

넙치, *Paralichthys olivaceus*를 이용한 toltrazuril의 안전성 평가: 급성독성, 약물 대사, 사이토카인 유전자 발현 및 생리학적 지표 분석

박상협* · 도정완**† · 조미영** · 김명석** · 김아란** · 김이경*†

*강릉원주대학교 수산생명의학과

**국립수산과학원 병리연구과

Effects of toltrazuril on olive flounder (*Paralichthys olivaceus*): Acute toxicity, Drug metabolism, Cytokine gene expression and Biochemical parameters

Sang Hyup Park*, Jeong-wan Do**†, Mi young Cho**, Myoung Sug Kim**,
Ah Ran Kim** and Yi Kyung Kim*†

*Department of Aquatic Life Medicine, Gangneung-Wonju National University, Gangneung 25457, Korea
**Pathology Division, National Institute of Fisheries Science, Busan 46083, Korea

The aim of this study was to examine the effect of toltrazuril on olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Sixty flounder (average weight 107.75 ± 8.48 g; average length 21.01 ± 1.13 cm) was randomly allocated into six groups, namely, 5, 10, 20, 50, 100 and 200 mg/kg. As measure of acute toxicity the LD₅₀ value of 108.904 mg/kg was obtained. Based on the results of the acute toxicity test, a range-finding test was conducted by intramuscularly injecting toltrazuril once daily for three consecutive days. The doses were as follows: [1] 20, 40, 60, 80 mg/kg (low-dose group) and [2] 100, 120, 150 mg/kg (high-dose group). Subsequently, gene expression analysis and biochemical test were performed, leading to the determination of the no observed adverse effect level (NOAEL) as 80 mg/kg. In conclusion, toltrazuril has a high toxicity in olive flounder, and further studies are required to more evaluate the toxicological mechanisms of toltrazuril. This study will provide essential data for assessing the safety and ecological risks of toltrazuril.

Key words: *Paralichthys olivaceus*, Toltrazuril, Acute toxicity, Range-finding test

서 론

1990년부터 양식이 시작되어 현재는 우리나라

대표 양식어종 중 하나인 넙치는 빠른 성장 속도와 함께 소비자들 사이 선호도가 높아 국내 양식 업계에서 중요한 품종으로 인식되고 있다(Jee et al., 2013). 또한 넙치의 생산량은 1990년과 비교하여 2023년 약 40배 증가한 39,931톤을 기록하였다(KOSIS, 2023). 하지만 양식 산업의 가파른 성장과 함께 제한된 양식 현장의 고밀도 사육을 비롯한 다양한 환경적 요인들이 복합적으로 작용하면서

†Corresponding author: Yi Kyung Kim & Jeong-Wan Do
Tel: +82-33-640-2409, Fax: +82-33-640-2955
E-mail: yikyung1118@gwnu.ac.kr
Tel: +82-51-720-2473, Fax: +82-51-720-2473
E-mail: microcims@korea.kr
These authors contributed equally.

병원체에 의한 질병 발생이 양식업의 생산성에 심각한 영향을 미친다(Cho et al., 2009; Krkošek, 2010). 이러한 문제를 해결하기 위한 체계적인 관리와 예방이 필수적인 과제로 대두되고 있으며, 일부 양식장에서는 양식 장비와 사육 시설의 소독, 약물 및 화학 물질을 이용한 병원체의 제거 등의 방법이 사용되고 있다(Rasowo et al., 2007; Opiyo et al., 2018).

쿠도아속(Genus *Kudoa*)은 주로 근육에 기생하며, 감염 시 근육, 신경계, 소화계, 신장에 낭종을 형성한다(Kim et al., 2018). 전 세계적으로 다양한 어류들이 이 기생충에 감염되며, 특히 상업적으로 중요한 어종인 대서양연어(*Salmo salar*), 유럽바다농어(*Dicentrarchus labrax*), 넙치(*P. olivaceus*) 등에 경제적인 피해를 끼친다(Whipps et al., 2003). 대부분의 쿠도아속 종은 인간에게 병원성이 없다고 알려졌으나, 2010년 한국에서 일본으로 수출된 넙치에서 *K. septempunctata* 감염이 최초로 보고되었고, 이후 일본에서 새로운 식중독의 원인으로 확인되었다(Matsukane et al., 2010; Song et al., 2013). *K. septempunctata*는 다른 쿠도아속 기생충과 달리 숙주의 근육 용해를 유발하지 않지만, 근육에 낭종을 형성한다(Kim et al., 2018). 이후 낭종 내에서 성숙한 기생충은 낭종이 터지면서 외부로 배출된다.

콕시듐증(Coccidiosis)은 주로 장, 담관 및 신세뇨관에 기생하는 점액포자충에 의하여 발생한다(Noack et al., 2019). 이 질병은 주로 가축과 가금류에서 흔한 기생충 질병 중 하나로, 80~100%의 높은 폐사율로 인하여 축산산업에 경제적 손실을 유발한다(Lopez-Osorio et al., 2020). Toltrazuril은 동물의 장에서 중간 대사산물인 toltrazuril 설펍사이드(toltrazuril sulfoxide) 형태를 거쳐 최종 대사산물인 toltrazuril 설펍(toltrazuril sulfone, ponazuril)으로 대사가 이루어진다(Pietruk et al., 2021). 이러한 toltrazuril은 구포자충(Genus *Eimeria*)의 분열생식(schizogony) 및 유성생식(gametogony)을 포함한 모든 세포 내 발달 단계에서 기생충의 증식을 억제하거나 사멸을 유도하는 효과를 나타내며, 가금류의 콕시듐증에 대한 면역 반응을 증강시킨다(Mehlhorn et al., 1984; Grief, 2000). 또한 toltrazuril은 점액포자충의 발달 단계 중 일부에서 기생충 세포질

에서의 공극화(vacuolization) 및 미토콘드리아의 구조적 손상과 같은 증상으로 독성을 나타낸다(Bermúdez et al., 2006). 따라서 toltrazuril은 치료 효과가 입증되어 있음에도 불구하고, 높은 독성을 가진 화합물이기 때문에 EU에서는 가축을 대상으로 한 최대 허용 잔류기준(maximum residue limits, MRLs)을 설정하여 관리하고 있다. 그러나 수산물에 대한 toltrazuril의 잔류 허용 기준은 설정되어 있지 않으며, 독성과 잔류의 문제는 여전히 고려해야 하는 중요한 사항이다. 특히 무독성량(no observed adverse effect level; NOAEL)을 결정하는 것은 비임상 안전성 연구에서 약물의 유해한 영향을 확인하고, 임상 시험에서의 안전 용량을 추정하는데 중요한 지표로 활용될 수 있기 때문에 toltrazuril의 안전성 평가에서 중요하다(Baird et al., 2019). NOAEL은 유해한 변화의 발생 여부를 포함하는 개념으로, 실험에서 약물이 생물학적, 조직병리학적인, 생화학적인 및 기능적 변화를 일으키지 않는 최대 농도 또는 용량을 나타내며, “유해한 변화”는 유해한 조직병리학적인, 생화학적인 및 기능적 변화로 정의된다(Kerlin et al., 2016). 넙치의 체내에서 나타날 수 있는 toltrazuril의 독성과 관련된 연구가 부족하기 때문에 이 약물이 넙치에 미칠 수 있는 정확한 독성 영향을 파악하는 데 한계가 있다. 특히, toltrazuril의 안전 용량과 잔류 기준을 설정하기 위한 연구가 선행되어야 하며, 이를 통하여 넙치 양식에서의 안전성을 확보하는 것이 중요하다.

본 연구에서는 넙치의 점액포자충을 치료할 수 있는 치료제로 주목받고 있는 toltrazuril을 이용하여 급성독성 시험을 통한 반수치사량(lethal dose 50; LD₅₀)을 측정하였다. 또한 toltrazuril의 독성 여부를 보다 정밀하게 평가하기 위하여 혈액생화학적인 분석을 진행하고, 간과 신장 조직에서의 약물대사 유전자(cytochrome P450 family 1 subfamily A; CYP1A, UDP-glucuronosyltransferase; UGT, Glutathione S-transferase; GST) 및 염증성 사이토카인 유전자(interleukin 1 beta; IL-1β)의 발현 수준을 조사하였다. 이를 바탕으로, 본 연구는 toltrazuril의 급성 독성을 평가하고, 대사 및 염증 반응에 대한 기초 데이터를 제공함으로써, 수산 양식업에서 toltrazuril의 안전한 사용 가능성을 제시하는 것을 목

표로 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

실험물질

본 연구에서 toltrazuril ($C_{18}H_{14}F_3N_3O_4S$, Purity ≥ 98%; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)은 시판되는 시약을 구매하여 사용하였다. Toltrazuril은 필요량을 측량한 후 dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich)에 용해시킨 후 각 용량에 맞춰 희석한 후 사용하였다.

실험동물 및 시험환경

실험에 사용한 넙치는 충청남도 태안의 한 양식장에서 구매하였으며, 평균 체중은 107.75 ± 8.48 g, 평균 체장은 21.01 ± 1.13 cm였다. 강릉원주대학교 해양과학교육원으로 육긴 후 실험어를 800 L 크기의 수조에 무작위로 배치하고, 2주일 동안 수조에 적응시킨 뒤 실험을 진행하였다. 실험을 시작하기 전 무작위로 선별한 넙치에서 세균검사 및 바이러스 검사를 통하여 감염여부를 확인한 후 건강한 넙치를 사용하여 실험을 진행하였다. 시판되는 넙치용 사료(Suhyup, Korea)를 하루에 1번 공급(체중의 약 2%)하였고, 샘플링 및 주사투여 24시간 전에는 사료 공급을 중단하였다. 실험 환경은 수온 18-21°C, 광 조건은 자연 광주기 조건으로 유지되었다. 용존 산소, 수온 등 실험수조의 환경은 실험을 진행하는 동안 매일 확인하였다. 본 실험은 강릉원주대학교 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인 하에 표준작업 지침서에 따라 수행하였다(Approval No. GWNU-2023-10).

급성독성 시험

본 연구에서는 OECD 급성독성 시험 가이드라인에 따라 넙치를 대조군과 약물 투여군으로 나누어 실험을 진행하였다. 급성독성 시험에서는 각 군당 최소 10마리 이상의 동물이 요구되며, 이는 통계적 신뢰성을 확보하기 위한 것으로 최소한의 샘플 수를 권장하는 것이다(OECD Guideline 203, 2019). 또한 본 연구는 약물 투여 후 96시간 동안 지속적으로 관찰하였으며, 이는 OECD 가이드라인에서

약물의 독성 반응을 충분히 평가할 수 있는 표준 관찰 기간으로 권장하고 있다(OECD Guideline 203, 2019). 본 연구에서는 toltrazuril (Sigma Aldrich)의 독성을 평가하기 위하여 사육환경에 적응시킨 넙치를 각 10마리씩 대조군과 약물 투여군으로 나누었다. 급성독성 시험에서 사용한 toltrazuril의 용량은 5, 10, 20, 50, 100 및 200 mg/kg이었으며, 대조군에는 동일한 용량의 DMSO만 투여하였다. 이 용량 범위는 급성 독성 시험을 위한 OECD 가이드라인에 따라 설정된 3단계 용량 설정 절차를 기준으로 하여 결정되었으며, 초기 용량인 5 mg/kg부터 시작하여 점진적으로 200 mg/kg까지 증가시켰다(OECD Guideline 423, 2001). 또한 투여를 진행하는 데 있어 넙치가 받을 수 있는 스트레스를 최소화하기 위하여 2-phenoxyethanol (JUNSEI, Tokyo, Japan)로 마취한 후 넙치의 복강 주변 근육 2곳에 주사 투여하였다. Toltrazuril은 각 용량에 맞춰 100 µl DMSO에 용해시킨 후 근육 내 주사를 통해 넙치에 처리하였고, 96시간 동안 지속적으로 관찰하였다. 관찰하는 중 물리적인 자극에 대한 반응이 없거나 아가미의 움직임이 없는 경우를 폐사한 것으로 판단하여 수조의 오염을 방지하기 위하여 즉시 제거하였다. 96시간 이후 toltrazuril에 의한 최종 폐사 개체를 바탕으로 하여 통계프로그램(probability analysis; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용하여 LD₅₀ 값을 산출하였다($p < 0.05$).

용량설정 시험

1) 시험 디자인

넙치에서 toltrazuril의 NOAEL을 결정하기 위해, 총 2회의 용량 설정 시험을 진행하였다. 용량설정 시험을 위한 투여용량은 넙치의 급성독성실험 결과인 LD₁₀=55.474 mg/kg, LD₅₀=108.904 mg/kg 및 Park et al. (2023)의 실험방법을 근거하여 [1] 20, 40, 60, 80 mg/kg; [2] 100, 120, 150 mg/kg으로 설정하고, 각 투여군에 대하여 6마리씩 주사투여하였다(Prieto et al., 2013; Cook et al., 2015; Park et al., 2023). Toltrazuril은 DMSO에 용해시켰고, 약물 투여는 1ml 주사기를 이용하여 각 용량 시험군에 100 µl 용량으로 복강 주변 근육 2곳에 나누어 투여하였다. 이때 용매대조군의 경우 같은 용량의 DMSO

를 근육 내 투여하였다. 약물 투여는 3일 연속 1일 1회 투여하였고, 약물 투여 후 매일 관찰하였으며, 체중은 약물 투여하기 전과 약물 투여 완료 후 각 1회씩 측정하였다. 급성독성 시험과 마찬가지로 폐사한 것으로 판단되는 개체는 수조에서 즉시 제거하였다.

2) 약물대사 및 염증성 사이토카인 유전자 발현 분석

Toltrazuril (Sigma Aldrich)이 넙치의 간 및 신장 조직에서 약물 대사 유전자 및 염증성 사이토카인 유전자 발현에 미치는 영향을 평가하기 위하여 마지막 주사투여일로부터 6일 후 넙치의 간 및 신장 조직을 샘플링 하였다. 이후 각 조직은 RNAiso Plus reagent (TaKaRa, Shiga, Japan)을 사용하여 균질화 하였고, total RNA를 추출한 후 Nanodrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, USA)를 사용하여 total RNA의 농도 및 품질을 확인하였다. cDNA는 PrimeScript RT Reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa)를 사용하여 합성하였고, 분석하기 전까지 -80°C에서 보관하였다.

지표로 선정된 유전자(CYP1A, GST, UGT, IL-1 β)의 발현량을 분석하기 위하여 Thermal Cycler Dice™ real-time PCR system (TaKaRa) 및 TB Green® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa)를 사용하였다. Real-time PCR 조건은 초기 변성으로 95°C에서 30초간 1 cycle을 진행한 후 95°C에서 5초, 60°C에서 30초를 하나의 cycle로 하여 40 cycles 진행하였다. 각 유전자

들의 mRNA 분석은 elongation factor 1alpha (EF1 α)로 각 시료를 normalization한 후 대조군과 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method를 이용한 fold change 값을 측정하였다 (Schmittgen and Livak, 2008). 실험에 사용한 primer는 Table 1에 나타내었다.

3) 혈액생화학적 분석

마지막 투여일로부터 6일 후 혈장 분석을 위하여 넙치의 꼬리 정맥에서 헤파린 처리되어 있는 주사기를 사용하여 혈액을 채취하여 혈장을 분리한 뒤 -80°C에서 분석을 실시할 때까지 보관하였다. Fuji-Dri Chem 4500 분석기기(Fujifilm, Tokyo, Japan)를 사용하였다. 분석은 alanine aminotransferase (ALT), total protein (TP), albumin (ALB), glucose (GLU), Blood urea nitrogen (BUN) 및 creatine (CRE) 총 6가지 항목에 대해 실시하였다.

통계분석

데이터는 평균 \pm SEM으로 표시하였으며, 통계 분석은 SPSS 25.0 software (SAS Inc.)를 사용하였다. 그룹 간의 유의미한 차이는 사후분석을 위한 One-way ANOVA test와 Tukey's HSD post hoc test의 다중 비교 검정을 사용해 결정되었고, $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의미한 것으로 판단하였다.

결 과

급성독성 시험

Table 1. Primer used in this study

Gene		Sequence (5' - 3')	Reference
Cytochrome P450, family 1, subfamily A (CYP1A)	FW	GACTTCATCCCTATCCTCCAGT	Jung et al., 2017
	RV	CCTCTCCTGTATCTCTGGGTAAG	
Glutathione S-transferase (GST)	FW	TCTGTCTGGACCTGTGTACCTG	Jung et al., 2017
	RV	GTTGGGAAAGTCTGAGAGGATGC	
UDP-glucuronosyltransferase (UGT)	FW	CTCTAATGAGTCGAGTGAAGGG	Cui et al., 2020
	RV	CATGAGTAGGACTCCACAACAG	
Interleukin 1 beta (IL-1 β)	FW	GACAGTGAGATGGTGCATTTC	Hur et al., 2013
	RV	ACCATCACTGGCCTGTTGTCT	
Elongation factor 1alpha (EF1 α)	FW	CGTGAGCGTGGTATCACCAT	XM_020104638.1
	RV	AGCCGATCTTCTTGATGTAG	

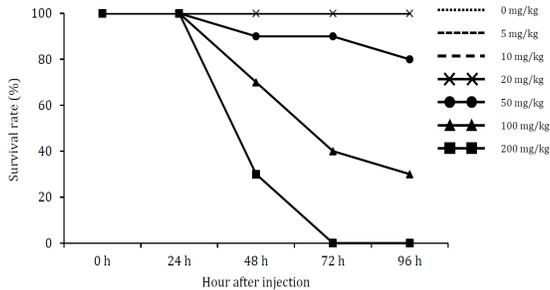


Fig. 1. Survival rate of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* exposed to toltrazuril.

실험 대상인 넙치를 toltrazuril에 96시간 동안 노출시킨 후 24, 48, 72, 96시간 동안 관찰하여 약물 투여 개체의 50%를 폐사시키는 용량인 LD₅₀ 값을 확인하였다. 실험기간동안 0, 5, 10 및 20 mg/kg 용량 실험군 넙치는 폐사하는 개체가 나타나지 않았고, 50, 100 및 200 mg/kg 용량 실험군 넙치가 농도 및 시간별 순차적으로 폐사하였다. 50 mg/kg의 용량구간에서는 48시간에 1마리, 96시간에 1마리 총 2마리 폐사하였다. 100 mg/kg의 용량구간에서는 48시간에 3마리, 72시간에 3마리, 96시간에 1마리 총 7마리가 폐사하였다. 200 mg/kg의 용량구간에서는 주사투여한지 48시간에 7마리, 72시간에 3마리가 폐사하여 72시간만에 모든 개체가 폐사하였다(Fig. 1). Probit analysis를 이용하여 산출된 넙치의 toltrazuril에 대한 LD₅₀ 값은 108.904 mg/kg이었다(Fig. 2).

용량설정 시험

1) 유전자 발현 분석

Toltrazuril을 용량에 따라 근육 내 주사투여한 후 유전자 발현 분석을 통하여 toltrazuril이 넙치에 어떠한 독성 영향도 미치지 않는 용량인 NOAEL을 결정하였다.

Toltrazuril의 넙치 내 독성을 평가하기 위하여 1차 용량설정 시험에서는 [20, 40, 60 및 80 mg/kg] 용량으로 하루 1회, 3일간 연속적으로 근육내 투여하였다. 마지막 약물 투여일로부터 6일 후 간 및 신장을 채취하여 각 조직의 약물대사 유전자 발현 변화를 분석하였다. 그 결과 간 및 신장 조직 모두에서 모든 약물대사 유전자(CYP1A, GST, UGT)는

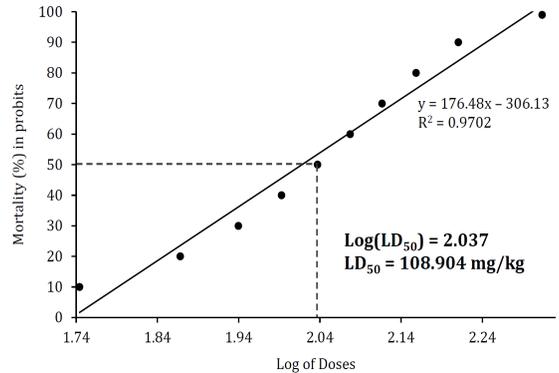


Fig. 2. Probit analysis for acute LD₅₀ determination of toltrazuril in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* after 96 hours.

DMSO만을 투여한 대조군과 비교하였을 때 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3. A, B).

Toltrazuril의 용량을 100, 120, 150 mg/kg으로 조정하여 두 번째 실험을 진행하였다. 가장 높은 용량인 150 mg/kg 투여군에서 6마리의 넙치 중 3마리가 폐사하였으며, 첫 번째 실험에서의 결과와 다르게 간 조직에서의 유전자 발현은 대조군과 비교하였을 때 모든 약물대사 유전자 및 사이토카인 유전자에서 유의적인 차이를 나타내었다(Fig. 3 C, E). Toltrazuril 투여 후 약물대사 유전자 발현량은 농도의존적으로 증가하였다. CYP1A는 대조군과 비교하였을 때 100 mg/kg 약물 투여군은 6.1배, 150 mg/kg 약물 투여군은 6.8배 유의적인 증가를 나타내었다. 또한 phase 2 약물대사 유전자인 GST는 대조군과 비교하였을 때 150 mg/kg 약물 투여군에서만 5.1배 유의적인 증가를 확인할 수 있었고, UGT는 120 mg/kg 약물 투여군에서는 6.4배, 150 mg/kg 용량 투여군에서는 6.6배 유의적으로 증가하였다.

신장 조직 내 phase 2 약물대사 유전자인 GST와 사이토카인 유전자인 IL-1β는 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3 D, E). 하지만 phase 1 약물대사 유전자인 CYP1A 및 UGT는 toltrazuril 용량이 높아짐에 따라 발현량도 함께 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3 D). CYP1A는 대조군과 비교하였을 때 150 mg/kg 용량 투여군에서 4.8배 유의적인 증가를 나타내었다. 또한 UGT 유전자는 대조군과 비교하였을 때 100 mg/kg 용량 투여군은 5.1배,

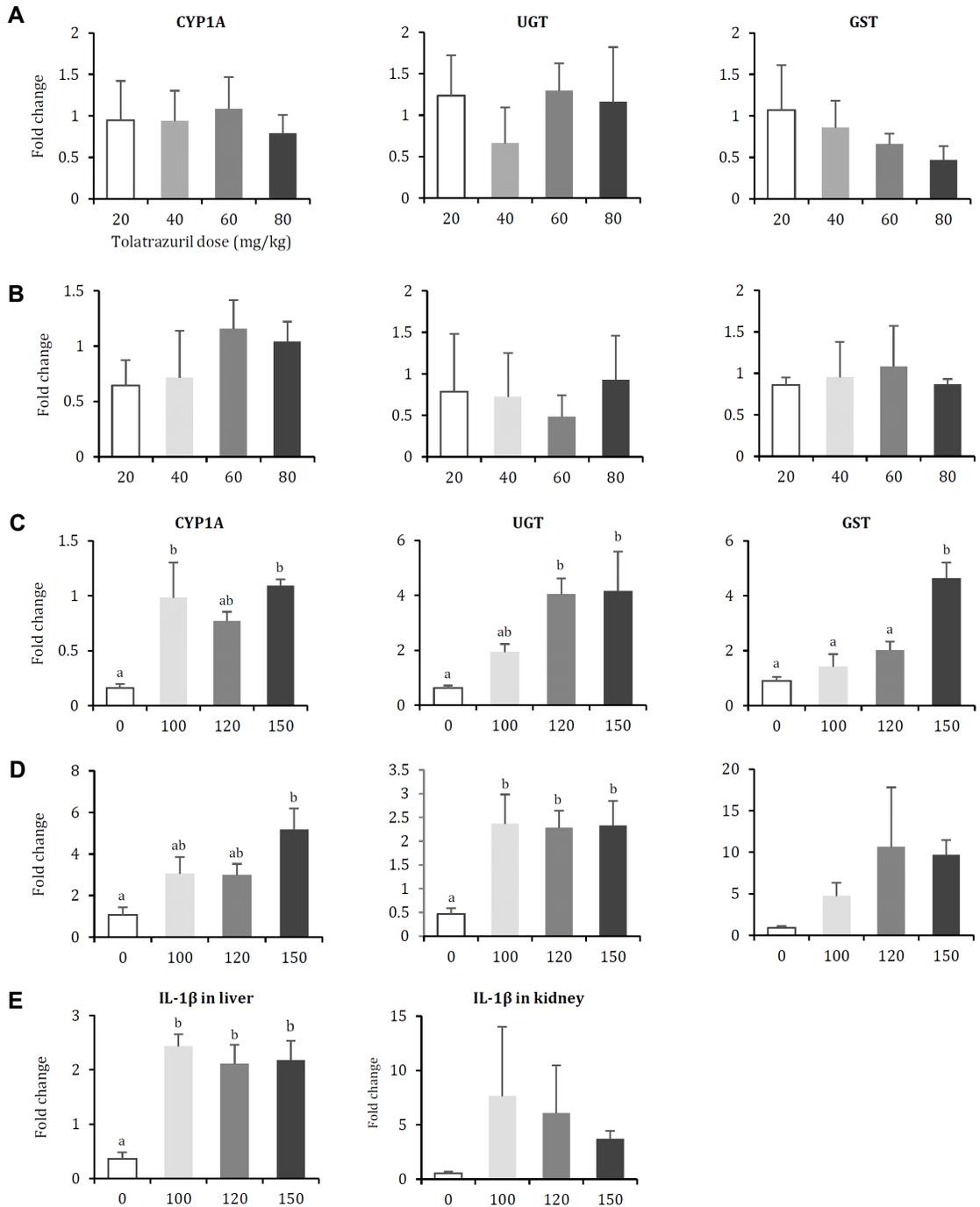


Fig. 3. Effect of toltrazuril on drug metabolism genes (CYP1A, GST, UGT) and cytokine gene (IL-1 β) expression in the kidney and liver of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, at varying toltrazuril doses for three days. Figures A and B show the effects at 20, 40, 60, and 80 mg/kg, while Figures (C, D) represent the effects at 100, 120, and 150 mg/kg. Figure E represents the expression of IL-1 β in the liver and kidney. Data represent the mean \pm standard deviation. The mean values with different letters are statistically significant ($p < 0.05$).

120 mg/kg 용량 투여군은 4.9배 그리고 150 mg/kg 용량 투여군은 5배 유의적인 증가를 나타내었다.

2) 혈액생화학적 분석

혈액생화학적 조사는 어류의 생리적인 상태 및 건강을 평가하는데 주로 사용되는 방법 중 하나이다(Grant, 2015; Fazio, 2019). 혈액생화학적 조사에서는 ALT, TP, ALB, GLU, BUN 및 CRE를 측정하였다(Fig. 4). ALT, GLU, BUN 및 CRE 수치는 toltrazuril의 용량이 증가함에 따라 함께 증가하는 경향을 보였고, 반면 TP 및 ALB 수치는 toltrazuril의 용량이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. ALT, GLU, BUN 및 CRE 수치는 무처치군 및 대조군과 비교하였을 때 150 mg/kg 용량 투여군에서만 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4 A, C, E, F). 이때 150 mg/kg 용량 투여군은 대조군과 비교하였을 때, ALT는 1.5배, GLU는 1.4배, BUN은 2.6배 그리고 CRE는 1.3배 높은 수치였다. TP 및 ALB 수치의 경우 무처치군 및 대조군과 비교하

였을 때 150 mg/kg 약물 투여군에서 유의한 감소를 나타내었다(Fig. 4 B, D). 이는 150 mg/kg 용량 투여군과 대조군을 비교하였을 때, TP는 1.5배, ALB는 1.8배 낮은 수치를 보였다.

고 찰

넙치에 대한 toltrazuril의 급성독성 및 약물대사 유전자 발현 분석 실험을 진행하기 위해서 toltrazuril의 용매로써 DMSO를 사용하였다. DMSO는 일반적으로 적혈구와 같은 혈구(hemocyte), 섬유아 세포(fibroblast) 등에서 세포 독성을 나타내는 것으로 알려져 있으나, 동물에 대한 전체적인 독성이 낮은 편이다(Yi et al., 2017; Gallardo-Villagrán et al., 2022). 어류의 배아를 이용하는 시험에서는 시험 동물에 대한 낮은 독성과 배아의 chorion을 손상시키지 않으면서 투과할 수 있어 일반적으로 사용하는 용매이다(Kais et al., 2013). 동물 시험에서도 DMSO는 통상적인 용매로써 사용되고 있다(Pelzel

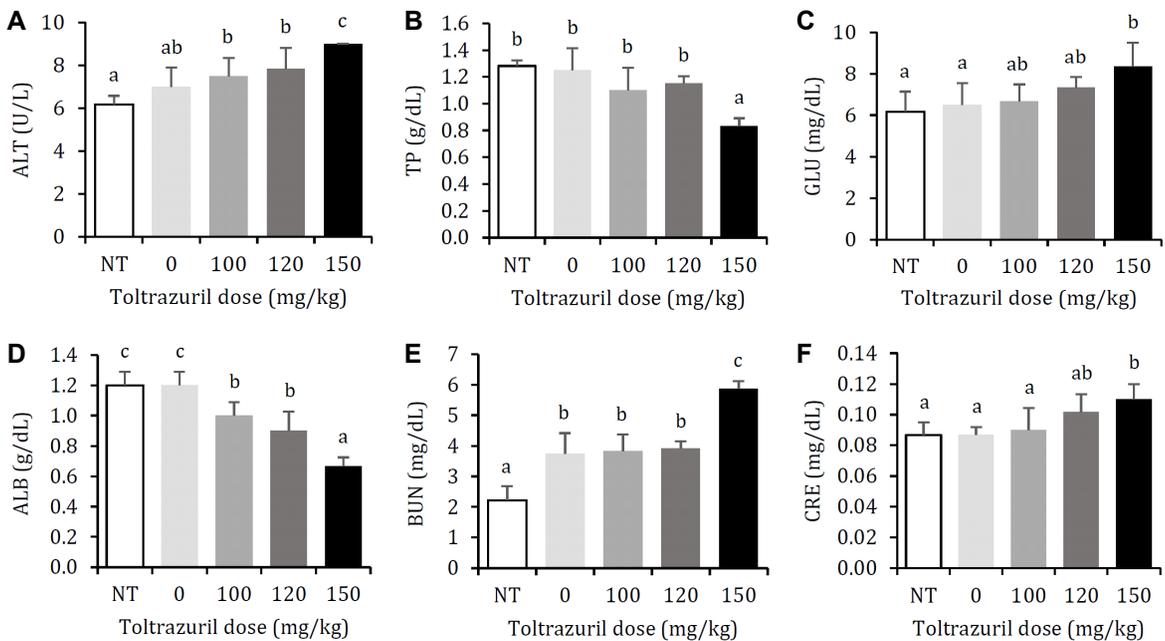


Fig. 4. Effect of toltrazuril on hematological parameters (A; ALT, B; TP, C; GLU, D; ALB, E; BUN, F; CRE) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Data represent mean \pm standard deviation; The mean values with different letters are statistically significant ($p < 0.05$). ALT; alanine aminotransferase, TP; total protein, GLU; glucose, ALB; albumin, BUN; blood urea nitrogen, CRE; creatine.

et al., 2012; Sun et al., 2012; Galvao et al., 2014; Cevallos et al., 2017). 본 연구를 진행하는 동안 용매 대조군에서 폐사하는 개체가 발생하지 않았으며, 이는 DMSO가 넙치에 미치는 영향이 매우 미미함을 시사한다. 따라서 DMSO의 독성이 실험에 실질적인 영향을 미치지 않는다고 판단하였고, toltrazuril을 독성시험의 용매로 사용하기에 적합하다고 판단하였다.

본 연구에서 진행한 넙치의 급성독성시험 결과 LD₅₀ 값은 108.904 mg/kg으로 측정되었다. 이 값은 기존에 쥐와 닭에서 보고된 LD₅₀ 값인 1600~5000 mg/kg 범위에 비해 현저히 낮은 수치로, toltrazuril이 넙치에서 높은 독성을 나타낸다는 것을 시사한다(Healthcare, 2003; Mitchell, 2008). 본 연구의 결과와 다르게 경구 투여 경로를 사용한 실험의 결과이지만, 수생 환경에 서식하는 넙치는 쥐 및 닭과 비교하였을 때 최소 14.7배, 최대 45.9배 더 높은 독성을 나타내었다. 이는 수생 환경에서 살아가는 넙치가 다른 육상 동물들과 비교하여 약물의 흡수 및 대사 과정에서 차이를 보이기 때문이다(Owen et al., 2007). 예를 들어, 넙치와 같은 수생동물은 수중 환경에서 독성 물질에 지속적으로 노출되며, 물속에서 용해된 물질을 더 많이 흡수할 수 있어 독성이 더 강하게 나타날 수 있다. 추가로 이전 넙치를 대상으로 하여 점액포자충 치료제로써 toltrazuril과 함께 널리 사용되고 있는 약품 중 하나인 amprolium hydrochloride 약물을 이용하여 넙치의 급성독성을 진행한 결과 LD₅₀ 값을 141.18 mg/kg으로 확인하였다(Park et al., 2023). 이 값을 toltrazuril의 LD₅₀ 값인 108.904 mg/kg과 비교하였을 때, toltrazuril이 amprolium hydrochloride보다 약 0.7배 더 높은 독성을 가지는 것으로 판단된다. 이전 연구에서는 *K. septempunctata* 포자(spore)에 대하여 항기생충 약물인 amprolium과 toltrazuril의 효과를 비교 및 분석하였다(Ahn et al., 2017). 그 결과 amprolium은 toltrazuril에 비하여 더 강력한 항기생충 효과를 보였으며, 포자의 크기 감소 및 구조적 변화를 유도하였다. 또한 최소저지농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 값도 amprolium이 낮아 더 효과적인 약물로 평가되었다. 하지만 이 연구는 *in vitro* 실험에 초점을 맞추었기에, *in vivo* 연구에서

두 약물에 대한 어류 숙주에 미치는 영향은 상이할 수 있다. 본 연구결과와 비교한 결과 미성숙 포자나 다른 발달 단계에서의 약물 효과가 다를 수 있기 때문에 추가적인 연구가 필요한 것으로 보인다. 따라서 *K.septempunctata*의 치료를 위한 약물을 선택할 경우, toltrazuril의 독성에 대한 통찰이 필요하며, 이에 대한 추가적인 독성 연구가 반드시 이루어져야 한다.

Toltrazuril과 같은 트리아진(triazine) 계열 약물은 친유성 특성을 가지고 있어 경구 투여 시 위장관에서 빠르게 흡수되고, 이후 전신 순환계로 분포되는 것으로 알려져 있다(Dirikolu et al., 2009). 그러나 *K. septempunctata*는 넙치의 근육 조직에 기생하는 점액포자충이며, 넙치 근육에는 많은 혈관이 분포하고 있어 약물이 빠르게 흡수될 수 있다(Yin et al., 2015). 경구투여는 약물이 위장을 거쳐 흡수되고, 이후 혈류로 유입되기까지 시간이 걸리기 때문에 약리 효과가 늦게 나타날 수 있는 반면, 근육 내 직접적인 주사투여는 약물이 위장관을 통과하지 않고, 직접 혈류로 빠르게 흡수되는 특성을 가진다(Hodge et al., 2021). 이러한 특성 덕분에 근육 내 주사투여는 약물이 신속하게 전신 순환계로 유입되며, 약리학적 효과가 더 빠르고 강력하게 나타날 수 있다. 따라서 본 연구에서는 toltrazuril의 빠른 흡수와 효과적인 전달을 위하여 넙치의 근육에 주사투여하여 실험을 진행하였다.

용량설정 시험은 실험을 통하여 어떠한 약물 또는 화합물의 적정 농도 범위를 파악하기 위한 실험이다(Woodward et al., 2020). 주로 화학물질이나 독성 물질이 식물 또는 동물에 미치는 영향을 평가할 때 사용하며, 이 시험의 목적은 물질이 일정 농도에서 독성 효과를 나타내는지 확인하고, 이를 바탕으로 추가 실험에 사용할 적정 용량 또는 농도를 설정하는 것이다(Woodward et al., 2020). Toltrazuril의 투여 용량을 설정하기 위하여 독성시험을 실시할 때는 필요한 실험적 방법 및 기준이 필요하다. 이를 위하여 문헌 조사 및 기존 연구를 바탕으로 real-time PCR을 활용한 약물 대사 유전자 발현 분석 결과를 용량설정의 지표로 하여 실험을 진행하였다. 본 연구에서는 독성시험을 바탕으로 설정한 용량의 toltrazuril을 근육 내 주사투여한 후 약물

대사 유전자의 조직별 발현량을 분석하였다. 그 결과 약물대사 유전자의 조직별 발현은 저용량 투여군(20, 40, 60, 80 mg/kg)은 유의한 차이를 보이지 않았지만, 고용량 투여군(100, 120, 150 mg/kg)은 용량에 의존하여 약물대사 유전자 및 사이토카인 유전자의 발현량이 증가하는 것을 확인하였다. 신장 조직 내에서 대조군과 비교하였을 때 phase 1 약물대사 유전자인 CYP1A의 mRNA 발현은 150 mg/kg 용량 투여군에서 높았으며, phase 2 약물대사 유전자인 UGT는 대조군과 비교하였을 때 모든 toltrazuril 투여군에서 높은 발현량을 보였다.

CYP1A는 약물 대사에 중요한 역할을 하는 효소로, 다양한 독성 물질이나 약물이 체내에서 대사될 때 활성화된다(Klomp et al., 2020). 따라서 toltrazuril이 간 및 신장에서 대사되는 메커니즘을 이해하기 위하여 CYP1A의 조직별 발현량을 확인하였으며, 이는 toltrazuril의 대사 경로를 파악하고 독성 반응을 평가하는 데 필수적이다. 또한 UGT 및 GST는 phase 2 약물대사 효소로써, 약물이 체내에서 독성 물질로 전환되는 것을 막고, 쉽게 배설될 수 있도록 전환하는 역할을 한다(Jancova et al., 2010). 즉 toltrazuril이 체내에서 독성을 유발할 가능성이 있기 때문에, UGT 및 GST 유전자의 발현을 통하여 약물의 대사 과정과 해독 과정을 확인하였다. 마지막으로 염증 반응을 유도하는 IL-1 β 를 확인함으로써 toltrazuril이 넙치의 간 및 신장 조직에서 염증 반응이 일어나는지 확인하였다(Arlov et al., 2017).

이러한 결과는 간 조직에서 더 뚜렷하게 나타났는데, 간 조직 내에서 phase 1 약물대사 유전자로, 약물이거나 외인성 물질(xenobiotics)을 전환하여 물에 더 잘 용해되는 형태로 바꾸어 배출을 용이하게 하는 CYP1A 효소의 유전자 발현은 대조군과 비교하였을 때 100 mg/kg 및 150 mg/kg 용량 투여군에서 증가하였다. 이전 streaked prochilod (*Prochilodus lineatus*)를 대상으로 하여 발암물질인 벤조(a)피렌(Benzo[a]pyrene)을 처리하였을 때 간과 신장에서 CYP1A의 발현이 증가하였고, 이를 해독 반응의 결과로 보고하였다(Santos and dos Reis Martinez, 2020). 본 연구의 결과 또한 toltrazuril을 처리한 후 간 및 신장에서 CYP1A의 발현이 증가하는 것을

확인할 수 있었으며 toltrazuril의 해독 반응 결과로 판단하였다. 일반적으로 CYP1 계열 효소의 활성화는 다환 방향족 탄화수소와 같은 독성 및 환경 오염 물질이 발암성 대사 산물로 변환되는 생체 활성화와 관련이 있다(Korashy et al., 2016). 간은 어류에서 CYP1A 발현의 주요 조직으로, 화학 물질의 대사 경로에서 중요한 역할을 하기 때문에 수많은 연구에서 수생환경 오염의 생물학적 지표(biomarker)로 사용되고 있다(Moore et al., 2003; Oh et al., 2008; Uno et al., 2012). 하지만 CYP1 효소의 활성화는 항상 외부 물질의 해독을 촉진하는 것은 아니므로, CYP1만을 독성의 바이오마커로 사용하는 데에는 한계가 있다고 판단하였고, 이에 따라 보다 포괄적인 바이오마커로 사용되는 Phase 2 약물대사 효소인 GST와 UGT의 유전자 발현량을 분석하였다(Dacari et al., 2018; Santos and dos Reis Martinez, 2020).

Phase 2 약물대사는 외부 화학 물질, 특히 독성 물질을 변형하여 체내에서 수용성을 증가시키고, 배출을 촉진하는 과정이다. 이 과정에서 중요한 역할을 하는 효소는 GST, UGT를 포함하여, sulfotransferase (SULT), N-acetyltransferase (NAT) 등이 있다(Jancova et al., 2010). GST와 UGT는 주로 약물의 해독 및 배설 촉진에 중요한 역할을 하며, SULT와 NAT는 화합물의 활성을 조절하고 호르몬 대사에서 중요한 기능을 한다(Jancova et al., 2010). 특히 SULT 및 NAT는 선택적 독성 및 호르몬 조절에 중요한 역할을 하는 반면, GST 및 UGT는 화합물의 수용성을 증가시켜 배설을 촉진하게 된다. 따라서 본 연구에서는 toltrazuril 약물의 해독과 배설에 중요한 역할을 할 것이라 예상되는 GST와 UGT를 phase 2 약물대사 표적 유전자로 설정하였다. GST 및 UGT는 공통적으로 150 mg/kg 용량 투여군에서 증가하는 것을 확인하였다. 피렌(Pyrene)은 유기화합물의 불완전 연소 시 생성되는 다환 방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)로, 국제 암 연구소(International Agency for Research on Cancer)에서는 이를 3군 발암물질로 분류한다(Barron et al., 2004). 이전 Chinese rare minnow (*Gobio-cypris rarus*)을 100 mg/L의 피렌에 노출시킨 경우 간 조직에서 GST 및 UGT의 발현이 증가하였다

(Yuan et al., 2014). 이 외에도, 다양한 환경 오염물질에 의한 효소의 발현 유도 및 조절 메커니즘은 killifish, red mullet 및 nile tilapia에서도 보고되었다. 예를 들어 killifish에서는 PAH에 의한 GST의 유도가 관찰되었고, red mullet에서는 독성 반응을 유도할 수 있는 β -naphthoflavone이 GST 유전자의 발현을 증가시킨 것으로 보고되었다(Olinga et al., 2008; Christine Paetzold et al., 2009). 또한 nile tilapia에서는 벤조(a)피렌이 GST의 유도 효과를 나타내었고, 본 연구의 결과는 이러한 이전 연구들과 일치하는 결과를 나타낸다(Costa et al., 2012). GST 및 UGT와 같은 phase 2 약물대사 효소는 생체이물(xenobiotics)의 생체 내 변환과 돌연변이 및 발암에 대한 세포 보호에서 중요한 역할을 한다(Refat et al., 2008). 이와 관련하여 GST 및 UGT는 각각 전자친화적 화합물을 glutathione 또는 glucuronic acid와 결합시켜 물에 더 잘 용해되도록 하여, 화합물이 담즙이나 신장을 통하여 배설될 수 있게 돕는다(Townsend and Tew, 2003; Iyanagi, 2007). 본 연구의 GST 및 UGT 유전자 발현의 증가는 간이 외부 화학물질에 대한 해독 반응을 활성화하려는 생리적 적응 반응으로 해석할 수 있으며, 이를 통하여 간이 유해 물질을 변형하고 배출하는 해독 경로를 활성화시킨 것으로 판단하였다.

추가적으로 고용량 투여 실험에서는 IL-1 β 의 조직 특이적 발현을 분석한 결과, 간 조직 내에서 toltrazuril을 투여한 모든 실험군이 통계적으로 유의미하게 높은 발현량을 보였다. 이전 제브라피쉬(*Danio rerio*)를 살균제로 사용하는 카르벤다짐(carbendazim)을 0, 4, 20, 100 및 500 μ g/L 농도로 침지시켰을 때 100 및 500 μ g/L 농도에 노출된 경우 IL-1 β 의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(Jiang et al., 2015). 어류에서 IL-1 β 는 대식세포의 활성화를 유발하는 면역 조절에 관여하여 염증 반응, 호흡 활동, 식균 작용 및 산화질소의 생성을 증가시킨다(Taffalla et al., 1999). 즉 이러한 결과는 toltrazuril과 같은 외부 독성 물질에 의한 염증 반응으로 IL-1 β 와 같은 염증 유도 사이토카인이 증가했을 가능성을 나타낸다.

간 및 신장 내에서 약물대사 유전자 및 사이토카인 유전자 발현 분석과 함께 혈액생화학적 분석을

함께 진행하여 toltrazuril이 넙치에 미치는 독성을 함께 평가하였다. 혈액생화학적 분석은 어류의 생리적 상태와 건강 상태를 평가하기 위해 흔히 사용하는 방법 중 하나로, 생화학적 바이오마커인 glucose, total protein 및 다양한 효소들은 어류의 스트레스 지표로도 자주 사용된다(Osman et al., 2010; Grant, 2015; Docan et al., 2018; Fazio, 2019). 본 연구에서 toltrazuril을 넙치에 주사 투여 후 혈장 분석을 진행하였고, 지표들의 수치는 toltrazuril 용량의 존적으로 변화하였다. ALT는 일반적으로 간, 심장, 신장 및 근육 등 다양한 조직의 세포 내에 존재하는 nonplasma-specific에 속한다. 간 손상의 지표로 널리 사용되는 ALT는 주로 간 조직에 존재하며, 간 손상의 신뢰성 있는 지표로 활용될 수 있다. Gabriel et al. (2009)은 *Lepidogathis alopecuroides* (*Teliostachya alopecuroidea*) 잎의 추출물에 노출된 *Clarias gariepinus*에서 ALT가 증가하는 것을 보고하였고, 이러한 증가는 시트르산 회로(Citric acid cycle)의 장애로 인한 것으로 보고하였다. 특히 ALT의 증가는 이 식물 추출물이 유발한 간 손상을 나타낸다고 추가로 설명하였다. 본 연구의 결과 또한 이전 보고된 연구들과 동일하게 toltrazuril을 투여하였을 때 100 mg/kg 투여군부터 유의적인 증가가 관찰되었으며, 150 mg/kg 용량 투여군에서는 가장 높은 수치를 나타내었다. 이러한 결과로 보았을 때 toltrazuril을 투여한 후 넙치의 간 조직이 손상되었다고 판단할 수 있다.

혈장 내 GLU 수치는 다양한 스트레스 요인에 민감하게 반응하기 때문에, 어류의 건강 상태를 평가하는 중요한 생화학적 지표로 사용된다(Polakof et al., 2011). 이전 메기과 어류인 가이양(*Pangasiodon hypophthalmus*)을 중금속인 크롬(20, 30 및 40 mg/L)에 노출시킨 경우 혈장 내 GLU 수치가 대조군과 비교하였을 때 유의하게 증가하였다. 이는 스트레스에 의하여 카테콜아민 및 글루코코르티코이드 호르몬의 분리를 촉진하여 혈장 내 GLU 수치가 증가한 것으로, 스트레스 호르몬 분비를 자극하여 고혈당을 유발하고, 이를 통하여 어류가 높은 에너지 수요를 충족시키려 한 반응으로 보고하였다(Xu et al., 2021). 본 연구에서 넙치의 혈장 내 GLU 수치가 증가한 것은 toltrazuril 투여에 의한

스트레스 반응으로 해석할 수 있다.

어류에서 BUN은 암모니아 다음으로 중요한 질소 배설물로, 종종 신장 기능 장애의 지표로 활용되며, 혈장 내 BUN 농도의 증가는 신장 손상에 의해 발생할 수 있다(Bernet et al., 2001; Burtis and Bruns, 2014). 또한 CRE는 크레아틴 인산을 이용하여 ADP가 인산화되면서 생성되는 노폐물로, 혈장 내 CRE 농도의 증가는 신장 기능 장애를 반영할 수 있다(Burtis and Bruns, 2014). Zhang et al. (2007)은 남세균에 의해 생성되는 독소인 마이크로시스틴(microcystin)을 붕어(*Carassius carassius*)에게 각각 50 및 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 용량으로 복강내 투여하였으며, 그 결과 두 용량 군 모두에서 혈장 내 BUN과 CRE 수치가 유의미하게 증가한 것으로 나타났다. 이러한 결과는 붕어의 신장 기능 장애를 나타내는 지표로 해석될 수 있다. 유사하게, 본 연구에서 넙치에 toltrazuril을 주사 투여한 결과 혈장 내 BUN 및 CRE 수치의 증가를 확인할 수 있었는데, 이는 신장 기능 장애를 시사하는 결과로 판단된다.

혈중 TP는 어류에 있어 부정적인 영향의 바이오마커로 사용되며, 어류 건강 상태를 평가하는 중요한 수단으로 사용된다(Kovyrshina and Rudneva, 2012). 혈액에는 다양한 대사 산물과 외인성 화학물질을 운반하고 감염으로부터 어류를 보호하며 다른 신체 기능에 도움을 주는 다양한 유형의 단백질이 포함되어 있다. 혈중 TP의 대부분을 구성하는 알부민은 간 건강 상태를 평가하는 데 사용되는 혈액의 구성 요소이다(Sunmonu and Oloyede, 2007). 이전 잉어(*Cirrhinus mrigala*)를 살충제로 사용되는 다이아지논(diazinon) 두 가지 농도(0.815 및 1.63 mg/L)에 노출시킨 결과 TP 및 ALB 수치가 유의하게 증가한 것을 확인하였고, 이러한 변화를 다이아지논에 의하여 잉어의 생리적 변화가 유발되었으며, 최종적으로는 생존에 잠재적인 영향을 미칠 수 있다고 보고하였다(Haider and Rauf, 2014). 또한 나일 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)를 1.95 및 3.9 ppm 농도의 은나노입자(silver nanoparticle)에 노출시킨 경우 혈장 내 ALB 및 TP의 수치가 감소하였다(Ibrahim, 2020). 이러한 결과는 은나노입자 중독으로 인한 높은 에너지 수요로 인하여 대체 에너지원으로 사용되기 때문이라고 보고하였으며, 추가적

으로 단백질 합성에 있어 장애를 유발한 것으로 판단하였다. 본 연구에서 넙치에 toltrazuril을 투여한 후 ALB 및 TP의 수치가 감소하고 신뢰도 높은 간손상 지표인 GPT 감소를 종합적으로 검토한 결과 toltrazuril이 넙치 내에서 간독성을 유발하였다고 판단하였다. 용량설정 시험을 진행하기 위해서 통계적 혹은 생물학적으로 유의적인 변화를 평가하기 위한 방법이 필요하다. 이러한 방법에는 qRT-PCR을 이용한 mRNA 정량, 효소 활성 측정 및 western blot 등이 알려져 있다. 특히 2012년 미국 FDA 가이드선에서는 CYP 효소 유도평가방법에 대해 mRNA를 이용한 northern blot과 RT-PCR을 추천하는 수정안을 제시하였으며, 어류 면역 독성 시험 평가 방법 중에서 RT-PCR을 이용한 mRNA 정량법이 우위적으로 사용되고 있다(Rehberger et al., 2017; Bailey et al., 2019). 이러한 근거로 하여 본 연구에서는 RT-PCR을 이용한 mRNA 정량법을 선택하여 실험을 진행하였다. 넙치에 toltrazuril을 투여한 결과 후 ALB 및 TP 수치의 감소, 신뢰도 높은 간 손상 지표인 ALT 감소, 약물대사 유전자 발현 등을 종합적으로 검토하여 toltrazuril이 넙치 내에서 간독성을 유발하였다고 판단하였다. Gesek et al. (2015)은 메추라기(*Coturnix japonica*)에서 toltrazuril이 간과 신장에 독성 병리학적 변화를 유발했다고 보고하였다. 또한 31.4g의 파쿠(*Piaractus mesopotamicus*)를 실험동물로 사용하여 5일 동안 3.0 mg/L 농도의 toltrazuril에 침지시켰을 때 간 조직 내의 모세혈관 울혈 및 간세포 비대가 관찰되기도 하였다(Carraschi et al., 2017).

본 연구의 결과 넙치에서 toltrazuril의 LD₅₀ 값은 108.904 mg/kg으로 나타났고, 이를 바탕으로, 용량 설정 시험을 통하여 넙치 체내에서 어떠한 독성 영향도 나타내지 않는 최대값인 NOAEL을 80 mg/kg으로 판단하였다. 이는 toltrazuril이 넙치에서 80 mg/kg 이하의 농도에서 독성 반응을 일으키지 않음을 의미하며, 안전한 사용 범위에 대한 중요한 기준을 제공하는 결과이다. 또한 본 실험에서는 넙치를 대상으로 3일간 반복투여를 진행하였기에, 단회 투여에 따른 독성 반응에 대한 추가적인 연구가 필요하다. 단회 투여에 의한 독성 효과와 반복 투여가 초래할 수 있는 장기적인 독성 반응은 다를

수 있기 때문에 단회 투여의 독성 평가도 필요하다. 반복투여와 단회 투여 간의 차이를 비교하는 연구를 통해 toltrazuril의 독성 메커니즘에 대한 보다 명확한 이해를 제공할 수 있을 것이다. 이후 추가적인 연구에서는 toltrazuril의 독성 메커니즘을 보다 구체적으로 규명하기 위하여 세포 생리학적 반응, 생화학적 반응 및 조직 손상 정도 등을 평가하는 실험이 필요하다. 특히 toltrazuril의 생리적 및 생화학적 경로를 확인하여, 넘치뿐 아니라 다른 수생 생물에 미칠 수 있는 영향을 평가해야 한다. 이와 같은 후속 연구들은 toltrazuril의 안전성 및 생태학적 위험을 평가하는데 중요한 기초 자료가 될 것이다.

요 약

본 연구에서는 넘치(*Paralichthys olivaceus*, average weight 107.75 ± 8.48 g; average length 21.01 ± 1.13 cm)를 대상으로 toltrazuril의 급성독성시험을 실시하였고, 5, 10, 20, 50, 100 및 200 mg/kg으로 용량을 설정하여 1회 주사투여하였다. 실험을 진행하는 도중 50 mg/kg 이상의 용량에서 폐사하는 개체가 발생하였으며, 50 mg/kg에서는 2마리, 100 mg/kg에서는 7마리, 200 mg/kg에서는 10마리가 모두 폐사하였고, LD₅₀ 값은 108.904 mg/kg이었다. 이후 급성독성시험의 결과를 참고로 한 용량설정시험은 하루에 1회, 3일 동안 연속으로 toltrazuril을 근육 내 주사투여하였으며, 다음과 같은 용량으로 실시하였다; [1] 20, 40, 60, 80 mg/kg (저용량 시험군), [2] 100, 120, 150 mg/kg (고용량 시험군). 이후 유전자 발현 분석 및 혈액생화학적 분석의 결과를 통하여 무독성량(No observed adverse effect level, NOAEL)을 80 mg/kg으로 결정하였다. 결론적으로 toltrazuril은 넘치의 체내에서 높은 독성을 나타내며, 추가적인 연구를 통해 toltrazuril의 독성 메커니즘을 보다 구체적으로 평가할 필요가 있다. 또한 본 연구는 toltrazuril의 안전성 및 생태학적 위험을 평가하는데 중요한 기초 자료가 될 것이다.

사 사

이 논문은 국립수산과학원(P2024027, 넘치쿠도 아층 저감화 연구)의 지원에 의해 진행되었음.

References

- Ahn, M., Won, S., Kang, B., Gong, P., Yoo, E., Dhara-
anedharan, S. and Jang, Y.: In vitro effect of two
commercial anti-coccidial drugs against myxospores
of *Kudoa septempunctata* genotype ST3 (Myxozoa,
Multivalvulida). *Parasite*, 24, 2017. [https://doi.org/
10.1051/parasite/2017012](https://doi.org/10.1051/parasite/2017012)
- Arlov, Ø., Öztürk, E., Steinwachs, M., Skjåk-Bræk, G.
and Zenobi-Wong, M.: Biomimetic sulphated algi-
nate hydrogels suppress IL-1B-induced inflamma-
tory responses in human chondrocytes, 2017. [https://
doi.org/10.22203/ecm.v033a06](https://doi.org/10.22203/ecm.v033a06)
- Bailey, C., von Siebenthal, E.W., Rehberger, K. and
Segner, H.: Transcriptomic analysis of the impacts
of ethinylestradiol (EE2) and its consequences for
proliferative kidney disease outcome in rainbow
trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Bio-
chemistry and Physiology Part C: Toxicology &
Pharmacology*, 222, 31-48, 2019. [https://doi.org/10.
1016/j.cbpc.2019.04.009](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2019.04.009)
- Baird, T.J., Caruso, M.J., Gauvin, D.V. and Dalton, J.A.:
NOEL and NOAEL: a retrospective analysis of men-
tion in a sample of recently conducted safety phar-
macology studies. *Journal of Pharmacological and
Toxicological Methods*, 99, 106597, 2019. [https://doi.
org/10.1016/j.vascn.2019.106597](https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.106597)
- Barron, M.G., Heintz, R. and Rice, S.D.: Relative po-
tency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon
receptor agonists in fish. *Marine environmental re-
search*, 58(2-5), 95-100, 2004. [https://doi.org/10.10
16/j.marenvres.2004.03.001](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2004.03.001)
- Bermúdez, R., Alemañ, N., Vigliano, F., Vázquez, S.,
Quiroga, M.I. and Nieto, J.M.: Effects of symmetric
triazinone (toltrazuril) on developmental stages of
Enteromyxum scophthalmi parasitizing turbot (*Scop-
hthalmus maximus* L.): a light and electron micro-
scopic study. *Aquaculture*, 254(1-4), 65-71, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.042>
- Bernet, D., Schmidt, H., Wahli, T. and Burkhardt-Holm,
P.: Effluent from a sewage treatment works causes
changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo
trutta* L.). *Ecotoxicology and environmental safety*,

- 48(2), 140-147, 2001. <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.2012>
- Burger, M.A.A., Barnes, A.C. and Adlard, R.D.: Wildlife as reservoirs for parasites infecting commercial species: host specificity and a redescription of *Kudoa amamiensis* from teleost fish in Australia. *Journal of Fish Diseases*, 31(11), 835-844, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2008.00958.xr>
- Burtis, C.A. and Bruns, D.E.: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics-E-Book: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics-E-Book. Elsevier Health Sciences, 2014.
- Carraschi, S. P., Florêncio, T., Ignácio, N. F., Ikefuti, C. V., Cruz, C., & Ranzani-Paiva, M. J. T. (2017). Hematological and histopathological assessment of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) after treatment of pathogens with veterinary medicinal products. *Comparative Clinical Pathology*, 26, 105-114, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00580-016-2351-9>
- Cevallos, A.M., Herrera, J., López-Villaseñor, I. and Hernández, R.: Differential effects of two widely used solvents, dms and ethanol, on the growth and recovery of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes in culture. *The Korean journal of parasitology*, 55(1), 81, 2017. <https://doi.org/10.3347/kjp.2017.55.1.81>
- Cho, M.C., Oh, Y.K., Park, S.H., Lee, H.Y., Kang, Y.J. and Park, M. (2009). Effects of extruded pellet and moist pellet feed on health conditions of olive flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of fish pathology*, 22(3), 283-291, 2009.
- Cook, N., Hansen, A.R., Siu, L.L. and Razak, A.R.A.: Early phase clinical trials to identify optimal dosing and safety. *Molecular Oncology*, 9(5), 997-1007, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.07.025>
- Costa, J., Reis-Henriques, M.A., Castro, L.F.C. and Ferreira, M.: Gene expression analysis of ABC efflux transporters, CYP1A and GST α in Nile tilapia after exposure to benzo (a) pyrene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 155(3), 469-482, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.004>
- Dasari, S., Ganjavi, M.S., Yellanurkonda, P., Basha, S. and Meriga, B.: Role of glutathione S-transferases in detoxification of a polycyclic aromatic hydrocarbon, methylcholanthrene. *Chemico-biological interactions*, 294, 81-90, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.08.023>
- Della Torre, C., Corsi, I., Nardi, F., Perra, G., Tomasino, M.P. and Focardi, S.: Transcriptional and post-transcriptional response of drug-metabolizing enzymes to PAHs contamination in red mullet (*Mullus barbatus*, Linnaeus, 1758): a field study. *Marine environmental research*, 70(1), 95-101, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.03.009>
- Dirikolu, L., Karpiesiuk, W., Lehner, A.F., Hughes, C., Granstrom, D.E. and Tobin, T.: Synthesis and detection of toltrazuril sulfone and its pharmacokinetics in horses following administration in dimethylsulfoxide. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 32(4), 368-378, 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.01053.x>
- Docan, A., Grecu, I. and Dediu, L.: Use of hematological parameters as assessment tools in fish health status. *Journal of Agrolimentary Processes and Technologies*, 24, 317-324, 2018.
- Fazio, F.: Fish hematology analysis as an important tool of aquaculture: a review. *Aquaculture*, 500, 237-242, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.10.030>
- Gabriel, U.U., Obomanu, F.G. and Edori, O.S.: Haematology, plasma enzymes and organ indices of *Clarias gariepinus* after intramuscular injection with aqueous leaves extracts of *Lepidagathis alopecuroides*, 2009.
- Gallardo-Villagrán, M., Paulus, L., Leger, D. Y., Therrien, B. and Liagre, B.: Dimethyl sulfoxide: a bio-friendly or bio-hazard chemical? the effect of DMSO in human fibroblast-like synoviocytes. *Molecules*, 27(14), 4472, 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27144472>
- Galvao, J., Davis, B., Tilley, M., Normando, E., Duchon, M.R. and Cordeiro, M.F.: Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*, 28(3), 1317-1330, 2014. <https://doi.org/10.1096/fj.13-235440>
- Gesek, M., Sokół, R., Welenc, J., Tylicka, Z., Korzeniowska, P., Kozłowska, A. and Otrocka-Domagala, I.: Histopathological observations of the internal organs during toltrazuril (Baycox®) treatment against naturally occurring coccidiosis in Japanese quail, 2015.
- Grant, K.R.: Fish hematology and associated disorders. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 18(1), 83-103, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.05.015>
- Greif, G.: Immunity to coccidiosis after treatment with toltrazuril. *Parasitology Research*, 86, 787-790, 2000. <https://doi.org/10.1007/s004360000218>
- Haider, M.J. and Rauf, A.: Sub-lethal effects of diazinon

- on hematological indices and blood biochemical parameters in Indian carp, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(6), 947-953, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201402086>
- Healthcare, B.: Baycox solution 2.5% for coccidiosis control in Poultry. *Bayer Healthcare*, 2003.
- Hodge, D., Back, D.J., Gibbons, S., Khoo, S.H. and Marzolini, C.: Pharmacokinetics and drug-drug interactions of long-acting intramuscular cabotegravir and rilpivirine. *Clinical Pharmacokinetics*, 60, 835-853, 2021. <https://doi.org/10.1007/s40262-021-01005-1>
- Ibrahim, A.T.A.: Toxicological impact of green synthesized silver nanoparticles and protective role of different selenium type on *Oreochromis niloticus*: hematological and biochemical response. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 61, 126507, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126507>
- Iyanagi, T.: Molecular mechanism of phase I and phase II drug-metabolizing enzymes: implications for detoxification. *International review of cytology*, 260, 35-112, 2007. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)60002-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)60002-8)
- Jancova, P., Anzenbacher, P. and Anzenbacherova, E.: Phase II drug metabolizing enzymes. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 154 (2), 103-116, 2010.
- Jee, B.Y., Min, J.G., Kim, T.J., Choi, J.S. and Park, S.M.: Research on Sanitation Control for an HACCP Application for a Flatfish (*Paralichthys olivaceus*) Aquaculture Farm. *Journal of Fisheries and Marine Sciences Education*, 25(5), 1179-1191, 2013. <https://doi.org/10.13000/JFMSE.2013.25.5.1179>
- Jiang, J., Wu, S., Wang, Y., An, X., Cai, L., Zhao, X. and Wu, C.: Carbendazim has the potential to induce oxidative stress, apoptosis, immunotoxicity and endocrine disruption during zebrafish larvae development. *Toxicology In Vitro*, 29(7), 1473-1481, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.06.003>
- Joo Gaeul and Sohng Kyeong-Yae.: 전산화 단층촬영을 이용한 한국 성인의 둔부 피하지방두께 측정: 근육주사 바늘길이 산정을 위한 기초조사. *Journal of Korean Academy of Nursing*, 40(2), 247-254, 2010. <https://doi.org/10.4040/jkan.2010.40.2.247>
- Kais, B., Schneider, K.E., Keiter, S., Henn, K., Ackermann, C. and Braunbeck, T.: DMSO modifies the permeability of the zebrafish (*Danio rerio*) chorion-implications for the fish embryo test (FET). *Aquatic toxicology*, 140, 229-238, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.022>
- Kerlin, R., Bolon, B., Burkhardt, J., Francke, S., Greaves, P., Meador, V. and Popp, J.: Scientific and regulatory policy committee: recommended (“best”) practices for determining, communicating, and using adverse effect data from nonclinical studies. *Toxicologic Pathology*, 44(2), 147-162, 2016. <https://doi.org/10.1177/0192623315623265>
- Kim, J.J., Ryu, S. and Lee, H.: Foodborne illness outbreaks in Gyeonggi province, Korea, following seafood consumption potentially caused by *Kudoa septempunctata* between 2015 and 2016. *Osong public health and research perspectives*, 9(2), 66, 2018. <http://doi:10.24171/j.phrp.2018.9.2.05>
- Klomp, F., Wenzel, C., Drozdik, M. and Oswald, S.: Drug-drug interactions involving intestinal and hepatic CYP1A enzymes. *Pharmaceutics*, 12(12), 1201, 2020. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121201>
- Korashy, H.M., Ansari, M.A., Maayah, Z. H., Imam, F., Raish, M., Attafi, I.M. and Moraished, B.A.: Differential Effects of Sunitinib on the Expression Profiles of Xenobiotic-Metabolizing Enzymes and Transporters in Rat Liver and Kidneys. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 119(2), 173-183, 2016. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12555>
- Kovyrshina, T.B. and Rudneva, I.I.: Seasonal dynamics of activity of oxidative modification of proteins and oxidation-inhibiting enzymes in the blood of goby *Neogobius melanostomus* inhabiting the Black Sea and the Sea of Azov. *Journal of Ichthyology*, 52, 277-283, 2012. <https://doi.org/10.1134/S0032945212020099>
- Krkošek, M.: Host density thresholds and disease control for fisheries and aquaculture. *Aquaculture Environment Interactions*, 1(1), 21-32, 2010. <https://doi.org/10.3354/aei0004>
- López-Osorio, S., Chaparro-Gutiérrez, J.J. and Gómez-Osorio, L.M.: Overview of poultry *Eimeria* life cycle and host-parasite interactions. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 384, 2020. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00384>
- Matsukane, Y., Sato, H., Tanaka, S., Kamata, Y., & Sugita-Konishi, Y.: *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. *J. Parasitol. Res.*, 107, 865-872, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1941-8>
- Mehlhorn, H., Ortmann-Falkenstein, G. and Haberkorn, A.: The effects of sym. Triazinones on developmental stages of *Eimeria tenella*, *E. maxima* and *E. acervulina*: a light and electron microscopical study.

- Zeitschrift für Parasitenkunde*, 70, 173-182, 1984. <https://doi.org/10.1007/BF00942219>
- Mitchell, M.A.: Ponazuril. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 17(3), 228-229, 2008.
- Moore, M. J., Mitrofanov, I. V., Valentini, S. S., Volkov, V. V., Kurbskiy, A. V., Zhimbey, E. N., ... & Stegeman, J. J. (2003). Cytochrome P4501A expression, chemical contaminants and histopathology in roach, goby and sturgeon and chemical contaminants in sediments from the Caspian Sea, Lake Balkhash and the Ily River Delta, Kazakhstan. *Marine Pollution Bulletin*, 46(1), 107-119, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00325-9](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00325-9)
- Moran, J.D.W., Whitaker, D.J. and Kent, M.L.: A review of the myxosporean genus *Kudoa* Meglitsch, 1947, and its impact on the international aquaculture industry and commercial fisheries. *Aquaculture*, 172 (1-2), 163-196, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00437-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00437-2)
- Noack, S., Chapman, H.D. and Selzer, P.M.: Anticoccidial drugs of the livestock industry. *Parasitology research*, 118, 2009-2026, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06343-5>
- OECD Guideline for Testing of Chemicals. Guideline 203: Fish Acute toxicity Test – Acute Toxic Class Method 2019. <https://doi.org/10.1787/20745761>
- Oh, S.M., Ryu, B.T., Kim, H.R., Choi, K. and Chung, K.H.: Molecular cloning of CYP1A gene and its expression by benzo (a) pyrene from goldfish (*Carassius auratus*). *Environmental Toxicology: An International Journal*, 24(3), 225-234, 2009. <https://doi.org/10.1002/tox.20422>
- Olinga, P., Elferink, M.G.L., Draaisma, A.L., Merema, M.T., Castell, J.V., Perez, G. and Groothuis, G.M.M.: Coordinated induction of drug transporters and phase I and II metabolism in human liver slices. *European journal of pharmaceutical sciences*, 33(4-5), 380-389, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.01.008>
- Opiyo, M. A., Marijani, E., Muendo, P., Odede, R., Leschen, W. and Charo-Karisa, H.: A review of aquaculture production and health management practices of farmed fish in Kenya. *International journal of veterinary science and medicine*, 6(2), 141-148, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.07.001>
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD): Guideline 423: acute oral toxicity—acute toxic class method, 2001.
- Osman, A.G., Koutb, M. and Sayed, A.E.D.H.: Use of hematological parameters to assess the efficiency of quince (*Cydonia oblonga* Miller) leaf extract in alleviation of the effect of ultraviolet-A radiation on African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 99(1), 1-8, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.01.002>
- Owen, S.F., Giltrow, E., Huggett, D.B., Hutchinson, T. H., Saye, J., Winter, M.J. and Sumpter, J.P.: Comparative physiology, pharmacology and toxicology of β -blockers: mammals versus fish. *Aquatic Toxicology*, 82(3), 145-162, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.02.007>
- Paetzold, S.C., Ross, N.W., Richards, R.C., Jones, M., Hellou, J. and Bard, S.M.: Up-regulation of hepatic ABCB2, ABCG2, CYP1A1 and GST in multixenobiotic-resistant killifish (*Fundulus heteroclitus*) from the Sydney Tar Ponds, Nova Scotia, Canada. *Marine environmental research*, 68(1), 37-47, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.04.002>
- Park, S.H., Choi, Y.K., Do, J.W., Choi, H.S. and Kim, Y.K.: Acute toxicity of amprolium hydrochloride in *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.*, 36(1):141-150. 2023. <https://dx.doi.org/10.7847/jfp.2023.36.2.337>
- Pelzel, H.R., Schlamp, C.L., Waclawski, M., Shaw, M. K. and Nickells, R.W.: Silencing of Fem1cR3 gene expression in the DBA/2J mouse precedes retinal ganglion cell death and is associated with histone deacetylase activity. *Investigative ophthalmology & visual science*, 53(3), 1428-1435, 2012. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8872>
- Pietruk, K., Olejnik, M. and Jedziniak, P.: Risk of residues of toltrazuril sulfone in eggs after oral administration—Could setting maximum residue limit be helpful?. *Food Chemistry*, 360, 130054, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130054>
- Polakof, S., Mommsen, T.P. and Soengas, J.L.: Glucosensing and glucose homeostasis: from fish to mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 160(4), 123-149, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.07.006>
- Prieto, P., Cole, T., Curren, R., Gibson, R.M., Liebsch, M., Raabe, H. and Kinsner-Ovaskainen, A.: Assessment of the predictive capacity of the 3T3 Neutral Red Uptake cytotoxicity test method to identify substances not classified for acute oral toxicity (LD50 > 2000 mg/kg): Results of an ECVAM validation study. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 65 (3), 344-365, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.11.013>

- Rasowo, J., Okoth, O.E. and Ngugi, C.C.: Effects of formaldehyde, sodium chloride, potassium permanganate and hydrogen peroxide on hatch rate of African catfish *Clarias gariepinus* eggs. *Aquaculture*, 269(1-4), 271-277, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.087>
- Refat, M.S., El-Korashy, S.A., Kumar, D.N. and Ahmed, A.S.: FTIR, magnetic, 1H NMR spectral and thermal studies of some chelates of caproic acid: inhibitory effect on different kinds of bacteria. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 70(1), 217-233, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2007.07.036>
- Rehberger, K., Werner, I., Hitzfeld, B., Segner, H. and Baumann, L.: 20 Years of fish immunotoxicology—what we know and where we are. *Critical reviews in toxicology*, 47(6), 516-542, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1288024>
- Santos, C. and dos Reis Martinez, C.B.: Biotransformation in the fish *Prochilodus lineatus*: an organ-specific approach to cypla gene expression and biochemical activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 80, 103467, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103467>
- Schmittgen, T.D. and Livak, K.J.: Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols*, 3(6), 1101-1108, 2008. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Song, J.Y., Choi, J.H., Choi, H.S., Jung, S.H. and Park, M.: Monitoring of *Kudoa septempunctata* in cultured olive flounder and wild fish in Jeju Island during 2012. *Journal of fish pathology*, 26(3), 129-137, 2013. <https://doi.org/10.7847/jfp.2013.26.3.129>
- Stock, M.L., Elazab, S.T. and Hsu, W.H.: Review of triazine antiprotozoal drugs used in veterinary medicine. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 41(2), 184-194, 2018. <https://doi.org/10.1111/jvp.12450>
- Sun, H.H., Saheb-Al-Zamani, M., Yan, Y., Hunter, D.A., Mackinnon, S.E. and Johnson, P.J.: Geldanamycin accelerated peripheral nerve regeneration in comparison to FK-506 in vivo. *Neuroscience*, 223, 114-123, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.026>
- Sunmonu, T.O. and Oloyede, O.B.: Biochemical assessment of the effects of crude oil contaminated catfish (*Clarias gariepinus*) on the hepatocytes and performance of rat. *African Journal of Biochemistry Research*, 1(5), 83-89, 2007.
- Tafalla, C., Figueras, A., & Novoa, B. (1999). Role of nitric oxide on the replication of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV), a fish rhabdovirus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72(3-4), 249-256, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(99\)00109-9](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00109-9)
- Townsend, D.M. and Tew, K.D.: The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47), 7369-7375, 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>
- Uno, T., Ishizuka, M. and Itakura, T.: Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental toxicology and pharmacology*, 34(1), 1-13, 2012. <https://doi.org/10.1616/j.etap.2012.02.004>
- Whipps, C.M., Adlard, R.D., Bryant, M.S., Lester, R.J., FINDLAV, V. and Kent, M.L.: First report of three *Kudoa* species from eastern Australia: *Kudoa thyr sites* from mahi mahi (*Coryphaena hippurus*), *Kudoa amamiensis* and *Kudoa minithyr sites* n. sp. from sweeper (*Pempheris ypsilychnus*). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(3), 215-219, 2003. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2003.tb00120.x>
- Whipps, C.M. and Kent, M.L.: Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyr sites* (Myxozoa: Myxosporaea). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(5), 364-373, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2006.00114.x>
- Woodward, P., Bedding, A. and DeJardin, D.: Dose Ranging Studies and Dose Determination. *Bayesian Methods in Pharmaceutical Research*, 139-159, 2020.
- Xu, Z., Cao, J., Qin, X., Qiu, W., Mei, J. and Xie, J.: Toxic effects on bioaccumulation, hematological parameters, oxidative stress, immune responses and tissue structure in fish exposed to ammonia nitrogen: a review. *Animals*, 11(11), 3304, 2021. <https://doi.org/10.3390/ani11113304>
- Yin, J., Collier, A.C., Barr, A.M., Honer, W.G. and Procyshyn, R.M.: Paliperidone palmitate long-acting injectable given intramuscularly in the deltoid versus the gluteal muscle: are they therapeutically equivalent?. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 35(4), 447-449, 2015. <https://doi.org/10.1097/JCP.0000000000000361>
- Yi, X., Liu, M., Luo, Q., Zhuo, H., Cao, H., Wang, J. and Han, Y.: Toxic effects of dimethyl sulfoxide on red blood cells, platelets, and vascular endothelial cells in vitro. *FEBS open bio*, 7(4), 485-494, 2017. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12193>
- Yuan, L., Lv, B., Zha, J. and Wang, Z.: Transcriptional expression analysis of ABC efflux transporters and xenobiotic-metabolizing enzymes in the Chinese rare

minnow. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37(3), 984-995, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.03.015>

Zhang, X., Xie, P., Li, D. and Shi, Z.: Hematological and plasma biochemical responses of crucian carp (*Carassius auratus*) to intraperitoneal injection of extracted microcystins with the possible mechanisms

of anemia. *Toxicon*, 49(8), 1150-1157, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.02.009>

Manuscript Received: Nov 22, 2024

Revised: Dec 03, 2024

Accepted: Dec 05, 2024