

자몽추출물의 흰쥐 간조직 부패억제에 대한 현미경적 연구

황규성, 임도선¹, 최기주², 서윤경³, 백두진³

울지대학교 보건산업대학 장례지도학과, ¹울지대학교 보건과학대학 치위생학과

²울지대학교 전자현미경실, ³한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

(2010년 12월 1일 접수, 2010년 12월 21일 수정접수, 2010년 12월 22일 게재승인)

간추립: 시체의 보존을 위해 사용되어져 왔던 포르말데히드는 매우 자극적 냄새와 강한 독성으로 인체에 유해하며, 그 사용량의 제한이 있기 때문에 이를 대체하는 물질이 요구된다. 본 연구에서는 광학 및 전자현미경을 이용하여 흰쥐의 간조직을 대상으로 천연제제인 자몽추출물이 생체조직의 부패억제에 어떤 효과가 있는지 알아보고자 하였다.

8주령의 Sprague-Dawley (SD)계 수컷 흰쥐를 대조군과 실험군으로 나누어 각각을 0일군, 1일군, 2일군, 3일군, 4일군 및 5일군으로 분류하고 에테르(ether)로 마취시킨 후 복부의 백색선을 절개하여 간을 적출하였다. 대조군 및 실험군의 간조직을 37°C 배양기에 각각 넣어 처리하였으며, 습도는 80±5%를 유지하였다. 실험군에는 자몽추출물 분말 부직포제 한 포를 실험 시작부터 첨가하여 실험이 끝날 때까지 배양기 내에 방치하였으며, 매일 1회씩 실험기간 동안 자몽추출물 수용액을 분무하였다. 대조군에는 아무런 처치를 하지 않았다. 실험종료 후 간조직을 광학현미경과 전자현미경으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

광학 및 전자현미경을 이용하여 흰쥐의 간조직을 대상으로 자몽추출물의 생체조직 부패억제효과를 검증한 결과, 자몽추출물이 조직의 변성 및 부패를 3일 이상 지연시키는 것을 관찰할 수 있었다.

본 연구의 결과는 자몽추출물이 시체의 천연보존제로서 유용하게 사용할 수 있는 근거를 제시하였다고 생각된다.

찾아보기 낱말: 자몽추출물, 보존제, 부패억제효과, 간조직, 현미경적 관찰

서 론

해부 또는 해부실습을 위해 시체의 보존은 필수적이다. 효과적 보존액은 자연 조직색을 띄어 교육효과를 높이고, 곰팡이 성장과 건조로부터 시체를 충분히 보호할 수 있어야 하며, 시체를 접하는 교육자와 학생의 건강에 유해하지 않아야 한다(Nicholson 등 2005). 일반적으로 조직, 기관 및 시체 고정을 위한 보존제로 포르말데히드가 가장 많이 사용되고 있다. 포르말데히드는 시료를 좋은 형태로 보존할 수 있으며, 사용이 쉽고 비용이 저렴하다는 장점에도 불구하고, 자극적인 냄새와 독성이 강하여 작업자에게 유해하며, 또한 사용량의 제한이 있기 때문에 이를 대체하는 물질이 필요하다(Frölich

등 1984, Tschernetzky 1984, Majewski 등 2003, Whitehead와 Savoria 2008).

따라서 비독성, 비침습성, 친환경적 효과가 높은 천연 보존제를 찾아내기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이 중 향균, 항진균에 대한 소독효과가 뛰어나며 LD50값이 2,900 mg/kg으로 인체에 거의 독성이 없는 자몽추출물에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(Tirillini 2000, Heggors 등 2002, Park와 Kim 2006). 그러나, 자몽추출물의 과일과 식품에 대한 소독 및 보존효과에 대한 연구는 많으나 생체 조직의 부패억제효과 및 보존력에 관한 연구는 미비한 실정이다(Hwang 등 2009). 자몽추출물이 미생물의 세포벽 파괴에 의한 항균효과, 효소활성 저해로 인한 보존효과가 있다면, 생체 조직에 대한 부패억제 및 보존효과가 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서는 광학 및 전자현미경을 이용하여 흰쥐의 간조직을 대상으로 자몽추출물의 생체조직의 부패억

제효과를 검증하여 천연보존제로서 시체 보존효과의 가능성을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

실험동물로는 체중 230~250 g 내외의 건강한 8주령 Sprague-Dawley (SD)계 흰쥐 수컷을 사용하였다. 모든 실험동물을 대조군과 실험군(55% 자몽추출물 분말과 자몽추출물 수용액 처리)으로 나누어 각각을 0일군, 1일군, 2일군, 3일군, 4일군 및 5일군으로 분류하고 각 군마다 5마리를 사용하였다. 모든 동물은 에테르(ether)로 마취시킨 후 복부의 백색선을 절개하여 간을 적출하였다. 이 후 바닥에 거즈를 깔 직경 약 9cm의 페트리접시(petri-dish) 위에 놓고 실험하였다.

2. 자몽추출물 적용 실험

대조군 및 실험군을 37°C 배양기에 각각 넣어 처리하였으며, 습도는 $80 \pm 5\%$ 를 유지하였다. 실험군에는 자몽추출물 분말 부직포제 한 포를 실험 시작부터 첨가하여 실험이 끝날 때까지 배양기 내에 방치하였으며, 자몽추출물 수용액을 1일 1회씩 분무하여, 실험 개시일로부터 5일간 처리하였다. 본 실험에 사용한 자몽추출물 분말 부직포제(바이오-크린 천국, 한국장레닷컴 제품)는 소독된 쌀분말에 자몽추출물을 섞어 소량씩 공기에 역발산시키는 방법을 통해 실험기간 동안 일정하게 자몽추출물의 농도를 유지하고자 사용하였다. 자몽추출물 수용액은 타 문헌을 참조로 조직의 부패억제효과가 있는 55%를 최적 농도로 결정하였다 (Hwang 등 2009).

3. 광학현미경적 관찰

대조군과 실험군을 해당 날에 꺼내어 시료를 10% NBF(neutral buffered formalin)로 고정시킨 후, 통상적인 방법으로 파라핀 블록을 제작하고 4 μ m 두께의 절편을 제작한 다음 2% AES(3-aminopropyltriethoxysilane, Sigma, USA)로 도말한 슬라이드에 시료를 붙였다. 이후 조직절편에서 파라핀을 제거하기 위해 슬라이드를 80°C 오븐에서 1일 방치한 다음 자일렌에 5분간 처리 후, 순수 에탄올에 5분간 처리하였다. 파라핀이 제거된 슬라이드를 80°C의 건조기에서 1일 건조시켰다.

수세된 시료의 핵을 염색하기 위하여 헤마톡실린액(Harris method)으로 3분간 염색하였고, 흐르는 물에서

20분간 세척하였다. 이 후 세포질을 염색하기 위하여 에 오진 와이액으로 5분간 염색 후, 다시 흐르는 물에서 5분간 세척하였다. 모든 처리가 끝난 시료를 광학현미경(Olympus BX51, Japan)에서 200배로 관찰하였다.

4. 투과전자현미경적 관찰

시료를 2.5% paraformaldehyde-glutaraldehyde(4°C, 인산염완충액, pH 7.4)에 1일 동안 전고정하고, 0.1 M 인산염완충액(4°C, pH 7.4)으로 15분씩 2회 세척한 다음, 1% OsO₄(4°C, 인산염완충액)로 1일 후고정하였다. 고정이 끝난 시료는 동일 완충용액으로 2회 세척한 후, 에탄올 농도 상승 순으로 탈수하고, propylene oxide로 치환하여 Poly/EM Bed 812 embedding medium으로 포매한 다음, 60°C vacuum drying oven(Yamato, Japan)에서 2일 동안 중합 반응시켰다. 포매된 조직은 초박절편기(ultra-microtome, LKB-2088)로 1 μ m 두께의 준초박절편(semi-thin section)을 제작하여 1% toluidine blue로 염색하고 광학현미경으로 관찰하였다. 동일부위에서 60~80 nm로 초박절편을 제작하여 copper grid에 부착시킨 다음, uranyl acetate와 lead citrate로 이중 염색하여 투과전자현미경(H-7600, Japan)으로 80 kV에서 관찰하였다.

결 과

1. 광학현미경 관찰

1) 대조군

대조군 0일군에서는 중심정맥을 기준으로 방사형으로 나열되어 있는 간세포들의 전형적인 형태가 관찰되었다. 간세포의 경계가 명확하였고 핵 또한 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 1A). 1일군에서는 간세포와 간세포의 경계가 조금씩 불분명해지기 시작하였으나, 핵 및 간세포의 전체적 형태는 0일군과 유사하였다(Fig. 1B). 2일군의 경우, 간세포의 형태는 유지하고 있었으나 세포의 구분은 불분명하였고 일부에서는 경계가 유실되어 간세포 개개의 형태를 구분할 수 없었다. 전체적으로 간세포 내 핵을 관찰할 수 없었으며, 세포 핵 자리가 비어있는 형태(hollow)로 관찰되었다(Fig. 1C). 3일군에서는 간세포의 형태는 완전히 붕괴되어 각각의 세포가 서로 융합된 커다란 덩어리 형태를 보였으며, 세포 핵이 있던 자리는 유실되어 관찰이 불가능하였다(Fig. 1D). 4일군에서는 형태와 경계가 완전히 유실되어 형태를 확인하기 어려웠으며, 융합된 간세포들의 분리(separation)현상이 진행되고 있는 것을 관찰하였다(Fig. 1E). 5일군에서는 간

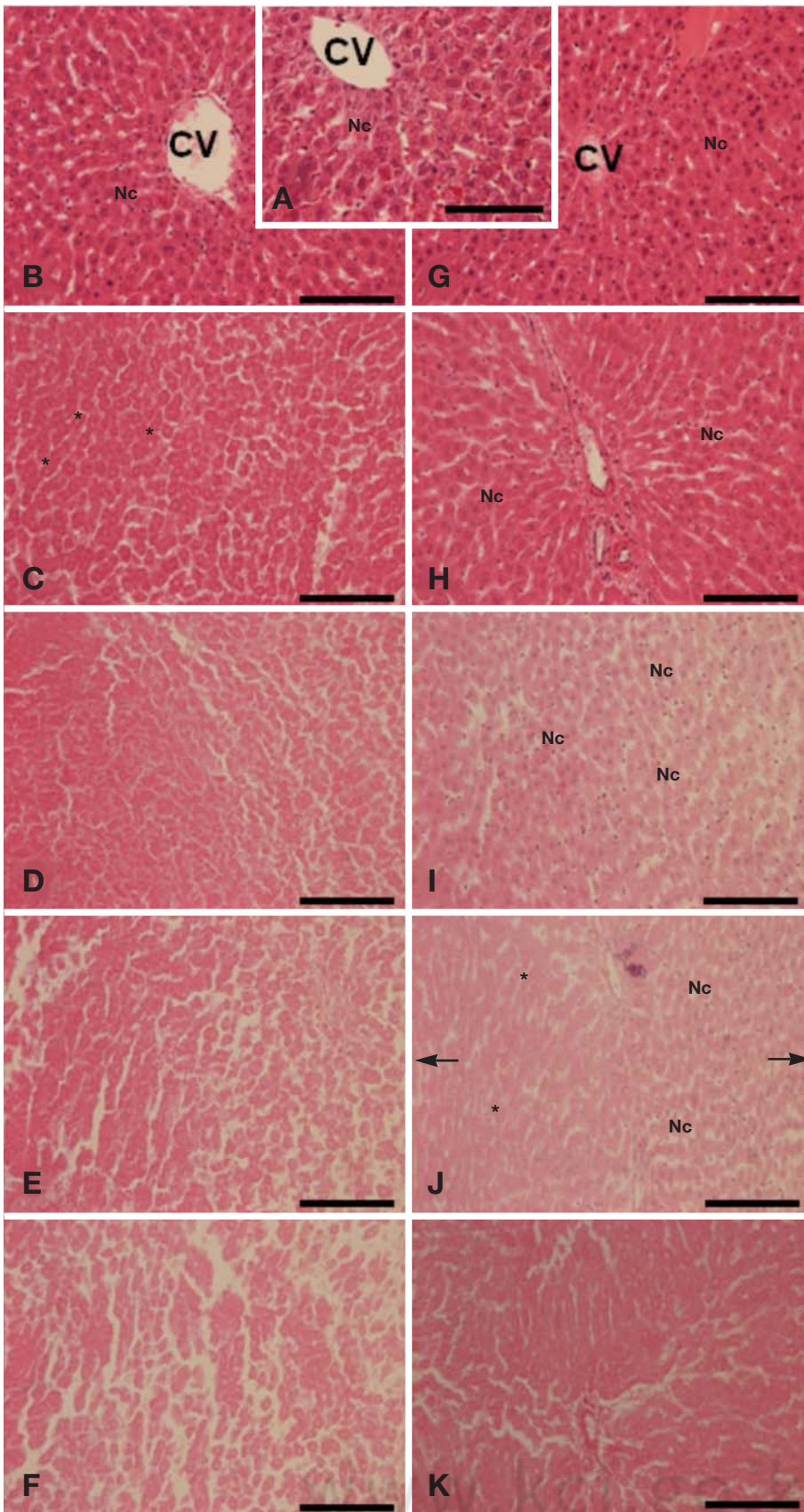


Fig. 1. Light microscopic observation of rat liver. CV, Central Vein; A~F, Control; G~K, Experimental; A, 0 day; B & G, 1 day; C & H, 2 days; D & I, 3 days; E & J, 4 days; F & K, 5 days. Scale bars=25 μ m. Nc, nucleus; *, hollow; ←, proximal portion; →, distal portion.

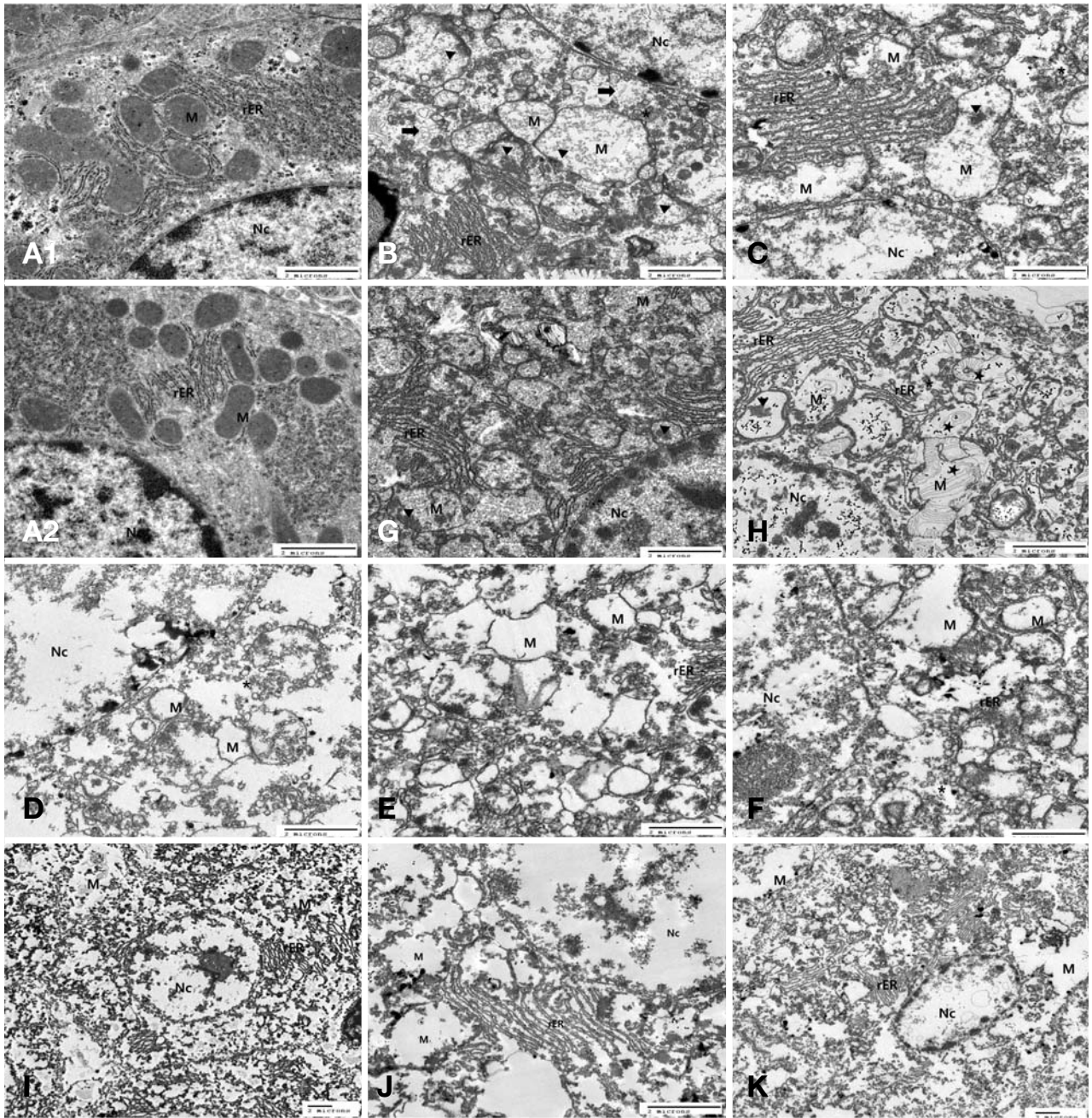


Fig. 2. Transmission electron microscopic observation of rat liver. A~F, Control; G~K, Experimental; A, 0 day; B & G, 1 day; C & H, 2 days; D & I, 3 days; E & J, 4 days; F & K, 5 days. M, mitochondria; Nc, nucleus; rER; rough endoplasmic reticulum, *, vesiculation of rER, ★, myelinoid body; arrow, smooth endoplasmic reticulum; arrow head, woolley density.

세포들이 모두 붕괴되어 각각의 조직으로 구분할 수 없었으며, 조직간 분리현상이 심화되어 사이가 크게 벌어지는 것을 관찰하였다(Fig. 1F).

2) 실험군

실험군 1일군에서는 전형적인 간세포 형태가 관찰되

었고, 대조군 0일군의 간세포와 동일한 형태로 관찰되었고, 간세포들 사이의 경계가 명확하였고 핵이 뚜렷이 관찰되었다(Fig. 1G). 2일군에서는 뚜렷한 핵막과 핵인의 형태를 가지고는 있으나 호염성은 다소 떨어져 보이는 핵이 관찰되었다. 몇몇의 간세포들 사이 경계가 희미해지기 시작하여 경계를 명확히 관찰할 수 없었

다(Fig. 1H). 3일군의 경우, 대부분의 간세포에서 핵막과 핵인이 뚜렷이 관찰되었으나, 몇몇에서는 핵을 관찰할 수 없었다. 전체적으로 세포질의 염색성이 떨어지는 현상이 관찰되었다(Fig. 1I). 4일군의 경우, 핵막과 핵인이 뚜렷이 관찰되는 간세포, 핵막은 있으나 핵인의 형태가 명확하지 않은 간세포, 핵이 없이 관찰되는 간세포가 혼재되어 있었다. 간세포사이의 경계가 불분명하였으며 2~3개의 간세포들이 서로 융합된 덩어리 모양의 형태가 관찰되었다(Fig. 1J). 한편, 5일군에서는 핵의 형태만 유지하고 있는 간세포들이 관찰되었고, 몇몇의 간세포에는 핵이 비어있는 형태(hollow)로 관찰되었다. 간세포들의 형태는 완전히 붕괴되어 각각의 세포가 서로 융합된 커다란 덩어리 모양이 관찰되었다(Fig. 1K).

2. 전자현미경 관찰

1) 대조군

대조군 0일군 간세포에서는 핵막이 잘 유지되고 있었으며 몽진염색질과 퍼진염색질이 관찰되었고, 정상적인 막구조를 유지하는 사립체와 과립세포질세망이 관찰되었다(Fig. 2A1, 2A2). 1일군 간세포에서 핵의 이중막이 부분적으로 팽창되었고 사립체는 능선이 사라지고 팽창되었고, 과립세포질세망의 팽창과 탈과립이 일어났고, 그리고 일부 수조에서는 공포화(vesiculation)가 관찰되었고, 무과립세포질세망도 팽창되었다(Fig. 2B). 2일군 간세포에서 핵막은 불규칙해졌으며, 염색질이 용해되었다. 일부 사립체에서 woolley density와 사립체막의 분리가 관찰되었고, 과립세포질세망의 팽창과 탈과립이 1일군보다 많이 관찰되었다. 3일군 간세포에서 핵막과 염색질 용해가 관찰되었고 세포질과 융합되는 것을 관찰하였다. 사립체 속의 구조물은 대부분 용해되었고 불규칙한 막을 유지하거나 파괴되었다. 과립세포질세망의 수조의 팽창이 더 진행되었다(Fig. 2D). 4일군 간세포에서 팽창되고 용해되어 합쳐진 사립체가 다수 관찰되었고, 과립세포질세망 역시 팽창 또는 공포화되었다(Fig. 2E). 5일군 간세포에서 핵막이 많이 유실되었고, 막구조가 손상된 사립체가 주변 세포 구조물과 융합되는 현상이 관찰되었다(Fig. 2F).

2) 실험군

실험군 1일군 간세포에서 핵막과 염색질은 비교적 잘 유지되었다. 사립체는 능선이 사라지고 팽창되고, woolley density가 관찰되었으나, 대조군 1일군보다는 손상이 적게 관찰되었다. 과립세포질세망 역시 팽창과 일부에서 탈과립 현상이 있었으나 비교적 형태는 잘 유지되

었다(Fig. 2G). 2일군 간세포에서 핵막이 불규칙해지고 팽창되었으며, 사립체의 팽창이 관찰되었고, 일부에서 증판형태의 myelinoid body가 관찰되었으며, 과립세포질세망의 팽창과 공포화가 일어났고, 탈과립이 진행되었다(Fig. 2H). 3일군 간세포에서 핵막의 팽창이 관찰되나 비교적 잘 유지되고 있으며, 사립체는 용해되어 주변 구조물과 융합되는 것이 관찰되었고 myelinoid body는 2일군보다 감소되었다. 과립세포질세망의 팽창 및 탈과립이 관찰되었다(Fig. 2I). 4일군 간세포에서 핵막이 소실되고, 염색질의 용해가 관찰되었으며, 사립체 막의 소실 및 주변 구조물과 융합되는 것이 관찰되었다(Fig. 2J). 5일군 간세포에서 핵의 염색질이 용해되고 사립체의 용해와 융합, 과립세포질세망의 팽창이 관찰되었다(Fig. 2K).

고 찰

의학의 가장 기본이 되는 인체의 구성 및 구조, 생리적 역할과 체계를 배우기 위해서는 시체를 이용한 실습과 보존 시간의 연장이 매우 중요하다. 의학적 관찰을 하기 위해서 시체의 부패를 억제하고 보존시간을 연장시키기 위한 보존제의 필요성이 강조되고 있다. 이미 선진국에서는 보다 현실감 있고 보존효과가 높은 보존제에 대해 많은 연구를 시도하고 있으나, 포르말데히드 또는 포르말데히드와 페놀의 혼합액이 조직, 기관 및 시체의 고정을 위한 보존제로 주로 사용되어져 왔다(Bradbury와 Hoshino 1978, Tschernetzky 1984, Wineski와 English 1989, Groscurth 등 2001). 그러나 포르말데히드는 인체에 매우 유해하며 독성이 강하고, 미국 환경부에서 인체 발암물질로 분류되고 있다(Frölich 등 1984, Nichoson 등 2005, Whitehead와 Savoria 2008). 근래에는 자극적인 포르말린 냄새를 없애고 인체에 무해하며, 보존 효과와 현실감 있는 시체를 만들기 위한 보존제 개발에 대한 연구가 진행되고 있다(Lischka 등 1981, Wineski와 English 1989).

자몽추출물은 부패성 및 병원성 미생물에 대한 살균 효과를 나타낼 뿐만 아니라, 다량의 토크페놀을 함유하고 있어 강한 방취력이 있고 악취와 부패 냄새를 없애는데도 유용한 물질로 알려져 있다(Park과 Kim 2006). 식품분야에서는 여러 천연보존제 중 식품과 야채에 대한 보존 및 소독효과가 뛰어나며 인체에 무해한 자몽추출물에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(Hegggers 등 2002, Zayachkivska 등 2005).

자몽추출물은 천연 추출물로 주성분인 아스코르빈산(ascorbic acid), 아스코르빌 팔미탄산염(ascorbyl palmitate)은 부패성 및 병원성 미생물의 세포벽을 파괴하고 효소 활성을 저해함으로써 보존효과를 나타낸다고 하였으며, 항생제 내성 균주에도 효과적으로 작용하여 특히 포도상구균과 장구균에서 항균효과가 매우 크다고 하였다(Cvetnic과 Vladimir-Knezevic 2004, Kim 등 2005). 플라보노이드(flavonoid)의 일종인 나리진(naringin)은 세포독성, DNA 손상 억제, 광범위한 항균, 항진균 및 항산화작용을 한다고 연구된 바 있다(So 등 1996, Blankson 등 2000, Brzozowski 등 2005).

자몽추출물의 보존효과에 대한 연구도 많이 보고되고 있다. 자몽추출물에는 보존적 약제로 알려진 염화벤제토늄(benzethonium chloride)이 함유되어 있어 항균력 및 보존효과가 높으며, 세균억제효과가 좋고 안전하여 효과적인 보존제로 사용이 가능하다고 알려져 있다(von Woedtke 등 1999, Xu 등 2007). Kim 등(2005)도 자몽추출물을 10 ppm 이상 첨가한 경우 4°C에서 17일까지 호기성 세균 및 효모(yeast)의 성장을 억제하는 효과를 관찰할 수 있었다고 하였으며, Hwang 등(2009)은 자몽추출물을 흰쥐의 콩팥에 적용한 결과, 37°C, 습도 80±5%에서 55% 자몽추출물은 부패와 변성을 억제하는 부패억제제로서 효과가 있다고 하였다.

본 연구에서는 자몽추출물의 생체 조직의 부패억제 효과 및 보존력에 관하여 알아보고자 흰쥐의 간조직을 대상으로 부패 및 보존효과에 대해 연구하였다.

광학현미경 관찰에서 부패가 진행됨에 따라 나타나는 간조직의 특징은 핵의 응축과 소실, 세포간의 융합, 조직 사이 분리현상이 점차적으로 관찰되었다. 실험군의 시간 경과에 따른 부패양상은 간의 바깥부위보다 안쪽부위에서보다 괴사가 심하였는데, 이것은 자몽추출물과 실제적으로 접해있던 바깥부위가 안쪽부위에 비해 부패 활성도가 낮았기 때문으로 볼 수 있었다(Sundberg와 Jönsson 2008). Hwang 등(2009)은 시간경과에 따른 흰쥐 콩팥의 부패양상 실험에서 공기 및 수분의 접촉이 많은 콩팥 겉질이 속질보다 괴사가 빠르고 심하게 일어난다고 하였는데, 본 실험에서 자몽추출물을 처리한 간 조직에서 겉표면의 괴사가 속보다 덜 일어난 것은 자몽추출물이 부패와 괴사를 지연시키는데 참여한 것이라 생각된다. Virchow (1854)는 식물이나 동물에서 유래된 지방성분의 물질이 물과 반응하면 막으로 형성된 층판 구조물을 형성하며 이를 myelinoid body라 하였다. 저자들이 전자현미경으로 관찰한 실험군의 사립체내에서 관찰된 층판형태의 구조물은 자몽추출물과 세포내 물과

반응하면서 형성된 myelinoid body라 생각된다.

한편 광학현미경 관찰에서 대조군의 2일군 부패양상과 실험군의 5일군 부패양상이 유사하게 관찰되었다. 실험군에서 3일군까지는 간세포의 형태 및 핵의 전형적인 모습이 관찰되었고, 3일군부터 세포질의 호산성 염색 정도가 현저히 떨어지는 것을 확인하였다. 이는 부패가 진행됨에 따라 간 조직의 pH가 점차적으로 알칼리로 바뀌게 되면서 발생하는 현상으로 생각할 수 있었다(Mayer 2000). 이러한 결과는 전자현미경으로 관찰한 경우에도 실험군 1일군에서 핵막과 사립체 그리고 과립세포질세망의 대조군보다 그 형태를 더 잘 유지하는 것을 알 수 있었다. 또한 사립체에서 관찰된 woolley density는 사립체 능선에서 분리된 지질과 단백질 성분 또는 사립체 기질 단백질로 이루어진 것으로, woolley density가 관찰되는 것은 사립체의 비가역적인 손상을 의미한다(Collan 등 1981). Myagkaya 등(1985)은 woolley density는 세포 괴사 또는 용해시 사립체에서 관찰되며 세포손상시간에 따라 woolley density가 관찰되는 빈도가 증가된다고 하였으며, 본 실험에서도 시간이 지남에 따라 사립체내 woolley density가 증가되는 것을 알 수 있었고, 사립체의 팽창도 심해지는 것을 알 수 있었으며, 이는 대조군이 자몽추출물을 처리한 실험군보다 심한 것을 알 수 있었다.

대조군 4일군에서는 자몽추출물과 접촉한 곳의 세포의 핵은 보존되어 있었으나 안쪽 부위의 경우 핵이 소실되는 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같은 결과는 Xu 등(2007)의 자몽추출물이 부패효소억제효과가 탁월하여 보존시간을 길게 한다는 연구와 Hwang 등(2009)의 자몽추출물이 흰쥐 콩팥에서의 조직부패억제효과가 있다는 연구결과와 일치하는 것을 알 수 있었다.

결론적으로 본 연구결과는 37°C, 습도 80±5%에서 55% 자몽추출물이 간에서 부패와 변성을 억제하는 부패억제제로서 효과가 있고, 실험군의 5일군 조직의 형태가 대조군의 2일군 조직의 형태적 특성과 유사하게 나타났다. 따라서 자몽추출물의 부패억제효과는 최소 3일 이상이라고 판단되며, 자몽추출물이 조직의 변성 및 부패를 일정시간 억제한다고 생각할 수 있었다. 자몽추출물이 시체의 보존부패억제제로 사용되기 위해서는 실제로 시체에 적용 및 검증된 효과에 대한 다양한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

Blankson H, Grotterod EM, Seglen PO : Prevention of toxin-

- induced cytoskeletal disruption and apoptotic liver cell death by the grapefruit flavonoid, naringin. *Cell Death Differ* 7: 739-746, 2000.
- Bradbury SA, Hoshino K : An improved embalming procedure for long-lasting preservation of the cadaver for anatomical study. *Acta Anta* 101: 97-103, 1978.
- Brzozowski T, Konturek PC, Drozdowicz D, Konturek SJ, Zayachivska O, Pajdo R, Kwiecien S, Pawlik WW, Hahn EG : Grapefruit-seed extract attenuates ethanol- and stress-induced gastric lesion via activation of prostaglandin, nitric oxide and sensory nerve pathways. *World J Gastroenterol* 11: 6450-6458, 2005.
- Collan Y, McDowell E, Trump BF : Studies on the pathogenesis of ischemia cell injury. VI. Mitochondrial flocculent densities in autolysis. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 35: 189-199, 1981.
- Cvetnic Z, Vladimir-Knezevic S : Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extracts. *Acta Pharm* 54: 243-250, 2004.
- Frølich KW, Andersen LM, Knutsen A, Flood PR : Phenoxye- thanol as a nontoxic substitute for formaldehyde in long-term preservation of human anatomical speci- mens for dissection and demonstration purposes. *Anat Rec* 208: 271-278, 1984.
- Groscurth P, Eggli P, Kaphammer J, Rager G, Hornung JP, Fasel JDH : Gross anatomy in the surgical curriculum in Switzerland: Improved cadaver preservation, anatomi- cal models, and course development. *Anat Rec* 265: 254-256, 2001.
- Hwang KS, Choi KJ, Nam YS, Lim DS : Microscopic study of decomposition-inhibition effect in grapefruit-seed extract in rat kidney. *Korean J Microscopy* 39: 325- 332, 2009.
- Heggers JP, Cottingham J, Gusman J, Reagor L, Mccoy L, Carino E, Cox R, Zhao JG : The effectiveness of pro- cessed grapefruit-seed extract as an antibacterial agent II. Mechanism of action and in vitro toxicity. *J Altern Complement Med* 8: 333-340, 2002.
- Kim MK, Park MS, Choi SU, Park HR, Hwang YI : Antimicro- bial effect of grapefruit seed extracts on preservation for carrot and spinach. *J Life Sci* 15: 66-70, 2005.
- Lischka MF, Krammer EB, Egger TP, Paolini H : Controlled dissecting laboratory trail of different phenol-free- embalming fluids in comparison with phenol-formalin- solution. *Anat Anz* 150: 226-234, 1981.
- Mayer RG : *Embalming : History, Theory and Practice*, 3th edi., McGraw-Hill, pp 95-101, 2000.
- Majewski P, Pernak A, Grzymislawski M, Iwanik K, Pernak J : Ionic liquids in embalming and tissue preservation. Can traditional formalin-fixation be replaced safely? *Acta Histochem* 105: 135-142, 2003.
- Myagakaya G, van Veen H, James J : Ultrastructural changes in rat liver sinusoids during prolonged normothermic and hypothermic ischaemia in vitro. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 47: 361-373, 1984.
- Nichoson HD, Samalia L, Gould M, Hurst PR, Woodroffe M : A comparison of different embalming fluids on the quality of histological preservation in human cadavers. *Eur J Morphol* 42: 178-184, 2005.
- Park HK, Kim SB : Antimicrobial activity of grapefruit seed extracts. *Korean J Food & Nutr* 19: 526-531, 2006.
- So FV, Guthrie N, Chambers AF, Moussa M, Carroll KK : Inhibition of human breast cancer cell proliferation and delay of mammary tumorigenesis by flavonoids and citrus juices. *Nutr Cancer* 26: 167-181, 1996.
- Sundberg C, Jönsson H : Higher pH and faster decomposition in biowaste composting by increased aeration. *Waste Manag* 28: 518-526, 2008.
- Tirillini B : Grapefruit. the last decade acquisitions. *Fitoterapia* 71: 29-37, 2000.
- Tschernezky W : Restoration of the softness and flexibility of cadavers preserved in formalin. *Acta Anat* 118: 159- 163, 1984.
- Virchow R : Ueber das ausgebreitete Vorkommen einer dem Nervenman analogen Substanz in den thiereschen Geweben. *Virchow Arch* 6: 562, 1854. cited in Gha- dially FN : *Ultrastrucural pathology of the cell and matrix*. 3rd edi., London, Butterworths, pp 614, 1988.
- von Woedtk T, Schlüter B, Pfliegel P, Lindequist U, Jülich WD : Aspects of the antimicrobial efficacy of grapefruit seed extract and its relation to preservative substances con- tained. *Pharmazie* 54: 452-456, 1999.
- Whitehead MC, Savoria MC : Evaluation of methods to reduce formaldehyde levels of cadavers in the dissection labo- ratory. *Clin Anat* 21: 75-81, 2008.
- Wineski LE, English AW : Phenoxye- thanol as a nontoxic pre- servative in the dissection laboratory. *Acta Anat* 136: 155-158, 1989.
- Xu W, Qu W, Huang K, Guo F, Yang J, Zhao H, Luo Y : Anti- bacterial effect of grapefruit seed extract on food- borne pathogens and its application in the preservation of minimally processed vegetables. *Postharvest Biol Technol* 45: 126-133, 2007.
- Zayachivska OS, Konturek SJ, Drozdowicz D, Konturek PC, Brzozowski T, Ghagotsky MR : Gastroprotective ef- fects of flavenoids in plant extracts. *J Physiol Phar- macol* 56: 219-231, 2005.

Microscopic Observation of Decomposition-inhibition Effect in GSE (Grapefruit Seed Extract) in Rat Liver

Kyu-Sung Hwang, Do-Seon Lim¹, Ki-Ju Choi², Youn-Kyoung Seo³, Doo-Jin Paik³

Department of Funeral Science, College of Health Industry, Eulji University

¹*Department of Dental Hygiene, College of Health Science, Eulji University*

²*Electron Microscopy Laboratory, Eulji University*

³*Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University*

Abstract : Regarding to preserve the cadaver, formaldehyde has been used as a major preservative. However, the usage of formaldehyde has been considered by its harmful effects such as the disturbing odor, toxicities and limitations to use. Therefore we studied the effect of decomposition-inhibition which is a natural product, grapefruit seed extract (GSE).

Concerning the preservative activity, we sacrificed 8 week old male SD rat and collected liver. Using liver tissues, we treated GSE as a time dependant manner under 37°C, 80±5% humidity conditions. To confirm GSE effects, we applied light and electron microscopic analysis.

In results, we observed GSE attenuated the morphological changes and putrefaction of liver tissues more than 3 days. Herein, we introduced the potential substitute of formaldehyde to preserve the cadaver as well as animal tissues.

Keywords : GSE (Grapefruit Seed Extract), Preservative, Decomposition-inhibition, Rat liver, Microscopic analysis