

멍게 물렁증 근육변성의 병인에 관한 연구

허민도 · 이효은 · 이무근* · 김보성**

부경대학교 수산생명의학과, *대한수산질병관리사회, **국립수산물품질관리원 수산방역과

Histopathological studies on the degenerative changes of somatic muscle in soft tunic syndrome of ascidian, *Halocynthia roretzi*

Min Do Huh[†], Hyo Eun Lee, Mu Kun Lee* and Bo Sung Kim**

*Department of Aquatic Life Medicine, College of Fisheries Science,
Pukyong National University, Busan 608-737, Korea*

**Korean Aquatic Organism Disease Inspector Association, Busan 612-050, Korea*

***Aquatic Life Disease Control Division, National Fishery Products Quality Management Service*

As a part of research to elucidate the pathogenesis of so called Soft Tunic Syndrome(STS), that caused mass mortalities in the cultured sea squirts, *Halocynthia roretzi*, the epidemiological and pathological analysis were done to both clinically normal and diseased groups of the farms of Tongyoung and Geoje coastal areas in southeast sea from February to July, 2008. In the histological finding of the tunic, most of individuals showed tunic softness syndromes that included the disarrangement and destruction of tunic fiber with the simultaneous presence of flagellates-like cells, recently suspected as main agents of tunic softness syndromes. Simultaneously, the intensive degenerative changes of the skeletal muscle of diseased sea squirts were recognized. The changes were characterized with the hyalinization and condensation of muscle fibril and hemocytic infiltration in the muscle fibers. Those were thought to be a kind of typical Zenker's necrosis as in the skeletal muscle of higher vertebrates. Besides of the diseased sea squirts, Zenker's necrosis of skeletal muscles were seen in the normal ones. Epidemiological inquiry for diseased groups revealed that the higher incidences of tunic softness syndrome were recorded in the fast growing groups and in the sites presuming the organic pollution. And Higher malondialdehyde(MDA) and glutathione peroxidase(GPx) activity were detected in the groups showing STS. Those results suggested that Zenker's necrosis of body muscles was a kind of "nutritional myopathy" by oxidative stress. Conclusively, it was considered that Zenker's necrosis of body muscles gives an important clue for elucidating pathogenesis of STS of cultured squirts. And it seems that the necrosis were caused by the oxidative stress to body muscle during abnormal rapid growth of sea squirts.

Key words: Tunic-softness syndrome, Sea squirts, Zenker's necrosis, Pathogenesis, Rapid growth

[†]Corresponding author: Min Do Huh
Tel: +82-51-629-5942; Fax: +82-51-629-5942
E-mail: mindo60@gmail.com

서 론

대한민국에서 현재 양식되고 있는 무척추동물에 속하며, 피낭류의 하나인 멧게(*Halocynthia roretzi*)가 해마다 경남, 통영 지방을 중심으로 소위 멧게의 몸체가 본래의 단단함이 없어지고 물렁해지는 소위 물렁증을 나타내면서 대량 폐사하여, 멧게 양식산업에 큰 피해를 입고 있다(Shin *et al.*, 2011).

물렁증은 피막섬유조직이 분해되어 그 밀도가 떨어지고 피막이 얇아지는 현상을 보이며, 수온 7~18°C 일 때 발생하고 20°C 이상의 수온에서는 발병하지 않는 것으로 알려져 있다 (Shin *et al.*, 2011). 최근 Kumagai *et al.*(2010, 2011)은 물렁증 발병 멧게에서 *Bodonidae* 과 편모충을 그 원인생물로 보고하였고, 공격실험을 통하여 물렁증과의 인과관계를 확인하였다. 또한, Shin *et al.*(2011)은 경상남도 통영의 멧게 수하식 양식장의 물렁증 발병 개체에서 동일한 편모충을 보고하고 피막 연화와의 상관성을 분석하였다.

병증 발생의 근본 원인 추구에 있어 질병 개체에서 특징적으로 확인되는 병변에 대한 병리조직학적 분석은 매우 핵심적이고 결정적인 과학적인 수단이 될 수 있다. 어류의 질병의 대부분은 바이러스, 세균 또는 기생충에 의한 감염증들이다. 그러나 패류 이하의 무척추동물은 고등의 척추동물과 다른 해부생리학적 특성을 갖기 때문에 폐사 피해를 그 폐사와 관련하여 동정된 원인체와의 직접적 상관관계에 대한 깊은 연구가 지금은 절실하다고 생각된다.

더구나 대부분의 감염증이 해당 개체의 면역성 저하가 선행하고 다음에 이차적으로 병원체들 (opportunistic pathogens)이 체내로 침투한다는 근원적 근거에서 접근할 필요가 있다고 본다(B.Austin *et al.*, 1999).

지금까지는 물렁증의 발병 원인으로 동원핵편모충 *Azumiobodo hoyamushi*로 보고하고 있다(Kim *et al.*, 2014).

병리조직학적 관찰은 구조-기능 상관성에 근거하여 진단적 측면에서 원인체와 숙주간의 반응의 관계를 분석한다. 그 병리조직학적 관찰 소견은 개체의 원인체와의 반응성을 표현하기 때문에 진단

의 정확성과 관련하여 매우 중요한 형태학적 증거가 된다(Leeson *et al.*, 1988.; Cheville, 1988).

본 연구는 2008년 2월에서 7월까지 경상남도 통영의 물렁병 발병 개체에 대한 조직학적 분석을 실시한 결과, 물렁증 개체가 모두 오직 체근(體筋)과 피낭에 한하여, 심한 괴사(젠커씨 근응고괴사) 소견을 보인 반면, 기타 내부 장기조직의 손상은 확인되지 않는, 근 특이 조직 변성 소견이었다. 물렁증 발생 해역의 어업인 탐문 조사와 함께, 멧게에 대한 형태학적 및 생화학적인 분석을 실시하였다.

생화학적인 분석은, 본 실험 전 분석결과와 사람을 위시한 동물체의 근조직이 활성산소 노출에 취약한 조직인 것으로 잘 알려져 있기에(M. Donald McGavin *et al.*, 2006), 본 물렁증 발생의 근본적인 원인으로서는, 활성산소에 의한 근조직의 산화성 손상일 수 있다는 가설 위에 실시하였다. 즉, 사전의 역학적 조사에 근거, 근조직 내 활성산소의 과다 발생은 양식 환경해수 내 오염 유기물에 의한 2차적인 이상 현상에 의한다는 가설 위에, 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

조사개체 채집 및 처리 방법

본 연구를 위해 2008년 2월에서 7월에 경상남도 통영과 거제 연안지역의 수하식 멧게 양식장의 멧게에 대한 역학 탐문조사 및 임상학적, 병리조직학적 검사를 실시하였다(Fig. 1). 통영지역 수월리 멧게 수하연 양식장에서 물렁증 변화를 보이는 멧게를 채집하였으며 (n=60, 5~8 cm), 마찬가지로 통영 지역 한산도 근방 멧게 수하연 양식장에서 (n=60, 5~8 cm) 물렁증 변화를 보이는 멧게를 채집하였고 (n=60, 5~8 cm, 거제지역 가조도 근방에서 물렁증 변화가 없는 대조 개체를 (n=60, 4~8 cm) 채집하였다. 채집된 개체는 폭기(aeration)조건하의 신선한 상태에서 실험실로 운반되었다. 멧게 외피 및 육안적인 이상 유무를 확인한 후 외피를 포함한 멧게 전체 조직을 광학현미경적 조사에 사용하였다.

조직표본 제작

멧게 몸체내로 고정액의 침투가 잘 될 수 있도록

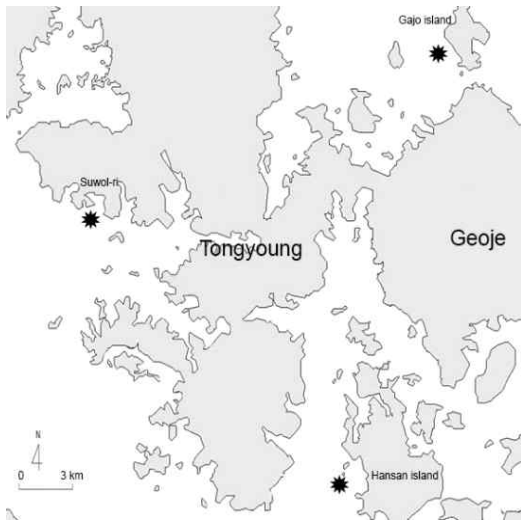


Fig. 1. Sampling sites (*) for the investigation in Tongyoung and Geoje.

내장이 손상을 입지 않도록 뿌리 부분을 조심스럽게 절단한 다음 몸체의 뿌리방향 아래로부터 가위의 둔성 부분을 외피 아래로 넣어 종으로 입수공 및 출수공에 이르기까지 절제하였다. 절제한 멍게 몸체를 Bouin 액에 고정하고, 24시간 후에 피낭을 포함한 몸체 3부분을 횡단으로 재고정하였다. 각 조직편을 통상적인 방법에 따라 파라핀 절편을 제작하고 hematoxylin and eosin(H&E) 염색을 통해 광학현미경에서 확인하였다.

산화스트레스 측정법

멍게의 체근육에서 발생하는 병변의 해석을 위해 체근육에서 발생하는 산화적 스트레스의 유무 및 심도를 malondialdehyde(MDA) 값과 glutathione peroxidase(GPx) 활성을 통하여 측정하였다. 물렁증 증상을 보이는 개체와 보이지 않는 개체의 체근을 균질화한 후 원심분리하여 균질액을 얻었다. 단백질량은 Bradford 법으로 측정하였고 MDA 값과 GPx 활성도를 측정하였다. 우선, 멍게 체근육 1 g을 취하여 근육 무게의 5배 용량인 5 ml의 1/20 M phosphate buffer (pH 7.4)에 균질화 시켜 반응액을 준비하였다. Thiobarbiturice acid (TBA) 변법으로 7% SDS (sodium dodesyl sulfate)로 가용화시켜 여기에 0.67% 2 ml를 가하여 95°C 가온기에서 50분

간 가온 후 즉시 급냉시켰다. Butanol 5 ml을 첨가하여 800 ×g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Glutathione peroxidase(GPx) 활성 측정은 동일한 체근 반응액을 대상으로 Lawrence 등의 방법에 따라 실시하였다 (Aurélie, 2013).

본 결과의 통계처리는 T-test로 각 실험군 평균 간의 유의성을 검정하였다(P<0.05).

결 과

역학 탐문조사

2008년 2월에서 7월까지 통영지역 수월리, 한산도 연안과 거제지역 가조도 연안의 멍게 양식장의 양식어민을 대상으로 역학 탐문조사의 결과, 물렁증 증상은 2월에서 6월사이의 저수온기에 주로 피해를 주는 것으로 조사되었다. 특히, 개체의 크기와 병증발생과는 관련이 없이 성장 속도가 비교적 느린 양식장에서는 물렁증에 의한 폐사율이 낮은 경향을 보였다. 동일 지역의 같은 연령군에서도 개체가 큰 군에서부터 발생이 시작되어, 개체의 크기 보다는 성장의 속도와 폐사와의 관련성이 높은 것으로 조사되었다. 유기물 오염이 충분히 의심되는 한산도 연안 양식장에서 가장 높은 폐사율을 보였으며, 비교적 청정지역으로 불리는 거제 가조도 주변해역 개체에서는 병증이 확인되지 않았다.

병리조직학적 분석

물렁증을 보인 개체군은 피낭의 일부분 또는 전체가 얇아져 탄력이 없으며 고유의 강도를 잃었고, 입수공과 출수공이 부종과 유사하게 팽창된 형태를 가지고 있었다. 심도가 깊은 개체에서는 피낭 뿐만 아니라 체근육도 얇아져 내부장기가 보이거나 피낭 및 체근육이 파열된 경우도 있었다(Fig. 2).

대조군과 물렁증 개체의 피낭에 대한 조직학적 분석을 실시한 결과, 피낭과 근육 이외의 장기에서는 조직학적 이상소견이 인정되지 않았다.

물렁증 개체군의 피낭에서는 피낭 두께의 감소와 함께 국소적으로 피낭섬유(tunic fiber)의 고유 배열을 상실하고 단절되거나 희박화되어 있었다. 특히, 피낭섬유의 구조 파괴가 확인된 부분에 편모



Fig. 2. Presentative feature of tunic softness syndrome in sea squirts.

를 가진 호염성의 방추형 세포가 확인되었다. 염증 반응으로 추정되는 혈구세포로 보이는 짙은 호산성 세포 침윤이 인정되는 부분도 있었으며, 개체에

따라 피낭상피가 심하게 위축되어 그 두께가 현저히 낮아져 편평 혹은 입방상피화하여 그 고유한 배열상을 상실하거나 탈락되는 경우도 있었다 (Fig. 3).

대조군의 정상적인 멍게의 근육조직은 피낭의 내측에서 내장 전체를 덮고 있었다. 멍게의 근육조직은 크게 두 개의 층으로 나뉘져 바깥 피낭층으로 종주근(longitudinal muscular layer)이 있으며 내측으로 내장을 감싸고 있는 운주근(circular muscular layer)이 위치하였다. 두 근육층의 조직학적 구조는 매우 유사하나 근세포(myofibre)가 놓인 방향에 따라 다양한 형태를 보여주었다. 기본적인 운주근의 종단면을 보면 근섬유가 근섬유막(endomysium)으로 둘러싸여 느슨하게 배열되어 있는 모습을 볼 수 있었으며, 근섬유에서 특징적으로 근원섬유(myofibrils)가 근섬유막쪽으로 뭉쳐 있는 모습을 볼 수 있었다. 근원섬유가 근섬유막 쪽으로 몰리면

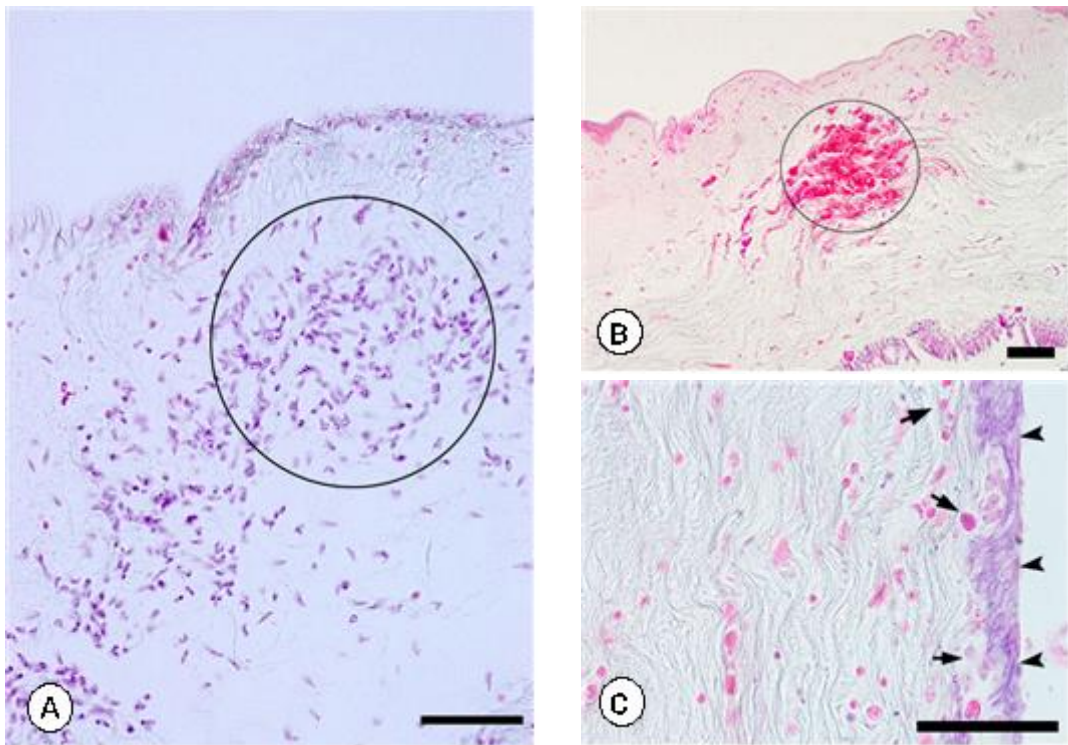


Fig. 3. Histological observation of tunic suffered with tunic softness syndrome of sea squirt. A: Flagellate-like cells (circle) in the scarce tunic fibers, B: Focal eosinophilic cell infiltration in the tunic (circle), C: Degenerative tunic epithelium (arrowheads) and their desquamated nucleus (arrows). H&E, Bar=50 μ m.

서 근섬유의 중앙부에는 빈 공간이 보이는데, 보통 이 공간은 비어 있거나 과립성 물질이 소량 보이기도 하였다. 종주근에서도 이러한 빈 공간들이 보이는데, 역시 과립성 물질이 인정되는 경우도 있었다. 종주근에서는 골격근에 특징적인 횡문(stri-

ation)을 관찰할 수 없었고 근세포의 특성상 골격근(skeletal muscle)이라기보다는 평활근(smooth muscle)에 더 가까운 것으로 확인되었다(Fig. 4-A).

물렁증 증상을 보인 멍게에서는 외투 아래 체근의 변성변화가 두드러지고 근조직 내 다수의 he-

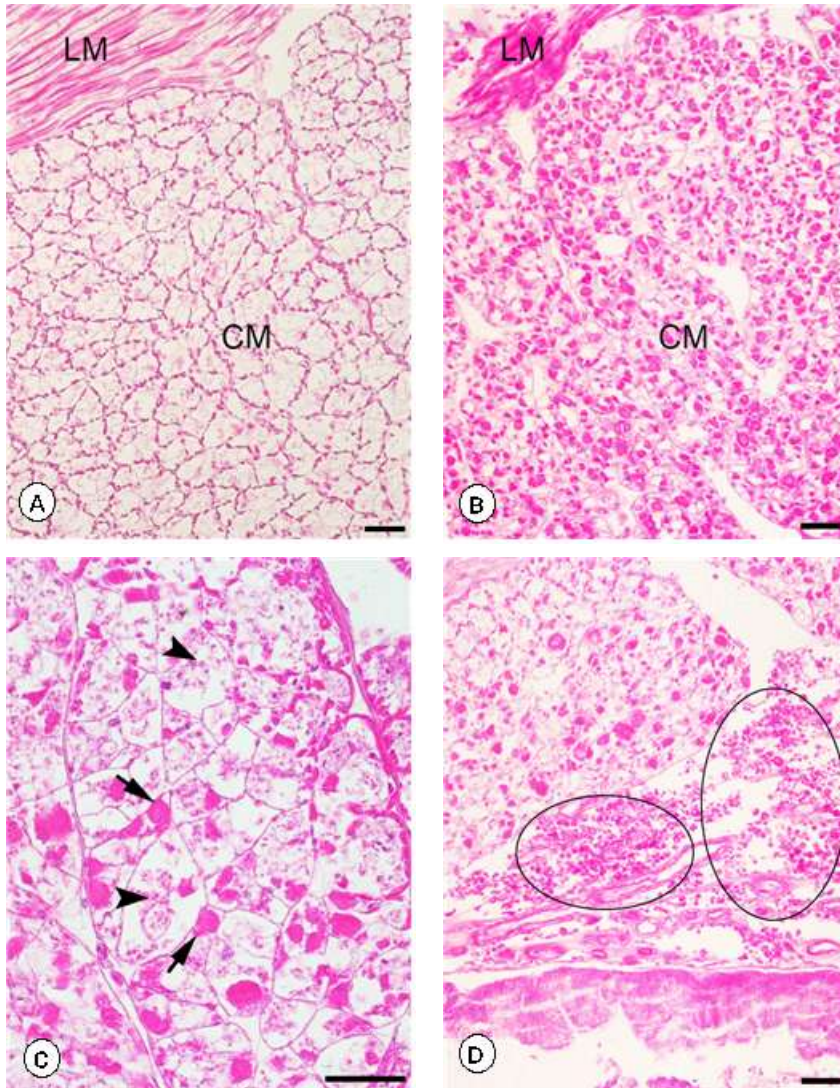


Fig. 4. Histological observation of skeletal muscle from normal and diseased sea squirts with tunic softness syndrome. A: Outer longitudinal muscle layer (LM) and inner circular muscle layer (CM) in normal sea squirts, B: Zenker's necrosis in the muscle layers in the sea squirts with tunic softness syndrome. Note the eosinophilic condensed muscle fibril. C: High magnification of circular muscle layer with Zenker's necrosis. Condensed degenerative muscle fibril with random distribution in the muscle fibers were seen (arrows). Hemocytes were infiltrated in the muscle fibers (arrowheads). unic (circle), D: Heavy hemocytic infiltration near degenerative muscle fibers (elliptical circles). H&E, Bar=100 μ m.

mocyte 침윤이 확인되었다. 특히 종주근에서 근원 섬유가 한쪽으로 치우쳐지고 불균질한 질은 호산성을 띄는 심한 젠커씨 괴사 (Zenker's necrosis) 가 확인되었다(Fig. 4). 근조직 내 과립 출현은 검사한 대부분의 개체군에서 경미하게 확인되었다. 물렁증을 보인 개체군에서 심도의 차이는 있지만 대부분 이러한 젠커씨 괴사를 확인할 수 있었다. 이러한 젠커씨 괴사와 물렁증의 출현율을 분석한 결과, 조직학적 젠커씨 괴사가 피낭의 편모층의 출현보다 높은 빈도로 출현하였으며, 심도의 차이는 있지만 정상 명계 개체군의 근육에서도 출현하였다(Table 1).

근육조직 외 검사한 내부 장기에서는 변성 및 괴사 소견을 전혀 인정할 수 없었고, 각종 결합조직내의 hemocyte 침윤 정도만 확인되었다. 생식소의 간질 및 결합조직과에 다수의 hemocyte 침윤

소견이 확인되었으나 임상소견 및 조직학적 소견과 유의한 관련이 없었다. 생식소, 심장, 장, 소화맹낭 등에는 특기할 소견이 인정되지 않았다.

MDA 및 GPx 활성도 측정

근육에서 나타난 젠커씨 괴사와 관련하여 산화적 스트레스의 발생유무를 측정하기 위하여 근육의 malondialdehyde (MDA) 값과 glutathione peroxidase (GPx) 활성치를 측정한 결과, 물렁증과 근육변성이 없는 정상 개체군보다 물렁증과 근육변성을 나타낸 개체군이 유의적으로 MDA 값이 높게 나타났다. GPx 활성치의 경우, 근육변성을 나타낸 개체군이 정상 개체군보다 높게 나타났으나 통계적인 유의성은 인정되지 않았다(Fig. 5).

Table 1. Number of individuals with clinical signs and histological lesions related with tunic softness syndrome of sea squirts

| | Hansan Island (n=60) | Suwol-ri (n=60) | Gajo island (n=60) |
|---|-------------------------|--------------------|-----------------------|
| Individuals with clinical softness | 60 | 60 | 0 |
| Individuals with degenerative muscle fibers | 57 | 46 | 17 |
| Individuals with flagellate-like cells in the tunic sections | 48 | 47 | 0 |
| Individuals with degenerative muscle fibers + flagellate-like cells | 43 | 37 | 0 |

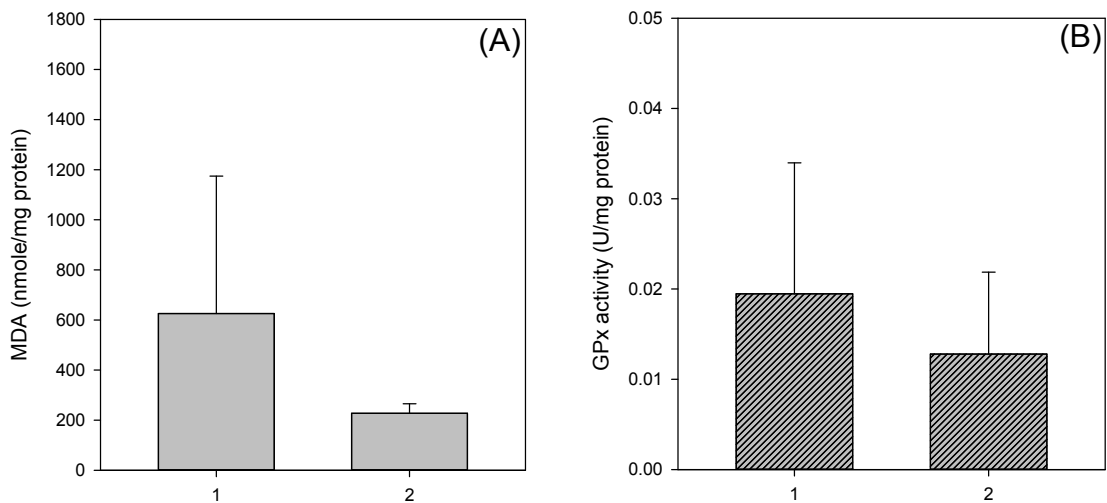


Fig. 5. Biochemical analysis of the muscle of sea squirts. A: Malondialdehyde (MDA) level (nmol/mg protein) in the muscle, B: Glutathione peroxidase (GPx) activity (U/mg protein) in the muscle (1: The sea squirts suffered with tunic softness syndrome, 2: normal sea squirts from Suwol-ri). Values are means \pm S.D.

고 찰

본 연구에서 물렁증을 보인 멍게 개체군의 피낭에서 Kumagai *et al.* 과 shin *et al.*(2011)의 보고와 유사한 편모충과 인접 피낭섬유의 붕괴가 인정되어 전형적인 물렁증의 한 형태로 사료되었다. 본 조사에서는 체근의 광범위한 변성변화와 함께 이러한 편모충이 확인되었다. 근육 변성은 체근에 한정되어 나타났으며 전형적인 응고괴사 형태인 초자화, 즉 소위 젠커씨 괴사(Zernker's necrosis)의 형태를 취하였다(M. Donald McGavin *et al.*, 2006). 근육의 젠커씨 괴사는 임상적으로 물렁증을 가진 대부분의 개체에서 출현하여 물렁증과 연관된 조직학적 변화로 사료되었고, 정상적인 멍게 개체군에서도 다수 출현하여 물렁증의 전구병변의 하나로 의심되었다.

한편, 본격적인 역학조사를 실시하지는 않았으나, 탐문조사의 결과 물렁증은 유기물 오염 및 높은 성장속도가 다양한 측면에서 관계있는 것으로 사료되었고, 생화학적 분석 결과 물렁증과 근육변성을 나타내는 멍게 개체군에서 산화적 스트레스와 관련있는 MDA 수치가 유의하게 높게 나타나 멍게 체근육의 젠커씨 괴사는 고등척추동물에 발생하는 영양성 근병(nutritional myopathy)의 일종으로 의심되었다(M. Donald McGavin *et al.*, 2006).

영양성 근병은 어류를 포함한 양, 돼지, 소 등에 잘 발병되고 빠른 성장을 보이는 동물이나 성장, 특히 어린 개체의 급속성장 시기에 잘 발병되는 것으로 알려져 있다(M. Donald McGavin *et al.*, 2006). 이 질병은 항산화인자의 주체가 되는 비타민 E, 셀레늄 또는 그 양자의 결핍이 주원인이 되며, 조직학적으로 초자양(hyaline) 근괴사가 특징적이며, 결과적으로 항산화작용의 결핍에 따른 근섬유의 산화장해에 따른 질병인 것으로 알려져 있다(M. Donald McGavin *et al.*, 2006). 생물이 급속한 성장을 이루는 시기에 세포의 산화환원반응(redox reaction)이 활발하여지게 되고, 이 때 세포 내 활성산소(reactive oxygen species)의 발생이 많아지게 되므로 세포기능 유지를 위해서는 세포 내 항산화작용의 역할이 매우 중요한 것으로 사료된다. 더구나 근조직은 지속적으로 수축활동이 이루어

어지므로 항상 높은 생리활성 상태에 놓이게 되어, 항산화작용에 대한 요구성이 높아지고, 산화스트레스에 노출될 가능성이 높은 조직이 되는 것이다(M. Donald McGavin *et al.*, 2006). 그러나 급속 성장과 산화스트레스에 관한 연구는 많지 않고 앞으로 더욱 체계적인 연구가 필요한 것으로 생각된다.

따라서 근 괴사의 일차적인 원인은 산화스트레스성 손상에 기인한 것이며, 편모충의 개재는 약화된 개체에 이차적으로 침입한 것으로 멍게의 피낭 손상에 직간접적으로 영향을 미칠 것으로 사료되었다. 이 편모충은 피낭 외의 장소에서는 발견되지 않고, 근조직을 제외한 내부 장기에는 전혀 형태학적 이상 소견을 나타내지 않았기에 근육의 괴사 손상은 이 편모충과 무관한 것으로 사료되었다.

지금까지의 연구 결과를 종합하면, 근육층에 한정된 괴사현상은 산화스트레스와 밀접한 연관이 있는 것으로 사료되며, 근육괴사부로 유리된 용해소체 유래의 각종 효소가 인접한 피낭의 연화현상을 유발하여 물렁증 현상에게까지 연결될 수 있는 것이며, 물렁증의 전형적인 외부조건인 외피의 연화과정의 상체에 대하여는 편모충의 역할과 관련하여 또 다른 연구가 필요한 것으로 사료되었다.

References

- Aurélié Dupont-Prinet, Marion Pillet, Denis Chabot, Tanya Hansen, Réjean Tremblay, Céline Audet. Northern shrimp (*Pandalus borealis*) oxygen consumption and metabolic enzyme activities are severely constrained by hypoxia in the Estuary and Gulf of St. Lawrence, *Experimental Marine Biology and Ecology* 448:298-307. 2013.
- B. Austin and D. A. Austin, Characteristic of the diseases, *Bacterial fish pathogen: Disease of farmed and wild fish*, 3rd ed, Praxis publishing, UK, 13-34, 1999.
- Choi, D.L., Lee, N., Kim, M.S., Seo, J.S., Park, M., Kim, J.W. & Hwang, J.Y. Flow cytometry analysis of softness syndrome effects on hemocytes of the tunicate, *Halocynthia roretzi*. *Aquaculture* 309:25-30. 2010.
- Hirose, E., Ohtake, S.I. & Azumi, K. Morphological characterization of the tunic in the edible ascidian, *Halocynthia roretzi* (Drasche), with remarks on 'soft

- tunic syndrome' in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* 32:433-445. 2009.
- Jeong, J.E., Kang, S.W., Shin, Y.K., Jun, J.C., Kim, Y.O., Hur, Y.B., Kim, J.H., Chae, S.H., Lee, J.S., & ho Choi I. Comparative analysis of expressed sequence tags (ESTs) between normal group and softness syndrome group in *Halocynthia roretzi*. *Molecular & Cellular Toxicology* 7:357-365. 2011.
- Kim, H.J., Park, J.S., Park, K.H., Shin, Y.K. & Park, K.I., The kinetoplastid parasite *Azumiobodo hoyamushi*, the causative agent of soft tunic syndrome of the sea squirt *Halocynthia roretzi*, resides in the East Sea of Korea. *Journal of Invertebrate Pathology* 116:34-42, 2014.
- Kumagai, A., Suto, A., Ito, H., Tanabe, T., Song, J.Y., Kitamura, S.I., Hirose, E., Kamaishi, T. & Miwa, S. Soft tunic syndrome in the edible ascidian *Halocynthia roretzi* is caused by a kinetoplastid protist. *Diseases of aquatic organisms* 95:153. 2011.
- Kumagai, A., Suto, A., Ito, H., Tanabe, T., Takahashi, K., Kamaishi, T. & Miwa, S. Mass mortality of cultured ascidians *Halocynthia roretzi* associated with softening of the tunic and flagellate-like cells. *Diseases of aquatic organisms* 90:223-234. 2010.
- M. Donald McGavin and James F. Zachary, *Skeletal Muscle In: Pathologic basis of veterinary disease*, 4th ed, Mosby, USA, 66:973-1039. 2006.
- Shin, Y.K., Kim, H.J., Park, K.I., Choi, M.S., Jun, J.C. & Kim, O.K., Occurrence of bi-flagellated protists in the tunics of ascidians *Halocynthia roretzi* with tunic-softness syndrome collected from Tongyeong, south coast of Korea. *Journal of Fish Pathology* 24:197-204. 2011.
- Shin, K.S., Park, J.J., Jun, J.C., Myeong, J.I. & Yang, S.J. Effect of Dissolved Oxygen on Occurrence of Tunic Softness Syndrome in Sea Squirt *Halocynthia roretzi*, Tongyeong, South Coast of Korea. *Journal of Environment Biology* 31:204-212. 2013.

Manuscript Received : Apr 05, 2021

Revised : Jun 09, 2021

Accepted : Jun 14, 2021