

구리 독성에 기인하는 비정상적인 어류행동의 신경생화학적 분석

신성우, 조현덕*, 전태수*, 김정삼**, 이성규***, 고성철*

한국해양대학교 토목환경시스템공학부, *부산대학교 생물학과,
경북대학교 동물공학과, *한국화학연구원 환경독성연구부

Neurobiochemical Analysis of Abnormal Fish Behavior Caused by Copper Toxicity

Sung-Woo Shin, Hyun-Duk Cho*, Tae-Soo Chon*, Jong-Sang Kim**,
Sung-Kyu Lee*** and Sung-Cheol Koh*

*Division of Civil and Environmental Systems Engineering, Korea Maritime University,
Busan 606-791, Korea, *Department of Biology, Pusan National University,
Busan 609-735, Korea, **Department of Animal Science and Biotechnology,
Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea, ***Division of Environmental Toxicology,
Korea Institute of Toxicology, Daejeon 305-506, Korea*

ABSTRACT

The goal of this study is to develop a biomarker used in monitoring abnormal behaviors of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) as a model organism caused by hazardous chemicals. Japanese medaka was treated by copper of appropriate sublethal concentrations after starvation for 48 hr. The untreated individuals showed common behavioral characteristics (*i.e.*, smooth and linear movements). Locomotive activity of the fish was monitored using an image processing and automatic data acquisition system. When treated with copper (100 ppb), the fish showed shaking patterns more frequently. As the concentration of copper increased to 1,000 ppb, activity decreased, and the fish showed an erratic movement. Fish were exposed to copper at various concentrations (0, 100 and 1,000 ppb) for 24 hrs, and acetylcholine esterase (AChE) activity was observed. When fish were exposed to 1,000 ppb of copper, the body AChE activities appeared to decrease but the head AChE activities showed little change. Expressions of tyrosine hydroxylase (TH) protein in the different organs from both head (brain) and body (kidney) portions affected by the copper treatment were analyzed using immunohistochemical technique compared with control. Five organs of the fish (olfactory bulb, hypothalamus, optic lobe, pons and myelencephalon regions) showed a relatively strong TH protein expression in the control experiment. A differential expression of TH, however, was observed in the treatment (100 ppb and 1,000 ppb). The treatment (1,000 ppb) significantly suppressed TH protein production in the brain regions. In kidney, however, the same treatment caused little suppression compared with the control. Copper appeared to be less effective in suppression of TH than diazinon, a known TH suppressor. It was concluded that TH could be used as a potential biomarker to monitor the acute copper toxicity in Japanese medaka.

Key words : copper, tyrosine hydroxylase, acetylcholine esterase, neurobiochemical, biomonitoring, biomarker

※ To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-51-410-4418, E-mail: skoh@mail.hhu.ac.kr

서 론

생태학적 위해성은 특정한 화학물질과 혼합된 화학물질의 노출(exposure)과 유해성(hazard) 산물에 있어서 동등하게 적용되어야 한다. 화학물질의 노출과 유해성의 폭넓은 측정은 생물학적 시스템을 이용한 독성평가에 의하여 그 목적을 달성 할 수 있다. 또한 생물학적 시스템은 화학물질 스트레스의 분자적·생리학적 지시자(indicator)인 biomarker를 포함한다(Landis and Yu, 1999). 최근에는 독성 화학물질의 치사농도에 대한 행동학적 반응 *in situ* 모니터링 도구의 한 수단으로서 주목을 받고 있다.

황산구리는 상업적으로 개조된 어장에서 살조제로서 널리 사용되었으며, 어류의 병원성 원생동물인 기생충에 대해서 효과적으로 처리되었다. 일반적으로 구리는 경골어류에 높은 독성이 있는 것으로 알려져 있다(Perschbacher and Wurts, 1999). 전 세계적으로 많은 담수시스템 주변의 환경은 높은 구리독성을 가지고 있으며, 수생시스템 모니터링과 어류 치사의 조사에 대한 분석기술로서 담수 경골어류내 구리 노출에 대한 확실하고 신뢰성 있는 biomarkers 결정은 중요한 관심사로 대두되고 있다(Daglish and Nowak, 2002). 담수 경골어류에 있어서 구리 biomarkers의 최근 연구들은 간장 내 구리 잔여물과 간장 metallothionein (MT)의 직접 또는 간접적 분석에 초점을 두고 있다. 구리는 척추동물내 많은 수의 생물학적 반응을 수반하는 필수원소이며, 또한 이온 수송과 산화 효소반응 그리고 헤모글로빈 합성을 포함한다. 구리는 수중 내 산소의 환원을 촉매하는 cytochrome c oxidase의 구성물질이며, 이것은 세포호흡에 있어서 중요한 단계로 작용한다. 구리 결합단백질은 신경적 증상(멘케스병, 윌슨병)과 같은 결핍 이상 그리고 신경퇴행성 질환(알츠하이머병)에서의 금속이온 항상성의 지속과 유지에 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 멘케스와 윌슨 단백질은 구리 전달자로서의 특성을 가지며, 그리고 알츠하이머병의 amyloid precursor protein (APP)는 구리(II)와 아연(II) 전달자로서의 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다(Strausak *et al.*, 2001). 윌슨병은 간이나 뇌에 구리가 이상축적을 하여 세포손상을 일으켜 손이 떨

리고 언어장애와 같은 신경증세를 수반하는 것으로 알려져 있으며, 멘케스병은 조직내 구리와 metallothionein(구리의 보관, 독성 제거, 운반에 관여)이 증가되어 상대적 구리결핍 및 구리 함유 효소의 기능 저하로 인한 피부와 모발의 색소결핍, 저체온증, 골격의 기형, 경련발작, 중추신경계의 이상으로 나타나는 것으로 알려져 있다(Mercer, 2001; Fatemi and Sarkar, 2002).

구리의 수생생물에서의 작용메카니즘에 관한 연구는 경골어류에 의하여 많이 알려져 있으며(Taylor *et al.*, 1996; Clearwater *et al.*, 2002), 어류내 연속적인 세포학적 그리고 생리학적 변화에 있어서 급성 독성 노출에 관한 연구들이 주로 수행되어지고 있다(Handy, in press 2003). 그러나 지금까지 구리가 경골어류의 행동에 미치는 영향을 신경생화학적인 측면에서 분석·고찰한 연구는 드물다. 따라서 본 연구에 있어서는 구리의 급성 신경독성에 대한 어류의 행동변이를 관찰하였으며, 그에 따른 이상행동 반응에 관련된 신경전달물질 생성 및 소멸과 관련된 효소활성의 변화를 비교 검토하였다. 나아가서 이들 효소의 발현 여부가 어류의 이상행동을 설명할 수 있는지 검토 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 관찰 및 화학약품

실험 생물인 송사리는 (*Oryzias latipes*)는 일본 나고야대학교 bioscience center의 Laboratory of Freshwater Fish Stocks에서 육성된 "d-rR" 계통을 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소로부터 분양 받아 사용하였다. 부화 후 6~12개월 되는 실험 송사리는 수조(45×24×30 cm)내에서 탈염소 처리된 수도수(pH 6.5~7.3) 30 L을 넣고 산소 폭기를 하여 예비 사육을 하였다. 예비 사육기간 동안 인공건조먹이(Tetramin®)를 주었으며 광조건 L10:D14 및 온도 25±1°C에서 사육하였다. 체장 3.44±0.19 cm 및 체중 2.91±0.05 mg인 개체를 각 개체 별로 크기 44×19×10 cm인 수조에 옮겨 옆에서 2차원 관찰하였다.

관찰 기간 동안 먹이를 주지 않고 화합물 처리 전 2일 및 처리 후 2일을 개발된 자동 데이터 획득 및 목표물 추적 프로그램을 통하여 행동 반응

을 관찰하였다. 관찰시스템에서 실험 송사리의 궤적은 CCTV를 통하여 아날로그영상 형태로 송출되며 이는 다시 video overlay board로 보내져, 실시간 0.25초 간격으로 실험 송사리의 위치가 x, y좌표로 저장되었다.

2차원 이동 궤적을 매 5분 단위로 판별하였다. 일반적으로 시간에 따라 x, y좌표에서 이동한 궤적 유형은 다양하였는데 개체에 따라 다르게 나타나고, 각 개체 내에서도 시간에 따라 달리 나타났다. 궤적 유형 전반을 세세하게 파악하는 것은 어렵지만, 일반적으로 자주 반복되는 유형은 육안 관찰로도 비교적 명료하게 알 수 있었다. 매 5분 단위로 관찰된 궤적에 대해서 선형성, 만곡성, 움직임의 빠르기 및 전체적인 2차원 모양을 경험 있는 관찰자에 의하여 정성적으로 구분되었다.

실험 화학약품인 5수화물 황산구리 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)는 Sigma Chemical Corporation (Mo., USA)에서 구입하여 치사 농도 하에서 처리하여 사용하였다.

3. Acetylcholine esterase (AChE) 분석

Acetylcholine esterase (AChE) 정량은 황산구리에 노출된 송사리를 각각 0, 100, 1,000 ppb에서 24시간 노출하여 활성변화를 관찰하였으며, 송사리의 머리와 몸통부분 AChE 활성의 측정은 기질로서 45 mM 인산염 완충제 (phosphate buffer), pH 8.0, 0.56 mM acetylcholine을 이용하는 기존의 방법을 사용하였다 (Ellman *et al.*, 1961; Kim *et al.*, 2003).

4. 면역조직화학 실험

신경전달물질 합성에 관여하는 tyrosine hydroxylase (TH) 면역 반응성 측정은 avidin-biotin complex (ABC) 방법을 사용하였다 (Hsu and Raine, 1981). 실험 방법의 절차는 1) 송사리 절개 후 PBS 고정액으로 조직고정 단계 2) nonspecific binding을 차단하기 위한 조직의 충분한 incubation 안정화 단계 3) 항체반응 (anti-body reaction) 4) washing 5) dehydrating 6) 광학현미경 관찰 및 사진촬영으로 실시하였다. 면역조직화학 방법에 의한 TH 단백질의 조직별 발현에 관한 송사리 실험은 황산구리를 각각 0, 100, 1,000 ppb 농도로 48시간 처리한 후 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 송사리의 행동반응

앞서 언급한 바와 같이 2차원 이동 궤적에 대해서 선형성, 만곡성, 움직임의 빠르기 및 전체적인 2차원 모양을 정성적으로 판별하였다. 처리하지 않은 개체는 일반적으로 활동성이 높았고, 관찰수조의 전체를 주로 유영하였으며, 움직임의 궤적이 상대적으로 부드러우며 궤적은 선형적으로 나타났다 (Fig. 1). 반면 황산구리를 처리했을 경우 전체적으로 떨림 (shaking) 현상이 자주 있었고, 수면부에 긴 시간 머물거나 수조 벽 주위에서의 수직 운동이 많았으며, 농도가 높아질수록 활동성이 떨어지는 경향을 보였다. 황산구리 농도가 각각 0, 10, 100,

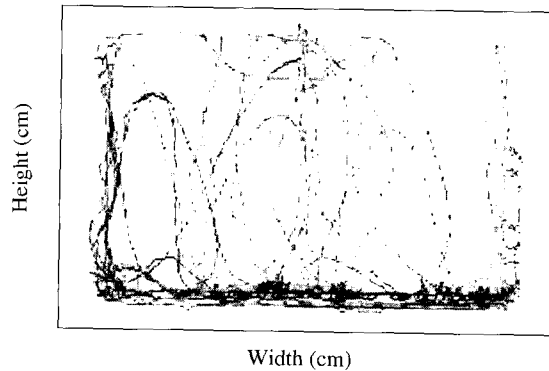


Fig. 1. The locomotive tracks of *Japanese medaka* in two dimension before the copper treatments.

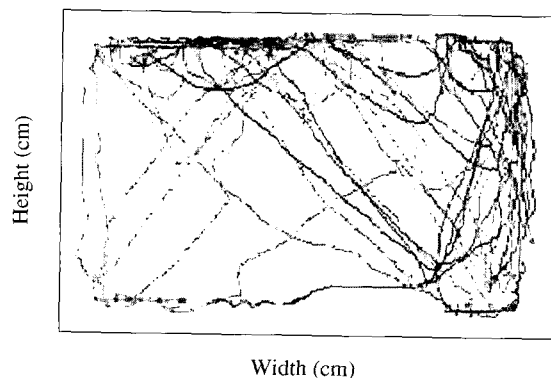


Fig. 2. The locomotive tracks of *Japanese medaka* in two dimension after the copper treatments (100 ppb).

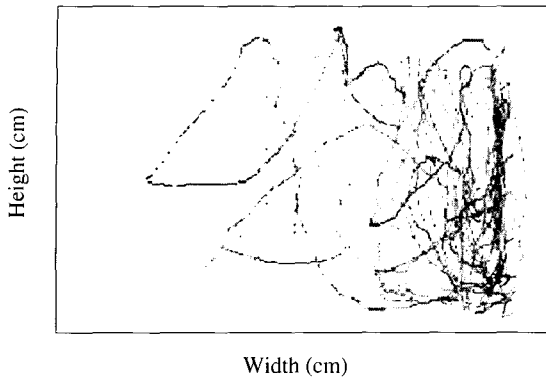


Fig. 3. The locomotive tracks of *Japanese medaka* in two dimension after the copper treatments (1,000 ppb).

1,000 및 5,000 ppb 농도로 함유된 용액에서 송사리를 48시간 노출시킨 결과, 5,000 ppb 농도에서는 모두 사멸하였다. 반면 10 ppb에서는 잘 관찰되지 않았다. 황산구리 100 ppb 처리시에는 떨림현상이 빈번하게 나타났으며, 표면부에서 긴 시간 머무르고, 수조 벽면을 끼고 수직적으로 유영하였다(Fig. 2). 고농도 1,000 ppb 처리시에는 활성이 현저히 감소되었고, 유영속도가 낮았으며, 벽쪽에서 수직적으로 유영하는 경향성이 보다 높았다(Fig. 3).

Charoy 등 (1999)의 실험에 있어서는 담수종인 윤충 *Brachionus calyciflorus*를 독성 스트레스의 치사량 지시자로서 자동궤적시스템(automatic tracking system)을 이용하여 유영행동 변화를 관찰하였다. 실험은 황산구리를 0, 2.5, 6.2, 12.5, 20 및 25 $\mu\text{g l}^{-1}$ 의 농도로 처리하여 5분 그리고 2, 6시간의 처리시간별로 각각 유영속도(speed)와 굴곡(sinuosity) 그리고 유영거리(periods of swimming)를 관찰하였다. 여기서 유영속도와 유영거리는 농도의 증가와 시간의 경과에 따라 비례적으로 감소됨이 관찰되었다. 또한 어류의 독성물질에 대한 노출시(시안, 크롬, 페놀: 3~100 ppm; fenitrothion: 0.4 ppm) 관찰된 이상적 행동변화는 호흡곤란에 의한 수면부상성, 독성물질로부터의 회피성, 비상 시 개체간 확산성 및 빠른 행동변화 등이 알려져 있다(Ram and Gopal, 1991; Lee and Lee, 1998). 유기인산계 살충제인 다이아지논을 이용한 본 연구팀의 이전 실험결과에 있어서도(Shin *et al.*, 2001) 약제처리 시 유영속도와 유영거리의 유의적인 감소, 수면부상

후 머무름, 꼬인 실타래와 같은 궤적 양상의 운동을 보여주었다. 이와 같이 본 실험결과에서 황산구리 처리시 관찰된 송사리의 비정상적인 이상행동 반응은 황산구리의 독성에 의해 야기되며, 또한 처리량에 따라 특이적인 양상을 보이는 것으로 판단된다.

Figs. 1-3에서 본 바와 같이 황산구리에 대한 독성행동 반응의 궤적자료는 비선형적이고 복잡하여 계량적으로 해석하기가 힘이 든다. 최근 Kwak 등 (2002)이 송사리에 대해서 diazinon에 대한 대표적 행동반응을 수리적으로 분리하고 인공신경망으로 자동 인지하였다. 그러나 이러한 계량적 분석을 위해서는 별도의 연구 노력이 필요하므로 앞으로 본 연구진을 황산구리에 대한 송사리의 2차원 궤적 반응에 대해서도 계량적으로 분석하고 자동 인지할 수 있도록 하고자 한다.

2. 구리 처리시 AChE 효소활성의 영향

송사리를 0, 10, 100, 1,000, 그리고 5,000 ppb 농도의 황산구리 용액에 24시간 노출시킨 결과 1,000 ppb 이하의 농도에서만 생존을 하였으며, 0, 100, 1,000 ppb의 농도에서 신경전달물질인 acetylcholine을 분해하는 AChE 효소활성 변화를 각각 관찰하였다. 몸통부위에서는 1,000 ppb 농도 처리시 효소활성이 감소되는 경향이였으며, 머리부위에서는 효소활성이 다소 증가되는 경향을 보였다. 그러나 모든 경우에 있어서 유의성은 인정되지 않았다(Fig. 4).

Acetylcholine은 운동신경과 부교감신경 말단부

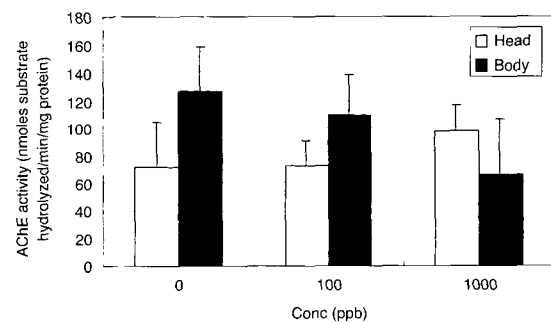


Fig. 4. Changes in acetylcholine esterase activity of *Japanese medaka* exposed to different levels of copper.

위에서 분비되는 신경전달물질로서의 중요한 생리학적인 기능을 가지고 있으며, 신경말단에서 분비된 acetylcholine은 자극의 전달이 끝나면 cholinesterase에 의해 분해되는 것으로 알려져 있다. 이러한 어류의 구리 노출에 따른 AChE 활성변화에 관한 이전 연구에서는, 무지개송어를 황산구리 14 µg/liter의 농도로 21일간 노출시킨 후 머리부위 AChE 효소활성을 관찰한 결과, 각각 2일, 7일, 그리고 14일 노출 후의 AChE 효소활성이 대조구에 비해서 증가됨이 보고되었다 (Dethloff *et al.*, 1999). Romani 등 (2003)의 연구에서는 지중해 경골어류인 *Sparus auratus*를 0, 0.1, 0.5 ppm의 농도로 황산구리에 20일간 노출시킨 후 머리부위의 AChE 활성을 측정된 결과, 대조구와 0.1 ppm 농도에서는 별다른 차이가 없었으나, 0.5 ppm에서는 뚜렷한 효소의 증가를 보였다. 본 연구의 급성독성실험에서도 머리부위의 AChE 활성은 통계적 유의성은 없었으나 다소 증가됨이 관찰되었으며, 이러한 AChE 효소활성의 증가는 상대적인 acetylcholine 농도의 감소로

이어져 결국 운동신경과 부교감 신경을 자극하여 송사리 이상행동을 초래한 것으로 판단된다. 그러나 이는 AChE 저해제로 알려진 tetrodotoxin (Rosenblad and Nilsson, 1993) 등을 사용하는 실험을 통하여 보다 명백히 규명되어질 필요가 있을 것이다.

3. 송사리내 TH 단백질의 조직별 분포

약제를 처리하지 않은 대조구 머리(뇌)부위에서의 TH 단백질의 발현은 각각 후각망울 (olfactory bulb; OB), 시상 (hypothalamus), 시각엽 (optic lobe), 교뇌 (pons) 그리고 연수 (medulla)의 부분에서 발현되었다 (Fig. 5). 100 ppb 처리시 머리(뇌) 부위에서는 전뇌 부분인 후각망울에서만 TH 단백질의 발현이 억제되는 것이 관찰되었다 (Fig. 6). 고농도인 1,000 ppb 처리시 머리(뇌) 부위에서의 TH 단백질의 억제는 후각망울, 시상, 시각엽, 그리고 교뇌의 부분에서 비교적 억제되는 것이 관찰되었다 (Fig.

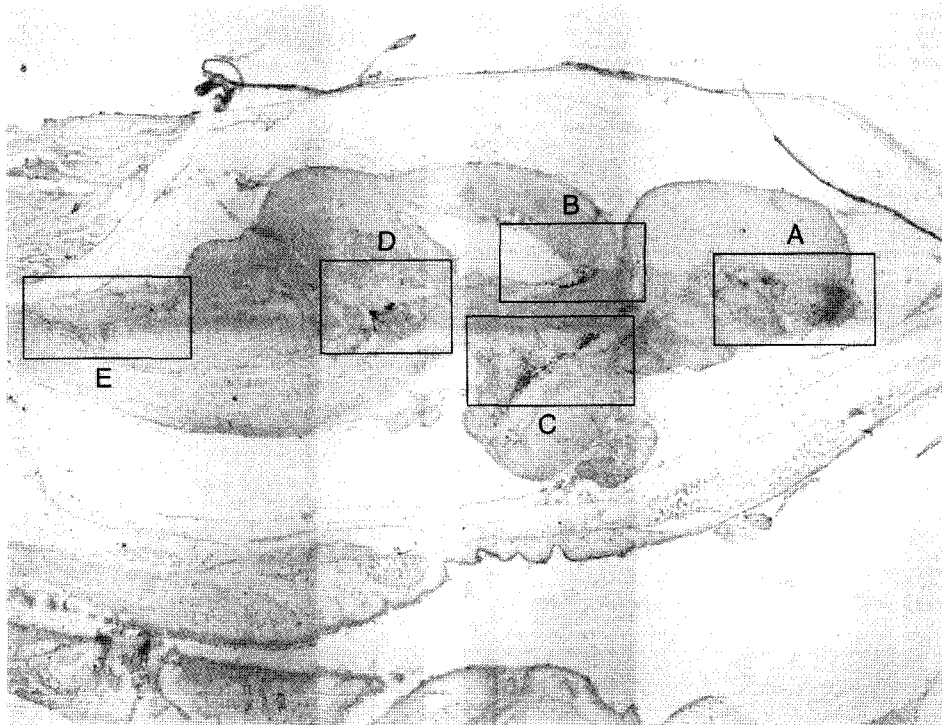


Fig. 5. Localization of TH-expressing cells in brain regions of the *Japanese medaka* when not treated with copper. A, olfactory bulb; B, optic lobe; C, hypothalamus; D, pons; E, medulla.

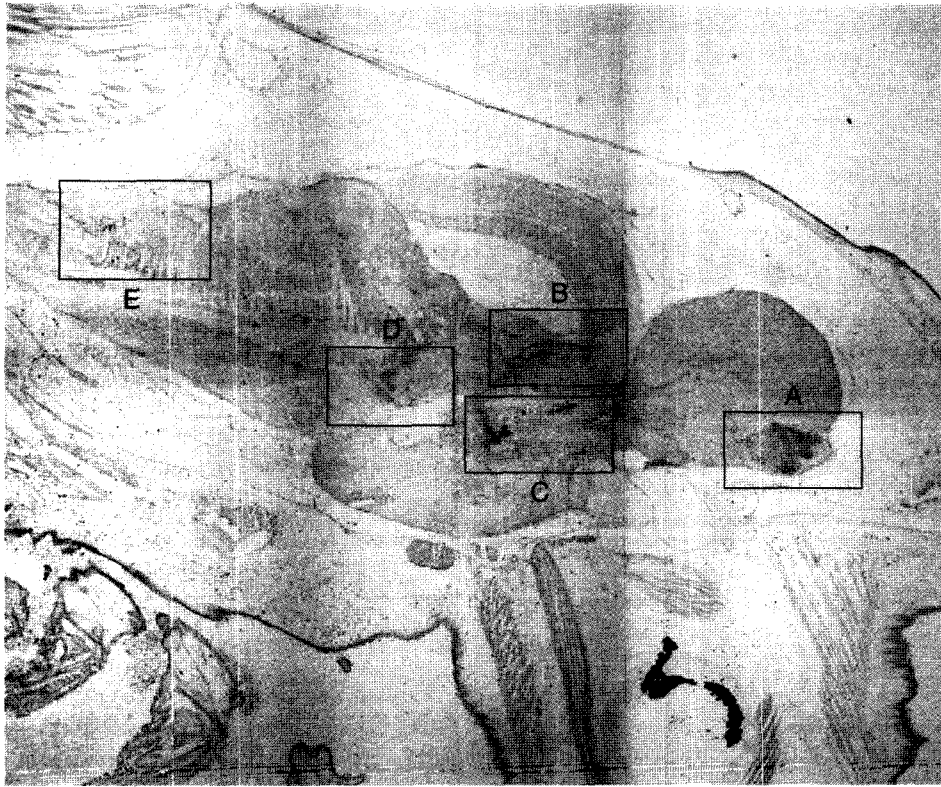


Fig. 6. Localization of TH-expressing cells in brain regions of the *Japanese medaka*, treated with 100 ppb copper.

7). 또한 고농도의 1,000 ppb 처리를 통한 몸통(신장)부위에서는 대조구에 비하여 상대적으로 발현의 차이가 미미한 것으로 관찰되었다(Fig. 8).

이전 실험결과(Shin *et al.*, 2001)에 있어서도, 유기인산계 살충제인 다이아지는 1,000 ppb 처리시 조직별로 후각망울, 중뇌(midbrain), 뇌간(brain stem; pon and medulla)에서 TH 단백질이 약간 억제되는 것이 이미 관찰되었다. 두 실험 결과를 비교하면 어느 정도 뇌의 전뇌부분과 중뇌부분에서 TH 단백질의 발현 억제가 일어나는 것으로 보였다. 이는 뇌의 기저핵(중뇌: 전뇌)부위에 구리의 이상축적에 의한 신경학적 증상으로 생기는 율슨병에 관한 이전 결과들과 마찬가지로, 본 실험에서 실시한 TH 단백질의 발현에 있어서도 송사리의 중뇌 부분인 후각망울에서 일관되게 억제 발현되었다. Kawano 등(2001)은 율슨병의 동물모델로서 자주 활용되는 Long-Evans Cinnamon 쥐(LEC 쥐)의 모노아민계(TH, 5-hydroxytryptamine) 뉴런 면역조

직학적 변화를 대조구인 Long-Evans Agouti 쥐(LEA 쥐)와 비교하여 4주, 10주 그리고 20주 후 뇌 부위 구리의 농도와 TH-면역반응 섬유(TH-immunoreactive fibers)의 밀도를 비교 검토하였다. LEC 쥐 뇌 부위의 구리 농도는 4주 후에는 대조구에 비해 낮았으나, 20주 후에는 대조구에 비해 상당히 높은 것으로 관찰되었다. 또한 LEC 쥐의 TH-면역반응 섬유 밀도는 대피질(cingulate cortex)부위에서는 4주, 10주 그리고 20주 모두 뚜렷하게 낮게 나타났으며, 다른 뇌 부위인 해마(hippocampus)와 소뇌(cerebellum)에서는 4주와 10주에서 낮게 관찰되었다. 따라서 관찰된 LEC 쥐의 연령에 따른 구리농도의 변화는 모노아민계 뉴런 시스템 내 변화와 상호 관련 있음을 제시하였다. 따라서 본 연구에서 관찰된 구리에 의한 송사리의 뇌 부위 TH 단백질의 발현 억제는 신경신호전달 이상으로 이어지고 결국 행동변화를 야기하는 것으로 판단된다. 한편 뇌의 구리축적에 따른 율슨병 단백질

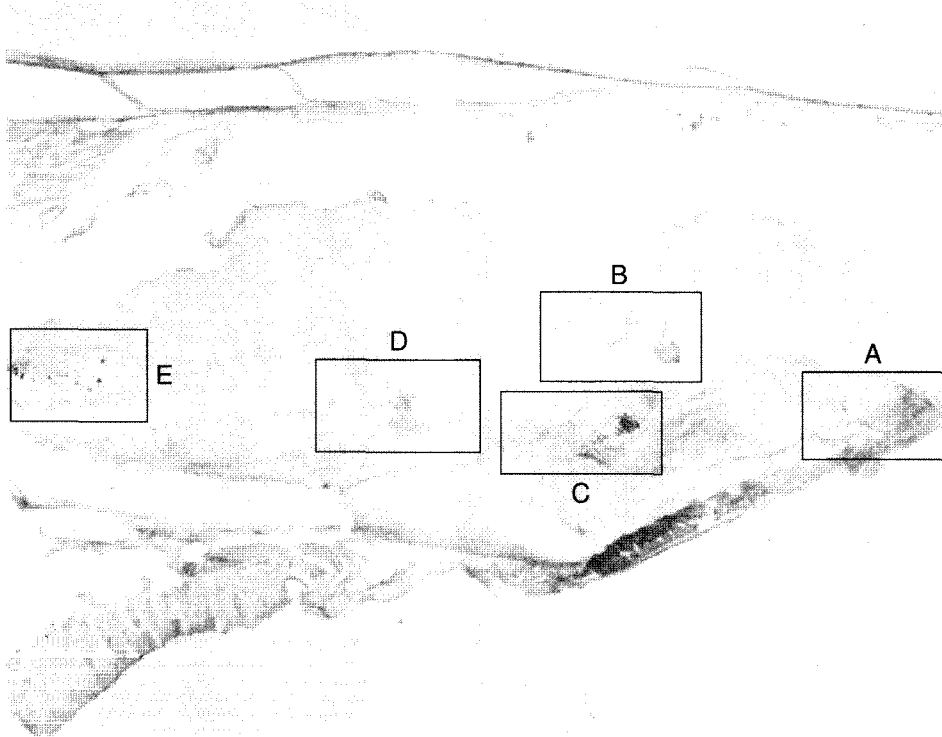


Fig. 7. Localization of TH-expressing cells in brain regions of the *Japanese medaka*, treated with 1,000 ppb copper.

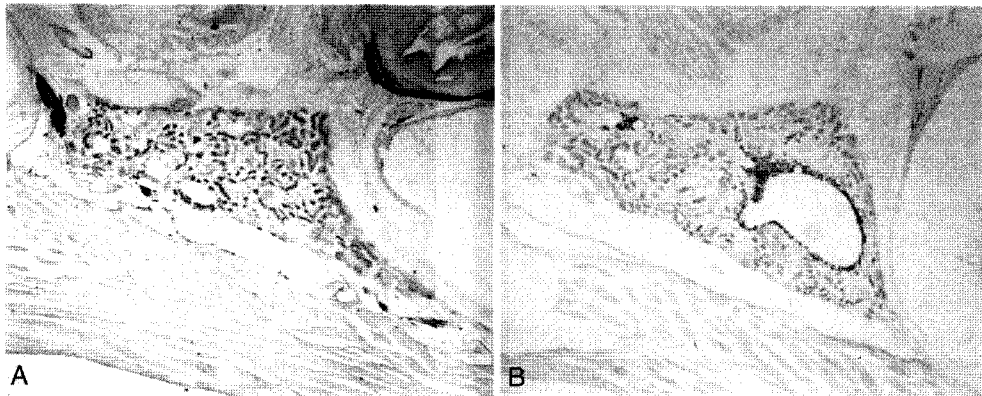


Fig. 8. Localization of TH-expressing cells in body (kidney) regions of the *Japanese medaka*. A, no treatment and B, copper treatment 1,000 ppb.

질인, 구리-전달 P-type ATPase (ATP7B)에 관한 연구에 있어서 Saito 등 (1999)은 Long-Evans Agouti 쥐 (LEA 쥐)를 이용하여 면역조직화학 측정

에 의한 ATP7B 단백질의 분포와 구리의 양을 조사 하였다. 실험 결과 ATP7B 단백질은 해마부위 (hippocampal formation), 후각망울, 소뇌, 소뇌피질

(cerebral cortex), 그리고 뇌간 등의 신경세포에서 강하게 발현되었으며, 아울러 많은 양의 구리가 검출되었다. 또한 dopamine beta hydroxylase도 강하게 발현되었는데, 이는 율순병에서도 catecholamine류의 신경신호전달 물질의 생성과 이용이 관여됨을 의미한다. 따라서 위의 결과를 종합해 볼 때 TH는 AChE에 비해 어류의 급성독성을 모니터링할 수 있는 잠재적 biomarker로서 그 활용이 기대되며, 구리축적에 의한 TH 발현 정도는 어류의 이상 행동 현상을 부분적으로 설명할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 차세대 핵심환경기술개발사업 (#2002-11301-0006-1)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고 문헌

- Charoy C and Janssen C. The swimming behaviour of *Brachionus calyciflorus* (Rotifer) under toxic stress, *Chemosphere* 1999; 38(14): 3247-3260.
- Clearwater SJ, Farag AM and Meyer JS. Bioavailability and toxicity of dietborne copper zinc to fish, *Comp. Biochem. Physiol. Part C* 2002; 132: 269-313.
- Daglish RW and Nowak BF. Rainbow trout gills are a sensitive biomarker of short-term exposure to waterborne copper, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2002; 43: 98-102.
- Dethloff GM, Schlenk D, Hamm JT and Bailey HC. Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures, *Ecotoxicology and environmental safety, Environmental research, Section B* 1999; 42: 253-264.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres (Jr) V and Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7: 88-95.
- Fatemi N and Sarkar B. Insights into the mechanism of copper transport by the Wilson and Menkes disease copper-transporting ATPases, *Inorganica chimica acta* 2002; 339: 179-187.
- Handy RD. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process?, *Comparative biochemistry and physiology Part A* 2003; in press.
- Hsu Sm and Raine LJ. Base of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, *Histochem. Cytochem.* 1981; 29: 577-580.
- Kawano H, Takeuchi Y, Yoshimoto K, Matsumoto K and Sugimoto T. Histological changes in monoaminergic neurons of Long-Evans Chinnamon rats, *Brain Research* 2001; 915: 25-31.
- Kim SH, Kim WK, Lee JS, Koh SC, Lee SK, Chon TS and Kim JS. Regulation of acetylcholine esterase and monoamine oxidase in *Oryzias latipes* by carbofuran, *The Korean journal of environmental toxicology* 2003; 18 (1): 21-25.
- Kwak IS, Chon TS, Kang HM, Chung NI, Kim JS, Koh SC, Lee SK and Kim YS. Pattern recognition of the movement tracks of medaka (*Oryzias latipes*) in response to sub-lethal treatments of an insecticide by using artificial neural networks, *Environ. Pollut.* 2002; 120: 671-681.
- Ladies WG and Yu MH. Introduction to Environmental Toxicology, Second Edition, Lewis Publishers 1999; 1-19.
- Lee HK and Lee YH. A study of system development for the detection of toxic materials into the source of water supply, *Korea society of civil engineers, Journal of civil engineering* 1998; 18: 289-297.
- Mercer JFB. The molecular basis of copper-transport diseases, *Trends in molecular medicine* 2001; 7 (2): 64-69.
- Perschbacher PW and Wurts WA. Effects of calcium and magnesium hardness on acute copper toxicity to juvenile channel catfish, *Ictalurus punctatus*, *Aquaculture* 1999; 172: 275-280.
- Ram MD and Gopal K. Neurobehavioral changes in freshwater fish *channa punctatus* exposed to fenitrothio, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1991; 47: 455-458.
- Romani R, Antognelli C, Baldracchini F, Santis AD, Isani G, Giovannini E and Rosi G. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations, *Chemo-Biological Interactions* 2003; 145: 321-329.
- Rosenblada C and Nilsson OG. Basal forebrain grafts in the rat neocortex restore *in vivo* acetylcholine release and respond to behavioural activation, *Neuroscience* 1993; 55 (2): 353-362.

- Saito T, Okabe M, Hosokawa T, Kurasaki M, Hata A, Endo F, Nagano K, Matsuda I, Urakami K and Saito K. Immunohistochemical determination of the Wilson copper-transporting P-type ATPase in the brain tissues of the rat, *Neuroscience letters* 1999; 266: 13-16.
- Shin SW, Chung NI, Kim JS, Chon TS, Kwon OS, Lee SK and Koh SC. Effect of diazinon on behavior of Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*) and gene expression of tyrosine hydroxylase as a biomarker, *J. Environ. Sci. Health* 2001; B36 (6): 783-795.
- Strausak D, Mercer JFB, Dieter HH, Stremmel W and Multhaup G. Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases, *Brain research bulletin* 2001; 55(2): 175-185.
- Taylor EW, Beaumont MW, Butler PJ, Mair J and Mujallid MSI. Lethal and sub-lethal effects of copper on fish: arole for ammonia toxicity, *Toxicology of aquatic pollution* 1996; 85-114.