

Fluoranthene 독성에 기인하는 비정상적 어류행동의 신경생화학적 분석

신성우, 조현덕*, 전태수*, 김정상**, 이성규***, 고성철*

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

Neurobiochemical Analysis of Abnormal Fish Behavior Caused by Fluoranthene 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

Fluoranthene, a common polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), exhibits phototoxicity which may affect aquatic organisms. The eventual goal of this study is to develop a biomarker of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) used in monitoring hazardous chemicals in the ecosystem. In this study we investigated neural toxicity of fluoranthene in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) along with comparative analysis of corresponding behavioral responses. The untreated individuals showed normal behavioral characteristics (*i.e.*, smooth and linear movements). The treated fish, however, showed stopping and abrupt change of orientation (100 ppb), and severely reduced locomotive activity and enhanced surfacing activity (1,000 ppb). Treatment of the medaka fish with fluoranthene caused a significant suppression of acetylcholine esterase (AChE) activities in the body portion but not in the head portion. When fish were exposed to 1,000 ppb of fluoranthene for 24 hr, the body AChE activities decreased from $126. \pm 31.89$ (nmoles substrate hydrolyzed per min per mg protein) to 49.51 ± 11.99 . Expressions of tyrosine hydroxylase (TH) protein in the different organs from both head and body portions were comparatively analyzed using an immunohistochemical technique. Five organs of the medaka fish showing a strong TH protein expression were the olfactory bulb, hypothalamus, optic lobe, pons and myelencephalon regions. This study provides molecular and neurobehavioral bases of a biomonitoring system for toxic chemicals using fish as a model organism.

Key words : fluoranthene, 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

다환방향족 탄화수소화합물 (polycyclic aromatic hydrocarbons; PAHs)의 하나인 fluoranthene은 불완전 연소 혹은 유기물의 열분해로 발생되어, 환경 및 인체에 대한 중요한 오염원이 되고 있다. 석탄 연소 배출물, 자동차배출가스, 폐자동차 오일, 담배 연기와 같은 여러 매체에 대한 연구에서 이들 혼합물중의 다환방향족 탄화수소가 잠재적 발암성이 있는 것으로 알려져 있다. 다환방향족 탄화수소란 2가지 이상의 방향족 고리가 융합된 유기화합물로서 일반적인 성질은 비점과 용점이 높으나 증기압이 낮고, 분자량 증가에 따라 극히 낮은 수용해도를 지니며, 여러 유기용매에 용해되고, 친유성이 높은 것으로 알려져 있다. 다환방향족 탄화수소에 의한 수생오염은 오일 유출, 방출 그리고 침투(산업과 도시폐기물, 도시와 도시인근의 표면 유출과 그리고 대기상 침전물)에 의하여 발생 되어지며, 여러 가지 인간 활동 중 유기물의 불완전연소에 기인하는 것으로 많이 알려져 있다 (Hoffman *et al.*, 1995).

다환방향족 탄화수소화합물의 독성메카니즘은 세포막 기능과 그에 따른 막과 관련된 효소 시스템에 대한 저해로 나타내어지며, 또한 물질대사된 다소의 다환방향족 탄화수소화합물은 세포막 단백질과 DNA의 결합하므로서 독성영향을 미칠 수 있다 (Hoffman *et al.*, 1995). 이러한 생화학적 분열과 세포손상의 결과는 돌연변이, 기형의 발행 그리고 암을 유발시키는 것으로 알려져 있다. 실험동물에 있어서 독성은 악성 뇌종양을 일으키는 것으로 밝혀졌으며 (Napalkov and Alexandrov, 1974; Markovits *et al.*, 1976), 폴란드 내 석탄 생산 공장에서 근무하는 근로자는 성장 조절이 안되는 것과 단기적 기억력 감소에 의한 신경 증후군 증상이 나타난 것으로 보고되었다 (Majachrzak *et al.*, 1990). 대부분의 다환방향족 탄화수소화합물은 유전독성이거나 유전독성일 가능성이 있으며, 또한 자외선과 가시광선 흡수와 동반하여 어류 및 수생생물에 급성독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 또한 대사와 분해에 따라서 독성이 달라지며, 저농도에서는 미생물과 조류의 성장을 자극하는 것으로 알려져 있다. 이러한 독성은 수생환경에 광범위하게 오염

되었으며, 적어도 두가지 화합물 (fluoranthene 및 anthracene)은 태양 UV 발광에 의하여 어류에 대한 독성이 강화 되는 것으로 알려져 있으며, 유기생물에 축적된 다른 몇 가지 화합물들은 UV 빛에 조사 될 경우 독성물질의 형태로 전환되는 것으로 밝혀졌다 (Bowling *et al.*, 1983; Schirmer *et al.*, 1997). 특히 수생생물에 대한 독성은 대사나 광산화에 의하여 영향을 받으며, 일반적으로 자외선 존재 하에서 독성이 더 높은 것으로 알려져 있다 (WHO, 1998). 또한 다환방향족 탄화수소화합물의 일종인 fluoranthene은 환경에 있어서 하나의 중요한 화합물로서, 대개는 산소 의존성의 광독성으로 나타낸다. 광범위한 수생생물체에 나타나는 광독성 발생으로 인한 손상은 상당히 표적 선택적이지 못한 것으로 알려져 있다 (Kagan *et al.*, 1987). Anthracene과 fluoranthene의 광유도된 독성의 영향 (UV 조사)을 수생 저서생물에 실험한 연구 결과에서는 UV의 조사없이 실험한 것과 비교시 생존성과 행동 반응이 감소하는 것으로 관찰 되어졌다 (Hatch and Burton, 1999). 그러나 아직까지 어류의 모델 생물체를 이용한 fluoranthene의 신경 생화학적 및 행동학적인 실험이 많이 진행되지 않아, 신경행동 이상과 관련된 신경전달물질의 효소활성 변화 및 단백질의 발현 변화에 관한 연구가 요구되고 있다.

TH (tyrosine hydroxylase)는 tyrosine으로부터 DOPA를 합성하는 과정에서 작용하는 효소로서 신경전달물질인 도파민, 노르에피네프린, 에피네프린 등의 합성속도를 조절하는 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 (Shin *et al.*, 2001), AChE (acetylcholine esterase)는 콜린에스테라아제 중에서 기질 특이성이 높고, 특히 아세틸콜린을 중심으로 아세트산에스테르를 분해하는 효소이며, 콜린작용성뉴런의 신경전달물질인 아세틸콜린을 분해하여 흥분전달의 뒤처리를 하는 중요한 생리적 기능에 의하여 콜린성 marker로 자주 사용되는 것으로 알려져 있다 (Kim *et al.*, 1999). 본 연구의 목적은 송사리 모델 생물체를 이용하여 독성화학물질에 유도되는 비정상적 행동 모니터링을 위한 biomarker를 개발 하는데 있으며, 이를 위해 본 연구는 약제 처리 시 비정상적인 신경행동 이상을 보이는 송사리의 행동체계과의 신경전달물질인 AChE 효소활성 변화와 면역조직화학 방법에 의하여 TH 단백질의 조직 발현을 비교 관찰하였다. 이러한 비정상적 행동

이상과 신경전달물질 효소단백질 발현에 관한 본 연구의 결과는 어류의 모델 생물체를 이용한 fluoranthene에 대한 생물학적 모니터링의 신경생화학적 및 행동학적 작용기작에 대한 기초 자료를 제공할 것으로 기대된다.

재료 및 방법

1. 실험동물 관찰 및 화학약품

실험 생물인 송사리는 (*Oryzias latipes*) 일본 나고야대학교 bioscience center의 Laboratory of Freshwater Fish Stocks에서 육성된 “d-rR” 계통을 한국 화학연구원 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) 30L을 넣고 산소 폭기를 하여 예비 사육을 하였다. 예비 사육기간 동안 인공건조 먹이 (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 반응을 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 fluoranthene은 Aldrich Chemi-

cal Co. (WI., USA)에서 구입하여 치사 농도 하에서 처리하여 사용하였으며, 실험시에는 100% 에틸알콜로 용해시켜 최종 에틸알콜 농도를 8 ml/10 L로 맞추었다.

2. Acetylcholine esterase (AChE) 분석

Acetylcholine esterase (AChE) 정량은 다양한 fluoranthene의 농도에 노출된 송사리를 각각 0, 10, 100, 1,000, 5,000 ppb에서 24시간 노출하여 활성변화를 관찰하였으며, 송사리의 머리와 몸통부분 AChE 활성의 측정은 기질로서 45 mM 인산염 완충제 (phosphate buffer), pH 8.0, 0.56 mM 아세틸콜린을 이용한 Ellman 방법을 사용하였다 (Ellman *et al.*, 1961; Kim *et al.*, 2003).

3. 면역조직화학 실험

Fluoranthene에 처리된 송사리를 액체 질소 가스에 순간적으로 냉동한 후 머리와 몸통으로 잘라서 각각 분리하여 실시하였다. 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) 세정 (washing) 5) 탈수 (dehydrating) 6) 광학현미경 관찰 및 사진촬영으로 실시하였다. 면역조직화학 방법에 의한 TH 단백질의 조직별 발현에 관한 송사리 실험은 fluoranthene을 각각 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

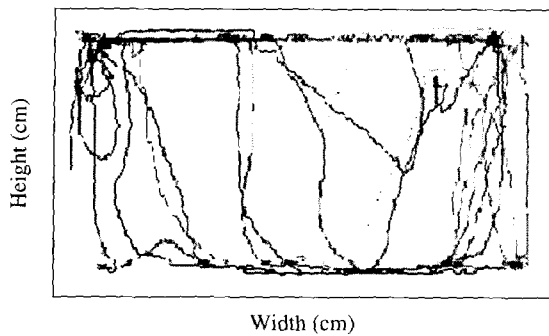


Fig. 1. The locomotive tracks of *Japanese medaka* in two dimension before the fluoranthene treatments.

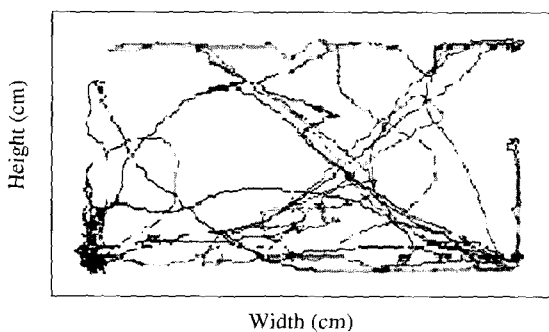


Fig. 2. The locomotive tracks of *Japanese medaka* in two dimension after the fluoranthene treatments (100 ppb).

(Fig. 1). 반면 fluoranthene을 처리했을 경우 대체적으로 궤적 중간에 멈추거나, 짧은 거리의 방향전환이 많이 생겨 궤적이 흐름이 유연하지 않고 뭉쳐지는 경우가 많았다. Fluoranthene 100 ppb 처리시 활동성이 낮았고, 관찰 수조의 하부에서 궤적이 실타래와 같은 모양을 자주 나타내었으며 방향성이 없이 짧은 거리를 왕복하는 경우가 많았다. 결과적으로 궤적이 선형적으로 부드럽게 나타나지 않고 만곡부위나 뭉쳐진 만곡부위가 상대적으로 많았다 (Fig. 2). 고농도인 fluoranthene 1,000 ppb 처리시에는 관찰 수조의 상부나 수면부에서 유형하는 경향이 높았으며, 시간이 경과함에 수평적 움직임의 속도가 저하되었다. 경우에 따라 수조 하부로의 이동하였으며, 하부로 내려왔을 경우에는 실타래와 같은 궤적을 나타내었다 (Fig. 3). 일반적으로 독성물질이나 화학약품 등의 유입시 보고되는 수면으로

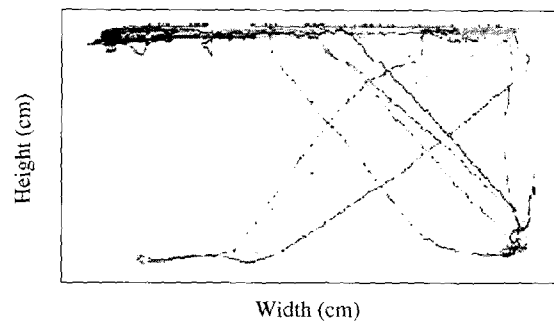


Fig. 3. The locomotive tracks of *Japanese medaka* in two dimension after the fluoranthene treatments (1,000 ppb).

상승하는 빈도수의 증가, 불규칙한 이동성, 경련, 폐쇄적인 아가미 운동 등 (Ram and Gopal, 1991)이 본 연구에서도 관찰되었다.

BaP (benzo(a)pyrene)의 신경독성 행동이상을 실험한 F-344 쥐에 대한 노출실험에 있어서는 25~200 mg/kg 농도에서 시간적으로 그리고 농도적으로 모두 운동 활성 (motor activity) (수평적 움직임 (horizontal activity), 총 이동거리 (total distance), 수직적 움직임 (vertical activity) 및 연속반응 (stereotypy))이 70% 이상 감소됨이 관찰되었다 (Saunders *et al.*, 2002). 경구 독성에 대한 연속적인 행동 변화에 관한 연구에 있어서는 BaP의 27 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 흡입농도에 노출된 F-344 쥐 실험에서는 운동 활성 (수평적 움직임)이 50% 정도 억제됨이 관찰되어졌다 (Hood *et al.*, 1998). Konstandi 등 (1977)의 실험에서는 다환방향족 탄화수소화합물인 3-methylcholanthrene을 25 ppm 농도로 노출시 학습과 기억력이 결손 되는 것으로 알려졌다.

본 연구팀의 이전 실험결과 (Shin *et al.*, 2001)에 있어서도, 신경독성물질로 알려진 유기인산계 살충제인 다이아지는 처리시 반응궤적은 부드럽고 연속적인 궤적이 잘 형성되지 않았으며, 관찰 수조의 수면부에서 주로 머물며, 꼬인 실타래와 같은 궤적양상을 나타내거나 짧은 거리의 반복 운동을 보여주었다. 따라서 본 연구 실험결과에서 fluoranthene의 처리시 관찰된 송사리의 비정상적인 이상행동 반응은 fluoranthene의 독성과 상관관계를 가지고 있음을 시사하는 것으로 볼 수 있다.

Figs. 1-3에서 본 바와 같이 독성행동 반응의 궤

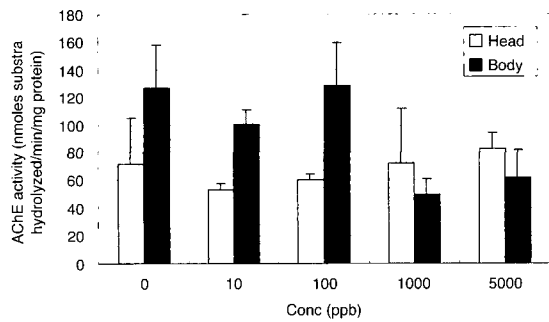


Fig. 4. Changes in acetylcholine esterase activity of *Japanese medaka* exposed to different levels of fluoranthene.

적자료는 비선형적이고 복잡하여 계량적으로 해석하기가 힘이 든다. 최근 Kwak 등(2002)이 송사리에 대해서 diazinon에 대한 대표적 행동반응을 수리적으로 분리하고 인공신경망으로 자동 인지하였

다. 그러나 이러한 계량적 분석을 위해서는 별도의 연구 노력이 필요하므로 앞으로 본 연구진을 fluoranthene에 대한 송사리의 2차원 궤적 반응에 대해서도 계량적으로 분석하고 자동 인지할 수 있도록 하고자 한다.

2. Fluoranthene 처리시 AChE 효소활성의 영향

송사리를 0, 10, 100, 1,000, 그리고 5,000 ppb 농도의 fluoranthene 용액에 24시간 노출하여 AChE 효소활성 변화를 관찰한 결과, 머리 부위에서는 특이한 효소활성 변화가 관찰되지 않았으나, 몸통부위에서는 1,000 ppb 이상에서 49.51 ± 11.99 nmoles (substrate hydrolyzed per min per mg protein)의 수치로서 효소활성이 50% 수준으로 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이전 실험결과에 있어서 유기인산계 살충제인 다이아지논을 0~5,000 ppb 농도로 24시간 처리한 AChE 효소활성의 변화는 10 ppb 이

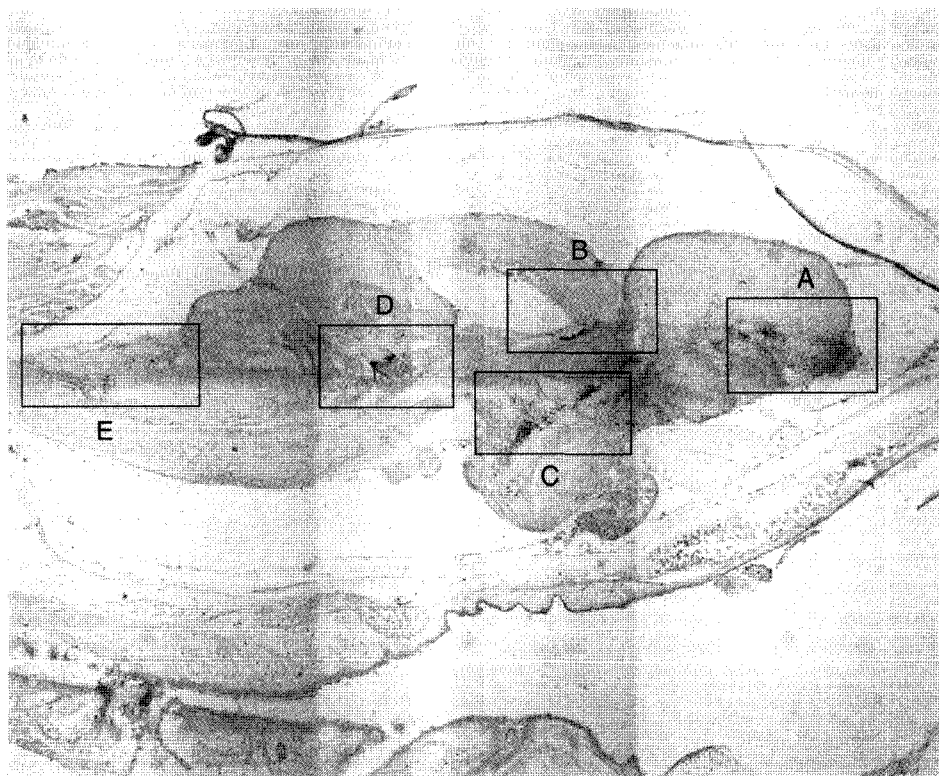


Fig. 5. Localization of TH-expressing cells in brain regions of the *Japanese medaka* when not treated with fluoranthene. A, olfactory bulb; B, optic lobe; C, hypothalamus; D, pons; E, medulla.

상의 농도에서 머리와 몸통부위에서 유의적으로 감소하는 것이 관찰되었다(Kim *et al.*, 1999). 여러 가지 다환방향족 탄화수소화합물(fluoranthene 외 6종)에 노출 시킨 후 전기뱀장어 AChE 효소활성의 변화는 *in vitro* 실험에서 억제되는 것으로 관찰되었다(Kang and Fang, 1997). 유의한 실험으로서 Jett 등(1999)은 전기뱀장어 AChE의 실험에서 fluoroanthene IC₅₀의 수치가 17.0±0.5 μM의 값으로서 약간 억제됨을 관찰하였다. 전기뱀장어 AChE 효소활성 변화를 살펴본 두 실험은 고리의 수가 많은 다환방향족 탄화수소화합물일수록 AChE를 보다 더 억제하는 것으로 판단하고 있다. 이러한 실험결과에서 AChE 억제는 상대적인 아세틸콜린 농도의 증가에 의해 야기된 송사리 이상행동의 가능성을 보여주는 것이다. 이와 유사하게 본 실험에 있어서도 fluoroanthene 처리시 몸통부위에서의 AChE 효소활성의 감소는 송사리의 이상행동과 어느 정도 상

호관련성이 있을 것으로 판단된다.

3. 송사리 내 TH 단백질의 조직별 분포

면역조직화학 방법에 의한 TH (tyrosine hydroxylase) 단백질의 조직별 발현에 관한 송사리 실험은 fluoroanthene을 각각 100 ppb와 1,000 ppb 농도로 48시간 처리한 후 실시하였다. 약제를 처리하지 않은 대조구 머리(뇌)부위에서는 후각망울(olfactory bulb; OB), 시상(hypothalamus), 시각엽(optic lobe), 교뇌(pons) 그리고 연수(medulla)의 부분에 각각 TH 단백질이 발현되었다(Fig. 5). 그러나 100 ppb 처리시 머리(뇌)부위에서는 후각망울 부분에 TH 단백질의 발현이 억제되는 것으로 관찰되었다(Fig. 6). 1,000 ppb 처리구에서는 머리(뇌)부위의 후각망울과 시각엽 그리고 교뇌의 부분에 각각 TH 단백질이 발현이 억제되는 것으로 관찰되었다(Fig. 7). 고농도 처리 머리부위에서의 TH 발현의 저하는

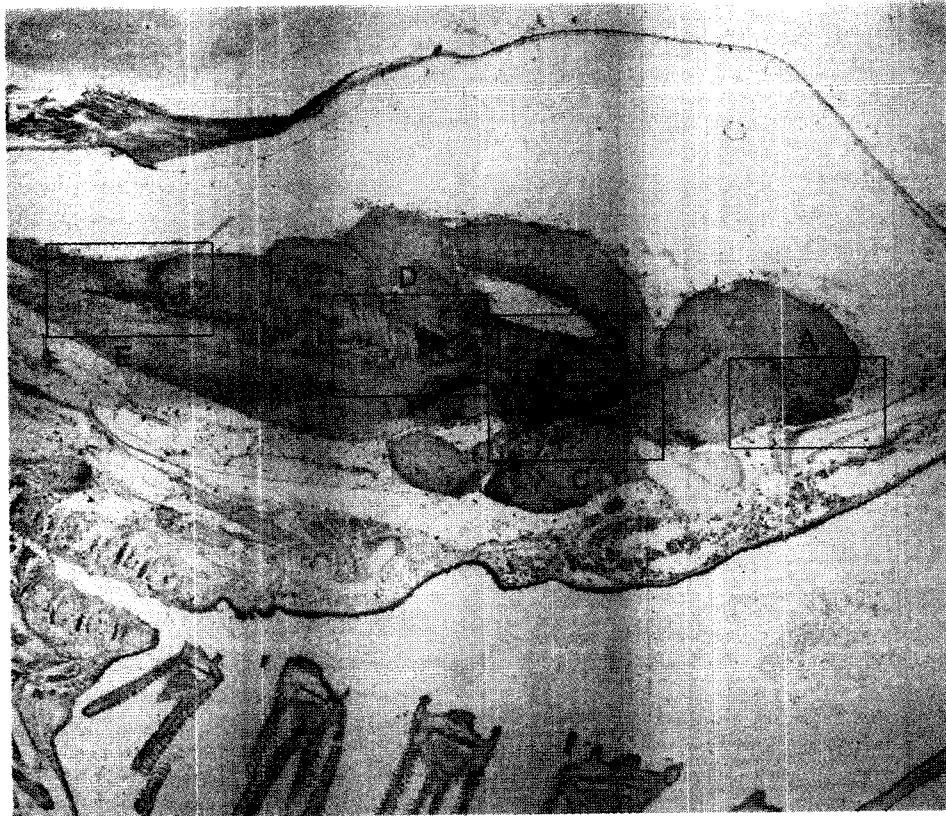


Fig. 6. Localization of TH-expressing cells in brain regions of the *Japanese medaka*, treated with 100 ppb fluoranthene.

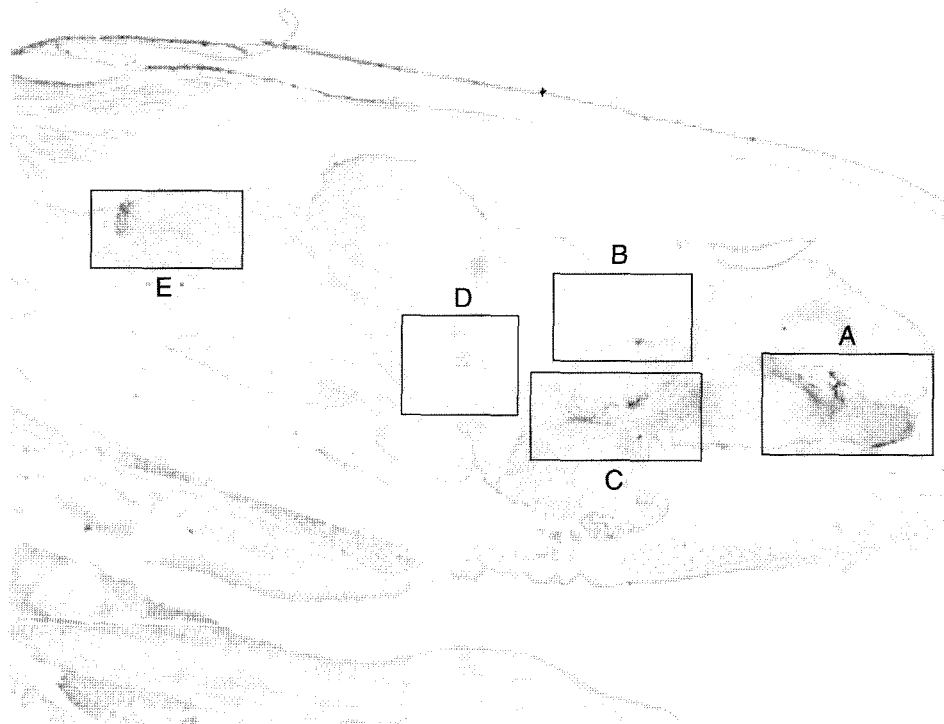


Fig. 7. Localization of TH-expressing cells in brain regions of the *Japanese medaka*, treated with 1,000 ppb fluoranthene.

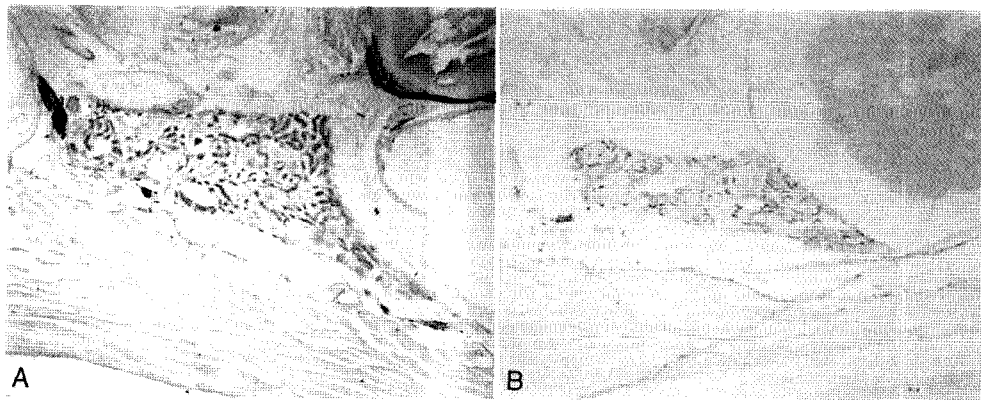


Fig. 8. Localization of TH-expressing cells in body (kidney) regions of the *Japanese medaka*. A, no treatment and B, fluoranthene treatment 1,000 ppb.

송사리의 행동에 상당한 영향을 미친 것으로 예측할 수 있었다. 그러나 몸통부위 (신장)에서는 고농도인 1,000 ppb 처리시에서만 대조구에 비해서 어

느 정도 약간의 발현 차이가 나타나는 것으로 관찰되었다 (Fig. 8). 이것은 머리부위에 비해 몸통부위인 경우에는 급성독성의 영향을 받지 않은 데

기인하는 것으로 보이며, 장기적인 노출 실험을 통한 만성 독성적 영향을 검토할 필요가 있다고 본다.

기존 연구 결과를 살펴보면, Andersson 등(1998)은 다환방향족 탄화수소화합물이 다수 함유된 디젤연료 배출가스를 극성에 의하여 분진상(미세분말상)과 약휘발상으로 분류하여 각각 5가지 형태로 구별하여, cresyl violet 염색과 면역조직화학실험을 이용한 성숙한 쥐의 두개골내에 마이크로주사를 하여 실험 관찰하였다. 실험결과 쥐의 뇌 부분인 선조체와 해마에서 각각 분진상 III(mononitro-PAH를 포함), IV(dinitro-PH 그리고 quinones를 포함), V(극성물질을 포함)와 약휘발성 IV(dinitro-PAH 그리고 quinones를 포함), V(극성물질을 포함)의 주사에 대해서 조직 손상과 신경섬유성 acidic 단백질, TH 그리고 AChE의 억제와 같은 중요한 손상이 관찰하였다. 뇌의 해마와 선조체 부위는 이동(locomotor), 기억(memory) 그리고 지각(cognition)에 관련된 것으로서 PAH에 의한 급성 신경독성의 영향을 보여주는 것이다. 해마는 뇌의 안쪽 측두부의 일부로서 공간의 기억을 형성하거나 유지하는 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 선조체는 중뇌에서 대뇌피질 심부에 있는 회색질로 외측뇌실의 바닥에서 발생하는 것으로서 운동, 균형, 걸음 등에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서 TH 효소 단백질의 송사리 머리 부위에서의 발현 억제는 기존 결과와 비교해 볼 때 어느 정도 fluoranthene 노출에 의한 신경행동 변화를 급성적으로 초래한 것으로 볼 수 있다. 여기서 얻은 결과는 뇌 부분인 흑질과 선조체의 손상에 따른 시냅스내 도파민 결손에 의해 발생하는 파킨슨씨병과 같은 신경행동 변화의 marker로서 활용할 수 있는 근거를 마련해줄 수 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 과학재단 목적 기초 연구비(KOSEF; Project Number 98-0401-02-01-3)에 의해 수행되었습니다. 실험 생물인 송사리를 제공해 주신 일본 나고야대학교 Bioscience Center의 Laboratory of Freshwater Fish Stocks에 심심한 사의를 표합니다.

참 고 문 헌

- Andersson H, Lindqvist E, Westerholm R, Gragg K Alemen J and Olson L. Neurotoxic effects of fractionated diesel exhausts following microinjections in rat hippocampus and striatum, Environmental Research, Section A 1998; 76: 41-51.
- Bowling JW, Leverssee GJ, Landrum PF and Giesy, JP. Acute mortality of anthracene-contaminated fish w-xposed to sunlights, Aquatic Toxicology 1983; 3: 79-90.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres (Jr) V and Featherstone RM. Anew and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, Biochem. Pharmacol. 1961; 7: 88-95.
- Hatch AC and Burton (Jr) GA. Photo-induced toxicity of PAHs to *Hwalella azteca* and *Chironomus tentans*: effects of mixures and behavior, Environmental Pollution 1999; 106: 157-167.
- Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA and Cairns J. Handbook of Ecotoxicology, Lewis Publishers 1995; 330-355.
- Hood DB, Coffee RG, Farthing W and Knuckles ME. Modeling B(a)p: carbon black aerosols for inhalation toxicology studies, Toxicologist 1998; 42: 250.
- Hsu Sm and Raine LJ. Base of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparisor between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, Histochem. Cytochem. 1981; 29: 577-580.
- Jett DA, Navoa RV and Lyons (Jr) MA. Additive inhibitory action of chlorpyrifos and polycyclic aromatic hydrocarbons on acetylcholinesterase activity in vitro, Toxicology Letters 1999; 105: 223-229.
- Kagan J, Stokes A, Gong HH and Tuveson RW. Light-dependent cytotoxicity of fluoranthene: oxygen-dependent membrane damage, Chemosphere 1987; 16: 2417-2422.
- Kang JJ and Fang HW. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit the activity of acetylcholinesterase purified from electric eel, Biochemical and Biophysical Research Communication 1997; 238: 367-369.
- Kim JS, Koh SC, Lee SK and Chon TS. Regulation of acetylcholine esterase and neurotransmitters in *Oryzias Latipes* by diazinon, The Korean journal of environmental toxicology 1999; 14(3): 81-85.
- Kim SH, Kim WK, Lee JS, Koh SC, Lee SK, Chon TS and Kim JS. Regulation of acetylcholine esterase and mono-

- amine oxidase in *Oryzias latipes* by carbofuran, The Korean journal of environmental toxicology 2003; 18 (1): 21-25.
- Konstandi M, Pappa, P, Johnson E, Lecklin A and Marselos M. Suppression of the acquisition of conditioned avoidance behavior in the rat by 3-methylcholanthrene, Pharmacol. Biochem. Behav. 1997; 56: 637-641.
- 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.
- Majchrzak R, Sroczynski J and Chelmeska E. Evaluation of the nervous system in workers in the furnace and coal divisions of the coke-producing plants, Med. Pr. 1990; 2: 108-113.
- Markovits P, Levy S, Nocentini A, Velizarov A, Sabharwal PS and Benda P. *In vitro* malignant transformation of fetal hamster brain cell by benzo(a)pyrene, CRAcad. Sci. 1976; 282: 2015-2020.
- Napalkov NP and Alexandrov VA. Neurotropic effect of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene in transplacental carcinogenesis, J. Nat. Cancer Inst. 1974; 52: 1365-1366.
- Ram MD and Gopal K. Neurobehavioral changes in freshwater fish *channa punctatus* exposed to fenitrothio, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1991; 47: 455-458.
- Saunders CR, Ramesh A and Shockley DC. Modulation of neurotoxic behavior in F-344 rats by temporal disposition of benzo(a)pyrene, Toxicology Letters 2002; 129: 33-45.
- Schirmer K, Chan GJ, Greenberg BM, Dixon DG and Bols NC. Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture, Toxicology *in vitro* II 1997; 107-119.
- 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.
- WHO, IPCS, Environmental Health criteria 202, Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 1998.