

Simazine의 면역억제작용

김경란 · 조대현¹ · 표석능*
성균관대학교 약학대학, ¹식품의약품안전청

Immunosuppressive Activity of Simazine

Kyung-Ran KIM, Dae-Hyun CHO¹ and Suhkneung PYO*

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, 300 Chunchun-dong, Jangan-ku,
Suwon City, Kyunggi-do 440-746

¹Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-ku, Seoul, 122-020

(Received April 13, 1999; accepted May 26, 1999)

Abstract – Triazine herbicide has been reported to directly suppress the immune response. In the present study, the effect of simazine on the immune response was investigated. Splenic lymphocytes were treated with mitogen (lipopolysaccharide, concanavalin A) in the presence of simazine. When simazine(300 mg/kg, 600 mg/kg) was administered every day for 3 weeks or 4 weeks, respectively, the number of plaque forming cells (PFC) was decreased. Antibody production of IgM and IgG class was significantly decreased in splenic cells from simazine-treated animals. In addition, when animals were exposed to simazine, the susceptibility of virus infection as well as the growth of tumor cells was increased. These data suggest that simazine affected the immune function and humoral immunity impaired by simazine treatment contributed to pathological process.

Keywords □ Simazine, PFC, IgG, IgM

Simazine은 triazine계 herbicide로서 동물에서 유방암이나 다른 암을 유발하는 것으로 알려져 있었다(Hayes et al., 1990). 또한 triazine계 herbicide인 atrazine이 면역계에 억제효과가 있음이 보고되어 왔고(Michel et al., 1992), simazine이나 atrazine과 같은 제초제를 포함한 많은 농약들이 면역계에 미치는 영향에 대한 연구가 계속되어지고 있다. D.D.T에의 장기간 노출은 비장 중량이 감소하였고 ovalbumin으로 면역화시킨 생쥐에 대한 항체반응의 감소와 총혈청 γ -globulin 수치의 현저한 감소가 확인되었으며(Wasermann et al. 1969), 생쥐에게서 *Salmonella typhimurim* 감염의 치사효과에 대한 감수성을 증가시키고(Fan et al, 1978) *Salmonella typhimurim*에 대한 항체반응을 감소시킨다(Subbarao et al., 1977). 생쥐에게 dinitrofurantoin을 노출시키면 시험관내에서 mitogen 자극에 의한 비장임파구 증식을 억제시키고(Subbarao et al., 1977), phosphoroorganic compound, pyrethroid, chlorinated hydrocarbons, carbamates, nitrophenol과 유기용매에 노출된 액성 농약 생산업체에 종사하는 근로자들의 세포성면역과 체액성면역을 측정된 결과 대조군과 비교하여 혈청중의 IgG의 농도가 증가하고 동시에 남성에서는 IgM, 여성에게

서는 IgA의 농도가 현저하게 증가한다고 보고되었다(Klucinski. et al., 1996). 이와같은 보고들에도 불구하고 simazine의 면역억제효과를 나타내는데 있어 체액성 면역에 미치는 영향을 연구한 보고는 아직 없다. 따라서 본 연구는 triazine계 herbicide인 atrazine의 생체내 노출시 나타나는 면역억제 효과를 보고한 이전의 연구를 참고로 하여 생쥐의 비장세포를 이용한 시험관내 방법과 생체내 방법을 이용하여 simazine의 체액성 면역억제작용에 미치는 영향을 평가하였다.

실험방법

실험동물과 시약

본 연구에 사용한 실험동물은 식품의약품안전청 및 Charles River Lab., Japan으로부터 분양받아 실험하였다. 실험동물은 생후 5주령의 암컷 흰쥐를 대조군, 용매투여군, MTD(maximum tolerated dose) 투여군, 2배의 MTD 투여군으로 분류한 후 5마리의 생쥐를 한군으로 하여 증류수 투여군을 대조군, 0.5% carboxymethyl cellulose(CMC) 투여군을 용매군, 0.5% CMC에 녹인 저농도와 고농도의 simazine용액(300 mg/kg, 600 mg/kg) 투여군으로 나누어서

*To whom correspondence should be addressed.

0.2 ml씩 4주동안 경구투여하였다. *in vitro* 방법에서는 simazine을 100, 10, 1, 0.1 µg/ml로 사용하였다. 모든 시약은 특별한 언급이 없으면 미국 Sigma사에서 구입하여 사용하였다. RPMI 1640과 소혈청 및 기니아픽 보체는 미국의 GIBCO사에서 구입하여 사용하였다.

생쥐 비장세포의 분리

Simazine을 1주, 2주, 3주, 4주 투여군과 대조군 생쥐를 ether로 안락사 시킨 후 무균상태에서 비장을 적출하여 5 ml의 RPMI 1640 배지가 있는 60 mm petri dish에 넣었다. 5 ml의 주사기를 이용하여 비장세포를 분리시킨 후 잘 현탁하여 원심분리하여 상등액을 버린 후 신선한 배지를 가하여 현탁시킨 후 실험목적에 따라 세포수를 조정하였다.

LPS와 ConA에 의한 세포증식의 측정

조제한 생쥐의 비장세포를 96-well plate에 well당 2×10^5 개의 세포를 넣고 LPS와 concanavalin A(ConA)를 첨가하고 전체 배양 부피는 200 µl로 하였다.

5% CO₂배양기, 37°C에서 48시간 배양한 후 세포증식을 알아보기 위하여 MTT(2 µg/ml)를 가하여 4시간 더 배양한 후 540 nm에서 흡광도를 측정함으로써 임파구증식을 측정하였다.

비장세포의 용혈반형성세포수(plaque forming cell) 측정

항체를 생성하는 세포수에 대한 simazine의 영향을 측정하기 위하여 SRBC에 대한 항체생성능력을 Bullock과 Moller에 의해 변형된 Jerne plaque assay(Jerne and Nordin, 1963)를 사용하여 측정하였다. 간단히 서술하면 다음과 같다. 대조군과 simazine 투여군으로 분류하고, SRBC(5×10^8 cell/mouse, sheep blood cells, Korea media, Korea)를 복강내에 주사하여 면역화시켰다. 면역화시킨 흰 쥐를 4일 후에 ether로 안락사시켜 비장을 적출한 후 10% FBS 함유 RPMI 1640에서 homogenize시킨 후 원심분리(1000 rpm, 10분)하여 침전물을 만든 후 배양액에 부유시키고, 10배 희석시켰다. 현탁된 SRBC는 FBS를 함유하지 않은 RPMI 1640 용액으로 3회 세척하여(1000 rpm, 10분) 침전상태로 만든 후 침전이 흔들리지 않게 한다. Guinea pig complement는 FBS 함유하지 않은 RPMI 1640으로 3배 희석시킨다. 0.5% agar를 FBS 함유하지 않은 RPMI 1640에 녹이고 여기에 최종농도 0.05%로 FBS 함유하지 않은 RPMI에 녹인 DEAE-dextran을 섞어서 agar가 굳지 않도록 47°C를 유지하였다. 10 ml round-bottom tube에 400 µl의 agar 용액과 25 µl의 SRBC 및 50 µl의 비장 현탁액을 가하고 이 용액에 25 µl의 complement를 가하였다. 이 혼합액 200 µl를 petridish에 dropping하고 즉시 slide glass를 공기방울이 생기지 않도록 덮은 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3시간 동안 배양하였다. 배양 후 생성된

용혈반형성 세포수를 측정하였다. Plaque forming cell (PFC)의 수와 비장세포의 수를 세고 희석 배수를 고려하여 계산한 후 PFCs/ 10^6 recovered cells로 나타내었다(Gilbert et al., 1987).

배지내 항체 측정

대조군과 simazine 투여군에 SRBC(5×10^8 cells/mouse)를 복강내에 주사하여 면역화시킨 흰 쥐를 4일 후에 치사시킨 후 위와 같은 방법으로 비장 단일세포 현탁액을 만들고, 배양상등액은 매일 깨끗한 10% FBS 함유 RPMI 1640으로 1:1로 희석해 가면서 배양일로부터 각각 1, 2, 3, 4일 후에 준비하였다. 비장세포 배양상등액에 존재하는 각각의 Immunoglobulin양을 Vunakis와 Langone (1980)의 방법에 따라 ELISA 방법으로 측정하였다. 간단히 서술하면 다음과 같다. 100 µl의 마우스의 폴리클론항체를 96-well plate에 넣고 4°C에서 밤새 두어서 coating되도록 하였다. 여기에 사용된 마우스의 폴리클론항체는 carbonate-bicarbonate 완충액(pH 9.6)에 1:160 배로 희석하여 사용하였다. Plate는 0.1% Tween 20과 1% BSA(Bovine Serum Albumin)를 포함한 PBS(PBS-Tween, pH 7.4)로 3회 이상 수세하였다. 100 µl의 비장세포 상등액을 항체가 coating 된 96-well plate에 가하여 3시간 동안 배양하고 plate를 PBS-Tween 20으로 3회 이상 수세한 후 alkaline phosphate가 결합된 각각의 anti-IgG, IgM 및 폴리클론항체를 100 µl씩 가하여 2시간 동안 배양하였다. Plate를 PBS-Tween 20으로 3회 이상 수세한 후 diethanolamine 완충액(pH 9.8)에 1 mg/ml로 녹인 4-nitrophenyl phosphate 용액을 100 µl씩 가하고 상온에서 1시간 배양하고 ELISA reader 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

감염 및 종양 생성측정

감염시키고자 하는 바이러스로서 Friend Leukemia Virus complex(a mixture of helper Friend murine leukemia virus and defective spleen-focus-forming virus)와 이식하고자 하는 종양세포인 sarcoma-180(ATCC TIB61)을 사용하였으며 경구투여 개시일로부터 5일째 되는 날 바이러스를 접종하였고 simazine 투여 2주 후에 sarcoma-180을 복강에 이식하여 각각의 생존여부를 관찰하였다. 계속하여 simazine이 virus 감염에 대한 생체 내 저항성에 영향을 주는지 측정하기 위하여 Starec 등(1991)의 방법으로 감염 후 virus titer에 비례하는 splenomegaly를 형성하는 Friend Virus 감염실험을 이용하였다.

통계처리

실험결과의 평균치와 실험오차를 계산하였고, 대조군과의 차이를 Student's *t*-test를 사용하여 검정하였다. *p* 값이 5% 미만일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

Simazine은 triazine계 herbicide로서 발암물질임은 밝혀졌으나 안전성 평가나 면역계에 대한 연구보고가 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 B세포가 관여하는 체액성면역에 미치는 영향을 평가하였다. 항체를 생성하게 되기까지 필요한 B세포의 증식과 항체를 생성하는 세포수나 분비되는 항체의 양에 simazine이 어떤 영향을 주며 이런 영향이 생체내에서의 simazine에 대한 면역억제 작용의 결과와의 상관성을 논하고자 하였다.

Simazine이 면역기관인 비장세포에 대하여 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 10 µg/ml의 LPS와 4 µg/ml의 ConA를 이용하여 세포증식에 대한 영향을 보았다. Simazine(0.1, 1, 10, 100 µg/ml)은 T세포 miogen인 Con A에 대하여 농도의존적인 세포증식 억제효과를 나타내었는데 0.1, 1, 10 µg/ml의 simazine은 세포증식을 대조군에 비하

여 12% 정도 억제하였으며 100 µg/ml의 simazine은 30% 정도 억제하였다(Fig. 1a). 이는 simazine이 세포성면역을 감소시킴을 의미하는 것이다. Simazine은 B세포 mitogen인 LPS에 대하여 농도의존적인 세포증식 억제효과를 나타내었는데 비장 단일세포에 대한 LPS의 증식효과는 0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml의 simazine 처리한 군은 대조군에 비하여 35%-43% 정도 억제하였으며 100 µg/ml의 simazine은 대조군에 비하여 60% 정도 억제하였다(Fig. 1b). 따라서 이러한 결과는 simazine이 체액성 면역의 억제에도 관여하고 있음을 나타내었다.

이와 같은 결과로부터 simazine이 체액성 면역에 영향을 주는지 알아보기 위하여 항체생성세포수를 측정하였다. SRBC로 면역화된 생쥐의 비장세포와 SRBC(indicator cell)를 섞어주었을 때 항체를 생산하는 B세포 주위의 SRBC가 생성한 항체와 complement의 공격을 받아 용해되는 현상을 관찰하는 방법으로 용해된 plaque수를 세어 항체생성 세포 수에 대한 simazine의 영향을 알아보았다. Simazine 투여 1주 후에는 simazine 300 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 변화가 없었지만 simazine 600 mg/kg 투여군은 대조군보다 76% 정도의 현저한 감소를 나타내었다. Simazine 투여 2주 후에는 simazine 300 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 61% 정도의 감소를 나타내었고 simazine 600 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 31% 정도의 증가를 나타내었으며 simazine 투여 3주 후에

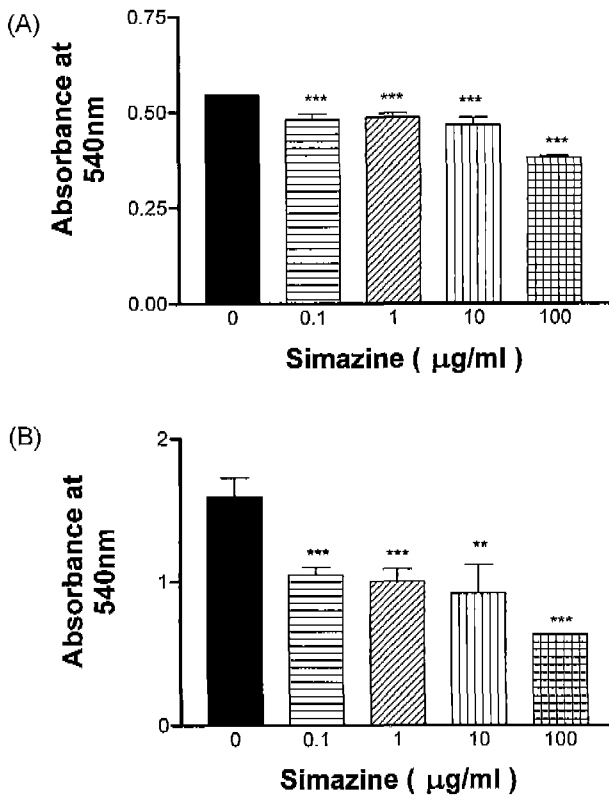


Fig. 1. In vitro effect of simazine on the splenocytes blastogenesis with Con A (A) or LPS (B). Splenocytes(5×10^5 cells/well) were treated with Con A(4 µg/ml) or LPS(10 µg/ml) in the presence of various concentrations of simazine for 48hrs. The proliferation of splenocytes was assessed by MTT. Cell density was measured at 540 nm. Simazine-treated groups were significantly different from control group at all dose ranges of simazine (**p<0.01, ***p<0.001).

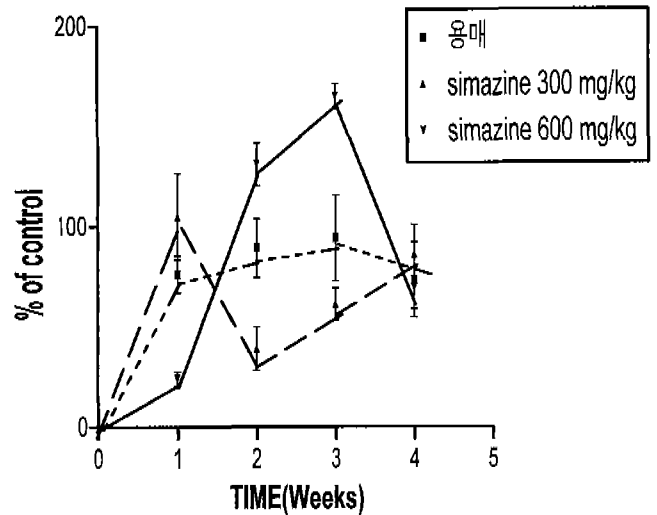


Fig. 2. The ex vivo effect of simazine on PFC response to SRBC. Mice were immunized with 1×10^8 SRBC by i.p. injection. Splenocytes were obtained 4 days later and agar solution for plaque was prepared by SRBC indicator cells and complement. The numbers of plaque were determined and results were calculated as PFC per 1×10^6 spleen cells. Results are expressed as the percent of controls(means of 5 individuals). *p<0.05.

서는 simazine 300 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 49% 정도의 감소가 나타났고 simazine 600 mg/kg 투여군은 80% 정도의 증가를 나타내었으며 simazine 투여 4주 후에는 simazine 300 mg/kg, simazine 600 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 각각 14%, 36% 정도의 감소를 나타내었다(Fig. 2).

이와같은 결과로 simazine이 체액성 면역을 담당하고 있는 B세포에 영향을 미치고 있음을 확인할 수 있었다.

생성되는 항체의 양에 미치는 영향을 알아보기 위하여 폴리클론 항체와 IgM 및 IgG의 총량을 ELISA 방법으로 측정하였다. ELISA 방법을 하기 위하여 coating에 사용한 폴리클론 항체는 IgM, IgG 및 IgA에 대한 항체를 포함하는 것으로 IgM, IgG 및 IgA의 총량을 측정하였으며 1차 면역반응에 의해 생성된 IgM과 2차 면역반응에 의해 생성된 IgG의 양을 차례로 측정하였다.

Simazine이 IgM의 항체총량의 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 24시간에 있어서 simazine 투여 1주 후에는 simazine 300 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 18% 정도 감소하였고, simazine 600 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 4% 정도의 감소를 나타내었으나 통계학적인 유의성이 없었고, simazine 투여 2주 후에는 simazine 300 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 8% 정도의 감소를 나타내었으나, 통계학적인 유의성이 없었고, simazine 600 mg/kg을 투여군에서 대조군과 비교하여 18% 정도의 감소를 나타내었다. 투여 3주 후에는 simazine 300 mg/kg, simazine 600 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 각각 30%, 34% 정도의 현저한 감소를 나타내었고 simazine 투여 4주 후에는 simazine 300 mg/kg, simazine 600 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 각각 39%, 47% 정도의 현저한 감소를 나타내었다(Fig. 3a).

Simazine이 IgG의 항체총량의 생성에 미치는 영향을 알아보았다. 24시간에 있어서 simazine 투여 1주 후에는 simazine 300 mg/kg, simazine 600 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 각각 2%, 13% 정도의 감소를 나타내었고, simazine 투여 2주 후에는 simazine 300 mg/kg, simazine 600 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 각각 12%, 19% 정도의 감소를 나타내었으나, 통계학적인 유의성이 없었고 투여 3주 후에는 simazine 300 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 별 영향이 없었다. 그러나 simazine 600 mg/kg 투여군은 25% 정도의 현저한 감소를 나타내었으며 simazine 투여 4주 후에는 simazine 300 mg/kg, simazine 600 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 각각 16%, 48% 정도의 현저한 감소를 나타내었다(Fig. 3b). 항체가 분비되어 배지중에 존재하려면 항체 생성세포에 의해 항체생성이 선행되어야 하며 이것이 운반되어 세포 밖으로 분비되는 단계를 거쳐야 할 것이므로 항체생성

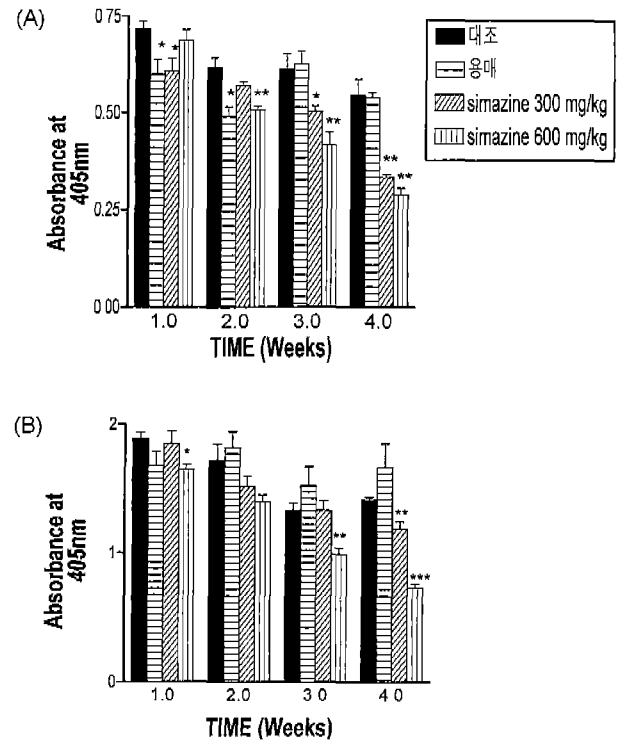


Fig. 3. The *ex vivo* effect of simazine on the production of IgM (A) and IgG (B). Mice were immunized with 1×10^8 SRBC by i.p. injection. After 4 days, spleens were isolated at the 1st, 2nd, 3rd, 4th week after administration of simazine into mice and splenocytes were incubated in the medium for 48 hours. Supernatants of splenocultures were collected at 24 hours for IgM or IgG production and used for the determination of each antibody concentration. Anti-mouse polyclonal antibodies (1:160 dilution) were coated on 96 well plate overnight. After supernants of splenocytes cultures were added to each well and incubated for 2hrs, antimouse IgM or IgG conjugated with alkaline phosphatase (AP) were added, respectively. The reaction of AP substrate was measured at 405 nm (** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

세포수와 분비된 항체의 양을 측정함으로써 simazine이 체액성면역의 어느 단계를 억제하는 것인지를 예측할 수 있게 하였다. 따라서 simazine은 항체를 생성하는 기능을 부분적으로 억제하고 항체를 분비하는 기능도 억제됨을 알 수 있었다.

B세포에서 생성된 항체는 바이러스나 암세포를 제거하는 기능을 가지고 있는데 항체가 직접 바이러스나 암세포에 결합한 후 보체가 결합하면 용해되어 버리는 경우와 바이러스나 암세포에 항체가 결합한 후 노출된 Fc 부분에 대해 대식세포의 식작용이 촉진되어서 제거되는 것으로 알려져 있다(Morgan and Weigle, 1987). 따라서 위에서 얻은 실험결과가 본 실험 조건하에서 simazine이 생체의 감염이나 종양의 성장에 대한 방어능력의 감소를 초래할 것인가를 알아보려고 하였다. 즉 생체가 simazine에 반복해서 노

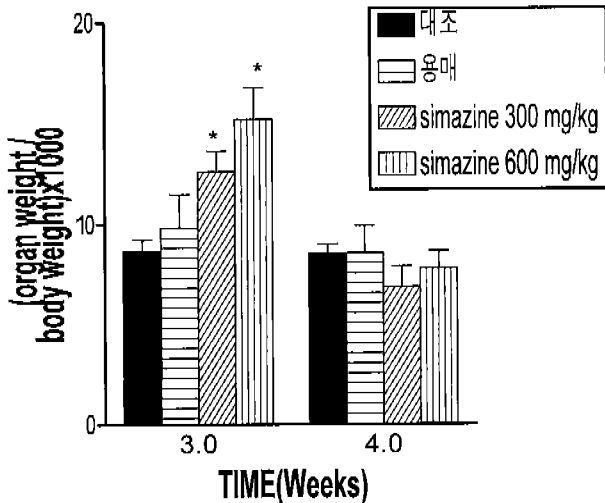


Fig. 4. The *ex vivo* effect of simazine on the weight of spleen with Friend virus. Mice were inoculated i.p. with 0.2 ml of FLV complex suspension on the 5th day after first administration. Spleens were isolated at the 3rd, 4th week after administration of simazine into mice and trimmed weighed. Simazine-administered groups for 3 weeks were significantly different from control (** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

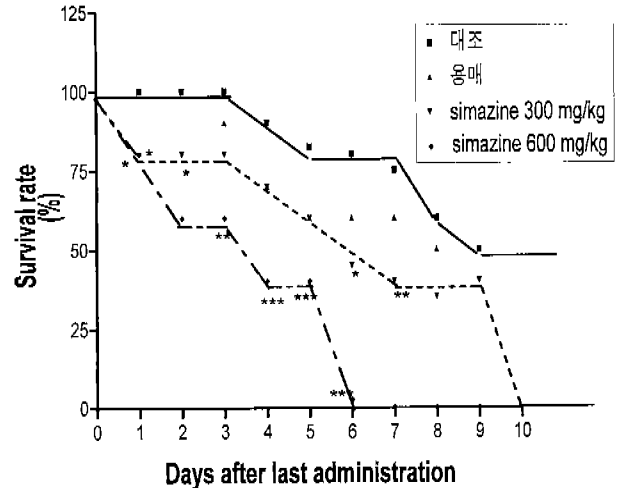


Fig. 5. The effect of simazine on host resistance against tumor growth of Sarcoma-180. Simazine was administered to mice at the 300 mg/kg or 600 mg/kg dissolved in 0.5% CMC for 4 weeks. Sarcoma-180 was intraperitoneally inoculated to mice before 14 days last administration. Simazine-administered groups were significantly different from control(*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$).

출될 경우 B세포가 항체 생성을 감소시키면 체액성면역에 대한 방어능력이 저하되므로 바이러스나 종양의 제거 능력이 감소되리라 예상되기 때문이다.

Friend virus 감염에 대한 숙주저항에 미치는 영향에서 감염의 정도는 virus titer에 비례하는 splenomegaly의 형성(Axelrod and Steeves, 1964; Bendinelli et al., 1985)에 있기 때문에 simazine이 Friend virus 감염에 의한 비장무게의 변화에 미치는 영향을 측정하였다. 우선 simazine이 Friend virus 감염에 의한 치사율에 미치는 영향을 측정하였으나 큰 영향이 없었고(데이터는 별도로 기재하지 않았다), Friend virus 감염에 의한 비장무게의 변화에 simazine이 미치는 영향을 측정할 결과는 비장/체중의 비가 simazine 투여 3주 후에는 simazine 300 mg/kg, simazine 600 mg/kg 투여군이 대조군과 비교하여 각각 13%, 15% 정도의 증가를 나타내었고 simazine 투여 4주 후에는 simazine 300 mg/kg, simazine 600 mg/kg 투여군이 대조군과 비교하여 각각 20%, 9% 정도의 감소를 나타내었지만 통계학적인 유의성이 없었다(Fig. 4). Friend virus 감염에 의한 흉선무게의 변화에 simazine이 미치는 영향을 측정할 결과는 흉선/체중의 비가 simazine 투여 3주 후에는 simazine 300 mg/kg, simazine 600 mg/kg 투여군이 대조군과 비교하여 각각 27%, 18% 정도의 감소를 나타내었고 simazine 투여 4주 후에는 simazine 300 mg/kg 투여군은 영향이 없었고, simazine 600 mg/kg 투여군이 대조군과 비교하여 11% 정도의 감소를 나타내었지만 통계학적

인 유의성이 없었다(데이터는 별도로 기재하지 않았다). 따라서 면역반응은 simazine에 의하여 그 기능이 저하되어 숙주의 바이러스에 대한 감수성이 증가하여 3주 투여 시에 대조군에 비해 비장증대와 흉선감소 현상이 나타난 것으로 보이고 그후 차차 면역기능이 회복되어서 4주 투여 후에는 비장증대와 흉선감소 증세가 회복되어진 것으로 추정되어진다.

암세포 발생에 대한 simazine의 영향을 알아보기 위하여 simazine 투여 2주 후에 sarcoma-180을 복강에 이식하고 계속하여 simazine을 2주 더 투여한 다음 생존율을 관찰하였다. 이와같은 실험결과 종양세포인 sarcoma-180을 이식한 경우에 생명연장율이 감소되었다(Fig. 5). 암세포이식 15일째 되는 날부터 대조군과 simazine 투여군 사이에 뚜렷한 생존율의 차이를 보였는데 simazine 300 mg/kg 투여군과 simazine 600 mg/kg 투여군에서 생존율이 대조군과 비교하여 20% 정도 감소하였으며 암세포 이식 16일째 되는 날에는 simazine 300 mg/kg 투여군과 simazine 600 mg/kg 투여군에서 생존율이 대조군과 비교하여 각각 20%, 40% 정도 현저히 감소되어 simazine이 암에 대한 감수성을 증가시켜서 발암가능성을 높이므로 암 발생율, 종양 성장률과 전이가 증가하게 되어 생명 연장율이 감소된 것으로 추정되며 암 발생은 복잡한 면역반응에 기초를 두고 있기 때문에 정확한 작용기전을 밝히기는 어려운 것 같다. 실제로 항체는 바이러스 제거에 중요한 역할을 하며 암세포 항원에 대한 항체는 antibody-dependent cell mediated cytotoxicity 또는 complement dependent cell lysis

에 의해 암세포 제거를 유도할 수 있다고 알려져 있다 (Frank, 1979; Lowell, 1980).

그러나 이와 같은 결과는 단지 B세포에 국한되어 일어난 결과라고 말할 수는 없으나 본 연구결과는 시험관내의 실험결과가 생체내 실험결과와 일치하기 때문에 simazine이 체액성 면역을 억제하는 효과가 있음을 시사한다. 이러한 결과는 triazine계 herbicide인 atrazine이 면역계에 억제작용이 있다는 보고(Michel et al., 1992)와 일치하여 simazine과 triazine계 제초제의 면역계에 대한 정보를 제공하며 simazine의 면역억제작용의 작용기전을 밝히는데 도움이 될 수 있을 것이다.

참고문헌

- Axelrod, A. A. and Steeves, R. A.: Assay for Friend leukemia virus (1964). Rapid quantitative method based on enumeration of macroscopic spleen foci in mice. *Virology* **24**, 513-518.
- Bendinelli M., Matteuci, O. and Friendman, H (1985). Retrovirus-induced acquired immunodeficiency. *Adv. Cancer Res.* **45**, 125-181.
- Fan, A., Street, J. C. and Nelson, R. M. (1978). Immunosuppression in mice administered methyl parathion and carbofuran by diet. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **45**, 235-243.
- Frank, M. M. (1979). The complement system in host defence and inflammation. *Rev. Inf. Dis* **1**, 87-118.
- Gibert K. and Dresser D. W. (1987). A practical approach. In lymphocytes (G.G.B. Klauss, Ed.) pp. 109-123. IRL Press., Oxford.
- Hayes, W. J. and Laws E. R. (1990). Handbook of Pesticide Toxicology, Vol. 3, Classes of Pesticides, Academic Press, New York.
- Jerner, N. K. and Nordin, A. A. (1963). Plaque formation in agar by antibody producing cells. *Science* **140**, 405-407.
- Klucinski P, Hrycek A, Stasiura-Zielinska H, Kossmann S, Tustanowski J, Friedek D, and Kaminska-Kolodziej B (1996). Humoral and cellular immunity rates in chemical plant workers employed in the production of liquid pesticides. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* **9**, 103-110.
- Lowell, G. H. (1980). Antibody-dependent cell-mediated antibacterial activity. *J. Immunol.* **125**, 1278-1284.
- Michel, F., Jacques, F., Denis, G., Saad, M. and Krzysztof, K. (1992). Limited immunotoxic potential of technical formulation of the herbicide atrazine (AAtrex) in mice. *Toxicol. Lett* **60**, 263-274.
- Morgan, E. L. and Weigle, W. O. (1987). Biological activities residing in the Fc region immunoglobulin. *Adv. Immunol.* **40**, 61-134.
- Starec, M., Rouveix, B., Sinet, M., Chau, F., Desforges, B., Pocardalo, J. and Lechat, P. (1991). Immune status and survival of opiate- and cocaine-treated mice infected with Friend virus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **259**, 745-750.
- Subbarao, D. S. and Glick, B. (1977). Pesticide effects on the immune response and metabolic activity of chicken lymphocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **154**, 27-29.
- Vunakis, H. V. and Langone, J. J. (1980). Immunochemical technique. In *Methods in Enzymology*. Vol. 7 pp. 419-439, Academic Press, New York.
- Wassermann, M., Wassermann, D., Gershon, Z. and Zeller-mayer, L. (1969). Effect of organochlorine pesticides on body defense system, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **160**, 393-399.