

Balb/c 마우스에서 유기인계 농약인 Pirimiphos-methyl 및 Methidathion의 면역독성

엄준호 · 정승태 · 박재현 · 길정현 · 이종권 · 오혜영 · 김형수
식품의약품안전청, 국립독성연구원 독성연구부

Immunotoxicity of Organophosphorous Pesticides, Pirimiphos-methyl and Methidathion in Balb/c Mice

Juno H. Eom, Seung-Tae Chung, Jae Hyun Park, Jung Hyun Kil,
Jong Kwon Lee, Hye Young Oh and Hyung Soo Kim

National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea

Received November 12, 2004; Accepted December 7, 2004

ABSTRACT. Pirimiphos-methyl and methidathion as organophosphorus (OP) pesticides were tested for their immunotoxic effects on Balb/c mice. Three dose levels of pirimiphos-methyl (10, 60, or 120 mg/kg/day) and methidathion (0.5, 2.5 or 5.0 mg/kg/day) were administered orally in the mice for 4 weeks. After, changes in body weight gain, relative weight of spleen and thymus, viable splenic cell numbers, surface marker on immune cell, and proliferation activity were investigated. Results showed that neither Pirimiphos-methyl nor methidathion dosages changed significantly body weight, relative thymus and spleen weight, and thymus and spleen cellularities of the mice, but high dose treatment (120 mg/kg) of pirimiphos-methyl significantly decreased relative spleen weight and spleen cellularity of the mice. No alterations were observed in changes of LPS-proliferation response of splenocytes by exposure to any dose of pirimiphos-methyl and methidathion. However, pirimiphos-methyl dosages reduced ConA-proliferation response of splenocytes and both methidathion and pirimiphos-methyl decreased the ability of antibody production to SRBC. The results indicate that 28 days exposure to the high dose of pirimiphos-methyl suppress the function of splenic T and B cell function, and methidathion reduce the immune responsibility of B cell in mice without the changes in lymphoid organ weight or viability of splenocytes. Pirimiphos-methyl is more immunotoxic than methidathion although this has higher general toxicity than that.

Keywords: Organophosphorous pesticide, Pirimiphos-methyl, Methidathion, Immunotoxicity.

서 론

매년 방대한 양의 농약이 농업에 널리 사용되고 있어 이들 농약에 의한 환경 및 인간의 건강에 미치는 효과는 연구되어야 할 분야이다. 유기인계 농약인 pirimiphos-methyl은

이차 세계대전시 독일에서 신경 독가스로서 개발하였으나, 아프리카 일대 및 호주에서는 땅콩농작에 살충제로 사용하여 낙화생유충 잔류량을 10 mg/kg으로 1974년 JMPR (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues)에 의해 설정되었고, 1990년 CCPR(Codex Committee on Pesticide Residues)에 의해 15 mg/kg으로 조정되었으며, 1986년 미국에서 곡물 보호제로 등록된 이래 쌀 나방을 비롯한 여러 해충의 방제로 저장성 곡물을 보호 목적으로 주로 사용되고 있다(Huang and Subramanyam, 2003). 파키스탄에서 모기 박멸의 위해 가정용으로 사용되었으며 인체에 무해한 것으로 보고되었다(Nasir *et al.*,

Correspondence to: Hyung Soo Kim, Department of Toxicology, National Institute of Toxicological Research, Korea Food and Drug Administration, 5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul 122-704, Korea

Abbreviations: ELISA, enzyme-linked immunosorbant assay; PFC, plaque forming cell; SRBC, sheep red blood cell.

1982). 흰쥐를 사용한 독성연구에서 pirimiphos-methyl은 100 ppm에서 혈중 urea 농도 상승과 glucuronic acid 배설을 증가시키고, 조직의 esterase의 작용을 저해하지만 영속적인 상해는 유도하지 않는 것으로 알려져 있으며 (Rajini and Krishnakumari, 1988; Neskovic *et al.*, 1989; Rajini *et al.*, 1989) 특히 간에서 독성이 야기되며 protease의 저해작용에 기인한다고 한다(Raizada *et al.*, 1994; Mantle *et al.*, 1997). 또한 효모균과 인간 임파구의 유전독성시험에서도 약한 유전독성물질로 보고되고 있으며(Bianchi-Santamaria *et al.*, 1997), Akay *et al.* (1992)은 alkaline phosphatase의 활성을 증가시키며 임파구 및 다세포 수를 감소시킨다는 보고가 있어 면역독성을 일으킬 가능성을 보여주고 있다. 또한 methidathion은 주로 진드기 살충제로 접촉 및 위장내에서 작용을 한다. 따라서 이 농약은 과일이나 야채에 잔류하는 것으로 알려져 있다. Methidathion의 독성은 젓먹이 흰쥐에서 급성독성이 강하게 나타났으며(Gaines and Linder, 1986), 일반독성은 간의 lipid peroxidation에 영향을 미친다(Altuntas, 2002). 야만성독성으로는 심장이나 순환기계에서 손상을 일으키며 비타민 E와 C로 활성산소를 제거하여 완하시킬 수 있는 손상이라고 보고하고 있다(Yavuz *et al.*, 2004). Quest *et al.*(1990)은 methidathion이 유전독성은 없이 양성 및 양성 간암을 유발하는 Group C 등급의 발암성물질보고하였으나, Kevekordes *et al.*(1996)은 인간 임파구에서 대사활성화 없이 자대염색체교환반응을 증가시켜 유전독성물질로서 보고하고 있다. 이러한 평가 연구 결과에 따르면 pirimiphos-methyl은 methidathion에 비해 전반적으로 약한 독성을 나타내고 있으며 특히 pirimiphos-methyl의 발암성은 미약한 것으로 보고되었다. 그러나 식품의 단백질 결손이 농약에 대한 감수성 장기가 면역장기이며, 대사체나 활성산소 등의 스트레스에 면역계가 가장 감수성 있다고 보고하고 있다(Banerjee *et al.*, 1996, 1999). 따라서 본 논문에서는 Balb/c 마우스를 실험동물로 사용하여 pirimiphos-methyl과 methidathion을 4주간 반복투여한 후 세포성 면역능 및 체액성 면역능과 관련한 면역독성지표들에 대한 평가 연구를 통해 이들 유기인계 농약에 대한 면역학적 안전성을 평가함은 물론 pirimiphos-methyl 및 methidathion의 면역독성 기전의 이해에도 기여하고자 하였다.

재료 및 방법

시험재료

본 실험에 사용한 시험물질은 Pirimiphos-methyl (ChemService, West Chester, USA)과 Methidathion

(ChemService, West Chester, USA)이며 용매는 Corn oil(Sigma Chem. Co. St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. 또한 면역세포 분포비 분석을 위해 사용한 염색항체들은 BD Pharmingen Inc.(San Diego, CA, USA) 제품을 사용하였다. 항체생성능 측정을 위해서는 Agar(Difco Lab. Detroit, MI, USA), DEAE dextran(Pharmacia, Uppsala, Sweden), Guinea pig complement(Sigma Chem. Co. St. Louis, MO, USA) 및 Sheep red blood cell (국립독성연구원)을 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-ethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTS} (Promega, Madison, WI, USA), RPMI 1640 media(Gibco Lab., Grand Island, NY, USA), Fetal bovine serum(FBS, Hyclone Lab., South Hyclone Road Logan, Utah, USA), Purified anti mouse CD3(BD Pharmingen Inc. San Diego, CA, USA), Concanavalin A(ConA) (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO, USA), Lipopolisaccharide(LPS) (Sigma Chem. Co. St. Louis, MO, USA) 등은 면역세포 배양 및 증식능 측정을 위해서 사용되었다. 그 외 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

실험동물 및 사육조건

실험동물은 4-5주령의 수컷 Balb/c 마우스를 (주)샘타코에서 구입하여 1주간의 순화기를 거쳐 사용하였으며 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 10\%$, 12시간의 명암 주기하에서 계속 사육하였고, 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시험물질 투여

Pirimiphos-methyl 또는 methidathion을 corn oil에 용해시키고, LD₅₀의 1/10, 1/100용량 및 중간용량을 선택 기준으로 하여 pirimiphos-methyl은 10 mg/kg, 60 mg/kg, 120 mg/kg 그리고 methidathion의 경우는 0.5 mg/kg, 2.5 mg/kg, 5.0 mg/kg의 용량으로 각각 0.1ml씩 4주간(주 6일) 마우스에 경구 투여하였고, 용매 대조군에는 corn oil로 동일하게 투여하였다. 투여 종료 후 마우스는 CO₂를 흡입시켜 치사시킨 후 면역능 측정시험을 실시하였다. 각 군당 8~10마리의 마우스를 사용하였다.

체중 및 면역 관련 장기 무게 측정

시험물질 투여전과 투여 후 29일째 마우스의 체중을 측정하여 두 시점의 체중차이를 계산하였다. 또한 비장 및 흉선의 중량비는 각 장기를 적출하여 무게를 측정하고 실험일(투여 후 29일째)의 체중에 대한 백분율(%)로 상대중량을 산출하였다.

비장 및 흉선의 세포수(cellularity) 측정

마우스를 CO₂를 이용하여 치사시킨 후 비장과 흉선을 무균적으로 적출하여 stainless steel mesh(# 100)에서 압착하여 세포를 분리시켰으며, RBC lysing buffer(0.15 M NH₄Cl, 1.0 mM KHCO₃ 및 0.1 mM Na₂EDTA; pH 7.2)로 적혈구를 제거하였다. Incomplete RPMI 1640 (100 µg/ml streptomycin, 100 IU/ml penicillin 및 2 mM L-glutamine) 배지로 1회 세척한 후 complete RPMI-1640(Incomplete RPMI 1640 및 10% heat-inactivated fetal bovine serum)로 2회 세척하였다. 마지막으로 complete RPMI-1640 배지에 lymphocyte를 부유시킨 후 세포수를 측정하였다.

세포염색 및 유세포분석(flow cytometry analysis)

비장 및 흉선세포 부유액에서 T세포와 B세포아군들의 분포비를 flow cytometry로 분석하였다. 마우스의 비장 및 흉선세포 부유액을 PBS로 2회 세척한 후, 1×10⁶ 세포에 대하여 T 세포아군의 구분을 위해서는 Fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated hamster anti-mouse CD3, Cy-Chrome-conjugated rat anti-mouse CD4, 그리고 Phycoerythrin(PE) conjugated rat anti-mouse CD8 등의 항체를 사용하였고, B 세포의 구분을 위해서는 Cy-Chrome-conjugated rat anti-mouse B220 항체를 사용하여 4°C 차광하에서 30분간 염색하였다. 염색된 세포는 PBS로 세척한 후 0.5% paraformaldehyde로 고정 한 다음 flow cytometer를 이용하여 분석하였다.

비장세포의 증식능 시험

마우스 비장세포의 증식능을 평가하기 위해 96 well flat-bottomed plate의 각 well에 배양액 100 µl에 비장 세포(1×10⁶ cells/ml)와 Con A(5 µg/ml) 또는 LPS(50 µg/ml)를 처리하여 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 72시간 배양하여 증식을 유도하였다(Niks *et al.*, 1990; Melchers *et al.*, 1975). 72시간 배양 후에 20 µl의 MTS/PMS를 각 well에 추가하여 3시간 배양한 후 ELISA reader (Molecular Devices Co, Sunnyvale, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정함으로써 비장세포의 증식능에 미치는 영향을 평가하였다.

비장세포의 항체형성능 측정

SRBC에 대한 비장의 항체형성세포 측정은 Luster 등 (1988)의 방법에 따라 수행하였다. 비장을 적출하여 세포를 유출시킨 후, EBSS로 1,500 rpm에서 10분간 3회 세척한 후, EBSS 5 ml에 비장세포를 부유시킨 후 얼음에 보관하여 사용했다. 먼저 0.4% agar를 제조하여 DEAE

dextran(30 mg/ml)을 가하고 항온수조에서 47°C를 유지한다. 이중 350 µl를 취하여 비장세포액 100 µl, EBSS로 3회 세척하여 얻은 SRBC 25 µl 및 guinea pig complement 25 µl와 섞은 후 petri dish에 놓고 45×50 mm cover glass로 기포가 생기지 않고 고르게 퍼지도록 살짝 덮고 패트리 접시(petri dish)를 가볍게 두드리고 agar를 굳힌 후, 5% CO₂ 배양기에서 37°C에서 3시간 배양시켰다. 배양 후 형성된 플라크 수를 세어 1×10⁶ 비장세포당 플라크 수를 계산하였다.

통계학적 분석

본 실험에서 얻은 측정치는 통계프로그램인 SigmaStat (SPSS Inc. Chicago, USA)의 one-way analysis of variance(ANOVA)를 적용하여 통계처리 하였고, 각 군간의 비교는 Dunnett's and Duncan's test를 사용하여 유의수준 P<0.05로 대조군과 용량군 사이에 통계학적 유의성을 검정하였다.

결 과

마우스의 체중 및 면역장기의 상대적 중량과 구성 세포수에 미치는 영향

Methidathion의 경구투여는 마우스의 체중, 비장 및 흉선의 상대적 중량과 세포수 등에 유의한 변화를 초래하지 않았다. 저용량 및 중용량의 pirimiphos-methyl 투여시에도 methidathion과 마찬가지로 마우스의 체중, 비장 및 흉선의 상대적 중량 및 세포수에는 유의한 영향을 미치지 않았으나, 고용량(120 mg/kg)군에서는 비장의 상대적 중량 및 세포수가 통계적으로 유의성 있게 감소되었다 (Table 1, 2).

마우스 비장 T 세포아군 및 B 세포아군의 상대적 분포비에 미치는 영향

Methidathion과 pirimiphos-methyl를 4주간 경구 투여 후 마우스로부터 비장을 취하고, anti-CD3, anti-CD4 그리고 anti-CD8 항체를 사용하여 비장세포를 3색 염색한 후 flow cytometry를 활용하여 비장 T 세포아군들의 상대적 분포비 변화를 분석하였다. 분석 결과, pirimiphos-methyl 고용량 투여군에서 CD3-/CD4+/CD8+ T 세포아군이 유의성 있게 감소된 것을 제외하고 기타 모든 T 세포아군에서 유의한 분포비 변화를 관찰할 수 없었다. 한편 CD3-/CD4+/CD8+ T 세포아군은 비장세포 중 적은 비중(0.1~0.2%)을 차지하므로 이것의 분포비 감소가 pirimiphos-methyl 고용량 투여군에서 나타난 비장의 상대적 중량 및 비장세포수 감소를 설명해 줄 것으로 사료

Table 1. Effects of methidathion on body weights, relative organ weights and cellularity in Balb/c mice^a which were dosed orally for 4 weeks

	VC	Methidathion (mg/kg/day)			PC
		0.5	2.5	5.0	
Body weight (g)	24.12 ± 0.86	24.21 ± 1.05	24.43 ± 1.19	24.60 ± 1.18	23.88 ± 1.08
Relative spleen weight (%) ^b	0.39 ± 0.05	0.37 ± 0.05	0.38 ± 0.03	0.37 ± 0.03	0.20 ± 0.02*
Relative thymus weight (%) ^b	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.04	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.03	0.08 ± 0.02
Splenic cellularity (× 10 ⁶)	122.6 ± 23.6	122.8 ± 35.8	117.3 ± 28.4	118.0 ± 31.8	30.1 ± 14.2*
Thymic cellularity (× 10 ⁶)	42.0 ± 14.4	59.0 ± 6.7	57.0 ± 6.8	54.3 ± 12.5	17.3 ± 6.1

^aThe number of Balb/c mice tested was 9 per dose group. Vehicle control (VC) mice were dosed with corn oil alone. For positive control (PC) mice, cyclophosphamide (200 mg/kg) was injected into peritoneal cavity 24 h before euthanization. Data are presented as mean ± SD.

^bRelative spleen (thymus) weight (%) = spleen (thymus) weight/body weight × 100.

*Significantly different from the control group at $P < 0.05$.

Table 2. Effects of pirimiphos-methyl on body weights, relative organ weights and cellularity in Balb/c mice^a which were dosed orally for 4 weeks

	VC	Pirimiphos-methyl (mg/kg/day)			PC
		10	60	120	
Body weight (g)	24.12 ± 0.86	24.96 ± 1.41	23.97 ± 1.04	23.82 ± 1.01	23.88 ± 1.08
Relative spleen weight (%) ^b	0.39 ± 0.05	0.38 ± 0.02	0.36 ± 0.05	0.28 ± 0.04*	0.20 ± 0.02*
Relative thymus weight (%) ^b	0.14 ± 0.02	0.16 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.08 ± 0.02
Splenic cellularity (× 10 ⁶)	122.6 ± 23.6	112.8 ± 19.0	99.2 ± 20.5	71.5 ± 26.4*	30.1 ± 14.2*
Thymic cellularity (× 10 ⁶)	42.0 ± 14.4	56.7 ± 18.9	51.1 ± 19.3	60.0 ± 24.9	17.3 ± 6.1

^aThe number of Balb/c mice tested was 9 per dose group. Vehicle control (VC) mice were dosed with corn oil alone. For positive control (PC) mice, cyclophosphamide (200 mg/kg) was injected into peritoneal cavity 24 h before euthanization. Data are presented as mean ± SD.

^bRelative spleen (thymus) weight (%) = spleen (thymus) weight/body weight × 100.

*Significantly different from the control group at $P < 0.05$.

Table 3. Effects of pirimiphos-methyl and methidathion on splenocyte subsets in Balb/c mice^a which were dosed orally for 4 weeks

	VC	Pirimiphos-methyl (mg/kg/day)			Methidathion (mg/kg/day)			PC	
		10	60	120	0.5	2.5	5.0		
CD3- CD4-CD8-	93.0 ± 3.7	95.1 ± 2.3	95.2 ± 1.7	95.1 ± 2.2	95.0 ± 1.2	95.2 ± 1.8	94.9 ± 2.6	90.3 ± 4.4	
	CD4 ± CD8+	0.24 ± 0.17	0.14 ± 0.09	0.16 ± 0.09	0.10 ± 0.05*	0.15 ± 0.05	0.12 ± 0.08	0.13 ± 0.06	0.29 ± 0.14
	CD4+CD8-	5.25 ± 2.66	3.44 ± 1.13	3.51 ± 1.04	3.58 ± 1.19	3.53 ± 0.49	3.36 ± 0.92	3.58 ± 1.25	6.97 ± 2.33
	CD4-CD8+	1.69 ± 1.27	1.30 ± 1.17	1.13 ± 0.89	1.20 ± 1.17	1.31 ± 0.80	1.30 ± 0.99	1.50 ± 1.46	2.46 ± 2.35
	Total CD3-	63.1 ± 5.1	62.8 ± 5.4	63.8 ± 4.7	62.2 ± 6.2	63.5 ± 7.4	63.8 ± 6.9	62.8 ± 5.8	29.9 ± 6.3*
CD3+ CD4-CD8-	2.44 ± 0.82	2.43 ± 0.75	2.69 ± 0.97	2.25 ± 0.81	2.52 ± 0.65	2.62 ± 0.74	2.42 ± 0.63	1.52 ± 0.48	
	CD4+CD8+	1.93 ± 1.09	2.40 ± 2.17	2.35 ± 1.75	1.56 ± 0.85	2.39 ± 1.74	2.62 ± 1.65	2.04 ± 1.30	1.84 ± 0.97
	CD4+CD8-	59.0 ± 3.3	59.5 ± 4.3	60.0 ± 3.5	61.6 ± 3.2	57.2 ± 3.6	58.4 ± 3.9	57.9 ± 3.3	62.7 ± 2.6
	CD4-CD8+	36.7 ± 3.3	35.7 ± 3.7	34.9 ± 2.5	34.5 ± 2.2	37.9 ± 2.4	36.4 ± 3.2	37.7 ± 2.5	34.0 ± 2.7
	Total CD3+	36.9 ± 5.1	37.2 ± 5.5	36.2 ± 4.7	37.7 ± 6.2	36.5 ± 7.4	36.4 ± 6.9	37.2 ± 5.8	70.0 ± 6.3*
B220+	30.3 ± 5.4	28.8 ± 8.5	25.5 ± 4.8	26.2 ± 7.1	33.5 ± 7.6	28.9 ± 11.9	24.4 ± 5.0	13.5 ± 6.3*	

^aThe number of Balb/c mice tested was 9 per dose group. Vehicle control (VC) mice were dosed with corn oil alone. For positive control (PC) mice, cyclophosphamide (200 mg/kg) was injected into peritoneal cavity 24 h before euthanization. The splenocyte cell suspensions from individual mice were stained for CD3/CD4/CD8 or B220 expression. Data are presented as mean ± SD.

*Significantly different from the control group at $P < 0.05$.

되지 않는다. 따라서 pirimiphos-methyl 고용량 투여군에서 나타난 비장의 상대적 중량 및 비장세포수 감소는 pirimiphos-methyl 투여가 특정 비장 구성 세포군에 특이적으로 영향을 미친 결과가 아니라 비장세포 전체에 비

특이적으로 미친 독성의 결과로 사료된다(Table 3). 다른 한편, B 세포 특이적 염색항체(anti-mouse B220/CD45R)를 사용하여 비장내 B 세포군의 상대적 분포비 변화를 flow cytometry를 사용하여 분석한 결과, 두 물질 모두

Table 4. Effect of pirimiphos-methyl and methidathion on thymocyte subsets in Balb/c mice which were dosed orally for 4 weeks

	VC	Pirimiphos-methyl (mg/kg/day)			Methidathion (mg/kg/day)			PC
		10	60	120	0.5	2.5	5.0	
CD3- CD4-CD8-	3.50 ± 1.50	3.52 ± 1.40	3.63 ± 1.96	4.40 ± 2.88	3.40 ± 1.80	4.14 ± 2.10	4.20 ± 1.43	5.17 ± 2.92
CD4+CD8+	87.7 ± 3.9	88.3 ± 3.4	88.5 ± 2.8	85.0 ± 5.3	87.8 ± 4.2	87.0 ± 2.2	85.6 ± 7.3	79.7 ± 8.6*
CD4+CD8-	7.14 ± 3.97	6.62 ± 4.14	6.48 ± 3.20	7.75 ± 5.80	6.51 ± 5.03	6.71 ± 3.46	7.73 ± 7.09	7.00 ± 1.63
CD4-CD8+	1.67 ± 1.07	1.57 ± 0.88	1.43 ± 0.93	2.84 ± 2.98	2.27 ± 1.53	2.16 ± 1.51	2.38 ± 1.20	8.23 ± 6.22*
Total CD3-	73.5 ± 8.7	78.1 ± 3.9	78.5 ± 5.5	72.9 ± 11.9	75.5 ± 5.9	74.5 ± 9.9	74.9 ± 9.3	52.6 ± 11.0*
CD3+ CD4-CD8-	4.73 ± 2.25	4.58 ± 2.24	4.27 ± 1.62	4.00 ± 1.88	4.19 ± 2.23	3.72 ± 1.38	4.49 ± 2.77	2.65 ± 0.81
CD4+CD8+	26.4 ± 24.8	30.3 ± 25.4	30.3 ± 26.1	26.1 ± 23.2	28.4 ± 25.2	29.1 ± 22.8	27.9 ± 25.5	23.4 ± 20.3
CD4+CD8-	53.7 ± 25.3	51.2 ± 23.4	53.4 ± 24.1	58.3 ± 23.1	52.1 ± 24.1	52.8 ± 21.6	53.6 ± 24.1	54.5 ± 20.1
CD4-CD8+	15.1 ± 4.2	14.3 ± 4.5	13.1 ± 2.6	14.4 ± 5.6	16.0 ± 5.0	15.0 ± 4.7	14.7 ± 4.6	21.9 ± 6.4*
Total CD3+	26.5 ± 8.7	21.8 ± 4.0	21.5 ± 5.5	27.1 ± 11.6	24.5 ± 5.9	25.5 ± 10.0	25.1 ± 9.3	47.4 ± 11.0*

^aThe number of Balb/c mice tested was 9 per dose group. Vehicle control (VC) mice were dosed with corn oil alone. For positive control (PC) mice, cyclophosphamide (200 mg/kg) was injected into peritoneal cavity 24 h before euthanization. The thymocyte cell suspensions from individual mice were stained for CD3/CD4/CD8 expression. Data are presented as mean ± SD.

*Significantly different from the control group at $P < 0.05$.

대조군과 비교하여 투여군에서 유의한 변화를 관찰할 수 없었다(Table 3).

마우스 흉선 T 세포아군의 상대적 분포비에 미치는 영향

비장의 경우와 마찬가지로, methidathion과 pirimiphos-methyl 투여 후 마우스로부터 흉선을 취하고, anti-CD3, anti-CD4, 그리고 anti-CD8 항체를 사용하여 흉선세포를 3색 염색한 후 flow cytometry를 활용하여 흉선 T 세포 아군들의 상대적 분포비 변화를 분석하였다. 이는 유기인계 농약이 흉선에서 T 세포의 분화 및 발생과정에 미치는 영향을 평가하기 위한 것으로 분석 결과, 모든 T 세포아군들의 상대적 분포비는 대조군과 비교하여 투여군들에서 의미 있는 차이를 보이지는 않았다(Table 4).

마우스 비장 T 세포의 증식능에 미치는 영향

비장 T 세포는 항원 자극에 의해 활성화되어 분열 및 분화 후 세포 및 체액성 면역반응에 관여하게 된다. 따라서 T 세포의 증식능은 그 기능 수행에 있어 매우 중요하며 이에 대한 영향은 면역독성의 중요 지표로 사용될 수 있다(Luster *et al.*, 1988). 마우스가 유기인계 농약에 장기간 노출될 경우, 비장 T 세포의 증식능에 영향을 받는

지 평가하기 위해 유기인계 농약에 4주간 노출된 마우스로부터 비장을 적출하여 비장세포를 준비한 다음 체외에서

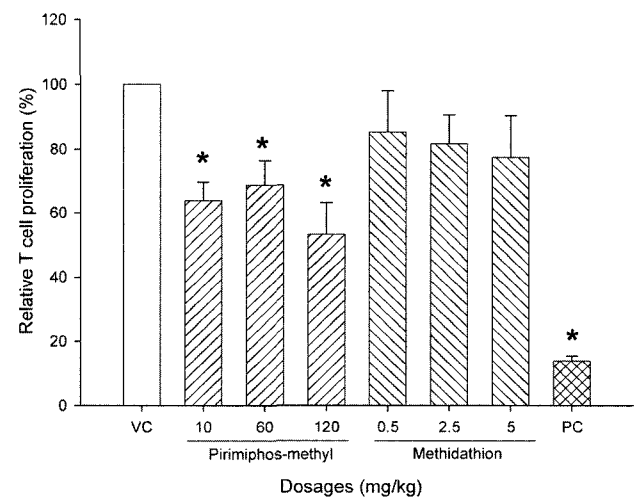


Fig. 2. Effects of pirimiphos-methyl and methidathion on ConA proliferation response of splenocytes in Balb/c mice which were dosed orally for 4 weeks. Splens from individual mice were aseptically removed and finely minced with meshes. Spleen cell suspension was washed in RPMI1640 media and resuspended in culture media. Spleen cell counts were performed using a hemacytometer. The proliferation responses of splenic T cells were tested with ConA. For mitogen responsiveness assay, 1.0×10^5 cells of splenocytes in RPMI supplemented with 10% FBS were seeded to the wells of 96-well plates and incubated with ConA ($5 \mu\text{g/ml}$) at 37°C , 5% CO_2 for 48 hrs. Then $20 \mu\text{l/well}$ of combined MTS/PMS solution was added. After 4 hrs at 37°C , 5% CO_2 , the absorbance at 490 nm was recorded using an ELISA reader. Results expressed as mean percentage ± SD of OD490 values versus vehicle control (VC, corn oil-treatment), PC (positive control, cyclophosphamide treatment). Results expressed as mean ± SD. *Significantly different from the control group at $P < 0.05$.

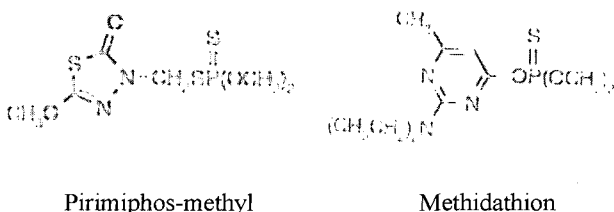


Fig. 1. Molecular structure of pirimiphos-methyl and methidathion.

T 세포의 증식을 유도하기 위해 concanavalin A(ConA)를 처리하였다. ConA 처리 후 증식능의 변화는 MTS 환원 산물의 흡광도 측정을 통하여 평가하였다. 증식능 변화 측정 결과 pirimiphos-methyl 투여 마우스들로부터 분리한 비장 T 세포들은 대조군 비장 T 세포와 비교하여 모든 투여용량에서 유의한 증식능 감소가 관찰되었으며 감소 정도는 10, 60, 120 mg/kg 투여군에 대하여 각각 37%, 32% 그리고 47% 감소로 나타났다(Fig. 2). methidathion 투여 마우스들로부터 분리한 비장 T 세포들 또한 대조군 비장 T 세포와 비교하여 모든 투여군에서 증식능이 감소하는 경향(최대 약 23%)을 보였으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 2).

마우스 비장 B 세포의 증식능에 미치는 영향

비장 B 세포는 T 세포의 자극에 의해 활성화되어 분열 및 분화 후 체액성 면역반응에 관여하게 된다. 따라서 T

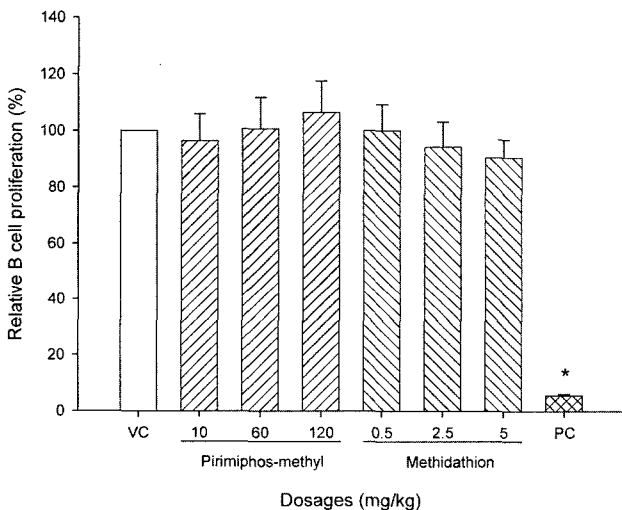


Fig. 3. Effects of pirimiphos-methyl and methidathion on LPS-proliferative response of splenocytes in Balb/c mice which were dosed orally for 4 weeks. Splens from individual mice were aseptically removed and finely minced with meshes. Spleen cell suspension was washed in RPMI1640 media and resuspended in culture media. Spleen cell counts were performed using a hemacytometer. The proliferation responses of splenic B cells were tested with LPS. For mitogen responsiveness assay, 1.0×10^5 cells of splenocytes in RPMI supplemented with 10% FBS were seeded to the wells of 96-well plates and incubated with LPS ($50 \mu\text{g/ml}$) at 37°C , 5% CO_2 for 72 hrs. Then $20 \mu\text{l/well}$ of combined MTS/PMS solution was added. After 4hrs at 37°C , 5% CO_2 , the absorbance at 490nm was recorded using an ELISA reader. Results expressed as mean percentage \pm SD of OD490 values versus vehicle control(VC, corn oil-treatment), PC (positive control, cyclophosphamide treatment). Results expressed as mean \pm SD. *Significantly different from the control group at $P < 0.05$.

세포와 마찬가지로 B 세포의 증식능 또한 B 세포 기능에 있어 매우 중요한 요소이기 때문에 이에 대한 영향은 면역독성의 중요 지표로 사용되고 있다(Luster *et al.*, 1988). 유기인계 농약 투여에 의한 비장 B 세포 증식능의 변화를 측정하기 위해 마우스로부터 비장을 적출하여 준비한 비장세포에 B 세포 mitogen인 lipopolysaccharide (LPS)를 처리하였다. LPS 처리 후 비장 B 세포의 증식능 정도는 MTS법을 사용하여 측정하였다. 측정 결과 pirimiphos-methyl 및 methidathion 투여군 모두에서 유의성은 없지만 methidathion 투여군에서는 농도의존적인 경향을 보였다(Fig. 3).

마우스의 항체형성능에 미치는 영향

유기인계 농약에의 노출이 마우스의 항체형성능에 미치는 영향을 평가하기 위해 실험 4일 전(농약 투여 후 25일째)에 면양적혈구(SRBC)를 복강으로 주사한 후 비장을 적출하여 anti-SRBC IgM 생산-비장세포수를 PFC 계수법으로 측정하였다. 측정 결과 pirimiphos-methyl에의 노출은 마우스 항체형성능을 용량의존적으로 감소시켰으며 methidathion 투여군 또한 2.5 및 5.0 mg/kg 용량에서 유의하게 항체형성능이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이러한 결과로 보아 pirimiphos-methyl과 methidathion과

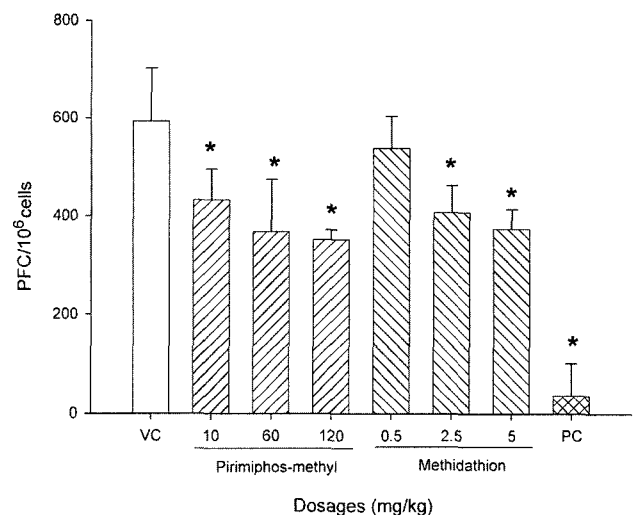


Fig. 4. Effects of pirimiphos-methyl and methidathion on anti-SRBC IgM forming response of splenocytes in Balb/c mice which were dosed orally for 4 weeks. Mice were i.p. immunized with SRBC antigen at 4 days before assay. Splens from individual mice were aseptically removed and pooled. The number of anti-SRBC forming cells was determined in spleen cell suspension pooled. Data are presented as PFC/ 10^6 splenocytes (specific activity). Results expressed as mean \pm SD. *Significantly different from the control group at $P < 0.05$.

같은 유기인계 농약에 장기간 노출되었을 경우 항체형성과 같은 체액성 면역반응이 억제된 결과이다.

고 찰

농약은 용도를 기준으로 분류한다면 살충제(insecticide), 제초제(herbicide), 살서제(rodenticide) 등으로 크게 분류되며 화학적 구조로 분류한다면 유기염소계, 유기인계, 카바메이트계 등으로 구분된다. 이러한 농약은 식품의 잔류 농약으로써 인류의 건강을 위협하는 요인으로 부각되고 있다(Lefferts, 2000). 한편 지금까지도 사용되고 있는 유기염소계 농약은 분해되기 어렵고 지용성이어서 지방조직에 축적되기 때문에 인체에 급성독성보다는 만성독성이 우려되고 있다(Crinnion, 2000; Vale *et al.*, 2003). 또한 BBB(blood brain barrier)를 용이하게 통과하여 중추신경계에도 영향을 주는 반면, 유기인계 농약은 대체로 신속히 대사 배출되어 만성독성이 약한 편이고, 자연환경에서도 잘 분해되기 때문에 현재 살충제로서 널리 사용되고 있다(Beaman *et al.*, 1999).

비록 유기인계 농약이 신속히 대사 배출되기는 하지만 소량의 모화합물이 고등동물의 조직에서 검출되었다는 보고도 있다. 따라서 유기인계 농약에 장기간 노출되었을 경우 유해한 생리작용을 유발할 개연성은 충분히 존재한다고 할 수 있다(Akay *et al.*, 1992; Khan *et al.*, 1992; Qureshi *et al.*, 1992). 따라서 유기인계 농약의 노출에 의한 면역독성을 평가하고자, 유기인계 농약을 실험동물로 마우스를 사용하여 OECD 가이드라인에 맞춰 반복투여 후 면역독성을 평가하고 그 독성 기작을 이해하고자 하였다.

본 연구를 위해 pirimiphos-methyl 및 methidathion을 각각 LD₅₀의 1/10 이하~1/100 이상의 용량으로 4주간 경구 투여하였으며, 실험 결과의 통계적 유의성을 확보하기 위해 실험군당 8마리 이상의 Balb/c 마우스를 사용하였다. 투여기간 동안 농약 투여군은 대조군과 유사한 체중 증가를 보였으며, 유기인계 농약 투여로 인한 외관상의 병리적 증상은 관찰되지 않았다. 체중 외에 거시적 면역독성 지표로서 면역관련 장기인 비장 및 흉선의 상대적 중량을 측정된 결과, methidathion의 경구투여는 마우스의 비장 및 흉선의 상대적 중량과 세포수 등에 유의한 변화를 초래하지 않았다(Table 1). Pirimiphos-methyl의 경우도 methidathion과 마찬가지로 마우스의 흉선의 상대적 중량 및 흉선 세포수에는 유의한 영향을 미치지 않았으나 고용량(120 mg/kg) 투여시에는 비장의 상대적 중량 및 세포수가 통계적으로 의미 있게 감소되는 것이 관찰되었다(Table 2). Pirimiphos-methyl 고용량 투여시

나타난 비장의 상대적 중량 감소는 비장구성 총세포수 감소에 일부 기인한 것으로 사료된다. 한편 flow cytometry를 사용하여 비장세포에서 B 세포 및 다양한 T 세포아군들(subsets)을 구별하여 그 분포비를 분석한 결과에 따르면 대조군과 비교하여 pirimiphos-methyl 및 methidathion 투여군 비장세포에서 뚜렷한 분포비 차이를 보이는 세포아군들은 관찰되지는 않았다(Table 3). 이러한 결과는 pirimiphos-methyl 또는 그 대사산물이 비장세포의 사멸을 유도하거나 촉진시키지만 그와 같은 영향이 특정 비장세포아군들에 미치는 것이 아니라 전체 비장세포에 대한 비특이적 영향에 의한 결과로 사료된다.

비록 pirimiphos-methyl 및 methidathion 투여가 마우스 흉선의 무게나 세포수에 변화를 주지는 않았으나 흉선에서 일어나는 T 세포 분화과정에 영향을 주었다면 이 또한 궁극적으로 마우스의 면역기능에 부정적 영향을 줄 수 있으므로 다양한 흉선세포아군들의 분포비 변화를 분석하였으나, 두 유기인계 농약 투여군은 대조군과 비교하였을 때 흉선세포아군들의 분포비에는 영향을 주지 않았다(Table 4). 따라서 pirimiphos-methyl이나 methidathion에의 노출은 적어도 본 실험에 사용한 용량에서는 흉선에서 일어나는 T 세포의 분화 및 발생에는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

T 세포는 APC에 의해 자극을 받고 활성화되면 증식하여 항원-특이적 T 세포의 수가 급격히 늘어나게 되며 특정 기능의 T 세포(cytotoxic T cell, Th1 cell 또는 Th2 cell)로 분화를 일으키게 되고 분화된 T 세포는 이후 진행되는 체액성 또는 세포성 면역반응을 유도하게 된다. T 세포의 증식은 항원에 반응하여 일어나는 주요 면역반응 중 하나이다. 따라서 T 세포 증식능의 이상은 궁극적으로 부적절한 면역반응 유발로 연결되게 된다. pirimiphos-methyl와 methidathion에 장기간 노출된 마우스로부터 비장을 적출하고 비장세포에 Con A를 처리하여 비장 T 세포를 활성화시켜 증식능을 조사한 결과 pirimiphos-methyl 투여군에서는 모든 용량에서 비장 T 세포 증식능의 감소가 나타났으며 120 mg/kg 투여 마우스로부터 분리한 비장 T 세포는 대조군 비장세포에 비해 약 50%에 가까운 증식능 감소를 보여주었다(Fig. 2). 그러나 methidathion 투여 마우스의 비장 T 세포에서는 통계적 유의성을 보이지는 않았지만 증식능 감소 경향을 나타내었다(Fig. 2). 이러한 결과는 특히 pirimiphos-methyl의 투여가 마우스 비장 세포아군들의 구성 분포비 등에 대한 변화는 탐지되지 않았으나, T 세포의 증식 활성화능에는 이상을 초래하고 있는 것으로 보아 pirimiphos-methyl의 투여가 비장 T 세포의 사멸을 유도한 결과라고 사료된다.

B 세포는 항원 자극에 의해 활성화 및 분화된 T 세포에

의해 자극을 받게 되면 증식 및 분화되어 항체를 생산할 수 있는 형질세포(plasma cell)가 된다. 따라서 비장 B 세포의 정상적 증식능은 체액성 면역반응을 일으키는데 중요한 요소이다. 비장 T 세포와 유사하게 비장 B 세포 또한 lipopolysaccharide(LPS)를 사용하여 시험관내에서 인위적으로 증식을 유도하여 pirimiphos-methyl과 methidathion에 반복 노출에 따른 마우스의 비장 B 세포 증식능을 측정하였다. 측정 결과 두 유기인계 농약의 모든 투여군에서 약간의 증식능 감소 경향을 관찰할 수는 있었지만 대조군과 비교하여 유의적 변화가 관찰되지는 않았다(Fig. 3). 이러한 결과는 적어도 pirimiphos-methyl에의 노출은 마우스의 비장세포 중 B 세포 보다는 T 세포에 보다 유독한 결과를 유래하는 것으로 사료된다. 유기인계 농약의 경우는 아니지만 Dean *et al.*(1990)이 카바메이트계 농약인 aldicarb를 C3H 마우스에 복강으로 투여한 후 비장 T 세포의 증식능을 조사한 결과 ConA에 의해 유도되는 비장 T 세포의 증식능이 감소되었음을 보고한 바 있다.

유기인계 농약이 면역기능에 미치는 영향을 보다 실제적으로 평가하기 위해 항원으로 면양적혈구(SRBC)를 사용하여 유기인계 농약에 장기간 노출된 마우스의 항체형성능을 측정하였다. 측정 결과 pirimiphos-methyl과 methidathion에의 노출은 마우스에 의한 anti-SRBC 항체형성을 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이는 두 유기인계 농약이 비장세포의 사멸, 비장 T 세포 증식능 등에 미치는 영향이 체액성 면역반응과 같은 실제적 면역반응에 대한 영향으로 나타남을 보여주는 것으로 pirimiphos-methyl 및 methidathion에 의한 실질적 면역독성의 한 예를 제시하는 것으로 사료된다. 농약 특히 카바메이트계 농약에 의한 항체형성능 감소의 예는 다수 보고된 바 있으나(Gieldanowski *et al.*, 1991; Institoris *et al.*, 2002), 유기인계 농약에 장기간 노출되었을 때 나타나는 항체형성능 감소와 관련된 연구 보고는 Kowalczyk-Bronisz *et al.*(1992)이 Chlorfenwinfos를 사용하여 보고한 연구 결과가 유일하게 알려져 있다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, methidathion과 pirimiphos-methyl에 장기간 노출될 경우, Balb/c 마우스의 면역기능 저하가 유발될 가능성이 우려되며 이와 같은 면역기능에 대한 영향은 고용량의 pirimiphos-methyl에 노출되었을 경우 특히 두드러질 것으로 예상된다. 이는 methidathion(Toxicity class WHO 1b; EPA 1)이 pirimiphos-methyl(Toxicity class WHO 3; EPA 3) 보다 강한 일반독성 및 유전독성 등을 보임에도 불구하고, 면역계에 미치는 영향에 있어서는 pirimiphos-methyl이 methidathion 보다 큰 것은 대사배출 속도가 보다 신속한 methidathion

(Gallo, 1991)에 비해 체내에서 축적하여 체내 스트레스가 발생하여 해소되지 못하며, pirimiphos-methyl의 단백질합성을 저해(Marinovich *et al.*, 1994)하는 등을 미뤄보면, Banerjee(1999) 등의 논리처럼 농약에 의해 면역장기가 감수성이 증가되어 면역독성을 초래한 것으로 보이며, 또한 pirimiphos-methyl에 의한 항체형성능 저해는 T 세포에 대한 부정적 영향에 의한 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청 국립독성연구원의 2002년도 내분비계 장애물질 연구사업 2003년도 독성연구 기본사업의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Akay, M.T., Yilmazoglu, G., Yasacan, S., Turk, H. and Kolanyaka, D. (1992): Bioavailability and toxicological potential of wheat-bound pirimiphos-methyl residues in rats. *Xenobiotica*, **22**, 293-302.
- Altuntas, I., Delibas, N., Demirci, M., Kilinc, I. and Tamer, N. (2002): The effects of methidathion on lipid peroxidation and some liver enzymes: role of vitamins E and C. *Arch Toxicol.*, **76**, 470-473.
- Banerjee, B.D., Koner, B.C., Pasha, S.T. and Ray, A. (1996): Immunotoxicity of pesticides: perspective and trends. *Indian J. Exp. Biol.*, **34**, 723-733.
- Banerjee, B.D. (1999): The influence of various factors on immune toxicity assessment of pesticide chemicals. *Toxicol. Lett.*, **107**, 21-31.
- Beaman, J.R., Finch, R., Gardner, H., Hoffmann, F., Rosenkrance, A. and Zelikoff, J.T. (1999): Mammalian immunoassays for predicting the toxicity of malathion in a laboratory fish model. *J. Toxicol. Environ. Health A*, **56**, 523-542.
- Bianchi-Santamaria, A., Gobbi, M., Cembran, M. and Arbaboldi, A. (1997): Human lymphocyte micronucleus genotoxicity test with mixtures of phytochemicals in environmental concentrations. *Mutat. Res.*, **388**, 27-32.
- Crinnion, W.J. (2000): Environmental medicine, part 4: pesticides-biologically persistent and ubiquitous toxins. *Altern. Med. Rev.*, **5**, 432-447.
- Dean, T.N., Kakkanaiah, V.N., Nagarkatti, M. and Nagarkatti, P.S. (1990): Immunosuppression by aldicarb of T cell responses to antigen-specific and polyclonal stimuli results from defective IL-1 production by the macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **106**, 408-417.
- Gaines, T.B. and Linder, R.E. (1986): Acute toxicity of pesticides in adult and weanling rats. *Fundam Appl. Toxicol.*, **7**, 299-308.
- Gallo, M.A. and Lawryk, N.J. (1991): Organic phosphorus pesticides. In *Handbook of Pesticide Toxicology*. Hayes, W.J. Jr. and Laws, E.R. Jr., Eds. Academic Press, New York, pp, 5-3.
- Gieldanowski, J., Kowalczyk-Bronisz, S. and Bubak, B.

- (1991): Studies on affinity of pesticide Unden-2-isopropoxyphenyl N-methylcarbamate to immunological system. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, **39**, 85-97.
- Huang, F. and Subramanyam, B. (2003): Responses of *Coryca cephalonica* (Stainton) to pirimiphos-methyl, spinosad, and combinations of pirimiphos-methyl and synergized pyrethrins. *Pest. Manag. Sci.*, **60**, 191-198.
- Instititoris, L., Papp, A., Siroki, O., Banerjee, B.D. and Desi, I. (2002): Immuno- and neurotoxicological investigation of combined subacute exposure with the carbamate pesticide propoxur and cadmium in rats. *Toxicology*, **178**, 161-173.
- IPCS 자료 <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v92pr16.htm>
- <http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v072pr20.htm>
- Kevekordes, S., Gebel, T., Pav, K., Edenharder, R. and Dunkelberg, H. (1996): Genotoxicity of selected pesticides in the mouse bone-marrow micronucleus test and in the sister-chromatid exchange test with human lymphocytes *in vitro*. *Toxicol. Lett.*, **89**, 35-42.
- Khan, S.U., Kacew, S. and Matthews, W. (1992): Bioavailability to rats of bound [¹⁴C] pirimiphos-methyl in stored wheat. *J. Environ. Sci. Health B*, **4**, 355-367.
- Kowalczyk-Bronisz, S., Gieldanowski, J., Bubak, B. and Kotz, J. (1992): Studies on effect of pesticide chlorfenwinfos on mouse immune system. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, **40**, 283-289.
- Lefferts, L.Y. (2000): Pesticide residues variability and acute dietary risk assessment: a consumer perspective. *Food Addit. Contam.*, **7**, 511-517.
- Luster, M.I., Munson, A.E., Thomas, P.T., Holsapple, M.P., Fenters, J.D., White, K.L. Jr., Lauer, L.D., Germolec, D.R., Rosenthal, G.J. and Dean, J.H. (1988): Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **10**, 2-19.
- Mantle, D., Saleem, M.A., Williams, F.M., Wilkins, R.M. and Shakoori, A.R. (1997): Effect of pirimiphos-methyl on proteolytic enzyme activities in rat heart, kidney, brain and liver tissues *in vivo*. *Clin. Chim. Acta*, **262**, 89-97.
- Marinovich, M., Guizzetti, M. and Galli, C.L. (1994): Mixtures of benomyl, pirimiphos-methyl, dimethoate, diazinon and azinphos-methyl affect protein synthesis in HL-60 cells differently. *Toxicology*, **94**, 173-185.
- Melchers, F., Braun, V. and Galanos, C. (1975): The lipoprotein of the outer membrane of *Escherichia coli*: a B-lymphocyte mitogen. *J. Exp. Med.*, **142**, 473-482.
- Nasir, S.M., Ahmad, N., Shah, M.A. and Azam, C.M. (1982): A large-scale evaluation of pirimiphos-methyl 25% WP during 1980-1981 for malaria control in Pakistan. *J. Trop. Med. Hyg.*, **85**, 239-244.
- Neskovic, N.K., Karan, V.Z., Sabovljevic, V. and Vitorovic, S.L. (1989): Toxic effects of pirimiphos-methyl residues on rats. *Biomed. Environ. Sci.*, **2**, 115-130.
- Niks, M., Otto, M., Busova, B. and Stefanovic, J. (1990): Quantification of proliferative and suppressive responses of human T lymphocytes following ConA stimulation. *J. Immunol. Methods.*, **126**, 263-271.
- Pope, C.N. (1999): Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.*, **2**, 161-181.
- Quest, J.A., Copley, M.P., Hamernik, K.L., Rinde, E., Fisher, B., Engler, R., Burnam, W.L. and Fenner-Crisp, P.A. (1990): Evaluation of the carcinogenic potential of pesticides. 2. Methidathion. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **12**, 117-126.
- Qureshi, M.J., Jamil, F.F., Haq, A. and Naqvi, S.H. (1992): Bioavailability and toxicity to rats of bound residues of ¹⁴C-pirimiphos-methyl in stored wheat. *J. Environ. Sci. Health B*, **27**, 369-375.
- Raizada, R.B., Srivastava, M.K., Kaushal, R.A., Singh, R.P., Gupta, K.P. and Dikshith, T.S. (1994): Dermal toxicity of hexachlorocyclohexane and pirimiphos-methyl in female rats. *Vet. Hum. Toxicol.*, **36**, 128-130.
- Rajini, P.S. and Krishnakumari, M.K. (1988): Toxicity of pirimiphos-methyl: I. The acute and subacute oral toxicity in albino rats. *J. Environ. Sci. Health B*, **23**, 127-144.
- Rajini, P.S. and Krishnakumari, M.K. (1988): Toxicity of pirimiphos-methyl: II. Effect of dietary feeding on blood and urine constituents in albino rats. *J. Environ. Sci. Health B*, **23**, 145-158.
- Rajini, P.S., Muralidhara, and Krishnakumari, M.K. (1989): Inhibitory pattern of tissue esterases in rats fed dietary pirimiphos-methyl. *J. Environ. Sci. Health B*, **24**, 509-524.
- Vale, C., Fonfria, E., Bujons, J., Messeguer, A., Rodriguez-Farre, E. and Sunol, C. (2003): The organochlorine pesticides gamma-hexachlorocyclohexane (lindane), alpha-endosulfan and dieldrin differentially interact with GABA(A) and glycine-gated chloride channels in primary cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience*, **117**, 397-403.
- Yavuz, T., Altuntas, I., Delibas, N., Yildirim, B., Candir, O., Cora, A., Karahan, N., Ibrism, E. and Kutsal, A. (2004): Cardiotoxicity in rats induced by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C. *Hum. Exp. Toxicol.*, **23**, 323-329.
- Yavuz, T., Delibas, N., Yildirim, B., Altuntas, I., Candir, O., Cora, A., Karaman, N., Ibrism, E. and Kutsal, A. (2004): Vascular wall damage in rats induced by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C. *Arch. Toxicol.*, **78**, 655-659.