

# Mancozeb의 아급성 노출이 마우스의 면역병리학적 인자 및 비장세포 증식능에 미치는 영향

표 명 윤\*, 정 애 희<sup>1</sup>

숙명여자대학교 약학대학, <sup>1</sup>서울특별시보건환경연구원

## Effects of Subacute Oral Administration of Mancozeb on the Immunopathological Parameters and Splenocytes Proliferation in Mice

Myoung-Yun Pyo\* and Ae-Hee Cheong<sup>1</sup>

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

<sup>1</sup>Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public and Environment, Seoul 137-734, Korea

### ABSTRACT

Mancozeb, a polymeric complex of zinc and manganese salts of ethylene bithiocarbamate (EBDC), is used widely in agriculture as fungicides, insecticides, and herbicides. Mancozeb can be occupationally and environmentally exposed to human and has been reported to induce estrogenic activity, therein it is considered as an endocrine disrupter. After female ICR mice were treated Mancozeb orally at the doses of 250, 1,000 and 1,500 mg/kg/day for consecutive 30 day, we investigated the effects of Mancozeb on the immunopathological parameters (body-, thymus-, spleen-, liver- and kidney-weight, splenic cellularity, hematological parameters) and mitogen (Con A, LPS)-induced splenocyte proliferation (SP). Liver- and kidney- weight were increased, but body- and thymus-weight, number of splenocytes and WBC were decreased, when compared with control group. When splenocytes isolated from the mice exposed to Mancozeb for 30 days were cultured in presence of mitogens, the SP against Con A was significantly and dose-dependently decreased and the SP against LPS was also slightly decreased. Our present results indicate that subacute exposure of Mancozeb to mice might show immunotoxic effect.

**Key words :** Mancozeb, subacute exposure, immunopathology, splenocyte proliferation

### 서 론

Mancozeb은 ethylene bisdithiocarbamate의 zinc와 manganese의 polymeric complex로 과일, 야채, 견과류, 농작물 등의 광범위한 살균제로 쓰이며, 사

용법이 간편하고 단가가 저렴하여 우리나라에서도 사용량이 많은 농약이다(농약연보, 1999).

Mancozeb은 rat에서의 경구 LD<sub>50</sub>가 8~15 g/kg/day (Hurley *et al.*, 1998; Kackar *et al.*, 1997)으로 독성이 약한 편이지만 male rat에 Mancozeb을 경구 투여할 경우, 갑상선은 체중비에 따라 thyroid peroxidase와 thyroxine (T4)은 용량과 투여기간에 따라 의존적으로 변화하고(Kackar *et al.*, 1997; Trivedi *et*

\* To whom correspondence should be addressed.

Tel: +82-2-710-9573, E-mail: ypyo@sdic.sookmyung.ac.kr

*al.*, 1993; Mehrota. *et al.*, 1990) rat에 Mancozeb이 함유된 사료를 공급하면 체중감소(Varnagy *et al.*, 2001)와 간과 갑상선무게가 증가하고, 고용량(253 mg/kg, 379 mg/kg)에서는 신장, 부신, 정소 중량이 증가함을 보이며, 저용량(50 mg/kg)에서는 갑상선의 기능 손상이 되며 갑상선 호르몬 농도가 변화(Szepvolgyi *et al.*, 1989)하는 등 Mancozeb의 갑상선에 대한 기관독성이 보고되고 있다.

Male rat에 1,000 mg/kg/day를 35일간 경구투여했을 때 정소의 정자 수 감소와 이상정자 증가가 나타나고(Harris *et al.*, 2000), 동량을 180일간 경구투여했을 때는 정소중량 증가 및 정소상체 중량 감소가 있다고 보고하고 있으며(Mahadevaswami *et al.*, 2000) female rat에 Mancozeb 투여후 성주기 변화와 건강 난포의 감소, 폐쇄 난포의 증가(Baligar and Kaliwal, 2001), 마우스의 착상억제(Bindali and Kaliwal, 2002) 등과 만성노출 후 male rat의 정액 감소 및 고환 중량증가, 부고환의 중량감소 등 생식선에 나타나는 병리학적인 변화(Kackar *et al.*, 1997) 등에 관한 보고가 있다. 또한 Mancozeb을 rat에 104주 동안 식이 투여하였을 때 유방종양, 귀암, 간암, 췌장종양, 갑상선종양, 두개골의 뼈육종, 혈액 임파망상구의 신형성 등의 증가(Belpoggi *et al.*, 2002)와 rat에서 nitrosomethylurea (NMU)로 유발된 췌장암을 촉진한다는 보고(Monis and Valentich, 1993; Larsson *et al.*, 1976)도 있으며 Colosio 등(Colosio *et al.*, 1996)은 내분비계장애물질로 분류되고 있는 Mancozeb을 장기간 직업적으로 노출된 사람에게서 면역계 변화가 약하게 나타난다고 보고하였다. 그러나 Mancozeb의 일반독성이나 유전독성 및 생식독성 등에 대한 연구결과에 비해 면역계에 미치는 영향에 대한 연구결과는 거의 보고 되지 않아 본 연구에서는 Mancozeb이 생체내의 면역계에 미치는 영향을 체계적으로 검토하기 위하여 Mancozeb을 아급성 노출시킨 후 면역병리학적 인자 및 비장세포 증식능을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 시약 및 기기

실험물질로는 Mancozeb (86.5%, technical grade, Dau Agro Science, France)을 (주)경농에서 공급받

아 사용하였고, 시약으로는 Coulter 제품인 Lyse, phosphate buffer, Clenz, Gibco 제품인 RPMI 1640 medium power, fetal bovine serum (FBS), antibiotic-antimycotic agent, MEM-nonessential amino acid, sodium bicarbonate, trypan blue, Hank's balanced salt solution (HBSS), Sigma 제품인 dimethylsulphoxide (DMSO), concanavalin A (ConA), lipopolysaccharides (LPS), 4-(2-hydroxy ethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES), Amresco 제품인 3-(4,5,-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide (MTT)와 Wako 제품인 2-mercaptoethanol 등을 사용하였으며 그 외의 시약은 모두 세포배양용 또는 특급을 사용하였다. 기기로는 CO<sub>2</sub> incubator (NAPCO, Precision scientific Inc.), Coulter counter (T-890, Coulter Co.), ELISA microplate reader (ELX 800, BIO-TEK instruments Co.) 등을 사용하였다.

### 2. 실험동물

3~4주령인 ICR계 암컷 마우스를 유한양행 중앙연구소로부터 분양받아 고휘사료(삼양사)와 수돗물을 자유롭게 공급하면서 실험동물실에서 2~3주간 적응시킨 후, 건강상태가 양호한 6~8주령(25±2g)의 마우스를 선택하여 실험에 사용하였다. 실험동물실의 온도는 21~24°C, 습도는 40~60%로 유지하였고 조명은 12시간 간격으로 조정하였다.

### 3. 실험물질의 조제 및 투여

Mancozeb을 투여직전 3차 증류수에 현탁하여 마우스 체중 10g당 Mancozeb 현탁액 0.1 mL를 투여할 수 있는 농도로 조제한 다음, LD<sub>50</sub>과 EPA의 면역독성시험 지침서(U.S. EPA, 1996)를 기준으로 하여 결정한 250, 1,000, 1,500 mg/kg/day 용량으로 주 5회 30일간 경구투여한 후 32일째에 실험하였고 대조군에는 동량의 3차 증류수를 같은 방법으로 투여하였다.

### 4. 면역병리학적 인자 측정

#### 1) 체중 및 장기무게 측정

실험 전 물은 자유롭게 공급하면서 약 16시간동안 절식한 후 체중을 측정하였으며, 체중증가(g)는

실험일의 체중과 Mancozeb 투여일의 체중과의 차이로 나타내었다. 또한 각 장기의 중량비는 실험일에 실험동물의 비장, 흉선, 간장, 신장을 적출하여 각각의 무게를 실험일의 체중에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

## 2) 혈액학적 parameter 측정

마우스의 안정맥총에서 heparinized capillary (Chase instruments Co.)로 채혈하여 EDTA (K<sub>3</sub>)가 들어있는 시험관 (Sherwood medical Co.)에 취하고 roll mixer로 혼합한 후 WBC (white blood cell), RBC (red blood cell), HGB (hemoglobin), HCT (hematocrit), PLT (platelet)를 Coulter counter로 측정하였다. Coulter counter는 사용 전에 4C plus<sup>®</sup>액으로 WBC, RBC, HGB, HCT, PLT값을 표준용액에 맞게 보정한 후 혈액을 분석하였다.

## 3) 비장세포수 측정

Mancozeb 투여 후 실험일에 마우스의 비장을 적출하여 빙냉의 HBSS에 넣고 frosted microscope slides (Fisher Scientific)를 이용하여 비장세포액을 만들어 원심분리 (1,000 rpm, 10 min, 4°C)하고 세포 침전물에 RBC lysis buffer를 가하여 적혈구를 용혈시킨 후 원심분리하였다. 상정액을 제거하고 침전된 비장세포에 일정량의 HBSS용액을 가한 후 Turk's solution (Rakich *et al.*, 1998)으로 세포수를 측정하여 비장당 비장세포수를 계산하였다.

## 4) 복강 대식세포수 측정

Mancozeb에 노출시킨 마우스를 치사시킨 후 복강내로 빙냉의 DMEM 배지 8 mL을 주사하여 1~2분간 마사지 한 다음 주사기로 복강내의 세포액을 얻었다. 복강에서 취한 세포액을 모아 원심분리 (2,000 rpm, 5 min., 4°C)한 후 침전물에 0.2% NaCl을 가하여 적혈구를 용혈시킨 다음 원심분리하여 상정액을 제거하고 PBS로 2회 세척후 Turk's solution을 이용하여 마우스 당 세포수를 계산하였다.

## 5. Mitogen에 대한 비장세포 증식능 측정

Mancozeb을 250, 1,000, 1,500 mg/kg/day로 30일간 투여하여 아급성 노출시킨 후 32일째에 마우스의 비장을 무균적으로 적출하였다. 적출한 비장으로 조제한 비장세포액 100  $\mu$ L ( $2 \times 10^6$  cells/mL)를 96 well flat bottomed plate의 각 well에 가하고 30

분동안 배양 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>)하여 안정시킨 후 T cell mitogen인 Con A (2  $\mu$ g/mL) 또는 B cell mitogen인 LPS (50  $\mu$ g/mL)를 각각 가하고 10% FBS-RPMI 배지로 200  $\mu$ L가 되도록 하여 배양하였다. 배양 3일 후에 MTT assay를 이용하여 비장세포 증식능을 측정하였다.

## 6. 통계 처리

각 실험군의 측정값의 평균과 표준편차를 구하고, 대조군의 실험치와 비교하여 Student's t-test로 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 체중 및 장기무게에 미치는 영향

Mancozeb을 250, 1,000, 1,500 mg/kg/day용량으로 주 5회 30일간 경구투여하여 아급성 노출시킨 후 32일째에 체중 및 사료섭취량과 장기무게를 측정하여 32일 동안 증가된 체중과 사료섭취량 및 체중에 대한 장기중량비를 Table 1에 나타내었다.

Mancozeb의 아급성 노출에 의해 250 mg/kg/day 용량에서 대조군에 비해 체중증가(g)의 감소가 유의성있게 ( $p < 0.05$ ) 나타났으나 농도의존적인 차이를 나타내지는 않았다. 250, 1,000, 1,500 mg/kg/day 투여군에서 간장의 중량비는 대조군에 비해 각각 9.9%, 20.5%, 34.3%로 유의성있게 ( $p < 0.01$ ) 농도의존적으로 증가하였고, 신장의 중량비는 Mancozeb 투여군이 대조군에 비해 각각 2.8%, 7.0%, 7.0% ( $P < 0.01$ ) 증가 경향을 보였다. Mancozeb 투여군의 흉선 중량비는 대조군에 비해 모든 용량에서 약 11~12% 정도 감소하였으며, 비장의 중량비는 대조군과 비슷하였다. 이상의 결과는 저자 등 (Chung and Pyo, 2004)이 Mancozeb을 마우스에 급성노출하여 보고한 결과와 매우 유사하였다.

Szepvolgyi 등 (1989)은 male Wistar계 rat에 Dithane M-45 (80% Mancozeb)을 12주 동안 혼합식이 한 결과 간과 신장의 무게가 증가하였고 콜레스테롤의 수치가 증가하였으며 간의 triglyceride 함량 상승이 유발되었다고 보고하여 간과 신장의 중량비가 증가한 본 실험의 결과와 유사하다. Subramoniam 등 (1991)도 male albino rat에 Mancozeb을 30일 동안

투여하면 간장의 중량이 농도의존적으로 증가하였음을 보고하였으나 Kackar 등(1999)은 male rat에 Mancozeb을 1,000, 1,500 mg/kg/day 용량으로 180일, 360일 투여했을 때 체중감소, 간비대, 신장중량의 약간 감소 등을 보고하여 신장의 중량비는 본 연구와 같지 않았다. Kackar 등(1997)은 male albino rat에 360일 동안 Mancozeb을 투여한 결과 30일까지는 유의성 있는 체중 변화가 없었으나 360일 후에는 유의성 있는 체중증가율의 감소를 보였다는 보고를 하였다. 또한 30일 동안의 사료섭취량 및 비장의 중량비는 대조군에 비해 유의성 있는 변화를 보이지 않았다.

## 2. 혈액학적 parameter에 미치는 영향

Mancozeb을 주 5회 경구투여하여 30일간 아급성 노출시킨 후 32일째에 안장맥총에서 채혈하여 순환말초혈관내의 혈액학적 성상을 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. 본 실험에서 순환말초혈액

내의 혈액학적 분석결과는 Guest 등(1991)이 보고한 결과와 유사하였다. 250, 1,000, 1,500 mg/kg/day 투여군에서 백혈구(WBC)수가 각각 22.1%, 23.3%, 40.7% 농도의존적으로 유의성 있게 ( $p < 0.01$ ) 감소하였으며, 적혈구(RBC)수는 1,000, 1,500 mg/kg/day 투여군에서 대조군에 비해 각각 3.8% ( $p < 0.01$ ), 6.3% 약하게 감소하였다. Hemoglobin (HGB)은 저농도에서는 대조군과 차이가 없었으나 1,000, 1,500 mg/kg/day 용량에서 대조군에 비해 각각 3.2%, 5.6% 유의성 있게 감소하였으며, Hematocrit (HCT)도 이와 비슷한 결과를 보였다.

## 3. 면역관련 세포수에 미치는 영향

### 1) 비장세포수

Mancozeb을 주 5회 30일간 경구적으로 아급성 노출시킨 후 32일째에 비장을 적출하여 비장세포수를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 250, 1,000, 1,500 mg/kg/day 용량으로 투여한 결과 대조군에 비

**Table 1.** Changes of body- and organ- weight in the mice subacutely administered Mancozeb

Exp.group	Control	Doses of Mancozeb (mg/kg/day)		
		250	1,000	1,500
B.W. gain (g)	6.12 ± 2.56	4.22 ± 2.37*	5.03 ± 2.17	5.07 ± 1.00
Food (g)	364 ± 14	337 ± 51	369 ± 18	362 ± 39
Spleen (%)	0.50 ± 0.08	0.56 ± 0.16	0.50 ± 0.11	0.55 ± 0.14
Thymus (%)	0.18 ± 0.02	0.14 ± 0.02**	0.16 ± 0.03	0.14 ± 0.02*
Liver (%)	4.64 ± 0.12	5.10 ± 0.16**	5.59 ± 0.44**	6.23 ± 0.63**
Kidney (%)	1.42 ± 0.07	1.46 ± 0.06	1.52 ± 0.14	1.52 ± 0.05**

Mancozeb was orally administered to ICR mice (250, 1,000, 1,500 mg/kg/day) for 30 days. Mice were sacrificed on day 32. B.W. gain (g) = final weight - initial weight. Changes of organ weight = (organ weight/body weight) × 100. The results are expressed as the means ± S.D. of 3 separate experiments for 3 mice per group. Significant difference from control group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

**Table 2.** Changes of hematological parameters in the mice subacutely administered Mancozeb

Hematological parameters	Control	Doses of Mancozeb (mg/kg/day)		
		250	1,000	1,500
WBC ( $10^3/\text{mm}^3$ )	8.6 ± 1.5	6.7 ± 1.8**	6.6 ± 1.9**	5.1 ± 1.8**
RBC ( $10^3/\text{mm}^3$ )	8.0 ± 0.6	8.0 ± 0.6	7.7 ± 0.4**	7.5 ± 0.7
HGB (g/dL)	12.5 ± 0.7	12.5 ± 0.4	12.1 ± 0.5*	11.8 ± 0.6**
HCT (%)	40.2 ± 1.3	39.8 ± 2.8	39.0 ± 2.2*	37.9 ± 2.5**
PLT ( $10^3/\text{mm}^3$ )	723 ± 126	719 ± 172	632 ± 240	648 ± 181

Mancozeb was orally administered to ICR mice (250, 1,000, 1,500 mg/kg/day) for 30 days. Mice were sacrificed on day 32. The results are expressed as the means ± S.D. of 3 separate experiments for 3 mice per group. Significant difference from control group (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

해 각각 9.0%, 27.8%, 33.8% ( $p < 0.05$ ) 감소하여 고농도의 Mancozeb에 반복적으로 노출될 경우 마우스의 비장세포수가 영향을 받는 것으로 보인다.

2) 복강 대식세포수

Mancozeb을 30일간 경구투여하여 아급성 노출시키고 32일째에 복강내의 대식세포를 얻어 세포수를 측정하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Mancozeb에 아급성 노출된 경우 250 mg/kg/day 용량에서 유의성없이 약간 감소하는 경향을 보였다.

4. Mitogen에 대한 비장세포 증식능에 미치는 영향

Mancozeb을 주 5회 30일간 마우스에 경구투여하여 아급성 노출시킨 후 32일째에 비장세포액을 조제한 다음 T cell mitogen 또는 B cell mitogen에 대한 비장세포 증식능을 측정한 결과는 Fig. 3과 Fig. 4와 같다.

Mancozeb에 아급성으로 노출된 마우스의 Con A에 대한 비장세포 증식능 (Fig. 3)은 250, 1,000, 1,500 mg/kg/day 투여군에서 대조군에 비해 각각 16.6%, 19.4% ( $p < 0.05$ ), 21.6% ( $p < 0.05$ ) 용량의존적으로 감소되었으며, 급성노출시 (Chung and Pyo, 2004)에 나타난 감소경향이 아급성 노출시에 비장세포 증식능이 뚜렷이 감소되는 것으로 보인다. 또

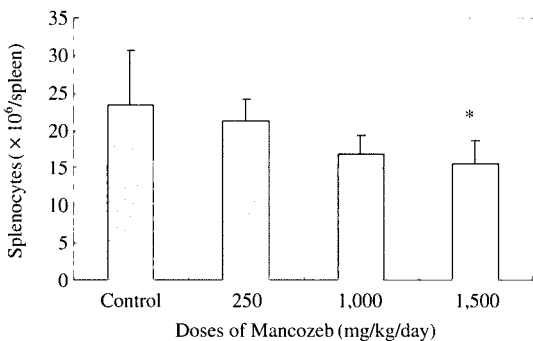


Fig. 1. Splenic cellularity in the mice subacutely administered Mancozeb. Mancozeb was orally administered to ICR mice (250, 1,000, 1,500 mg/kg/day) for 30 days. Mice were sacrificed on day 32. The results are expressed as the means  $\pm$  S.D. of 3 separate experiments for 3 mice per group. Significant difference from control group (\*  $p < 0.05$ ).

한 LPS에 대한 비장세포 증식능을 측정된 결과를 Fig. 4에서 보면, Mancozeb에 in vivo에서 아급성 노출을 받은 비장세포의 LPS mitogen에 대한 증식 정도는 대조군에 비해 모든 용량에서 약 15% 감소되었다.

이상의 결과로 보면, Mancozeb으로 아급성 노출이 되었을 때 세포성 면역반응이 억제되고 체액성

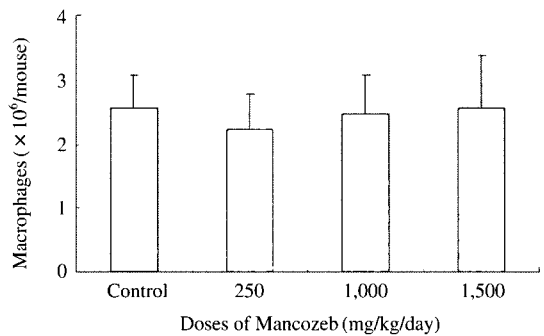


Fig. 2. Peritoneal macrophage numbers in the mice subacutely administered Mancozeb. Peritoneal macrophages were collected on day 32. Other legends are the same as those described in Fig. 1.

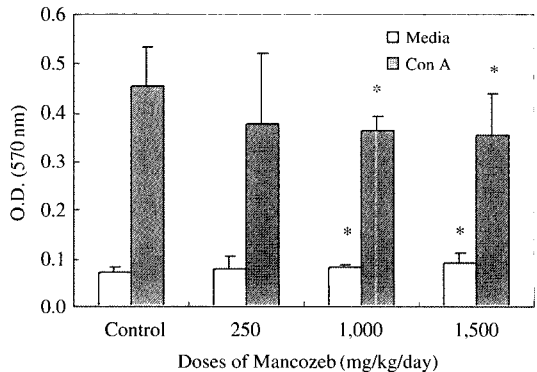
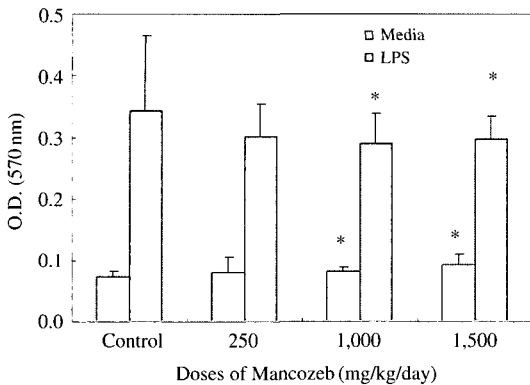


Fig. 3. Alteration in T cell mitogen induced proliferation of splenocytes from the mice subacutely administered Mancozeb. Mancozeb was orally administered to ICR mice (250, 1,000, 1,500 mg/kg/day) for 30 days. Mice were sacrificed on day 32. Splenocytes were cultured with Con A (2  $\mu$ g/mL) for 72 hrs. Splenocytes proliferation was assessed by MTT assay. The results are expressed as the means  $\pm$  S.E. of 4 separate experiments for 3 mice per group. Significant difference from control group (\* $P < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Alteration in B cell mitogen induced proliferation of splenocytes from the mice subacutely administered Mancozeb. Splenocytes were cultured with LPS (50  $\mu$ g/mL) for 72 hrs. Other legends and methods are the same as those described in Fig. 3.

면역반응도 영향을 받을 것으로 생각되며 Mancozeb의 면역독성기전 연구를 계속 진행할 필요가 있다.

## 결론

내분비계 장애물질로 알려진 Mancozeb을 250, 1,000, 1,500 mg/kg 용량으로 주 5회 30일간 경구투여하여 아급성 노출시킨 후 면역병리(체중, 장기무게, 비장세포수, 복강 대식세포수, 혈액학적 parameter) 및 mitogen에 대한 비장세포 증식능에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다. Mancozeb에 아급성 노출된 경우 투여용량에 차이는 있으나 간장과 신장의 중량비가 대조군에 비하여 증가되었고 백혈구 수와 적혈구수는 유의성 있게 감소되었으며 혈소판은 약하게 감소하는 경향을 보이고 고농도로 노출시 비장세포수도 유의적으로 감소하였다. Mancozeb을 아급성 노출시킨 비장세포는 T cell mitogen인 Con A에 대해서는 용량의존적으로 증식정도가 저하되었으며, B cell mitogen인 LPS에 대해서도 다소 증식이 감소되었다.

이상의 결과는 Mancozeb은 아급성 노출시 면역병리학적 parameter에 변화를 유발하고 비장세포 증식능을 억제하는 결과를 보여 생체 면역계에 영향을 미칠 수 있음을 시사해 주고 있다.

## 감사의 글

본 연구는 2003년도 숙명여자대학교 교내연구비 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

## 참고 문헌

- 농약연보. 농약공업협회. 1999; p.62-63.
- Baligar PN and Kaliwal BB. Induction of gonadal toxicity to female rats after chronic exposure to mancozeb. *Ind. Health* 2001; 39(3): 235-243.
- Belpoggi F, Soffritti M, Guarino M, Lamvertini L, Cevolani D and Maltoni C. Results of long-term experimental studies on the carcinogenicity of ethylene-bis-dithiocarbamate (Mancozeb) in rats. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2002; 982: 123-136.
- Bindali BB and Kaliwal BB. Anti-implantation effect of a carbamate fungicide mancozeb in albino mice. *Ind. Health* 2002; 40(2): 191-197
- Chung AH and Pyo MY. Effects of acute administration of mancozeb on the immune function in mice. *Yakhak Hoeji* 2004; 48(1): 41-46.
- Colosio C, Barcellini W, Maroni M, Alcini D, Bersani M, Cavallo D, Galli A, Meroni P, Pastorelli R, Rozzardi GP, Soleo L and Foa V. Immunomodulatory effects of occupational exposure to Mancozeb. *Arch. Environ. Health* 1996; 51(6): 445-451.
- Guest IC, Paik NW, Ryu JC, Park JS and Chang IM. Hematological values in normal laboratory mice (ICR and ddY strains). *Kor. J. Toxicol.* 1991; 7: 47.
- Harris ML, Chora L, Bishop CA and Bogart JP. Species- and age-related differences in susceptibility to pesticide exposure for two Amphibians, *Rana pipiens*, and *Bufo americanus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2000; 64: 263-270.
- Hurley PM, Hill RN and Whiting RJ. Mode of Carcinogenic Action of Pesticides Inducing Thyroid Follicular Cell Tumors in Rodents. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106(8): 437-445.
- Kackar R, Srivastava MK and Raizada RB. Studies on Rat Thyroid after Oral Administration of Mancozeb: Morphological and Biochemical Evaluations. *Journal of Applied Toxicology* 1997; 17(6): 369-375.
- Kackar R, Srivastava MK and Raizada RB. Induction of gonadal toxicity to male rats after chronic exposure to mancozeb. *Ind. Health.* 1997; 35(1): 104-111.

- Kackar R, Srivastava MK, and Raizada RB. Assessment of toxicological effects of mancozeb in male rats after chronic exposure. *Indian J. Exp. Biol.* 1999; 37(6): 553-559.
- Larsson KS, Arnander C, Cekanova E and Kjellberg M. Studies of teratogenic effects of the dithiocarbamates Maneb, Mancozeb, and Propineb. *Teratology* 1976; 14: 171-184.
- Mahadevaswami MP, Jadaramkunti UC, Hiremath MB and Kaliwal BB. Effect of mancozeb on ovarian compensatory hypertrophy and biochemical constituents in hemicastrated albino rat. *Reproductive Toxicology* 2000; 14: 127-134.
- Mehrotra NK, Kumar S and Yogeshwer S. Enhancement of tumor-initiating activity of DMBA by the carbamate fungicide Mancozeb. *Bull. Environ Contam. Toxicol.* 1990; 44: 39-45.
- Monis B and Valentich MA. Promoting effects of mancozeb on pancreas of nitrosomethylurea-treated rats. *Carcinogenesis* 1993; 14(5): 929-933.
- Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA and Weller RN. Effects of dentin bonding agents on macrophage mitochondrial activity. *J. Endodon.* 1998; 24: 528-533.
- Subramoniam A, Agrawal D, Srivasrava SP and Seth PK. Influence of mancozeb on mitogenically responsive lipids in rat cerebrum and liver. *Indian Journal of Experimental Biology* 1991; 29: 943-945.
- Szepvolgyi J, Nagy K, Sajgone Vukan K, Regoly-Merei A, Soos K, Toth K, Pinter A and Antal M. Subacute toxicological examination of Dithane M-45. *Fd. Chem. Toxic.* 1989; 27(8): 531-538.
- Trivedi N, Kakkar R, Srivastava MK, Mithal A and Raizada RB. Effect of oral administration of fungicide-mancozeb on thyroid gland of rat. *Ind. J. Exp. Biol.* 1993; 31: 564-566.
- EPA US. Health Effects Test Guidelines-Pesticides and Toxic Substances. Immunotoxicity 1996.
- Varnagy L, Budai P, Molnar E, Takacs I and Fejes S. One-generation reproduction toxicity study of mancozeb and lead acetate. *Meded. Rijksuniv. Gent. Fak. Landbou-wkd. Toegep. Biol. Wet.* 2001; 66(2b): 873-878.