

## DZIAŁANIE NEUROIMMUNOMODULACYJNE WYSOKOTOKSYCZNEGO ZWIĄZKU FOSFOROORGANICZNEGO NA ROZWÓJ INFEKCJI *TRICHINELLA SPIRALIS*

JANUSZ BANY I DANUTA ZDANOWSKA

Wojskowy Instytut Higieny i Epidemiologii im. gen. Karola Kaczkowskiego, ul. Kozielska 4,  
01-163 Warszawa; E-mail: wihie@wihe.waw.pl

**ABSTRACT.** Neuroimmunomodulatory effect of highly toxic organophosphorus compound on the development of *Trichinella spiralis* infection. The highly toxic organophosphorus compound (isopropylmethylphosphonofluoridate – IMPF) belonging to the group of the so called toxic of warfare agents can impair immune effector mechanisms determining the development of parasitic infection. Preliminary studies have demonstrated that IMPF delays elimination of adults *Trichinella spiralis* forms from the intestine of C57Bl/6 mice and B6C3F1 hybrids. Besides, the studied compound modifies the proliferative activity of T-cells in the above mentioned mice and reduces the production of anti-SRBC antibodies in C57Bl/6 strain. The mechanisms are discussed of the organophosphorus compound effect on neuroimmunological processes connected with antiparasitic immunity, paying attention also to the function of these processes by the parasitic infection itself, in host-parasite relationship. The probability is also considered of increased sensitivity to *Leishmania* infection in humans poisoned with IMPF and/or other organophosphorus compounds.

**Key words:** isopropylmethylphosphonofluoridate, *Leishmania* spp. neuroimmunomodulation, organophosphorus compounds, *Trichinella spiralis*.

Związki fosforoorganiczne są szeroko rozpowszechnionymi substancjami, występującymi w otoczeniu człowieka (Descates 1988, Brzeziński 1994). Są one szeroko stosowane nie tylko w rolnictwie (insektycydy, herbicydy), ale również w przemyśle, weterynarii i medycynie. Grupa związków fosforoorganicznych jest bardzo zróżnicowana pod względem toksyczności i obejmuje również jedne z najsilniejszych trucizn zaliczanych do tzw. Bojowych środków trujących (BST), np.: sarin, soman, tabun i VX. Mechanizm ich działania polega na unieczynnianiu cholinesteraz. Już bardzo małe dawki tych związków wywołują ciężkie zatrucia kliniczne z zespołem objawów muskaryno-i nikotyno-podobnych oraz z objawami ze strony ośrodkowego układu nerwowego (Kowalczyk 2002). W przeciwieństwie do dość obszernej wiedzy na temat neurotoksyicznego działania tych związków, znajomość ich właściwości immunotoksycznych jest nadal bardzo skąpa.

Ostatnio ukazało się kilka prac, dotyczących zaburzeń odpornościowych, wywo-



ływanych przez ester izopropylowy kwasu metylofluorofosfonowego (isopropylmethylphosphonofluoridate – IMPF; sarin) (Kassa i wsp. 2001, 2003; Kalra i wsp. 2002). Wyniki badań przedstawione w tych pracach wskazują, że IMPF działa zarówno na niektóre parametry odporności nieswoistej jak i swoistej.

Odpowiedź immunologiczna jest regulowana nie tylko przez antygeny, ale znajduje się także pod wpływem układu endokrynnego i nerwowego. Układy odpornościowy i neuroendokrynowy są elementami skomplikowanej sieci regulacyjnej, w której występuje dwukierunkowa komunikacja poprzez wspólne neuroprzekazniki, cytokiny i receptory (Lutz i wsp. 2001). W związku z tym substancje działające toksycznie na układ nerwowy mogą również modulować odpowiedź immunologiczną. Jednocześnie wiadomo, że funkcją układu immunologicznego jest obrona przeciw patogenom zewnętrznym (wirusy, bakterie, pasożyty) oraz przeciwdziałanie powstawaniu nowotworów.

W ostatnich latach ukazały się opracowania sugerujące m.in. występowanie zależności między wzrostem wrażliwości na infekcję a zatruciem IMPF i/lub innymi związkami fosforoorganicznymi u ludzi. Dotyczy to głównie tzw. Syndromu Wojny w Zatoce (Gulf War Syndrom) oraz skutków ataku terrorystycznego w Japonii (1994 r.) (IOM 1995, Kamimura i wsp. 1998, Nakajima i wsp. 1999, Conn i wsp. 2002, Henderson i wsp. 2002, Kalra i wsp. 2002). W dostępnej literaturze światowej nie znaleziono prac dotyczących badań rozwoju infekcji pasożytniczej u zwierząt doświadczalnych po ostrym zatruciu IMPF.

Wstępne badania przeprowadzone na myszach C57BL/6, C3H i mieszańcach B6C3F1 po ostrym zatruciu IMPF wykazują wzrost wrażliwości na rozwój infekcji *Trichinella spiralis*. Ogólnie stwierdzono, że szybkość eliminacji dojrzałych włośni z jelita myszy jest wolniejsza po uprzednim podaniu IMPF (Bany i wsp. 2002). Związek ten powodował jednocześnie zahamowanie aktywności acetylocholinesterazy, większe u myszy C57BL/6, niż u mieszańców B6C3F1. Stopień zahamowania aktywności tego enzymu jest jednocześnie wskaźnikiem biologicznego działania badanego związku fosforoorganicznego i może wiązać się z wrażliwością danego szczepu myszy. Wrażliwość ta zależy m. in. od enzymu paraoksonazy (PON1), neutralizującego związki fosforoorganiczne, którego aktywność uwarunkowana jest genetycznie (Akgur i wsp. 1999, Haley i wsp. 1999, Costa i wsp. 2003).

Następnie zaobserwowano zmiany w odpowiedzi humoralnej i komórkowej u myszy po ostrym zatruciu IMPF. Stwierdzono obniżenie wytwarzania przeciwciał anty-SRBC u myszy C57BL/6, ale nie u mieszańców B6C3F1. Wystąpiły zmiany w ekspresji markerów powierzchniowych limfocytów T, CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> w zależności od czasu intoksykacji. Obserwowano także zaburzenia aktywności proliferacyjnej limfocytów T u myszy po podaniu badanego związku (dane niepublikowane). Jednocześnie wiadomo, że komórki T odgrywają istotną rolę w eliminacji nicieni jelitowych (Garside i wsp. 2000).

Wydaje się, że większej „wrażliwości” myszy C57Bl/6 na IMPF w porównaniu



z mieszańcami B6C3F<sub>1</sub> (ogólnie większe zahamowanie aktywności acetylocholinoesterazy, obniżenie wytwarzania przeciwciał) towarzyszy wzrost nasilenia rozwoju włośnicy u tego szczepu. Na zależność między szybkością ekspulsji postaci dojrzałych *T. spiralis* z jelita a szczepem myszy i powiązaniem tych procesów ze zjawiskami neuroimmunologicznymi zwrócili uwagę m. in. Vallance i wsp. (1997) i Khan i wsp. (2001).

Nie wiadomo jednak jaki jest mechanizm oddziaływania IMPF powodujący zarówno zmiany aktywności proliferacyjnej limfocytów T jak i wytwarzania przeciwciał przez komórki B. Wydaje się, że zaangażowany jest tutaj szlak autonomicznego układu nerwowego łączący ośrodkowy układ nerwowy bezpośrednio z docelową tkanką w przewodzie pokarmowym – przez nerwy współczulne i przywspółczulne (Felten i Felten 1994). Być może, IMPF działa również na wydzielanie norepinefryny i ekspresję  $\beta_2$ -adrenergicznych receptorów na komórkach T CD4<sup>+</sup> i limfocytach B. Wykazano, że norepinefryna może także regulować funkcje odpornościowych komórek w kierunku odporności przeciwniekcyjnej. Rozważa się także, że receptory  $\beta_2$ -adrenergiczne wpływają na poziom cytokin i przeciwciał wytwarzanych przez te komórki zarówno *in vivo* jak i *in vitro* (Kohm i Sanders 2001). Inni autorzy sugerują, że supresja odpowiedzi immunologicznej *in vivo* przez inny związek fosforoorganiczny – paration, jest przynajmniej częściowo związana z bezpośrednim oddziaływaniem na układ odpornościowy (Pruett i wsp. 1992).

Analizując możliwe mechanizmy oddziaływania badanego związku na układ neuroimmunologiczny należy również zwrócić uwagę na tzw. oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczową (HPA). Komunikuje się ona z „obwodem” przez uwalnianie hormonów z przysadki, co prowadzi do produkcji glikokortykosteroidów w nadnerczach, które następnie hamują odpowiedź immunologiczną (Turnbull i Rivier 1999). W pracy Kalry i wsp. (2002) starano się wykazać, że subkliniczne dawki sarinu u szczurów hamują aktywność proliferacyjną w odpowiedzi na ConA niezależnie od osi HPA. Wykazano, że poziom kortykosteroidów w surowicy szczurów poddanych działaniu sarinu był znacząco niższy niż u zwierząt kontrolnych. Wskazuje to, że indukowana przez ten związek immunosupresja jest wynikiem aktywacji osi HPA. Wykazano również, że chlorizondamina, która blokuje transmisję autonomicznego układu nerwowego, znosi efekt działania sarinu prowadzący do zmian aktywności proliferacyjnej komórek T. Te wyniki sugerują, że w oddziaływaniu sarinu na odpowiedź limfocytów T pośredniczy autonomiczny układ nerwowy, niezależnie od osi HPA. W innych badaniach stwierdzono ponadto, że chemiczne przerwanie nerwu współczulnego wpływa na zależną od limfocytów T odpowiedź przeciwciał, produkcję IL-2, aktywność cytotoksyczną limfocytów T oraz na nadwrażliwość typu późnego (Madden i wsp. 1989, Kruszewska i wsp. 1998).

Rozpatrując mechanizmy oddziaływania badanego związku fosforoorganicznego na rozwój włośnicy należy także zwrócić uwagę na procesy neuroimmunologiczne modyfikowane przez samą infekcję pasożytniczą w układzie żywiciel-paso-



żyt. Tym bardziej, że zmiany w aktywacji jelitowej osi neuroimmunologicznej odgrywają główną rolę w kształtowaniu dynamiki integracji między pasożytem a żywicielem (Palmer and Greenwood-van Meerneld 2001).

Wywołany przez włośnia stan zapalny jelita wpływa znacząco na pobudzenie elektryczne i synaptyczne zachowania neuronów jelitowych podczas infekcji *T. spiralis* u świnek morskich. Wzmocnienie pobudzenia jest kluczowym elementem dla pewnej subpopulacji nerwów jelitowych, zaangażowanych w detekcję, opóźnienie i analizę bodźca sensorycznego w jelitowym układzie nerwowym (Palmer 1991, Palmer i wsp. 1998).

Wydaje się, że oddziaływanie włośni na funkcję nerwów cholinergicznym (muskarynowych i nikotynowych), adrenergicznych oraz nerwów typu NANC (*nonadrenergic, noncholinergic*) związane jest głównie ze zmianami w wydzielaniu kluczowych neuroprzekaźników jelitowych oraz może być niezależne lub zależne od limfocytów T. Ilość acetylocholin (ACh) uwalnianej z zakończeń nerwowych w jelicie czczym szczura zarażonego *T. spiralis* jest znacząco obniżona. Indukowane przez pasożyta zahamowanie uwalniania ACh jest niezależne od komórek T ponieważ zmniejszenie aktywności tego neuroprzekaźnika występuje także u zarażonych szczurów z defektem grasicy (Collins i wsp. 1989, 1992).

Występują także zaburzenia syntezy neuroprzekaźników adrenergicznych wywołanych infekcją włośnicową. Obserwowano osłabienie wydzielania norepinefryny z zakończeń nerwów podśluzówkowych szczurów zarażonych włośniami. Zmiany te nie pojawiają się u zwierząt z defektem grasicy, co sugeruje, że zaburzenia w funkcjonowaniu nerwów adrenergicznych zależne są od limfocytów T (Swain i wsp. 1991). Infekcja *T. spiralis* wywiera również istotny wpływ na neuroprzekaźniki peptydowe związane z funkcją nerwów NANC. Ilość substancji P jest znacząco zwiększona w jelitach myszy i szczurów zarażonych (Swain i wsp. 1992; Agro i Stanisław 1993). Substancja P służy nie tylko jako ważny jelitowy neuroprzekaźnik, ale także działa immunomodulująco, sprzyja zapaleniu, wzmacnia aktywność limfocytów i makrofagów (Ottaway 1996; Fiocchi 1997). Zaburzenia funkcji nerwów NANC są zależne od limfocytów T. Wskazują na to doświadczenia przeprowadzone na zwierzętach z defektem grasicy oraz badania związane z immunoneutralizacją przeciwciał anti-SP u zarażonych myszy *T. spiralis* (Swain i wsp. 1992, Agro i Stanisław 1993).

Otrzymane dane z doświadczeń na zwierzętach wskazują na możliwości zaistnienia podobnych zaburzeń neuroimmunologicznych u ludzi poddanych działaniu IMPF i/lub innych związków fosforoorganicznych, które mogą prowadzić do zmian w rozwoju infekcji pasożytniczej np. leishmaniozy.

Jak już wspomniano, po wojnie w Zatoce Perskiej pomiędzy sierpniem 1990 i czerwcem 1991 u żołnierzy armii USA pojawiły się objawy nazwane Syndromem Wojny w Zatoce. Manifestowały się one m.in. bólami stawów, osłabieniem, zmęczeniem, bólami głowy, utratą pamięci, a także wzrostem wrażliwości na infekcje



(IOM 1995, Conn i wsp. 2002). Etiologia tego syndromu jest obecnie nieznana. Przedstawiono w związku z tym hipotezę, że ekspozycja na sarin może powodować anomalie neuroimmunologiczne manifestujące się klinicznymi objawami charakterystycznymi dla tego syndromu (Kalra i wsp. 2002). Podobne kliniczne objawy zaobserwowano w Matsuboto w Japonii w następstwie ostrego zatrucia sarinem w czerwcu 1994 (Kamimura i wsp. 1998, Nakajima i wsp. 1999). Odnośnie infekcji, która zaistniała u żołnierzy przebywających w Zatoce Perskiej sugeruje się, że była ona głównie powodowana przez *Leishmania* spp. Ocenia się nawet, że ok. 5-6% weteranów wojny w Zatoce było zarażonych tymi pasożytami (IOM 1995).

Rozważa się także inne możliwości wyjaśnienia pojawienia się niektórych objawów w tym neurologicznych u weteranów wojny w Zatoce Perskiej. Sugeruje się, że związki fosforoorganiczne (insektycydy, repelenty) występujące w otoczeniu człowieka, a także bromek piridostygminy (stosowany profilaktycznie przy zatruciach sarinem) mogą przyczyniać się do ich występowania (Abou-Donia i wsp. 1996). Nasilenie tych objawów u ludzi, powodowane m.in. przez te związki występujące w środowisku, zależy od polimorfizmu genowego paraoksonazy/aryloesterazy (PON1) i butyrylocholinoesterazy warunkującego poziom i aktywność tych enzymów (Shih i wsp. 1998, Haley i wsp. 1999). Zwraca się także uwagę na zmiany niektórych parametrów immunologicznych występujących u weteranów wojny w Zatoce (Zhang i wsp. 1999). Wydaje się, że zmiany te mogą prowadzić do zaburzeń procesów odpornościowych.

Przedstawione niektóre aspekty oddziaływania IMPF na procesy neuroimmunologiczne, warunkujące odpowiedź na infekcje wywoływane przez pasożyty są niezmiernie skomplikowane i w dalszym ciągu słabo poznane. Związki fosforoorganiczne w połączeniu z innymi czynnikami np. stresem, wysoką temperaturą, szczepieniami, lekami itp. mogą prowadzić u ludzi i zwierząt do dysregulacji niektórych funkcji układu immunologicznego ważnych dla zachowania homeostazy ustroju. Następstwem tych zmian może być zwiększona podatność organizmu na infekcje i inne choroby związane z zaburzeniami procesów odpornościowych.

Praca finansowana przez KBN, projekt badawczy nr 0 T00C 001 23.

#### LITERATURA

- Abou-Donia M.B., Wilmarth K.R., Jensen K.F., Oehme F.W., Kurt T.L. 1996. Neurotoxicity resulting from coexposure to pyridostigmine bromide, deet, and permethrin: implications of Gulf War chemical exposures. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 48: 35-56.
- Agro A., Stanisław A.M. 1993. Inhibition of murine intestinal inflammation by anti-substance P antibody. *Regulatory of Immunology* 5: 120-126.
- Akgur S.A., Ozturk P., Sozmen E.Y., Delen Y., Tanyalcin T., Ege B. 1999. Paraoxonase and acetylcholinesterase activities in human exposed to organophosphorous compounds. *Journal of Toxicology and Environmental Health. A.* 24; 58: 469-474.
- Bany J., Zdanowska D., Golińska Z., Kowalczyk M. 2002. Wpływ estru izopropylowego kwasu me-



- tylo-fluorofosfonowego (IMPF) na przebieg włośnicy u myszy. Materiały z VIII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego. 8-11 września, Łódź 2002, abstrakt: 249.
- Brzeziński J. 1994. Toksykologia pestycydów. W: *Toksykologia* (Red. W. Seńczuk). PZWL, Warszawa: 428-481.
- Collins S.M., Blennerhassett P. A., Blennerhassett M.G., Vermillon D.L. 1989. Impaired acetylcholine release from the myenteric plexus of *Trichinella*-infected rats. *American Journal of Physiology* 257: G898-G903.
- Collins S.M., Blennerhassett P.A., Vermillon D.L., Davis K., Langer J., Ernst P.B. 1992. Impaired acetylcholine release in the inflamed rat intestine is T cell independent. *American Journal of Physiology* 263: G198-G201.
- Conn C.A., Dokladny K., Menache M.G., Barr E.B., Kozak W., Kozak A., Wachulec M., Rudolph K., Kluger M.J., Henderson R. F. 2002. Effects of sarin on temperature and activity of rats as a model for Gulf War Syndrome neuroregulatory functions. *Toxicology and Applied Pharmacology* 184: 77-81.
- Costa L.G., Cole T.B., Furlong C.E. 2003. Polymorphisms of paraoxonase (PONI) and their significance in clinical toxicology of organophosphates. *Journal Toxicology and Clinical Toxicology* 41: 37-45.
- Descates J. 1988. Immunotoxicology of drugs and chemicals, 2nded., Elsevier, Amsterdam.
- Felten S.Y., Felten D.L. 1994. Neural-immune interactions. *Progress Brain Research* 100: 157-162.
- Fiocchi C. 1997. Intestinal inflammation: A complex interplay of immune and non-immune cell interactions. *American Journal of Physiology* 273: G769-G775.
- Garside P., Kennedy M.W., Wakelin D., Lawrence C. 2000. Immunopathology of intestinal helminth infection. *Parasite Immunology* 22: 605-612.
- Haley R.W., Billecke S., La Du B.N. 1999. Association of low PONI Type Q (Type A) arylesterase activity with neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Toxicology and Applied Pharmacology* 157: 227-233.
- Henderson R.F., Barr E.B., Blackwell W.B., Clark C.R., Conn C.A., Kalra R., March T.K., Sopori M.L., Tesfaigzi Y., Mechane M.G., Mash D.C. 2002. Response of rats to low levels of sarin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 184: 67-76.
- IOM 1995. Health Consequences of Service during the Persian Gulf War: Initial Findings and Recommendations for Immediate Action. National Academy Press, Washington, DC.
- Kalra R., Singh S.P., Razani-Boroujerdi S., Langley R.J., Blackwell W.B., Henderson R.F., Saporì M.L. 2002. Subclinical doses of the nerve gas sarin impair T cell responses through the autonomic nervous system. *Toxicology and Applied Pharmacology* 184: 82-87.
- Kassa J., Koupilova M., Herink J., Vachek J. 2001. The long-term influence of low-level sarin exposure on behavioral and neurophysiological functions in rats. *Acta Medica* 44: 21-27.
- Kassa J., Krocowa Z., Sevelowa L., Sheshko V., Kasalova I., Neubauerova V. 2003. Low-level sarin-induced alteration of immune system reaction in inbred BALB/c mice. *Toxicology* 187: 195-203.
- Kamimura M., Katoh O., Kawata H., Kudo K., Yagishita Y., Niino H., Saitoh K., Saitoh A. 1998. Legionella pneumonia caused by aspiration of hot spring water after sarin exposure. *Nikon Kokyuki Gakkai Zasshi* 36: 278-282.
- Khan W.I., Vallance B.A., Blennerhassett P.A., Deng Y., Verdu E.F., Matthaei K.I., Collins S.M. 2001. Critical role for signal transducer and activator of transcription factor 6 in mediating intestinal muscle hypercontractility and worm expulsion in *Trichinella spiralis*-infected mice. *Infection and Immunity* 69: 838-844.
- Kohm A.P., Sanders V.M. 2001. Norepinephrine and  $\beta$ 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function *in vitro* and *in vivo*. *Pharmacological Reviews* 53: 487-525.
- Kowalczyk M. 2002. Toksykologiczne aspekty współczesnych zagrożeń. *Lekarz Wojskowy* 78: 34-39.
- Kruszewska B., Felton D.L., Stevens S.W., Moynihan J.A. 1998. Sympathectomy-induced immune changes are not abrogated by the glucocorticoid receptor blocker RU-486. *Brain Behavior Immu-*



- nity 12: 181-200.
- Lutz W., Tarkowski M., Dudek B. 2001. Psychoneuroimmunologia. Nowe spojrzenie na funkcjonowanie układu odpornościowego. *Medycyna Pracy* 52: 203-209.
- Madden K.S., Felton S.Y., Felton D.L., Sundaresan P.R., Livant S. 1989. Sympathetic neural modulation of the immune system. I. Depression of T cell immunity *in vitro* and *in vivo* following chemical sympathectomy. *Brain Behavior Immunity* 3: 72-89.
- Nakajima T., Ohta S., Fukushima Y., Yanagisawa N. 1999. Sequelae of sarin toxicity at one and three years after exposure in Matsumoto, Japan. *Journal of Epidemiology* 9: 337-343.
- Ottaway C.A. 1996. Role of neuroendocrine system in cytokine pathways in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology Therapy* 10 (Suppl. 2): 10-15.
- Palmer J.M. 1991. Immunomodulation of electrical and synaptic behavior of myenteric neurons of guinea pig small intestine during infection with *Trichinella spiralis*. In: *Effect of immune cells and inflammation on smooth muscle and enteric nerves* (Eds. W. Snape and S. M. Collins). CRC Press, Inc., Boca Raton, U.S.A.: 181-196.
- Palmer J.M., Greenwood-van Meerveld B. 2001. Integrative neuroimmunomodulation of gastrointestinal function during enteric parasitism. *Journal of Parasitology* 87: 483-504.
- Palmer J.M., Wong-Riley M., Sharkey K.A. 1998. Functional alterations in jejunal myenteric neurons during inflammation in innematode-infected guinea pigs. *American Journal of Physiology* 275: G922-G935.
- Pruett S.B., Han Y., Munson A.E., Fuchs B.A. 1992. Assessment of cholinergic influences on a primary humoral immune response. *Immunology* 77: 428-435.
- Shih D.M., Gu L., Xia Y., Navab M., Li W., Hama S., Castellani L.W., Furlong C.E., Costa L.G., Fogelman A.M., Lulis A.L. 1998. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394: 284-287.
- Swain M.G., Blennerhassett P.A., Collins S.M. 1991. Impaired sympathetic nerve function in the inflamed rat intestine. *Gastroenterology* 100: 675-682.
- Swain M.G., Agro A., Blennerhassett P., Stanis A., Collins S.M. 1992. Increased levels of substance P in the myenteric plexus of *Trichinella*-infected rats. *Gastroenterology* 102: 1913-1919.
- Turnbull A.V., Rivier C.L. 1999. Regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: Action and mechanism of action. *Physiological Reviews* 79: 1-71.
- Vallance B.A., Blennerhassett P.A., Collins S.M. 1997. Increased intestinal muscle contractility and worm expulsion in nematode-infected mice. *American Journal of Physiology* 272: G321-G327.
- Zhang Q., Zhou X., Denny T., Ottenweller J.F., Lange G., Lamanca J.J., Lavieta M.H., Pollet C., Gause W.C., Natelson B.H. 1999. Changes in immune parameters seen in Gulf War Veterans but not in civilians with chronic fatigue syndrome. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 6: 1:6-13.