

***Corresponding author:**

Hong-Gu Joo
Laboratory of Veterinary Pharmacology,
College of Veterinary Medicine, Jeju National
University, 102 Jejudaehak-ro, Jeju 63243,
Korea
Tel: +82-64-754-3379
Fax: +82-64-756-3354
E-mail: joo@jejunu.ac.kr

ORCID:
<https://orcid.org/0000-0002-1505-8761>

Conflict of interest:
The authors declare no conflict of interest.

Received: June 7, 2021
Accepted: July 22, 2021



© 2021 The Korean Society of Veterinary Science.
This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

지질다당류로 활성화된 마우스 골수세포에서 구충제 Fenbendazole의 억제 효과

박서로¹, 주홍구^{1,2*}

¹제주대학교 수의과대학 수의약리학실
²제주대학교 수의과학연구소

Inhibitory effects of fenbendazole, an anthelmintics, on lipopolysaccharide-activated mouse bone marrow cells

Seo-Ro Park¹, Hong-Gu Joo^{1,2*}

¹Laboratory of Veterinary Pharmacology, College of Veterinary Medicine, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

²Veterinary Medical Research Institute, Jeju National University, Jeju 63243, Korea

Fenbendazole (FBZ) is a commonly used anthelmintics in veterinary medicine that has recently been found to have anticancer effects in humans. On the other hand, few studies have examined the anti-inflammatory effects of FBZ, and its mechanism is unknown. In this study, mouse bone marrow cells (BMs) were treated with lipopolysaccharide (LPS), a representative inflammation-inducing substance, to generate a situation similar to osteomyelitis *in vitro*. The effect of FBZ on inflammatory BMs was examined by measuring the metabolic activity, surface marker expression, cell nuclear morphology, and mitochondrial membrane potential (MMP) of BMs. FBZ decreased the metabolic activity and MMP of LPS-treated BMs. Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide staining and Hoechst 33342 staining showed that FBZ reduced the number of viable cells and induced the cell death of inflammatory BMs. In addition, FBZ reduced the proportion of granulocytes more than B lymphocytes in LPS-treated BMs. Overall, FBZ induces cell death by destabilizing the MMP of LPS-induced inflammatory BMs. In addition to anthelmintic and anticancer agent, FBZ can play a role as an anti-inflammatory agent.

Keywords: fenbendazole; bone marrow cells; inflammation; lipopolysaccharides; osteomyelitis

서론

Fenbendazole (FBZ)은 수의에서 유용하게 쓰이는 구충제 중 하나이다[1]. FBZ은 실험용 설치류, 반려동물, 산업동물에서 회충, 십이지장충, 편충 등 내부 기생충 감염의 예방 및 치료제로 허가 받아 사용되고 있다[2,3]. 구충 작용기전으로는 기생충의 세포 분열 과정 중 미세소관의 형성을 방해하여 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[4,5].

최근 FBZ이 항암효과가 있다는 보고[6]와 일부 임상사례를 시작으로 커뮤니티, 인터넷을 통해 FBZ을 임의로 복용하는 사례가 증가하였다. FBZ은 인간 암세포의 미세소관에 친화성을 나타내고 micromolar 농도에서 항암효과를 보였으며, 새로운 항암기전으로 GLUT transporter와 hexokinase의 발현 억제로 glucose uptake를 효과적으로 억제

하는 사실이 알려졌다[6].

골수는 혈액세포와 면역세포가 유래하는 기관으로 면역체계에서 매우 중요한 역할을 한다. 우리는 FBZ이 항암제로서의 가능성이 대두되고 있는 가운데 골수세포에 대한 항염증 효과 또한 있는지 의문이 들었다. 하지만 앞선 연구에서는 조류에서 선충 감염으로 인해 발생한 골수염에 FBZ을 투여하여 치료한 사례만이 존재하였다[7]. 이와 같이, FBZ의 골수염에 대한 효과에 관한 연구는 많이 부족하다. 따라서 본 연구에서는 *in vitro*에서 골수염과 유사한 상황을 만들기 위해 대표적인 염증 유발물질인 lipopolysaccharide (LPS)를 골수세포에 처리하여 FBZ의 항염증 효과 유무와 작용기전을 알아보았다. 이를 위해 FBZ을 농도별로 처리한 후 골수세포의 대사활성도, 표면 마커 발현, 세포의 핵 형태, 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential) 등을 측정하여 골수세포에서 FBZ의 항염증 효과에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

실험동물과 시약

실험동물은 OrientBio (Korea)에서 구입하여 제주대학교 실험동물센터에서 유지하였다. 동물실험에서 8-12주령 사이의 C57BL/6 마우스가 사용되었고, 제주대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 시행되었다(승인번호, 2018-0011). FBZ과 LPS (*Escherichia coli* O55)는 Sigma사(USA)에서 구입하였으며, FBZ은 dimethyl sulfide, LPS는 인산완충액에 녹인 후 사용하였다.

골수세포의 분리와 물질 처리

본 실험실에서 확립된 방법으로 골수세포를 분리하였다[8]. CO₂ gas로 마우스를 안락사 시킨 뒤 대퇴골과 경골을 적출하여 골수조직을 채취하였다. 이 조직을 ammonium chloride-potassium lysis buffer로 처리하여 적혈구를 제거한 후 70 µm cell strainer에 걸러 single cell을 획득하였다. 이를 계수하여 96- 또는 6-well culture plates에 배양하였다. FBZ과 LPS를 처리한 후 37°C, 5% CO₂의 조건에서 배양하였고 분석에 이용하였다.

골수세포의 대사활성도 측정

골수세포를 1 × 10⁶ cells/mL의 농도로 96-well culture plate에 넣은 후 FBZ과 LPS (1 µg/mL)를 농도별로 처리한 후 배양하였다. 배양이 끝난 후 골수세포에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT, Sigma) 용액을 0.5 mg/mL 농도로 넣고 4시간 동안 처리하였다[9]. 살아있는 세포에 의해 생긴 crystal violet을 녹이기 위해 10% sodium dodecyl sulfate 용액을 well당 100 µL씩 넣어 2시간 동안 반응시켰다. 그 후 microplate reader (Molecular Devices사, USA)를 이용하여 흡광도(570 nm)를 측정하였다.

유세포 분석

마우스 골수세포를 6-well culture plate에 1 × 10⁶ cells/mL의 농도로 배양하고 FBZ과 LPS를 농도별로 처리하였다. 3일간 배양 후 미토콘드리아 막전위를 측정하기 위해 rhodamine 123 용액을 10 µg/mL의 농도로 암실조건에서 30분간 염색하였다. 골수세포의 세포사(cell death) 측정을 위해 annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)와 propidium iodide (PI) 용액으로 염색하였다[10]. 또한, 파립구와 B림프구의 비율을 측정하기 위해 allophycocyanin-labeled anti-Gr-1 항체와 biotin-labeled anti-B220 항체, FITC-avidin을 사용하였다. 유세포 분석은 CytoFLEX와 CytExpert software (Beckman Coulter, USA)를 이용해 분석하였다.

Hoechst 33342 염색을 이용한 골수세포 핵 관찰

골수세포의 세포사를 확인하기 위해 핵 모양을 관찰하였다. 세포의 핵을 염색하기 위해 Hoechst 33342 용액을 2.5 µg/mL 농도로 처리하여 37°C에서 10분간 염색하였다[11]. 염색된 세포는 형광현미경(ZOE Fluorescent Cell Imager; BIO-RAD, USA)을 이용해 관찰하였고 사진 촬영을 했다.

통계분석

각 실험은 2-3회 반복하여 시행되었다. Fig. 1은 평균 ± 표준편차로 나타냈다. One way analysis of variance 분석 후에 Turkey-Kramer multiple comparison test (GraphPad Prism; GraphPad Software, USA)로 유의성을 확인하였다. 통계처리 후 *p*-value

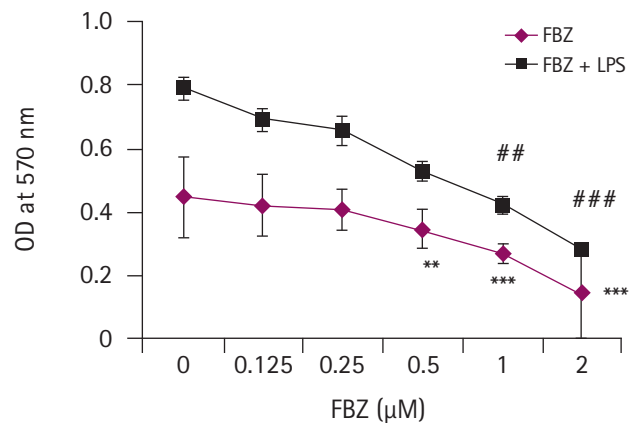


Fig. 1. Fenbendazole (FBZ) decreases the metabolic activity of lipopolysaccharide (LPS)-treated and untreated bone marrow cells (BMs). BMs (1 × 10⁶ cells/mL) were incubated in 96-well culture plates and treated with FBZ in the absence or presence of 1 µg/mL LPS. The concentration range of FBZ was 0 to 2 µM and treated by 2-fold dilution stepwise. MTT assay was performed at 3 days after the drug treatment. The data are presented as the mean ± standard deviation. ***, ### indicate *p* < 0.001 and **, ## indicate *p* < 0.01, compared to the BMs treated without LPS or LPS alone (FBZ 0 µM), respectively. OD, optical density.

가 0.05 미만인 경우 유의한 것으로 판단하였다.

결과

FBZ이 골수세포의 대사활성도에 미치는 영향

FBZ 단독과 FBZ + LPS (1 µg/mL) 처리군에서 골수세포의 대사활성도를 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였다(Fig. 1). MTT assay 결과 FBZ 단독에 비해 FBZ + LPS 처리군은 모든 농도(0-1 µM)에서 보다 높은 대사활성도를 나타내었으며, FBZ의 농도가 증가함에 따라 대사활성도가 감소됨을 확인하였다. 특히, FBZ 단독의 0.5-2 µM 농도에서 유의하게 대사활성도가 감소하였고, FBZ + LPS 처리군에서는 1-2 µM 농도에서 유의한 감소를 보였다. 이러한 결과는 FBZ이 LPS와 같은 염증 물질에 의해 자극된 골수세포의 활

동을 억제할 수 있음을 나타낸다.

FBZ에 의한 골수세포의 미토콘드리아 막전위 변화

FBZ이 골수세포에 미치는 영향을 조사하기 위해 FBZ과 LPS를 처리한 골수세포의 미토콘드리아 막전위를 측정하였다. 이를 위해 rhodamine 123 용액을 사용하여 골수세포를 염색한 후 유세포 분석을 하였다(Fig. 2). LPS는 골수세포의 미토콘드리아 막전위를 높이는 반면, FBZ은 LPS로 증가된 미토콘드리아 막전위를 크게 감소시켰다. 특히, FBZ 0.25 µM 농도와 FBZ 1 µM 농도의 fluorescence intensity 평균값의 차이는 5,034로, FBZ 0 µM 농도와 FBZ 0.25 µM 농도의 평균값의 차이인 1,083보다 크다. 이 결과는 0.25-1 µM 사이 농도의 FBZ은 LPS에 의해 자극된 골수세포의 미토콘드리아 이중막의 구조를 더욱 불안정하게 할 수 있음을 나타낸다.

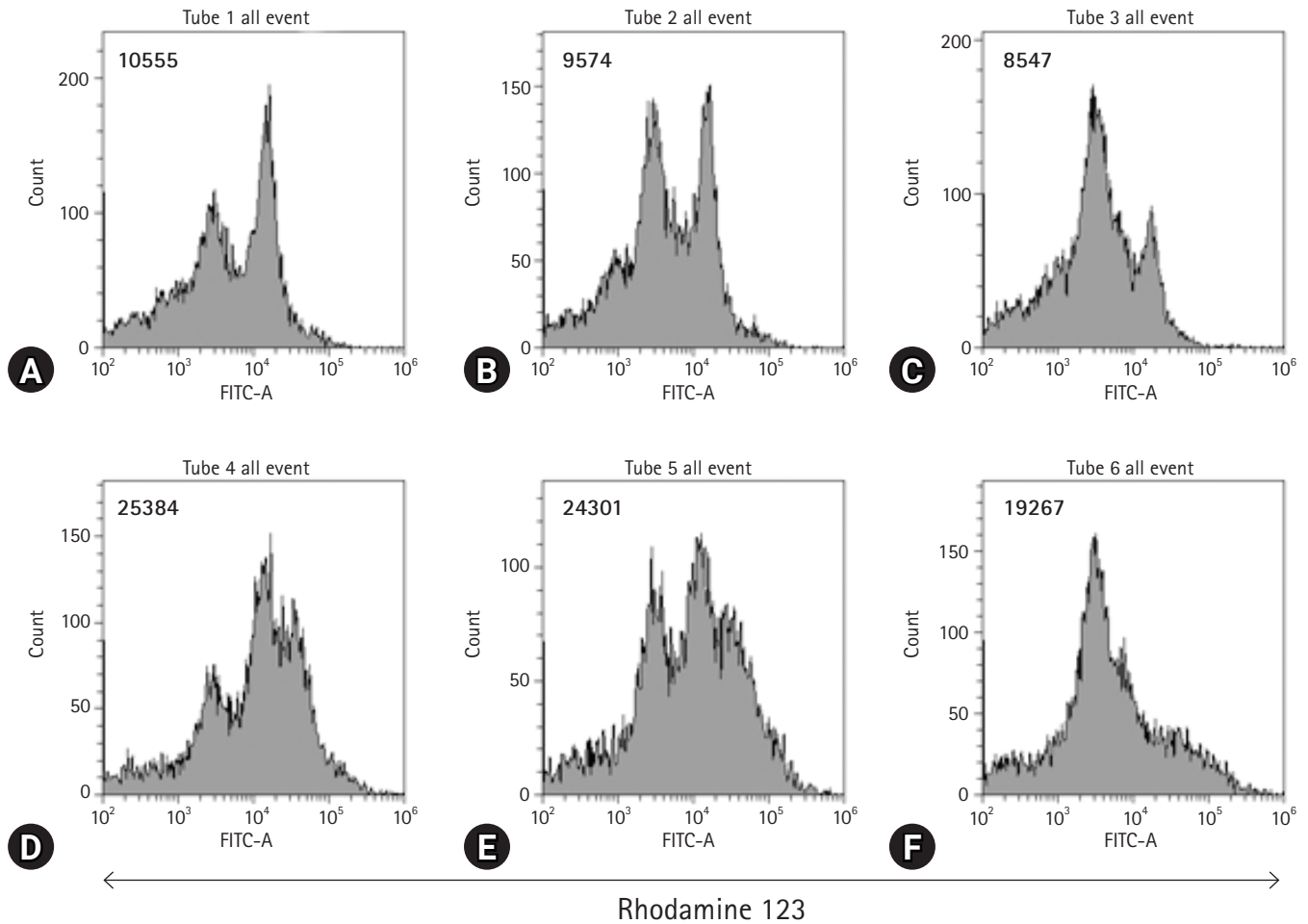


Fig. 2. Fenbendazole (FBZ) reduces the mitochondrial membrane potential of both lipopolysaccharide (LPS)-treated and untreated bone marrow cells (BMs). Mouse BMs in 6-well culture plates were treated with or without 1 µg/mL LPS for 2 days, followed by an FBZ treatment. The treated BMs were stained with Rhodamine 123 solution. The number in histograms indicates the mean fluorescence intensities. (A) FBZ 0 µM, (B) FBZ 0.25 µM, (C) FBZ 1 µM, (D) FBZ 0 µM + LPS 1 µg/mL, (E) FBZ 0.25 µM + LPS 1 µg/mL, and (F) FBZ 1 µM + LPS 1 µg/mL.

FBZ에 의한 골수세포의 세포사 증가

유세포 분석은 골수세포의 세포사를 확인하기 위해 annexin V-FITC/PI 염색 후 수행되었다(Fig. 3). FBZ 단독 또는 FBZ + LPS 처리된 세포의 viable cells (annexin V-/PI-)의 비율이 유사하게 감소하였다. 이 감소는 특히 Fig. 2와 같이 FBZ 1 μ M 농도에서 현저하게 감소함을 보였다. Viable cells는 FBZ 단독일 때 FBZ 0-0.25 μ M은 2.3%, FBZ 0.25-1 μ M은 13.8% 감소하였다. FBZ + LPS 처리군에서도 FBZ 0-0.25 μ M은 3.4%, FBZ 0.25-1 μ M은 9.3% 감소하였다. 죽은 세포 중 necrotic cells (annexin V-/PI+)의 수는 FBZ 0-1 μ M 농도에서 5%에서 6%로 증가한 FBZ 단독에 비해 FBZ + LPS 처리군에서 더욱 현저한 변화를 보였다. 그러나 early apoptosis cells (annexin V+/PI-)에서는 FBZ 단독은 6%에서 12%로 증가한 반면, FBZ + LPS 처리군에서는 10%로 일정하였다.

이러한 결과는 FBZ이 LPS 처리 여부와 관계없이 골수세포에서 세포사를 유도할 수 있음을 보여준다.

골수세포 내의 과립구와 B림프구의 구성에 FBZ이 미치는 영향

마우스 골수세포의 주요 구성 세포 중에는 과립구와 B림프구가 포함되어 있다. 두 가지 세포 구성에 FBZ이 미치는 영향을 조사하기 위해, FBZ과 LPS로 처리된 골수세포를 Gr-1 또는 B220 특이적인 항체로 염색한 후 유세포 분석을 실시하였다(Fig. 4). Dot plot의 Gr-1+ 구역은 호중구를 포함한 과립구이다. FBZ 0 μ M 농도에서 FBZ 단독은 27%, FBZ + LPS 처리군은 25%인 것으로 보아 LPS는 과립구의 비율을 크게 증가시키지 않았다. 반면, FBZ 0-1 μ M 사이의 변화를 보면 FBZ 단독에서는 27%에서 15%로 감소하였고 FBZ + LPS 처리군에서는 25%에서 19%로 감소하였다. 골수세포에 LPS

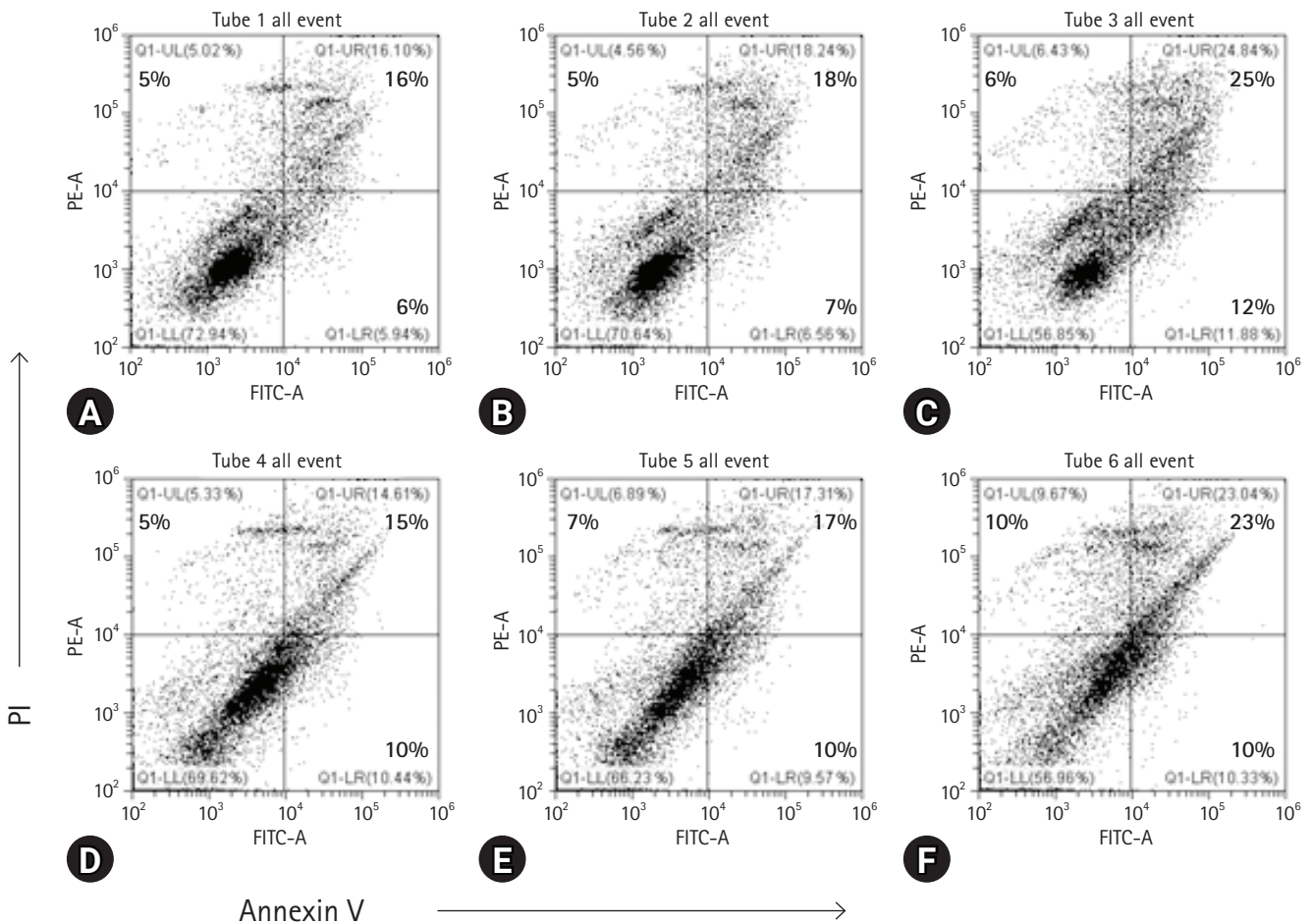


Fig. 3. Fenbendazole (FBZ) induces the apoptosis and necrosis of lipopolysaccharide (LPS)-treated and untreated bone marrow cells (BMs). The cells were cultured in 6-well culture plates and treated with FBZ (0, 0.25, 1 μ M) and LPS (1 μ g/mL). Annexin V-FITC/PI staining was performed after 2 days of treatment. The cells in the quadrants indicate necrosis (upper left, UL), late apoptosis (upper right, UR), viable (lower left, LL), and early apoptosis (lower right, LR) cells, respectively. The number in quadrants indicates the percentage of cells. (A) FBZ 0 μ M, (B) FBZ 0.25 μ M, (C) FBZ 1 μ M, (D) FBZ 0 μ M + LPS 1 μ g/mL, (E) FBZ 0.25 μ M + LPS 1 μ g/mL, and (F) FBZ 1 μ M + LPS 1 μ g/mL. PI, propidium iodide.

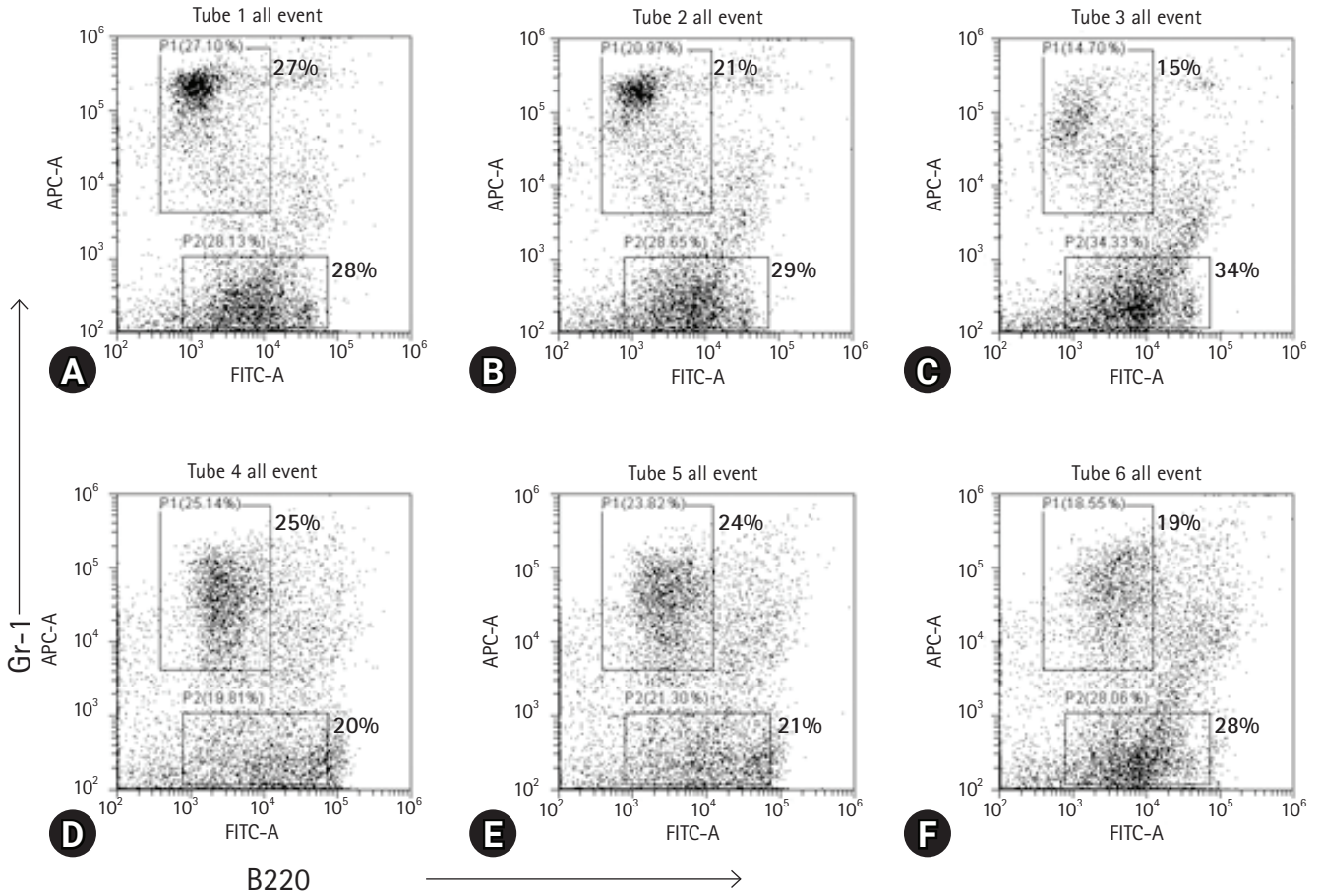


Fig. 4. Fenbendazole (FBZ) significantly decreases granulocytes than B cells in bone marrow cells (BMs). BMs (1×10^6 cells/mL) were seeded in 6-well culture plates and treated with FBZ and lipopolysaccharide (LPS). The cells were stained with anti-B220 or Gr-1 specific antibody. The cells were analyzed using flow cytometry. The upper squares in dot plots indicate the population of Gr-1 positive cells, granulocytes. The lower squares in dot plots indicate the population of B220 positive cells, B cells. Irrespective of the presence of LPS, the proportion of granulocytes decreased, but that of B cells increase. (A) FBZ 0 μ M, (B) FBZ 0.25 μ M, (C) FBZ 1 μ M, (D) FBZ 0 μ M + LPS 1 μ g/mL, (E) FBZ 0.25 μ M + LPS 1 μ g/mL, and (F) FBZ 1 μ M + LPS 1 μ g/mL.

처리와 관계없이 과립구의 비율은 현저하게 감소시키는 사실을 알 수 있다. Dot plot의 B220+ 구역은 B림프구이다. B림프구의 비율은 LPS에 의해 증가하지 않았고, 28%에서 20%로 오히려 감소한 모습을 보였다. 반면, LPS 유무와 관계없이 FBZ의 농도가 증가함에 따라 B림프구의 비율은 증가하였다.

FBZ에 의한 골수세포의 핵 형태 변화

골수세포를 Hoechst 33342 용액으로 염색한 후, 형광현미경을 사용하여 FBZ에 의한 골수세포의 핵 형태 변화를 관찰하였다 (Fig. 5). FBZ 단독 처리군에서는 1 μ M 농도에서 눈에 띄게 분절된 핵을 가진 세포의 수가 증가하였다. LPS 처리로 골수세포의 수가 현저하게 증가되었고 FBZ의 1 μ M 농도에서 분절된 핵을 가진 세포의 수가 증가하였다. 핵이 분절된 세포가 증가하는 것은 세포사의 증가를 의미하므로 FBZ 1 μ M은 LPS 유무와 관계없이 골수세포의 세포

사를 증가시키는 사실을 확인했다.

고찰

FBZ은 수의에서 광범위하게 사용되는 항기생충제 중 하나이며 [1-3], 최근 중앙세포를 이용한 연구에서 항암효과를 갖는다는 사실이 밝혀졌다[6]. 하지만 FBZ의 항염증 효과에 대한 연구는 매우 미흡하며 그 작용기전도 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 FBZ의 항염증 효과를 알아보기 위해 골수세포에 대표적인 염증성 유도물질 중 하나인 LPS를 FBZ과 함께 복합 처리한 후 분석하였다.

FBZ이 세포활성도와 미토콘드리아 막전위를 감소시켜 골수세포의 활성을 억제하였다. 또한, annexin V-FITC/PI 염색과 Hoechst 33342 염색을 통해 FBZ이 염증성 골수세포의 세포사를 유도하는 사실을 확인하였다. 이러한 결과는 LPS 처리로 만들어진 염증성 골

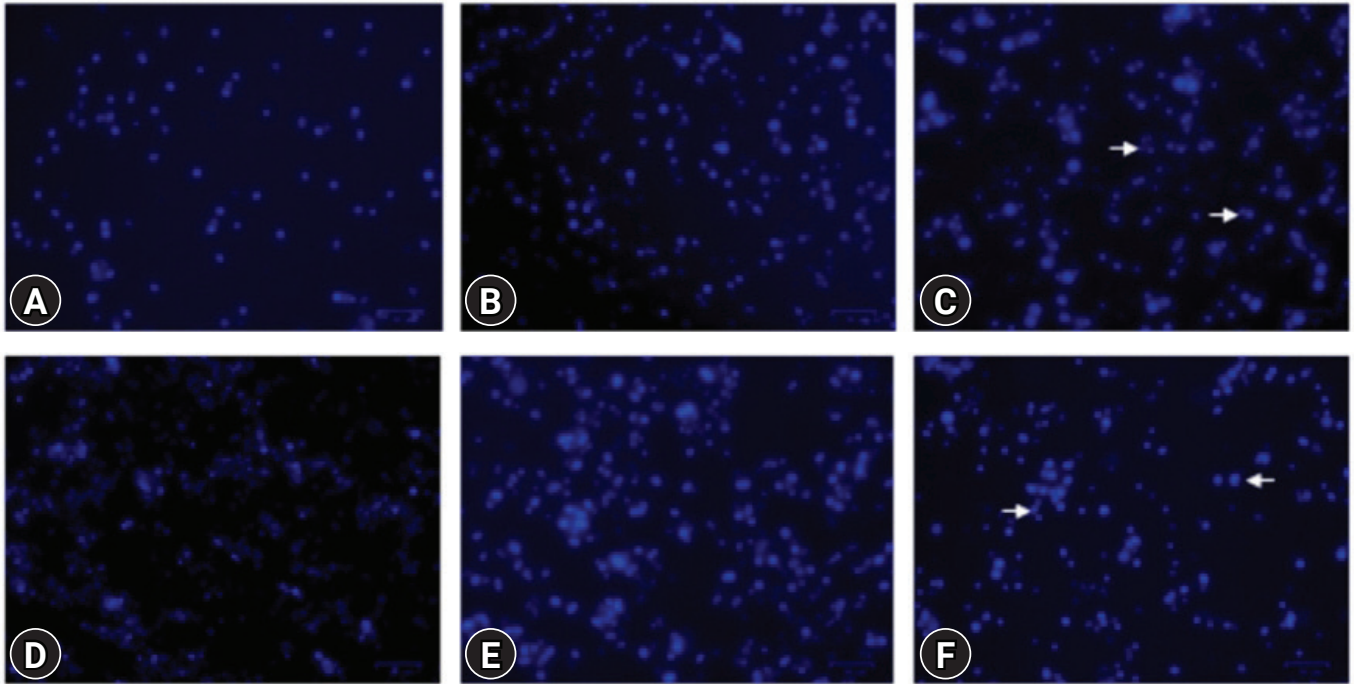


Fig. 5. Fenbendazole (FBZ) increased the number of bone marrow cells (BMs) with fragmented nuclei. The cells were set up and treated with FBZ and lipopolysaccharide (LPS), as in Fig. 2. After 2 days, Hoechst 33342 staining was performed. The BMs treated with FBZ 1 μM contain many cells with fragmented nuclei (arrows). (A) FBZ 0 μM, (B) FBZ 0.25 μM, (C) FBZ 1 μM, (D) FBZ 0 μM + LPS 1 μg/mL, (E) FBZ 0.25 μM + LPS 1 μg/mL, and (F) FBZ 1 μM + LPS 1 μg/mL.

수세포에서 FBZ이 세포 수와 미토콘드리아 기능을 모두 감소시킨다는 것을 보여준다. 과립구와 B림프구의 구성 비율 변화를 분석한 결과 FBZ은 LPS가 처리된 골수세포에서 B림프구보다 과립구의 비율을 더 감소시켰다.

FBZ이 과립구의 발현을 선택적으로 억제하는 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만, 이를 설명할 수 있는 선행연구들이 있다. 천식 동물모델에서 FBZ이 알레르기성 기도염증과 Th2 사이토카인의 생산을 감소시켰다[12]. FBZ은 기생충 감염증 치료에 다양하게 이용된다[13]. 일반적으로 기생충 감염 시 호산구를 포함한 과립구가 증가되고[14], FBZ이 기생충 치료에 이용되므로, FBZ이 과립구의 숫자 또는 기능에 영향을 미칠 수 있음을 유추할 수 있다. 또한, squirrel monkey를 이용한 앞선 연구에서 총 백혈구, 호중구, 단핵구 및 호산구 수 비교는 FBZ을 처리하지 않은 대조군에 비해 FBZ을 처리한 군에서 현저히 감소한 모습을 보였다[15]. 이를 종합하면 FBZ은 골수세포 중에서도 과립구를 특히 감소시킨다고 생각된다. 반면, FBZ의 농도가 증가함에 따라 전체 생존 세포 수와 과립구는 줄어드는데, 림프구의 절대값은 크게 변하지 않아 상대적인 비율로 림프구가 증가한다고 추측할 수 있다. 다른 연구에서도 절대 림프구 수는 FBZ 치료에 영향을 거의 받지 않았다[15]. 하지만 FBZ은 마우스의 면역체계에 상당한 영향을 미치는 것으로 보아[16], B림프구의 기능이 감소될 가능성은 있다.

다른 연구에서는 설치류에서 FBZ에 의한 골수 억제가 발생하지

않음을 보고하였다[17]. 하지만 본 연구에서는 골수세포에 대한 FBZ의 직접적인 효과를 측정하여 실험조건이 다르다. 또한 LPS에 의해 과도한 염증 반응이 발생한 골수세포를 이용하여 FBZ의 항염증 효과에 대한 연구를 수행했으며, FBZ을 항염증제로 사용할 수 있는 가능성을 확인했다.

이러한 결과를 종합하면, LPS 처리로 인해 염증성 상태가 된 골수세포에서 FBZ은 미토콘드리아 막전위를 불안정하게 만들어 세포사를 유도시켜 항염증 효과를 일으키는 것으로 추정된다. 향후 미토콘드리아와 FBZ의 관련성, 다른 항염증제와의 상승 효과, 다양한 염증이 유도된 동물질환 모델에서의 약효 실험이 추가적으로 필요하다.

ORCID

Seo-Ro Park, <https://orcid.org/0000-0002-6012-4668>

Hong-Gu Joo, <https://orcid.org/0000-0002-1505-8761>

References

1. Campbell WC. Benzimidazoles: veterinary uses. *Parasitol Today* 1990;6:130-133.
2. Pritchett KR, Johnston NA. A review of treatments for the

- eradication of pinworm infections from laboratory rodent colonies. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2002;41:36–46.
3. Petersen MB, Friis C. Pharmacokinetics of fenbendazole following intravenous and oral administration to pigs. *Am J Vet Res* 2000;61:573–576.
 4. Dawson PJ, Gutteridge WE, Gull K. A comparison of the interaction of anthelmintic benzimidazoles with tubulin isolated from mammalian tissue and the parasitic nematode *Ascaridia galli*. *Biochem Pharmacol* 1984;33:1069–1074.
 5. Friedman PA, Platzer EG. Interaction of anthelmintic benzimidazoles and benzimidazole derivatives with bovine brain tubulin. *Biochim Biophys Acta* 1978;544:605–614.
 6. Dogra N, Kumar A, Mukhopadhyay T. Fenbendazole acts as a moderate microtubule destabilizing agent and causes cancer cell death by modulating multiple cellular pathways. *Sci Rep* 2018;8:11926.
 7. Hawkins MG, Couto S, Tell LA, Joseph V, Lowenstine LJ. Atypical parasitic migration and necrotizing sacral myelitis due to *Serratospiculoides amaculata* in a prairie falcon (*Falco mexicanus*). *Avian Dis* 2001;45:276–283.
 8. Kim HJ, Kim MH, Byon YY, Park JW, Jee Y, Joo HG. Radioprotective effects of an acidic polysaccharide of *Panax ginseng* on bone marrow cells. *J Vet Sci* 2007;8:39–44.
 9. Kim SY, Joo HG. Evaluation of adjuvant effects of fucoidan for improving vaccine efficacy. *J Vet Sci* 2015;16:145–150.
 10. Moon SY, Joo HG. Anti-inflammatory effects of 4,4'-diaminodiphenyl sulfone (dapson) in lipopolysaccharide-treated spleen cells: selective inhibition of inflammation-related cytokines. *Korean J Vet Res* 2015;55:199–204.
 11. Jang JY, Moon SY, Joo HG. Differential effects of fucoidans with low and high molecular weight on the viability and function of spleen cells. *Food Chem Toxicol* 2014;68:234–238.
 12. Cai Y, Zhou J, Webb DC. Treatment of mice with fenbendazole attenuates allergic airways inflammation and Th2 cytokine production in a model of asthma. *Immunol Cell Biol* 2009;87:623–629.
 13. Prichard RK, Ranjan S. Anthelmintics. *Vet Parasitol* 1993;46:113–120.
 14. Rajamanickam A, Munisankar S, Bhootra Y, Dolla CK, Nutman TB, Babu S. Elevated systemic levels of eosinophil, neutrophil, and mast cell granular proteins in *Strongyloides stercoralis* infection that diminish following treatment. *Front Immunol* 2018;9:207.
 15. Nehete PN, Wilkerson G, Nehete BP, Chitta S, Ruiz JC, Scholtzova H, Williams LE, Abee CR, Vanchiere JA. Cellular immune responses in peripheral blood lymphocytes of *Giardia* infected squirrel monkey (*Saimiri boliviensis boliviensis*) treated with Fenbendazole. *PLoS One* 2018;13:e0198497.
 16. Landin AM, Frasca D, Zaias J, Van der Put E, Riley RL, Altman NH, Blomberg BB. Effects of fenbendazole on the murine humoral immune system. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2009;48:251–257.
 17. Villar D, Cray C, Zaias J, Altman NH. Biologic effects of fenbendazole in rats and mice: a review. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 2007;46:8–15.