



T-2 toxin을 투여한 닭에서 Comet assay 방법을 이용한 DNA 손상 평가와 독성

하대식¹ · 허정호² · 이국천² · 조명희² · 김국현² · 김충희³ · 류재두⁴ · 이승환 · 김근섭 · 김의경 · 김중수
경상대학교 수의과 대학 (동물의학 연구소), ¹경남보건 환경연구원, ²경남 축산 진흥연구소 남부지소,
³진주산업대학교 동물생명과학과, ⁴국립동물 검역원 부산지원

Assessment of DNA Damage using an Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) Comet Assay and Toxic Effects in Chickens by T-2 Toxin Treatment

Dae Sik Hah¹, Jung Ho Heo², Kuk Cheon Lee², Myung Heui Cho², Kuk Hun Kim², Chung Hui Kim³,
Jae Du Lue⁴, Seung Hwan Lee, Gon Sup Kim, Eui Gyung Kim and Jong Shu Kim

College of Veterinary Medicine and Institute of Animal Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701

¹Gyeongnam provincial Government Institute of Health Environment, Changwon 541-703

²Gyeongnam Livestock Promotion Institute South-branch, Tongyoung 650-817

³Department of Animal Science and Biotechnology, Jinju National University, Jinju 660-758

⁴National Veterinary Research and Quarantine service Busan Regional Office, Busan 602-030, Korea

Received February 24, 2006; Accepted May 15, 2006

ABSTRACT. This study was designed to evaluate the possible DNA damaging effects of T-2 toxin using an alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) comet assay and also to investigate toxic effects in chickens. A total of 20 chickens were used in these experiments. Graded concentrations of dietary T-2 toxin (0, 4, 8, and 16 $\mu\text{g/g}$ of diet) were given to groups of 5 broiler chickens. In comet assay, The DNA damage was analysed by the tail extent moment (TEM) and tail length (TL), which were used as markers of DNA strand breaks in SCGE. A significant dose-dependent increase in the extent of DNA migration as well as in the percentage of cells with tails was observed after treatment with T-2 toxin ($P < 0.05$). Treatment with the low T-2 toxin (4 μg of diet) induced a relatively low level of DNA damage in comparison with the high T-2 toxin (16 μg of diet) group. The growth rate was significantly reduced by concentrations of 8, and 16 μg of diet ($P < 0.05$). The feed conversion ratio were significantly affected by any concentrations ($P < 0.05$). The relative weight of the spleen, and lung was decreased by the growth inhibitory concentrations. The bursa of Fabricius, thymus, and kidney were decreased in relative weight by concentrations of 16 μg of diet. The relative weight of the liver and heart were unaffected. The hemoglobin (Hb), hematocrit (HCT), and mean corpuscular hemoglobin (MCH) were decreased at concentration of 16 μg of diet. As compared with control chickens, there was no marked change in serum components except uric acid in T-2 treated chickens. All lymphoid tissues retained atrophic and lymphoid cell depletion throughout the three weeks trial.

Keywords: Alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) comet assay, T-2 toxin, DNA damage, Toxicity.

서 론

Comet assay는 1980년대 말에 개발되어 1990년대 초반에 다양한 응용과학 분야에 이용되어지기 시작하였으며, 1990년대 후반부터는 의학의 다양한 분야 (prenatal diagnosis, DNA repair deficiency syndrome, cancer susceptibility, cancer therapy, diabetes mellitus, rheumatoid arthritis 등)에도 응용, 이용되고 있으며, 최근에는 그 응용범위가 넓어져 생물학이나 독성학 분야 (genotoxicity, aging, exercise, nutrition, cell cycle analysis, free radical biology, nutritional toxicology, phytoprotectants 등)에서도 폭 넓게 이용되기 시작하였다. 이러한 연구에 이용되어진 단일세포 겔 전기영동법 (single cell gel electrophoresis), 일명 comet assay는 개개의 세포수준에서 DNA 단일가닥 손상(single strand break)과 alkali-labile site, 그리고 DNA 손상부위의 회복 중 불완전한 DNA excision 부위까지를 검출할 수 있도록 개발된 것이다(Koppen and Angelis, 1998; Mohankumar *et al.*, 2002; Nigro *et al.*, 2002; Ündeğer and Başaram, 2002). 이 comet assay는 특정 조직이나 기관뿐만 아니라 핵을 가지고 있는 세포라면 어느 조직이나 부위도 이용되어질 수 있는 장점이 있다. 이 방법은 수 천개의 세포만 있으면 분석이 가능하므로, 실험에 사용되어지는 시료의 양도 수 mg이면 충분하다. 분석방법이 상당히 간단하여 분석에 걸리는 시간이 적게 들며, 일단 기자재가 완비되면 실험에 필요한 소모품이 많지 않으므로 분석당가 또한 싸다(Singh *et al.*, 1988, McKelvey-Martin *et al.*, 1993). 또 다른 장점으로는 10^{10} dalton 당 1개의 DNA 단일가닥 손상을 측정할 수 있을 만큼 뛰어난 감도를 들 수 있다(Gedik *et al.*, 1992). 이는 일반적으로 많은 물질들이 DNA 이중가닥보다 DNA 단일가닥을 5~2000배 정도 더 유발하기 때문에 DNA 이중가닥 손상을 측정하는 기존의 방법(Shugart, 1988)에 비해 더욱 유용하다. 이러한 방법을 이용하여 Atroshi *et al.*(1997)은 생쥐에서 T-2 toxin 유도 DNA 손상을 연구하였고, Kamp *et al.*(2005)은 ochratoxin A를 쥐에 투여하여 쥐의 간장과 신장에서 DNA 손상 정도를 측정하였고, Djelic과 Anderson(2003)은 estrogens이 DNA 손상에 미치는 영향을 연구하였으며, Rastogi *et al.*(2001)은 aflatoxin B1을 쥐에 장기간 투여하여 간장과 신장에서 지질과산화 및 DNA 손상을 연구하였고, Ozcelik *et al.*(2004)은 ochratoxin A를 쥐에 투여하여 쥐의 신장에서 DNA 손상을 연구하여 보고한 바 있다.

식품 혹은 사료에 천연 독소나 합성 독소가 오염되어 사람과 동물의 체내에 들어오게 되면 사람과 동물의 건강을 위협하게 된다. T-2 독소는 *Fusarium* 속 곰팡이로부터

산출되는 독성이 강력한 trichothecene 곰팡이 독소이며, 이 독소의 화학 구조의 특징은 epoxy trichothecene 환상 구조를 가지고 있는 것이다(Atroshi *et al.*, 1997). T-2 toxin은 사료나 식품에 오염되며, 조리과정에서도 파괴되지 않고 오랫동안 안전한 상태를 유지하므로 사람이나 동물의 건강을 해치는 가장 강력한 독소이다(Leasons, 1995; Atroshi, 1997). T-2 독소의 독성 효과 중 가장 현저한 것은 비교적 소량에서도 급성으로 조혈장기와 면역장기인 임파조직에 위해를 가하여 적혈구 생산 억제와 면역억제 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Nakadate, 1990; Smith, 1994; 김, 1985). 또한 T-2 독소는 세포벽에 직접 결합한 후(Gyongyossy-Issa, 1985) sulphhydryl 기, 리보솜과 같은 세포 소기관에 독소가 결합하게 되어 RNA, DNA와 단백질 합성을 현저하게 억제하며(Ueno, 1977). 적혈구를 용혈 시키며 적혈구막을 변형시키는 것으로 알려져 있다(Rizzo, 1992).

모든 호기성 세포는 산소를 이용하여 에너지 대사를 진행하며 생존하고 있다. 그러나, 생체가 이용한 산소 중 1~3%는 생체내 정상적인 대사과정 즉 각종 물리적, 화학적, 생물학적인 스트레스를 받아 유해한 활성산소 중 (reactive oxygen species: ROS)으로 변하게 된다(Steinmetz, 1991). 세포는 이런 유해한 활성산소 중에 노출되면 산화적 손상을 입게 된다(Freidovich, 1999; Wu, 1998; Yun, 2002). Free radical은 대식세포의 살균 작용, 정보전달 및 오래된 단백질 제거 등에 이용되는 불가결한 물질이므로 적정량이 생성되어야 하나 생체내의 생성량이 그 방어기전을 벗어나 많은 양이 생성되면 생체 세포막 구성성분인 다가 불포화지방산을 공격하여 과산화 지질이나 산화분해물이 생체 내 축적되고 축적된 과산화 지질은 일시적 혹은 영구적으로 생체에 손상을 주어 단백질, 효소, DNA 손상을 일으켜 여러 가지 질환 원인으로 알려져 있다(Ignarro, 1999; MeCord, 2000; Zheng, 2000). 이러한 비정상적인 변화에 대해 생체는 활성산소종을 제거하는 자기방어기구로서 superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase 같은 효소적 기전과(Glass, 1997; Kumpawat, 2003) α -tocopherol, β -carotene, ascorbic acid, urate, cystein, ceruloplasmin, transferrin, albumin 등의 비 효소적 기전이다(Daniel, 2003; Inatani, 1996; Wen, 1999; Wu, 1999) 있어 생성된 free radical을 소거한다고 알려져 있는데 이러한 산화적 스트레스가 곰팡이 독소에 의해서도 유발된다는 보고가 있는 후 곰팡이 독소와 산화적 스트레스에 관한 관심이 증가하게 되었다(Rizzo *et al.*, 1992; Halliwell, 1992).

이러한 각종 유해 물질에 의해서 손상된 DNA를 측정하는 초기 방법으로는 gas chromatography-mass spec-

trometry(GC-MS), high performance liquid chromatography-electrochemical detection(HPLC-ECD)(Daniel *et al.*, 2003) 등의 방법이 사용되었으나 많은 유기 용매의 사용, 고 비용, 오랜 시간이 소요되며, 한 번에 한 시료만 측정할 수 밖에 없는 등의 단점으로 최근에 Comet assay 방법이 개발되어 DNA 손상 측정에 응용되고 있다. Comet assay 방법을 이용한 지금까지 각종 곰팡이 독소 유래 DNA 손상 측정은 주로 쥐, 또는 생쥐 등에서만 연구되어져 있고 닭에서는 이러한 연구결과를 찾아보기 힘들어 닭에 T-2 toxin을 투여할 때 DNA 손상 정도를 Comet assay 방법으로 알아보고자 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

실험 재료

본 실험에 사용한 T-2 toxin은 Sigma(St. Louis, MO)로부터 구입하여 사용하였다. T-2 toxin을 50% 에틸알코올에 녹인 후 소량의 사료(stock diet)에 뿌려서 에틸알코올을 증발 시킨 후 사료 자동 혼합기로 골고루 섞은 다음 각 처리군 별 첨가 비율(대조군, 4, 8, 16 µg/g of diet),에 따라 기초 사료에 첨가한 후 사료 자동 혼합기로 혼합하여 실험기간(21일) 동안 공급하였다.

실험동물 및 사육환경

실험동물은 협업신진 BHB()로부터 7일령 평균체중이 70.6~72.3 g 되는 하이라인 버라이어티 브라운(Variety Brown) 각 20마리를 구입하였다. 구입 후 축산진흥연구소(진주, Korea) 실험실에서 1주간 순화를 시킨 후 체중을 측정하여 평균 체중이 비슷하게 4개 군으로 배치하고 실험에 사용하였다. 실험 기간 중 사육실 환경 조건은 실내온도 23~24°C, 상대습도 50 ± 10%, 환기횟수 10~14회/hr, 조명 12 hr/day을 유지하였다. 모든 실험 동물은 사육용 케이지에 5마리씩 분리하여 사용하였다. 사료는 초이크롭(대한사료)를, 물은 상수도수를 자유롭게 섭취시켰다.

시험군 및 투여량 설정

닭에서 알려져 있는 치사용량 보다 낮은 용량인 16 µg/g of diet을 최고용량으로 설정하고 일정한 공비(0.5)로 하여 중간용량 8 µg/g of diet, 저용량군 4 µg/g of diet으로 하여 3개의 용량군으로 설정하였으며, 대조군은 독소가 함유되지 않은 기초 사료를 공급하였다.

관찰 및 검사항목

임상증상 및 사망관찰. 모든 실험동물에 대해서 매일 1회 일정한 시간에 일반상태의 변화, 중독증상, 및 사망유

무를 전 실험 기간 동안 관찰하였다.

체중 측정. 시험 기간 중 체중은 시험개시일, 7, 14, 그리고 21일에 측정하였다.

사료 섭취량. 사료 섭취량은 처리군 별로 당일 급여량과 익일 잔량을 시험개시~7일, 8~14일, 그리고 15~21일 사이의 소모량을 측정하였다.

혈액학적 검사. 일반 혈액학적 검사는 EDTA로 항응고 처리하여 적혈구수(RBC), 백혈구수(WBC), 헤마토크리트치(Hct), 혈색소량(Hb), 평균적혈구혈색소농도(MCHC), 평균적혈구혈색소량(MCH), 평균혈구용적(MCV), 중성호성백혈구(neutrophil), 산호성백혈구(eosinophil), 염기호성백혈구(basophil), 림프구(lymphocyte), 및 단핵구(monocyte) 등을 자동혈구측정기(HemaVet 950, USA)을 이용하여 측정하였다.

혈청 생화학적 검사. 혈청 생화학적 검사는 부검전일 절식시킨 동물의 상완 정맥에서 채혈한 다음 실온에서 응고시킨 다음 원심분리해서(3,000 rpm, 15 min) 얻은 혈청에 대해서 uric acid, glutamate oxalate transaminase (SAT), lactate dehydrogenase(LDH), γ-glutamyl transpeptidase(GGT), total protein, cholesteol, triglyceride, glucose, calcium, creatinine phosphate kinase(CPK), blood urea nitrogen(BUN), creatine, phosphorous, glutamate pyruvate transaminase(ALT), amylase를 자동분석기(Pronto/E, BPC사, Italy)를 이용하여 측정하였다.

부검 및 장기중량 측정. 시험 기간 중 폐사한 동물이 없었으므로 시험 종료 후 모든 동물을 경골탈추시킨 후 완전 방혈한 다음 육안적으로 장기를 검사하였다. 전 실험 동물에 대하여 각 장기(liver, heart, spleen, brain, lung, kidney, bursa of Fabricius, thymus gland)의 중량을 측정하였다.

병리조직학적 검사. 장기 중량 측정이 끝난 liver, heart, spleen, brain, lung, kidney, bursa of Fabricius, thymus gland를 10% 중성 포르말린에 고정시킨 후 파라핀 포매하여 5 µm 절편을 만들어 hematoxylin & eosin 염색하여 관찰하였다.

DNA 손상 측정. DNA 손상 실험에 사용한 세포는 닭의 혈액을 채취하여 phosphate buffer saline(PBS : Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ free, 15.2 mM pH 7.4) 용액에서 세척한 후 PBS 용액 1 ml이 들어 있는 시험관에 20 µl 혈액을 넣은 다음 냉장고에서 약 60분간 배양하여 사용하였다. 0.5% low melting point agarose(LMPA) 75 µl에 배양한 혈액 5 µl을 첨가하여 혼합한 다음 1% normal melting agarose(NMA)를 frosted-slide glass에 도포하여 미리 준비한 슬라이드글라스 위에 혼합한 시료를 놓고 커버글

라스를 덮은 다음 4°C에서 10분간 방치하여 agarose를 굳게 하였다. 커버슬라이드를 조심스럽게 제거한 다음 다시 한번 LMPA를 첨가하고 4°C에서 10분간 방치하여 다시 agarose를 굳게 하였다. coverslip을 제거한 슬라이드를 1% triton X-100과 10% DMSO 농도로 첨가한 용해용액(2.5 M NaCl, 0.1 M NaEDTA, 10 mM Trizma Base, NaOH 4 g; pH 10)에 넣어 빛이 차단된 곳, 4°C에서 1시간 정도 방치하여 용해시켰다. 용해 용액에서 슬라이드를 취하여 용액을 완전히 제거하고, 전기영동 장치를 수평이 되도록 하여 주위에 얼음을 채워 4°C로 유지하도록 하고 차가운 unwinding solution을 슬라이드가 간신히 잠기는 정도로 부은 후 전류가 흐르는 방향과 동일한 방향으로 슬라이드를 넣고 30분간 암실에서 unwinding시켰다. 슬라이드가 놓여진 위치와 수평 여부를 다시 한번 확인한 후 power supply를 25 V(~0.74 V/cm), 20 min으로 설정하고 300 mA가 되도록 buffer(3 M NaOH, 10 mM NaEDTA, final volume 0.3 M NaOH, 1 mM NaEDTA; pH 13) 양을 조정하면서 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝난 다음 슬라이드를 꺼내어 물기를 제거하고 중화용액(0.4 M Tris-HCl, pH 7.5, 4°C)에서 5분간 담근 다음 슬라이드를 꺼내어 물기를 제거하고 이 과정을 3회 반복하였다.

중화 후 슬라이드를 꺼내어 물기를 완전히 제거한 다음, 100% 차가운 ethanol에 슬라이드를 5분간 넣어서 건조시킨 다음 염색 약 ethidium bromide(EtBr 10 mg/ DW 1 ml : 500×stock solution) 30 µl를 취하여 염색한 후 coverslip을 덮어서 형광 현미경으로 관찰하였다.

형광 현미경(Olympus, ×200)으로 background 및 배율을 확인하고 슬라이드 마다 50개의 세포를 관찰하여 손상된 DNA 이동 거리, DNA 직경, tail length, tail moment과 percentage를 측정하기 위하여 LTD(Liverpool, UK)을 CCD 카메라에 연결하여 Comet assay software program(Komet 5.5)로 분석하였다. DNA 손상정도를 Tail extent moment(TEM), tail length(TL, µm) 값으로 분석하였다. 본 실험에서 각 처리구당 2개씩의 슬라이드를 만들었으며, 이를 3회 반복하였다.

통계처리

본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 통계처리 computer program인 SAS 프로그램(SAS institute Inc, Version 6.04, Cary, NC, USA)을 이용하여 등분산 검정 후 one-way ANOVA에서 유의한 F값이 관찰되는 항목에 대하여 대조군과 각 처리군 사이의 유의수준 $p < 0.05$ 로 Dunnett's *t*-test를 이용하여 실시하였다.

Table 1. Mortality and clinical signs of chickens treated with dietary supplementation of T-2 toxin for 21 days

Dose (µg/g of diet)	0	4	8	16
Mortality	0/5 ^a	0/5	0/5	0/5
Clinical signs (anorexia, ataxia)	0/5	0/5	2/5	3/5

^aValue are expressed as numbers of dead or clinical signs animals/total number of animals.

결과 및 고찰

일반증상 관찰

시험 전 기간을 통하여 대조군을 비롯하여 모든 처치군에서 폐사한 동물은 없었으나 처리군에서는 식욕 감퇴 및 활동이 둔하여지는 것을 관찰할 수 있어 김(1985)이 기니피그에 T-2 toxin을 투여하여 관찰한 결과, Doerr *et al.*(1981), Chi *et al.*(1977), Wyatt *et al.*(1973)이 닭에 T-2 toxin을 투여하여 연구한 결과, Hayes *et al.*(1980)이 생쥐에 T-2 toxin을 투여하여 연구한 결과, Boonchuvit *et al.*(1975)이 살모넬라에 감염된 닭에 T-2 toxin을 투여하여 연구한 결과, Mann *et al.*(1982)이 소에게 T-2 toxin을 투여한 연구 결과와 Grizzle *et al.*(2004)이 메추라기에 T-2 toxin을 투여하여 연구한 결과와 일치하였다. 이러한 결과로 보아 T-2 toxin은 동물의 종에 관계없이 식욕 감퇴 및 활동을 억압하는 효과를 나타내는 것으로 생각된다(Table 1).

체중변화

T-2 toxin을 투여한 후 시험 기간 동안의 평균 체중은 약물 투여 7일에 8 µg/g diet, 16 µg/g diet 처리 그룹이 대조군에 비하여 체중이 유의성 있게 감소하였으나 14일째에는 고용량군에서만 대조군에 비하여 유의성 있는 감소 현상을 보이다가 21일째에는 다시 대조군에 비하여 고용량군과 중간용량군에서 유의성 있는 감소 현상을 보였고, 평균 증체량은 저용량, 중간용량, 고용량 처리군 모두에서 대조군에 비하여 유의적으로 감소되었다. 일당 증체량에 있어서도 총 평균 증체량과 같은 경향으로 각 처리군에서 유의적으로 체중이 감소하는 경향을 보였는데 이는 시험물질이 체중 증가에 영향을 미치는 것으로 판단되는데 이는 절대 장기 증량이나, 상대 장기증량의 변화에서 유의적인 변화가 없기 때문에 시험물질에 의한 체중 감소 현상으로 생각된다(Table 2). 이러한 결과는 김(1985)이 기니피그에 T-2 toxin을 투여하여 관찰한 결과, Doerr *et al.*(1981), Chi *et al.*(1977), Wyatt *et al.*(1973)이 닭에 T-2 toxin을 투여하여 연구한 결과, Hayes *et al.*(1980)이 생쥐에 T-2 toxin을 투여하여 연구한 결과, Boonchuvit

Table 2. Effect of dietary supplementation of T-2 toxin on the chickens

Items	Control	T-2 addition levels (µg/g of diet)		
		4	8	16
Live body weight (g)				
Day 0	72.3 ± 8.32 ^a	75.0 ± 8.31 ^{ab}	70.6 ± 7.98 ^b	73.3 ± 4.56 ^{ab}
Day 7	138.5 ± 2.74 ^a	134.8 ± 9.34 ^{ab}	127.4 ± 6.01 ^{bc}	123.0 ± 11.65 ^c
Day 14	225.6 ± 7.28 ^a	192.9 ± 10.58 ^a	190.1 ± 29.15 ^a	151.4 ± 42.63 ^b
Day 21	321.4 ± 22.29 ^a	287.7 ± 22.5 ^{ab}	267.1 ± 46.22 ^b	224.4 ± 18.13 ^c
Body weight gain (g)				
Days 0~7	66.2 ± 1.69 ^a	59.8 ± 1.97 ^a	50.8 ± 1.54 ^b	49.7 ± 1.02 ^c
Days 8~14	87.1 ± 5.28 ^d	75.1 ± 7.34 ^c	62.7 ± 6.56 ^b	28.4 ± 1.10 ^b
Days 15~21	95.8 ± 8.35 ^c	58.1 ± 6.41 ^b	77.0 ± 6.18 ^a	73.0 ± 4.65 ^a
Days 0~21	239.1 ± 21.28 ^c	212.7 ± 19.34 ^c	190.5 ± 13.64 ^b	151.1 ± 10.68 ^a
Daily body weight gain (g)				
Days 0~7	9.46 ± 1.42 ^b	8.54 ± 1.35 ^b	7.26 ± 1.25 ^a	7.10 ± 1.15 ^a
Days 8~14	12.44 ± 2.85 ^a	10.73 ± 1.65 ^{ab}	8.96 ± 1.28 ^b	4.06 ± 0.92 ^c
Days 15~21	13.69 ± 1.36 ^c	8.3 ± 1.05 ^b	11.0 ± 1.32 ^a	10.42 ± 1.24 ^a
Days 0~21	11.39 ± 1.58 ^a	10.13 ± 1.26 ^b	9.07 ± 1.07 ^b	7.20 ± 1.03 ^c
Total feed intake (g)				
Days 0~7	207.21 ± 38.87 ^a	187.80 ± 46.78 ^b	177.00 ± 44.10 ^b	161.50 ± 31.24 ^b
Days 8~14	224.70 ± 13.00 ^a	201.00 ± 21.11 ^b	190.28 ± 18.34 ^b	171.43 ± 18.40 ^c
Days 15~21	143.57 ± 18.45 ^b	147.29 ± 24.05 ^b	118.43 ± 10.34 ^a	104.57 ± 11.86 ^a
Days 0~21	575.48 ± 43.39 ^a	536.10 ± 38.89 ^b	485.71 ± 41.71 ^c	437.50 ± 36.71 ^c
Daily feed intake (g)				
Days 0~7	29.60 ± 2.53 ^a	26.83 ± 2.15 ^b	25.29 ± 2.61 ^{bc}	23.07 ± 2.19 ^c
Days 8~14	32.10 ± 1.87 ^c	28.71 ± 3.05 ^b	27.18 ± 2.64 ^b	24.49 ± 1.35 ^a
Days 15~21	20.51 ± 2.05 ^a	21.04 ± 2.31 ^a	16.92 ± 1.89 ^b	14.94 ± 1.53 ^b
Days 0~21	27.40 ± 3.16 ^b	25.53 ± 2.36 ^{ab}	23.13 ± 2.43 ^{ab}	20.83 ± 1.36 ^a
Feed conversion (Feed/gain)				
Days 0~7	3.13 ± 0.09 ^a	3.14 ± 0.05 ^a	3.48 ± 0.07 ^b	3.24 ± 0.04 ^b
Days 8~14	2.58 ± 0.06 ^a	2.67 ± 0.04 ^a	3.03 ± 0.03 ^b	6.05 ± 0.13 ^c
Days 15~21	1.49 ± 0.02 ^a	1.90 ± 0.08 ^b	1.54 ± 0.07 ^a	1.43 ± 0.05 ^a
Days 0~21	2.41 ± 0.03 ^b	2.52 ± 0.06 ^b	2.55 ± 0.05 ^b	2.89 ± 0.06 ^a

^{abcd}Mean ± SD with different superscripts in the same row differ significantly (p<0.05).

et al.(1975)이 살모넬라에 감염된 닭에 T-2 toxin을 투여 하여 연구한 결과, Mann *et al.*(1982)이 소에게 T-2 toxin을 투여한 연구 결과와 Grizzle *et al.*(2004)이 메추라기에 T-2 toxin을 투여하여 연구한 결과와 일치하였는데 T-2 toxin은 역시 동물의 종에 관계없이 체중 증가에 영향을 미친다고 생각되어진다.

사료 섭취량

총 사료 섭취량은 각 측정 기간에서 대조군과 각 처리군 사이에는 유의성 있게 감소하였으며, 실험 전 기간 동안의 사료 소비량도 같은 경향을 나타내었다. 일당 사료 섭취량은 전반적으로 대조군에 비하여 처리군에서 유의적으로 감소하는 경향을 보였고, 사료 요구율은 처리 후 7일째 저용량 군에서 현저히 감소하였고, 8-14일 동안에는 고용량군(16 µg/g of diet)이 6.05 ± 0.13으로 특이하게 사료효율이 낮았으며, 이러한 경향은 전 실험기간동안에도 나타나 T-2 toxin이 사료개선효과를 저해하는 것으로 판단할 수 있다(Table 2).

장기중량의 변화

절대 장기중량 값은 폐장과 비장이 모든 처리군에서 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였고 신장, F낭 과 흉선의 장기 중량은 고용량 군(16 µg/g of diet)에서 대조군과 저, 중 용량 군에 비하여 유의성 있게 현저히 감소하였다. 그러나 간장과 심장의 장기중량의 변화는 관찰되지 않았다(Table 3). 이러한 결과는 김(1985)이 기니피그에 T-2 toxin을 투여하여 관찰한 결과와 Wyatt *et al.*(1973)이 닭에 T-2 toxin을 투여하여 연구한 결과와 일치하는 경향이었으나, Chi *et al.*(1977)은 9주 동안 T-2 toxin을 닭에 투여한 결과 2 ppm 처리군에서 심장 장기중량이 유의성 있게 증가한다고 하여 본 실험 결과와 일치하지 않았으나, 간장 장기 중량은 본 실험 결과와 일치하였고, Boonchuvit *et al.*(1975)은 살모넬라에 감염된 닭에 T-2 toxin을 투여하여 연구한 결과 비장 장기중량은 본 실험 결과와 일치하나 F낭 장기중량은 영향을 받지 않는다고 하여 본 실험 결과와 상이한 결과를 나타내었다. 이러한 차이는 Boonchuvit *et al.*(1975)이 닭을 살모넬라에 감염

Table 3. Absolute organ weight in chickens treated with dietary supplementation of T-2 toxin on the chickens for 21 days

Parameter	Group	Control	Low	Middle	High
	Dose/($\mu\text{g/g}$ of diet)	0	4	8	16
	No. of animals	5	5	5	5
Liver (g)		9.3 \pm 1.16	8.76 \pm 0.94	8.74 \pm 0.95	8.38 \pm 1.15
Heart (g)		2.11 \pm 0.31	2.02 \pm 0.23	2.1 \pm 0.47	1.76 \pm 0.15
Brain (g)		2.24 \pm 0.23 ^a	2.04 \pm 0.15 ^{ab}	1.98 \pm 0.16 ^b	1.98 \pm 0.18 ^b
Lung (g)		2.20 \pm 0.25 ^a	1.78 \pm 0.08 ^b	1.74 \pm 0.30 ^b	1.58 \pm 0.23 ^b
Kidney (g)	Left	1.96 \pm 0.15 ^a	1.86 \pm 0.32 ^a	1.78 \pm 0.33 ^{ab}	1.48 \pm 0.13 ^b
	Right	1.86 \pm 0.18 ^a	1.84 \pm 0.19 ^a	1.76 \pm 0.36 ^a	1.26 \pm 0.17 ^b
Bursa of Fabricius(g)		1.94 \pm 0.42 ^a	1.88 \pm 0.19 ^a	1.88 \pm 0.91 ^a	0.90 \pm 0.25 ^b
Thymus gland (g)		2.64 \pm 0.71 ^a	2.16 \pm 0.52 ^a	2.00 \pm 0.35 ^a	1.18 \pm 0.15 ^b
Spleen (g)		0.92 \pm 0.22 ^a	0.74 \pm 0.11 ^{ab}	0.62 \pm 0.22 ^{bc}	0.40 \pm 0.17 ^c

^{abc}Mean \pm SD with different superscripts in the same row differ significantly ($p < 0.05$).

시킨 후 T-2 toxin을 투여하여 실험한 결과에 기인하는 것 같다.

체중에 대한 각 장기의 상대 중량 비

각 처리군 간 상대 중량비도 장기중량의 변화와 유사하게 폐장과 비장이 모든 처리 군에서 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였고 신장, F낭과 흉선의 상대 장기 중량비는 고용량군(16 $\mu\text{g/g}$ of diet)에서 대조군과 저, 중 용량군에 비하여 유의성 있게 현저히 감소하였다. 그러나 간장과 심장의 상대 장기중량의 변화는 관찰되지 않았다 (Table 4).

혈액학적 검사

혈액학적 검사 소견에서 WBC치는 저용량군과 중용량군에서 증가하는 경향을 보이다가 고용량군에서 다시 회복하는 경향을 보였으며, neutrophil치는 전 처리 군에서 대조군에 비하여 유의적으로 증가하는 것으로 보아 T-2 toxin의 영향으로 말미암아 아마도 염증반응이 있는 것으로 추측되며, eosinophil과 basophil치는 숫적으로는 증

가하였으나 유의성은 인정되지 않았고 Hb, HCT, MCV, HCH과 PLT치는 유의적으로 감소하는 경향을 보였는데 이는 T-2 toxin 이 조혈장기를 억압한 결과로 풀이된다. 특히 임파구치가 처리 용량-의존형으로 감소하는 경향을 보이며 특히 고용량군(16 $\mu\text{g/g}$ of diet)에서 현저하게 감소하였는데($p < 0.05$) 이는 역시 T-2 toxin 중독증 중 특징인 T-2 toxin이 면역장기를 억압한 결과로 나타나는 현상이라고 생각되어진다. 이러한 결과는 Chowdhury *et al.* (2004), Chowdhury *et al.*(2005)과 Swamy *et al.*(2004) 이 자연 상태에서 자라고 있는 곡류에 오염되어 있는 곰팡이 독소를 분석과 이 사료를 먹인 닭에서 면역글로부린과 혈액변화를 관찰한 연구 결과와 일치하는 것으로 보아 T-2 toxin 중독 효과는 면역장기와 조혈장기를 현저하게 억압한다는 사실이 다시 입증되어졌다고 생각된다(Table 5).

혈청생화학학적 검사

시험물질을 투여한 후 Total protein치가 중용량군과 고용량군에서 유의적으로 증가하였으며, triglyceride치와 amylase치가 중용량 군에서 대조군에 비하여 유의적으로

Table 4. Relative organ weights of chickens treated with the dietary supplementation of T-2 toxin on the chickens for 21 days

Parameter	Group	Control	Low	Middle	High
	Dose/($\mu\text{g/g}$ of diet)	0	4	8	16
	No. of animals	5	5	5	5
Liver (g)		4.908 \pm 0.481	5.075 \pm 1.268	5.336 \pm 0.382	5.859 \pm 0.294
Heart (g)		1.114 \pm 0.157	1.170 \pm 0.326	1.281 \pm 0.154	1.231 \pm 0.253
Brain (g)		1.182 \pm 0.327 ^a	1.182 \pm 0.241 ^a	1.209 \pm 0.142 ^{ab}	1.384 \pm 0.132 ^b
Lung (g)		1.161 \pm 0.115 ^a	1.031 \pm 0.131 ^b	1.062 \pm 0.094 ^b	1.105 \pm 0.248 ^b
Kidney (g)	Left	1.035 \pm 0.086 ^a	1.078 \pm 0.024 ^b	1.087 \pm 0.031 ^b	1.035 \pm 0.034 ^a
	Right	0.982 \pm 0.024 ^a	1.066 \pm 0.157 ^b	1.075 \pm 0.136 ^b	0.881 \pm 0.062 ^c
Bursa of Fabricius (g)		1.024 \pm 0.151 ^a	1.089 \pm 0.135 ^b	1.148 \pm 0.203 ^b	0.629 \pm 0.148 ^c
Thymus gland (g)		1.394 \pm 0.143 ^a	1.251 \pm 0.154 ^a	1.221 \pm 0.085 ^a	0.825 \pm 0.058 ^b
Spleen (g)		0.486 \pm 0.039 ^a	0.429 \pm 0.027 ^{ab}	0.379 \pm 0.013 ^b	0.280 \pm 0.014 ^c

^{abc}Mean \pm SD with different superscripts in the same row differ significantly ($p < 0.05$).

Table 5. Hematological values of chickens treated with the dietary supplementation T-2 toxin for 21 days

Parameter	Group	Control	Low	Middle	High	Sem
	Dose/($\mu\text{g/g}$, diet)	0	4	8	16	
	No. of animals	5	5	5	5	
WBC ($\text{K}/\mu\text{l}$)		19.09 \pm 0.94 ^b	24.08 \pm 2.91 ^a	24.10 \pm 2.17 ^a	20.79 \pm 2.00 ^b	1.06
RBC ($\text{m}/\mu\text{l}$)		2.87 \pm 0.24 ^a	3.01 \pm 0.24 ^a	2.94 \pm 0.20 ^a	2.74 \pm 0.19 ^a	0.11
Hb (g/dl)		11.98 \pm 0.08 ^a	11.70 \pm 0.77 ^a	11.77 \pm 0.54 ^a	10.77 \pm 0.60 ^b	0.28
HCT (%)		30.06 \pm 1.58 ^a	29.22 \pm 1.56 ^{ab}	29.04 \pm 0.89 ^{ab}	27.36 \pm 1.42 ^b	0.70
MCV (fl)		101.47 \pm 2.29 ^a	100.22 \pm 3.29 ^a	99.55 \pm 3.84 ^a	99.66 \pm 4.46 ^a	1.78
MCH (pg)		41.52 \pm 1.92 ^a	40.30 \pm 0.88 ^{ab}	39.93 \pm 1.19 ^{ab}	39.31 \pm 1.19 ^b	0.67
MCHC (g/dl)		40.70 \pm 1.23 ^a	40.09 \pm 1.42 ^a	40.21 \pm 0.46 ^a	39.20 \pm 1.27 ^a	0.58
RDW (%)		10.25 \pm 0.41 ^b	10.49 \pm 0.38 ^{ab}	10.33 \pm 0.26 ^b	10.90 \pm 0.40 ^a	0.18
PLT ($\text{K}/\mu\text{l}$)		50.69 \pm 2.38 ^a	49.13 \pm 2.21 ^a	51.28 \pm 3.69 ^a	44.81 \pm 2.64 ^b	1.40
MPV (fl)		6.09 \pm 0.34 ^b	6.60 \pm 0.21 ^a	6.40 \pm 0.13 ^{ab}	6.32 \pm 0.39 ^{ab}	0.14
Neutrophil (%)		28.52 \pm 5.86 ^b	33.66 \pm 3.12 ^{ab}	34.30 \pm 1.52 ^a	35.63 \pm 1.31 ^a	1.73
Lymphocyte (%)		53.01 \pm 8.25 ^a	48.78 \pm 5.28 ^a	47.37 \pm 2.78 ^a	40.08 \pm 3.18 ^b	2.66
Monocyte (%)		9.95 \pm 0.63 ^a	9.67 \pm 0.57 ^a	9.58 \pm 0.48 ^a	9.85 \pm 0.53 ^a	0.28
Eosinophil (%)		4.36 \pm 2.10 ^a	5.10 \pm 1.53 ^a	5.74 \pm 0.94 ^a	6.12 \pm 1.09 ^a	0.74
Basophil (%)		1.67 \pm 1.29 ^a	1.87 \pm 0.95 ^a	2.10 \pm 0.88 ^a	2.21 \pm 0.87 ^a	0.51

^{ab}Mean \pm SD with different superscripts in the same row differ significantly ($p < 0.05$).

Table 6. Serum biochemical values of chickens treated with the dietary supplementation T-2 toxin for 21 days

Parameter	Group	Control	Low	Middle	High	Sem
	Dose/($\mu\text{g/g}$ of diet)	0	4	8	16	
	No. of animals	5	5	5	5	
Uric acid		0.07 \pm 0.01	0.25 \pm 0.25	0.34 \pm 0.42	0.19 \pm 0.22	0.13
SAT		1.44 \pm 0.11	1.41 \pm 0.04	1.34 \pm 0.29	1.3 \pm 0.28	0.10
LDH		0.51 \pm 0.23 ^a	0.21 \pm 0.09 ^b	0.47 \pm 0.15 ^a	0.66 \pm 0.04 ^a	0.07
GGT		1.03 \pm 0.06	0.98 \pm 0.07	1.2 \pm 0.2	1.15 \pm 0.19	0.07
Total protein		0.12 \pm 0.02 ^c	0.15 \pm 0.04 ^c	0.24 \pm 0.07 ^b	0.56 \pm 0.07 ^a	0.03
cholesterol		0.16 \pm 0.06 ^{ab}	0.13 \pm 0.02 ^b	0.24 \pm 0.09 ^a	0.16 \pm 0.07 ^{ab}	0.03
triglyceride		0.23 \pm 0.06 ^b	0.14 \pm 0.02 ^b	0.52 \pm 0.28 ^a	0.16 \pm 0.02 ^b	0.07
glucose		0.52 \pm 0.13	0.59 \pm 0.05	0.76 \pm 0.3	0.48 \pm 0.17	0.09
calcium		0.49 \pm 0.17	0.52 \pm 0.12	0.56 \pm 0.36	0.33 \pm 0.09	0.10
CPK		0.67 \pm 0.12	0.63 \pm 0.06	0.79 \pm 0.26	1.23 \pm 0.92	0.24
BUN		1.47 \pm 0.03	1.46 \pm 0.02	1.46 \pm 0.03	1.47 \pm 0.04	0.01
creatine		0.15 \pm 0.02	0.13 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.13 \pm 0.01	0.006
phosphorus		1.07 \pm 0.65	0.65 \pm 0.08	0.84 \pm 0.13	0.95 \pm 0.51	0.21
ALT		1.63 \pm 0.06	1.58 \pm 0.04	1.52 \pm 0.11	1.5 \pm 0.23	0.06
amylase		0.26 \pm 0.04 ^b	0.33 \pm 0.08 ^{ab}	0.51 \pm 0.26 ^a	0.44 \pm 0.14 ^{ab}	0.07

^{ab}Mean \pm SD with different superscripts in the same row differ significantly ($p < 0.05$).

증가하였으며, LDH치가 저 용량 군에서 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 Chi *et al.* (1977)의 결과와 Boonchuvit *et al.*(1975), Wyatt *et al.* (1973)의 결과와 측정 항목 중 일부는 일치하고 일부 항목치는 상이한 결과를 나타내었는데 이는 각 연구자들이 투여한 T-2 toxin의 투여 용량의 차이와 또는 실험동물에 다른 요인 즉 salmonella와 같은 감염 요인을 매개 변수로 두었기 때문에 부분적으로 일치 또는 상이한 결과가 나타나는 것으로 생각되어 진다. 이러한 변화는 모두 다 기준치 범위를 벗어나 있기 때문에 투여한 약물의 영향이라고 생각된다(Table 6).

육안적 및 병리 조직학적 검사

실험 최종일 실험동물을 경구 탈추시켜 완전 방혈한 다음 부검을 실시하였다. 부검 시 육안적 소견으로는 각종 실질 장기의 출혈과 지방간을 관찰할 수 있었고, 특히 고 용량 처리군(16 $\mu\text{g/g}$ of diet)의 흉선, F낭 과 비장이 대조군에 비하여 현저히 위축되어 있었는데(Fig. 1, 2, 3) 이러한 결과는 김(1985), Boonchuvit *et al.*(1975)의 결과, Chi *et al.*(1977)의 결과, Wyatt *et al.*(1973)의 결과, Hayes *et al.*(1980)의 결과와 Mann *et al.*(1982)의 결과와 일치하였는데 이런 결과는 실험동물의 축종에 관계없이 나타나는 T-2 toxin의 중독 증상이라고 생각되어지며,

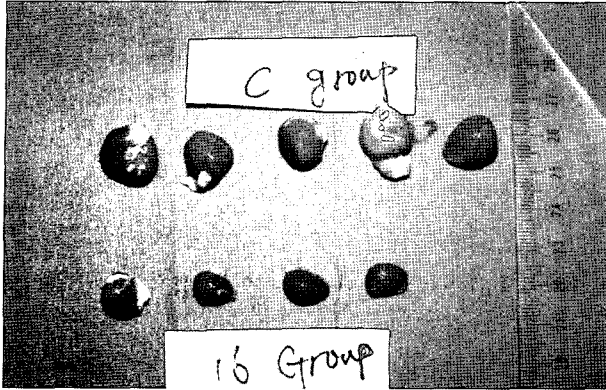


Fig. 1. Spleens of chicken treated with T-2 toxin were shown sever atrophy. Spleen of control group was normal size (upper) but spleen of treated group (16 $\mu\text{g/g}$ of diet) was shown sever atrophy (bottom) than that of control.

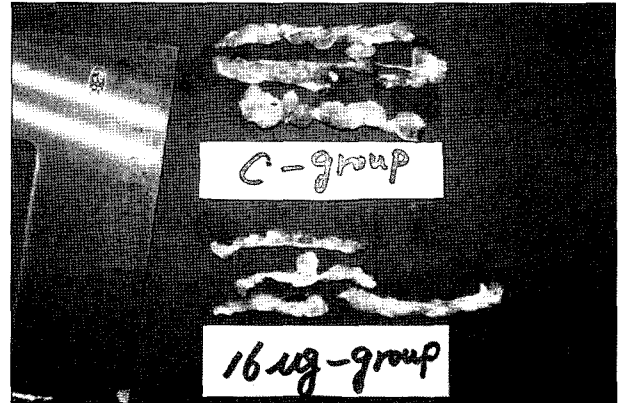


Fig. 3. Thymus gland of chicken treated with T-2 toxin showed severe atrophy. Thymus gland of control group was of the normal size (upper) but thymus gland of the treated group (16 $\mu\text{g/g}$ of diet) showed severe atrophy (bottom) than that of control.

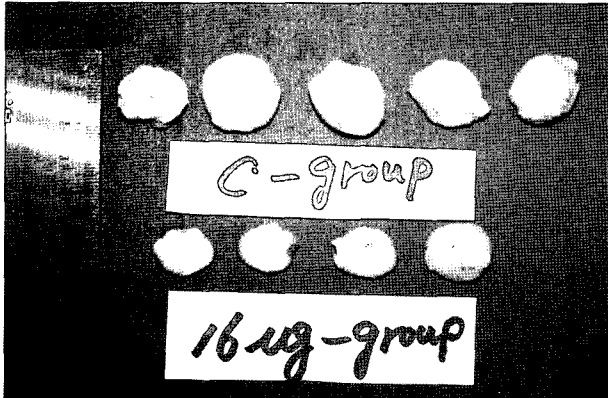


Fig. 2. Bursa of Fabricius in chickens treated with T-2 toxin showed severe atrophy. Bursa of Fabricius of the control group was of the normal size (upper) but the bursa of Fabricius of the treated group (16 $\mu\text{g/g}$ of diet) showed severe atrophy (bottom) than that of the control.

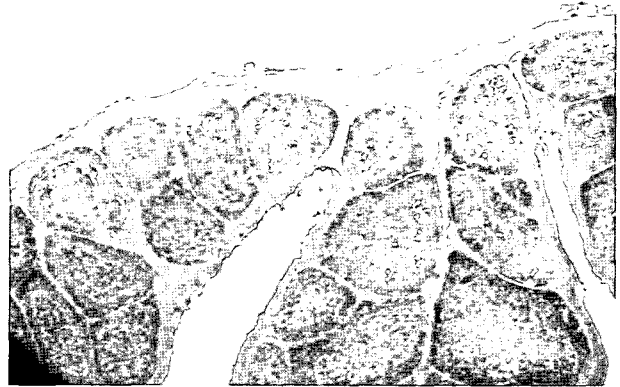


Fig. 4. The lymph node from bursa of Fabricius from a chicken treated with T-2 toxin for 21 days reveals various degrees of atrophy of lymphatic nodules with lymphoid cell depletion.

이러한 사실은 혈액과 혈청 성분 분석 결과에서 조혈장기 억압으로 인한 Hb, HCT, MCH치의 감소현상과 임파구의 현저한 감소 현상으로 잘 뒷받침 되고 있으며 신장, F낭, 흉선의 장기 중량 무게 및 상대 장기중량이 대조군에 비해서도 현저하게 감소된 현상도 이를 잘 대변해 주고 있다. 병리 조직학적 검사결과 대조군의 흉선, F낭과 비장의 임파절이 두터운 피질층과 임파구가 조밀하게 분포되어 있는 것과는 대조적으로 처리 군에서는 임파 소절의 위축을 나타내어서 변연에 조밀한 임파구대를 갖는 것부터 거의 세망세포로만 구성되어 있는 것 까지 관찰되었으며, 각 임파소절의 중심부에는 종대된 세망세포나 대식구로 구성되어 있었고 임파구의 핵 농축과 핵 붕괴상을 관찰할 수 있었다. 특히 충혈과 세망세포의 증식, 임파구감소 현상이 뚜렷하였다(Fig. 4, 5, 6).

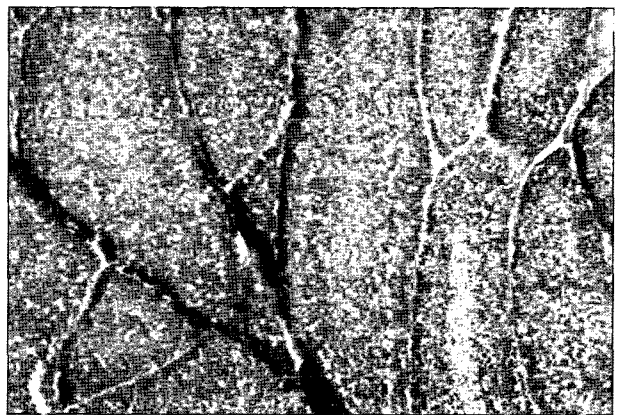


Fig. 5. Normal appearance of thymus of a chicken after 21 days on the semipurified control diet.



Fig. 6. The thymic lymph node from a chicken treated with T-2 toxin for 21 days reveals lymphoid cell depletion.

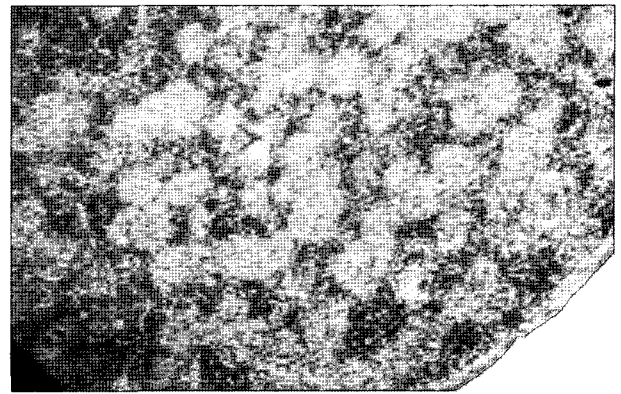


Fig. 7. Microscopic appearance of atrophic spleen of a chicken after 21 days on dietary T-2 toxin. Splenic red pulp became hypoplasia and lymphoid cell depletion in white pulp.

DNA 손상 측정

DNA 손상 정도를 관찰하기 위하여 슬라이드마다 50개의 세포를 관찰하여 DNA 손상 지표를 나타내는 손상된 DNA 이동 거리, DNA 직경, tail moment와 tail length 값으로 분석한 결과 T-2 toxin 첨가 시 농도 의존적으로 현저하게 DNA 손상이 나타났다(Fig. 8, Table 7, 8).

이러한 결과는 T-2 toxin을 닭에 투여하여 DNA 손상을

직접 연구한 문헌이 없어서 직접 비교하기는 힘들지만 Atroshi *et al.*(1997)이 T-2 toxin을 생쥐에 투여하여 DNA 손상을 연구한 결과 대조군에 비하여 처리군에서 76%의 DNA 손상을 보고하여 DNA 손상의 경향이 일치하였고, Kamp *et al.*(2005)과 Özcelik *et al.*(2004) 이 비록 T-2 toxin은 아니지만 ochratoxin A를 쥐에 투여하

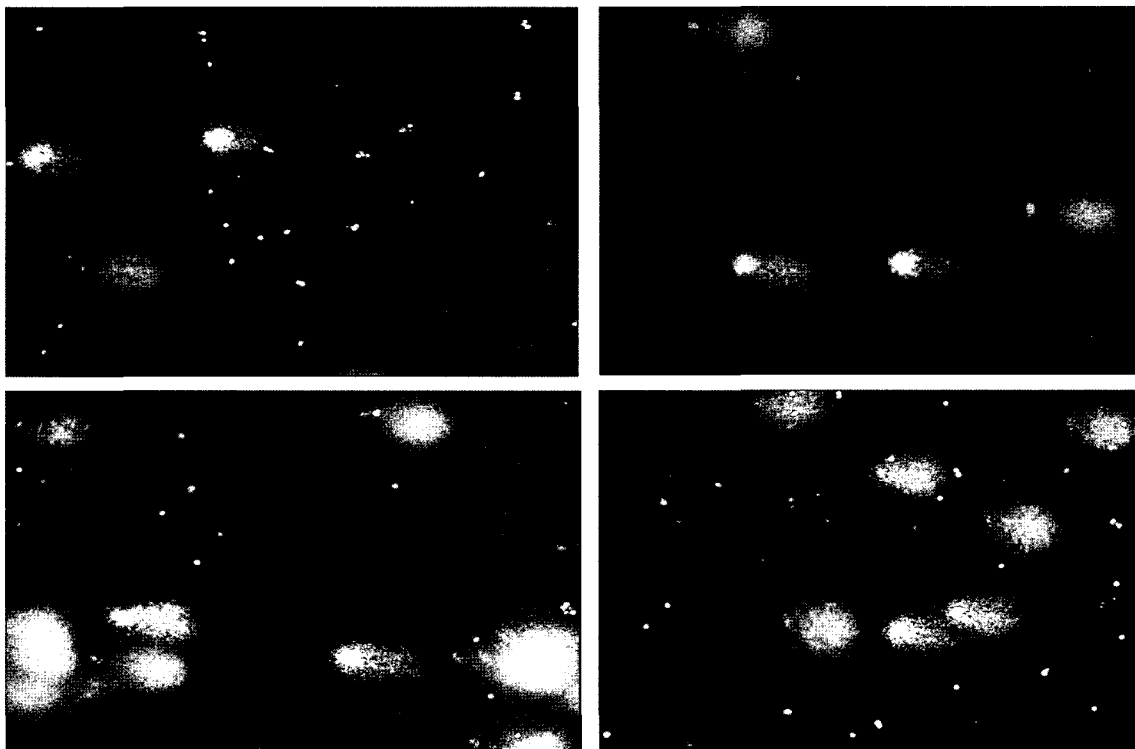


Fig. 8. Representative images of T-2 toxin induced oxidative DNA damage in chickens. Typical comets are shown in groups non-treated (upper left) and treated with 4 µg (upper right), 8 µg (bottom left) and 16 µg (bottom right) with the dietary supplementation of T-2 toxin for 21 days.

Table 7. Effects of T-2 toxin on the DNA damage of the blood in chickens (Means \pm SD)

T-2 toxin (μ g/g of diet)	Scored cells	Tail moment (TM)	Tail length (TL)
Control	100	17.88 \pm 3.76 ^a	59.21 \pm 2.81 ^a
4	100	31.85 \pm 2.58 ^b	98.15 \pm 3.25 ^a
8	100	49.05 \pm 3.54 ^b	167.02 \pm 12.16 ^b
16	100	92.22 \pm 1.24 ^c	207.47 \pm 11.58 ^c

^{abc}Values with different superscript within the same column are significantly different ($p < 0.05$).

Table 8. Effects of T-2 toxin on the percentage of head DNA and tail DNA of the blood in chickens (Means \pm SD)

T-2 toxin (μ g/g of diet)	Scored cells	Head DNA (%)	Tail DNA (%)
Control	100	45.44 \pm 3.59 ^a	54.56 \pm 4.54 ^a
4	100	31.80 \pm 1.17 ^b	68.20 \pm 4.87 ^b
8	100	29.57 \pm 2.21 ^b	70.43 \pm 3.48 ^b
16	100	12.22 \pm 0.98 ^c	87.78 \pm 5.21 ^c

^{abc}Values with different superscript within the same column are significantly different ($p < 0.05$).

여 관찰한 결과와도 일치한 것으로 보아 곰팡이 독소는 생체에서 DNA 손상을 유도한다는 것을 알 수 있겠다.

결 론

7일령 닭에 T-2 toxin을 4, 8, 16 μ g/g of diet 농도로 21일간 급여하여 comet assay 방법으로 T-2 toxin 이 닭 혈액 DNA 손상에 미치는 영향과 독성을 분석한 결과 닭 혈액 DNA는 T-2 toxin에 의해서 용량 의존적으로 유의한 손상을 받았고($p < 0.05$), 일당 체중 증가율과 사료 효율은 유의적($p < 0.05$)으로 감소하였으며, 면역장기인 비장, 흉선과 F낭(bursa of Fabricius)의 중량이 현저하게 감소하였다($p < 0.05$). 혈액 성분 중 Hb, MCH, HCT, lymphocytes 치가 현저하게 감소하였으나 uric acid 치를 제외한 혈청 성분은 영향을 적게 받았다. 육안적 부검 소견 및 병리조직학적 소견으로는 임파조직의 심한 위축과 임파구 고갈 현상이 뚜렷하였다. 이상의 결과로 보아 T-2 toxin은 닭 혈액 DNA에 현저한 손상을 유발하며, 조혈장기와 면역장기를 억제하는 것으로 판단된다.

참고문헌

김종수 (1985): 기니피그에서 실험적 trichothecene (T-2) 독소중독증. 서울대학교 대학원 박사학위 논문.
 Atroushi, F., Rizzzo, A., Biese, I., Veijalaninen, P., Antila, E. and Westermarck, T. (1997): T-2 toxin-induced DNA damage in mouse liver: the effect of pretreatment with coen-

zyme Q10 and α -tocopherol. *Molec. Aspects Med.*, **18**, 255-258.
 Boonchuvit, B., Hamilton, P.B. and Burmeister, H.R. (1975): Interaction of T-2 toxin with *salmonella* infections of chickens. *Poul. Sci.*, **54**, 1693-1975.
 Chi, M.S., Mirocha, C.J., Kurtz, H.J., Weaver, G., Bates, F. and Shimoda, W. (1977): Subacute toxicity of T-2 toxin in broiler chicks. *Poul. Sci.*, **56**, 306-313.
 Chowdhury, S.R. and Smith, T.K. (2004): Effects of feeding blends of grain naturally contaminated with fusarium mycotoxins on performance and metabolism of laying hens. *Poul. Sci.*, **83**, 1849-1857.
 Chowdhury, S.R., Smith, T.K., Oremans, H.J. and Woodward, B. (2005): Effects of feed-borne fusarium mycotoxins on hematology and immunology of laying hens. *Poul. Sci.*, **84**, 1841-1850.
 Daniel, G., Isabella, D.D., Roberto, C., Aldo, M. and Raniel, R. (2003): An improved HPLC measurement for GSH and GSSG in human blood. *Free Rad. Biol. & Med.*, **35**, 1365-1372.
 Djelic, N. and Anderson, D. (2003): The effect of antioxidant catalase on oestrogens, triiodothyronine, and noradrenaline in the Comet assay. *Terato Carcino Mutagen Supple*, **2**, 69-81.
 Doerr, J.A., Hamilton, P.B. and Burmeister, H.R. (1981): T-2 toxicosis and blood coagulation in young chickens. *Toxico. Appl. Pharm.*, **60**, 157-162.
 Freidovich, I. (1999): Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann. NY Acad. Sci.*, **893**, 13-15.
 Gedik, C.M., Ewen, S.W.B. and Collins, A.R. (1992): Single-cell gel electrophore applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, **62**, 313-320.
 Glass, G.A. and Stark, A.A. (1997): Promotion of glutathion-r-glutamyl transpeptidase - dependent lipid peroxidation by copper and ceruloplasmin: The requirement for iron and the effects of antioxidants and antioxidant enzymes. *Envir. & Mole. Mut.*, **29**, 73-80.
 Grizzle, J.M., Kersten, D.B., McCracken, M.D., Houston, A.E. and Saxton, A.M. (2004): Determination of the acute 50% lethal dose T-2 toxin in adult bobwhite quail: Additional studies on the effect of T-2 toxin mycotoxin on blood chemistry and the morphology of internal organs. *Avian. Disease.*, **48**, 392-399.
 Gyongyossy, I.C. and Khachatourians, G.G. (1985): Interaction of T-2 toxin and murine lymphocytes and the demotration of a threshold effect on macromolecular synthesis. *Biochemica Biophysica Acta*, **844**, 167-173.
 Haillwell, B. (1992): Oxygen radicals as key mediators in neurological disease: fact or fiction?. *Annals Neurology*, **32**, 10-15.
 Hayes, M.A., Bellamy, J.E.C. and Schiefer, H.B. (1980): Subacute toxicity of dietary T-2 toxin in mice: Mophological and hematological effects. *Can. J. Copm. Med.*, **44**, 203-218.
 Ignarro, L.J., Cirino, G. and Casini, A. (1999): Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system. *J. Cardio. Pharm.*, **34**, 879-889.

- Inatani, R., Nakatani, N. and Fuwa, H. (1996): Antioxidative effect the constituent of rosemary and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 520-528.
- Kamp, H.G., Eisenbrand, G., Janzowski, C., Kiossev J., Latendresse, J.R., Schlatter, J. and Turesky, R.J. (2005): Ochratoxin A induce oxidative DNA damage in liver and kidney after oral dosing to rat. *Mol. Nutr. Food Res.*, **49**, 1160-1167.
- Kumpawat, K., Deb, S., Ray, S. and Chatterjee, A. (2003): Genotoxic effect of raw betel-nut extract in relation to endogenous glutathione levels and its mechanism of action in mammalian cells. *Mut. Res.*, **538**, 1-12.
- Koppen, G. and Angelis, K.J. (1998): Repair of X-ray induced DNA damage measured by the comet assay in roots of *Vicia Faba*. *Environ. Molecular Mutat.*, **32**, 281-285.
- Lesson, S., Diaz, G. and Summers, J.D. (1995): Trichochece. In *Polutry metabolic disorders and mycotoxins*. University Book, Guelph, Ontario, Canada. pp. 190-226.
- Mann, D.D., Buening, G.M., Hook, B.S. and Osweiler, G.D. (1982): Effect of T-2 toxin on the bovine immune system : Humoral factors. *Infect. Immun.*, **36**, 1249-1252.
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P. and Collins, A. (1993): The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res.*, **288**, 47-63.
- McCord, J.M. (2000): The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am. J. Med.*, **108**, 652-662.
- Mohankumar, M.N., Janani, S., Prabhu, B.K., Kumar, P.R.V. and Jeevanram, R.K. (2002): DNA damage and integrity of UV-induced DNA repair in lymphocytes of smokers analysed by the comet assay. *Mutat. Res.*, **520**, 179-187.
- Nakadate, M., and Ueno, Y. (1990): Selected mycotoxin : ochratoxins, trichothecenes and ergot. *Environ. Health Criter.*, **125**, 71-164.
- Nigro, M., Grenzilli, G., Scarcelli, V., Gorbi, S. and Regoli, F. (2002): Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Mar. Environ. Res.*, **54**, 517-520.
- Özcelik, N., Soyz, M. and Kilinc, I. (2004): Effect of ochratoxin A on oxidative damage in rat kidney : Protective role of melatonin. *J. Appl. Toxicol.*, **24**, 211-215.
- Rasotogi, R., Srivastava, A.K. and Rastogi, A.K. (2001): Long term effect of aflatoxin B1 on lipid peroxidation in rat liver and kidney : effect of *picroliv* and *silymarin*. *Phytother. Res.*, **15**, 307-310.
- Rizzo, A.F., Atroshi, F., Hirvi, T. and Saloniemi, H. (1992): The hemolytic activity of deoxynivalenol and T-2 toxin. *Natural Toxins*, **1**, 106-110.
- Shugart, L.R. (1988): Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding assay. *Aquat. Toxicol.*, **13**, 43-52.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, **175**, 184-191.
- Smith, B.J., Holliday, S.D. and Blaylock, B.L. (1994): Hematopoietic alterations after exposure to T-2 mycotoxin. *Toxicol.*, **32**, 1115-1123.
- Steinmetz, K.A. and Potter, J.D. (1991): Vegetables, fruit and cancer. II. mechanisms. *Cancer Causes and Control.*, **2**, 427-442.
- Swamy, H.V.L., Smith, T.K., Karrow, N.A. and Boremans, H.J. (2004): Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with fusarium mycotoxins on growth and immunological parameters of broiler chickens. *Poul. Sci.*, **83**, 533-543.
- Ueno, Y. (1977): Mode of action of trichothecenes. *Pure. Appl. Chem.*, **49**, 1737-1745.
- Ündeğer, Ü., Başaram, N. (2002): Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures by the alkaline comet assay. *Arch. Toxicol.*, **76**, 430-436.
- Wen, H.C., Beth, A.V. and Xin, G.L. (1999): High level dietary vitamin E do not replace cellular glutathione peroxidase in protecting mice from acute oxidative stress. *Biochem. Mole. Action. Nut.*, **98**, 1951-1957.
- Wu, G., Flynn, A.W. and Jolly, C.A. (1999): Dietary protein or arginine deficiency impairs constitutive and inducible nitric oxide synthesis by young rats. *J. Nutr.*, **129**, 1347-1357.
- Wyatt, R.D., Hamilton, P.B. and Burmeister, H.R. (1973): The effects of T-2 toxin in broiler chickens. *Poul. Sci.*, **52**, 1853-1859.
- Yun, Z.F., Sheng, Y. and Guoyao, W. (2002): Free radicals, antioxidants, and Nutrition. *Nutrition.*, **18**, 872-879.
- Zheng, M. and Storz, G. (2000): Redox sensing by prokaryotic transcription factors. *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 1-8.