

## AFLATOKSİN VE AFLATOKSİN BAĞLAYICISI OLAN POLİVİNİL POLİPİROLİDON (PVPP) VERİLEN BROİLERLERDE PERİTONEAL MAKROFAJLARIN FAGOSİTİK VE MİKROBİSİDAL AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ \*

İlhami Çelik<sup>1</sup>

Halis Oğuz<sup>2</sup>

Ömer Demet<sup>2</sup>

Murat Boydak<sup>1</sup>

Hasan Hüseyin Dönmez<sup>3</sup>

### Determination of Phagocytic and Candidacidal Activities of Peritoneal Macrophages Isolated from Chickens Fed with Aflatoxin and an Aflatoxin Adsorbing Agent, Polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) Containing Feed

**Summary :** In this study effects of aflatoxicosis, which was experimentally induced by giving mixed aflatoxins in feed (2.5 mg/kg) for 21 days, on phagocytic and Candidacidal activities of chicken peritoneal macrophages and preventive action of polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) supplementation (3g/kg) were investigated. Feeding experiments were performed on totally 200 male one-day-old chicks of Avian strain. The animals were divided into four groups each containing 50 chickens and feed with different diets as follows: First group, with commercial broiler feed. Second group, with mixed aflatoxins containing (2.5 mg/kg) commercial broiler feed. Third group, with PVPP (0.3 %) supplemented commercial broiler feed. Fourth group, with both PVPP (0.3 %) and mixed aflatoxins (2.5 mg/kg) containing feed. At the end of the feeding experiment, peritoneal macrophages were isolated. The phagocytic and intracellular Candidacidal indices were determined. The data were analysed statistically. The results have revealed that aflatoxicosis depressed both phagocytic and Candidacidal potential of peritoneal macrophages. PVPP addition prevented the animals from depressive effects caused by aflatoxins on peritoneal macrophage functions.

**Key words :** Aflatoxicosis, peritoneal macrophages, polyvinylpolypyrrolidone addition.

**Özet :** Bu çalışmada yemle 21 gün süreyle 2,5 mg/kg yem düzeyinde karışık aflatoksin verilerek oluşturulan deneysel aflatoksinikoziste etlik civcivlerin peritoneal makrofajlarının fagositik ve Candidasidal etkinlikleri ile yeme 3 g/kg düzeyinde ilave edilen polivinil polipirolidon (PVPP)'un koruyucu etkisi araştırıldı. Yedirme denemeleri 200 adet Avian ırkı, günlük erkek etçi civcivde gerçekleştirildi. Hayvanlar, herbirinde 50'şer civciv bulunan 4 gruba ayrıldı ve aşağıdaki yemlerle beslendi: Birinci grup ticari etlik piliç yemiyle, ikinci grup 2.5 mg/kg düzeyinde aflatoksin içeren ticari etlik piliç yemiyle, üçüncü grup % 0.3 oranında PVPP ilave edilen ticari etlik piliç yemiyle, dördüncü grup % 0,3 oranında PVPP ve 2.5 mg/kg düzeyinde aflatoksin içeren ticari etlik piliç yemiyle. Yedirme denemesi sonunda, peritoneal makrofajlar elde edildi. Fagositik ve Candidasidal indeksler belirtildi. Sonuçlar istatistiksel metodlarla analiz edildi. Sonuçlar, aflatoksinikozisin makrofajların hem fagositöz ve hem de Candidasidal güçlerini baskıladığını ortaya koymaktadır. PVPP ilavesi hayvanları, aflatoksinterin peritoneal makrofajların görevlerinde neden olduğu baskılamadan korumaktadır.

**Anahtar kelimeler :** Aflatoksinikozis, peritoneal makrofajlar, polivinilpolipirolidon ilavesi.

### Giriş

Yemlerde üreyen *Aspergillus* türü küflerin metabolitleri olan aflatoksin- B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>), aflatoksin- B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoksin-G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>), aflatoksin -G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>) ve okratoksin-A (OA) ile *Fusarium* türlerinin

ürettiği T-2 toksin, özellikle etlik piliçlerde neden oldukları kronik mikotoksikozisler nedeniyle, önemli maddi kayıplara neden olmaktadır (Gerberick ve Sorenson, 1983; Kaya, 1984; Giambone 1985a; Singh ve ark., 1990).

Geliş Tarihi : 25.12.1995

\* Bu çalışma S.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

1. S.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, KONYA.

2. S.Ü. Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, KONYA.

3.Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Morfoloji Anabilim Dalı, VAN.

Kronik aflatoksikozisli hayvanlarda antikor yanıtı zayıflamakta (Thaxton ve ark., 1974; Özcan, 1984; Slowik ve ark., 1985; Özer ve ark., 1989), hücrel bağışıklık tepkimesinde düşüşler ortaya çıkmakta (Giambone ve ark., 1985b) ve hayvanların yemden yararlanma yetenekleri ile büyüme hızları düşmektedir (Gerberick ve Sorenson, 1983; Giambone ve ark., 1985b). İmmün sistemde oluşan görevsel yetmezliklerin, bursa Fabricii ve timusta meydana gelen atrofi sonucu perifer kan lenfositlerinin sayı ve görevlerinde ortaya çıkan düşüşler (Thaxton ve ark., 1974; Slowik ve ark., 1985) ile fagositik hücrelerin görevlerinde oluşan kayıplara (Ortiz-Neldon ve Qureshi, 1992) bağlı olduğu ortaya konmuştur. İmmün sistemin zayıflaması sonucu hayvanlar bakteriyel, viral ve paraziter hastalıklara daha duyarlı hale gelmektedir (Giambone ve ark., 1985b).

En tehlikeli ve biyolojik etkinliği en yüksek düzeyde olan AFB<sub>1</sub>, zararlı etkileri ve etki mekanizması en iyi anlaşılmış olan aflatoksindir. Yapılan çalışmalarda bu toksinin, karaciğerde karma görevli oksidaz (MFO) enzim sistemi tarafından etkin metabolitine dönüştürüldükten sonra sitotoksik, mutajenik, karsinojenik özellik kazandığı ortaya konmuştur (Körenlampi, 1977; Ortiz-Neldon ve Qureshi, 1992). MFO enzim sistemi tarafından etkinleştirilen AFB<sub>1</sub>'in kanatlı peritoneal makrofajlarında önemli morfolojik dejenerasyonlara neden olduğu ve bu hücrelerin koyun alyuvarlarını fagosite etme kapasiteleri ile cama tutunma yeteneklerini zayıflattığı bildirilmiştir (Ortiz-Neldon ve Qureshi, 1992).

Aflatoxinlerle bulaşık yemlerin değerlendirilmesi amacıyla, temiz yemlerle karıştırılmak suretiyle toksin düzeylerinin düşürülmesi (Şanlı, 1980), toksinlerin etkisizleştirilmesi (Park ve ark., 1988), yeme yüzeyde tutucu ilave ederek toksinlerin emiliminin engellenmesi (Carson ve Smith, 1983., Bonna ve ark., 1991; Harvey ve ark., 1991) gibi yöntemler uygulanmaktadır. En yaygın olarak kullanılan yüzeyde tutucular zeolit, bentonit, alüminyum silikat, etkin karbon, polivinilpolipirrolidon (PVPP) ve bunların karışımlarıdır (Carson ve Smith, 1983; Harvey ve ark., 1991). Bu yüzeyde tutuculardan PVPP'nin, yeme %0,5 oranında ilave edildiğinde, yemdeki aflatoxinlerin emilimini %79-91 oranında azalttığı ileri sür-

rülmektedir (Interpremix Ges. M.B.H. SPB., 1991). Bu madde, yemde bulunan vitaminler gibi yüksek elektriksel yüklü moleküllerin emilimini de azalttığından, bu özelliği kullanımında önemli bir sakınca oluşturmaktadır. Bu çalışmada, yeme 2, 5 mg/ kg düzeyinde ilave edilen aflatoxin karışımının kanatlı peritoneal makrofajlarının fagositoz ve Candidasidal kapasiteleri üzerindeki etkilerinin ve yeme %0, 3 oranında, aflatoxinlerle birlikte eklenen PVPP'nin makrofaj fonksiyonları üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### Materyal ve Metot

A. Hayvan Materyali : Bu çalışmada 200 adet Avian ırkı, günlük erkek etçi civciv kullanıldı. Hayvanlar her birinde 50 civciv bulunan 4 gruba ayrıldı.

1. Gruba 0-4 hafta ticari etlik piliç yemi verildi.

2. Gruba 2.5mg /kg düzeyinde *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 suşu kullanılarak fermentasyon yöntemiyle (Shotwell ve ark., 1966; Demet ve ark., 1995) pirinçte üretilen aflatoxin karışımı (%83,06 AFB<sub>1</sub>, %12,98 AFB<sub>2</sub>, %2,84 AFG<sub>1</sub>, %1,12 AFG<sub>2</sub>) ilave edilen ticari etlik piliç yemi verildi.

3. Gruba %0,3 oranında PVPP ilave edilen ticari etlik piliç yemi verildi.

4. Gruba %0,3 oranında PVPP ve 2, 5 mg/kg düzeyinde aflatoxin karışımı ilave edilen ticari etlik piliç yemi verildi.

Bütün gruplara yem ve su, 21 gün süreyle ad libitum verildi.

B. Peritoneal Makrofajların İzolasyonu ve Bu Hücrelerin Fagositoz Kapasiteleri ile Candidasidal Aktivitelerinin Belirlenmesi :

Peritoneal makrofajlar, Ortiz-Neldon ve Qureshi'nin (1992) bildirdiği yöntemle izole edildi. Bu amaçla yedirme süresinin sonunda her gruptan 6'şar hayvana serum fizyolojikte (%0,9 NaCl) şişirilmiş %3'lük Sephadex G-50 (Pharmacia), 1 ml/100 g vücut ağırlığı dozunda periton boşluğuna enjekte edildi. Kırksekiz saat sonra hayvanlar öldürülerek; periton boşlukları, 30 ml heparin'li (10 IU/ml heparin, Liquemine, Roche) serum fizyolojikte yıkandı. Elde edilen eksudat, plastik tüplere alınarak 285 G'de 15 dakika süreyle + 4°C'de

santrifuj edildi. Oluşan pelet, %10 oranında fetal sığır serumu (Gibco) içeren 2 ml RPMI 1640 (Sigma) ile resüspanse edildi. Süspansiyondaki canlı makrofaj oranı, trypan blue metodu (Phillips, 1979) ile belirlenerek canlı makrofaj oranı  $2 \times 10^6$  hücre/ml'ye ayarlandı. Makrofaj başına 8 adet *Candida albicans* (M 51) ilave edilen tüpler, 37°C'deki benmaride 4 rpm'de çalkalanarak 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her örnekten 2'şer lama 500 µl süspansiyon alınarak üzerine 125 µl acridine orange (Sigma) solüsyonu (14 mg acridine orange/100 ml RPMI 1640) ilave edildi ve 1 dakika beklendikten sonra floresan mikroskopta (Leitz Ortholux-II) incelendi. Nükleusları yeşil-sarı floresans veren makrofajlarla *Candidalar* canlı, portakal sarısı-kırmızı floresans verenler ölü olarak kabul edildi (Bertalanffy, 1962). Ayrıca her örnekten, May Grünwald- Giemsa yöntemiyle boyanarak (Culling ve ark., 1985) hazırlanan 2'şer preparat, ışık mikroskobunda incelendi. Gerekli görülen bölgelerin fotoğrafları çekildi.

Her preparatta 200 makrofaj sayılarak fagositoz ve *Candidasidal* indeksler (fagositoz yapan ve *Candidasidal* aktivite gösteren makrofaj yüzdeleri) hesaplandı. Işık mikroskopik incelemelerde makrofajlardaki morfolojik dejenerasyonlar da belirlendi.

Elde edilen sayısal veriler analiz edilerek, grupların ortalama değerleri arasındaki farkların önem dereceleri tespit edildi (Kutsal ve ark., 1990).

## Bulgular

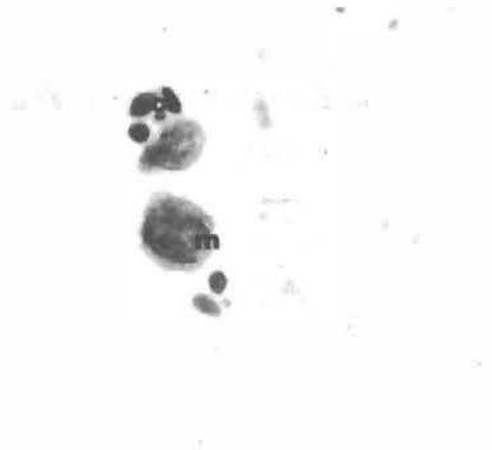
Kontrol grubundan izole edilen peritoneal makrofajlar, iri, çekirdekleri çentikli ve kromatin dağılımı monositlerinkine benzeyen hücreler şeklinde gözlemlendi (Şekil 1). Fagositoz yapmış olan hücrelerin sitoplazmalarında 1-7 arasında değişen sayıda *Candida*'ya rastlandı (Şekil 3 ve 4).

Yemlerine 2, 5 mg /kg düzeyinde aflatoksin karışımı ilave edilen hayvanlardan elde edilen peritoneal makrofajların önemli bir kısmında iri sitoplazmik vakuoller ve piknotik çekirdeklerle karakterize morfolojik dejenerasyonlara rastlandı (Şekil 2). Bu hücreler cama tutunmadıklarından, daha düzgün ve yuvarlak şekilliydiler.

Yemlerine tek başına PVPP ve PVPP'nin aflatoksinle birlikte ilave edildiği gruplardan izole edilen makrofajlarda morfolojik dejenerasyonlar gözlemlenmedi.

Floresan mikroskopik incelemelerde canlı makrofaj ve *Candidaların* yeşil-sarı (Şekil 3), ölü olanların ise portakal sarısı-kırmızı (Şekil 4) floresans verdikleri gözlemlendi.

Grupların fagositik ve *Candidasidal* indeksleri ile sayısal verilerin analiz sonuçları Tablo 1'de verilmiştir.



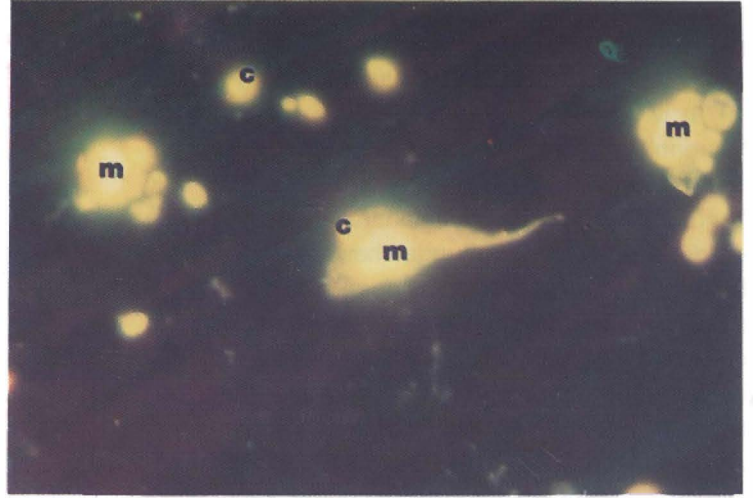
Şekil 1. Kontrol grubundan izole edilen peritoneal makrofaj (m) ve fagosite edilmemiş *Candidalar* (c). May Grünwald-Giemsa, x1400.



Şekil 2. Yemlerine aflatoksin karışımı ilave edilen gruptan izole edilmiş peritoneal makrofaj (m) ve fagosite edilmemiş *Candidalar* (c) görülmekte. İri sitoplazmik vakuoller (oklar) ve piknotik nükleus (n) belirgin. May Grünwald-Giemsa, x1200.

Tablo 1.Peritoneal Makrofajların Fagositoz ve Candidasidal İndeksleri\*

	Hayvan No	Fagositoz	Candidasidal
		İndeksi (%)	İndeks (%)
1.Grup	1	46.3	63.3
	2	48.6	61.6
	3	45.8	64.2
	4	49.2	58.4
	5	47.8	62.8
	6	45.6	63.4
		$\bar{X} = 47.22 \pm 1.53a$	$\bar{X} = 62.28 \pm 2.09a$
2.Grup	1	24.2	32.3
	2	23.8	31.8
	3	25.6	34.8
	4	24.6	33.6
	5	22.9	34.2
	6	24.8	30.8
		$\bar{X} = 24.32 \pm 0.92c$	$\bar{X} = 32.92 \pm 1.53b$
3.Grup	1	45.6	62.5
	2	44.8	61.8
	3	46.2	63.4
	4	44.6	60.5
	5	43.8	59.6
	6	42.2	62.3
		$\bar{X} = 44.53 \pm 1.41b$	$\bar{X} = 61.68 \pm 1.40a$
4.Grup	1	43.8	60.3
	2	45.6	59.8
	3	42.4	62.4
	4	45.2	61.6
	5	43.8	57.8
	6	44.6	58.8
		$\bar{X} = 44.23 \pm 1.16b$	$\bar{X} = 60.12 \pm 1.71a$



Şekil 3. Kontrol grubundan izole edilen fagositoz yapmış canlı makrofajlar (m) ile fagosite edilmemiş canlı Candidalar (c) görülmekte. Acridine orange, x1100.



Şekil 4. Çok sayıda candida (c) fagosite etmiş canlı bir makrofaj (m) görülmekte. Ölü olan Candidalar kırmızı floresans vermektedir. Acridine orange, x1100.

### Tartışma ve Sonuç

Çok düşük düzeylerde aflatoksin içeren yemlerin uzun süre yedirilmesi sonucu oluşan kronik aflatoksikozisler, tavukçuluk sektöründe önemli kayıplara neden olmaktadır. Kronik aflatoksikozislerin daha sık ortaya çıkmasının önemli bir sebebi, bu maddelerin ÖD 50 değerlerinin çok daha altındaki düzeylerde alındıklarında bile immün sistemde baskıya neden olmalarıdır. AFB<sub>1</sub>'in günlük ördek pa-

\*Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalama değerler arasındaki farklar önemli (P < 0.01) bulunmuştur.

lazlarındaki ÖD50 değeri 0,3-0,6 mg /kg iken, 1,5 mg'lık tek dozu, bu hayvanların timus ve bursa Fabricii'lerinde küçülme ile bağışıklık sisteminin görevlerinde önemli yetmezlikler oluşturmaktadır (Slovak ve ark., 1985). Thaxton ve ark. (1974), yemde 0.625 mg/kg düzeyinde AFB<sub>1</sub> bulunduğunda tavukların antikor yanıtında önemli düşüşler oluştuğunu bildirmişlerdir. Giambone ve ark. (1985a) ise, yemdeki 200 µg/kg düzeyindeki AFB<sub>1</sub>'in hücresel bağışıklığı baskılamakla birlikte, hayvanların New Castle ve kanatlı kolerasına duyarlılıklarını artırmadığını ileri sürmüşlerdir.

Aflatoksinlerin bağışıklık sisteminin görevlerini baskılayıcı etkileri yemdeki toksin düzeyleri ile yedirme sürelerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Thaxton ve ark., 1974). Farklı aflatoksinler arasında sinerjik etki bulunması nedeniyle, bir kaçını aynı anda alındıklarında tek başlarına alındıklarında etkili oldukları düzeylerin çok daha altında da etkili olabilmektedirler (Giambone ve ark., 1985b).

Aflatoksikozisli kanatlıların mononükleer fagositik sistemlerinin kandaki karbon parçacıklarını temizleme ve kan heterofillerinin Staphylococcus aureus'u fagosite etme yeteneklerinin, normal hayvanlardan daha düşük olduğu tespit edilmiştir (Michael ve ark., 1973; Chang ve Hamilton, 1979; Giambone ve ark., 1985b).

Aflatoksinlerin, rat alveoler makrofajlarının fagositoz yeteneklerinde de önemli kayıplara neden olduğu bildirilmektedir (Roberts, 1979). OA 'nın ise dalak makrofajlarının nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgeme kapasitelerini azalttığı gösterilmiştir (Singh ve ark., 1990).

Bu çalışmada, 21 gün süreyle, yemle 2, 5 mg/kg düzeyinde karışık aflatoksin yedirilerek deneysel aflatoksikozis oluşturulan etlik piliçlerin peritoneal makrofajlarının hem fagositik ve hem de Candidasidal indekslerinin, kontrol grubundan önemli derecede (P<0.01) düşük olduğu tespit edildi (Tablo 1). Ortiz-Neldon ve Qureshi (1992), in vitro koşullarda AFB<sub>1</sub>'e maruz bıraktıkları kanatlı peritoneal makrofajlarının koyun alyuvarlarını fagosite etme kapasitelerinin, AFB<sub>1</sub>'in karaciğer epitel hücrelerindeki karma görevli oksidaz (MFO) enzim sistemiyle etkinleştirilmesi halinde, önemli oranda baskılandığını göstermişlerdir. Mak-

rofajlarda bu enzim sistemi bulunmamaktadır. Biyokimyasal çalışma sonuçları (Köser ve ark., 1988) AFB<sub>1</sub>'in moleküler oksijen ve NADPH varlığında sitokrom P-450 bağımlı karaciğer MFO enzim sistemi tarafından etkin metaboliti olan AFB<sub>1</sub>-2-3-oksit'e dönüştürüldüğünü ve oldukça etkin olan bu metabolitin deoksiribonükleik asitteki N7-guanin'e bağlanarak etkisini gösterdiğini ortaya koymuştur. Ortamda 5 µg/ml yoğunluğunda bulunan AFB<sub>1</sub>, MFO enzim sistemiyle etkinleştirildiğinde, peritoneal makrofajların cama tutunma ve koyun alyuvarlarını fagosite etme kapasitelerini önemli oranda baskılamaktadır (Ortiz-Neldon ve Qureshi, 1992). Makrofajlarda oluşan morfolojik dejenerasyonlar, bu hücrelerin cama tutunma ve fagositoz yeteneklerinde düşüşlere neden olmaktadır. Bilindiği gibi psödopodyumlar, makrofajların fagositoz ve cama tutunma yeteneklerini önemli oranda etkileyen hücre zarı özelleşmeleridir.

Makrofajlar sistemi, vücuda giren yabancı antijenleri fagosite ederek oluşturdukları kritik antijenik determinantları lenfositlere sunarak bağışıklık sistemi tepkimelerinin oluşumunda çok önemli bir yer tutmaktadır. Bu hücrelerin fonksiyonlarında kayıplara neden olan çevresel faktörler, canlıların hastalıklara daha duyarlı hale gelmesine neden olur. Kronik aflatoksikozis sonucu makrofaj fonksiyonlarında oluşan yetmezlikler, kanatlıları koksidioz, salmonelloz ve Marek hastalığına daha duyarlı hale getirmektedir (Gerberick ve Sorenson, 1983; Boorman ve ark., 1984; Giambone ve ark., 1985a; Giambone ve ark., 1985b; Ortiz-Neldon ve ark., Qureshi, 1992). Aflatoksinler, kemik iliği üzerinde toksik etki göstermeleri nedeniyle mononükleer fagositik hücrelerin yapım hızlarını da azaltmaktadır (Boorman ve ark., 1984; Ortiz-Neldon ve Qureshi, 1992).

In vitro çalışmalarda piperonil bütoksit'in AFB<sub>1</sub>'in MFO ko-enzim sistemiyle etkinleştirilmesini engelleyerek (Ortiz-Neldon ve Qureshi 1992), alfa-naftoflavon'un ise kanatlı immün sistem dokularındaki P-450 etkinliğini bloke ederek (Lom ve ark., 1990), bu toksinin bağışıklık sistemini baskılayıcı etkilerini ortadan kaldırdığı tespit edilmiştir. Ancak, günümüzde bu iki maddenin kullanımı henüz yaygın değildir. Bu amaçla en yaygın olarak kullanılan maddeler arasında polivinilpolipirolidon

(PVPP), zeolitler, bentonitler, diatoma toprağı gibi alüminyum silikat bileşikleni, etkin kömür ve bunların karışımları önemli bir yer tutmaktadır (Carson ve Smith, 1983; Bonna ve ark., 1991). Yeme %0,5 oranında ilave edilen PVPP'nin yemdeki aflatoksinlerin %79-91 gibi çok önemli bir kısmının emilimini engellediğı bildirilmektedir (Interpremix Ges. M.B.H. SPB, 1991). Bu çalışmada yemlerine %0,3 oranında PVPP ilave edilen grubun peritoneal makrofajlarının fagositoz indeksi, yemlerinde 2,5 mg/kg düzeyinde aflatoksin bulunan grubun fagositoz indeksinden önemli derecede ( $P<0.01$ ) yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda yemlerine 2,5 mg/kg düzeyinde aflatoksinle birlikte % 0,3 oranında PVPP ilave edilen grubun fagositoz indeksi de sadece aflatoksin ilave edilen grubunkinden önemli derecede ( $P<0.01$ ) yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar yeme % 0,3 oranında ilave edilen PVPP'nin, aflatoksinlerin emilimini önemli oranda azalttığı görüşünü (Interpremix Ges. M.B.H. SPB, 1991) desteklemektedir. Bununla birlikte yemlerine PVPP'nin tek başına ilave edildiğı grubun fagositoz indeksi, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli derecede ( $P< 0.01$ ) düşük bulunmuştur.

Sonuç olarak yemde 2,5 mg/kg düzeyinde bulunan karışık aflatoksin, kanatlıların peritoneal makrofajlarında belirgin morfolojik dejenerasyonlara neden olmakta ve bu hücrelerin görevlerini önemli oranda baskılamaktadır. Yeme %0,3 düzeyinde PVPP ilavesi, bu bozuklukların ortaya çıkmasını önemli oranda engellemekle birlikte, bu maddenin yeme ilavesinde yemdeki vitaminler gibi yüksek polaniteli maddelerle, aflatoksin düzeyinin bilinmesi ve PVPP düzeyinin buna göre ayarlanması gereklidir.

### Kaynaklar

Bertalanffy, F.D. and Nagy, K.P. (1962). Fluorescence microscopy and photography with acridine orange. *Medical Radiograph. and Photography*, 38, 3:82-91.

Bonna, R.J., Auench, R.J., Bursina, S.J., Poppenga, R.H., Braselton, W.E and Watson, G.L. (1991). Efficacy of hydrated sodium calcium aluminosilicate (HSCAS) and activated charcoal in reducing the toxicity of dietary aflatoxin to mink. *Arch. of Env. Cont. and Toxicol.*, 20, 3:441-447.

Boorman, G.A., Horg H.L., Dieter, M.P., Hayes, H.T., Pohland A.E., Stack, M. and Luster, M.T. (1984). Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to Ochratoxin-A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 72:304-312

Carson, M.S. and Smith, T.K. (1983). Role of bentonite in prevention of T-2 Toxicosis in rats. *J. Anim. Sci.*, 57, 6:1498-1506.

Chang, C.F. and Hamilton, P.B. (1979). Impairment of phagocytosis in chicken monocytes during aflatoxicosis. *Poult. Sci.*, 58:562-566.

Culling, C.F.A., Allison, R.T. and Barr, W.T. (1985). "Cellular pathology technique". Bulterworth and Co. Ltd. London.

Demet, Ö., Oğuz, H., Çelik, İ., Nizamioğlu, F.(1995). Pirinçte aflatoksin üretilmesi. *Vet.Bil.Derg.*, 11, 1:19-23.

Gerberick, G.F. and Sorenson, W.G. (1983). Toxicity of T-2 toxin, a *Fusarium* mycotoxin, to alveolar macrophages in vitro. *Environmental Res.*, 32:269-285.

Giambone, J.J., Diener, U.L., Davis, N.D., Panangala, V.S., Hoerr, F.J., (1985a). Effects of aflatoxin on young turkeys and broiler chickens. *Poult. Sci.*, 64:1678-1684.

Giambone, J.J., Diener, U.L., Davis, N.D., Panangala, V.S., Hoerr, F.J., (1985b). Effects of purified aflatoxin on broiler chickens. *Poult.Sci.*, 64:852-858.

Harvey, R.B., Kubena, L.F., Phillips, T.D., Corrier, D.E., Ellisdæ, M.H. and Huff, W.E. (1991). Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with HSCAS. *Am.J.Vet. Res.*, 52, 1:152-156.

Interpremix Ges. M.B.H. SPB. (1991). Antitox (MycofixR) Plus and its effect on mycotoxins. St.Pölten, Austria.

Kaya, S.(1984). Yem ve besinlerdeki mikotoksinler: İnsan ve hayvan sağlığı için önemleri. *A.Ü.Vet.Fak.Derg.*, 36, 1:226-233.

Körenlampi, S.O.(1977). Mechanism of cytotoxicity of aflatoxin B1 : Role of cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 145:854-860.

Köser, P.L., Faletto, M.B., Maccubiddin, A.E and Cooroo, H.L.(1988). The genetics of aflatoxin B1 mechanism : Association of the induction of AFB1-4 hydroxylase with transcriptional activation of cytochrome P3-450 gene. *J.Biol.Chem.*, 263:12584-12595.

Kutsal, A., Alpan, Ö. ve Atpacık, R.(1990). İstatistik Uygulamalar. Bizim Büro Basımevi, Ankara.

- Lom, N.A., Golemboski, K.A., Dietert, R.R. and Bloom, S.E.(1990). Cytochrome P-450 catalysed activity in the bursa, thymus, peritoneal exudate cells (PECs) and liver of the 4 week old chicken after induction with 3, 4, 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB). *Poult.Sci.*, 69-85.
- Michael, G.Y., Thaxton, P. and Hamilton P.B. (1973). Impairment of the reticuloendothelial system of chicken during aflatoxicosis. *Poult. Sci.*, 52:1206-1207.
- Ortiz-Neldon, D.L. and Qureshi, M.A. (1992). The effects of direct and microsomal activated aflatoxin B1 on chicken peritoneal macrophages in vitro. *Veterinary Immunol. and Immunopathol.*, 31:61-76.
- Özcan, Z. (1984). Tavuklarda aflatoksinin etkisinde plazma hücrelerinin histometrik ve histomorfolojik incelenmesi. *A.Ü.Vet.Fak.Derg.*, 31, 1:137-153.
- Özer, A., Minbay, A., Özcan, Z. ve Yakışık, M.(1989). Deneysel aflatoksin zehirlenmesinin tavuklarda immün sistem hücrelerine ve antikor oluşumuna etkisi. *Doğa Vet. Hay. Derg.*, 13, 2:164-170.
- Park, D.L., Lee, L.S., Price, R.R. and Pohland, A.E. (1988). Review of the decontamination of aflatoxicosis by ammoniation, Current status and regulation. *J.A.O.A.C.*, 71, 4:685-703.
- Phillips, H.J. (1979). Dye exclusion tests for cell viability. In R.F. Kruse, Jr. and M.K. Patterson, J.R. (Editors). "Tissue culture methods and application." Academic press, New York, 406-408.
- Roberts, J.F. (1979). Effects of aflatoxin-B1 on rat peritoneal macrophages and mouse fibroblasts (L-M cells). *Gen. Pharmacol.*, 10:471-476.
- Shotwell, O.L., Hasseltine, C.V., Stubblefield, R.D. and Sorenson, W.G. (1966). Production of aflatoxin on rice. *Appl. Microbiol.*, 14, 3:425-429
- Sing G.S.P., Chauhan, H.V.S., Jha, G.J. and Singh, K.K. (1990). Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks. *J.Comp.Pathol.*, 103:399-410.
- Slowik, J., Graczyk, S. and Madej, J.A. (1985). The effect of a single dose of aflatoxin B1 on the value of nuclear index of blood lymphocytes and on histological changes in the liver, bursa Fabricii, suprarenal glands and spleen in Ducklings. *Felica Histochemica et Embryologica*, 23, 1-2:71-80.
- Şanlı, Y. (1980). Besinlerde küflenme olgusu, mikotoksinler ve mikotoksikozisler. *Gıda Bil. Tekn. Derg.*, 3, 3-4:127-148.
- Thaxton, J.P., Tung, H.T. and Hamilton, P.B. (1974). Immunosuppression in chickens by aflatoxin. *Poult. Sci.*, 53:721-725.