

AFLATOKSİNLER VE KANSER

L. AFRASYAP(1)

GENEL BİLGİLER

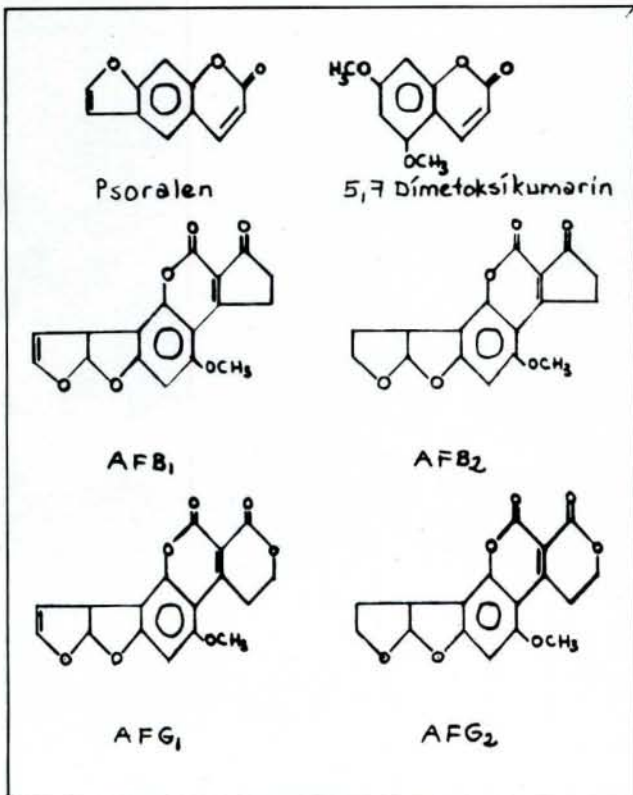
Aflatoksinler, mikotoksinler grubundan *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasitikus*'un fungal metabolitleridir. Özellikle mısır, fındık, fıstık, yerfıstığı, buğday gibi yağlı tohumlarda ve bu ürünlerin yağlarında bulunurlar. Dört majör AFL vardır. AFB1, AFB2, AFG1, AFG2. Bunlar arasında en toksik olanı AFB1, olup toksisite sıraları AFB1>AFG1>AFB2>AFG2 şeklindedir. AFL'lerin hidrosillenmesiyle meydana gelen AFM1, AFP1, AFQ1, daha az toksiktir. AFM1, çoğunlukla süt ve süt ürünlerinde bulunan hidrosillenme ürünüdür.

Aflatoksinlerin, toksisitelerini gösterebilmeleri için organizmada aktive olmaları gerekir. Bu aktivasyon ile DNA'ya bağlanan AFB1, hücrenin neoplastik transformasyonunda rol oynar. AFL'lerin en önemli fonksiyonları hepatokarsinogenik olmalarıdır. Ayrıca böbrek, karaciğer, barsak üzerinde etkilidirler.

YAPILARI

AFL'lerin kimyasal yapıları incelendiğinde 5,7 dimetoksikumarin halkası içerdikleri görülür. C2, ve C3 arasındaki çift bağ, toksisitelerinde önemlidir. Çift bağ ihtiva etmeyen AFB2 ve AFG2 bu nedenle daha az toksiktir (Tablo 1) (36).

Tablo I: AFL'lerin biokimyasal yapıları



AKTİVASYON

Aflatoksinler; toksik, mutajenik, karsinojenik etkilerini organizmada aktive olduktan sonra gösterirler. Aktivasyon iki şekildedir.

A- Mikrozomal Aktivasyon: Hücre mikrozomunda bulunan sitokrom AFB1'in C2 ve C3 arasındaki çift bağ açılarak AFB1 -epoksid meydana gelir. Bu ürün; DNA, RRNA, proteinler gibi hücrenin makromoleküllerine bağlanarak neoplastik transformasyonun başlamasına yol açar. Sitokrom p450 monooksijenaz enzim sistemi içinde p1 450 ve p3 450, p450 monooksijenaz'a göre daha hızlı ve aktif mutajenik ürünler oluşturan AFB1 epoksid'e neden olur. F448 ve F450 monooksijenazlar ile hidrosilaz enzimlerin katalitik etkisiyle AFB1'in daha az toksik olan hidrosillenme ürünleri (AFM1, AFP1, AFQ1) meydana gelir. Aktivasyon hücrede mikrozomda oluşur. AFB1-GSH meydana gelerek toksisite engellenir. Bu sistem hücrede denge halindedir (Tablo 2) (6,21,23,30,32,33,42).

Aktif AFB1-DNA'ya guanin'in N7 pozisyonunda kovalant bağlanarak, majör ürün olan AFB1-N7-Gua oluşur. Bu bileşik, imidazol halkasında lokalize pozitif bir yük ihtiva eder(5,6,22,26). Guanin'e olan bağlanma %80-90 arasındadır (6,39). AFB1-N7 Gua'nın yarı ömrü 7.5 saat olup, labil bir fraksiyondur ve bağlanmanın ilk yirmi dört saatinde %70'i DNA'dan uzaklaştırılır. Geri kalan kısım yarı ömrü daha uzun stabil derivatifiere döner. Bunun için önce imidazol halkası bölünür. N7'nin kimyasal transformasyonu ile AFB1-FAPY-I ve AFP1-FAPY-II meydana gelir(6,22,26,27,29,41). Diğer bir stabil derivatif, N7- Gua'nın ile AFP1'in C2'si arasındaki bağın hidralitik parçalanmasıyla oluşan AFP1dhd'dür. Bu bileşiğin meydana gelmesi, hasar görmemiş guanin'in çözünmesine bağlıdır(Tablo3) (39).

Aktif AFB1'in DNA'ya kovalant bağlanmasında iki ayrı teori mevcuttur.

1-AFB1 önce DNA'ya serbestçe diffüze olur.. Daha sonra baz dizilerini 5'den 3'e doğru okuyarak, belli baz dizilerindeki G rezidülerine bağlanır.

2. Bütün baz dizilerindeki G rezidüsüne bağlanma oranı aynıdır.

Ancak AFB1, DNA'ya serbestçe diffüze olamaz fakat özel dizilere spesifik olarak bağlanır. Yapılan çalışmalarda, bazı faktörlerin bağlanmada rol oynadığı görülmüştür.

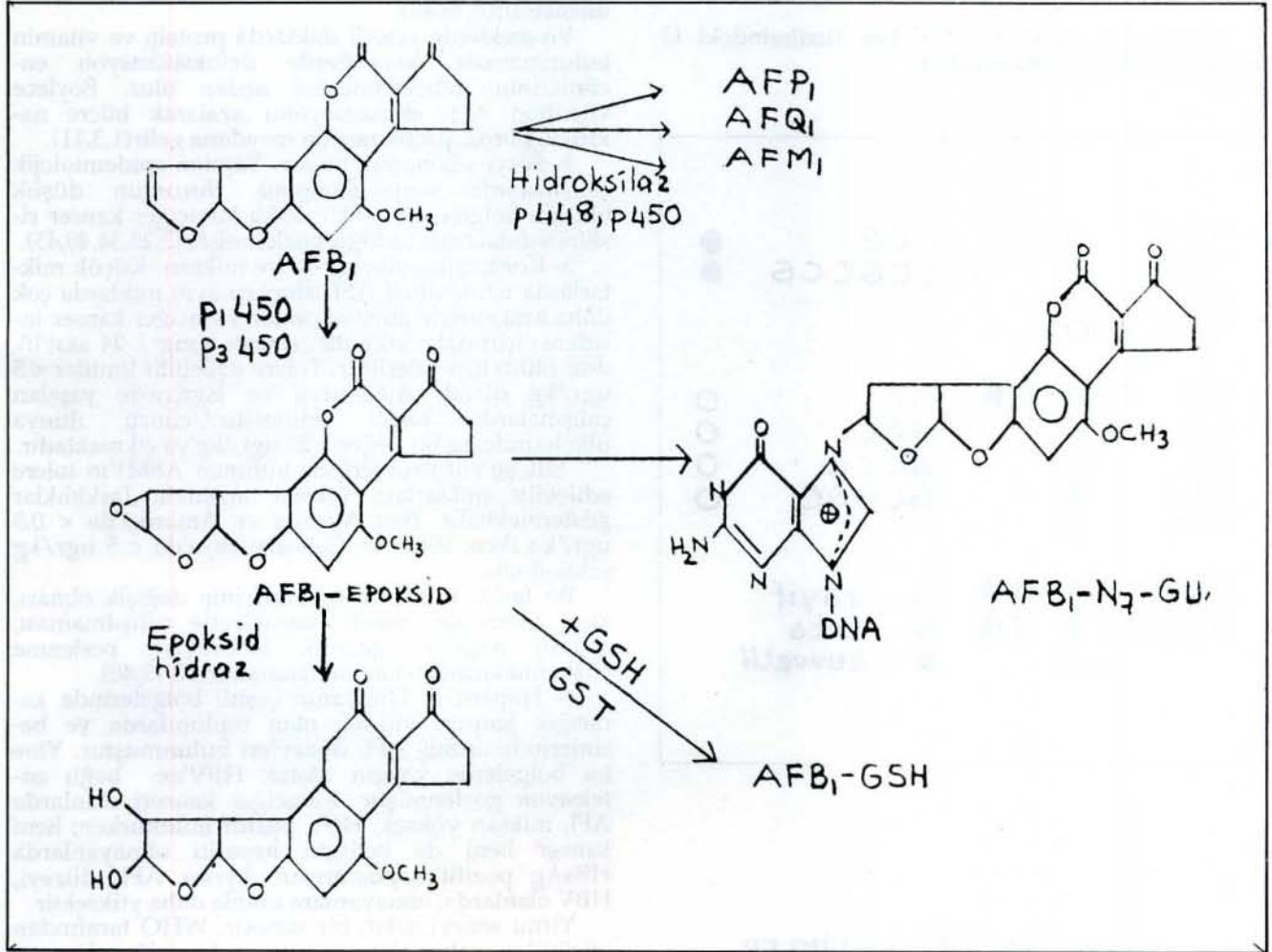
a- 5 yönünde kovalant bağlanma zayıfken, 3 yönünde kuvvetlidir.

b- G'e komşu baz rezidüleri bağlanmanın şiddetinde rol oynar. A ve T nükleotidlerine komşu tek bir G rezidüsü bağlanma için kötü hedefdir.

Örneğin:(AT)_n(G(A/T)_m dizisinde G'ye bağlanma oldukça zayıftır. (n=m=1 veya daha fazla)

c- A veya T nükleotidlerinin komşu olduğu birden fazla G rezidüsünün bulunduğu dizilerde, örneğin (A/T)_nGG(A/T)_m.

-CG dinükleotidinde, G rezidüsü orta derecede hedef; GC dizisindeki G zayıf hedefdir.

Tablo II: AFB₁'in aktivasyon ve inaktivasyonu

- CCG trinükleotinde G rezidüsü kuvvetli, GCC dizisindeki G zayıf hedeftir.

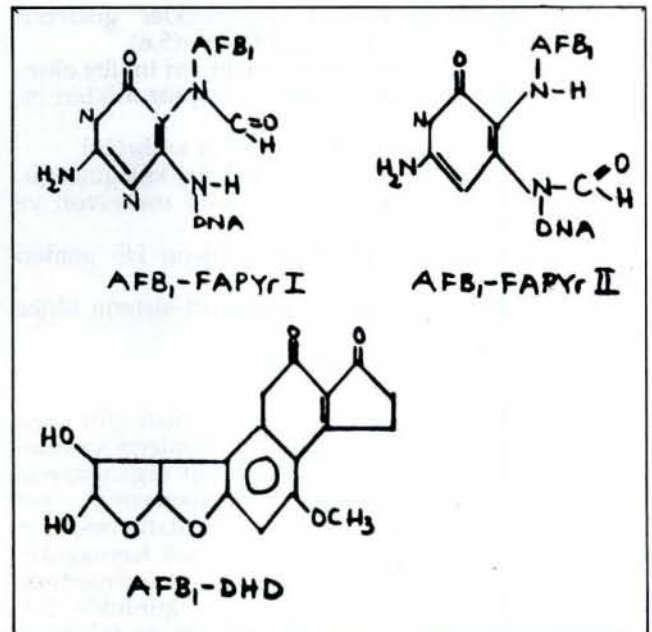
GGG ve GGCG dizilerinde 5' ve 3' rezidüleri orta derecede, ortadaki G rezidüleri kuvvetli olarak bağlanır.

- GC, GCC, GCGCC ve GCGGC gibi dizilerin 5'G rezidüsü zayıf hedef iken, CCG, CCGCCGCG dizisindeki G rezidüsü kuvvetli hedeftir (Tablo 4) (32,35).

AFB₁'in DNA ile bağlanması çoğunlukla kromatinin internükleozomal bölgesinde olmaktadır(3). Bağlanma ile hücrenin neoplastik transformasyonu başlar(5,6). AFB₁-N₇-Gua'ninden en çok etkilenen doku karaciğerdir(5,6,21,27,31,34). Diğer hedef organlar; mide(4), akciğer(6,8,39), barsak(8) ve böbrektir(23). Hücrelerden ise lenfoblast(22), fibroblast(26) ve eritoristler(9) transformasyona uğrar.

Ancak barsak neoplazmalarında etkin olan AFB₁ değil, AFM₁'dir. AFM₁'in barsaklardan emiliminin yavaş olması hücrenel transformasyona neden olur. Diğer hedef organlardaki aktivasyondan farklı yanı, monooksijenaz enzim sistemi ile değil prostoglandin H sentetaz ile AFM₁'in aktive edilmesidir(8).

B- Işık ile aktivasyon: AFL'ler yalnızca mikrozomal enzim sistemiyle değil, aynı zamanda AV ışınları ile de aktive olabilmektedirler. Mekanizma aynıdır. Ancak DNA'daki bağlanma rezidülerinde farklılık mevcuttur. UV ile aktivasyonda, AFL'ler DNA'ya A ve T rezidülerinden kovalant olarak

Tablo III. AFB₁'in DNA'ya bağlanmasıyla oluşan stabil derivatlarının yapıları

bağlanır. Ayrıca hedef doku cilt'dir. Bu aktivasyon biçiminde yine en toksik olan AFB1'dir. Afrika ve Asya ülkelerindeki çalışmalarda cilt tümörlerinde AFP1N7-Gua izole edilmiştir(32,36,37).

Tablo IV: AFB1'in DNA baz dizilerindeki G rezidüsüne bağlanma oranları

AGA	○	CCG	●
TGT	○	CCGCCG	●
AGT	○		
TGA	○		
GG	5' ○, 3' ●	GC	○
CG	○	GCC	○
GC	○	GCCC	○
CCG	●	GC GGC	○
GCC	○		
GGG	5' ○ 3' ○	○	zayıf
GGGG	5' ○ 3' ○	○	orta
-	●	●	kuvvetli

HÜCRESEL DEĞİŞİKLİKLER

Aktif AFB1'den, AFB1-N7-Gua oluşumuna bağlı olarak hücrede bir seri neoplastik değişiklikler zinciri başlar.

- 1-DNA replikasyonu ile GA TC'ye döner(23).
- 2- c-myc, c-Ha-ras, c-Ki-ras onkogenleri aktive olur(9,31).
- 3- Kromatinde yapısal değişiklikler gözlenir, düzensiz kondensasyon meydana gelir(5,6).
- 4- DNA ve RNA polimeraz enzimleri inhibe olur.
- 5- Sitozoldeki glukokortikoid reseptör miktarı indirgenir(16).
- 6- TAT inhibe olur, mRNA sentezi azalır(16).
- 7- İmmun sistem hücrelerinde değişiklik gözlenir. B lenfositler etkilenir, lenfoblastlarda mutasyon ve ölüm meydana gelir(26,22).
- 8- Eritositlerde β globin ve Histon H5 genleri artar(9).
- 9- Mitokondrial elektron transport sistemi bloke edilir(1).

ETYOLOJİ

1- Besinler: AFL'ler fındık, fıstık, mısır gibi yağlı tohumlarda oluştuğu için bu tip ürünlerin ve bunlardan elde edilen yağların yenilmesi organizmada hücresel transformasyonun başlamasına yol açacaktır. Yine AFL ile kontamine tahıllarla beslenen hayvanların ürünleride aynı oranda risk kaynağıdır. Hayvansal besinlerden olan süt ve süt ürünlerinde hidroksillenmiş AFL olan AFM1 çoğunlukla bulunur. Bu metabolit, AFB1'e göre daha az toksiktir.

Karsinogenik etkisi AFB1'in %2-10 arasındadır. Ancak süt ve süt ürünleriyle beslenen yeni doğanlarda ve çocuklarda hassasiyet fazla olduğundan kanser riskinde artacağı gözardı edilmemelidir(8,19,40).

Yiyeceklerde yeterli miktarda protein ve vitamin bulunmaması, karaciğerde detoksifikasyon enzimlerinin indirgenmesine neden olur. Böylece vücuttan AFL eliminasyonu azalarak hücre nekrozu, fibroz, profilerasyon meydana gelir(1,3,11).

2- Sosyo-ekonomik düzey: Yapılan epidemiolojik çalışmalarda sosyo-ekonomik durumun düşük olduğu bölgelerde, AFL'e bağlı karaciğer kanser riskinin daha fazla olduğu gözlenmiştir(2,25,34,40,43).

3- Kontaminasyon süresi ve miktarı: Küçük miktarlarda uzun süreli AFL alımları aynı miktarda çok daha kısa sürede almaya oranla karaciğer kanser insidensi için daha etkilidir. Ancak 6 mg / 24 saat'lik doz, ölüm için yeterlidir. Tolere edilebilir limitler < 5 ugr/kg olarak Avusturya ve İsviçre'de yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Üçüncü dünya ülkelerinde ise bu değer < 20 ugr/kg'ya çıkmaktadır.

Süt ve süt ürünlerinde bulunan AFM1'in tolere edilebilir miktarları, ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir. Batı Avrupa ve Amerika'da < 0.5 ugr/kg iken, SSCB ve Çekoslovakya'da < 5 ugr/kg şeklindedir.

Bu farklılık; ölçüm tekniklerinin değişik olması, kimi ülkelerde yeterli hassasiyette çalışılmaması, coğrafi dağılım, genetik farklılıklar, beslenme alışkanlıklarından kaynaklanmaktadır(10,13,40).

4- Hepatit B: Dünyanın çeşitli bölgelerinde karaciğer kanseri yüksek olan toplumlarda ve besinlerinde artmış AFL düzeyleri bulunmuştur. Yine bu bölgelerde yaygın olarak HBV'ne bağlı enfeksiyon gözlenmiştir. Karaciğer kanseri olanlarda AFL miktarı yüksek, HBV pozitif bulunurken; hem kanser hem de belirgin hepatiti olmayanlarda HBsAg pozitif saptanmıştır. Ayrıca AFL düzeyi, HBV olanlarda, olmayanlara oranla daha yüksektir.

Yirmi seneyi aşkın bir süredir, WHO tarafından yürütülen çalışmalarda, primer karaciğer kanseri olan olgularda AFL ile HBsAg arasında bir paralellik bulunmuş, ancak istatistiksel analizlerde sinerjik etkiyi gösterebilecek bir regresyon tespit edilememiştir(2,12,25,38,40).

5- Cinsiyet farkı: AFL'e bağlı primer karaciğer kanserinin görülme riski erkeklerde, kadınlara oranla iki kat fazladır(2).

AFLATOKSİN ÖLÇÜM TEKNİKLERİ:

A- Besinlerde: İki ayrı ölçüm tekniği kullanılabilir.

a- Tarama Metodları: Aspergillus Flavus, floresans veya UV ışığı altında parlak yeşil-sarı renkte görünür. Bu amaçla basit bir UV lambası kullanılarak, ilk saptama yapılabilir. Mısır ile yapılan çalışmalarda numunelerin %50'sinde bu metodla Aspergillus Flavus tespit edilmiştir. Pozitif bulunanlar kantitatif metodlarla tasdiklenmelidir. Tarama amacıyla mini-kolumn metoduda kullanılabilir(12).

b- Kantitatif Metodlar: İnce tabaka kromatografisi ve HPLC en uygun olanlarıdır(12).

B- Vücut sıvılarında: Vücuda alındıktan sonra mikrozom sisteminde aktiflenerek DNA'ya bağlanan AFL- vücut sıvılarında DNA'ya bağlanma biçiminde veya hidroksillenmiş metabolitleri halinde bulunmaktadır. Kan, idrar, süt gibi vücut sıvılarından çalışmalarda AFL alımı ile AFB1-N7-Gua ve AFL metabolitlerinin miktarları arasında korrelasyon saptanmıştır. Ölçüm tekniklerinde immünojenik (RIA,

ELİSA, USERİA), kromatografik (TLC, HPLC) ve mono klonal antikor yöntemleri kullanılmaktadır. Bunlar arasında en hassas USERİA'dır. Monoklonal antikor kullanarak yapılan ölçümler, özellikle AFL metabolitlerinin (M1-P1-Q1) tayininde uygundur. Ancak, antikor eldesindeki tekniklerin güçlüğü nedeniyle halen çapraz reaksiyonlar görülebilmektedir. Ucuz, güvenilir ve basit cihazların yeterli olduğu RIA ve ELİSA teknikleri özellikle epidemiolojik çalışmalarda daha uygundur (7.11.12.14.15.17.18.43).

ANTIOKSIDANLAR: AFL'in biyolojik etkinlikleri için gerekli metabolik aktivasyonları sırasında toksik ve detoksik reaksiyonlar dizisi denge halindedir (Tablo 2). AFL alımlarına bağlı primer karaciğer kanseri ve diğer kanser risklerini en aza indirmek amacıyla çeşitli antioksidanlar kullanılarak, detoksikasyon reaksiyonlarının hızını arttırmak mümkün olabilmektedir. Böylelikle aktif AFB1'in DNA'ya bağlanması azalır.

- EQ (Etoksikuin)

Bu antioksidan etkisini üç ayrı şekilde göstererek AFB1-N7-Gua oluşumunu en aza indirir.

a- Mikrozomda p-448 ve p-450'yi indükleyerek AFB1'e oranla daha az toksik olan, AFL metabolitlerinden AFM1 ve AFQ1 oluşumunu artırır.

b- GST aktivitesini artırarak, nontoksik olan AFB1-GSH oluşumunu sağlar.

c- Karaciğer ve böbrek DNA'sına, AFB1'in kovalant bağlanmasını indirir (23,28).

- Fenobarbital, β Naftoflavon, 3-Metilkolantren

Fenobarbital ve β Naftoflavon p-450'yi indükleyerek AFQ1, 3-Metilkolantren sitokrom p-448'e etki ederek AFM1 oluşumunu arttırırlar(23,28).

-BHT (3,5 ditterbutil 4 hidroksitoluen) ve BHA [2 (3)-tertbutil 4 hidroksianisol].

Her iki antioksidanda AFL hidroksillerinin oluşumunu katalizler. GST'ye indükleyerek AFB1-GSH oluşumunu arttırırlar. Ayrıca BHA, mikrozomal epoksid hidraz aktivitesini arttırarak AFB1-dhd oluşumunu hızlandırır(20,23).

- Oltipraz

Kuvvetli bir antizistosomal ajan olan, oltipraz, aynı zamanda AFL aktivasyonunda detoksikasyon reaksiyonlarını katalizleyen bir antioksidandır. Düşük konsantrasyonlarda AFL metabolitlerinin oluşumunu katalizlerken, yüksek konsantrasyonlarda GST'yi indükleyerek AFB1-GSH oluşmasını sağlar.

Deneyisel çalışmalarda, Oltipraz haricindeki diğer antioksidanların primer karaciğer kanserini önlemekle birlikte sürekli alımlarda diğer organlar için kanserojen olabildikleri saptanmıştır. Ancak oltipraz'ın böyle bir etkisi görülmemiştir ve insanlar için en uygun antioksidandır. %0.01'lik konsantrasyonda diette bulunduğu takdirde koruyucu etkisinde vardır(24).

AFLATOKSİN KONTAMİNASYONUN-DAN KORUNMA VE ALINMASI GERKEN ÖNLEMLER:

FAO, WHO, UNEP'in bu konudaki önerileri şunlardır(11,40).

1- Hasat öncesi ve hasat sonrası ekinde AFL limitinin tayini

2- Sulamalarda uygun su kullanımının sağlanması

3- Tarıma uygun zehir ve ilaçlar kullanılarak biyolojik kontrollerin yapılması

4- Her yıl değişik ekin uygulaması

5- Hasat sonrasında geleneksel saklama şartları iyileştirilerek, kuruluk, nem ve su aktivitelerinin ölçülmesi

6- Minimal düzeydeki kontaminasyonları bertaraf etmek için uçucu yağ asitleri ve baharat ekstraktları gibi bitkisel elemanların kullanılması

7- Tarımla uğraşanlara üretim, depolama ve saklama ile ilgili eğitim programlarının verilmesi

8- Gerekli önlemlerin alınması için zorlayıcı kanun ve yasaların konması

9- Kuraklık ve sel gibi doğa afetlerinin olabileceği yüksek risk bölgelerinin sürekli denetim altında tutulması

10- Tarama ve basit kantitatif metodların yaygınlaştırılması

11- Devamlı kontaminasyon görülen bölgelerin ayırt edilmesi.

KAYNAKLAR

1. Cavanna, A. et al.: Diagnostic value of prealbumin and retinol-binding protein in acute and chronic liver diseases. *Ric Clin Lab.* 15(1) : 71-7, 1985.

2. Van Eyken, P., Sciote, R., Desmet, V.J.: Expression of the novel extracellular matrix component tenascin in normal and diseased human liver. An immunohistochemical study. *J Hepatol* 11(1) : 43-52, 1990.

3- Hutchinson, D.R. et al.: *Clinico Chem Acta* 114: 649-74, 1981.

4- Inuzuka, S. et al.: Immunohistochemistry of the hepatic extracellular matrix in acute viral hepatitis. *Hepatology* 12(2): 249-56, 1990.

5- Fine, J.M. et al.: Occurrence of normal circulating prealbumin in a hemophilic patient after acute hepatitis ocated to the delta virus. *Clin Chem* 32(107): 1991-3, 1986.

6. Croy RG, Wogan GN: Temporal patterns of covalent DNA adducts in rat liver after single and multiple doses of Aflatoxin B1 *Can Res* 41:197-203, 1981.

7. Campbell TC, Caeda JP, Jayme JB et al: Aflatoxin M1 in human urine. *Nature* 227; 403-404, 1970.

8. Cullen JM, Ruebner BH, Hsien LS et al: X Carcinogenicity of dietary Aflatoxin M in male fischer rats compared to Aflatoxin B, *Can Res* 47:1913-1917, 1987.

9. Delcuve GP, Moyer R, Bailey G et al: Gene-specific differences in the Aflatoxin B1 adduction of Chicken erythrocyte chromatin. *Can Res* 48:7146-7149, 1988.

10. Egmond HPV: Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standart methods of sampling and analysis. *Food Add Contamin* 6:139-188, 1989.

11. FAO/WHO/UNEP; Nairobi - IO, Mycotoxins. Bangkok. 1987.

12. Friesen M, Bosch FX, Montesano R. Current Methods for the Measurement of Hummn exposure to Mycotoxins. FAO/WHO/UNEP Agenda Item 7, MYC 7.2, 1987.

13. Jelinek CF: Distribution of Mycotoxins. FAO/WHO/UNEP Agenda Item 5, MYC 87/5, 1987.

14. Groopman JD, Donahue PR, Zhu J et al: Aflatoxin metabolism. Detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:6496, 1985.

15. Groopman JD, Haugen A, Godorich GR et al: Quantitation of Aflatoxin B1 modified DNA using monoklonal antibodies. *Can Res* 42:3120-3124, 1982.

16. Horikoshi N, Tashiro F, Tanaka N et al: Modulation of hormonal induction of Tyrosine Aminotransferase and Glucocorticoid Receptör by Aflatoxin B1 and Sterigmatocystin in Reuber Hepatoma Cells. *Can Res* 48:5188-5192, 1988.

17. Hsien LL, Hsu ŞW, Chen Ds et al: Immunological detection of Aflatoxin B1-DNA adducts formed in vivo. *Can Res* 48:6328-6331, 1988.

18. International Agency for resarch on cancer: Monitoring of Aflatoxins in human body fluids and application to field studies. *Can Res* 45:922-928, 1985.

19. Iongh H, Vles RO, Pelt JG: Milk of mammals fed an Aflatoxin-containing diet. *Nature* 202:446-467, 1964.
20. Jhee EC, Ho LL, Latlikar PD: Effect of butylated hydroxyanisole pretreatment on in-vitro hepatic Aflatoxin B1-DNA binding and Aflatoxin B1-Glutathione conjugation in Rats. *Can Res* 48: 2688-2692, 1988.
21. Karenlampi SO: Mechanism of cytotoxicity of Aflatoxin B1. *Biochem Biophys Res Commun* 145:854-860, 1987.
22. Kaden DA, Call KM, Leong PM et al: Killing and mutation of human lymphoblast cells by Aflatoxin B1. Evidence for an inducible repair response. *Can Res* 47:1993-2001, 1987.
23. Kensler TW, Egner PA, Davidson NE et al: Modulation of Aflatoxin metabolism, Aflatoxin-N7-guanine formation and hepatic tumorigenesis in rats fed ethoxyquin. Role of Glutathione S-Transferases. *Can Res* 46:3924-3931, 1986.
24. Kensler TW, Egner PA, Dolan PM et al: Mechanism of protection against Aflatoxin Tumorigenicity in rats fed 5-(2-Pyrazinyl)-4-methyl-1,2-dithiol-3-thione (Oltipraz) and related 1,2-Dithiol-3-thiones and 1,2-Dithiol-3-thiones and 1,2-Dithiol-3-ones. *Can Res* 47:4271-4277, 1987.
25. Krishnamachari KAVR, Bhat RV, Nagarajan V et al: Hepatitis due to Aflatoxicosis. *The Lancet* May 10:1061-1063, 1975.
26. Leadon SA, Tyrell RM, Cerutti PK: excision repair of Aflatoxin B1-DNA adducts in human fibroblasts. *Can Res* 41:5125-5129, 1981.
27. Kin JK, Miller EC: 2,3-dihydro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy-aflatoxin B1 a major acid hydrolysis product of Aflatoxin B1-DNA or ribosomal RNA adduct formed in hepatic microsome-mediated reactions and in rat liver in vivo. *Can Res* 37:4430-4438, 1977.
28. Mandel HG, Manson MM, Jdah DJ et al: Metabolic basis for the protective effect of the antioxidant Ethoxyquin on Aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis in the rat. *Can Res* 47:5128-5223, 1987.
29. Martin CN, Garner RC: Aflatoxin B-oxide generated by chemical or enzymic oxidation of aflatoxin B1 causes guanine substitution in nucleic acids. *Nature* 267:863-865, 1977.
30. Marien K, Moyer R, Loveland P et al: Comparative binding and sequence interaction specificities of Aflatoxin B1, Aflatoxicol, Aflatoxin M1 and Aflatoxicol M1 with purified DNA. *J Biol Chem* 262:7455-7492, 1987.
31. Mahon GM, Hanson L, Lee JJ et al: Identification of an activated c-Ki-ras oncogene in rat liver tumors induced by aflatoxin B1. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9418-9422, 1986.
32. Misra RP, Muench KF, Humayun MZ: Covalent and Noncovalent Interactions of Aflatoxin with defined Deoxyribonucleic acid sequences. *Biochem* 22:3351-3359, 1983.
33. Moss EJ, Neal GE: The metabolism of aflatoxin B1 by human liver. *Biochem Pharmacol* 34:3193-3197, 1986.
34. Nizami F, Nizami HM, Ahmad M: Urinary excretion of aflatoxin and liver cancer in Karachi. *JP MA* 36: 112-114, 1986.
35. Refelo LM, Conley MP, Sambamureti K et al: Sequence context effects in DNA replication blocks induced by aflatoxin B1. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:3096-3100, 1985.
36. Shieh JC, Song PS: Photochemically induced binding of aflatoxins to DNA and its effect on template activity. *Can Res* 40:689-695, 1980.
37. Stark AA, Mor LM, Hermann Y et al: DNA strand scission and apurinic sites induced by photo activated Aflatoxins. *Can Res* 48:3070-3076, 1988.
38. Uchida T, Suziki K, Esumi M et al: Influence of Aflatoxin B1 intoxication on duck livers with duck hepatitis B virus infection. *Can Res* 48:1559-15565, 1988.
39. Wang TV, Cerutti P: Spontaneous reactions of Aflatoxin B1 modified Deoxyribonucleic Acid in vitro. *Biochem* 19:1962-1968, 1980.
40. WHO: Technical Bulletin, 8-40, 1989.
41. Wood ML, Smith JRI, Garner RC: Structural characterization of the major adducts obtained after reaction of an ultimate carcinogen aflatoxin B1-dichloride with calf thymus DNA in vitro. *Can Res* 48:5391-5396, 1988.