

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMALARDA HBV VE
AFLATOKSİN METABOLİTLERİ İLE AFLATOKSİN
MARUZİYETİNİN PATOGENEZE KATKISININ GEN
DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Illa Lawali Na NAWACHE

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Fatih KÖKSAL**

ADANA 2019

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HEPATOSELLÜLER KARSİNOMALARDA HBV VE
AFLATOKSİN METABOLİTLERİ İLE AFLATOKSİN
MARUZİYETİNİN PATOGENEZE KATKISININ GEN
DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Illa Lawali Na NAWACHE

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS
PROGRAMI**

YÜKSEK LİSANSTEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr. Fatih KÖKSAL**

Bu çalışma TYL.2018-10752 nolu proje olarak Çukurova Üniversitesi Araştırma
Projeleri tarafından desteklenmiştir.

ADANA 2019

KABUL ve ONAY



TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmaktan gurur duyduğum, yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübelerinden faydalanma imkânı bulduğum, beni her konuda sabırla destekleyen değerli hocam, tez danışmanım Sayın Prof Dr. Fatih KÖKSAL'a, eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli bölüm hocalarım Sayın Prof. Dr. Fügen YARKIN, Sayın Prof. Dr. Akgün YAMAN ve Sayın Prof. Dr. Macit İLKİT'e, çalışmalarım esnasında her zaman yakın desteğini ve yardımını gördüğüm Dr Gülfer YAKICI ve bölüm sekreterimiz Suna GÖKMEN, Suna abla, başta olmak üzere Ç.Ü Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İlla Lawalli Na awache

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLO DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hepatoselüler Karsinom	4
2.1.1. Epidemiyoloji	5
2.1.2. Risk Faktörleri	6
2.1.3. Kronik Viral Hepatit ve Karsinogenezis	7
2.1.4. Hepatoselüler Karsinogenezde Biyolojik Mekanizmalar	8
2.1.4.1.P53/ARF yolağı	8
2.1.5. HSK Tanı	9
2.2. Mikotoksinler	9
2.2.1. Aflatoksinlerin Çeşitleri ve Genel Özellikleri	10
2.2.2. Aflatoksinlerin Kimyasal Yapısı ve Biyotransformasyonu	10
2.2.3. Aflatoksinlerin Etki Mekanizmaları	11
2.2.4. Aflatoksinlerin Mutajenik Etkileri	12
2.2.5. Mikotoksinler ve Patogenez	12
2.2.6. Aflatoksinlerin Halk Sağlığı Üzerine Etkileri	15
3. GEREÇLER VE YÖNTEM	16
3.1. Klinik Materyallerin Toplanması	16
3.1.1. Materyallerin Klinik Olarak Değerlendirilmesi	16
3.2. Örneklerin İşlenmesi ve Saklanması	16
3.2.1. Kan Örneklerin Hazırlanması	16
3.2.2. Doku Örneklerinin Saklanması	16

3.2.3. İdrar Örneklerinin Gruplandırılması ve Saklanması	17
3.3. Aflatoksin Maruziyetinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi	18
3.4. Moleküler Yöntemler İçin Genomik DNA İzolasyonu	18
3.4.1. Serum Örneklerinden DNA İzolasyonu	19
3.4.2. Parafin Bloklara Gömülü Karaciğer Biyopsi Örneklerinden DNA izolasyonu	19
3.5.Hbx Onkoproteinini Kodlayan Gen Bölgesinin Varlığının Belirlenmesi	19
3.5.1. Hbx Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Jel Elektroforezi	19
3.6. TP53 R249S Mutasyonunun Varlığının Araştırılması	20
3.6.1.DNA Dizi Analizi Yöntemi ile R249S Mutasyonunun Araştırılması	20
3.6.1.1. P53 Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu	20
3.6.1.2. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	21
3.6.1.3. Cycle Sequence PCR Amplifikasyonu	21
3.6.1.4. Cycle Sequence PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Dizi Analizi Cihazına Yüklenmesi	21
3.6.2. PCR-RFLP Yöntemi ile R249S Mutasyonunun Araştırılması	22
3.6.2.1. PCR Amplifikasyonu	22
3.6.2.2. Restriksiyon Analizi ile Mutasyon Tespiti	23
3.6.2.2.1. Hae III Enzimi ile Restriksiyon İşleminin Gerçekleştirilmesi	23
3.6.2.2.2. Restriksiyon Ürünlerinin Jel Elektroforezi ve Sonuçların Değerlendirilmesi	24
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	41
7. KAYNAKLAR	42
8. ÖZGEÇMİŞ	47

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil1. KC kanserinin dünya genelinde görülme sıklığı	6
Şekil2. Başlıca aflatoksinlerin kimyasal yapıları	11
Şekil3.AFB1 ve AFM1 metabolizmasının şematik olarak gösterilmesi	14
Şekil4. Aflatoxin M1 (AFM1) ELISA (Elabscience®) sonuçları	27
Şekil5. Çalışmaya dahil edilen idrar örneklerindeki AFM1 Konsantrasyonlarının Dağılımı	27
Şekil6.HaeIII PCR-RFLP jel elektroforez görüntüsü	28

TABLO LİSTESİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. HBV'ye Bağlı HSK Risk Faktörleri	7
Tablo 2.Klinik değerlendirme için sorgulanacak hasta dosya bilgisi	17
Tablo3.Değerlendirmeye alınan bireylerin sosyodemografik özellikleri	25
Tablo 4.Değerlendirmeye alınan bireylerin yaşadıkları bölgeye göre dağılımları	26
Tablo5.HSK'lı hasta ve kontrol grup örneklerinin R249S mutasyonunun PCR-RFLP analizine göre dağılımları	28
Tablo6.HSK'lı hasta ve kontrol grup örneklerinin R249S mutasyonunun DNA dizi analizine göre dağılımları	29
Tablo7.p53 geni 249. kodonda arginin-serin değişikliği tespit edilen 4 hasta ile 2 kontrol grubu bireyin AFM1 ve demografik özellikleri	29

KISALTMALAR

3' UTR	: 3' translasyona uğramayan bölge
5' UTR	: 5' translasyona uğramayan bölge
AFB1	: Aflatoksin B1
AFG2	: Aflatoksin G2
AFG1	: Aflatoksin G1
AFM1	: Aflatoksin M1
AFM2	: Aflatoksin M2
AFP	: Alfafetoprotein
ALT	: Alanin amino transferaz
AST	: Aspartat amino transferaz
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
cfDNA	: Circulating free Deoksiribonükleik Asit
CYP450	: Sitokrom P450
DM	: Diyabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ELISA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
HBsAG	: Hepatit B yüzey antijeni
HBx	: Hepatit B X gen gölgesi
HBV	: Hepatit B virüsü
HSK	: Hepatosellüler Karsinom
HCV	: Hepatit C virüsü
HDV	: Hepatit D virüsü
HSK	: Hepatosellüler Karsinom
IARC	: International Agency for Research on Cancer
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi(single nucleotide polymorphism)
TP53	: Tümör protein 53
UV	: Ultra Viole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

HEPATOSELLÜLER KARSİNOMALARDA HVB VE AFLATOKSİN METABOLİTLERİ İLE AFLATOKSİN MARUZİYETİNİN PATOGENEZE KATKISININ GEN DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

Hepatosellüler karsinoma (HSK), dünyada erkeklerde beşinci, kadınlarda ise yedinci sırada görülen yaygın malignitelerden birisi olup primer karaciğer kanser olgularının %70-90'ını oluşturur. Kronik Hepatit B Virüsü (HBV) enfeksiyon prevalansı ve yüksek aflatoksin maruziyeti, HSK'nın önemli risk faktörlerini oluşturmaktadır. Diğer taraftan özellikle gıda menşeli aflatoksin ve metabolitlerinin karaciğerde neoplastik değişikliklere yol açtığı veya ko-faktör olarak katkı sağladığı uzun süreden beri speküle edilmektedir. Çalışmamızda, özellikle iklim ve beslenme tipi sebebi ile gıda menşeli Aflatoksin maruziyetine açık olan bölgemizde HSK gelişimi üzerinde Aflatoksin B1 (AFB1)'in ve kronik HBV'li hastalarda HBx geninin rolleri değerlendirilecektir. HBV ve Aflatoksinin hepatotoksistide önemli olduğu düşünülen P53 gen bölgesindeki mutasyonlar üzerinde sinerjistik ilişkisi sorgulanacak ve moleküler mekanizmaları araştırılacaktır. Bu amaçla kronik HBV taşıyıcısı HSK'li hastaların parafine gömülü karaciğer biyopsi örneklerinden deparafinizasyon sonrasında AFB1 seviyesi ve Hbx onkoproteinini kodlayan gen bölgesinin varlığı araştırılacaktır. HBV ve AFB1'in HSK riski üzerindeki sinerjistik etkisi, tümör supresör p53 geninin kodon 249'da hotspot mutasyon sıklığı DNA dizi analizi veya B planı olarak RFLP yöntemi kullanılarak tespit edilecektir. Çalışmamız sonucunda bölgemizdeki HSK hastalarında Aflatoksine maruziyet durumu ile HSK gelişiminde bir risk faktörü olarak Aflatoksin B1'in önemi belirlenecek ve kronik HBV enfeksiyonlu HSK hastalarının tedavisinde göz önünde bulundurulacak önemli bir veri sağlanacaktır. Çalışmamız sonucunda çalışmaya dahil edilen HSK+HBV'li hasta grubunda yer alan bireylerin ortalama idrar AFM1 konsantrasyon seviyeleri, kontrol grubunda yer alan bireylerin ortalama konsantrasyon seviyeleri ile kıyaslandığında, hasta idrarlarında 0.130absorbans/2600pg/ml, kontrol grubunda ise 0,179 absorbans/1600 pg/mL değerleri ile hasta grubundaki AFM1 konsantrasyonunun daha yüksek olarak bulunmuş, kontrol grubu bireylerden 3 (%14.2)'ünün, hasta grubunda ise 4 (%11.4)'ünün idrar AFM1 tespit seviyesi altında kalmıştır. R249S mutasyon varlığının belirlendiği DNA örneklerinde HSK'lı hastalara ait örneklerin 6/35 (%17.1)'sında ve 5'inde (%14.3), kontrol grubu bireyleri arasında ise her iki yöntem ile yalnızca 2'sinde (%9.6) tümör supresör geni p53'de ilgili kodonda AGG>AGT mutasyon varlığı tespit edilmiştir. DNA dizi analizi yöntemi ile p53 geninde R249S mutasyonu tespit edilen 5'i HSK'lı 6 bireyin tamamında da PCR-RFLP ile mutasyon tespit edildiği görüldü. Hasta grubunda AFM1 konsantrasyonu en düşük 1340pg/ml ve en yüksek 5015pg/ml, DNA dizi analizi yöntemi ile mutasyon belirlenen 5 bireyin ortalama AFM1 miktarı ise 3139 pg/ml olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Aflatoksin B1, Hepatoselülerkarsinoma, HBx, P53 mutasyonu

ABSTRACT

CONTRIBUTION OF HBV AND AFLATOXIN EXPOSURE TO THE PATONEGESIS OF HEPATOCELLULAR CARSINOMA IN GEN GEN LEVEL

Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the most common malignant tumors in the world, as fifth in males and seventh in females, accounting for 70-90% of primary liver cancer cases. Chronic Hepatitis B Virus (HBV) infection prevalence and high aflatoxin exposure are important risk factors for HCC. On the other hand, it is speculated, especially since the long time that food-derived aflatoxin and its metabolites contribute neoplastic changes in the liver or contribute as a cofactor. Our study will evaluate the roles of Aflatoxin B1 (AFB1) and HBx in patients with chronic HBV, especially on the development of HCC in our region, which is open to food and aflatoxin exposure due to climate and nutritional type. The synergistic relationship between HBV and Aflatoxin which are thought to be important in hepatotoxicity, for mutations in the P53 gene region, will be questioned and molecular mechanisms will be investigated. For this purpose, we will investigate the presence of the gene region encoding Hbx oncoprotein and AFB1 level in the paraffin-embedded liver biopsy specimens of HCC patients with chronic HBV after deparaffinization. The synergistic effect of HBV and AFB1 on HCC risk will be determined using the hotspot mutation frequency by DNA sequence analysis of the tumor suppressor p53 gene at codon 249 or by PCR-RFLP method as B plan. As a result of our study, aflatoxin exposure status in the HCC patients in our region and the importance of Aflatoxin B1 as a risk factor in the development of HCC will be determined. Significant data to be considered in the treatment of HCC patients with chronic HBV infection will be provided. The mean urine AFM1 concentration levels of the individuals in the HSK + HBV patient group were 0.130 absorbance / 2600pg / ml in the patient urine and 0.1799 absorbance / 1600 pg / mL in the control group compared to the mean concentration levels in the healthy subjects, 3 (14.2%) of the individuals in the control group and 4 (11.4%) in the patient group remained below the AFM1 detection level. DNA samples in which R249S mutation was detected, 6/35 (17.1%) and 5 (14.3%) samples of HCC patients, among the healthy individuals, only two (9.6%) were found to have AGG> AGT mutations at the relevant codon in tumor suppressor gene p53 with both method. PCR-RFLP mutation was detected in all 6 individuals, 5 of whom had HCC, whose DNA sequence analysis method detected R249S mutation in the p53 gene. In the patient group the lowest and highest AFM1 concentration was 1340pg / ml and 5015pg / ml, respectively.

Keywords: Aflatoxin B1, Hepatocellular carcinoma, HBx, P53 mutation

GİRİŞ

Hepatosellüler karsinoma (HSK), dünyada en sık karşılaşılan ve yüksek insidans ve mortalite ile seyreden kanser türüdür. Karaciğer epitelinden köken alan HSK'lar tüm kanserlerin %5'ini, primer karaciğer kanserlerinin de % 70-90'ını oluşturur. HSK, erkeklerde görülen kanser türleri arasında beşinci, kadınlarda ise dokuzuncu sırada yer alır. Kansere bağlı ölümler içerisinde 3. sırada yer alan HSK'larda prognoz mortaliteye seyreder ve olguların yaklaşık olarak %80'i kaybedilir^{1,2}.

HSK etyopatolojisinin multi faktöriyel olduğu yapılan araştırmalar ile gösterilmiştir. İnsidans coğrafi bölge, iklimatik özellikler, sosyo ekonomik düzey, özellikle *Aspergillus flavus* ve *Aspergillus parasiticus* aflatoksini gibi mikotoksinler ile kontamine gıdaları ihtiva eden beslenme alışkanlıkları, cinsiyet, yaş, alkol bağımlılığı ve en önemlisi kronik karaciğer hastalığı, yağlı sirotik karaciğere eşlik eden kronik HBV ve HCV enfeksiyon öyküsü ile ilişkilendirilmiştir^{3,4,5}. HCV ve HBV enfeksiyonlarının sık görüldüğü Doğu ve Güney Doğu Asya, sahra altı Afrika, Kuzey Afrika gibi düşük sanitasyon ve gıda hijyenine sahip ülkeler HSK için yüksek riskli bölgelerdir. Genellikle gelişmekte olan ülkelerde kronik HBV enfeksiyonları ve aflatoksin maruziyeti ile ilişkili olarak 60-70 yaş gibi ileri yaş gruplarında daha sık görülen HSK'nın, gelişmekte olan ülkelerde de görülmeye başlandığı bildirilmiştir. Ancak hepatit virüsleri ile HSK arasındaki ilişkide virüs tipi kadar; genotip, viral yükü, bazal core promoter ve precore bölgelerindeki muhtemel mutasyonların da etkili olduğu ileri sürülmüştür^(5,6). Mesela kronik HCV enfeksiyonlarının % 22'sinden sorumlu olduğu bilinen subtip-4, HCV ilişkili HSK olgularının %73.3'ünden sorumlu tutulmaktadır. Benzer şekilde HSK ve kronik karaciğer enfeksiyonları ile ilişkilendirilen HBV genotip B ve C'nin genel popülasyonda görülen kronik enfeksiyonlardaki insidansı, sırası ile, %10-30 ve % 70-90'dır^{5,6}. Kronik HBV enfeksiyonu ile birlikte, deneysel çalışmalarda HSK için yüksek mitotik potense sahip olup kontamine gıdalarda en yüksek miktarda üretilen aflatoksin B1 (AFB1) ile sık temas, mikotoksin üreten mantarların toprak ve havada bol miktarda bulunduğu sıcak ve nemli bölgelerde yaşayanlar için HSK riskini artırmaktadır. (3,4,5). Mikotoksinler, aflatoksinler B1,B2,G1,G2, sekonder metabolit

grubudur⁷. HSK da dahil klinik patolojiler ile ispatlanmış güçlü etiyolojik ilişki içerisinde olan AFB1'in karaciğerdeki biyotransformasyonu sonucu ortaya çıkan metabolitlerin güçlü hepatotoksisiteye sahip oldukları gösterilmiştir⁸.

HSK, kronik HBV enfeksiyonu ile AFB1 arasındaki sinerji ise, tümör bastırıcı gen TP53'teki 249. kodon'da gelişen bir mutasyon ile ilişkilidir. Bu mutasyon, AFB1 tarafından aktive edilmiş 8,9 epoksit'in, genin 249. kodon 3. bazındaki N-7 pozisyonunda yer alan guanine ile reaksiyonundan kaynaklanır. Reaksiyon sonunda 3. bazda G-T ile yer değiştirir ve arginin 249 serin (R249S) şekillenir. Bu değişim neoplastik transformasyon için başlatıcı kabul edilir. Ortaya çıkan mutant Hepatit B virüsü x etkileşimli proteini (HBXIP)- R249S, HBV ile enfekte hücrelerde, enfekte hepatositlerde, bir viral onko-protein olan, hepatit B virüsü X (HBx) proteininin C-terminal ucu ile bir güçlü bir kompleks oluşturur⁹. Bu 154 amino asitlik HBx, amino terminal bölgede 50-60 aminoasit büyüklüğündeki bir pro-onkojenik domain, karboksi terminal bölgenin sonunda 50 aminoasitlik bir pro-apoptotic domain ile ara bölgede çok sayıda fonksiyonel proteinler ihtiva eder. HBx'in hepatosit anatomisi, fizyolojisi, çoğalma döngüsü ve hayatta kalış süresi üzerine olan etkisi, bu pro-oncogenic ve pro-apoptotic etkileri arasındaki dengeye bağlıdır. Mutant R249S proteini ile C terminal uçta kompleks oluşması HBx proteininin apoptoz özelliğini bloke eder ve viral replikasyon döngüsü değişir. Replikasyon hızlanır, dolaşımda bol miktarda serbest R249S-HBx DNA görülür. Enfekte hücrelerde morfolojik olarak bipolar iğ oluşumu görülür ve muhtemelen hücreyle etkileşime bağlı olarak enfekte hücrelerde sentrozome dinamikleri ve sitokinezi bozulur. Apoptoz ve DNA tamiri gibi oldukça geniş bir hücre fonksiyon özelliği etkilenir. Dynein hafif zinciri ve R249S-HBx, iskelet ve kalp kası içinde yüksek oranda tespit edilebilir^{10,11}. Bunu pankreas, böbrek, karaciğer, beyin plasenta ve akciğer hücrelerindeki benzer değişimler izler.

Genel olarak, hasta vücut sıvılarında AFB1-albumin bileşenleri, AFB1 ile uzun vadeli bir maruziyetinin markeri olarak kabul edilmiştir. Bu albümin bileşenlerinin, insanlardaki yarılanma ömürleri 21 gün kadar olup mevcudiyetleri 2-3 aylık bir süre zarfındaki birikim hakkında bilgi verebilir¹². Bu sebeple, idrardaki aflatoksin M1, aflatoksin-N7-guanin bileşenleri ile serumdaki aflatoksin-albumin/ lizin bileşenlerinin seviyelerinin ölçülmesi, AFB1 maruziyetinin seviyesinin tespitinde 20 yıldır kullanılan

prediktiv non- invaziv bir yöntemdir ve artmış hepatocellular karsinom gelişme riski için önemli bir marker olduğunu kabul edilir^{12,13}.

Biz bu çalışmada, HSK'lı hastalarda AFB1 ve HBx genin HSK riski üzerindeki rollerinin değerlendirmesini amaçladık. Kronik HBV taşıyıcısı HSK'lu hastalar ve kontrol grubundan alınan kan ve idrar örneklerinde, AFB1-albümin adductları ve üriner AFB1 metabolitlerinin seviyesi belirlenecektir. Aynı hastalara ait parafin bloklara gömülü karaciğer biyopsi örneklerinden deparafinizasyon sonrasında Hbx onkoproteinini kodlayan gen bölgesinin varlığı araştırıldı ve HSK hastaları ile kontroller kıyaslanacaktır. Bölgemizde Hbx geni ve aflotoksin varlığı tespit edilen HSK'li hastaların karaciğer biyopsi örneklerinde HBV ve AFB1'in HSK riski üzerindeki sinerjistik etkisi, DNA dizi analizi ile tümör supresör p53 geninin kodon 249'da hotspot mutasyon sıklığı araştırılarak tespit edilecektir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Hepatoselüler Karsinom

Karaciğerin malign tümörleri, karaciğer dokusundan köken alan, primer ve primeri akciğer veya intestinal sistem gibi bir başka organ olup metastaz sonucu karaciğeri etkileyen, sekonder tümörler olmak üzere iki grupta incelenir. HSK karaciğerin en sık karşılaşılan primer malign tümör türüdür. Gelişmiş tanı ve tarama testleri ile erken tanı konup, cerrahi reseksiyon, radyoterapi, kemoterapi ve karaciğer transplantasyonu gibi geliştirilmiş tedavi rejimleri oluşturulmasına rağmen, hastalığın sisnsi başlangıçlı olmasına bağlı olarak hastanın hekime ileri histopatolojik evrelerde başvurması ve remisyon sonrası relapsların sık olması gibi sebepler ile halen tüm dünyada özellikle kansere bağlı ölümlerin en önemli sebebi olmaya devam etmektedir^{14,15}.

IARC- Global Kanser İstatistikleri birimi (GLOBOCAN) 2012 verilerine göre mortalitenin önemli sebepleri arasında yer alan 27 kanser türü içerisinde HSK ölümleri 745.000/782.500 m/vaka ile akciğer, meme ve kolorektal kanser ölümlerinden sonra 4. sırada yer almıştır¹⁶. Ancak aynı kaynağa göre 2018 yılında HSK'ya bağlı global ölümler 781.631/841.080 m/v olarak gerçekleşmiş, yani hem vaka hemde mortalite sayılarında artış kaydedilmiştir¹⁷. Primer ve metastatik karaciğer tümörleri etyolojileri farklı olmasına rağmen klinik belirtileri, tanı yöntemleri ve tedavileri benzerlik gösterdiğinden çoğu zaman birlikte değerlendirilmektedir. Karaciğerin primer malign tümörleri hepatosit ve intrahepatik safra yolları epiteli ile mezenkimal dokulardan gelişir. HSK, kolanjioselüler karsinoma ve hepatoblastom epitelyal dokulardan gelişmektedir. Mezenkim dokularından anjiosarkom, robdomyosarkom ve miks tümörler gelişmektedir. Karaciğerin en sık gözlenen primer malign tümörleri HSK ve kolanjioselüler karsinomadır. Primer karaciğer kanserlerinin %90'ını hepatoselüler karsinoma, %10'unu ise kolanjioselüler karsinom oluşturur. Birbirlerinden çoğunlukla histolojik, nadiren de immünohistolojik yöntemlerle ayrılırlar¹⁸.

2.1.1. Epidemiyoloji

Toplumların daha hijyenik şartlar, beslenme ve sağlık imkanlarına erişimi ile yaşlanmasına paralel olarak HSK insidansı giderek artmakta ve 70 yaşta tepe yapmaktadır¹⁹. Öte yandan görülme yaşı, HBV ve hatta Delta infeksiyonunun epidemik olduğu, Aflatoksin gibi çevresel toksinlere maruziyet oranlarının yüksek olduğu Çin, Afrika, Moğolistan gibi bölgelerde 30'lu yaşlara kadar düşmektedir. Erkek kadın oranı 2,4 – 3,7'ye 1 arasındadır. 2030'a yönelik yapılan projeksiyonlarda HSK sıklığının en fazla artacağı ülkeler Norveç (%2,9/yıl), beyaz – ABD'liler (%2,6) ve Kanada (%2,4) iken, kadınlar arasında zenci – ABD'liler (%4,0), İsviçre (%3,4), Almanya (%3,0) olarak beklenmektedir. Bu sürede hastalık sıklığında azalma beklenen ülkeler arasında Çin, Japonya, Singapur ve Avrupa'nın ülkemiz gibi HBV aşılmasına nispeten geç başlamış olan kısımları (Estonya, Çekya, Slovakya) yer almaktadır. 2005 ile karşılaştırıldığında % 35'lik bir insidans artışı beklenmektedir. Japonya, net insidansın düşmesi beklenen tek ülkedir²⁰. Bu dinamikleri sağlayacak olan en önemli faktörler yukarıda da belirtilen HBV, HCV ve çevrede bulunan toksinlerin daha etkin şekilde kontrol altına alınabilmesi yanında obezite ve buna bağlı metabolik komplikasyonlarda ve alkol kullanımında beklenen 2025'e kadar %55'lik artış²¹. HSK dünya genelinde eşit sıklıkta görülmez. HSK insidansındaki coğrafi farklılıklar, HBV ve HCV infeksiyonu insidansının coğrafi farklılığına bağlıdır. HBV ve HCV infeksiyonu, dünya genelinde HSK nedenlerinin %75'ini oluşturur. Ülkemizde HSK insidansı, HBV, HSK ilişkisi veya HBV-AFB1-HSK ilişkisinin bildirildiği bir yayın yoktur. Ancak 1993 yılında 65 yaş ve üzerindeki gruplarda HSK prevalansı 14/100000 iken, 1999 yılında bu sayının 18.1/100000 kişiye yükseldiği bildirilmiştir²². 497630 . Ancak Avrupa birliği ülkelerindekine benzer viral hepatit infeksiyonları ve HSK oranlarına sahip olduğumuz düşünülmektedir. Türkiye'de HSK sıklıkla daha ileri yaşlarda ve sirotik karaciğer zemininde gelişmektedir. Uzunalimoğlu ve ark. tarafından yayınlanan toplam 207 hastayı içeren çalışmada Türkiye'de etyolojide en sık HBV infeksiyonu (% 56), ikinci sırada ise HCV infeksiyonu (% 23.2) ve buna bağlı oluşan siroz vakaları, üçüncü sırada ise alkolik karaciğer hastalığı tespit edilmiştir²³. Yapılan başka bir çalışmada özellikle Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgesinde HSK'nın en sık nedenin HBV infeksiyonu olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada vakaların % 45'inde tek başına HBV infeksiyonu pozitifken %29'unda HBV infeksiyonuna HDV eşlik etmiştir²⁴.



Şekil1. KC kanserinin dünya genelinde görülme sıklığı²⁵

2.1.2. Risk Faktörleri

HSK insidansında iklim coğrafi bölge sosyo-ekonomik yapı, beslenmede yüksek dozda ve süreklilik arz eden aflatoksin ihtiva eden gıdaların kullanımı gibi çevreye ait, geçirilmiş kronik karaciğer hastalığı, siroz, obezite, aşırı yağlı karaciğer, kronik viral hepatit öyküsü, alkol kullanım alışkanlığı, diyabet, herediter hemochromatosis, sigara kullanımı, yaş ve cinsiyet gibi bireysel faktörler etkilidir³¹. Hayvan deneyli çalışmalarda seks hormonlarının kimyasallar ile indüklenmesinin HSK lar için bir risk faktörü olduğunu göstermiş, orchidectomy uygulanan erkek farelerde HSK riskinin azaldığı ispatlanmıştır. Bu durum HSK'in erkeklerde kadınlara oranla artmış risk ve insidans görüldüğünün bir izahı olarak kabul edilebilir. Ancak siroz ve kronik karaciğer hastalığı ile HSK'ya bağlı ölümlerin en az %63'ünden sorumlu olan HBV ve HCV infeksiyonları kesinleşmiş en önemli risk faktörleridir³².Laboratuvar kemiricileri ile yapılan deneysel çalışmalarda bu türler için genetik yatkınlık gösterilmiştir. Ancak Çinli ve Alaskalı toplumlarda aile içi HSK kümelenmeleri bildirilmiş olmasına rağmen insanlar için kesin hüküm verecek sonuçlar yoktur³³.Gelişmekte olan ülkelerde HSK vakalarının en az %80'i yüksek aflatoksin maruziyeti riski olan bölgelerde yoğunlaşır³⁴.

Tablo1. HBV'ye Bağlı HSK Risk Faktörleri

Konağa Ait Faktörler	Viral Faktörler	Çevreye Ait Faktörler
İleri yaş	Yüksek HBV DNA	Alkol
Cinsiyet	Koinfeksiyon (HCV,HDV)	Sigara
HSK aile öyküsü	Pre-core stop kodonu	Aflatoksin B1
Etnik Köken	Genotip C HBV	Obezite
Siroz		Diabet

2.1.3. Kronik Viral Hepatit ve Karsinogenezis

Virüslere bağlı kronik hepatitlere kronik viral hepatit denmektedir. Bütün kronik hepatitlerin %90'nı teşkil eder. Hepatit B virüsü(HBV), hepatit D(delta) virüsü (HDV) ve hepatit C virüsü(HCV) kronik hepatit yaptığı bilinen başlıca virüslerdir. Kronik viral hepatitler, sık ve yaygın bir hastalık olması ve siroz, hepatosellüler karsinoma gibi ciddi sonuçları ile bütün dünya için önemli sağlık sorunlarıdır³⁵.

HBV ve HCV'ne bağlı kronik infeksiyonlar dünyada sirozun en önemli nedenlerindedir. Viral infeksiyona bağlı siroz gelişiminde ilk olarak inflamasyon, sonrasında nekrozis, fibrozis ve rejenerasyon gelişir³⁶. Dünya genelinde HSK vakalarının yaklaşık % 50'si HBV ve % 25'i HCV infeksiyonu ile ilişkilidir³¹. Genel olarak, HSK gelişiminin en büyük sebebi HBV infeksiyonu varlığıdır ve Dünya genelinde yaklaşık 300 milyon kişinin bu virüsle kronik enfekte olduğu düşünülmektedir^{33,35}. Virüs kontamine kan transfüzyonları, damardan injeksiyonlar ve cinsel temas yoluyla bulaşır. HBV ile enfekte hastalarda, genel popülasyona oranla HSK gelişme riskinin 5-15 kat yüksek olduğu belirlenmiştir. HBV infeksiyonuna göre daha az kişide HCV infeksiyonu belirlenmiştir ve iki virüsün Dünya genelindeki prevalanslarında da farklılıklar bulunmaktadır. HCV taşıyan hastalar ile taşımayan hastalar karşılaştırıldığında, HSK gelişme riskinin 17 kat fazla olduğu belirtilmektedir³².HCV ile birlikte koinfeksiyon, aynı zamanda HSK riskinde artış ile ilişkilendirilmiştir. Bazı çalışmalar, HBV ve HCV koinfeksiyonu olan hastaların, tek

başına virüs bulaşmış hastalara kıyasla daha yüksek HSK oranına sahip olabileceğini ileri sürmektedir^{32,33}.

2.1.4. Hepatoselüler Karsinogenezde Biyolojik Mekanizmalar

Yapılan çalışmalarda hepatokarsinogenezde meydana gelen çeşitli genetik ve epigenetik değişikliklerin hücre proliferasyonu, sağkalımı ve farklılaşması gibi hücrel sinyal ileti yolları ile ilişkili olduğu belirtilmiştir⁴.

Bu yollar p53, retinoblastoma (Rb), Wingless/ β -katenin (Wnt/ β -katenin), transforming büyüme faktörü- β (TGF- β), MAPK, fosfatidilinositol 3-kinaz/v-akt murine thymoma viral onkogen homolog (PI3K/Akt) ve Janus kinaz/sinyal iletili ve transkripsiyon aktivatör (JAK/STAT) yollarını kapsamaktadır¹³.

2.1.4.1. P53/ARF yolağı

p53/p14ARF (p53/p14 alternative reading frame) yolağı; hücre döngüsü kontrolü, programlı hücre ölümü, senesens, farklılaşma ve gelişim, transkripsiyon, DNA replikasyonu, DNA tamiri ve genomik stabilitenin korunması gibi çeşitli hücrel fonksiyonlarından sorumludur⁴⁰. p53 birçok önemli görevde yer aldığından bu yoldaki bozukluklar HSK'da dahil olmak üzere birçok kanser türünde gösterilmiştir³⁷.

p53 mutasyonları, AFB1 kaynaklı H.K.'larda yüksek (>%50), AFB1 kaynaklı olmayan HSK'larda daha düşük (%20-%40) frekanslarda bulunmaktadır³². 200 kodondan fazla bölgeyi etkileyen ve %75 oranda yanlış anlamlı (missense) mutasyon ve bunlara eşlik eden kromozom 17'nin kısa kolunun kaybının da dahil olduğu p53 mutasyon spektrumu, pozisyonları ve doğaları itibarı ile farklılık göstermektedir^{30,31}.

Birçok çalışmada, özellikle hemakromatozis ve Wilson hastalığındaki oksidatif stresin de p53 mutasyonlarına bağlı olarak karaciğer karsinogenezindeki etkisi gösterilmiştir³⁵. Bu durumlarda, enflamasyon kaynaklı oksidatif stres nedeniyle oluşan reaktif oksijen ve nitrojen, siroz ve karaciğer yetmezliğinin yanısıra, H.K. gelişim riskini de 200 kata kadar arttırmaktadır. Oksidatif stres sonucunda p53 fonksiyonunu etkileyen mutasyonlar kodon 249'daki G>T ve kodon 250'deki C>A mutasyonlarıdır²⁷.

2.1.5. HSK Tanı

Hepatosellüler karsinoma tanısında kullanılan başlıca diagnostik teknikler serum belirteçlerini, karaciğer fonksiyon testlerini, çeşitli görüntüleme yöntemlerini ve histolojik incelemeyi kapsamaktadır. Serum

belirteçleri arasında sıklıkla kullanılan alfa-1 fetoproteindir (AFP). Rutinde kullanılan görüntüleme yöntemi ultrasonografi ile rejenere karaciğer nodülünün erken HSK'dan ayrılması zordur. Bu nedenle üç fazlı spiral bilgisayar tomografisi veya üç fazlı dinamik kontrastlı manyetik rezonans görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır¹¹. Görüntüleme yöntemleri ile tanı konamıyorsa, histopatolojik inceleme için radyolojik destek altında iğne biyopsisi uygulanabilmektedir. Ancak, tümörün kanaması ve implantasyon yoluyla yayılması riski söz konusudur¹⁰.

2.2. Mikotoksinler

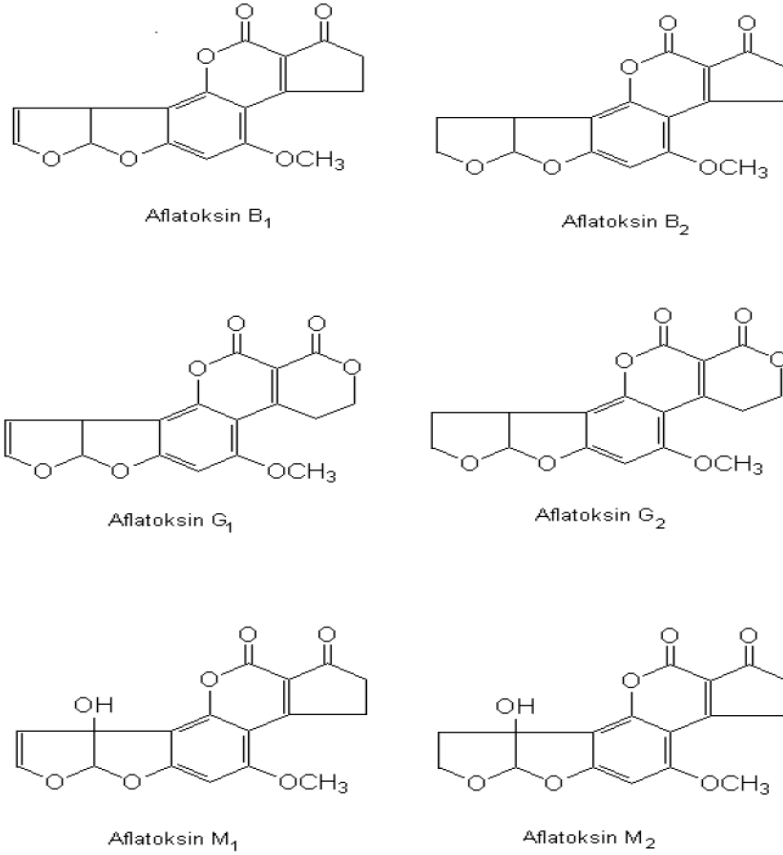
Mikotoksinler; Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Alternaria ve Claviceps gibi mantar (küf) cinslerinin sekonder metabolizması sonucu oluşan, düşük molekül ağırlıklı, çok çeşitli kimyasal yapıya sahip doğal toksinlerdir. İnsan ve hayvan sağlığı üzerinde güçlü ve çeşitli toksik etkiler oluşturmaktadırlar²⁸. Mikotoksinleri üreten mantarlar rüzgar ve hava akımlarıyla taşınarak her yerde (atmosferin çeşitli katmanları da dahil) bulunabilirler^{23,25}. Mikotoksin kontaminasyon düzeyi iklim koşullarına, ürünün cinsine ve coğrafi konuma bağlı olarak mevsimden mevsime, yıldan yıla farklılık gösterebilir. Dünyadaki tarım mahsüllerinin dörtte birinin mikotoksin ile kontaminasyon riski olduğu bildirilmiştir⁴¹. Mikotoksinler, günümüzde gıda ve yemlerdeki en önemli bulaşanlardan biri olarak kabul edilmektedir. Toprak, hava, su gibi doğal kaynaklar ile depolama ve taşıma sırasında yem hammaddeleri ve işlenmiş yem ürünlerine bulaşan küfler, oluşturdukları kalite bozuklukları ve ürün kayıplarıyla ekonomik zararlara yol açarken, ikincil metabolizma ürünleriyle insanlarda ve hayvanlarda sağlık risklerine neden olmaktadır. Bu nedenle yem hammaddelerinde ve yemlerdeki mikotoksin düzeyleri, gıda güvenliği zincirinin önemli bir unsuru olarak ortaya çıkmaktadır³³.

2.2.1. Aflatoksinlerin Çeşitleri ve Genel Özellikleri

Aflatoksinler 100.000'den fazla hindinin ölümüne neden olmuştur. Ördek ve sülünleri de etkileyen bu hastalık "Turkey X Disease" olarak adlandırılmıştır. Diyetin değiştirilmesinin morbidite ve mortalite oranını azaltmasıyla bu hastalığın besinsel kaynaklı olduğu farkedilmiş ve etkilenen tüm hayvanların diyetinin *Aspergillus flavus* ile kontamine olduğu ve bu nedenle "a-flavus-toxin" in kısaltılmasıyla elde edilen "aflatoksin" adı verilen toksik maddeyi içeren Brezilya yerfıstığı olduğu belirlenmiştir⁴¹.

2.2.2. Aflatoksinlerin Kimyasal Yapısı ve Biyotransformasyonu

Aflatoksinler, difurokumarosikloptenon ve difurokumarolakton gruplarında sınıflandırılmıştır. Aflatoksinlerin AF-B1, B2, G1 ve G2 olmak üzere dört ana fraksiyonu bulunmaktadır. Bu isimlendirme ince tabaka kromatografisinde, uzun dalga boyu UV ışığı altında aflatoksin B1 ve B2'nin mavi, aflatoksin G1 ve G2'nin ise yeşil floresan vermesiyle ilişkilidir³⁹. Benzer yapılara sahip toksinler olmakla birlikte başlıca aflatoksinler AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2 dir. Bu toksinler çeşitli besin ve tohumlarda değişen miktarlarda bulunmalarına rağmen; AFB1 genellikle en etkin olanıdır. Şekil 3'te başlıca aflatoksinler olan AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2'nin yapıları görülmektedir⁴¹. Bu belirtilen dört toksinler dışında AFM1 ve AFM2 olarak isimlendirilen önemli iki aflatoksin türevi daha bulunmaktadır^{39,40}. İlk defa aflatoksinli yemleri yiyen laktasyon dönemindeki çiftlik hayvanlarının sütlerinde gösterilen bu toksinlerin aflatoksinlerin türevinin oldukları gösterilmiştir. Sütte bulunmasından dolayı bu toksine "süt toksini", milk toxin, anlamında aflatoksin M (AFM) adı verilmiştir. AFM'nin bulunmasının ardından yapılan çalışmalar bu metabolitin B1 ve B2'nin hidroksi türevleri olduğu ortaya konmuş ve böylece AFM1 ve M2 diye iki ayrı bileşik olarak izole edilmiştir. Toksinlere verilen rakamlar ise toksitite derecesini göstermektedir. "1" ile simgelenenler yüksek, "2" ile simgelenenler daha düşük toksititeyi göstermektedir⁴². AFB1'in demetilasyonu toksik bir türev olan AFP1 oluşumu ve furan halkalarına köprü konumunda bulunan karbon atomunun hidroksilasyonu da AFB1 ile benzer etkiler gösteren fakat daha az karsinojenik olan AFM1 oluşumuyla sonuçlanır⁴¹.



Şekil 2. Başlıca aflatoksinlerin kimyasal yapıları

2.2.3. Aflatoksinlerin Etki Mekanizmaları

Alınma dozlarına bağlı olarak AF'lerin canlılar üzerinde farklı çeşitlerde etkileri bulunmaktadır. AF'ler içinde insan ve hayvanlar için en toksik olanı, en fazla karsinojenik etkiye sahip olanı, gıdalarda ve yemlerde en sık bulunanı AFB₁ olmasına karşın, AFM₁'de potansiyel karsinojen olup, rat ve alabalıklarda hepatosellüler karsinojenik etkiye sahip olmaktadır. AF'ler, insan ve hayvanlardaki toksik etkileri dikkate alındığında B₁ > M₁ > G₁ > B₂ > M₂ > G₂ şeklinde sıralanmaktadır^{41,42,43}.

Aflatoksinler, insan ve hayvanlarda zehir etkisi yaratırlar. Meydana gelen bu zehirlenme olayına aflatoksikozis denir. Bilinen en güçlü karsinojen olan AF'ler insan ve hayvanlarda karsinojenik (karaciğer, kolon ve böbreklerde kanser oluşumu), mutajenik (genetik yapıda bozulmalar, AFB₁ en mutajen mikotoksindir) teratojenik (protein sentezinin inhibisyonu, canlılarda sakat veya ölü doğumlar) hepatotoksik (karaciğerde yağlanma, soluk renk, nekroz, kanamalar, sarılık ve siroz) etkileri yanında

böbreklerde fonksiyon bozuklukları (nefrotoksik), immün sistemde zayıflama (immunosupressif etki), genel durum bozukluğu ve verim düşüklüğüne neden olumaktadırlar^{36,37}.

2.2.4. Aflatoksinlerin Mutajenik Etkileri

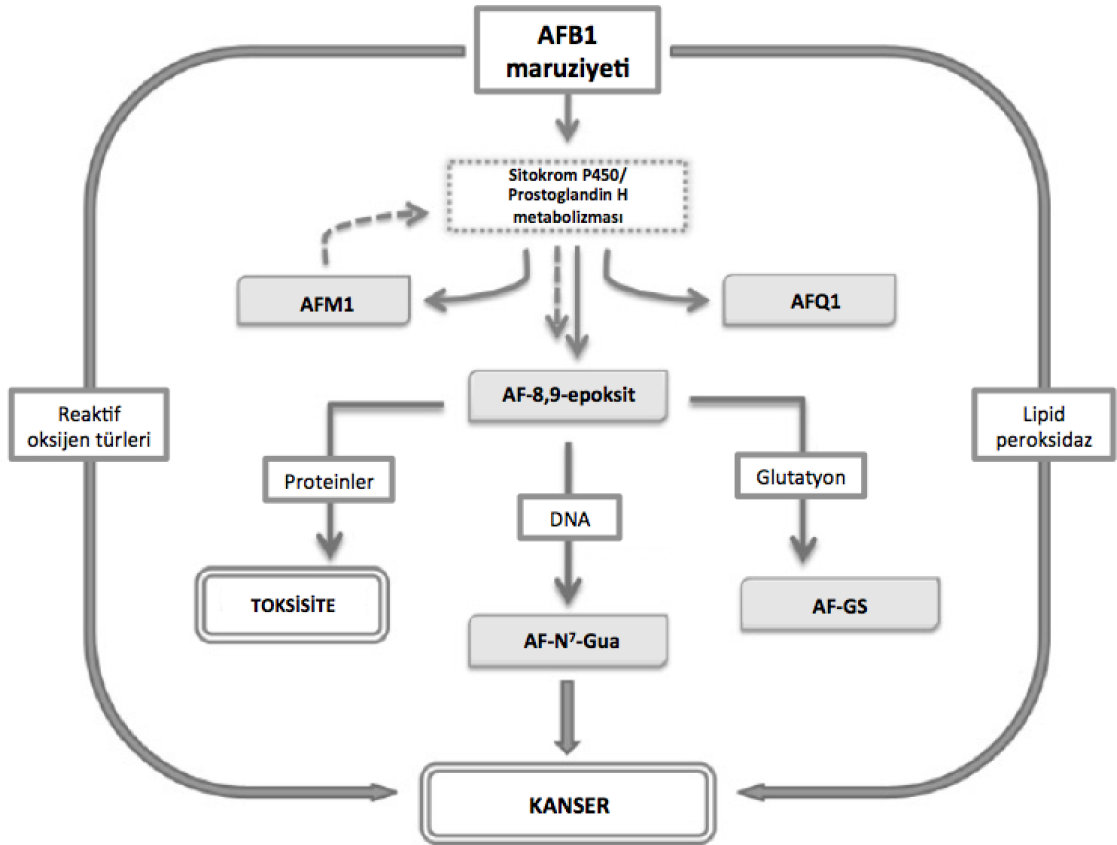
AFB1'in mutajenik etkilerinin, AFB1'in epoksit türevlerinin hücrede DNA zincirlerine bağlanmak suretiyle, DNA polimeraz enziminin aktivitesini inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. DNA'nın taşıdığı şifre bozulduğundan, hem DNA ve hem de RNA'da mutasyonların şekillenebileceği ileri sürülmektedir^{38,39}.

2.2.5. Mikotoksinler ve Patogenez

Mikotoksinler 1960'lı yıllarda akut toksemi vakaları ile ilişkili olarak dikkat çekmeye başlamıştır. Ancak genotoksisiteleri ve hepatositlerdeki karsinojenik etkileri 1994 yılında tartışmaya açılmıştır. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) epidemiyolojik ve laboratuvar çalışmalarının sonuçlarına dayanarak aflatoksinleri Grup-1 karsinojenler arasına yerleştirdi ve karsinojenik potansiyel olarak da grup-2B ajanlar içerisinde olduğunu duyurdu. Bu tanımlamada akut toksemiler ve kronik fonksiyon bozuklukları ve kanser olmak üzere insanlardaki aflatoksin maruziyeti iki başlık altında değerlendirildi. Aflatoksinlerin gıdalar ile 1 µg/kg (1 ppb) ila 12,000 µg/kg (12 ppm) arasında alınması zararsız olarak kabul edilebilmektedir. Kenya çalışmalarında kişi başına 50 mg alınmasının toksemiye bağlı ölümlere sebep olduğu gösterilmiştir. Muhtemelen klinik prognoz, diğer risk faktörlerinin de katılımı ile modifiye edilmektedir.

Gıda yolu ile alınan AFB1, incebarsaktan, özellikle duodenumun proksimalinden, emilir. Mezenterik lenf yolu ile absorbe olan aflatoksin, iyonik olmayan diffüzyon yolu ile hepatositlere nüfus eder. Karsinogenesden sorumlu olan AFB1 ve sıklıkla süt'de bulunan hidroksillenmiş metaboliti AFM1 karaciğerde sitokrom-P450 süper ailesi üyesi mikrozomal miks fonksiyonlu oksidatif enzimler ve sitoplazmik oksijenaz enzim sistemleri aracılığı ile metabolize olur. Bu enzim sistemleri, karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda bulunan, sitokromla ilişkili enzimler, O₂'ye ve NADPH'a bağımlı enzimlerdir.³⁷ Oksidatif reaksiyon sonucu

genotoksisiteden sorumlu endo ve ekzo stereoisomerlere sahip olan reaktif 8,9-epoxide'e çevrilirler. Ortaya çıkan hidroksillenmiş AFB1 metabolitleri sülfat ve glukuronik asitle birleşerek, suda çözünebilir sülfat veya glukuronid esterlerine dönüşür ve müteakiben idrar ve/veya safra yolu ile atılarak temizlenirler. Ancak AFB1'in fazla miktarda alınması veya transpetidaz ve/veya oksidaz enzimlerinin yetersizliği halind oksidadif biyotransformasyon esnasında bifuran halkandaki çift bağın oksidlenmesi sonucu oluşan reaktif exo-8,9-epoxide metaboliti, özellikle tümör supressör geni TP53 ile olmak üzere DNA, RNA ve proteinler güçlü affinite göstererek reaksiyona girer ve DNA'ya bağlanır.^{35,36} Predominant olarak promutajenik 8,9-dihydro-8-(N7-guanyl)-9-hydroxy-AFB1(AFB1-N7-G) şekillenir. Daha sonra AFB1-N7-G, AFB1-formamidopyrimidine (AFB1-FABY)'e çevrilir. guanine G, thymine TE'e dönüşür. Bu transversiyon/mutasyon zinciri TP53 geninde 249. kodonda arginin-serin değişikliği (R249S) ile sonuçlanır³⁷. Bilindiği gibi HBx, myc ve ras gibi proto-onkojenlerin ve viral-onkojenler ile p53 tümör supresyon genlerinin ekspresyonundaki mutasyon ve değişimler HSK etyolojisinde rol oynar. Diğer taraftan oluşan exo-8,9-epoxid glutatyona bağlanarak glutatyon-S-transferazı katalize eder, sonuçda reaktif oksijen radikallerinin birikimi artar ki, bu artmış DNA hasarıdır ve karsinogeneze yardım eder. Bir başka hasar da epoksid radikalının daha sonradan dialdehid şekline dönüşmesi ile oluşabilir. AFB1'in daha zayıf radikalleri olan AFQ1 ve AFP1 substratları glutatyon S-transferaz (GST) aracılı konjügasyon ile albümine bağlanarak stabil hale döner ve idrar yolu ile atılırlar^{27,32}. Son olarak da zayıf epoksi radikalleri DNA, RNA ve proteinler gibi makromoleküllere bağlanarak normal hücre fonksiyonlarını ve protein sentezini bozarlar. Mesela 8,9-oksidin oluşumuna ek olarak metabolizasyonun ileri adımlarında oluşan reaktif epoksitler, detoksifikasyona tabi tutulur. AFB1-DNA, serum AFB1-albumin ve AFM1 ve AFB1-merkaptürik asit gibi üriner AFB1 metabolitleri, AFB1 maruziyetinin önemli biyobelirteçleridir³⁸. AFB1, hücrede biyolojik saati bozar, K1 ras protoonkogeninin aktivasyonunu sağlar.



Şekil3. AFB1 ve AFM1 metabolizmasının şematik olarak gösterilmesi

Aflatoksin B1 ve HBV enfeksiyonu arasında sinerjistik etki olduğu belirlenmiştir. Tek bir risk faktörünün olmasına bağlı HSK gelişimi ile her ikisine maruz kalmada ki HSK riski karşılaştırıldığında, HBV ve AFB1'in HSK riskini 5-10 kat daha fazla arttırdığı belirlenmiştir³⁹. Kronik HBV enfeksiyonu esnasında artmış inflamatuvar cevap ve hepatositlerin hızlı proliferasyonu bir taraftan kontrolsüz spontan mutant hücre artışına sebep olurken diğer tarafta TP53 gibi onkogen genlerinde mutasyona olan hücrelerin de artışı anlamına gelmektedir ki bu hızlı progresyonu izah edebilir²⁸. Ancak AFB1'in HSK oluşturması için HBV enfeksiyonunun bir ön şart olmadığını da gösterir. Diğer taraftan bu görüş AFB1 ile DNA temasına bağlı olarak, epigenetik yolla, CpC adacıklarındaki oluşan 5 mC metilasyonu sonucu da karsinogenezin başlayabileceğini gösterilmesi ile desteklenmiştir^{28,29}. Gambiya'daki HSK'lı hastalar da yapılan yeni bir vaka-kontrol çalışmasında, hastaların yanı sıra kontrollerin de plazmalarında HBX DNA'nın

tespit edilebileceği ancak hepatositlerdeki genetik mutasyonların kanser ve R249S mutasyonu varlığı ile korelasyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Tayland'daki karaciğer kanseri vakalarına yönelik bir çalışmada deneklerin plazma örneklerinin analizi sonucunda, HBX'in, R249S mutasyonu olan HSK hastalarında tam bir DNA sekansı olarak tespit edilebileceği gösterilmiřtir³⁰.

2.2.6. Aflatoksinlerin Halk Sağlığı Üzerine Etkileri

Gıda zehirlenmelerine sebep olan aflatoksinlerin aynı zamanda bilinen en güçlü doğal karsinojenler olduğu anlaşılmıştır.²⁴ Aflatoksinler, alınma miktarına ve süresine bağlı olarak insanlarda ve hayvanlarda akut, subakut ve kronik tip zehirlenmelere neden olabilmektedirler. Vücuda alınan aflatoksinlerin sebep olduğu mikotoksikozise “aflatoksikozis” adı verilmektedir. Aflatoksikozis, bireysel olmaktan ziyade toplumu ve sürüyü ilgilendiren bir problemdir.^{26,28} Bir salgında neden tanımlanamaması, durumun gözden kaçırılmayacak kadar belirgin ve sendromların belirli tipte yiyeceklerle ilişkili olması, antibiyotik veya diğer ilaçlarla tedaviye cevabın düşüklüğu ve salgının mevsimsel olması durumunda aflatoksikozdan řüphelenilmelidir²². Karaciğer kanseri gelişmekte olan ölkelerde çok yaygın olarak görölmekte ve diyetle alınan aflatoksin ile karaciğer kanseri arasında paralel bir ilişkinin mevcut olduğu gösterilmiştir.^{39,40}

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmamızda, Ocak 2018 ila Nisan 2019 tarihleri arasında kalan 16 aylık süre içerisinde Çukurova Üniversitesi Balcalı hastanesi Gastroenteroloji Polikliniği'nde Hepatoselüler karsinoma (HSK) ön tanısı ile karaciğer biyopsi örnekleri alınarak histopatolojik olarak değerlendirilmek üzere Patoloji Ab D.'da gönderilen HSK tanısı almış hastalar ile Adana şehir hastanesinde takip edilmekte olan benzer özelliklere sahip toplam 35 hastaya ait, karaciğer biyopsi örneklerinden alınan ince kesitler, aflatoxin maruziyeti ve p53 geninde yarattığı muhtemel karsinojenik mutasyonun tespiti yönünden PCR-RFLP ve dizi analizi yöntemleri ile değerlendirilmiştir. Kontrol grubu olarak biyopsi endikasyonu olan 14'ü sirotik, 7'si fibrotik karaciğer hastalığı ön tanılı HBV (-) toplam 21 hastaya ait örnekler kullanıldı. Dosya ve klinik olarak takip edilebilen hastalara ait rutin tanı amaçlı olarak hastadan hekim tarafından istenmesi zorunlu testler için idrar örnekleri de alınabilen hastalar ve kontrol bireyleri çalışmaya dahil edilmiştir. Her iki grupta yer alan bireylerin idrar örnekleri, her hangi bir ek maddi katkı istenmeksizin, AFM1 yönünden de ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. İdrar örneği alınamayan vakalar çalışma dışı bırakılmıştır. Çalışmadan önce etik kurul belgesi alındı.

3.1.1. Materyallerin Klinik Olarak Değerlendirilmesi

Hasta dosya bilgisi Tablo 2'de belirtildiği şekilde olarak sorgulandı.

3.2. Örneklerin İşlenmesi ve Saklanması

3.2.1. Kan Örneklerin Hazırlanması

HSK olguları, HCV veya HBV sero-pozitif kronik karaciğer hastalığı olanlar, HCV veya HBV sero-negatif karaciğer semptomu olmayanlardan kan numuneleri alınarak, EDTA ile anti-koagüle edildi ve kan numuneleri toplandıktan sonra çalışma yapılana kadar -70°C'de saklandı.

3.2.2. Doku Örneklerinin Saklanması

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda HSK tanısı

almış hastalara ait arşivlenen karaciğer biyopsi dokusu ince kesitleri hedef mutasyon/ların tespiti için PCR, PCR-RFLP ve sekanslama yöntemleri ile değerlendirildi.

3.2.3. İdrar Örneklerinin Gruplandırılması ve Saklanması

HSK olguları, HCV veya HBV sero-pozitif kronik karaciğer hastalığı olanlar, HCV veya HBV sero-negatif karaciğer semptomu olmayanlardan idrar numuneleri alınarak çalışma gününe kadar saklandı. Kan, idrar ve parafin bloklardan kazınan karaciğer biyopsi örneklerinden DNA ekstraksiyonu ticari kiti kullanılarak elde edildi ve tüm ekstraktlar -20 °C saklanacaktır.

Tablo 2. Klinik değerlendirme için sorgulanacak hasta dosya bilgisi

Kurumun Adı:	
Hastanın Adı-Soyadı:	
Hastanın yaşı ve cinsiyeti:	
Memleket/yaşadığı yer	OPSİYONEL
Beslenme alışkanlıkları	
Sigara/ alkol Kullanımı	
Klinik tanı	
Laboratuvar tanı	
HSK bulguları	
Protokol no:	

3.3.Aflatoksin Maruziyetinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

İdrardaki AFM₁ seviyeleri, Aflatoxin M1 (AFM1) ELISA Kit Elabscience® (Catalog No: E-TO-E012 96T) kullanılarak enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA) yöntemi ile belirlendi.

İdrar örnekleri 3200 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra süpernatant, yöntem protokolünde belirtilen prosedüre göre AFM1 düzeylerinin belirlenmesi için aşağıdaki basamaklar kullanılarak çalışmaya dahil edildi.

1-AFM1 standartları ve idrar numuneleri distile su (1:20 veya 1:5) ile seyreltildi.

2-Her birinden 100 uL, 200 uL deney tamponu ile karıştırıldı.

3-Bu karışımın 100 uL'si antikor kaplı mikrotitrasyon kuyusuna aktarıldı ve plak oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi.

4- Otomatik bir mikropalak yıkayıcıda yıkama çözeltisi ile plak yıkandı.

5- AFM1 konjüгатından 100 uL her kuyucuğa ilave edildi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

6-Plak, bağlanmamış eşlenik maddenin çıkarılması için yeniden yıkama çözeltisi ile yıkandı.

7- Substrat reaktifinden 100 uL her kuyucuğa ilave edildi ve renk reaksiyonunun karanlıkta oda sıcaklığında 15 dakika ilerlemesi sağlandı.

8-Daha sonra, enzim reaksiyonunu sona erdirmek için kuyucuklara 100ul durdurma çözeltisi ilave edildi ve 15 dakika içinde emilim, bir ELISA okuyucusu (Tecan Genios®, Salzburg, Avusturya) tarafından 450 nm'de ölçüldü.

Absorpsiyon yoğunluğu örneklerdeki AFM1 konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Numunelerdeki AFM1 seviyesi, her plak için AFM1 standart çözeltisini kullanarak eşzamanlı standart eğrilerden hesaplandı. Tüm idrar örnekleri, iki farklı seyreltme (1:5 ve 1:20) ile iki kez analiz edildi ve ortalama değerler hesaplandı.

3.4. Moleküler Yöntemler İçin Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmaya dahil edilen kan ve parafin bloklara gömülü doku örneklerinden DNA izolasyonu, DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi.

3.4.1. Serum Örneklerinden DNA İzolasyonu

HBV DNA'sı pozitif olan hastalardan dolaşan serbest DNA ekstraksiyonu, 300µl serum örneğinden DNeasy Blood and Tissue Kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) aracılığı ile kitin önerileri doğrultusunda kan ve vücut sıvısı protokolüne göre gerçekleştirildi.

3.4.2. Parafin Bloklara Gömülü Karaciğer Biyopsi Örneklerinden DNA İzolasyonu

DNA, 3µm'lik renksiz parafin bloklarından izole edildi. Bloklar ksilen ve etanol içinde deparafinize edilerek ve 25°C'de 50µl DNA ekstraksiyon tamponu (TE pH 9, Proteinaz K 0.1 mg / ml,% 0.25 Nonidet P40) ve Proteinaz K (20 lg/l) içinde 56°C'de 2 gün inkübasyona bırakıldı. DNA izolasyonu, deparafinizasyon işleminden sonra DNeasy Blood and Tissue Kiti (Qiagen, Hilden, Almanya) ile üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi.

3.5.Hbx Onkoproteinini Kodlayan Gen Bölgesinin Varlığının Belirlenmesi

3.5.1. Hbx Gen Bölgesinin Amplifikasyonu ve Jel Elektroforezi

Serum ve karaciğer biyopsi örneklerinden izole edilen DNA örneklerinden HBx gen bölgesinin PCR ile tespiti, dizisi aşağıda belirtilen spesifik primerler kullanılarak Wang ve arkadaşlarının protokolüne göre gerçekleştirildi²⁶.

XF: 5'-ACGGAATTCATGGCTGCTAGGCTGTG-3'

XR:5'-ATCCTGCAGAGGTGAAAAGTTGCAT-3'

464bp'lik ürünün varlığı %2'lik Agaroz Jel elektrofrezinde tespit edildi.

Amplifikasyon aşamaları aşağıdaki şekilde tamamlanmıştır:

95 °C - 5 dakika -ilk denaturasyon

94 °C - 30 saniye - denaturasyon

58 °C - 1 dakika - bağlanma (annealing)

72 °C - 30 saniye - uzama (extension)

72 °C - 7 dakika - son uzama (extension) / 4 °C ∞

} 30 döngü

3.6. TP53 R249S Mutasyonun Varlığının Araştırılması

AFB1, DNA'ya bağlanarak guaninin timine transversiyon mutasyonlarına neden olan bir kanserojendir. AFB1 toksini ile ilişkilendirilmiş TP53 genindeki özgün R249S (G>T) somatik mutasyonunun araştırılması amacı ile serum ve karaciğer biyopsi materyallerinden izole edilen DNA örnekleri TP53 R249S mutasyonunun araştırılması amacı ile dizi analizi ve PCR-RFLP yöntemleri kullanılarak değerlendirildi.

3.6.1. DNA Dizi Analizi Yöntemi ile R249S Mutasyonunun Araştırılması

Otomatize dizi analizi yöntemleri DNA'nın daha kısa sürede analiz edilebilmesine olanak sağlamıştır. Bu yöntemlerde reaksiyonlar herbiri farklı dalgaboylarında ışımaya yapan boyalar ile işaretlenmiş dört ddNTP'yi de içeren tek bir tüp içerisinde gerçekleştirildi (dye-terminator dizileme) ve lazer ile okuma sağlandı.

3.6.1.1. TP53 Gen Bölgesinin PCR Amplifikasyonu

PCR 25 µl reaksiyon mixi ile gerçekleştirildi.

- 0.025 ng Kalıp DNA
- 200 mM dNTP, (her biri)
- R ve F primerleri (her biri 10 pmol)

p53R1F: 5'- GCC GTC CCA AGC AAT GGA TG

p53R4R: 5'-GGA CTT CAG GTG GCT GGA GT,

- 1 U Taq polymerase
- 1X PCR reaksiyon bufferı (1.5 mM MgCl₂) içinde hazırlanacaktır.

95 °C - 1 dakika

95 °C - 30 saniye

55 °C - 30 saniye

72 °C - 45 saniye

3.6.1.2. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Elde edilen PCR ürünleri “ExoSAP-IT” kiti kullanılarak, firmanın talimatları doğrultusunda 5 µl PCR ürününe 2 µl enzim eklenerek 37°C’de 15 dakika inkübasyonu sonrasında 85°C’de 15 dakika bekletilerek saflaştırılmıştır.

3.6.1.3. Cycle Sequence PCR Amplifikasyonu

Saflaştırılmış PCR ürünlerinin tek zincirli amplifikasyon işlemi, forward primeri kullanılarak dNTP ve ddNTP içeren reaksiyon karışımı ile BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirildi.

Her örnek için aşağıdaki karışım hazırlandı:

Ready Reaxion Mix (RR-100) 5x	2µl
Sequencing Buffer 5x	2µl
P53R1-F	2µl
dH2O	2µl
Saf PCR ürünü	2µl

Cycle sekans için hazırlanan örneklerin amplifikasyonu thermal cycler cihazında aşağıdaki ısı döngülerinde gerçekleştirildi.

96°C -10 saniye	}	25 döngü
50°C -5 saniye		
60°C -4 dakika		
4°C ∞		

3.6.1.4. Cycle Sequence PCR Ürünlerinin Saflaştırılması ve Dizi Analizi Cihazına Yüklenmesi

Cycle Sequence ürünleri, sekans cihazına yüklenmeden önce sephadex spin kolon yöntemi kullanılarak tekrar saflaştırıldı. Saflaştırma işlemi sephadex kimyasalının 1gr’na 14ml su eklenerek elde edilen karışım ile oluşturulan kolonlara ampikonların yüklenmesi ile aşağıdaki protokole göre gerçekleştirildi.

- 1-Boş spin kolonları 1.5ml'lik toplama tüplerine yerleştirildi.
- 2-Her bir kolona 750 ul sephadex karışımı eklendi.
- 3- 4500 rpm'de 2 dk. santrifüj işlemi gerçekleştirildi.
- 4-Toplama tüpündeki sıvı boşaltılarak oluşan sephadex kolonuna zarar vermeden amplikonlar yüklendi.
- 5- 4500 rpm'de 3 dk. santrifüj işleminden sonra toplama kabında elde edilen saf cycle sequencing ürünü ABI Prism 3730 sekans cihazına yüklendi ve cihaz kullanım prosedürlerine uygun bir şekilde çalışıldı.
- 6- Elde edilen sonuçlar Sequencing Analysis 5.1 (Applied Biosystems) programında analiz edildi.

3.6.2. PCR-RFLP Yöntemi ile R249S Mutasyonunun Araştırılması

Çalışmamızda TP53 R249S mutasyonunun araştırılması amacı ile kullanılan PCR-RFLP yönteminde serum ve biyopsi örneklerinden izole edilen DNA'lar amplifikasyon işlemi sonrasında restriksiyon enzimi olan Hae III ile kesime tabi tutuldu.

3.6.2.1. PCR Amplifikasyonu

Amplikon boyutlarının 254 bp olduğu ve p53 geninin ekson 7'sinde yer alan bu fragmenti çoğaltmak amacı ile PCR amplifikasyonunda bölgeye spesifik p1 ve p2 primerleri kullanıldı.

Primer dizileri:

p1 (up) (5-CTT GCC ACA GGT CTC CCC AA-3'),

p2 (down) (5'-AGG GGT CAG CGG CAA GCA GA-3').

Reaksiyon karışımı:

- 18.3 µl ddH₂O
- 2.5 µl 10×buffer
- 1 µl dNTPs
- 0.5 µl primer 1

- 0.5 µl primer 2
- 0.2 µl FastStart Taq DNA polimeraz
- 2 µl DNAkalıbı

Toplam 25-µl'lik karışım hazırlandı.

PCR şartları:

94°C'de 5 dak.

94°C'de 30 sn.

60°C'de 30 sn,

72°C'de 30 sn,

72°C'de 10 dak.

} 40 döngü

Amplifikasyon ürünleri (254 bp), %2 agaroz jel elektroforezi ile görünür hale getirildi.

3.6.2.2. Restriksiyon Analizi ile Mutasyon Tespiti

P53 geninin ekson 7'sinden türetilen 254 bp saflaştırılmış DNA fragmanının, kesim işlemi Hae III enzimi ile gerçekleştirildi.

3.6.2.2.1. Hae III Enzimi ile Restriksiyon İşleminin Gerçekleştirilmesi

Restriksiyon enzim ile kesimde reaksiyon karışımı: (Total hacim 20 µl).

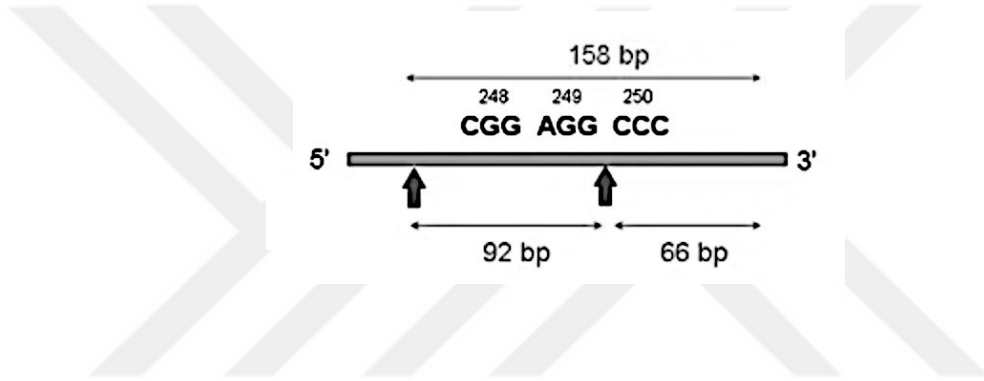
- HaeIII 1 µl,
- 2 µl 10×buffer,
- 5 µl DNA fragment,
- 12 µl ddH₂O

Bu reaksiyon karışımı 4 saat 37 ° C su banyosunda inkübe edildi.

3.6.2.2.2. Restriksiyon Ürünlerinin Jel Elektroforezi ve Sonuçların Değerlendirilmesi

Enzim Hae III, 249-250 kodonlarında bir GG/CC sekansını parçalayarak, PCR reaksiyonunun 254bp saflaştırılmış DNA ürününden 92 bp, 66 bp ve birkaç küçük fragman üretmektedir.

249–250 kodonlarında bir mutasyon varsa kesilmemiş 158 bp'lik bir fragman ile sonuçlandı ve bu özellik, etidyum bromür ile boyanan %3 agaroz jelde normal örneklerden ayırt etmede kullanıldı. 254 bp'de (tam uzunlukta PCR ürünleri) bandın olmaması, PCR ürününün tam kesimi için bir kontrol sağladı ve ayrılmamış 158bp fragmanın varlığı, örnekte mutasyonların olduğunu gösterdi.



BULGULAR

Tümör supresör geni tp53'ün 249.kodonun da oluşan muhtemel mutasyonların PCR-RFLP ve dizi analizi yöntemi ile, AFB1 epoksi metabolitlerinin de serum ve idrar örneklerinde ELISA yöntemi ile sorgulandığı, kronik HBV ve Aflatoksin-B1 maruziyetinin HSK ile ilişkisini tespitini amaçlayan bu çalışmada; çalışmaya dahil edilen örneklerin alındığı hasta ve kontrol gruplarının sosyodemografik özelliklere göre yapılan değerlendirmesin de her iki gruba dahil edilen toplam 56 bireyin 42'sinin erkek (%75) 14'ünün kadın (%25) olduğu, her iki grupta da 45 yaş üzeri örnek sayısının %54 ile benzer olduğu görüldü (Tablo 3).

Tablo3. Değerlendirmeye alınan bireylerin sosyodemografik özellikleri

	Kontrol Grubu (n=21)		HSK'lu Hasta (n=35)		Toplam Sayı (n=56)	
	S	%	S	%	S	%
Cinsiyet						
Erkek	13	62	29	83	42	75
Kadın	8	38	6	17	14	25
Yaş						
≤ 24	2	9.5	-		2	3.6
25-44	8	38	16	46	25	44.6
≥ 45	11	54.4	19	54	30	53.6

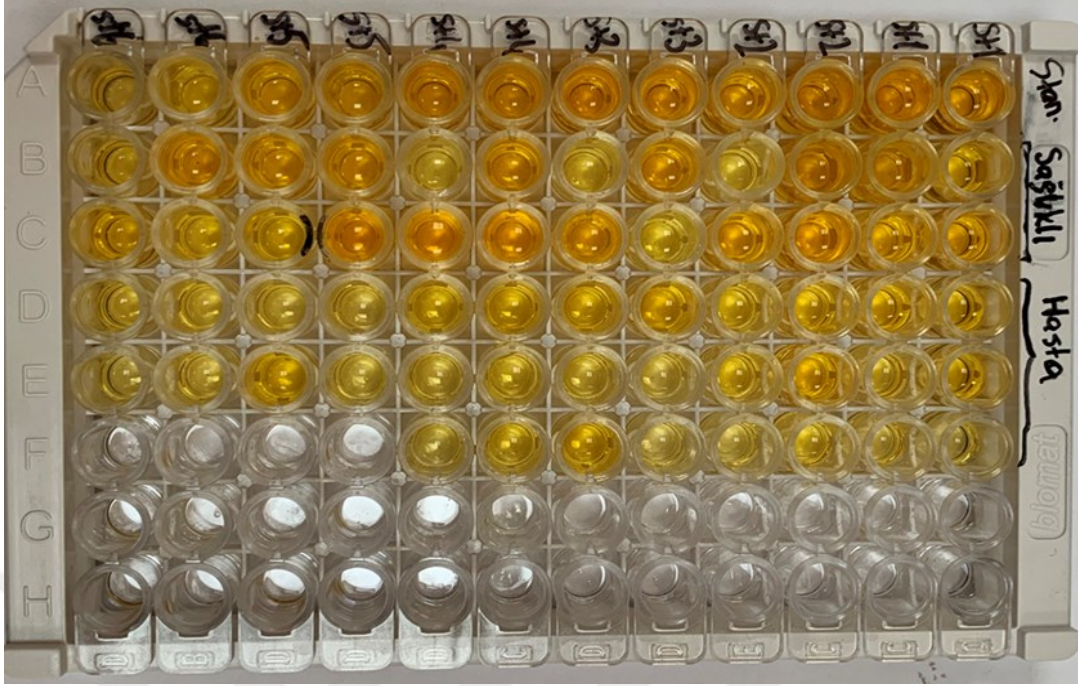
AFM1 düzeyleri kıyaslandığında hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlemlenmiş buna ek olarak 45 yaş üstü bireylerde, genç bireylere ve kırsal bölgelerde yaşayan bireylerin şehirlerde yaşayan bireylere oranla daha yüksek oranda oldukları görülmüştür (Tablo 4).

Tablo4. Değerlendirmeye alınan bireylerin yaşadıkları bölgeye göre dağılımları

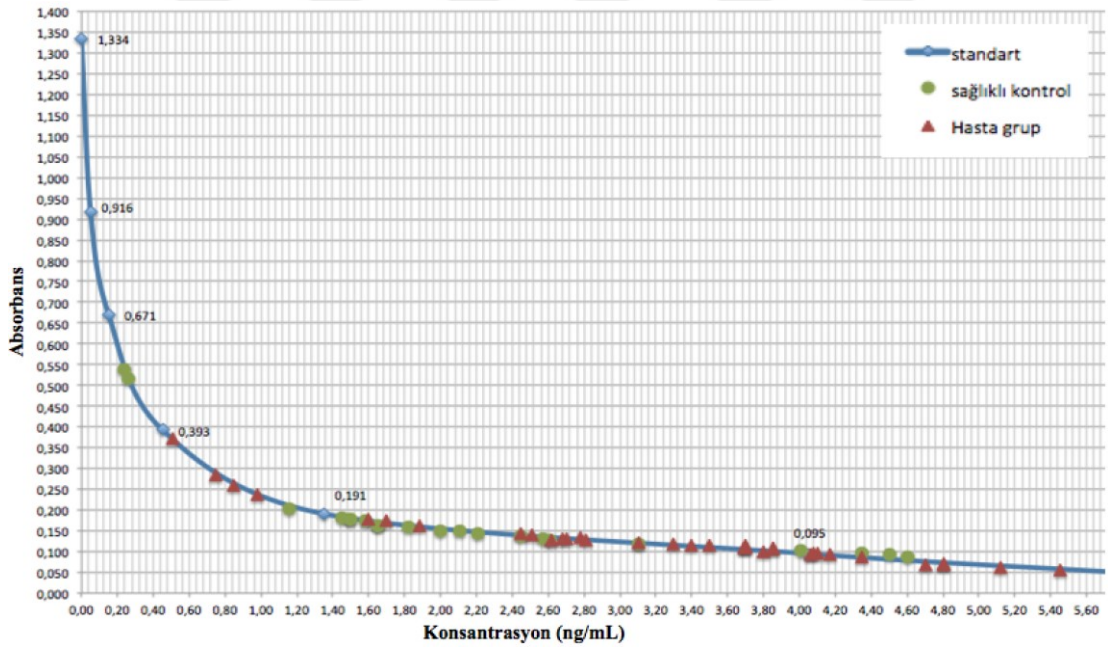
	Kontrol Grubu (n=21)	HSK'lu Hasta (n=35)	Toplam Sayı (n=56)
<u>Yaşadığı Bölge</u>			
Akdeniz	6	17	23
Doğu Anadolu	8	14	22
Karadeniz	5	3	8
Diğer	2	1	3

HSK+HBV'li hasta grubunda yer alan bireylerin ortalama idrar AFM1 konsantrasyon seviyeleri, kontrol grubuna ait bireylerde ortalama konsantrasyon seviyeleri ile kıyaslandığında, hasta idrarlarında bu değerlerin 0.130 absorbans/2600pg/ml kontrol grubunda ise 0,179 absorbans/1600 pg/mL olduğu yani hasta grubundaki AFM1 konsantrasyonunun daha yüksek olduğu görölmüştür. Kontrol grubu bireylerden 3 (%14.2)'ünün idrar AFM1 seviyesi kitin tespit değeri olan 0.150 pg/ml'nin altında olduğu görölmüş, benzer şekilde hasta grubundan da 4 (%11.4)'ünün idrarında AFM1 kit tespit seviyesinin altında kalmıştır.

Çalışmada kontrol grubu 14'u sirotik, 7'si fibrotik karaciğer hastalığı bulunan bireylerde dahil toplam 21 kişiden oluşmaktaydı. Bu bireylere ait ortalama AFM1 konsantrasyonları sirotik ve fibrotik olmak üzere sırasıyla 2260pg/ml ve 1820pg/ml olarak hesaplandı. DNA dizi analizi yöntemi ile mutasyon belirlenen 5 HSK'lı hastanın ortalama AFM1 miktarı ise 3139 pg/ml olarak belirlendi.



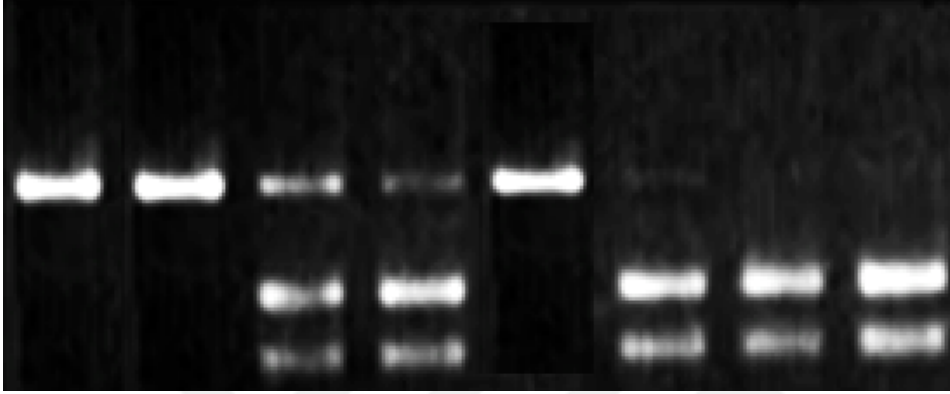
Şekil4. Aflatoxin M1 (AFM1) ELISA (Elabscience®) sonuçları



Şekil 5. Çalışmaya dahil edilen idrar örneklerindeki AFM1 Konsantrasyonlarının Dağılımı

Çalışmaya dahil edilen karaciğer biyopsi materyallerden elde edilen DNA örneklerinde AFB1 maruziyetinin neden olduğu R249S mutasyon varlığının belirlenmesi için

kullandığımız sırasıyla; PCR-RFLP (Şekil-5) ve DNA dizi analizi yöntemleri sonucunda HSK'lı hastalara ait örneklerin 6/35 (%17.1)'sında ve %5'inde (%14.3), kontrol grubu arasında ise her iki yöntem ile sirotik bireylerin örneklerine ait 2(%9.6) klinik materyalde tümör supresör geni p53'de ilgili kodonda AGG>AGT mutasyon varlığı tespit edilmiştir (Tablo.5-6).



Şekil6. HaeIII PCR-RFLP jel elektroforez görüntüsü

Tablo5. HSK'lı hasta ve kontrol grup örneklerinin R249S mutasyonunun PCR-RFLP analizine göre dağılımları

	Kontrol Grubu (n=21)		HSK'lı Hasta (n=35)	
	S	%	S	%
PCR-RFLP Mutasyon				
Var	2	9.6	6	17.1
Yok	19	90.6	29	82.9

DNA dizi analizi yöntemi ile p53 geninde R249S mutasyonu tespit edilen 4'ü HSK'lı 6 bireyin tamamında da PCR-RFLP ile mutasyon tespit edildiği görüldü. Bu bireylerin 5'inin erkek olduğu, kontrol grubunda yer alan tek kadın'da olmak üzere HSK'lı bir hasta hariç 5'inin 45 yaş üzeri grupta yer aldıkları tespit edildi. Hasta grubunda en

düşük AFM1 konsantrasyonunun 1340pg/ml, en yüksek konsantrasyonunun da 5015pg/ml olduğu görüldü(Tablo-7)

Tablo6. HSK'li hasta ve kontrol grup örneklerinin R249S mutasyonunun DNA dizi analizine göre dağılımları

<u>Dizi</u>	Kontrol Grubu (n=21)		HSK'lu Hasta (n=35)	
	S	%	S	%
<u>AnaliziMutasyon</u>				
Var	2	9.6	5	14.3
Yok	19	90.4	31	88.5

Tablo7. p53 geni 249. kodonda arginin-serin değişikliği tespit edilen 4 hasta ile 2 kontrol grubu bireyin AFM1 ve demografik özellikleri

Grup	Yaş	cinsiyet	AFM1
HSK	25-44	E	2620pg/ml
HSK	>45	E	3860pg/ml
HSK	>45	E	1340pg/ml
HSK	>45	E	2860pg/ml
HSK	>45	E	5015pg/ml
K	>45	E	2455pg/ml
K	>45	K	1030pg/ml

TARTIŞMA

Çalışmamızda kronik HBV taşıyıcısı HSK'lı hastalarda AFB1 mazuriyetinin karsinogeneze muhtemel katkısını tespit amacı ile planlanmıştır. Bu bağlamda Çukurova Üniversitesi Balcalı hastanesi ile Adana şehir hastanesinde izlenen HBV taşıyıcısı olup histopatolojik olarak doğrulanmış HSK tanısı almış hastalar ile HSK dışı sebepler ile tanı amaçlı olarak karaciğer biyopsisi yapılmış hastalara ait parafin blok karaciğer biyopsi ve idrar örnekleri örnekler dahil edilmiştir. metabolitlerinin seviyesinin belirlenmesinin ve bu AFB1 maruziyeti ile HBx geninin varlığı ile beraber, aflatoksinlerin mutajenik etkilerinden dolayı tümör süpresör p53 geni kodon 249'da ortaya çıkan mutasyonların sıklığı ve bunların HSK riski gelişiminde olası sinerjistik etkisini araştırmayı planladık.

Mikotoksinler ile HSK'da dahil olmak üzere karaciğer hastalıkları arasındaki muhtemel ilişki uzun süreden beri iddia edilmektedir. Özellikle AFB1, IARC tarafından Grup I karsinogen olarak sınıflandırılmıştır. Primer karaciğer kanserinin çok orijinli olduğu bilinmekle beraber gıda kökenli AFB1 kontaminasyonunun yüksek olduğu tropikal bölgelerde yüksek doz ve uzun süreli maruziyetin yaratılan epoksi radikalleri ve DNA metilasyonu üzerinden HSK gelişimi için önemli bir risk faktörü olduğu çok sayıdaki çalışmada ileri sürülmüştür(4). Aflatoksinlere olan duyarlılığın cinsiyete bağlı olup olmadığını araştırmak üzere yapılan deneylerde dişi farelerin erkek farelere göre daha az duyarlı olduğu; bu durumun da östrojenik hormonların koruyucu etkisinden kaynaklandığı ve toksisitenin de çevresel faktörler, maruziyet miktarı, yaş, sağlık ve beslenme alışkanlığına bağlı olarak farklılık gösterdiği ve AFB1'in genotoksik özelliği nedeniyle mutasyonlara yol açarak kanser gelişiminde etkili olduğu bulunmuştur⁴¹.

Hepatoma ve karaciğer hasarı oluşturduğuna ilişkin yapılan çalışmalar AFB1'in K1 ras protoonkogeninin aktivasyonunu sağladığı ve p53 tümör supresör genini farklılaştırdığı ek olarak HSK'lı hastalarda, p53 geninde önemli bir nokta olan 249. kodonun üçüncü bazında guanin→timin (G→T) transversiyon meydana getirdiği gözlenmiştir. Tümör oluşumunda rol alan genlerin farklılığına rağmen, p53 transkripsiyon faktörü temel tümör baskılayıcı ve bu sürece dahil olan çeşitli sinyal yollarının yöneticisi olarak görev almaktadır. Bu görevlerle uyumlu olarak, p53

mutasyonları HSK de dahil olmak üzere neredeyse tüm kanser çeşitlerinde gösterilmiştir (68).

HSK gelişiminde HBV ve aflatoksin maruziyet ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda, moleküler epidemiyolojik olarak HBx, TP53 gen bölgeleri ve mutasyon varlığını belirlemek amacı ile PCR, PCR-RFLP, DNA dizi analizi, AFB1 ve AFM1 gibi aflatoksin aduktlarının seviyelerini ölçmek amacı ile de sıklıkla ELISA ve HPLC yöntemleri kullanılmıştır.

Chu Y ve ark.'larının 2010 yılında yaptığı toplum temelli bir kohort çalışmasında HCV ile enfekte olmuş ve B-olmayan kişilerde AFB1 ile ilişkili HSK riskini araştırmayı amaçlamıştır. Serum AFB1-albumin adduct düzeyleri 100 HSK vakasında ve 1767 kontrol anti-HCV ve HBsAg (non-HBV,non-HCV) için seronegatif olarak kontrol edildi ve bir başka 103 HSK vakası ve anti-HCV-seropozitif ve HBsAg-seronegatif olan 176 kontrolde ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. 20 yıllık takipte, yeni gelişen HSK'a kadar olan takip süresi, non-HBV,non-HCV (p=0.0162) ve HCV-enfekte (p < 0.0001) bireylerde serum AFB1-albumin adduct seviyelerinin daha yüksek olduğu anlamlı derecede kısa olduğu belirlenmiştir ve 8 yıllık takipte HCV enfeksiyonu ve AFB1 maruziyeti HSK için bağımsız risk faktörleri olarak bulunmuştur. Yüksek serum AFB1-albumin adduct düzeyleri, düzenli alkol tüketimi olmayan bireylerden farklı olarak düzenli alkol tüketen, non-B-non-C bireylerde 8 yıl takipte yeni geliştirilen HSK riski ile anlamlı olarak ilişkili olduğu düşünülmüştür.

AFB1 maruziyeti, diğer HCV ile ilişkili HSK belirleyicileri ile değerlendirildiğinde bağımsız bir risk faktörü olarak belirlendi.AFB1 maruziyeti, alkol ve HCV enfeksiyonu dahil olmak üzere siroz için önemli risk faktörleri olan katılımcılarda HSK gelişimine katkıda bulunduğu kanaatine varılmıştır¹⁹.

Iu Gul ve ark.'larının yaptığı çalışmada, aflatoksine maruz kalmanın, HCV enfeksiyonunun veya HSK aile öyküsünün HSK gelişme riskini arttırıp arttırmadığını belirlemek için 10 yıl boyunca kronik HBV olan 145 erkeği takip etmişler.HPLC yöntemi kullanılarak AFM1 seviyelerini belirlemek amacı ile bireyleri izlemeye başlamadan önce 8 aylık idrar örneği toplamışlardır.

145 örneğin 78'inde (54%) AFM1 tespit edilmiş ve HSK riski, belirlenebilir AFM1 düzeyi olanlarda (3.6 ng / L'nin üstünde) 3.3 kat fazla bulunmuştur (1.2-8.7'in % 95 'lik güven aralığında). Relative risk yaşa ve HCV durumuna göre hesaplanmıştır.

Belirlenebilir AFM1'e maruz kalmaya bağlı olarak atfedilebilir risk 0.553'tür (0.087, 0.94). Yükselmiş AFM1 düzeyli ölümcül sirozlu hastaların riski göreceli olarak 2.8 (0.6, 14.3) idi ve Kalıcı bir şekilde yükselmiş alanin transaminaz (ALT) olma ihtimali, belirlenebilir AFM1(P= 0.007) olanlarda 2.5 kat daha yüksek, HCV enfeksiyonun eşlik ettiği hastalarda yaş ve AFM1 seviyelerine bağlı olarak yapılan hesaplamalarda HSK riski 5.8 ve ailedeki HSK öyküsü değerlendirildiğinde ise 5.6 kat artmıştır. Belirlenebilir AFM1 ve HSK 'li dört erkeğin hepsinde, parafin dokudan ekstrakte edilen kanser dokularında RFLP yöntemi ile p53 geninin 249 kodonunda mutasyon varlığı belirlenmiştir. Bu çalışma, AFM1'e maruz kalmanın, kronik HBV hepatitli erkeklerde HSK riskinin önemli bir bölümünü oluşturabileceğini, HCV ve ailede HSK öyküsünün, kronik HBV'li erkeklerde HSK riskini arttırdığına dair kanıtlara önem verdiğini göstermişlerdir²⁸.

Afum ve ark.'ları Kumasi, Gana'da aflatoksin ve karaciğer hastalığı arasındaki ilişkiyi belirlemek için bir vaka kontrol çalışması yapmışlardır. Sosyo-demografik özellikleri, gıda depolama ve tüketim alışkanlıklarını incelemek için bir anket uygulamış ve HPLC yöntemi ile AFM1 seviyelerini ölçmek için idrar örnekleri toplamışlardır. İki yüz yetmiş altı kişi çalışmaya dahil edilmiş ve bu bireyler; 38'inde karaciğer hastalığı olan(olgular), 136'sında hepatit B/C ya da karaciğer hastalığı bulunmayan (negatif kontrol), 102'sinde karaciğer kanseri bulunmayan ancak hepatit B / C pozitif (pozitif kontroller) olan şeklinde gruplandırılmıştır. Tüm gruplar içinde erkek katılımcıların sayısını fazla olarak belirlemişler (vakaların% 76'sı, negatif kontrollerin% 88'i ve pozitif kontrollerin% 65'i) ve Çok değişkenli analizler, vakalar negatif kontrollerle karşılaştırıldığında yaşın önemli bir belirleyici olduğunu, 25–34 yaşları arasındaki katılımcılar için vaka olma olasılığı > 45 olanlara göre% 70 daha az olduğu göstermiştir. Olgular arasında etnik gruplara göre farklılıklar olduğu ve Akan'ların AFM1 seviyelerinin diğer grupların ortalama seviyelerinden az olma yatkınlığı belirlenmiştir. Vakalar pozitif kontrollerle karşılaştırıldığında, yer fıstığının aflatoksin kontaminasyonu ile ilgili farkındalığın 2.29, mısırdaki ise 2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, çoğu vaka aflatoksin kontaminasyonunun insanlarda hastalığa neden olmadığını bildirmiştir. Bu durum katılımcıların potansiyel sağlık etkilerini tam olarak anlamamakla beraber aflatoksin kontaminasyonunun farkında olduklarını göstermiştir. Bu bulgular, aflatoksinin gıdadaki zararlı sağlık etkilerini ve

erkeklerde daha yüksek riskleri vurgulayan eğitim müdahalelerine acilen ihtiyaç duyulduğunu göstermiştir. Akan'lar arasında düşük aflatoksin seviyelerinin nedenlerinin belirlenmesi ve toplumdaki diğer etnik gruplara yarar sağlayan müdahaleleri tasarlamak için kullanılan bulguların belirlenmesi gerektiği düşünülmüştür²⁹.

Smith ve ark.'ları Guatemalan erişkinlerinde AFB1 maruziyeti ve hepatit virüsü enfeksiyonu prevalansını ve korelasyonlarını belirlemek amacı ile 2016 Mayıs-Ekim ayları arasında Guatemala'nın beş bölümünde ikamet eden 40 yaş ve üzeri (n = 461) sağlıklı kadın ve erkek bireyi bu kesitsel bir çalışmaya dahil etmişlerdir.

Serum AFB1-albumin adukları, izotop seyreltme kütle spektrometrisi yöntemi ile ölçülmüştür. Hepatit B virüsü ve hepatit C virüsü enfeksiyonunun biyobelirteçleri immünolojik test ile değerlendirilmiş ve AFB1-albumin adukları, katılımcıların %100'ünde, ortalama 8,4 pg /mg albümin olarak ($0,2 \pm 814,8$) hesaplanmıştır. Maruz kalma, erkek, kırsal, düşük gelirli ve daha az eğitilmiş katılımcılarda, kadın, kentsel ve yüksek sosyoekonomik statü katılımcılarına göre anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur. ($p < 0.05$). Hepatit B ve C seropozitifliği düşük (sırasıyla %0.9 ve %0.5) ve hepatit virüsü seropozitifliğinin düşük prevalansı ile eş zamanlı olarak önemli ölçüde AFB1 maruziyeti belirlenmiştir. Kantitatif olarak, AFB1 maruziyetleri daha önceki Asya ve Afrika'da karaciğer kanseri riskini arttırdığı tespit edilen çalışmalara benzer olduğu söylenmiş ve AFB1 maruziyetinin azaltılması, Guatemala'da karaciğer kanseri insidansını ve mortaliteyi azaltabileceği, daha fazla araştırma yapılmasını gerektiğini düşünmüşlerdir³⁰.

2012 yılında Brezilya'da yapılan bu çalışmanın amacı, HBV taşıyıcı ve taşıyıcı olmayan hastaların idrarında AFM1'in oluşumunu araştırmaktır. Bir grup, Mart-Haziran 2008 tarihleri arasında Brezilya'nın Maringa şehrindeki iki hastanede tedavi gören rastgele seçilen 43 HBV taşıyıcısını içermiş, kontrol grubu ise anti-HBs pozitif ve HBsAg negatif test sonuçlarına sahip 29 sağlıklı yetişkinden oluşmuştur. AFM1'in tespiti, HPLC ve Kobra Hücresi ile kolon sonrası derivasyon kullanılarak floresans ile yapılmış. Analiz edilen 72 numunenin HBV taşıyıcı olmayanların 05/29 (% 17,2)'unda ve kronik HBV taşıyıcılarının 16/43 (% 37,2)'sında AFM1 pozitifmiş. Çalışmada ankete katılan iki popülasyonun idrarında AFM1 göstermiştir. Bununla birlikte, kronik

HBV taşıyıcılarının AF'leri ve HBV arasındaki ilave etkileşime bağlı olarak HSK gelişme riskinin daha yüksek olduğuna dair kanıtlar varlığını ileri sürmüşlerdir³¹.

Fan K ve ark.'ları tarafından Nanjing, Çin'deki 260 kırsal kesimde (18-66 yaş) mikotoksin maruziyetini araştırmak amacı ile yapılmış bu çalışmada eşleştirilmiş plazma ve sabah ilk idrar örnekleri, UHPLC-MS / MS yöntemi ile 12 ana mikotoksin ve 14 mikotoksin metaboliti dahil olmak üzere 26 mikotoksin biyobelirteçleri için analiz edilmiştir. Mikotoksinler ve metabolitleri 95/260 (% 36,5) plazma ve 144/260 (% 55,4) idrar örneğinde tespit edilmiş ve %27.7 ile insidansı okratoksin A (OTA) plazmadaki en yaygın mikotoksin olarak belirlenirken, aflatoksin B1-lisin (AFB1-lisin) (görülme sıklığı% 19.6, aralık 10.5-74.5 pg / mg albümin), fumonisin B1 (FB1) (görülme sıklığı% 2.7, aralık 0.305-0.993 mg / L), deoksinivalenol (DON) (insidans% 2.3, aralık 1.39-53 mg / L), zearalenon (ZEN) (insidans% 6.5, aralık 0.063-0.418 mg / L) ve zearalanon (ZAN) (insidans% 1.2, 0.164-0.346 mg / L), plazma numunelerinde gösterilmiştir. DON-15-GlcA en sık belirlenen üriner mikotoksin olarak %43.8 ile bulunmuştur. DON, DON-3-GlcA, AFM1 (insidans 10.4%), ZAN, ZEN, FB1 , T-2 ve OTA idrar örneklerinde bulunan diğer mikotoksinlerdir. Plazma veya idrar seviyelerine bağlı olarak günlük AFB1, FB1, ZEN, DON ve OTA alımları tahmin edilmiştir. Sonuçlar, araştırılan kırsal alanda yaşayanların, günlük ortalama 0.41 ug/ kg.bw/gün alım ile kanserojen mikotoksin AFB1'e maruz kaldıklarını ve bunun sonucunda potansiyel bir halk sağlığı sorununun altını çizdiğini göstermişlerdir³².

Belma Giray ve ark.'ları Bu çalışmayı, Türkiye'nin farklı bölgelerinde yaşayan geriatric popülasyonda serum aflatoksin düzeylerindeki bölgesel ve mevsimsel farkları araştırmak ve cinsiyet ile ilişkisini değerlendirmek amacıyla yürütmüştür. Akdeniz ve Karadeniz Bölgelerinde yaşayan geriatric çalışma grubunda (ortalama yaş 72 ± 1.0 yıl, n=37) serum aflatoksin B1, B2, G1 ve G2 düzeyleri HPLC ile tayin edilmiştir. Tüm çalışma grubundaki total serum aflatoksin düzeyleri yaz döneminde 1171 ± 124 pg/mL, kış döneminde 732 ± 58 pg/mL olarak belirlenmiş ve mevsimler arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p< 0.05). Karadeniz Bölgesinde serum aflatoksin düzeyleri, her iki mevsimde de Akdeniz Bölgesine oranla yüksek bulunmuştur. En yüksek total aflatoksin düzeyleri ise (1539 ±170 pg/mL) muhtemelen küf mantarının büyümesi ve toksin oluşumu için uygun iklim koşulları nedeniyle Karadeniz Bölgesinde yaz döneminde toplanan örneklerde tayin edilmiştir. Cinsiyetler arasındaki farklar

istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tüm sonuçlar, bu bölgelerde yaşayan yaşlı popülasyonun aflatoksinlere devamlı maruziyetinin söz konusu olduğunu ve temas düzeylerinin yaz döneminde kışa oranla arttığını düşündürmektedir. Aflatoksin maruziyetinin geriatrik popülasyonda gözlenen hepatotoksisiteden sorumlu olabileceği ve aflatoksinlerle birlikte farklı mikotoksinlere temasın da sinerjistik veya additif etkilere yol açabileceği dikkate alınmalıdır³³.

Ali N ve ark.'ları Bangladeş'te gıda ve yemin AFB1 bulaşmasına dair veriler az olduğundan, sık maruz kalmayı belirten Bangladeşli idrarlarda metabolit ve biyobelirteç olan AFM1'in ortaya çıkması üzerine ELISA tarafından bir ilk tarama yapmışlardır. Bu bulgu, daha büyük bir idrar numunesi grubunda AFM1 konsantrasyonlarını belirlemek için daha hassas bir yöntem (IAC temizleme ve HPLC-FD analizi) uyguladıkları bir izleme çalışması yapmalarını sağlamış. Mikotoksin maruziyetinde olası mevsimsel ve bölgesel farklılıkları açıklamak için, Rajshahi'deki kırsal ve kentsel bir bölgeden 164 idrar (yaz aylarında n = 69, kış aylarında n = 95),62 katılımcıdan iki örnek toplam zamanında, ve Dakka bölgesindeki hamile kadınlardan elde edilen 54 olmak üzere Bangladeş'in iki semtinde toplam 218 idrar örneği çalışmaya dahil edilmiştir. AFM1, tüm Rajshahi idrar numunelerinin >% 40'ında yaz aylarında 1,7-104 pg / mL aralığında ve kış mevsiminde 1,8-190 pg / mL aralığında tespit edilmiştir. Ayrıca ortalama idrar AFM1 düzeyi kışın (27.7 ± 42.6 pg / mL) yaz (13.6 ± 21.2 pg / mL) mevsimine göre daha yüksekti ek olarak kırsal ve kentsel Rajshahi kohortu arasındaki tematik AFM1 seviyelerinde farklılıklar gözlenmiştir. Dhaka gebe kadınlarında AFM1 daha az sıklıkla (LOD'un% 31'in üzerinde, ortalama 13.9 ± 33.3 pg / mL), ancak Rajshahi kohortundaki gibi benzer bir konsantrasyon aralığında (1.7-141 pg / mL) bulunmuş ve üriner AFM1 düzeyleri katılımcıların gıda tüketim modeli ile anlamlı bir ilişki göstermemiştir. Sonuç olarak, diğer ülkelerdeki biyobelirteç verileri ile karşılaştırıldığında, Bangladeşli kohortlarımızdaki tespit sıklığı ve idrar AFM1 seviyeleri, potansiyel kanserojen aflatoksinlere maruz kalmalarına ilişkin kaygıları arttırdığı düşünülmüştür³⁴.

Sulaiman SH ve ark.'ları tarafından Selangor, Malezya, Hulu Langat bölgesinde yetişkinler arasında diyetle ilgili olarak aflatoksin maruziyetinin bir biyolojik belirteci olan idrar AFM1 arasındaki ilişkiyi belirlemek amacı ile yapılan çalışma bazı gıda ürünleri aflatoksin kirliliği için daha yüksek potansiyele sahiptir ve bunlar tüm çalışma katılımcılarına verilen bir Gıda Frekans Anketinde listelenmiş. Böylece listelenen her

bir gıda ürünü için tüketim oranlarını kaydetmişlerdir. Bununla birlikte, ELISA yöntemi kullanılarak AFM1 seviyelerinin ölçümü için Hulu Langat bölgesinde seçilen bölgelerdeki yetişkinlerden idrar örnekleri toplanmış. Toplanan ve test edilen 444 idrar numunesinin 199'u AFM1 için pozitif ve 37 tanesi 0.64 ng / mL tespit limitini (LOD) aşmıştır. Tahıl ürünleri, günlük ortalama 512.54 g tüketimle, tüm gıda grupları arasında en yüksek tüketim seviyesini göstermiştir. Ki-kare analizi, yumurta ($X^2 = 4.77$, $p = 0.03$) ve süt ürünlerinin ($X^2 = 19.36$, $p < 0.01$) tüketiminin idrar AFM1 ile anlamlı ilişki gösterdiğini ancak her iki gıda grubunda da phi ve Cramer'in V değerinin 0,3'ten daha düşük olduğunu yani bu besin gruplarının tüketimi ile idrardaki AFM1 düzeyi arasındaki ilişkinin zayıf olduğunu göstermiştir³⁵.

Schwartzbord J ve ark.'ları tarafından 52 Haiti numunede ELISA idrar AFM1 düzeyinin araştırıldığı bir çalışmada sınırın üstünde (0.2 ng / ml idrar) değerler bulunmuş ancak 14 numunede AFM1 seviyesi tespit limitinin altında (0.4 ng / ml) belirlenmiştir. 52 Haiti idrar numunesinin hepsinin sıvı kromatografisi, sadece 11'inin ölçülebilir AFM1 seviyesinde olduğunu göstermiş (ortalama: 29.5 pg / ml, standart hata: 10.8, aralık: 2.94–96.5 pg / ml). Helica ELISA, Haitian numunelerinde AFM1 dışında aflatoxin formları saptamış olabileceği veya matris artışı, düşük AFM1 konsantrasyonlarında sonuçları etkilemiş olabileceği düşünülmüştür. Bu ELISA, epidemiyolojik amaçlar için aflatoxine maruz kalmanın ilk, kalitatif göstergesi olarak görev yapabileceği ancak bu yöntemin AFM1 konsantrasyonlarının kesin ve spesifik bir göstergesi olarak kullanılması ek arıtma ve doğrulama gerektireceğini belirtmişlerdir³⁶.

Chen G. ve ark.'ları tarafından çocuklarda idrar AFM1 seviyelerini belirlemek ve bu çocuklarda daha önce bildirilmiş olan aflatoxin albümin addukt (AF-alb) seviyeleri ile korelasyonları belirlemek amacı ile eşleşen idrar ve kan örnekleri 6-14 aylık 84 Tanzanyalı çocuktan ve bir köydeki (Kigwa) 31 çocuktan, altı ay arayla üç kez örnek toplanmıştır. Sadece ikinci zaman noktasında iki farklı bölgeden 31 ve 22 çocuktan örnekler çalışmaya dahil edilmiştir. İdrar AFM1 ve AF-alb seviyeleri ELISA yöntemi kullanılarak ölçülmüştür. AFM1 veya AF-alb biyobelirteç ölçümlerine dayanarak üç köyün aflatoxine maruz kalmadaki sıralaması aynı, Kigwa köyünde, hem AFM1 hem de AF-alb seviyeleri, hasattan altı ay sonra başlangıç durumuna göre daha yüksek olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, bir sonraki ziyarette, AFM1 seviyeleri, ikinci ziyarette) 71.0 (44.7, 112.6) olan seviyeden 49.3 (31.5, 77.3) pg / ml'a düşmüştür.

AF-alb seviyeleri, bu iki ziyaret arasında 47.3'ten (29.7, 75.2) 52.7'ye (35.4, 78.3) pg / mg artarmış, AF-alb daha uzun süreli maruziyeti ölçerken AFM1'in kısa vadeli maruziyeti ölçtüğü gerçeğini yansıtmıştır. AFB1 alımı ile AFM1 atılımı arasında bir korelasyon var bulunmuştur.($r = 0.442$, $p < 0.001$). Sonuç olarak üriner AFM1'in, Tanzanyalı çocuklarda AFB1 belirlemede ve gıda kaynaklı toksine maruz kalmanın coğrafi ve geçici değişimlerini yansıtmada iyi bir biyobelirteç olduğunu belirtmişlerdir³⁷.

Etiyopya'daki küçük çocuklar arasında aflatoksin maruziyetini idrar biyobelirteçlerini kullanarak değerlendirmesi amacı ile yapılan başka bir çalışma da Amhara ve Tigray bölgesel Etiyopya eyaletlerinden 200 çocuğun (1-4 yaş arası) dahil edildiği kesitsel çalışma olarak yürütülmüştür. 200 çocuktan toplam 200 idrar örneği toplanmış ve AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 ve AFM1 düzeylerini belirlemek için LC-MS / MS yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Beş aflatoksinin dördü idrar örneklerinin 34 / 200'ünde (% 17) tespit edilmiş. AFM1, 14/200 (% 7) 'de idrar numunesinde 0,06-0,07 ng / mL aralığında, AFB2, AFG2 ve AFG1 idrar örneklerinin sırasıyla 9/200 (% 4,5), 6/200 (% 3) ve 5/200 (% 2,5) 'ünde belirlenmiş ve örneklerin hiçbirinde AFB1 tespit edilmemiş, farklı malnütrisyon kategorileri ile aflatoksin maruziyeti arasında ilişki bulunamamış, bununla birlikte, biyobelirteç analizi küçük çocukların aflatoksinlere maruz kaldığını açıkça göstermiştir. Bu nedenle, aflatoksinlerin potansiyel sağlık sonuçlarını önlemek için halkın bilinçlendirilmesinin önemli olduğu kanaatine varılmıştır³⁸.

Sánchez EM ve ark.'ları tarafından Kolombiya, Bogota'da bir pediatrik sevk hastanesinin acil servisine başvuran çocuklardan HPLC metodu ile idrardaki AFM1 ve AFM2'nin sıklığı ve seviyelerini araştırmak amacı ile yürütülmüş çalışmada, aflatoksin kaynağı olabilecek gıdaların tüketimini ve sosyodemografik değişkenleri değerlendirebilmek için de anket uygulanmıştır. İdrarda AFM1 sıklığı, pozitif örneklerde ortalama $16 \text{ pg mL}^{-1} \pm 10.7 \text{ pg mL}^{-1}$ konsantrasyonu ile % 41.7 olarak bulunmuştur. İdrarda AFM1'in varlığı, özellikle mısır ve pirinç olmak üzere AFB1 ile kontamine olması muhtemel tahılların tüketimi ile ilişkilendirilmiş ve hiçbir örnekte sabelirlenebilir AFM2 düzeyi bulunmamıştır. Sonuçlar, çocukların Kolombiya'daki aflatoksinlere maruz kalmasının gerçek bir sorun olduğunu ve bu problemin sağlık otoritelerinin önceliklerinden biri olması ve eser seviyelerde farklı biyolojik ve

biyolojik olmayan matrislerde aflatoksinlerin belirlenmesine ve miktarlanmasına izin veren analitik yöntemler kullanılarak yiyeceklerdeki aflatoksinlerin sürekli izlenmesi gerektiğini söylemişlerdir³⁹.

Biyikli Z ve ark.'larının yaptığı çalışmanın amacı kontrol grubu, farklı viral hepatitler ve hastalığın farklı derecelerinde aflatoksin düzeylerinin karşılaştırılarak, aflatoksin maruziyet oranları ve aflatoksin metabolizması hakkında bazı ipuçlarının elde edilmesidir. Çalışmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Kliniğine Ocak 2006 – Haziran 2007 tarihleri arasında ardışık olarak başvuran toplam 203 (erkek/kadın: 119/84) viral hepatitli hasta ve normal biyokimyasal değerleri ve negatif serolojisi olan 62 sağlıklı birey (erkek/kadın:33/29) kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiş. Plazma AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2 düzeyleri HPLC yöntemiyle ölçülmüş. Bulgular: AFB1, AFB2, AFG1 ve AFG2 sırayla hastaların %24.6, %17.2, %22.7, %18.2' sinde belirlenmiş. Hastalığın derecesinden bağımsız olarak AFB1 pozitif hastaların yüzdesi, kontrol grubundan anlamlı olarak fazla bulunmuş. Ancak aflatoksin pozitif hasta yüzdesi açısından kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler kanserli hasta grupları arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır. Sonuç: Bu çalışma ile Türkiye'de viral hepatitli hastalarda aflatoksin maruziyetinin, sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak fazla olduğu gösterilmiş. Hepatosellüler karsinom gelişiminde bu maruziyetin önemli rolü olabileceği ve bu konuda yapılacak daha geniş, randomize çalışmalar gerektiği sonucuna varılmış⁴⁰.

Ortiz-cuaran S ve ark.'ları Tayland'daki bir vaka kontrolüne dayanarak, 176 vakanın ve 133 referansın plazma DNA'sında R249S'yi ve HBX geninin durumunu ölçmüş ve HBX komple sekanslarının tespiti, önceden siroz belirtilmemiş olan HSK'da R249S ile ilişkili bulmuş ve böylece sirozu bypass eden HSK'ya giden bir yolda HBX ile spesifik olarak ilişkili bulunmuştur⁴².

Jiao J ve ark.'ları tarafından aflatoksin diyetine maruz kalmanın Güney Teksas'taki Hispanikler arasında HSK insidansında bir rol oynayıp oynamadığını araştırdıkları çalışmada dijital PCR ve RFLP kullanarak, TP53R249S somatik mutasyonunu, HSK'daki aflatoksin etiyojisinin ayırt edici özelliğini ve Güney Teksas'tan 218 HSK hastasının ve 96 Hispanik bireyin cfDNA'sında ölçmüşler. Mutasyon sadece Hispanik ve Asya HSK hastalarında tespit edildi ve mutasyonu olan hastalar anlamlı derecede daha gençti ve genel sağkalımı kısa olarak

belirlenmiştir. Aflatoksin maruziyeti, Güney Teksas'taki Hispaniklerde düşük oranda HSK'ye katkıda bulunduğu düşünülürken, plazma cfDNA'da mutasyonunun tespiti, bu popülasyonda siroz veya ileri fibrozlu hastalarda HSK için umut verici bir risk değerlendirmesi olarak görülmemiştir⁴³.

Kronik HBV olan Taylandlı hastalarda yapılan çalışmada HBV genetik varyasyonunun ve AFB1 kaynaklı HSK'nın bir belirleyicisi olarak p53 geninin R249S mutasyonunun rolünü değerlendirmişler. 65 HSK'lı hasta ve 89 bireyin dahil edildiği çalışmada viral mutasyonlar ve R249S mutasyonu, serum numunelerinde doğrudan sekanslama ve RFLP ile karakterize araştırılmış. BCP bölgesindeki T1753C / A / G ve A1762T / G1764A mutasyonlarının prevalansları HSK grubunda HSK olmayan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek olarak bulunmuş ayrıca R249S mutasyonu, HSK ve HSK olmayan grupların sırasıyla %6,2 ve %3,4'ünde tespit edilmiştir. Çoklu regresyon analizi ile, A1762T / G1764A mutasyonlarının varlığı, Tayland hastalarında HSK riski ile bağımsız olarak ilişkilendirilmiştir⁴⁴.

Mısır İskenderiye'de yapılan diğer bir çalışmada ise, TP53'te kodon 249'da ve cfDNA'daki CTNNB1'de mutasyonların varlığını incelemişler ve DNA konsantrasyonlarını, HSK hastalarında kanser olmayan HBV ve HCV taşıyıcılarına ve seronegatif bireylere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulmuşlar. Ser-249 TP53 mutasyonları, 255 bireyin cfDNA'sındaki PCR-RFLP kullanılarak belirlenmiş ve sekanslama ile doğrulanmış. Ser-249, kronik karaciğer hastalığı ve HBV (6/36; % 16.7) enfeksiyonu olan hastalarda en yüksek prevalansla 12 serum (% 4.8) cfDNA'sında bulunmuş. Buna paralel olarak, 20 HSK biyopsisinden çıkarılan DNA üzerinde yapılan çalışmalar, iki vakada (% 10) ser-249 mutasyonunun varlığını göstermiştir. Bu sonuçlar, aflatoksinin mutajenezinin Mısır'daki hepatokarsinogenezde bir rol oynayabileceğini ve cfDNA'nın, kronik karaciğer hastalığı ve kanserdeki aflatoksin maruziyetinin ve viral enfeksiyonların etkilerinin izlenmesinde uygun bir materyal kaynağı olabileceğini göstermektedir⁴⁷.

Chittmitrapap S ve ark'larının 2013 yılında yaptığı çalışmada HBsAg pozitif olan veya olmayan 124 HSK hastaya ait parafine gömülü karaciğer dokularında RFLP yöntemi ile R249S mutasyonunun prevalansını belirlemiş ve pozitif çıkan sonuçları dizi analizi ile doğrulamışlardır. Altmış dört (%52) hasta HBsAg ve 18 (%15) anti-HCV pozitif ve 12 örnekte RFLP ile mutasyon varlığı tespit edilmiştir. Yapılan sekans analizi

sonucunda 10 HSK hastasının (%8,1) AGG/AGT (R249S) mutasyonu olduğu doğrulanmış ve bu 10 kişiden altısı HBsAg pozitif, geri kalan 4 kişiden ikisi anti-HCV pozitif olduğu belirlenmiştir.HSK hastalarında R249S mutasyon prevalansı, HBsAg pozitif olan örnekler için %9.4, negatif olanlarda ise %6.7 olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmamız HBsAg olan veya olmayan HSK'da AFB1 ile ilişkili p53 mutasyonunun (R249S) orta derecede prevalansını göstermiş ve HBsAg pozitifliğinin, R249S prevalansı ile ilişkisi bulunamamıştır⁴⁹.



SONUÇ ve ÖNERİLER

AFB1 ve HBx geninin HSK riski üzerindeki rollerinin değerlendirmesi ve aflotoksin varlığının neden olduğu tümör süpresör geninde meydana gelen mutasyon varlığının araştırılması amaçlanan bu çalışmada;

1- Bölgemizde HSK'lu hastalarda AFM1 düzeyinin, kontrol grubuna benzer olduğu,

2- Cinsiyet, yaş, yaşanılan bölge ve alfatoksin içeren gıdaların farkındalığı ve bunların tüketimi gibi etkenlere göre yapılan incelemelerde kontrol grubu bireyleri arasında da AFM1 seviyelerinde erkek ve yaşlı gruplarda kadın ve 45 yaş altı gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu,

3- Kontrol grubuna ait sirotik bireylerin ortalama AFM1 konsantrasyonlarının, fibrotik karaciğer hastalığı olanlardan yüksek ancak mutasyon görülen 5 HSK'lı hastalara ait idrar örneklerinin ortalamasından düşük olduğu,

4- Aflatoksin B1 maruziyetine bağlı olarak TP53 geninin 249. kodonunda meydana getirdiği AGG>AGT mutasyon sıklığının HSK'lı hastalarda yüksek olmakla beraber kontrol grubuna ait bireylerde de aflatoksin içeren gıdaların tüketimi sebebi ile mutasyon görüldüğü,

5- Kronik HBV'li HSK hastalarında HbX geni ve R249S mutasyonlarının benzer oranda yüksek olduğu fakat sınırlı örnek sayısı nedeni ile AFM1 düzeylerinin bu gen ve mutasyon bölgeleri ile sinerjistik etki içerisinde olmadığı,

6- Aflatoksin tüketiminin HSK gelişiminde önemli bir faktör olduğu ancak diğer çevresel ve konağa ait faktörler göz önünde bulundurularak karsinom gelişime riskinin araştırılması ve bu konuda daha geniş, randomize çalışmalar yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

1. **Shuaichen Liu, Samantha S. Y. Koh and Caroline G. L. Lee.** Hepatitis B Virus X Protein and Hepatocarcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, 17, 940.
2. **Torre, L.A.; Bray, F.; Siegel, R.L.; Ferlay, J.; Lortet-Tieulent, J.; Jemal, A.** Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J. Clin.* **2015**, 65, 87–108.
3. **Chen CJ, Liang KY, Chang AS, et al.** Effects of hepatitis B virus, alcohol drinking, cigarette smoking and familial tendency on hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* **1991**; 13:398–406.
4. **Chen CJ, Wang LY, Lu SN, et al.** Elevated aflatoxin exposure and increased risk of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* **1996**; 24:38–42.
5. **Qian GS, Ross RK, Yu MC, et al.** A follow-up study of urinary markers of aflatoxin exposure and liver cancer risk in Shanghai, People's Republic of China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **1994**; 3:3–10.
6. **Gourama H, Bullerman LB (1995)** *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*, aflatoxigenic fungi of concern in foods and feed—a review. *J Food Prot* 58:1395–1404.
7. **Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D (2004)** Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *Am J Clin Nutr* 80:1106–1122.
8. **Wild CP, Gong YY (2010)** Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* 31:71–82.
9. **Kensler TW, Roebuck BD, Wogan GN, Groopman JD (2011)** Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology. *Toxicol Sci* 120(Suppl. 1):S28–S48.
10. **Dohnal V, Wu Q, Kuc̣a K (2014)** Metabolism of aflatoxins: key enzymes and interindividual as well as interspecies differences. *Arch Toxicol* 88:1635–1644
11. **Bailey EA, Iyer RS, Stone MP, Harris TM, Essigmann JM.** Mutational properties of the primary aflatoxin B1-DNA adduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* **1996**; 93:1535–9.
12. **Ueno, Y., 1985,** *The Toxicology of Mycotoxins, CRC Critical Review in Toxicology*, 14(2), 99-132.

13. **Groopman, J.D. and Kensler, T.W., 1988**, Aflatoxin Exposure in Human Populations: Measurements and Relationship to Cancer, *CRC Critical Review in Toxicology*, 19(2), 113-145.
14. **Wild CP, Turner PC**. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis*. 2002; 17:471–81
15. **Raney VM, Harris TM, Stone MP**. DNA conformation mediates aflatoxin B1-DNA binding and the formation of guanine N7 adducts by aflatoxin B1 8,9-epoxide. *Chemical Research in Toxicology*. **1993**; 6:64–8.
16. **Raney KD, Meyer DJ, Ketterer B, Harris TM, Guengerich FP**. Glutathione conjugation of aflatoxin B1 exo- and endo-epoxides by rat and human glutathione S-transferases. *Chemical Research in Toxicology*. **1992**;5:470–8.
17. **Makarananda K, Pengpan U, Srisakulthong M, Yoovathaworn K, Sriwatanakul K**. Monitoring of aflatoxin exposure by biomarkers. *Journal of Toxicological Sciences*. **1998**; 23(Suppl-9)
18. **Sabbioni G, Skipper PL, Buchi G, Tannenbaum SR**. Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B1 in vivo in rats. *Carcinogenesis*. **1987**; 8:819–24.
19. **Hui-Chen Wu, Qiao Wang, Hwai-I Yang, Habibul Ahsan, Wei-Yann Tsai, Li-Yu Wang, Shu-Yuan Chen, Chien-Jen Chen, and Regina M. Santella**. Aflatoxin B1 Exposure, Hepatitis B Virus Infection and Hepatocellular Carcinoma in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. **2009**March ; 18(3): 846–853.
20. **Wogan GN, Kensler TW, Groopman JD (2012)** Present and future directions of translational research on aflatoxin and hepatocellular carcinoma: a review. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 29:249–257.
21. **Turner PC, Flannery B, Isitt C, Ali M, Pestka J (2012)** The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants. *Nutr Res Rev* 25:162–175.
22. **Sandra Ortiz-Cuaran, Stephanie Villar, Doriane Gouas, Gilles Ferro, Amelie Plymoth, Thiravud Khuhaprema, Anant Kalalak, Suleeporn Sangrajrang, Marlin D. Friesen, John D. Groopman, Pierre Hainaut**. *Cancer Letters* 331 (2013) 46–51.

23. **De Mitri, M.S. Cassini, R. Bernardi, M.** Hepatitis B virus-related hepatocarcinogenesis: molecular oncogenic potential of clear or occult infections, *Eur. J. Cancer.* 46 (2010) 2178–2186.
24. **Benhenda, S. Cougot, D. Buendia, M.A. Neuveut, C.** Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis, *Adv.Cancer Res.* 103 (2009) 75–109.
25. **Ozturk M.** P53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure, *Lancet* 338 (1991) 1356–1359.
26. **Wang, XZ, Jiang XR, Chen XC, Chen ZX, Li D, Lin JY, Tao QM.** Seek protein which can interact with hepatitis B virus X protein from human liver cDNA library by yeast two-hybrid system. *World J Gastroenterol* 2002;8(1):95-98
27. **Qi LN, Bai T, Chen ZS, Wu FX, Chen YY, De Xiang B, et al.** The p53 in hepatocellular carcinoma from Guangxi, China : Role of chronic hepatitis B virus infection and aflatoxin B1 exposure. *Liver Int.* 2015;35(3):999–1009.
28. **Iu GUL, Uying YWU, Hu YUZ, Editorial SEE, Page ON.** Increased Risk of Hepatocellular Carcinoma in Male Hepatitis B Surface Antigen Carriers With Chronic Hepatitis Who Have Detectable Urinary Aflatoxin Metabolite M1. 1982;379–83.
29. **Afum C, Cudjoe L, Hills J, Hunt R, Padilla LA, Elmore S, et al.** Association between Aflatoxin M 1 and Liver Disease in HBV / HCV Infected Persons in Ghana. :1–11.
30. **Smith JW, Kroker-lobos MF, Lazo M, Rivera-andrade A, Egner PA, Wedemeyer H, et al.** Aflatoxin and viral hepatitis exposures in Guatemala : Molecular biomarkers reveal a unique profile of risk factors in a region of high liver cancer incidence. 2017;1–13.
31. **Giolo MP, Oliveira CM De, Bertolini DA, Lonardon VC, Gouveia MS, Netto DP, et al.** Aflatoxin M 1 in the urine of non-carriers and chronic carriers of hepatitis B virus in Maringa , Brazil. 2012;48.
32. **Fan K, Xu J, Jiang K, Liu X, Meng J, Li H, et al.** Determination of multiple mycotoxins in paired plasma and urine samples to assess human exposure in Nanjing , China *. 2019;248.
33. **Aflatoksin GS.** 27.05.2019 Karadeniz ve Akdeniz Bölgelerinde Yaşayan Yaşlı

- Gruplarda Serum Aflatoksin Düzeylerinin Değerlendirilmesi. **2019**;1–7.
- 34. Ali N, Blaszkewicz M, Hossain K, Degen GH.** International Journal of Hygiene and Determination of aflatoxin M 1 in urine samples indicates frequent dietary exposure to aflatoxin B 1 in the Bangladeshi population. *Int J Hyg Environ Health* [Internet]. **2017**;220(2):271–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.11.002>
- 35. Sulaiman SH, Jamaluddin R, Sabran MR.** Association between Urinary Aflatoxin (AFM 1) and Dietary Intake among Adults in Hulu Langat District, Selangor, Malaysia. **2018**;1:1–15.
- 36. Schwartzbord J, Severe L, Brown D.** Detection of trace aflatoxin M1 in human urine using a commercial ELISA followed by HPLC. **2017**;5804:3–7.
- 37. Chen G, Gong YY, Kimanya ME, Shirima CP, Routledge MN, Chen G, et al.** Comparison of urinary aflatoxin M1 and aflatoxin albumin adducts as biomarkers for assessing aflatoxin exposure in Tanzanian children. *Biomarkers* [Internet]. **2018**;0(0):131–6. Available from: <https://doi.org/10.1080/1354750X.2017.1285960>
- 38. Ayelign A, Woldegiorgis AZ, Adish A, De M, Heyndrickx E, Saeger S De.** Food Additives & Contaminants : Part A Assessment of aflatoxin exposure among young children in Ethiopia using urinary biomarkers urinary biomarkers. *Food Addit Contam Part A* [Internet]. **2017**;34(9):1606–16. Available from: <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1350290>
- 39. Sánchez EM.** Frequency and levels of aflatoxin M 1 in urine of children in Bogota , Colombia. **2019**;
- 40. Biyikli Z, Lman RD, Çinar K, Karayalçin K, Ersöz S, Karayalçin S, et al.** Aflatoxin exposure in viral hepatitis patients in Turkey Türkiye ' de viral hepatitli hastalarda aflatoksin maruziyeti. **2009**;2009(3):192–7.
- 41. İşleyici Ö.** Van ' da Tüketime Sunulan UHT Sterilize İnek Sütlerinde Aflatoksin M 1 Düzeyinin Araştırılması The Levels of Aflatoxin M 1 in UHT Sterilized Cow ' s Milk in Consumed in Van Province. **2012**;23(2):65–9.
- 42. Ortiz-cuaran S, Villar S, Gouas D, Ferro G, Plymoth A, Khuhaprema T, et +**
- 43. al.** Association between HBX status , aflatoxin-induced R249S TP53 mutation and risk of hepatocellular carcinoma in a case-control study from Thailand. *Cancer Lett* [Internet]. **2013**;331(1):46–51. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.11.012>

44. **Jiao J, Niu W, Wang Y, Baggerly K, Ye Y, Wu X, et al.** Prevalence of Aflatoxin-Associated TP53R249S Mutation in Hepatocellular Carcinoma in Hispanics in South Texas. **2018**;249(10):1–10.
45. **Li VD, Li KH, Li JT.** TP53 mutations as potential prognostic markers for specific cancers : analysis of data from The Cancer Genome Atlas and the International Agency for Research on Cancer TP53 Database. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. **2019**;145(3):625–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00432-018-2817-z>
46. **Marchio A, Amougou M, Aubin A, Narcisse B, Komaz P, Noah D, et al.** Droplet digital PCR detects high rate of TP53 R249S mutants in cell - free DNA of middle African patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Exp Med* [Internet]. **2018**;18(3):421–31. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10238-018-0502-9>
47. **Villar S, Ortiz-cuaran S, Abedi-ardekani B, Gouas D, Nogueira A, Plymoth A, et al.** Aflatoxin-Induced TP53 R249S Mutation in Hepatocellular Carcinoma in Thailand : Association with Tumors Developing in the Absence of Liver Cirrhosis. **2012**;7(6):1–7.
48. **Hosny G, Farahat N, Tayel H, Hainaut P.** Ser-249 TP53 and CTNNB1 mutations in circulating free DNA of Egyptian patients with hepatocellular carcinoma versus chronic liver diseases. **2008**;264:201–8.
49. **Thongbai C, Sa-nguanmoo P, Kranokpiruk P, Poovorawan K, Poovorawan Y, Tangkijvanich P.** Hepatitis B Virus Genetic Variation and TP53 R249S Mutation in Patients with Hepatocellular Carcinoma in Thailand. **2013**;14:3555–9.
50. **Chittmittrapap S, Chiochansin T, Chaiteerakij R, Treeprasertsuk S, Klaikaew N, Tangkijvanich P.** Prevalence of Aflatoxin Induced p53 Mutation at Codon 249 (R249s) in Hepatocellular Carcinoma Patients with and without Hepatitis B Surface Antigen (HBsAg). **2013**;14:7675–9.

özgeçmiş

1987 yılında Nijer’de doğdu. Orta Okulu ve Lise eğitimi Nijerde tamamladı .2011-2012 yıllar arasında Malatya’daki İnönü Üniversitesinde Türkçe hazırlık gördü. 2012 güz döneminde Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne başladı ve 2016 bahar döneminde mezun oldu.2017 bahar döneminde Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitime başladı.İyi derecede iyi Türkçe, Fransızca ve orta derecede İngilizce bilmektedir .

