

STUDIE NAAR HET VERBAND TUSSEN DE CONSUMPTIE VAN
ROOD EN VERWERKT VLEES EN DE ONTWIKKELING VAN
COLORECTALE KANKER AAN DE HAND VAN DNA-
ADDUCTOMICS

Isabel Rigaux

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de farmaceutische zorg

Academiejaar: 2018 – 2019



STUDIE NAAR HET VERBAND TUSSEN DE CONSUMPTIE VAN ROOD EN VERWERKT VLEES EN DE ONTWIKKELING VAN COLORECTALE KANKER AAN DE HAND VAN DNA- ADDUCTOMICS

Isabel Rigaux

Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de farmaceutische zorg

Academiejaar: 2018 – 2019



SAMENVATTING

Achtergrond: Colorectale kanker (CRK) is een ernstige ziekte in de westerse wereld, maar ook in lage-inkomenlanden krijgen steeds meer mensen CRK. Bij de ontwikkeling van CRK spelen voeding en levensstijl een belangrijke rol. Het eten van rood en verwerkt vlees zou bijdragen tot het ontwikkelen van CRK. De laatste jaren wordt steeds meer belang gehecht aan de heemijzerhypothese, die het verband tussen de consumptie van rood en verwerkt vlees en de ontwikkeling van CRK zou kunnen verklaren. Het onderliggende mechanisme is echter nog niet volledig gekend.

Doelstelling: Deze masterproef heeft als doel meer inzicht te krijgen in de invloed van rood en verwerkt vlees op de colonicarcinogenese en het mogelijk onderliggende mechanisme uit te zoeken a.d.h.v. een varkensproef.

Methode: In een varkensproef kregen 32 biggen gedurende 4 weken een welbepaald dieet. Er waren 4 diëten: een aanbevolen dieet met kip (wit vlees), een aanbevolen dieet met rood (en verwerkt) vlees, een westers dieet met kip (wit vlees) en een westers dieet met rood (en verwerkt) vlees. Rood (en verwerkt) vlees kan zorgen voor de vorming van DNA-adducten, die kunnen leiden tot mutaties en ontwikkeling van kanker. Aan de hand van gerichte analyse naar DNA-adducten (N^7 -methylguanine, O^6 -methylguanine, N^3 -methyladenine, α -Methyl- γ -hydroxy-1, N^2 -propanoguanine (CroG), pyrimido[1,2-a]purin-10(1H)-one (M_1G) en O^6 -carboxymethylguanine) en DNA-adductomics (een nieuwe onderzoeksmethode waarbij 'untargeted' gezocht wordt naar alle aanwezige componenten in een staal) werd getracht in de stalen van verschillende weefsels (lever, ileum, colon proximaal en colon distaal) DNA-adducten te detecteren met ultrahoge performantie vloeistofchromatografie gekoppeld aan hoge resolutie massaspectrometrie.

Resultaten en conclusie: N^7 -methylguanine, O^6 -methylguanine, N^3 -methyladenine, O^6 -carboxymethylguanine, CroG en M_1G werden in de varkensstalen gedetecteerd. Er waren te weinig stalen die deze DNA-adducten in een concentratie boven de detectielimiet bevatten waardoor het niet mogelijk was om de verschillen tussen de diëten statistisch te bevestigen. Er kan daarom niet geconcludeerd worden dat deze gekende DNA-adducten voornamelijk in een bepaald weefsel of bij de consumptie van rood vlees en/of een westers dieet gevormd worden. Naast de gekende DNA-adducten zijn er nog andere DNA-adducten aanwezig die mogelijks discriminerend zijn voor een bepaald dieet, zoals een rood (en verwerkt) vlees dieet. Identificatie van deze DNA-adducten was echter niet mogelijk door te lage concentraties. Enkel de retentietijd en de m/z -waarde zijn gekend (en bij sommige DNA-adducten zijn er voorstellen voor de chemische formule). Er is bijgevolg bijkomend onderzoek nodig om de ongekende DNA-adducten verder te identificeren, het ontstaan van deze DNA-adducten te associëren met het dieet en hun rol in de ontwikkeling van CRK op te helderen.

DANKWOORD

In dit dankwoord zou ik graag een aantal mensen bedanken die rechtstreeks of onrechtstreeks een belangrijke rol gespeeld hebben bij het realiseren van deze masterproef.

In de eerste plaats gaat mijn dank uit naar mijn promotor Prof. dr. Lynn Vanhaecke omdat ze mij de kans heeft gegeven om onderzoek te verrichten naar dit boeiende onderwerp en er een masterproef over te schrijven.

Eveneens wil ik Lieselot Hemeryck bedanken voor de begeleiding, het meermaals nalezen van mijn masterproef, om steeds bereid te zijn om te helpen en mijn vragen te beantwoorden.

Veel dank ook aan iedereen van het labo, in het bijzonder Beata en Mieke voor de hulp bij het praktisch uitvoeren van deze masterproef.

Vervolgens wil ik mijn familie en vrienden bedanken voor hun steun en luisterend oor bij het schrijven van deze masterproef. In het bijzonder wil ik Melissa, Eline en Evelien bedanken voor de gezellige pauzes en de vele gesprekken.

Verder wil ik iedereen bedanken die mijn masterproef nagelezen heeft, in het bijzonder An Mestach, Hilde Mestach en mijn mama.

Tot slot waardeer ik heel erg de steun die ik kreeg van mijn papa en mijn zus Karolien. Het is fantastisch te weten dat zij er steeds voor mij zijn en helpen waar ze kunnen.

INHOUDSOPGAVE

1.	INLEIDING	1
1.1.	COLORECTALE KANKER	1
1.1.1.	Ontstaan	1
1.1.2.	Oorzaken en risicofactoren	3
1.1.3.	Onderzoek en screening	3
1.1.4.	Symptomen en behandeling	4
1.1.5.	Incidentie van colorectale kanker	5
1.2.	ROOD EN VERWERKT VLEES	5
1.2.1.	Definitie	6
1.2.2.	Weerlegde hypothesen	6
1.2.2.1.	Verzadigde vetten en proteïnen	6
1.2.2.2.	Heterocyclische amines en polycyclische aromatische koolwaterstoffen	7
1.2.3.	De heemijzerhypothese	7
1.2.3.1.	Vetperoxidatie	8
1.2.3.2.	Vorming van N-nitrosoverbindingen	9
1.2.3.3.	Direct cytotoxisch effect van heem op de coloncellen	10
1.3.	DNA-ADDUCTOMICS	11
1.3.1.	DNA-adducten - algemeen	11
1.3.2.	Staalvoorbereiding	12
1.3.3.	DNA-adductanalyse	13
1.3.3.1.	Algemeen	13
1.3.3.2.	UHPLC- HRMS	14
2.	OBJECTIEVEN	16
3.	MATERIAAL EN METHODEN	17
3.1.	STANDAARDEN EN CHEMICALIËN	17
3.2.	KWALITEITSCONTROLE VAN DE UHPLC-HRMS	17
3.3.	OPTIMALISATIE VAN DNA-ADDUCTEXTRACTIE	18
3.3.1.	Proefopzet	18
3.3.2.	Stalen	18
3.3.3.	Protocollen	18
3.3.4.	DNA-adductanalyse	20
3.3.5.	Dataverwerking	21

3.4.	VARKENSPROEF	22
3.4.1.	Proefopzet	22
3.4.1.1.	Dierproef	22
3.4.1.2.	Diëten	23
3.4.2.	Aanmaak van de ijklijn	24
3.4.3.	Staalvoorbereiding	24
3.4.3.1.	DNA-extractie	24
3.4.3.2.	DNA-hydrolyse en DNA-adductextractie	25
3.4.4.	DNA-adductanalyse	25
3.4.5.	Dataverwerking en statistiek	26
3.4.5.1.	Gerichte DNA-adductanalyse	26
3.4.5.2.	Niet-gerichte screening	27
4.	RESULTATEN	29
4.1.	OVERZICHT CHROMATOGRAFIE	29
4.2.	OPTIMALISATIE VAN DNA-ADDUCTEXTRACTIE	30
4.3.	VARKENSPROEF	32
4.3.1.	Gerichte DNA-adductanalyse	32
4.3.2.	Niet-gerichte DNA-adductanalyse (DNA-adductomics)	36
4.3.2.1.	OPLS-DA modellen op basis van discriminerende ionen in het leverweefsel	38
4.3.2.2.	OPLS-DA modellen op basis van discriminerende ionen in het ileumweefsel	40
4.3.2.3.	OPLS-DA modellen op basis van discriminerende ionen in het 'colon 1' weefsel	42
4.3.2.4.	OPLS-DA modellen op basis van discriminerende ionen in het 'colon 2' weefsel	43
5.	DISCUSSIE	45
5.1.	OPTIMALISATIE VAN DNA-ADDUCTEXTRACTIE	45
5.2.	VARKENSPROEF	45
5.2.1.	Gerichte DNA-adductanalyse	45
5.2.2.	Niet-gerichte DNA-adductanalyse (DNA-adductomics)	47
6.	CONCLUSIES	50
7.	LITERATUURLIJST	51
BIJLAGEN		I
BIJLAGE I: BEREKENINGEN		I
BIJLAGE II: OPTIMALISATIE VAN DNA-ADDUCTEXTRACTIE		III

BIJLAGE III: DNA-EXTRACTIE MN NUCLEOSPIN DNA RAPIDLYSE: (PROTOCOL VOOR VERSE, DIEPGEVROREN EN IN ETHANOL BEWAARDE STALEN).....	VI
BIJLAGE IV: AANMAAK VAN DE IJKLIJN	VII
BIJLAGE V: TABELLEN.....	IX
BIJLAGE VI: FIGUREN.....	XXVI
BIJLAGE VII: INTERNALISATION@HOME-LEZINGEN.....	XXXVIII
Collen-Francqui Leerstoel 2018-2019: 'Pillen zonder zorgen? De kunst van het geneesmiddelengebruik'	XXXVIII
Pharmacogenetics: do you have your DNA passport?	XXXIX
Precision medicine in respiratory disease, are we beyond fiction?	XL

AFKORTINGEN

4-HNE	4-hydroxynonenal
A	Adenine
AK-dieet	Aanbevolen-Kip dieet
APC	Adenomatieuze polyposis coli
AR-dieet	Aanbevolen-Rood vlees dieet
ATNC's	Apparent total N-nitrosocompounds
C	Cytosine
CMG	O ⁶ -carboxymethylguanine
CRK	Colorectale kanker
CroG	α -Methyl- γ -hydroxy-1,N ² -propanoguanine
CroG- ¹³ C ₃ , ¹⁵ N ₂	Isotoop van α -Methyl- γ -hydroxy-1,N ² -propanoguanine
CT-DNA	Kalfthymus-DNA
CYP-450	Cytochroom P-450
DHN-MA	1,4-dihydroxynonane-mercaptopuurzuur
G	Guanine
GC	Gaschromatografie
HCA	Heterocyclische amines
HESI	Heated electrospray ionisation
HNE-dg	HNE-deoxyguanosine
HRMS	Hoge resolutie massaspectrometrie
IARC	Internationaal agentschap voor kankeronderzoek
iNOS	Induceerbare NO-synthase
ISTD	Interne standaard
LC	Vloeistofchromatografie
LPO	Lipideperoxiden
<i>m/z</i>	Massa over lading verhouding
MDA	Malondialdehyde
M ₁ G	Pyrimido[1,2-a]purin-10(1H)-one
M ₁ G- ¹³ C ₃	Isotoop van Pyrimido[1,2-a]purin-10(1H)-one
MS	Massaspectrometer
MSI	Microsatellietinstabiliteit
NDMA	N-nitrosodimethylamine
NO	Stikstofoxide
NOC	N-nitrosoverbindingen
NP	Normal phase
OPLS-DA model	Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis-model
Orbitrap	Orbital trap
PAK	Polycyclische aromatische koolwaterstoffen

PCA-X model	Principal component analysis-model
ROS	Reactive zuurstofradicalen
RP	Reversed phase
RT	Retentietijden
SPE	Vaste fase chromatografie
T	Thymine
TE-buffer	Tris-EDTA-buffer
TGF- β 1	Transforming growthfactor bèta 1
UHPLC	Ultra hoge performantie vloeistofchromatografie
UP-H ₂ O	Ultrapuur water
VIP-score	Variable importance in projection-score
WHO	Wereldgezondheidsorganisatie
WK-dieet	Westers-kip dieet
WR-dieet	Westers-Rood vlees dieet

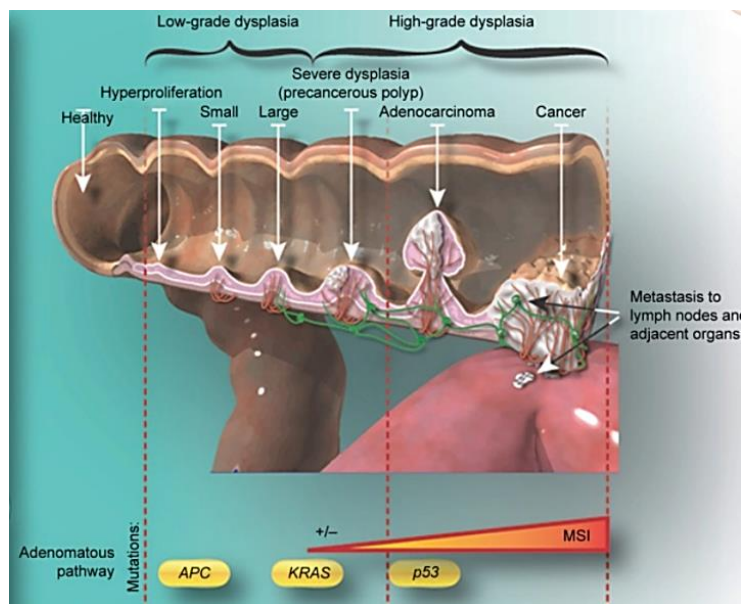
1. INLEIDING

In de inleiding wordt eerst dieper ingegaan op het ontstaan, de oorzaken en de risicofactoren, de symptomen en de incidentie van colorectale kanker (CRK). Vervolgens wordt er meer informatie gegeven over de invloed van rood en verwerkt vlees op de coloncarcinogenese en de analysemethode 'DNA-adductomics' die gebruikt wordt om het verband tussen de consumptie van rood (en verwerkt) vlees en de ontwikkeling van CRK te verklaren.

1.1. COLORECTALE KANKER

1.1.1. Ontstaan

Bij de ontwikkeling van CRK gaan cellen van de dikke darm zich te snel en ongecontroleerd delen, waarbij ze niet meer reageren op het signaal dat de celdgroei controleert. De opeenstapeling van deze cellen wordt een tumor genoemd. [1][2][3] De ontwikkeling van de meeste darmtumoren gebeurt in stadia, namelijk tumorinitiatie, -promotie en -progressie. Bij de tumorinitiatie vinden veranderingen plaats op genetisch niveau, waardoor een epitheelcel van het colon, zich abnormaal prolifereert (zie Figuur 1.1). [3] Op die manier stapelt zich een groep van



Figuur 1.1: Schematische voorstelling van de ontwikkeling van CRK : histologische en genetische veranderingen [6]

geprolifereerde cellen op aan het oppervlak van één of meerdere crypten (invaginaties van de epitheellaag van de darmwand) [3][4]. Indien de cellen een normale structuur hebben, is er sprake van hyperplasie; hebben de cellen echter een abnormale intracellulaire en intercellulaire organisatie, dan is er dysplasie. Wanneer de cellen blijven accumuleren, worden er poliepen gevormd die boven het epitheliale oppervlak uitkomen (zie Figuur 1.1). Slechts een klein percentage van de poliepen groeit uit tot een kwaadaardige tumor. Adenoma's zijn poliepen die dysplasie vertonen en die meer abnormaliteiten vertonen naarmate ze groeien. [4] De vorming van adenoma's kan veroorzaakt worden door een mutatie in het adenomateuze polyposis coli (APC) gen, waardoor in normale omstandigheden het proteïne APC tot expressie komt. Deze mutatie vindt meer specifiek plaats in het domein dat bindt aan β -catenine (een proteïne). β -catenine zorgt voor verhoogde aanmaak van c-Myc en andere proteïnen die de celdeling stimuleren

en heeft ook een rol in de celadhesie. Onder normale omstandigheden wordt β -catenine onderdrukt door APC. Door de APC-mutatie bindt APC echter niet meer met β -catenine, waardoor de vorming van abnormale weefsels niet onderdrukt wordt. In een gezonde situatie, wanneer de cellen migreren van de basis van de crypte naar het oppervlak van de epitheellaag, verhoogt APC en wordt β -catenine onderdrukt. Dit is geassocieerd met het verlies van de cellen, wat nodig is om een evenwicht te krijgen met de vorming van nieuwe cellen. Sommige tumoren hebben in plaats van een mutatie in het APC-gen, een mutatie in het gen dat codeert voor β -catenine. Hierdoor wordt β -catenine resistent tegen de onderdrukking door APC, waardoor er abnormaliteiten kunnen ontstaan. [4]

In het volgend stadium van promotie en progressie kunnen er bijkomende mutaties optreden, waaronder bv. mutatie in het RAS-gen. In de coloncarcinogenese is de volgorde van het type mutatie belangrijk: in de beginfase gaat het om APC-mutaties en vervolgens ontstaan er RAS-mutaties (zie Figuur 1.1). [4] Door de RAS-mutatie kan er verandering optreden in de tumorcellen, waardoor ze bijvoorbeeld sneller groeien. Deze eigenschap wordt doorgegeven aan de dochtercellen van deze tumoren, waardoor de populatie van tumorcellen voornamelijk opgebouwd is uit snel groeiende tumorcellen. Uit het initieel goedaardige adenoom ontstaat een kwaadaardig carcinoom. De kwaadaardige cellen kunnen de basaalmembraan doorbreken en zich verspreiden in de onderliggende weefsels van het colon, terwijl de cellen nog verder prolifereren. Eenmaal de cellen doorheen de colonwand gebroken zijn, kunnen ze ook migreren en metastaseren naar andere naburige organen zoals de blaas of de dunne darm. [3]

Genomische instabiliteit heeft een belangrijk aandeel in de ontwikkeling van CRK. Tijdens de coloncarcinogenese kunnen er drie verschillende moleculaire pathways van genomische instabiliteit voorkomen, namelijk de chromosomale instabiliteit pathway, de microsatelliet-pathway en de 'CpG island methylator phenotype'-pathway. [5] De chromosomale instabiliteit pathway omvat een opstapeling van mutaties in het APC-gen en RAS-gen (zoals hierboven vermeld). Bovendien zorgen deze mutaties voor verlies van functie van het p53-gen, de hoofdregulator voor transcriptie en apoptose. Dit heeft een impact op verschillende cellulaire functies en kan leiden tot carcinogenese. [6] Een tweede mogelijkheid is microsatellietinstabiliteit (MSI) in de tumor. De microsatelliet-pathway wordt gekenmerkt door een verstoring van DNA-herstelgenen. Microsatellieten zijn repetitieve DNA-sequenties in korte, niet-coderende regio's. Deze kunnen bij de microsatellietinstabiliteit ongelijk gerepliceerd worden. Ook kan deze instabiliteit leiden tot verhoogde gevoeligheid voor bijkomende genetische mutaties. [6] Een derde mogelijke verklaring voor de genetische instabiliteit is de 'CpG island methylator'-pathway, waarbij een afwijking in de genpromotorregio aanwezig is. De genpromotorregio is hierbij gemethyleerd, wat resulteert in

inhibitie van gentranscriptie. De inhibitie heeft daarnaast ook een invloed op de genen die de groeibevorderende genen reguleren. [6]

1.1.2. Oorzaken en risicofactoren

Onze darm wordt blootgesteld aan allerlei verschillende componenten vanuit de voeding zoals kankerverwekkende stoffen, maar ook beschermende stoffen. In die context speelt voeding een belangrijke rol bij de ontwikkeling van dikke darmkanker. Het eten van rood en verwerkt vlees kan leiden tot het ontwikkelen van dikke darmkanker. [1] Een meer gedetailleerde bespreking volgt in sectie 1.2. Naast voeding is ook de fysieke activiteit van een persoon bepalend voor het risico op CRK. Indien iemand minder fysiek actief is, blijven de kankerverwekkende stoffen langer in het darmlumen en krijgen deze stoffen meer tijd om schade aan te richten. [1] Bovendien is er een link met obesitas. [5]

Naast de factoren die met ons leefpatroon te maken hebben, zijn er andere risicofactoren die onveranderlijk zijn, zoals erfelijkheid. 30% van de dikke darmkankerpatiënten zijn drager van een genetische afwijking, die ze overgeërfd hebben van één van hun ouders. Deze afwijkingen hebben niet altijd CRK tot gevolg; men kan drager zijn zonder ooit CRK te krijgen. Een andere risicofactor is de aanwezigheid van adenomen in het slijmvlies van de darm, die ook actief kunnen bijdragen tot de ontwikkeling van CRK aangezien de meeste dikke darmkankers initieel ontstaan uit poliepen. Hoe groter het adenoom, hoe groter de kans dat het kwaadaardig wordt. Ten slotte is een chronische ontsteking van de dikke darm ook een mogelijke risicofactor. Bij patiënten met een lange voorgeschiedenis van colitis ulcerosa of de ziekte van Crohn is het risico verhoogd. [1]

1.1.3. Onderzoek en screening

CRK wordt best zo vroeg mogelijk gedetecteerd. Door precancereuze poliepen te verwijderen, wordt de ontwikkeling tot CRK en de verdere verspreiding van de kanker verhinderd en is de kans op genezing het grootst. [6] De vroegtijdige detectie kan gebeuren door screening a.d.h.v. diverse onderzoeken [7]. De Vlaamse Overheid steunt een tweejaarlijks onderzoek naar dikke darmkanker. Hierbij krijgen mensen vanaf 51 tot en met 74 jaar de mogelijkheid om gratis deel te nemen. Ze ontvangen een thuistest, waarmee ze zelf een stoelgangstaal kunnen afnemen en opsturen naar het labo voor analyse. [8][9][10] Op het stoelgangstaal wordt een immunologische fecale occult bloedtest (IFOB test) uitgevoerd, waarbij wordt nagegaan of het staal niet zichtbaar bloed (occult bloed) bevat [9]. Bloedsporen in de stoelgang kunnen namelijk wijzen op aanwezigheid van poliepen of op CRK [11]. Bloed wordt opgespoord in de ontlasting a.d.h.v. specifieke antilichamen die binden op het menselijke hemoglobine dat in het

bloed aanwezig is. [6][12] Indien de test afwijkend is (≥ 75 ng/ml bloed in de feces), is er een kijkonderzoek (coloscopie) vereist [13]. In de apotheek zijn ook zelftesten te verkrijgen die op basis van dit principe werken.[10]

Coloscopie is het meest courant gebruikte onderzoek om CRK op te sporen. Het is een endoscopisch onderzoek van de dikke darm (proximaal en distaal) dat zowel kankerachtige als precancereuze lesies (beschadiging van het weefsel) kan detecteren. Indien een poliep aanwezig is, kan die onmiddellijk verwijderd worden. Er wordt aangeraden om een coloscopie om de 10 jaar uit te voeren bij patiënten vanaf 50 jaar. [6][14]

1.1.4. Symptomen en behandeling

CRK groeit vaak langzaam en het kan meerdere jaren duren vooraleer een poliep ontaardt in kanker. Meestal zijn geen symptomen aanwezig tot de poliep de omvang van enkele centimeters heeft. De doorgang van de ontlasting kan vervolgens geblokkeerd worden wat kan leiden tot buikkrampen en pijn. Ook vermoeidheid en onverklaarbaar gewichtsverlies zijn symptomen die voorkomen bij colontumoren. Tumoren in het sigmoïd of rectum hebben als symptomen bloedverlies via de anus, bloedsporen in de stoelgang of op het toiletpapier en een verandering in de consistentie van de stoelgang, zoals constipatie, diarree of afwisselend beide, een valse drang of minder stoelgang. [1][6]

Bij darmkanker maakt een chirurgische ingreep bijna altijd deel uit van de behandeling. Het doel van deze ingreep is de tumor en naburige weefsels die mogelijk ook aangetast zijn, volledig te verwijderen. Achteraf kan radiotherapie of chemotherapie noodzakelijk zijn. Dit wordt beslist na microscopische analyse van de kankercellen en de klieren die in de onmiddellijke nabijheid van de dikke darm wegnomen werden. Met een bijkomende behandeling van radiotherapie kan het risico op herval beperkt worden en kan het volume van de tumor gereduceerd worden, wat het operatief verwijderen van de tumor vergemakkelijkt. Chemotherapie wordt aanvullend toegediend indien er een risico is op herval of als er uitzaaiingen zijn. [1]

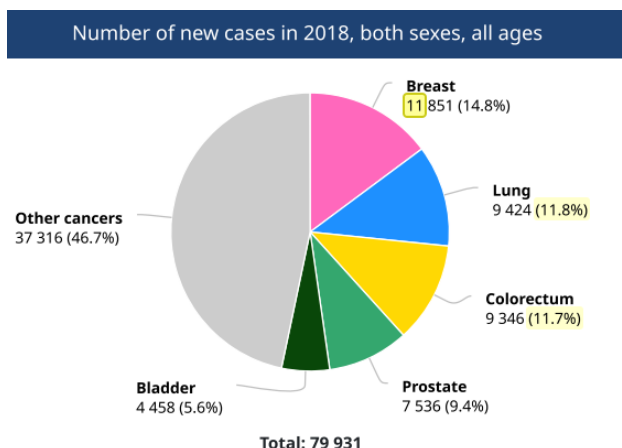
1.1.5. Incidentie van colorectale kanker

In de westerse wereld is CRK een veel voorkomende ziekte. In 2018 kregen 79 931 mensen in België de diagnose van kanker. Bij 11,7 % daarvan werd CRK gediagnosticeerd (zie Figuur 1.2). CRK is het derde meest voorkomende kankertype bij mannen, voorafgegaan door prostaatkanker en longkanker. Bij vrouwen is CRK de tweede meest voorkomende kanker na borstkanker. [15] Wereldwijd werd er in 2018 bij 18 078 957 mensen kanker vastgesteld. Voor 10,2% van deze mensen, ging het om CRK. In 2018 zijn 880 792 mensen

over de hele wereld gestorven ten gevolge van CRK. [16] Er zijn wel verschillen naargelang de geografische distributie. De incidentie van CRK in hoge-inkomenlanden zoals West-Europa en Noord-Amerika ligt hoger dan in lage-inkomenlanden in bv. Afrika en Oost-Europese landen. [16] Hoewel in de hoge-inkomenlanden een stabilisering of een daling in incidentie en mortaliteit te zien is, is de incidentie er nog altijd hoger dan in de lage-inkomenlanden. Deze stabilisering of daling in incidentie kan o.a. het gevolg zijn van verhoogde vroege detectie en preventie door chirurgisch verwijderen van de poliepen. Ook verbetering in chemotherapie en radiotherapie en veranderingen in levensstijl en eetpatroon hebben bijgedragen tot deze stabilisering of daling. Bij de lage en gemiddelde inkomenslanden is een stijging van incidentie en sterftcijfer merkbaar, vaak afhankelijk van de graad van sociale en economische ontwikkeling. [17] Verschillen tussen de landen en werelddelen kunnen vooral verklaard worden door verschillen in levensstijl, sociale en economische verschillen [18].

1.2. ROOD EN VERWERKT VLEES

De Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) en het Internationaal Agentschap Voor Kankeronderzoek (IARC) oordeelden dat rood vlees en verwerkt vlees mogelijk carcinogeen (groep 2A) en carcinogeen (groep 1) is voor de mens. Uit epidemiologisch onderzoek is namelijk gebleken dat de consumptie van rood en verwerkt vlees bijdraagt tot het risico op de ontwikkeling van CRK. [19][20] Er zijn verschillende hypothesen die het verband tussen de consumptie van rood en verwerkt vlees en het verhoogd risico op CRK kunnen (helpen) verklaren. In hiernavolgende punten (1.2.1, 1.2.2 en 1.2.3) wordt op dit aspect dieper ingegaan.



Figuur 1.2: aantal personen (mannen en vrouwen) met diagnose van kanker in 2018 in België, waarvan 11,7 % CRK. [15]

1.2.1. Definitie

In epidemiologische studies die de vleesconsumptie en het risico op bepaalde ziektebeelden bespreken, wordt de term 'vlees' niet altijd op dezelfde manier gedefinieerd. Algemeen worden runds-, varkens-, paarden- en lamsvlees (het spierweefsel) beschouwd als rood vlees. Geitenvlees en orgaanvlees (van elke diersoort) worden soms ook gezien als rood vlees. Bij kalfsvlees zijn de leeftijd waarop het dier geslacht wordt en het soort voeder dat het gekregen heeft, bepalend om het al dan niet onder te brengen in de categorie van rood vlees. [20][21][22] Volgens artikel 1 van het Koninklijk Besluit van 1989-04-13/32, is bereid (verwerkt) vlees: "een waar dat een behandeling ter verduurzaming ondergaan heeft. Dit bestaat uit voor menselijke consumptie geschikte, niet-gemalen, noch gehakte delen van runderen, schapen, geiten, varkens, eenhoevige dieren, gevogelte, konijnen en wild, met uitzondering van bloed. Mogelijke behandelingen zijn onder andere het toevoegen van zout en andere additieven, het drogen en het vriesdrogen, het roken, het rijpen, het verhitten en het verpakken van het vlees." [23]

1.2.2. Weerlegde hypothesen

1.2.2.1. Verzadigde vetten en proteïnen

Een hoog gehalte aan (verzadigde) vetten in rood en verwerkt vlees kan een eerste mogelijke verklaring zijn voor de verhoogde kans op CRK. Dit zou te wijten kunnen zijn aan een toegenomen productie van secundaire galzouten of een toename van vrije vetzuren in het colonlumen. Een andere mogelijkheid is de bijdrage tot de ontwikkeling van obesitas, waarvan geweten is dat het geassocieerd is met CRK en andere ziektes. De meeste studies kunnen echter niet met zekerheid een verband aantonen. Bovendien zijn (verzadigde) vetten ook in andere producten zoals vis en vlees van pluimvee aanwezig, terwijl de consumptie van deze producten niet geassocieerd wordt met CRK. [5][19][24]

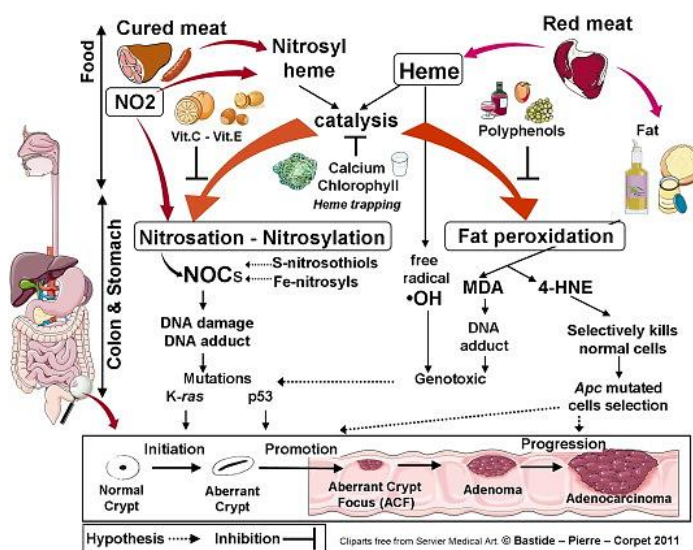
Daarnaast zijn ook eiwitten rijkelijk aanwezig in vlees. Eiwitten kunnen gefermenteerd worden in de dikke darm met vorming van toxische producten zoals amines, ammoniak, fenolen en waterstofsulfiden, die de DNA-synthese en het cellulair metabolisme verstoren, de overlevingsduur van cellen verminderen en de celtturnover doen toenemen. Epidemiologische studies bij mensen hebben evenwel niet met zekerheid kunnen aantonen dat er een verband is tussen het hoge eiwitgehalte in vlees en de verhoogde kans op CRK. Net zoals de vetten, zijn eiwitten tevens in (min of meer) dezelfde mate/grootteorde aanwezig in andere frequent geconsumeerde (dierlijke) levensmiddelen zoals kip, waarbij geen verhoogd risico is op CRK. De hypothese die stelt dat de inname van hoge hoeveelheid vetten of eiwitten in rood en verwerkt vlees zorgt voor een toename van CRK, is dus minder waarschijnlijk. [19][24][25]

1.2.2. Heterocyclische amines en polycyclische aromatische koolwaterstoffen

Een andere mogelijke verklaring is de verhoogde productie van polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) en heterocyclische amines (HCA's) in rood vlees door de bereidingswijze, zoals bij hoge temperaturen of in een open vlam. [19][26] De procarcinogene PAK's ontstaan bij de onvolledige verbranding van organische componenten. Gedurende de metabolisatie van deze PAK's kunnen er metabolieten gevormd worden die reageren met DNA via een covalente binding. Als deze DNA-schade niet of incorrect hersteld wordt, ontstaan er mutaties die kunnen leiden tot de ontwikkeling van CRK. Ook HCA's moeten eerst gemetaboliseerd worden alvorens ze carcinogeen zijn. Bij de metabolisatie van HCA's worden nitreniumionen gevormd die kunnen binden op DNA, met de vorming van DNA-adducten tot gevolg. [5] Er kon echter reeds aangetoond worden dat in wit vlees en vis minstens even hoge concentraties aan HCA's aanwezig zijn. Hetzelfde geldt voor de PAK's, waarvan ook geen hogere concentratie teruggevonden kan worden in rood en verwerkt vlees in vergelijking met wit vlees. Er kan met andere woorden besloten worden dat de verhoogde productie van PAK's en HCA's door de bereidingswijze van het vlees waarschijnlijk geen verklaring is voor het verhoogde CRK-risico [19][26].

1.2.3. De heemijzerhypothese

De laatste jaren wordt steeds meer belang gehecht aan de heemijzerhypothese. Heem bestaat uit een centraal ijzeratoom in een heterocyclische porfyriering. Heem is samen met het eiwit 'globine' als myoglobine aanwezig in vlees. Het is één van de grootste verschillen tussen rood en wit vlees; er is namelijk in rood vlees 10 keer meer heem aanwezig dan in wit vlees. Dit kan m.a.w. een mogelijke verklaring zijn voor de carcinogeniteit van rood vlees in vergelijking met wit vlees. [19] Voor het heemijzer werd een positieve associatie gevonden tussen de

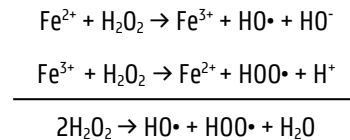


Figuur 1.3: Het katalytisch effect van heemijzer op de vorming van N-nitroso verbindingen (NOC's) en op de vetperoxidatie. De eindproducten die gevormd worden zijn NOC's, Malondialdehyde (MDA) en 4-hydroxynonenal (4-HNE). [28]

opname van het ijzer en het risico op carcinogenese [27]. Het mechanisme waardoor heemijzer carcinogeen is, is nog niet volledig gekend. Mogelijke mechanismen zijn enerzijds de katalysatie van vetperoxidatie en/of de vorming van N-nitrosoverbindingen. Anderzijds kan heemijzer ook een direct cytotoxisch effect hebben. [19][22][27]

1.2.3.1. Vetperoxidatie

Bij de vertering van rood vlees wordt 1,4-dihydroxynonane-mercaptuurzuur (DHN-MA), een vetperoxidatiemerker, geëxcreteerd in de urine [19]. De consumptie van rood vlees activeert dus de vetperoxidatiepathway [5]. Het katalytisch effect van heemijzer zorgt voor de peroxidatie van vet in de voeding tijdens de passage doorheen de darm. Heemijzer zorgt voor de vorming van reactieve zuurstofradicalen (ROS) door stimulatie van de fentonreactie zoals hieronder weergegeven. [19]



Bij deze reactie wordt ijzer zowel gereduceerd als geoxideerd door waterstofperoxide (H_2O_2) met vorming van hydroxyl- en hydroxyperoxide radicalen (zie reactie) [19]. De vorming van radicalen zorgt voor een cascade aan oxidatieve reacties, wat resulteert in oxidatie van vetten, eiwitten en DNA [19]. Bij de vetten zijn het meer specifiek de polyonverzadigde vetzuren, afkomstig van de fosfolipiden uit de inhoud van de darm en/of de colonocyten, die geoxideerd worden [5]. De ROS-moleculen nemen hierbij een waterstofatoom weg van de vetzuur-koolstof-keten, met vorming van een koolstofradicaal tot gevolg. Het koolstofradicaal wordt gestabiliseerd door de vorming van een geconjugeerd dieen. Dit dieen reageert op zijn beurt met O_2 waardoor opnieuw een hydroperoxide radicaal ontstaat dat andere lipidemoleculen kan oxideren en waardoor dezelfde reactie opnieuw plaatsvindt. [5] De gevormde lipideperoxiden (LPO's) kunnen verder afbreken tot aldehyden die relatief stabiel zijn en doorheen de cellen kunnen diffunderen [5]. Twee belangrijke aldehyden die gevormd worden, zijn malondialdehyde (MDA) en 4-hydroxynonenal (4-HNE) (zie figuur 1.3). MDA ontstaat uit de oxidatie van arachidonzuur en langere polyonverzadigde vetzuren, terwijl 4-HNE gevormd wordt uit ω -6 polyonverzadigde vetzuren. De aldehyden kunnen ofwel direct interageren met DNA en proteïnen ofwel kunnen ze verder geoxideerd worden tot epoxyderivaten. [28][29]

MDA bindt aan DNA waardoor mutagene verbindingen zoals DNA-adducten ontstaan, zoals bv. malondialdehydedeoxyguanosine en -deoxyadenosine. Het belangrijkste DNA-adduct dat gevormd wordt, is pyrimido[1,2-a]purin-10(1H)-one (M₁G). De DNA-adductvorming kan mogelijk bijdragen tot de ontwikkeling van CRK. [5][22][30]

4-HNE is een genotoxisch elektrofiel dat in DNA voornamelijk reageert met deoxyguanosine, wat leidt tot vorming van mutagene HNE-deoxyguanosine (HNE-dg)-adducten. 4-HNE kan ook eiwitten modifieren die betrokken zijn bij de DNA-reparatie, wat kan bijdragen tot de cytotoxische en carcinogene effecten van 4-HNE. Daarnaast is 4-HNE geassocieerd met een afname in de synthese van transforming growthfactor bèta 1 (TGF- β 1) (een antiproliferatieve cytokine). Deze afname correleert met een toename van de progressie van coloncarcinogenese. [31][32] 4-HNE induceert bovendien apoptose in de normale cellen, maar niet in pretumorale cellen die een mutatie hebben in het APC-gen [22][33][34]. De APC-gemuteerde coloncellen worden dus geselecteerd, wat de tumorvorming stimuleert [5].

1.2.3.2. Vorming van N-nitrosoverbindingen

De groep van de N-nitrosoverbindingen (NOC's) omvat alle stoffen die een N-nitrosogroep hebben, waaronder de N-nitrosamines en N-nitrosamides. NOC's behoren tot de groep van de meest krachtige carcinogenen. Een voorbeeld van een nitrosamine is N-nitrosodimethylamine (NDMA), waarvoor reeds een positieve associatie is gevonden met CRK. NOC's zijn alkylerende agentia die kunnen interageren met DNA, waarbij de nucleobasen wijzigen en er DNA-adducten gevormd worden. Deze interactie zorgt mogelijk voor mutaties, wat kan leiden tot o.a. coloncarcinogenese. NOC's zorgen o.a. voor de vorming van het DNA-adduct O⁶-gealkyleerde guanine, een lesie die kan aanleiding geven tot een mutatie die vaak optreedt bij CRK (dit wordt verder besproken in sectie 1.3.1). De desbetreffende mutatie treedt op in het K-RAS gen indien O⁶-methylguaninetransferase dit niet tijdig herstelt. N-nitrosamides kunnen spontaan optreden als alkylerende agentia, terwijl N-nitrosamines eerst geactiveerd moeten worden via een metabolisch proces, dat geregeld wordt door enzymen die behoren tot de cytochroom P-450 (CYP-450) enzymen. [5][35]

Het lichaam kan blootgesteld worden aan NOC's van zowel exogene als endogene oorsprong. Exogene NOC's zijn voornamelijk afkomstig van roken en de consumptie van verwerkt of hittebehandeld vlees zoals gerookt vlees. Wanneer vlees blootgesteld wordt aan hoge temperaturen, kan het moleculair stikstof geoxideerd worden. Het ontstane stikstofoxide is in staat om secundaire amines en amiden in o.a. vlees te nitrosyleren. Nitrieten (en nitraten) aanwezig in vlees kunnen ook zorgen voor de vorming van NOC's. [5][35] Nitrieten worden vaak toegevoegd aan vlees als bewaarmiddel, omwille van antibacteriële effecten. Wanneer nitriet zich in zure omstandigheden bevindt, kunnen nitrosylatie-agentia zoals distikstof-, tri- en tetraoxiden gevormd worden. [35]

NOC's kunnen ook endogeen geproduceerd worden. Dit zou het resultaat zijn van een reactie tussen nitrosylerende agentia en voornamelijk secundaire aminen. De endogene NOC's kunnen gevormd worden via verschillende mechanismen: via zuurgekatalyseerde, bacteriële of celgemedieerde routes. De zure katalyse vindt vooral plaats in de maag. Ongeveer 5% van het exogene nitraat wordt geabsorbeerd in de dunne darm, gerecirculeerd in het speeksel en gereduceerd tot nitriet door orale bacteriën. In de zure omgeving van de maag (lage pH) wordt het nitriet omgezet in nitrosylerende salpeterigzuur. [5][35] De NOC-concentratie in de maagsappen is echter tien keer lager dan de fecale niveaus. Het is daarom meer waarschijnlijk dat de vorming van NOC's in een latere fase plaatsvindt, als gevolg van chemische of bacteriële katalyse. In omstandigheden waar de pH hoger is, zoals in de darm, kunnen bacteriën NOC's produceren door amines, die afkomstig zijn van de afbraak van eiwitten, te nitrosyleren. Er is nog maar weinig geweten over welke bacteriën het precies gaat, hoewel wel gekend is welke bacteriële enzymen erbij betrokken zijn; namelijk nitraat- en nitrietreductase. De hoeveelheid NOC's die gevormd kan worden hangt af van hoeveel nitraat ingenomen wordt en wat de capaciteit is van de bacteriële enzymen om dit nitraat om te zetten naar nitriet. [5][19][35] Bij de celgemedieerde katalyse vormt het induceerbare NO-synthase (iNOS) stikstofoxide (NO). Het iNOS wordt tot expressie gebracht in verschillende celtypen en moet eerst geïnduceerd worden door o.a. cytokines en lipopolysacchariden om NO te kunnen produceren. [36][37] Het gevormde NO kan vervolgens werken als nitrosylerende verbinding, waardoor NOC's geproduceerd worden. [5]

Heemijzer kan naast de katalysatie van vetperoxidatie zorgen voor de (katalysatie van de) vorming van NOC's (zie Figuur 1.3). Er werd namelijk reeds aangetoond dat heemijzer zorgt voor verhoging van apparent total N-nitroso compounds (ATNC's) in feces. Er kon aangetoond worden dat nitrosylheem en nitroso-thiolen de hoofdbestanddelen zijn van ATNC's, wat leidt tot een mogelijk mechanisme waarbij zuur-gekatalyseerde thionitrosatie als eerste stap in de endogene vorming van NOC's gezien wordt. Eens dat S-nitrosothiols, die continu gevormd worden door NO-synthase, blootgesteld worden aan alkalische en reducerende omstandigheden in de dunne en dikke darm, kan NO vrijgesteld en opgenomen worden door heem. Het nitrosylheem dat gevormd wordt, kan werken als nitrosylerende stof die voor de vorming van potentieel carcinogene NOC's in het darmepitheel kan zorgen. [5][38][39]

1.2.3.3. Direct cytotoxisch effect van heem op de coloncellen

Een derde mogelijk mechanisme (binnen de heemhypothese) is het direct cytotoxisch effect van heem op de colonepitheelcellen. Heem remt namelijk de fysiologische feedback-inhibitoren (o.a. interleukine 15) die normaal gezien de proliferatie in de coloncrypten inhiberen. De remming van de inhibitoren veroorzaakt hyperproliferatie

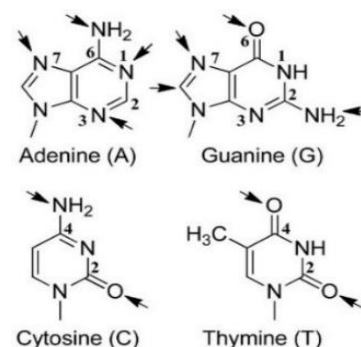
(voorstadium van CRK), hyperplasie en verlaagde apoptose van de epitheelcellen in de colonmucosae. Hyperproliferatie en hyperplasie kunnen leiden tot een verhoogd risico op mutaties in de oncogenen en tumorsuppressorgenen, wat daaropvolgend kan zorgen voor risicoverhoging op CRK. [5][19][40][41]

1.3. DNA-ADDUCTOMICS

Zoals hierboven in sectie 1.2 vermeld wordt, kunnen de LPO's en NOC's zorgen voor de vorming van DNA-adducten, wat beschouwd wordt als een mogelijke bijdragende oorzaak voor de ontwikkeling van kanker. In dit deel over DNA-adductomics wordt meer informatie gegeven over wat DNA-adducten precies zijn en hoe ze gevormd worden. Vervolgens wordt er besproken hoe de aanwezigheid van deze DNA-adducten gemeten kan worden, namelijk a.d.h.v. een ultrahoge performantie vloeistofchromatografie (UHPLC) die gekoppeld is aan hoge resolutie massaspectrometrie (HRMS). Deze methode wordt namelijk toegepast in deze masterproef om het verband tussen de consumptie van rood (en verwerkt) vlees en de ontwikkeling van CRK te bestuderen door DNA-adducten te analyseren.

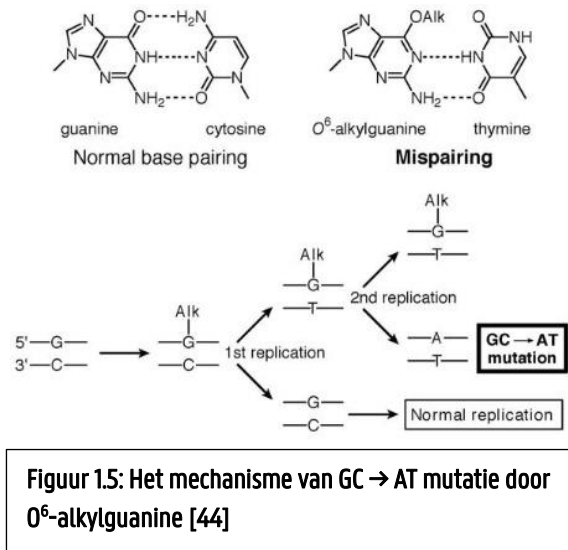
1.3.1. DNA-adducten - algemeen

DNA-adducten ontstaan door de binding van endogene of exogene elektrofiële moleculen aan nucleofiele sites in DNA zoals N-7 in guanine (zie Figuur 1.4) [41][42]. Endogene DNA-adducten kunnen gevormd worden door oxidatieve stress of inflammatie terwijl exogene DNA-adducten gevormd kunnen worden door chemicaliën uit de omgeving [43]. NOC's en LPO's kunnen allebei binden aan DNA-nucleobasen met de vorming van DNA-adducten tot gevolg. In moleculaire epidemiologische studies en kankerpreventiestudies kunnen deze DNA-adducten als biomarker gebruikt worden. [42]



Figuur 1.4: weergave van de elektrofiële bindingsplaatsen in de DNA-nucleobasen. [44]

Sommige moleculen, o.a. epoxiden en nitreniumionen, vereisen eerst metabole activering vooraleer ze in staat zijn om te reageren met het DNA. De activeringsreacties, die gekatalyseerd worden door enzymen zoals CYP-450-monoxygenasen, sulfotransferasen en N-acetyltransferasen, zorgen vervolgens voor elektrofile producten die kunnen reageren met de nucleofiele plaatsen in DNA. De elektrofile moleculen kunnen het DNA beschadigen door o.a. alkylering, oxidatie, deaminatie en crosslinking, waardoor de DNA-nucleobasen structureel en functioneel kunnen wijzigen. DNA-adducten zijn dus structureel gemodificeerde DNA-basen [44]. Indien de genotoxische moleculen niet op tijd geëlimineerd



Figuur 1.5: Het mechanisme van GC → AT mutatie door O⁶-alkylguanien [44]

worden uit het lichaam of DNA-adducten niet hersteld worden, kan dit leiden tot genomische instabiliteit, waardoor mutaties kunnen ontstaan. Deze mutaties kunnen de regeling van de celgroei verstoren, met carcinogenese tot gevolg. [41][42] De vorming van DNA-adducten verandert namelijk de mogelijkheid om een waterstofbinding te vormen met andere DNA-nucleobasen waardoor het vermogen om specifieke Watson-Crick-basenparen te vormen (adenine (A) vormt een basenpaar met thymine (T) (en omgekeerd) en guanine (G) vormt een basenpaar met cytosine (C) (en omgekeerd)) aangetast wordt. [45] Bij het DNA-adduct O⁶-gealkyleerde guanine, zal guanine dan bv. geen basenpaar met cytosine vormen (zie Figuur 1.5), maar krijgt thymine de voorkeur als basenpaar op het gemodificeerde guanine. In de tweede replicatieronde zal tegenover de thymine een adenine geplaatst worden, wat resulteert in een mutatie van G-C naar A-T. [44]

1.3.2. Staalvoorbereiding

De staalvoorbereiding start met het extraheren van het DNA uit de stalen. Het DNA wordt o.a. bekomen uit weefsels, bloed en urine. [42][43] Na de DNA-extractie wordt het DNA gehydrolyseerd. Hierbij worden de DNA-strengen afgebroken tot monomeren. Dit is nodig omdat de massaspectrometrische analyse van de DNA-bouwstenen een verhoogde gevoeligheid, nauwkeurigheid en precisie heeft in vergelijking met de DNA-polynucleotiden. Er zijn drie verschillende mogelijkheden om het DNA te hydrolyseren. De eerste mogelijkheid is thermische hydrolyse waarbij DNA-adducten die thermisch labiel zijn, vrijgemaakt worden bij hoge temperatuur. Een tweede type van hydrolyse is de enzymatische hydrolyse. Hierbij wordt het DNA afgebroken door nucleasen en fosfatasen om vervolgens de deoxynucleosiden vrij te stellen. Als laatste mogelijkheid is er de zure hydrolyse. Door verwarming in aanwezigheid

van een zuur worden de basen vrijgemaakt, waaronder (voornamelijk) de purines zoals adenine- en guanine-adducten. [46] De enzymatische en zure hydrolyse geven echter wel mengsels die een grote overmaat aan niet-gemodificeerde monomeren bevatten. Het is dus belangrijk dat de stalen, na hydrolyse, eerst verder opgezuiverd worden. [44] Deze opzuivering gebeurt in de laatste stap: het extraheren van de DNA-adducten waarbij de DNA-adducten gezuiverd worden van de niet-gemodificeerde deoxynucleosiden. Er kan hiervoor o.a. gebruik gemaakt worden van een vaste fase extractie (SPE). [46] Tijdens deze extractie worden ook andere componenten zoals eiwitten, die de LC-MS-analyse kunnen verstoren, verwijderd. Na de extractie worden de stalen met DNA-adducten geanalyseerd m.b.v. UHPLC-HRMS(/MS) (zie sectie 3). [42][43][44]

1.3.3. DNA-adductanalyse

1.3.3.1. Algemeen

DNA-adductanalyse kan gebruikt worden voor het onderzoek naar kankers zoals CRK. [41] Er is een mogelijkheid om 'targeted' analyse uit te voeren, waarbij gericht DNA-adducten gedetecteerd worden. Dit wil zeggen dat specifiek gescand wordt naar bepaalde DNA-adducten en dat de overige componenten in het staal genegeerd worden. DNA-adductomics is een nieuwe onderzoeksmethode waarbij 'untargeted' gezocht wordt naar alle aanwezige componenten in een staal; zowel de gekende als de ongekende DNA-adducten worden bestudeerd. [42][47]

Vroeger werd vooral gebruik gemaakt van de ³²P-postlabeling-methode om DNA-adducten te analyseren (hier wordt in het kader van deze masterproef echter niet dieper op ingegaan). [42] De analyse van DNA-adducten kan ook uitgevoerd worden m.b.v. een massaspectrometer (MS) in combinatie met gaschromatografie (GC) of vloeistofchromatografie (LC). De scheiding van de DNA-adducten van de overige componenten in het staal door GC of LC, is immers een meerwaarde voor bij de detectie door MS. [46] Voor GC-analyse is het wel noodzakelijk dat de componenten vluchtig zijn. DNA-adducten zijn echter niet altijd voldoende vluchtig, aangezien ze moeilijk te derivatiseren zijn. [48] Bovendien zijn verschillende DNA-adducten niet thermisch stabiel. Voor de LC-analyse moeten de DNA-adducten niet vluchtig zijn en kunnen er eveneens thermolabiele componenten gescheiden worden. Aangezien bij LC directe analyse van de DNA-adducten mogelijk is, wordt GC veel minder frequent toegepast voor DNA-adductanalyse. [42][46][49] De methode die op dit moment het meest toegepast wordt, is UHPLC-HRMS. [42] Aangezien in de biologische stalen de concentratie van DNA-adducten meestal tussen 0,01 - 10 adducten per 10⁸ normale nucleotiden ligt, is een ultragevoelige methode vereist. De UHPLC-HRMS methode heeft over het algemeen een hoge selectiviteit, gevoeligheid, nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid. [44]

1.3.3.2. UHPLC- HRMS

In deze masterproef wordt gebruik gemaakt van UHPLC gekoppeld is HRMS. De opstelling bij LC bestaat uit een pomp, een injector en een kolom. De kolom, die instaat voor de scheiding van de componenten, kan een stationaire fase hebben die polaire groepen bevat, meestal silicagel. [50][51] De mobiele fase is dan apolair en men spreekt over *normal phase* (NP) chromatografie. De polaire componenten binden aan het polaire oppervlak en de apolaire componenten elueren met de mobiele fase. [50][51] Een andere mogelijkheid is *reversed phase* (RP) chromatografie, die gekenmerkt is door een apolaire stationaire fase, meestal koolstofketens, en een polaire mobiele fase. Hierbij binden de apolaire stoffen aan de stationaire fase en elueren de polaire stoffen met de mobiele fase. [52] Het merendeel van de DNA-adducten kan gescheiden worden via RP-chromatografie met behulp van een C18-stationaire fase. Daarnaast is het voor sommige DNA-adducten nodig om gebruik te maken van NP-chromatografie. [46]

Bij UHPLC bestaat de kolom uit kleinere deeltjes dan bij de HPLC, met een groter contactoppervlakte tot gevolg. Dit zorgt voor een betere scheiding van de componenten, snellere chromatografie en een hogere sensitiviteit met smallere en hogere pieken. Bovendien is UHPLC gekenmerkt door een verhoogde druk tijdens de chromatografische analyse. [50] De mobiele fase kan hetzij constant blijven qua samenstelling (isocratische methode), hetzij gradueel verschillen (gradiënt) [53]. De detector detecteert de analyten na elutie van de kolom (en ionisatie, wat hieronder besproken wordt). In deze masterproef wordt een orbital trap massaspectrometer (MS) gebruikt. Er zijn echter ook nog andere mogelijkheden die gebruikt kunnen worden als alternatief, zoals o.a. een Time of Flight (TOF) MS. [46][50]

De koppeling van UHPLC aan MS is mogelijk doordat na de UHPLC en voor de MS een *heated electrospray ionisation* (HESI) bron aanwezig is. In de HESI-bron wordt de vloeistof die van de UHPLC elueert verneveld in een verwarmde kamer. De opening waaruit de vloeistof komt, staat onder spanning, waardoor een redoxreactie plaatsvindt. De redoxreactie zorgt voor productie van geladen aerosoldeeltjes. In de nevel neemt de grootte van de druppels geleidelijk af doordat het eluens verdampt. De ladingen binnenin de druppels komen dicht bij elkaar, waardoor ze afstoten en met verdere opsplitsing in kleinere geladen deeltjes tot gevolg. Deze deeltjes gaan dan verder naar de MS. Afhankelijk van de polariteit van de spanning die op de electrospraybron aangelegd wordt, is er productie van geprotoneerde of gedeprotoneerde ionen (in de positieve of negatieve ionmodus). [46][54]

Er wordt in het kader van deze masterproef gebruik gemaakt van een Q-Exactive™ MS). Dit is een *orbital trap* (orbitrap) instrument gekoppeld aan een quadrupool (hybride quadrupool-orbitrap hoge resolutie accurate MS).

[46][55] Net voor de orbitrap zit een C-trap (radiofrequentie-only quadrupool) die ervoor zorgt dat kleine bundels ionen doorgestuurd worden naar de orbitrap onder invloed van spanningsimpulsen. Ionen met dezelfde m/z -waarde zullen samen de orbitrap bereiken. De orbitrap bestaat uit twee buitenste elektroden en een centrale spilelektrode. De ionen die de orbitrap binnenkomen, oscilleren rond de centrale elektrode. De verschillende ionen oscilleren met een andere frequentie, wat leidt tot een scheiding. Door deze oscillatiefrequenties kunnen vervolgens de massaspectra van de ionen verkregen worden. [46][56] In de Q-Exactive™ MS is een quadrupool geplaatst tussen het lenzensysteem en de C-trap. Hierdoor kan vooraf bepaald worden welke m/z -verhouding doorgelaten wordt naar de C-trap en de orbitrap. Op die manier kan selectiever op zoek gegaan worden naar de m/z -waarden van interesse. [56][57]

Op basis van de chemische verbinding en de exacte massa van het DNA-adduct kan bij analyse met UHPLC in combinatie met HRMS(/MS) (hybride quadrupool MS) de DNA-adducten nauwkeurig geïdentificeerd worden. De hoge resolutie zorgt ervoor dat ionen met een vergelijkbare massa van elkaar gescheiden kunnen worden en de hieropvolgende meting van de ionenmassa's precies is. [58] Bovendien kan UHPLC-HRMS(/MS) structurele informatie geven en is het een uitstekende kwalitatieve en kwantitatieve analyse voor DNA-adductonderzoek met hoge sensitiviteit en hoge specificiteit. Dit wil zeggen dat lage concentraties aan DNA-adducten in de stalen met hoge specificiteit gemeten kunnen worden. [43] Het gebruik van HRMS zorgt bovendien voor een verbetering van de signaal-ruisverhoudingen voor DNA-adductanalyses in complexe stalen [46].

2. OBJECTIEVEN

CRK is een ernstig ziekte in de westerse wereld, maar ook in lage-inkomenlanden krijgen steeds meer mensen de diagnose van CRK. Bij de ontwikkeling van CRK speelt voeding (en levensstijl) een belangrijke rol. Onze darmen worden blootgesteld aan allerlei verschillende componenten vanuit de voeding zoals kankerverwekkende stoffen. Onder meer het eten van rood en verwerkt vlees zou bijdragen tot een verhoogd risico op CRK. Er bestaan reeds verschillende hypothesen die het verband tussen de consumptie van rood en verwerkt vlees en de ontwikkeling van CRK kunnen verklaren. De laatste jaren wordt er echter steeds meer belang gehecht aan de heemijzerhypothese. Het mechanisme werd echter nog niet volledig opgehelderd.

Deze masterproef heeft als doel meer inzicht te krijgen in de invloed van rood en verwerkt vlees op de coloncarcinogenese. Dit gebeurde aan de hand van een varkensproef. Er werden 32 biggen aangekocht die gedurende 4 weken een welbepaald dieet kregen. Er waren 4 diëten: een aanbevolen dieet met kip (wit vlees) (AK-groep), een aanbevolen dieet met rood (en verwerkt) vlees (AR-groep), een westers dieet met kip (wit vlees) (WK-groep) en een westers dieet met rood (en verwerkt) vlees (WR-groep). Na 4 weken werden de biggen geëuthaniseerd en werden er stalen van verschillende weefsels genomen (lever, ileum, colon proximaal en colon distaal).

De consumptie van rood (en verwerkt) vlees kan zorgen voor de vorming van DNA-adducten, wat structureel en functioneel gewijzigde DNA-nucleobasen zijn. In de stalen werd enerzijds gericht op zoek gegaan naar bepaalde DNA-adducten, namelijk N⁷-methylguanine, O⁶-methylguanine, N³-methyladenine, α-Methyl-γ-hydroxy-1,N²-propanoguanine (CroG), pyrimido[1,2-a]purin-10(1H)-one (M₁G) en O⁶-carboxymethylguanine (CMG). Anderzijds werd er onderzoek verricht a.d.h.v. DNA-adductomics. DNA-adductomics is een nieuwe onderzoeksmethode waarbij 'untargeted' gezocht wordt naar alle aanwezige componenten in een staal; zowel de gekende als de ongekende DNA-adducten worden in kaart gebracht en bestudeerd. DNA-adducten worden gedetecteerd a.d.h.v. ultrahoge performantie vloeistofchromatografie gekoppeld met hoge resolutie massaspectrometrie.

Bij de eventuele aanwezigheid (en kwantificatie) van DNA-adducten in de stalen van de verschillende diëten wordt een verband gezocht tussen de consumptie van rood (en verwerkt vlees) en de ontwikkeling van CRK. Hierbij wordt getracht om het ontstaan van mogelijke DNA-adducten, die teruggevonden worden in de stalen van biggen die rood (en verwerkt) vlees kregen, te verklaren en zo het mechanisme op te helderen.

3. MATERIAAL EN METHODEN

3.1. STANDAARDEN EN CHEMICALIËN

Als solventen voor UHPLC-HRMS (Q-Exactive™ (Thermo Scientific, San José CA, USA)) werden 0,05% azijnzuur (Merck, Darmstadt, Germany) in UP-H₂O en 100 % methanol (MeOH) (Fisher Scientific, Loughborough, UK) gebruikt.

De beschikbare DNA-adductstandaarden waren: N⁷-methylguanine, O⁶-methylguanine, N³-methyladenine en α-Methyl-γ-hydroxy-1,N²-propanoguanine (CroG) (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) en pyrimido[1,2-a]purin-10(1H)-one (M₁G) (Toronto research chemicals, Toronto, Canada) en O⁶-carboxymethylguanine (O⁶-CMG) (University of Wolverhampton - Prof. S. Moore, Wolverhampton, UK). Daarnaast werd gebruik gemaakt van analytische standaarden van adenine, cytosine, thymine en guanine (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA). Van elke standaard werd apart een werkstockoplossing aangemaakt aan een concentratie van 5 ng/μL. De werkstockoplossingen werden verdund om een 0,1 ng/μL oplossing van elke standaard te bekomen (zie BIJLAGE I: berekening 2), die o.a. gebruikt werd bij de kwaliteitscontrole van de UHPLC-HRMS-analyse (zie sectie 3.2.2).

O₆-d₃-methylguanine en M₁G-¹³C₃ (Toronto research chemicals, Toronto, Canada) en CroG-¹³C₃,¹⁵N₂ (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) zijn de interne standaarden (ISTD), die initieel ook aangemaakt werden in een 5 ng/μL werkstockoplossing. Vervolgens werd een oplossing gemaakt met O₆-d₃-methylguanine (20 ng/mL), M₁G-¹³C₃ (1ng/mL) en CroG-¹³C₃,¹⁵N₂ (1ng/mL) (zie BIJLAGE I: berekening 4).

3.2. KWALITEITSCONTROLE VAN DE UHPLC-HRMS

Vooraleer de Q-Exactive™ gebruikt kon worden voor de analyse van stalen, werden verschillende opstartprotocollen uitgevoerd. Zo vond eerst een evaluatie- en kalibratiestap plaats, door infusie van kalibratiemengsels (in positieve en negatieve modus), aangemaakt volgens het protocol beschreven in de handleiding (Thermo Fisher Scientific, San José, USA). Deze evaluatie- en kalibratiestap verzekert de juistheid van de gemeten *m/z*-waarden. In een volgende stap werden de solventen (0,05% azijnzuur in UP-H₂O en 100% methanol) gepurgeerd, waarbij de leidingen gespoeld werden met de juiste solventen. Nadien werd de kolom geconditioneerd met de begincondities (95% van 0,05% azijnzuur in UP-H₂O en 5% van 100% methanol) en werd de kolom in de kolomoven verwarmd tot een temperatuur van 45°C.

Bij elke analyse m.b.v. de Q-Exactive™ werd bij het begin (van elke analyse), na elke 40 stalen en op het einde een standaardmengsel (0,1 ng/μL) geanalyseerd. In het standaardmengsel waren zowel de standaarden M₁G, CroG,

CMG, O⁶-methylguanine, N⁷-methylguanine, N³-methyladenine, adenine, guanine, thymine en cytosine, als de interne standaarden O₆-d₃-methylguanine, M₁G-¹³C₃ en CroG-¹³C₃,¹⁵N₂ aanwezig. (zie BIJLAGE I: berekening 3) De analyse van het standaardmengsel biedt de mogelijkheid om de stabiliteit van de retentietijden van de gekende DNA-adducten (die in het standaardmengsel aanwezig zijn) gedurende de UHPLC-HRMS-analyse op te volgen.

3.3. OPTIMALISATIE VAN DNA-ADDUCTEXTRACTIE

3.3.1. Proefopzet

Tijdens de eerste fase van deze masterproef werd het protocol dat gebruikt wordt om de DNA-adducten uit de stalen te extraheren, geoptimaliseerd. Het protocol beschreven door Vanden Bussche et al. [59] is het protocol dat normaal gebruikt wordt voor de extractie van DNA-adducten in het laboratorium van chemische analyse (Faculteit Diergeneeskunde aan de Universiteit Gent). Er worden echter ook protocollen uitgevoerd die een variant zijn op dit protocol. Het verschil met het protocol van Vanden Bussche et al. is o.a. dat er in de variante protocollen extra stappen, zoals een extra wasstap en/of pH-neutralisatiestap, geïncorporeerd zijn. In deze masterproef werden vier protocollen, die in één of twee stappen van elkaar verschillen, uitgetest en vergeleken, telkens in drievoud. 'Protocol 1' is het protocol van Vanden Bussche et al., 'protocol 2' is hetzelfde protocol, maar met een pH-neutralisatiestap, 'protocol 3' heeft een extra wasstap en 'protocol 4' heeft een pH-neutralisatiestap en een wasstap.

3.3.2. Stalen

Om een objectieve vergelijking mogelijk te maken, werden 12 identieke DNA-stalen met DNA-adducten aangemaakt. Hierbij werden 100 µL van 1mg/mL kalftymus (CT)-DNA (achtergrondmatrix), 25 µL van een 0,1 ng/µL DNA-adductmengsel en 325 µL Tris-EDTA-buffer (TE-buffer) samengevoegd. Het DNA-adductmengsel bevatte adenine, guanine, cytosine, thymine, N⁷-methylguanine, O⁶-methylguanine, O⁶-carboxymethylguanine, N³-methyladenine, N³-methylguanine, M₁G en CroG. De TE-buffer is een pH-buffer, die vaak gebruikt wordt voor de stockering van DNA. Er werden telkens 3 van de 12 identieke stalen gebruikt voor het uittesten van elk protocol.

3.3.3. Protocollen

3.3.3.1. Protocol 1: protocol van Vanden Bussche et al.

De eerste drie stalen werden geëxtraheerd volgens dit 'protocol 1'. Als eerste stap werd er 50 µL ISTD-oplossing (zie sectie 3.1) en 2 ml 0,1 M mierenzuur (Merckx, Darmstadt, Germany) (zie BIJLAGE I: berekening 5) in UP-H₂O toegevoegd aan de stalen. Vervolgens werden de stalen exact 30 minuten in een heating block bij 80°C geplaatst,

waarna deze gedurende minstens 15 minuten afgekoeld werden in ijswater. De volgende stap was de SPE-extractie met Oasis HLB kolommen (Oasis® HLB cartridges (1 cc, 30mg) Waters (Milford,USA)). Eerst werd de Oasis HLB kolom 2 keer geconditioneerd met 1 ml methanol, waarna de kolom tweemaal geëquilibreerd werd met 1 ml UP-H₂O. Vervolgens werd het staal op de kolom gebracht en werd de kolom gedurende 1 min drooggetrokken. Het staal werd daarna geëluëerd met 2 ml methanol. Het eluens, dat bestaat uit de DNA-adducten en methanol, werd daarna gedurende 90 min bij kamertemperatuur drooggedampt met behulp van een vacuümevaporator (Speed Vac Plus Savant, Thermo Scientific, San José CA, USA). Eens droog werden de stalen heropgelost in 100 µl 0,05% azijnzuur in UP-H₂O (zie BIJLAGE I: berekening 1), gevortext en overgebracht naar HPLC-vials. De stalen werden bewaard bij -20°C in afwachting van analyse. (zie BIJLAGE II: protocol 1)

3.3.3.2. Protocol 2 : protocol met pH neutralisatie stap

Drie andere stalen werden volgens 'protocol 2' geëxtraheerd. Het 'protocol 2' werd op dezelfde manier uitgevoerd als 'protocol 1' (zie sectie 3.3.3.1.), met uitzondering van de pH-neutralisatiestap, die net voor de SPE-stap uitgevoerd werd. De pH werd gemeten (en opgevolgd) met behulp van een pH-meter (Mettler Toledo inlab® Expert Pro PH, Columbus ,Ohio, USA). Door toevoeging van NaOH (0,1 ; 1 of 5 M) en/of door toevoeging van HCl (1 of 6 M) werd de pH op een waarde tussen 7 en 7,4 gebracht. Vervolgens vond de SPE-extractie met de OASIS HLB kolommen plaats, cf. in protocol 1. (zie BIJLAGE II: protocol 2 voor het volledige protocol)

3.3.3.3. Protocol 3: protocol met extra wasstap

Er werden tevens drie stalen geëxtraheerd volgens het 'protocol 3'. 'Protocol 3' is hetzelfde protocol als 'protocol 1' (zie sectie 3.3.1.1.), uitgezonderd de extra wasstap; nadat het staal op de Oasis HLB kolommen gebracht en doorgelopen was, werd de kolom gewassen met 1 mL H₂O. (zie BIJLAGE II: protocol 3 voor het volledige protocol)

3.3.3.4. Protocol 4: protocol met pH-neutralisatie en extra wasstap

De laatste 3 stalen werden volgens het 'protocol 4' geëxtraheerd. Hierbij werd een pH-neutralisatie- en wasstap toegevoegd t.o.v. 'protocol 1' (zie sectie 3.3.3.1.). De pH-neutralisatiestap werd uitgevoerd net voor de SPE-stap, zoals beschreven in sectie 3.3.3.2. De wasstap (1 mL H₂O) vond plaats nadat het staal op de Oasis HLB kolommen gebracht en doorgelopen was, net zoals bij protocol 3. (zie BIJLAGE II: protocol 4 voor het volledige protocol)

3.3.4. DNA-adductanalyse

Voor de DNA-adductanalyse werd gebruik gemaakt van een hybride Quadrupool-Orbitrap HRMS (Q-Exactive™, Thermo Fisher Scientific, San José, USA). De instellingen werden overgenomen uit Hemeryck et al. [43]. Er werd gekozen voor de Acquity UPLC® BEH C18 kolom (1.7 µm 2,1 x 100 mm, Waters, Milford, ma, USA) en voor de solventen 0,05% azijnzuur in UP-H₂O en 100% methanol als mobiele fase. De Vanquish pomp (Thermo Scientific, San José, USA) pompte de solventen met een flow van 300 µL per minuut in de juiste verhoudingen over de kolom. Het gradiëntprogramma dat gebruikt werd, is weergegeven in Tabel 3.1. Tussen 0,00 en 0,850 minuten was er een dode tijd, waarna vervolgens het aandeel van 100% MeOH opgevoerd werd, wat nodig is om de DNA-adducten van de kolom te elueren. Tot slot werd de kolom geherconditioneerd met 95% azijnzuur HAc en 5% methanol gedurende 2 minuten). Aan de Vanquish pomp is een Dionix Ultimate 3000 RS autosampler (Thermo Scientific, San José, USA) gekoppeld, die instaat voor de injectie van 10 µL staal op de kolom. Een HESI-II bron (diepte C), stond in voor de ionisatie (in +/- modus) van de componenten die van de kolom elueren, vlak voor detectie door de Q-Exactive™. Voorafgaand aan de analyse van de stalen, werd een kwaliteitscontrole uitgevoerd (zie sectie 3.2.1.).

Tabel 3.1: Gradiëntprogramma solventen UHPLC-HRMS

Tijd (min)	Debiet (mL/min)	% 0,05% azijnzuur in UP-H ₂ O	% 100% methanol
0,00	Run		
0,00	0,300	95,0	5,0
0,850	0,300	95,0	5,0
4,00	0,300	50,0	50,0
4,010	0,300	0,0	100,0
5,010	0,300	0,0	100,0
5,020	0,300	95,0	5,0
7,00	Stop run		

3.3.5. Dataverwerking

De resultaten (chromatogrammen en massaspectra), die bekomen werden na de uitvoering van de UHPLC-HRMS-analyse, werden geïnterpreteerd met behulp van Xcalibur™ 4.0 qual en quan software (Thermo Fisher Scientific, San José, USA), aan de hand van een processingmethode. De processingmethode omvat informatie over o.a. de retentietijden en de massa over lading verhouding (m/z -waarden) van de gekende standaarden en interne standaarden, het tijdsvenster waarin gezocht moet worden naar een welbepaalde component en het toegelaten verschil tussen de theoretische en de gemeten massa, die doorgaans vastgelegd wordt op 5 ppm.

Aan de hand van Xcalibur™ werd voor elk staal nagegaan of de gekende DNA-adductstandaarden en ISTD aanwezig waren, namelijk M₁G, CroG, O⁶-CMG, O⁶-methylguanine, N⁷-methylguanine, N³-methyladenine, O₆-d₃-methylguanine, M₁G-¹³C₃ en CroG-¹³C₃, ¹⁵N₂. De verkregen pieken van de DNA-adductstandaarden en ISTD werden gecontroleerd op een goede integratie. Waar nodig, kon de integratie manueel aangepast worden. De signaalruisverhouding (>3) van de pieken werd hierbij ook bekeken. In de Xcalibur™ Quan software werden o.a. de piekoppervlaktes van de pieken van de aanwezige DNA-adductstandaarden weergegeven, alsook de piekoppervlakteverhoudingen. De piekoppervlakteverhouding is de verhouding van de piekoppervlakte van de piek van het DNA-adductstandaard op de piekoppervlakte van de piek van de interne standaard. Vervolgens werden de piekoppervlaktes en de piekoppervlakteverhoudingen van de pieken van de aanwezige DNA-adductstandaarden geëxporteerd naar Excel voor verdere verwerking.

Elk protocol werd in drievoud uitgevoerd, waardoor er (indien in elke staal elk DNA-adductstandaard gedetecteerd werd) 3 piekoppervlakteverhoudingen per DNA-adduct, per protocol waren. In Excel werd voor elk protocol het gemiddelde van de 3 piekoppervlakteverhoudingen van de gevonden DNA-adductstandaard berekend. De gemiddelde piekoppervlakte verhoudingen van de 4 protocollen werden per DNA-adductstandaard weergegeven in een tabel. Op basis van deze tabel werd nagegaan welk protocol voor de hoogste piekoppervlakteverhoudingen (en bijgevolg de hoogste concentratie) van de DNA-adductstandaard zorgde. Bovendien werd een Student's t-test uitgevoerd, om na te gaan of er een significant verschil was in de piek oppervlakte verhoudingen. Dit werd voor alle DNA-adductstandaarden op dezelfde manier berekend.

3.4. VARKENSPROEF

3.4.1. Proefopzet

3.4.1.1. Dierproef





Voorafgaand aan deze masterproef werd een varkensproef uitgevoerd om het verband tussen de consumptie van rood en verwerkt vlees en CRK a.d.h.v. o.a. metabolomics en DNA-adductomics verder te bestuderen. In het kader van deze masterproef werd onderzocht of er een verschil is in de vorming van DNA-adducten tussen de consumptie van rood (en verwerkt) vlees en wit vlees (in combinatie met een aanbevolen dieet of een westers dieet), aangezien DNA-adductvorming gezien wordt als een mogelijke onderliggende en/of bijdragende oorzaak van de ontwikkeling van CRK. Het verschil in vorming van DNA-adducten werd nagegaan door biggen te voederen met verschillende diëten (meer in detail besproken in sectie 3.4.1.2.). Het protocol van de varkensproef werd goedgekeurd door het ethisch comité van de Universiteit Gent (EC 2016/26).

Voor de desbetreffende proef werden 32 gecasteerde mannelijke biggen (Topigs x Piétrain) van 3 weken oud, uit 8 verschillende nesten aangekocht bij lokale commerciële boerderijen en toegewezen aan 8 hokken. Bij aankomst kregen alle biggen gedurende een week een commercieel prestarterdieet *ad libitum*. Vervolgens werden de verschillende opgelegde diëten geleidelijk aan geïntroduceerd gedurende een week. De biggen werden daarna gevoed met het voorziene dieet gedurende vier weken. De biggen werden twee keer per week gewogen en het gemiddelde lichaamsgewicht bij het begin van de experimentele voedingsperiode verschilde niet significant tussen de behandelingsgroepen ($7,00 \pm 0,88$ kg). Tijdens deze vier weken werden de biggen om 8, 12 en 18 uur *ad libitum* gevoederd met verse maaltijden. Om de individuele voedingsopname van elke big per maaltijd vast te leggen, werd gebruik gemaakt van een individueel voedersysteem. Water was altijd *ad libitum* beschikbaar.

Op het einde van de vier weken durende voederperiode, werden stalen afgenomen. Hiertoe werden de biggen geëuthanaseerd met een intramusculaire injectie van xylazine (20 mg / ml, 0,1 ml / kg lichaamsgewicht) en intraperitoneale injectie van pentobarbital (60 mg / ml, 0,8 ml / kg lichaamsgewicht), gevolgd door exsanguinatie. Elke dag werden twee biggen van elke dieetbehandeling geslacht, te beginnen met de zwaarste biggen. (Zie BIJLAGE V: Tabel 1 voor meer details.) Specifiek voor deze studie werden de lever (lobus hepatis dexter medialis) en weefselsegmenten (10 cm² segment) van de mucosa van het ileum, het proximale (Colon muc 1) en het distale colon (Colon muc 2) verwijderd, gehakt, gehomogeniseerd en voorzichtig gespoeld met 0,9% NaCl-oplossing. De weefsels werden vervolgens in vloeibare stikstof gebracht en bewaard in 95% ethanol bij -80°C tot verdere staalverwerking.

3.4.1.2. Diëten

Er zijn vier verschillende diëten (zie Figuur 3.1); kip in een aanbevolen dieet (A voor aanbevolen en K voor kip = 'AK'), kip in een westers dieet (W voor westers en K voor kip = 'WK'), rood (en verwerkt) vlees in een aanbevolen dieet (A voor aanbevolen en R voor rood vlees = 'AR') en rood (en verwerkt) vlees in een westers dieet (W voor westers en R voor rood vlees = 'WR').

		Vlees	
			
Dieet		Kip-aanbevolen dieet	Rood en verwerkt vlees-aanbevolen dieet
		Kip- westers dieet	Rood en verwerkt vlees – westers dieet

Figuur 3.1: Overzicht van de 4 diëten, credits: Sophie Goethals [60]

voedselconsumptiepeiling van 2004 [61]. Kippendijen en -borsten vormden het kippenvlees, wat model staat voor wit vlees. Het vlees werd aangekocht bij lokale supermarkten, slachterijen en vleesverwerkende bedrijven. Het rauwe vlees van beide vleestypen werd op een vergelijkbare manier bereid (bakken (70%) of vacuüm koken (30%)) en het vlees werd bewaard (3-4 weken) bij -20 ° C. Alle voedselproducten werden gemengd om selectie van bepaalde voedingsmiddelen door de biggen te vermijden en om homogene diëten te verkrijgen.

De samenstelling van het westerse dieet was gebaseerd op de gemiddelde voedselinname van de Belgische bevolking en werd gekenmerkt door grote hoeveelheden geraffineerde granen, desserts en snoep [61]. Het aanbevolen dieet werd samengesteld op basis van de voedingsrichtlijnen van de Vlaamse actieve voedingsdriehoek (toegepast in de periode 2005-2017) en werd gekenmerkt door grote hoeveelheden fruit, groenten, volle granen en zuivelproducten [62] [63] [64].

3.4.2. Aanmaak van de ijklijn

Om de DNA-adducten in de stalen kwantitatief te kunnen bepalen, werd eerst een ijklijn aangemaakt. De ijklijnstalen ondergingen hetzelfde DNA-adductextractieprotocol als de te analyseren stalen, namelijk het protocol van Vanden Bussche et al. [59] Eerst werden er ijklijnoplossingen gemaakt (0,2 ng/mL, 2 ng/mL en 10 ng/mL) met daarin de standaarden adenine, guanine, cytosine, thymine, N⁷-methylguanine, O⁶-methylguanine, O⁶-CMG, N³-methyladenine, M₁G en CroG. De ijklijnstalen bestonden uit 100 µL van 1mg/ml kalffhymus DNA (CT-DNA) en 50 µL ISTD-oplossing (zie sectie 3.1). Afhankelijk van de gewenste concentratie werd daarbovenop een bepaalde hoeveelheid van de ijklijnoplossingen toegevoegd en aangelengd tot 500 µL UP-H₂O. De volgende concentraties werden op die manier aangemaakt: 0 ng/mL; 0,05 ng/mL; 0,1 ng/mL; 0,2 ng/mL; 0,4 ng/mL; 0,6 ng/mL; 0,8 ng/mL; 1,0 ng/mL; 2,5 ng/mL en 5 ng/mL (zie BIJLAGE IV). Na extractie werden de ijklijnstalen bij -20°C bewaard in afwachting van de analyse.

3.4.3. Staalvoorbereiding

3.4.3.1. DNA-extractie

Het DNA uit de lever, duodenum en colonmucosae (1: proximaal en 2: distaal) werd geëxtraheerd door gebruik te maken van de Nucleospin Tissue Machery Nagel DNA-extractiekit (Macherey-Nagel GmbH & Co., 52355 Düren, Germany). In de kit zijn het nodige materiaal en buffers aanwezig. De DNA-extracties werden uitgevoerd zoals beschreven in het protocol van de fabrikant (zie BIJLAGE III). Eerst werd 40 mg staal afgewogen, om vervolgens de ethanolresten te laten verdampen en het staal fijn te pletten. Aan dit fijngeplette staal werd in een 2 ml epje 150 µL Rapidlyse Lysis (RLY)-buffer en 10 µL proteinase K toegevoegd zodat het weefsel kon lyseren in een warmwaterbad (maximaal 1 uur, vortexen om de 5 min). In een volgende stap werd 440 µL Rapidlyse Binding (RLB)-buffer toegevoegd om de DNA-bindingscondities te optimaliseren. Nadien werden de stalen op de *NucleoSpin DNA RapidLyse Column* gebracht en gecentrifugeerd gedurende 1 min aan 11000 xg. Het DNA bond zich aan de kolom, terwijl de rest van het staal elueerde in een collectietube. Daarna volgde 2 maal een wasstap van de silicamembraan door telkens 500 µL Rapidlyse Wash (RLW)-buffer toe te voegen en te centrifugeren gedurende 1 min aan 11000 xg. Het drogen van de silicamembraan gebeurde daaropvolgend door opnieuw te centrifugeren gedurende 1 min aan 11000 xg. Als laatste stap werd het DNA in 2 keer geëluëerd, telkens in een apart epje. Hiertoe werd er telkens 100 µL Rapidlyse Elution (RLE)-buffer op de *NucleoSpin DNA RapidLyse Column* gebracht, gevolgd door een 4 min durende incubatie bij kamertemperatuur, om dit vervolgens te centrifugeren gedurende 1 min aan 11000 xg. Het geëluëerde staal werd bewaard bij -20 °C tot verdere verwerking.

De hoeveelheid DNA die geëxtraheerd werd, werd gemeten met behulp van een nanodrop ND-1000 spectrofotometer. Hierbij werd een nanodrop van elk staal op de spectrofotometer geplaatst. [65]

3.4.3.2. DNA-hydrolyse en DNA-adductextractie

In deze masterproef werd gebruik gemaakt van de zure hydrolyse, zoals beschreven door Vanden Bussche et al. [59]. De twee substalen, die geëluëerd werden zoals beschreven in 3.3.2.1. DNA extractie, werden samengebracht in een glazen buis. Alle stalen werden vervolgens op een gelijk volume van 450 µL gebracht met UP-H₂O, waarna 50 µL ISTD-oplossing (zie sectie 3.1) werd toegevoegd. Vervolgens werd er ook 2 ml 0.1 M mierenzuur in UP-H₂O toegevoegd. Het glazen buisje werd nadien voor exact 30 min in een heating block bij 80°C geplaatst. Na 30 min werd het glazen buisje afgekoeld in ijswater gedurende minstens 15 min.

De volgende stap was de SPE-extractie met Oasis HLB kolommen (30 mg, 1mL). Eerst werd de Oasis HLB kolom 2 keer geconditioneerd met 1 ml methanol, waarna de kolom 2 maal geëquilibreerd werd met 1 ml UP-H₂O. Daarna werd het staal op de kolom gebracht en werd de kolom gedurende 1 min drooggetrokken. Vervolgens werd het staal geëluëerd met 2 ml methanol. Het eluens werd daarna drooggedampt bij kamertemperatuur met behulp van een vacuümevaporator (Speed Vac Plus Savant, Thermo Scientific, San José CA, USA) gedurende 90 min. Eens droog werden de stalen heropgelost in 100 µl 0,05% azijnzuur in UP-H₂O (BIJLAGE I: berekening 1), gevortext en overgebracht naar HPLC-vials. De stalen werden bij -20°C bewaard in afwachting van de analyse.

3.4.4. DNA-adductanalyse

Vooraleer de stalen geanalyseerd werden, werd een kwaliteitscontrole uitgevoerd, zoals beschreven staat in sectie 3.2.1. De varkensstalen en de ijklijnstalen werden vervolgens geanalyseerd d.m.v. UHPLC-HRMS (Q-Exactive™) zoals beschreven staat in sectie 3.3.4. De ijklijn werd bij het begin en op het einde van de analyse geanalyseerd. Om de 10 stalen werd een 'spoel'-acetonitril (ACN) (Biosolve Chimie SARL, Dieuze, France) geanalyseerd.

3.4.5. Dataverwerking en statistiek

3.4.5.1. Gerichte DNA-adductanalyse

Na analyse van de stalen werden de resultaten (de chromatogrammen en massaspectra) verwerkt m.b.v. de Xcalibur™ software. In elk staal werd nagegaan of de gekende DNA-adducten aanwezig waren, namelijk N⁷-methylguanine, O⁶-methylguanine, O⁶-carboxymethylguanine, N³-methyladenine, M₁G en CroG. In Tabel 3.1 worden de belangrijkste gegevens van de standaarden weergegeven, o.a. de retentietijden en de massa van de standaarden. Voor de verdere dataverwerking van de resultaten wordt verwezen naar sectie 3.3.5.

Tabel 3.1 Standaarden met chemische formule, massa, *m/z*-waarde (in + en – modus) en de retentietijd

Standaarden	Chemische formule	Massa (g/mol)	<i>m/z</i> full scan (+) (u)	<i>m/z</i> full scan (-) (u)	Retentietijd (min)
Adenine	C ₅ H ₅ N ₅	135.13	136.0617718	134.0472185	0.94
Guanine	C ₅ H ₅ N ₅ O	151.13	152.0566864	150.0421331	0.95
Cytosine	C ₄ H ₅ N ₃ O	111.1	112.0505384	110.0359851	0.83
Thymine	C ₅ H ₆ N ₂ O ₂	126.1133	127.0502040	125.0356508	1.13
N ⁷ -methylguanine	C ₆ H ₇ N ₅ O	165.153	166.0723364	164.0577832	0.99
O ⁶ -methylguanine	C ₆ H ₇ N ₅ O	165.156	166.0723364	164.0577832	1.25
O ⁶ -d ₃ -methylguanine	C ₆ D ₃ H ₄ N ₅ O	168.17	169.0912667	167.0766134	1.25
N ³ -methyladenine	C ₆ H ₇ N ₅	149.157	150.0774218	148.0628686	0.88
Pyrimidopurinone (M ₁ G)	C ₈ H ₅ N ₅ O	187.1582	188.0566864	186.0421331	1.19
M ₁ G- ¹³ C ₃	C ₅ (¹³ C) ₃ H ₅ N ₅ O	190.1257	191.06675	189.0521967	1.19
Alpha-Me-gamma-OH-PdG (CroG)	C ₉ H ₁₁ N ₅ O ₂	221,2159	222.0985512	220.0839979	1.79
CroG- ¹³ C ₃ , ¹⁵ N ₂	C ₈ (¹³ C) (¹⁵ N) ₂ H ₁₁ N ₅ O ₂	224.19104	225.09598	223.0814367	1.79
O ⁶ -CMG	C ₇ H ₇ N ₅ O ₃	209.165	210.0621656	208.0476124	0.99

Bij de analyse van de ijklijn werd de aanwezigheid van DNA-adducten in de ijklijnstalen gecorrigeerd a.d.h.v. de DNA-adductconcentraties in het blanco staal. Het CT-DNA kan immers een achtergrond van DNA-adducten bevatten en hetzelfde geldt uiteraard ook voor de DNA-nucleobasen. De correctie kwam tot stand door de bekomen piekoppervlakte van de andere ijklijnstalen te verminderen met de piekoppervlakte van het blanco staal, voor elk DNA-adduct of -base. De ijklijn werd nadien uitgezet met op de Y-as de piekoppervlakteverhoudingen van het DNA-adduct en op de X-as de gekende (toegevoegde) DNA-adductconcentratie. Aangezien de ijklijn geanalyseerd werd bij aanvang van de analyse, alsook op het einde, werden 2 ijklijnen per DNA-adductstandaard bekomen. Er werd gekeken naar de determinatiecoëfficiënt (R²) om te kunnen besluiten welke ijklijn voldeed aan de vooropgestelde voorwaarde van een R² groter dan 0,98 (bij voorkeur > 0,99).

In de varkensstalen werden (indien mogelijk) de concentraties van de (eventueel) gedetecteerde DNA-adducten bepaald a.d.h.v. de piekoppervlakte (verhouding) van de piek en de vergelijking van de ijklijn van het

desbetreffende DNA-adduct. De concentraties werden vervolgens zodoende gecorrigeerd door te delen door de DNA-concentratie (ng/ μ L) per staal (gemeten door de nanodrop ND-1000 spectrofotometer), en deze gelijk te zetten op 100 door te vermenigvuldigen met een factor 100. Vervolgens werden Student's t-testen uitgevoerd om na te gaan of er een significant verschil was in DNA-adductconcentratie tussen 2 beschouwde groepen. Er werd gekeken naar het eventuele verschil tussen de weefsels: lever versus colon proximaal ('colon 1'); lever versus ileum; lever versus colon distaal ('colon 2'); ileum versus 'colon 1'; ileum versus 'colon 2'; 'colon 1' versus 'colon 2', maar daarnaast ook naar de mogelijke verschillen tussen diëten (binnen de weefsels): rood (en verwerkt) vlees versus wit vlees (kip); westers dieet versus aanbevolen dieet; westers-wit vlees (kip) versus westers-rood (en verwerkt) vlees, aanbevolen-wit vlees (kip) versus aanbevolen-rood (en verwerkt) vlees; aanbevolen-wit vlees (kip) versus westers-wit vlees (kip); aanbevolen-rood (en verwerkt) vlees versus westers-rood (en verwerkt) vlees.

3.4.5.2. Niet-gerichte screening

Om te screenen op de aanwezigheid van alle mogelijke DNA-adducten in de varkensstalen werd gebruik gemaakt van de Sieve™ 2.2 software (Thermo Fisher Scientific, San José, USA). Alle ionen, die elueerden tussen 0,7 minuten en 5,5 minuten, met een m/z -waarde tussen 70 en 700 Da, werden behouden. De maximale piekbreedte bestond uit 0,5 minuten en de maximale massa-afwijking werd ingesteld op 10 ppm. De minimale piekintensiteit was 50 000 (arbitrary units). De positieve (+nH, +K, +Na,+NH₄) en de negatieve (-nH) ionen werden telkens apart geselecteerd. Na het automatisch processen van de gegevens, gaf Sieve™ de m/z -waarde, de RT en de abundantie van elk gedetecteerd ion weer. De resultaten uit Sieve™ werden vervolgens verder verwerkt met Simca™ 15 software (Umetrics AB, Umeå, Sweden), na de correctie voor de hoeveelheid DNA in elk staal, logaritmische datatransformatie en Pareto schaling.

Er werden daarbij 2 soorten modellen opgesteld, namelijk het Principal component analysis-model (PCA-X model) en het Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis-model (OPLS-DA model). De validiteit van de OPLS-DA modellen werd geëvalueerd a.d.h.v. R^2X , R^2Y en Q^2 karakteristieken, de CV-anova test (p -waarde < 0,05) en de permutatietest. De minimale waarde van de karakteristieken R^2X , R^2Y en Q^2 is 0,5. R^2X en R^2Y garanderen de "goodness of fit" en de Q^2 schat hoe goed het model nieuwe data voorspelt.

In een volgende stap werden de meest discriminerende ionen uit het massaspectrum geselecteerd om de modellen te verfijnen. De selectie was gebaseerd op de jack-knifed betrouwbaarheidsinterval, de *Variable Importance in Projection* (VIP)-score en S -plot van het OPLS-DA model op basis van alle ionen uit het massaspectrum. Eerst werden

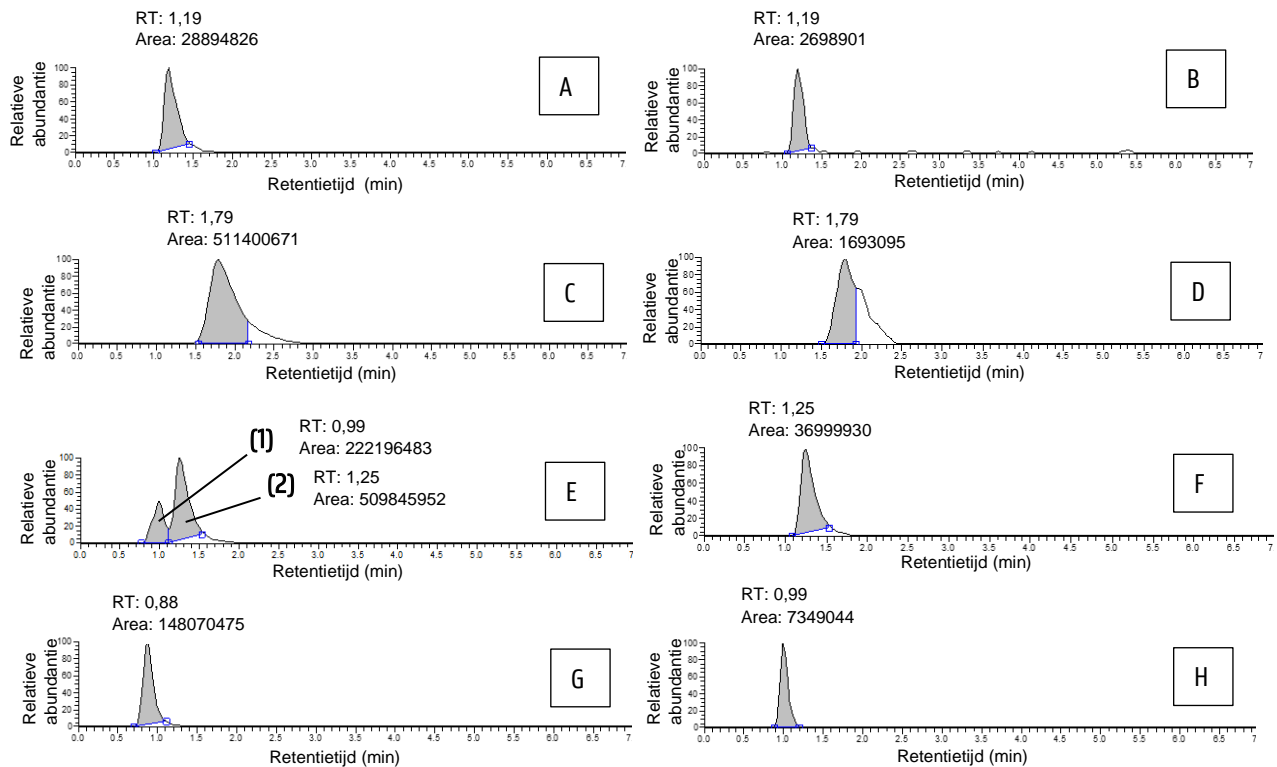
de ionen waarbij het jack-knifed betrouwbaarheidsinterval kleiner is dan 0 verwijderd. Vervolgens werden ook de ionen verwijderd die een VIP-score lager dan 1 hadden. Finaal werden ionen geselecteerd op basis van hun excentrische positie in het S-plot. In het S-plot werden de meest uiterste ionen geselecteerd door het instellen van de p-waarde en de p(corr)-waarde. De p-waarden, die visueel vastgelegd werden, geven het belang van een ion voor de groepsscheiding weer. De p (corr)-waarde, die de betrouwbaarheid van het belang van een ion voor de groepsscheiding weergeeft, is kleiner dan -0,5 en groter dan 0,5. Alle ionen die een p (corr)-waarde tussen -0,5 en 0,5 hadden, werden niet geselecteerd. [41]

In een laatste stap werd getracht om de chemische formule van de geselecteerde discriminerende ionen te achterhalen. Dit werd bepaald voor de ionen uit modellen die een vergelijking maken tussen rood (en verwerkt) en wit vlees. Sieve gaf reeds een mogelijke formule, maar a.d.h.v. de Xcalibur™ Qual Browser kan eveneens een voorstel voor de chemische formule verkregen worden. De ionen werden in de Qual Browser opgespoord op basis van hun m/z -waarde en retentietijd. Indien enerzijds een piek gevonden werd op de juiste retentietijd en anderzijds het ion op de juiste m/z -waarde in het spectrum waargenomen werd, dan kon de formule van een mogelijk DNA-adduct voorgesteld worden door de software. De voorgestelde structuren konden gecontroleerd worden door het C13-isotoop van de component in het spectrum met exact dezelfde retentietijd (en een ± 100 x lagere oppervlakte dan de C12-component) op te zoeken, waarna de C13/C12 ratio bepaald kon worden om een inschatting te geven van het aantal koolstoffen in de molecule. Praktisch hield dit in dat de piekoppervlakte van de C13-isotoop gedeeld werd door de piekoppervlakte van C12 en dit quotiënt vermenigvuldigd werd met factor 100/1,1. Indien een chemische formule bekomen werd, werd deze eveneens afgetoest met de database, ontwikkeld door L.Y. Hemeryck et al. [43].

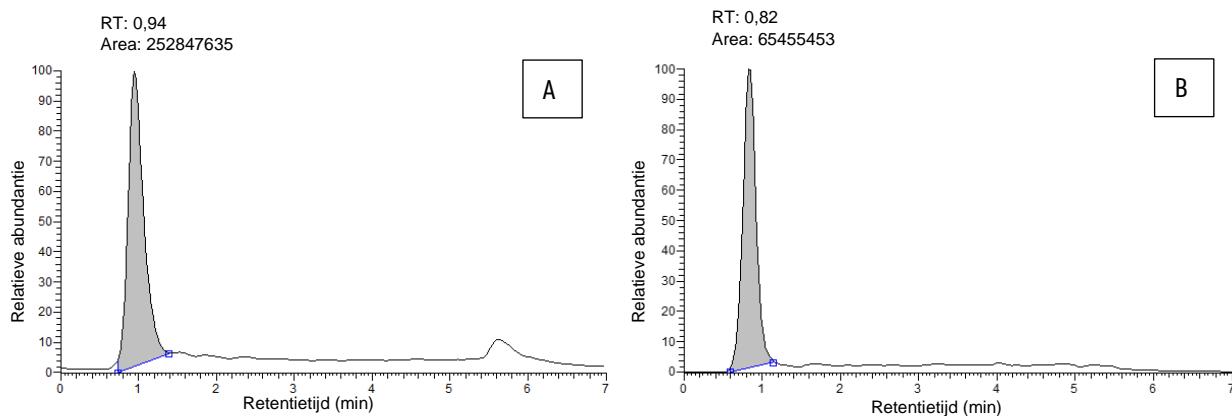
4. RESULTATEN

4.1. OVERZICHT CHROMATOGRAFIE

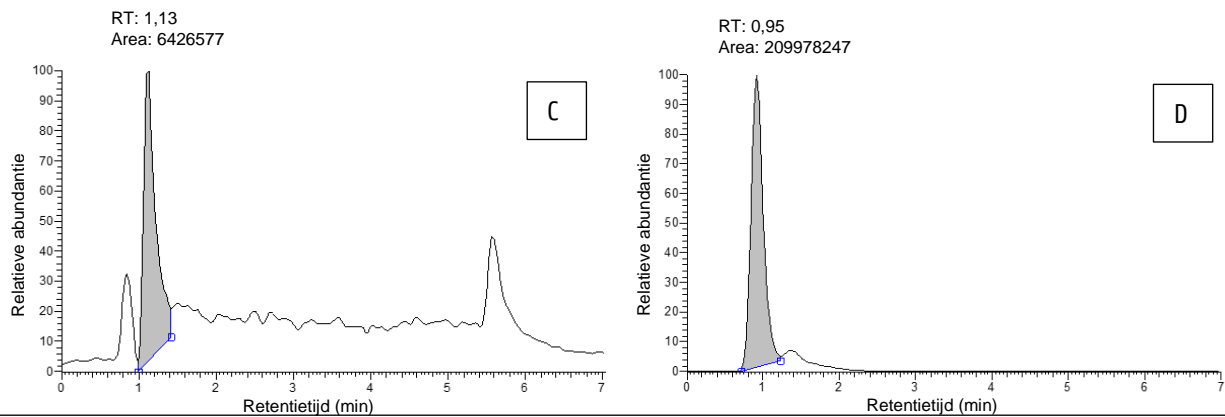
In Figuur 4.1, 4.2 en 4.3 worden de chromatogrammen na analyse van de standaarden weergegeven. In elk chromatogram is er een piek, de retentietijd en piekoppervlakte (area) te zien van de desbetreffende standaard.



Figuur 4.1: Chromatogrammen van de standaarden (1 ng) : M_1G (A), $M_1G-^{13}C_3$ (B), $CroG$ (C), $CroG-^{13}C_3,^{15}N_2$ (D), N^7 -methylguaninie (E1), O^6 -methylguaninie (E2), O^6 -d3-methylguaninie (F), N^3 -methyladenine (G) en O^6 -CMG (H)



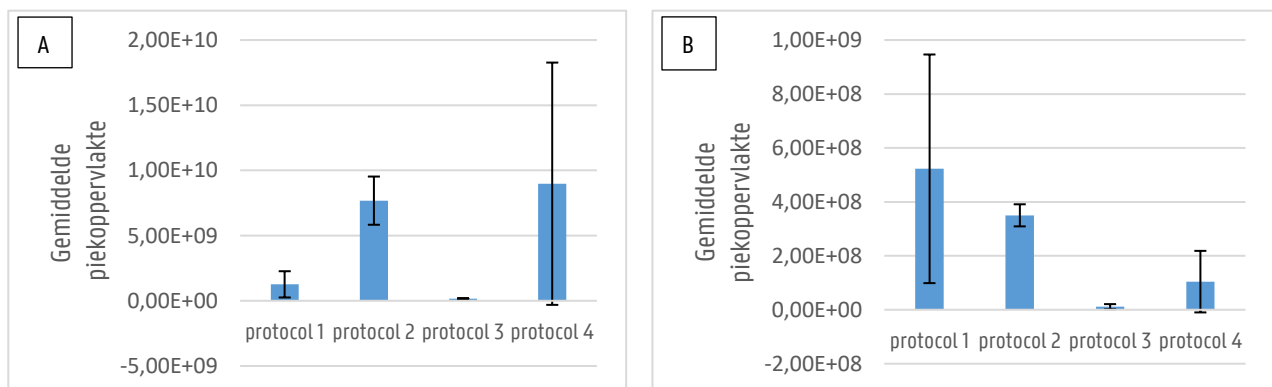
Figuur 4.2: Chromatogrammen van de standaarden (1 ng): Adenine (A) en Cytosine (B)



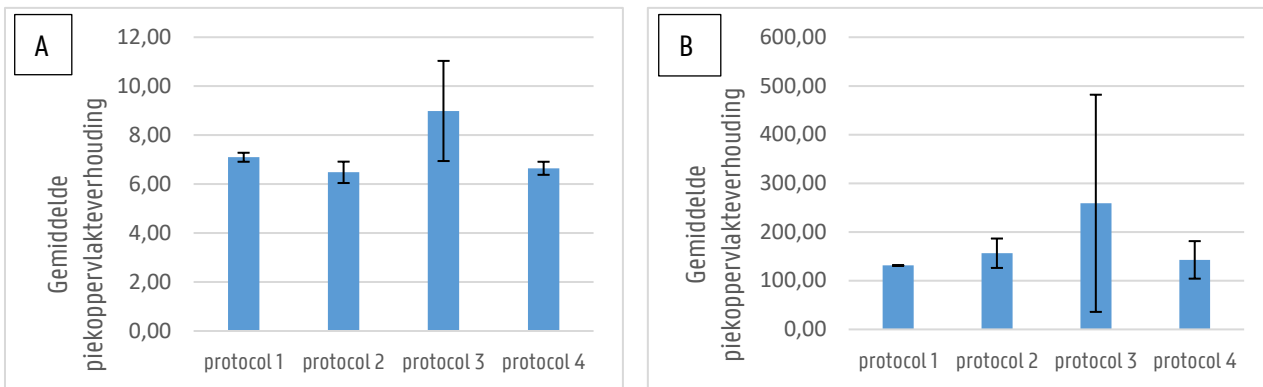
Figuur 4.3: Chromatogrammen van de standaarden (1 ng) : Thymine (C) en Guanine (D)

4.2. OPTIMALISATIE VAN DNA-ADDUCTEXTRACTIE

Bij de optimalisatie van DNA-adductextractie werden 4 protocollen met elkaar vergeleken en werd nagegaan welk protocol de beste resultaten gaf voor de extractie van DNA-adducten. Om een vergelijking te kunnen maken, werd gekeken naar volgende componenten: adenine en guanine, O^6 -methylguanine en CroG. De overige standaarden (Cytosine, Thymine, O^6 -CMG, N^3 -methyladenine, N^7 -methylguanine en M_1G) werden niet (goed) gedetecteerd. De bekomen piekoppervlaktes van adenine en guanine werden vergeleken per protocol. Bij O^6 -methylguanine en CroG werd een vergelijking gemaakt op basis van de piekoppervlakteverhouding. In Figuur 4.4 en 4.5 worden de resultaten, nl. de gemiddelde piekoppervlaktes (van drie stalen per protocol, cf. supra) van adenine en guanine en de gemiddelde piekoppervlakteverhouding (van drie stalen per protocol, cf. supra) van O^6 -methylguanine en CroG weergegeven.



Figuur 4.4: A) staafdiagram van de gemiddelde piekoppervlakte van adenine en B) staafdiagram van de gemiddelde piekoppervlakte van guanine



Figuur 4.5: A) staafdiagram van de gemiddelde piekoppervlakteverhouding van O⁶-methylguanidine en B) staafdiagram van de gemiddelde piekoppervlakteverhouding van CroG

In Tabel 4.1 worden de p-waarden van de paarsgewijze vergelijkingen weergegeven, namelijk een vergelijking tussen protocol 1 en 2, tussen protocol 1 en 3, tussen protocol 1 en 4, tussen protocol 2 en 3, tussen protocol 2 en 4 en tussen protocol 3 en 4. De p-waarde (<0,05) toont aan of er een significant verschil tussen de twee protocollen aanwezig is. Op basis van mogelijke significante verschillen kan een keuze gemaakt worden voor een bepaald protocol. Enkel de p-waarden van de vergelijking tussen protocol 1 en 2 en tussen protocol 2 en 3 voor adenine en p-waarden de vergelijking tussen protocol 2 en 3 en tussen protocol 2 en 4 voor guanine tonen een significant verschil aan.

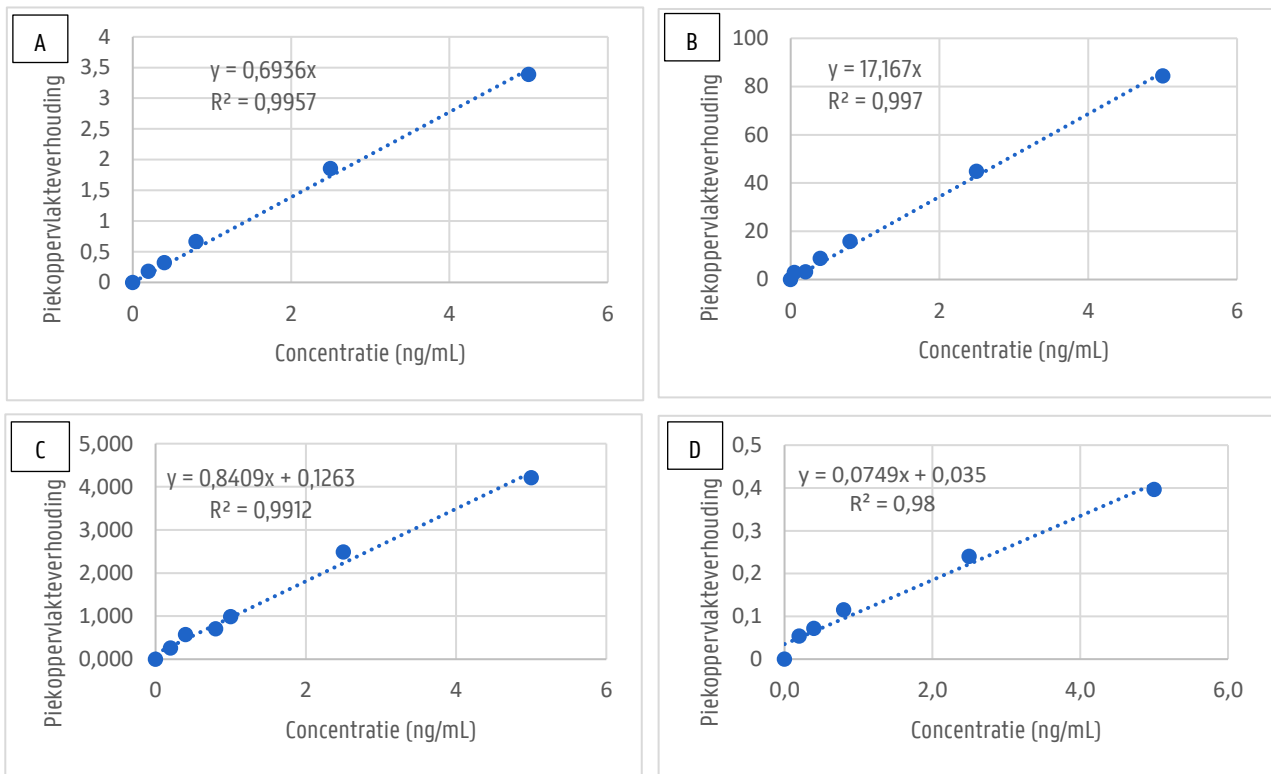
Tabel 4.1 P-waarden paarsgewijze vergelijkingen : optimalisatie DNA-adductextractie

	Adenine	Guanine	O ⁶ -methylguanidine	CroG
Protocol 1 en 2	0,01	0,52	0,17	0,34
Protocol 1 en 3	0,24	0,10	0,30	0,50
Protocol 1 en 4	0,23	0,17	0,19	0,71
Protocol 2 en 3	0,01	1,53E-04	0,11	0,47
Protocol 2 en 4	0,82	0,02	0,67	0,68
Protocol 3 en 4	0,29	0,23	0,22	0,54

4.3. VARKENSPROEF

4.3.1. Gerichte DNA-adductanalyse

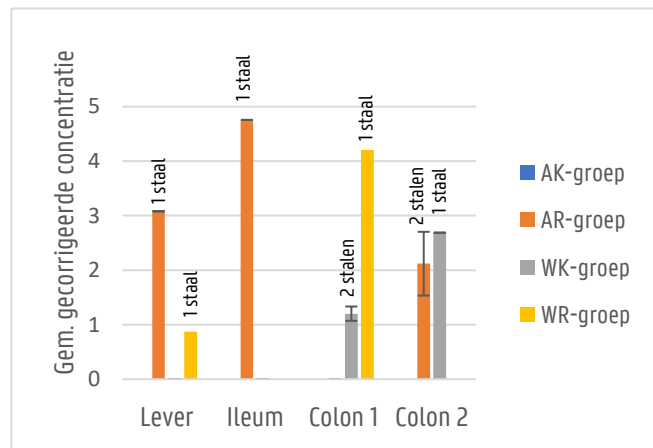
Om de aanwezigheid van de gekende DNA-adducten in de varkensstalen kwantitatief te bepalen, werden ijklijnen opgesteld waarbij de piekoppervlakteverhoudingen in functie van de verschillende concentraties gezet werden. In Figuur 4.6 worden de ijklijnen van M₁G, CroG, O⁶-methylguanine en N³-methyladenine weergegeven. De 4 ijklijnen hebben telkens een R² groter dan 0,98. De ijklijnen van componenten N⁷-methylguanine, adenine, guanine, cytosine en thymine vertonen een te lage R² (<0,98) (zie BIJLAGE VI: Figuur 1). O⁶-CMG werd niet teruggevonden in de stalen, waardoor er voor deze component geen ijklijn opgesteld kon worden.



Figuur 4.6: A) ijklijn M₁G, B) ijklijn CroG, C) ijklijn O⁶-methylguanine en D) ijklijn N³-methyladenine

Vervolgens werd in de varkensstalen gericht gezocht naar de gekende DNA-adducten, namelijk M₁G, CroG, O⁶-methylguanine, N³-methyladenine, O⁶-CMG, N⁷-methylguanine.

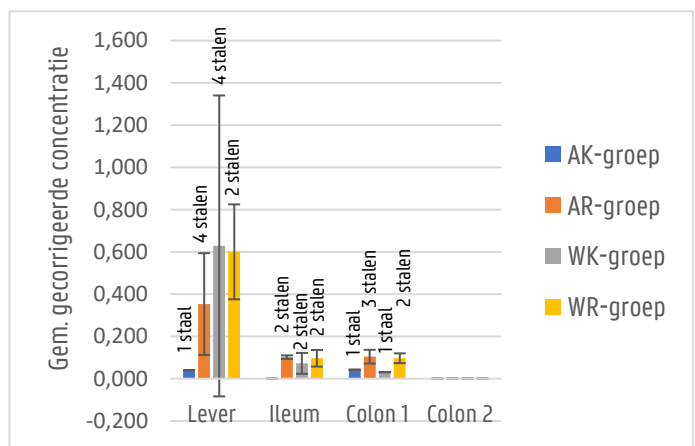
In 9 van de 128 stalen (8 stalen per dieetgroep x 4 dieetgroepen per weefsel x 4 weefsels) werd het DNA-adduct M₁G gedetecteerd. De concentratie van M₁G in de stalen werd berekend a.d.h.v. de ijklijn. Vervolgens werd deze concentratie gecorrigeerd door te delen door de DNA-concentratie in elk staal en door te vermenigvuldigen met een factor 100. De DNA-concentraties in elk staal worden weergegeven in Tabel 27 in BIJLAGE V. Nadien werd het gemiddelde berekend van de gecorrigeerde M₁G-concentratie in de stalen waarin M₁G werd gedetecteerd. In Figuur 4.7 wordt de



Figuur 4.7 : Gemiddelde gecorrigeerde M₁G-concentratie (van de stalen waarin M₁G gedetecteerd werd, aantal stalen wordt weergegeven in de figuur) per dieet en weefseltype

gemiddelde gecorrigeerde M₁G-concentratie (van de stalen waarin M₁G gedetecteerd werd) weergegeven per dieet en weefseltype. Er is te zien dat er in geen enkel staal van de biggen die een aanbevolen-wit vlees (kip) (AK-groep) M₁G gedetecteerd werd. In de lever-, ileum- en 'colon 1' weefsels hebben de stalen (waarin M₁G teruggevonden werd) van biggen die diëten kregen met rood (en verwerkt) vlees steeds een hogere concentratie aan M₁G. Ook in het 'colon 2' weefsel werd in de aanbevolen-rood (en verwerkt) vlees dieetgroep en westers-wit vlees (kip) dieetgroep M₁G gevonden. Rekening houdend met de standaarddeviatie hebben de stalen in deze groepen een even hoge concentratie aan M₁G.

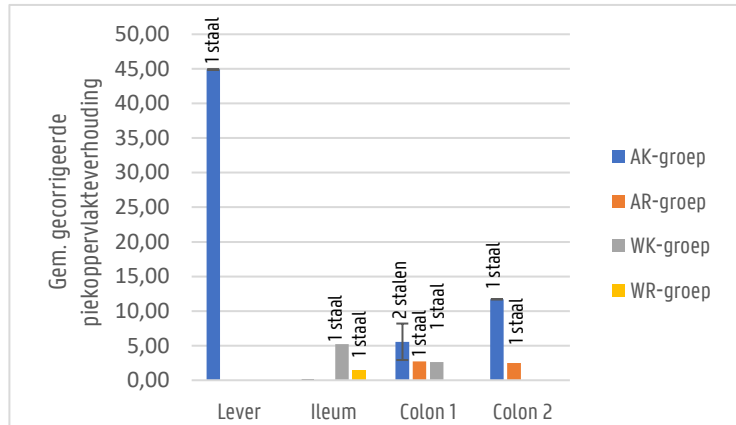
Het DNA-adduct CroG werd in 24 stalen (van de 128) gedetecteerd. Aan de hand van de ijklijn werd de concentratie in elk staal bepaald. Vervolgens werd de gemiddelde gecorrigeerde concentratie van de stalen waarin CroG teruggevonden werd berekend (zoals hierboven beschreven staat bij het DNA-adduct M₁G). De gemiddelde gecorrigeerde concentratie van CroG per dieet en weefseltype wordt weergegeven in Figuur 4.8. Zoals geïllustreerd in Figuur 4.8 wordt er in het 'colon 2' weefsel geen CroG gedetecteerd. In de overige weefsels zijn de concentraties in de stalen van de rood (en verwerkt) vlees-dieetgroepen (waarin



Figuur 4.8: Gemiddelde gecorrigeerde CroG-concentratie (van de stalen waarin CroG gedetecteerd werd, het aantal wordt weergegeven in de figuur) per dieet en weefseltype

CroG gedetecteerd werd) hoger dan in de stalen van de wit vlees-dieetgroepen, behalve in de stalen van de WK en WR-groep in de lever (waarin CroG teruggevonden werd), die hebben quasi een zelfde concentratie.

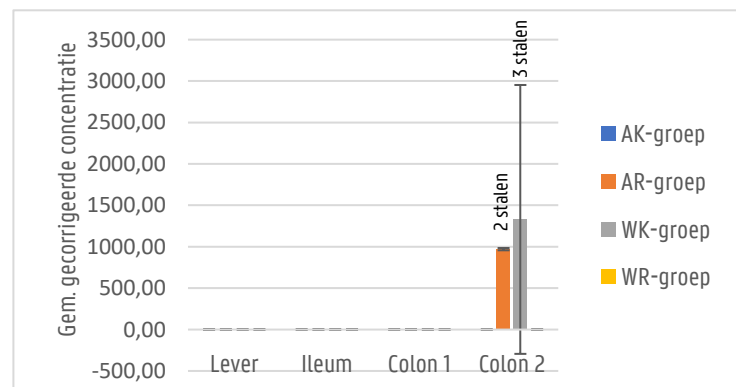
O⁶-methylguanine werd in 9 van de 128 stalen gedetecteerd. De concentraties werden berekend a.d.h.v de ijklijn. Er kan echter opgemerkt worden dat de concentraties niet precies konden bepaald worden, behalve bij het leverstaal van de big dat een aanbevolen dieet met kip kreeg (AK-groep). Bij de overige stalen is de concentratie lager dan 0,05 (zie Tabel 7 in BIJLAGE V). Aangezien de concentratie niet precies kon bepaald worden, wordt de gemiddelde gecorrigeerde



Figuur 4.9: Gemiddelde gecorrigeerde O⁶-methylguanine-piekoppervlakteverhouding (van de stalen waarin O⁶-methylguanine gedetecteerd werd, het aantal wordt weergegeven in de figuur) per dieet en weefseltype

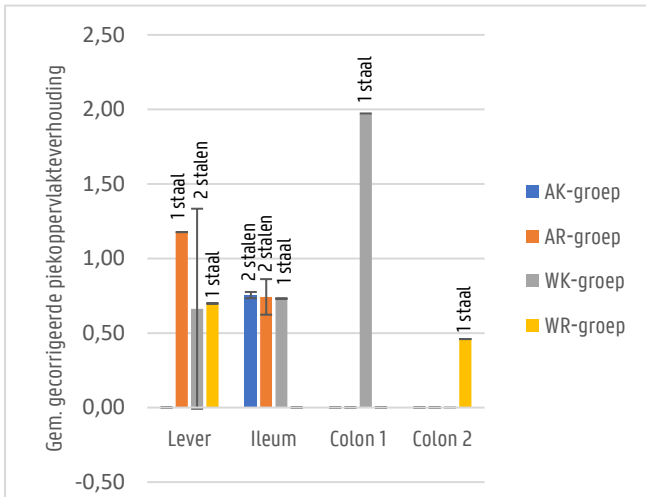
piekoppervlakteverhouding van O⁶-methylguanine per dieet en weefseltype weergegeven in Figuur 4.9. Deze gecorrigeerde piekoppervlakteverhouding wordt bekomen door te delen door de DNA-concentratie in elk staal (zie Tabel 27 in BIJLAGE V) en te vermenigvuldigen met een factor 100. Er is te zien dat O⁶-methylguanine voornamelijk in de stalen van biggen die een aanbevolen-wit vlees (kip) dieet (AK-groep) teruggevonden wordt. In de ileumstalen van de WK-groep werd er ook meer O⁶-methylguanine gedetecteerd dan in de stalen van de WR-groep.

N³-methyladenine werd enkel teruggevonden in de 5 'colon 2'(colon distaal) stalen. De gemiddelde gecorrigeerde concentratie (cf. supra) van N³-methyladenine per dieet en weefseltype wordt weergegeven in Figuur 4.10. N³-methyladenine is meer aanwezig in de stalen van de WK-groep dan in de stalen van de AR-groep. In de overige dieetgroepen werd er geen N³-methyladenine gedetecteerd.

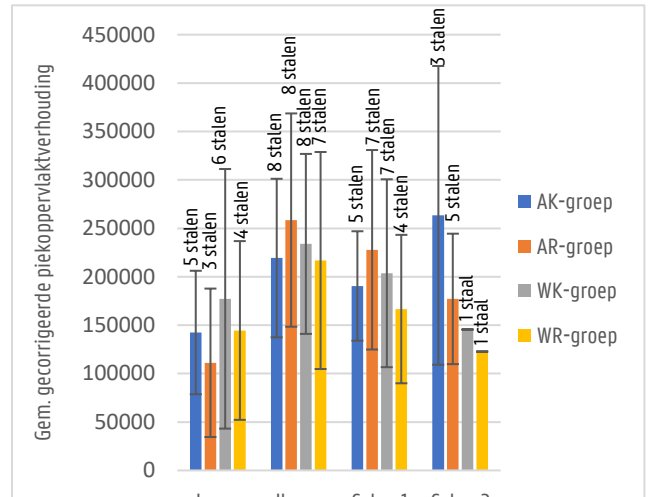


Figuur 4.10: Gemiddelde gecorrigeerde N³-methyladenine-concentratie (van de stalen waarin N³-methyladenine gedetecteerd werd, het aantal wordt weergegeven in de figuur) per dieet en weefseltype

De DNA-adducten O⁶-CMG en N⁷-methylguanidine werden respectievelijk in 11 stalen en 82 stalen teruggevonden. De concentratie kon niet bepaald worden, aangezien er geen bruikbare ijklijn is. Er werd echter wel een vergelijking gemaakt op basis van de gecorrigeerde piekoppervlakteverhoudingen. De gemiddelde gecorrigeerde piekoppervlakteverhoudingen per dieet en weefseltype worden weergegeven in Figuur 4.11 en 4.12.



Figuur 4.11: Gemiddelde gecorrigeerde O⁶-CMG-piekoppervlakteverhouding (van de stalen waarin O⁶-CMG gedetecteerd werd, het aantal wordt in de figuur weergegeven) van per dieet en weefseltype

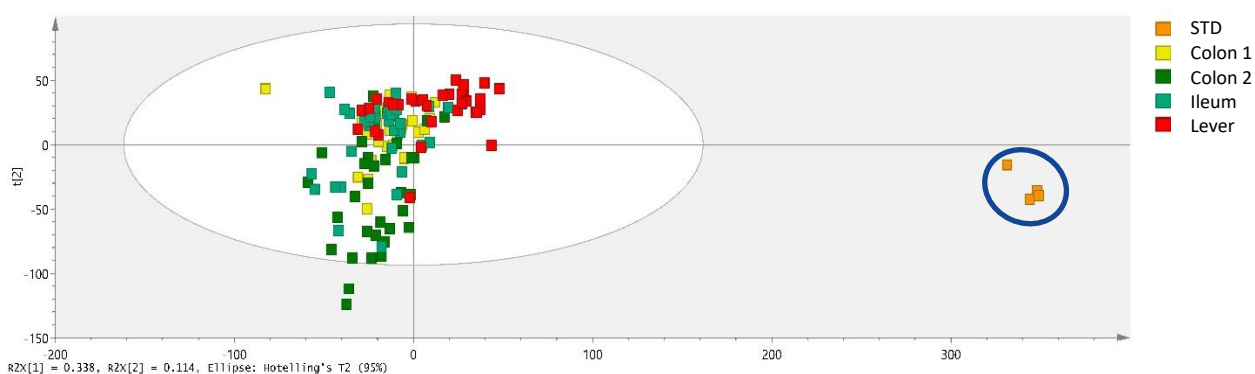


Figuur 4.12: Gemiddelde gecorrigeerde N⁷-methylguanidine-piekoppervlakteverhouding (van de stalen waarin N⁷-methylguanidine teruggevonden werd, het aantal stalen wordt in de figuur weergegeven) per dieet en weefseltype

In Figuur 4.11 is te zien dat in de leverstalen (waarin O⁶-CMG aanwezig was) van de rood (en verwerkt) vlees dieetgroepen een hogere piekoppervlakteverhouding hebben dan de stalen van de wit vlees (kip) dieetgroepen. In het ileumweefsels hebben alle stalen (waarin O⁶-CMG gedetecteerd werd) van dieetgroepen quasi een zelfde piekoppervlakteverhouding. In het 'colon 1' en 'colon 2' weefsel is er steeds maar 1 dieetgroep waarin O⁶-CMG gedetecteerd wordt, namelijk respectievelijk in WK-groep en in de WR-groep. N⁷-methylguanidine wordt in elke dieetgroep en in elk weefseltype gedetecteerd (zie Figuur 4.12). In alle weefsels is de piekoppervlakteverhouding van de WK-groep groter dan de WR-groep. In het ileum- en 'colon 1' weefsel is de piekoppervlakteverhouding van de stalen van de AK-groep lager dan AR-groep, bij de andere 2 weefsels is het omgekeerd.

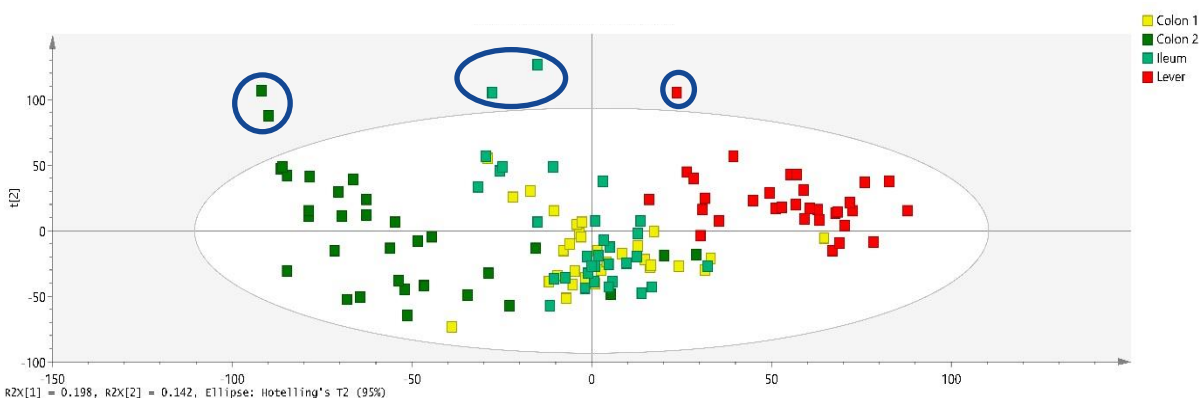
4.3.2. Niet-gerichte DNA-adductanalyse (DNA-adductomics)

Een PCA-X model en een OPLS-DA model werden op basis van alle ionen uit de Sieve™ software opgesteld. In het PCA-X model (zie Figuur 4.11) wordt de inherente clustering van de stalen van de vier weefsels (lever, colon proximaal (wordt verder als colon 1 benoemd), colon distaal (wordt verder als colon 2 benoemd) en ileum) op basis van hun DNA-adductoom gevisualiseerd. Visuele clustering van de mengsels van de kwaliteitscontrole (zie sectie 3.2) laat toe de stabiliteit van het systeem tijdens de analyse te beoordelen. De clustering van de standaarden (STD), die de stabiliteit van van het verloop van de analyse aantoont, wordt weergegeven in Figuur 4.13.



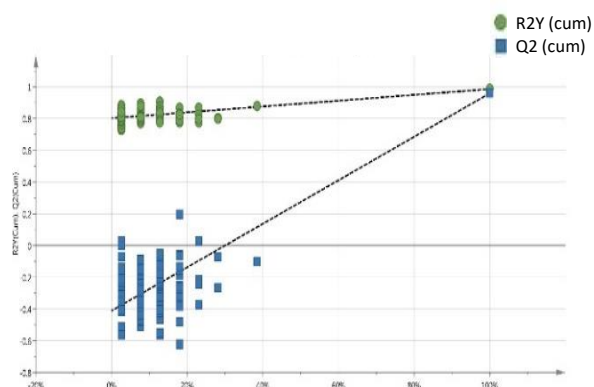
Figuur 4.13 : PCA-X plot van stalen van colon proximaal (colon 1), colon distaal (colon 2), ileum en lever met weergave van de standaarden (STD)

In Figuur 4.14 wordt het PCA-X model zonder de mengsels opgesteld, in deze figuur is te zien dat de vier verschillende weefsels clusteren en er 5 uitbijters aanwezig zijn.



Figuur 4.14: PCA-X plot van stalen van colon proximaal (colon 1), colon distaal (colon 2), ileum en lever met aanduiding (blauwe cirkels) van de uitbijters

De OPLS-DA modellen op basis van alle ionen van het massaspectrum werden gemaakt met als doel de verschillen in het DNA-adductoom na consumptie van rood (en verwerkt) vlees vs. wit (kip) vlees en een westers dieet vs. een aanbevolen dieet in kaart te brengen en te bestuderen. Eerst werd de validiteit van de OPLS-DA modellen geëvalueerd a.d.h.v. volgende karakteristieken: de R^2X , R^2Y , Q^2 , de CV-anova (p-waarde < 0,05) en de permutatietest. Het resultaat van de permutatietest voldoet aan de voorwaarden indien alle blauwe Q^2 -waarden links lager zijn dan het oorspronkelijke punt rechts en de blauwe regressielijn de verticale as, door of onder 0, kruist (Figuur 4.15).



Figuur 4.15 Permutatietest die voldoet aan de voorwaarden

In Tabellen 4.2, 4.3, 4.4 en 4.5 worden de bekomen modelkarakteristieken weergegeven. Er zijn zes modellen per weefseltype, waarbij er telkens twee groepen met elkaar vergeleken worden: rood (en verwerkt) versus wit vlees (kip) (R vs K), rood (en verwerkt) vlees in combinatie met een aanbevolen dieet versus een westers dieet (R: A vs W), wit vlees (Kip) in combinatie met een aanbevolen dieet versus een westers dieet (K: A vs W), een aanbevolen dieet versus een westers dieet (A vs W), een aanbevolen dieet in combinatie met rood (en verwerkt) vlees versus wit vlees (Kip) (A: R vs K) en een westers dieet in combinatie met rood (en verwerkt) vlees versus kip (wit vlees) (W: R vs K).

Tabel 4.2: Karakteristieken van de OPLS-DA levermodellen

	R vs K	R: A vs W	K: A vs W	A vs W	A: R vs K	W: R vs K
A	1 + 3 + 0	1+2+0	1 + 3 + 0	1 + 3 + 0	1 + 3 + 0	1 + 3 + 0
R^2X	0,483	0,403	0,498	0,425	0,532	0,586
R^2Y	0,93	0,981	0,996	0,965	0,985	0,984
Q^2	-0,196	0,141	0,12	-0,151	-0,277	-0,134
CV Anova	1	0,95	0,99	1	1	1
Permutatie	Niet ok	Niet ok	Niet ok	Niet ok	Niet ok	Niet ok

Tabel 4.3 : Karakteristieken van de OPLS-DA ileummodellen

	R vs K	R: A vs W	K: A vs W	A vs W	A: R vs K	W: R vs K
A	1 + 3 + 0	1 + 4 + 0	1 + 3 + 0	1 + 3 + 0	1 + 3 + 0	1 + 3 + 0
R^2X	0,451	0,603	0,514	0,453	0,569	0,549
R^2Y	0,974	1	0,997	0,944	0,992	0,995
Q^2	-0,644	-0,169	-0,324	-0,442	-0,238	-0,279
CV Anova	1	1	1	1	1	1
Permutatie	Niet ok	Niet ok	Niet ok	Niet ok	Niet ok	Niet ok

Tabel 4.4: Karakteristieken van de OPLS-DA 'colon proximaal (colon 1) modellen

	R vs K	R: A vs W	K: A vs W	A vs W	A: R vs K	W: R vs K
A	1+4+0	1+5+0	1+3+0	1+3+0	1+2+0	1+3+0
R ² X	0,581	0,731	0,569	0,532	0,467	0,665
R ² Y	0,99	1	0,996	0,973	0,969	0,988
Q ²	-0,235	-0,0297	-0,272	-0,406	-0,466	-0,0918
CV Anova	1	1	1	1	1	0,99
Permutatie	Niet ok	Niet ok	Niet ok	Niet ok	Niet ok	Niet ok

Tabel 4.5: Karakteristieken van de OPLS-DA 'colon distaal (colon 2)' modellen

	R vs K	R: A vs W	K: A vs W	A vs W	A: R vs K	W: R vs K
A	1+3+0	1+2+0	1+3+0	1+2+0	1+5+0	1+3+0
R ² X	0,326	0,365	0,376	0,276	0,623	0,463
R ² Y	0,991	0,984	0,999	0,926	1	0,998
Q ²	-0,77	-0,36	-0,282	-0,547	-0,402	-0,973
CV Anova	1	1	1	1	1	1
Permutatie	Niet ok	Niet ok	Niet ok	Niet ok	Niet ok	Niet ok

Aangezien er geen OPLS-DA model op basis van alle ionen uit het massaspectrum gevalideerd konden worden (zie sectie 5.3), werden, in een volgende stap, de meest discriminerende ionen geselecteerd (Jack-knifed interval > 0, VIP > 1 en p(corr) en p-waarden (zie sectie 3.4.5.2)) om de modellen te verfijnen. Op basis van de geselecteerde discriminerende ionen werd een nieuw model gebouwd en, indien mogelijk, gevalideerd. De geselecteerde discriminerende ionen en de karakteristieken van de OPLS-DA modellen worden hieronder per weefsel weergegeven. De OPLS-DA modellen van de vergelijking rood (en verwerkt) vlees versus wit vlees (kip) worden per weefsel voorgesteld. De overige OPLS-DA modellen en de S-plots kunnen teruggevonden worden in BIJLAGE VI in Figuur 22 t.e.m. 25.

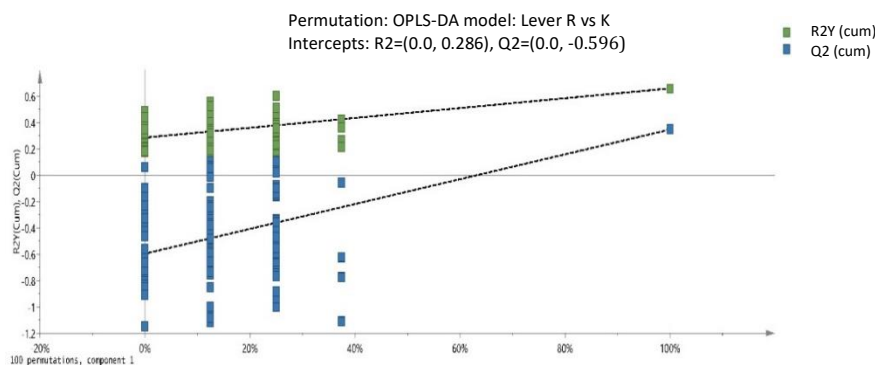
4.3.2.1. OPLS-DA modellen op basis van discriminerende ionen in het leverweefsel

In Tabel 4.6 worden de karakteristieken van de levermodellen weergegeven.

Tabel 4.6: Karakteristieken van de OPLS-DA levermodellen op basis van de geselecteerde discriminerende ionen

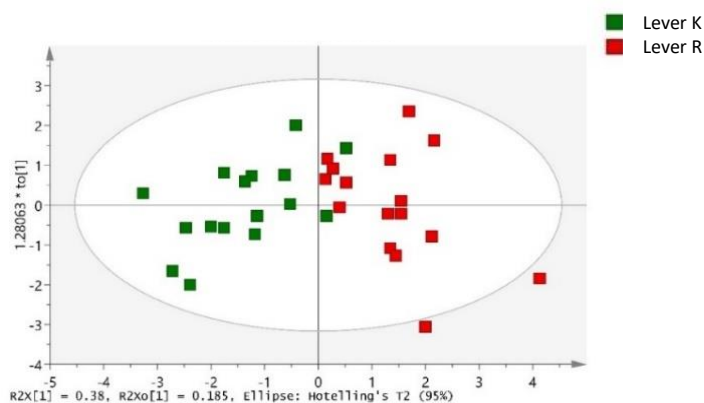
	R vs K	R: A vs W	K: A vs W	A vs W	A: R vs K	W: R vs K
A	1+3+0	1+1+0	1+1+0	1+1+0	1+1+0	1+4+0
R ² X	0,69	0,68	0,666	0,688	0,73	0,868
R ² Y	0,659	0,86	0,861	0,613	0,823	0,969
Q ²	0,347	0,67	0,703	0,476	0,676	0,826
CV-Anova	0,20	0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,04
Permutatie	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal

Als voorbeeld van een permutatietest, wordt Figuur 4.16 gegeven. Er is te zien dat alle blauwe Q^2 -waarden links lager zijn dan het oorspronkelijke punt rechts en de blauwe regressielijn de verticale as door 0 kruist. Er is echter wel overlap tussen de R^2 -waarden (groen) en de Q^2 -waarden (blauw). De permutatietesten van de andere OPLS-DA modellen zijn gelijkaardig.



Figuur 4.16: Resultaat van de permutatietest van het OPLS-DA model “Rood vlees versus wit vlees (kip)” in de leverstalen.

In de OPLS-DA modellen van de leverstalen werd er telkens een vergelijking gemaakt tussen twee groepen. In het OPLS-DA model “Lever R vs K” werd er bijvoorbeeld een vergelijking gemaakt tussen leverstalen van biggen die rood (en verwerkt) vlees kregen en leverstalen van biggen die wit vlees (kip) kregen (zie Figuur 4.17). In de meeste modellen is er te zien dat de twee groepen, die vergeleken worden, onderling clusteren (zie in BIJLAGE VI: Figuur 2, 3, 4, 5 en 6).



Figuur 4.17: Het OPLS-DA model “Rood vlees versus wit vlees (kip)” in de leverstalen.

De geselecteerde discriminerende ionen, die gebruikt werden om de nieuwe OPLS-DA modellen op te bouwen, worden opgelijst in Tabel 4.7 en in Tabel 7 t.e.m. 11 in BIJLAGE V. In de gevalideerde modellen (zie sectie 5.3) werd nagegaan in welke stalen de ionen het meest voorkomen om na te gaan in welke groep stalen deze ionen discriminerend zijn. Aangezien het ‘rood versus wit vlees’ en ‘aanbevolen versus westers’ levermodellen niet

gevalideerd werden, werd er niet nagegaan voor welke dieetgroep de ionen discriminerend zijn. Bovendien werd er enkel door de Sieve™ een chemische formule voorgesteld.

Tabel 4.7: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "Lever R vs K" (rood vlees vs. wit vlees (kip))model

	+/- modus	RT (min)	m/z	Voorgestelde chemische formule
1	+	1,09	234,9944	
2	+	5,24	219,1488	C13H19O1N2
3	+	2,28	312,0416	
4	+	3,04	391,1812	C9H28O7N8P1
5	+	1,35	397,2177	
6	+	4,71	446,2223	
7	+	1,56	527,1978	C12H35O10N9P2
8	-	1,25	343,1294	
9	-	1,07	402,0689	
10	-	0,99	532,3107	

^a Retentietijd = RT

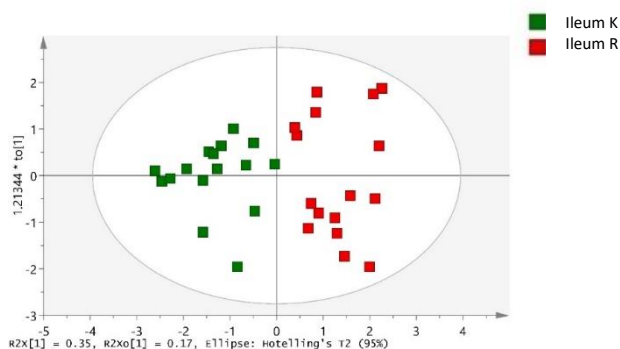
4.3.2.2. OPLS-DA modellen op basis van discriminerende ionen in het ileumweefsel

In Tabel 4.8 worden de karakteristieken van de ileummodellen, die allen gevalideerd konden worden, weergegeven. De permutatietesten (zoals voorbeeld bij het leverweefsel) voldoen aan de voorwaarden, er is echter wel overlap in de R²-waarden en de Q²-waarden.

Tabel 4.8 Karakteristieken van OPLS-DA ileummodellen op basis van geselecteerde discriminerende ionen

	R vs K	R: A vs W	K: A vs W	A vs W	A: R vs K	W: R vs K
A	1+2+0	1+3+0	1+2+0	1+4+0	1+2+0	1+5+0
R ² X	0,63	0,701	0,773	0,886	0,707	0,908
R ² Y	0,791	0,979	0,916	0,781	0,926	0,987
Q ²	0,507	0,764	0,72	0,62	0,733	0,887
CV-Anova (P-waarde)	< 0,01	0,04	0,04	0,01	0,03	0,03
Permutatie	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal

In Figuur 4.18 wordt het OPLS-DA model van de vergelijking tussen rood (en verwerkt) en wit vlees weergegeven. De overige OPLS-DA modellen worden weergegeven in BIJLAGE VI: Figuur 7 t.e.m. 11.



Figuur 4.18: Het OPLS-DA model "Rood vlees versus wit vlees (kip)" in de ileumstalen

De geselecteerde discriminerende ionen, die gebruikt werden om de nieuwe OPLS-DA modellen op te bouwen worden in Tabel 4.9 en Tabel 12 t.e.m. 16 in BIJLAGE V weergegeven. Bij deze ionen werd ook nagegaan voor/in welke dieetgroep ze discriminerend zijn. Bovendien werd er getracht om de chemische formule van de geselecteerde discriminerende ionen te achterhalen. Dit werd enkel bepaald voor het model van de vergelijking tussen rood (en verwerkt) en wit vlees. (zie Tabel 4.9)

Tabel 4.9: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "ileum R vs K" model (rood vs. wit vlees (kip))

	+/- modus	RT (min)	m/z	Voorgestelde chemische formule	Chemische formule (Qual software™)	Discriminerend in/voor
1	+				C18H11010N7S; C19H17015S; C11H2706N5S6; C12H25012N2S4; C12H25012N2S4; C18H1909N3S3 of C17H1304N10S3	R
2	+	1,02	517,0287		C13H2302N2 of C11H210N5	R
3	+	1,06	239,1747			K
4	+	3,9	241,0914			/
5	+	3,05	282,9367			K
6	+	1,02	362,7566			K
7	+	1,32	388,9009			/
8	+	1,03	434,7792			/
9	+	1,03	517,0287			R
10	-	1	176,9925	C1H8010N8P2		R
11	-	0,94	196,8463			/
12	-	2,2	297,0726			R
	-	4,94	348,9287			/

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

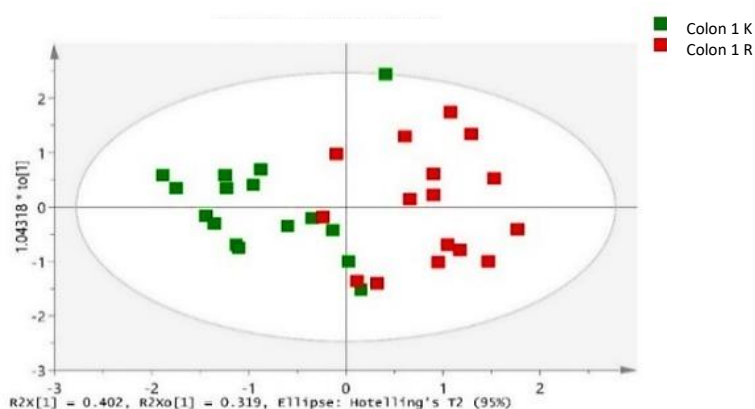
4.3.2.3. OPLS-DA modellen op basis van discriminerende ionen in het 'colon 1' weefsel

De karakteristieken van de 'colon 1' modellen worden weergegeven in Tabel 4.10. Alle modellen konden gevalideerd worden. De permutatietesten (zie permutatietest bij de levermodellen) voldoen aan de voorwaarden, hoewel er wel overlap is tussen de R^2 -waarden en de Q^2 -waarden.

Tabel 4.10: Karakteristieken van OPLS-DA 'colon 1' modellen op basis van discriminerende en geselecteerde ionen

	R vs K	R: A vs W	K: A vs W	A vs W	A: R vs K	W: R vs K
A	1+1+0	1+3+0	1+2+0	1+1+0	1+3+0	1+2+0
R^2X	0,712	0,642	0,694	0,512	0,749	0,557
R^2Y	0,649	0,993	0,942	0,742	0,956	0,951
Q^2	0,549	0,919	0,785	0,517	0,792	0,74
CV-Anova (P-waarde)	< 0,01	< 0,01	0,01	< 0,01	0,03	0,03
Permutatie	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal

In Figuur 4.19 wordt het OPLS-DA model van de 'colon 1' stalen van biggen die rood (en verwerkt) of wit vlees kregen, weergegeven. De overige modellen zijn terug te vinden in BIJLAGE VI (Figuur 12 t.e.m. 16) In elk model is er te zien dat er twee clusters van de twee groepen, die vergeleken worden, aanwezig zijn. In sommige modellen ("Colon 1 R vs K" en "Colon 1 A vs W) is er overlap tussen de clusters.



Figuur 4.19: Het OPLS-DA model "Rood vlees versus wit vlees (kip)" in de colon proximaal (colon 1) stalen

De discriminerende en geselecteerde ionen, die gebruikt werden om de nieuwe OPLS-DA modellen op te bouwen, worden opgelijst in Tabel 4.11 en Tabel 17 t.e.m. 21 in BIJLAGE V. Bovendien werd er getracht om de chemische formule van de geselecteerde discriminerende ionen te achterhalen. Dit werd enkel bepaald voor het model van de vergelijking tussen rood (en verwerkt) en wit vlees. (zie Tabel 4.11)

Tabel 4.11: Geselecteerde discriminerende ionen van het "colon proximaal R vs K" model (rood vs. wit vlees)

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Chemische formule (Qual software™)	Discriminerend in/voor
1	+	1,76	281,0329	C3H16O5N4P3		R
2	+	2,25	299,0545	C2H18O5N6P3		R
3	+	3,83	326,1458			/
	-				C8H11O11N5; C22H9O5; C21H3N7; C9H7O7N9; C10H13O12N2; C7H15O15N; C6H9O10N8; C20H7O4N3 of C25H7O2N	
4	-	1,07	353,0045		C2H7O14N7; C16H5O8N2; C17H04N6; C4H9O15N4 of H5O13N10	/
5		0,93	353,0045			/

^a Niet discriminerend voor een bepaald dieet = /

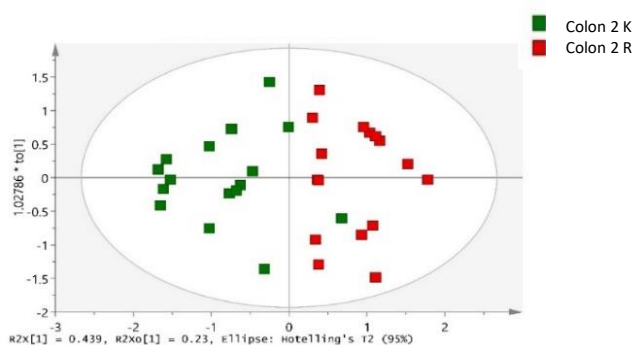
4.3.2.4. OPLS-DA modellen op basis van discriminerende ionen in het 'colon 2' weefsel

De validiteit van de OPLS-DA modellen op basis van de discriminerende en geselecteerde ionen in de 'colon 2' stalen werd nagegaan a.d.h.v. de karakteristieken die weergegeven worden in Tabel 4.12. De permutatietesten (zoals de permutatietest in het leverweefsel) voldoen aan de voorwaarden. Er is echter wel overlap tussen de R²-waarden en de Q²-waarden.

Tabel 4.12: karakteristieken van 'colon 2' modellen op basis van discriminerende en geselecteerde ionen

	R vs K	R: A vs W	K: A vs W	A vs W	A: R vs K	W: R vs K
A	1+1+0	1+3+0	1+3+0	1+3+0	1+5+0	1+2+0
R ² X	0,669	0,694	0,826	0,785	0,871	0,764
R ² Y	0,684	0,963	0,962	0,685	0,991	0,912
Q ²	0,51	0,799	0,816	0,554	0,887	0,747
CV Anova	< 0,01	0,02	0,02	< 0,01	0,03	0,02
Permutatie	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal	Niet optimaal

In Figuur 4.20 wordt het OPLS-DA model van de vergelijking rood (en verwerkt) versus wit vlees weergegeven (andere modellen zie BIJLAGE VI: Figuur 17 t.e.m. 21). In elk model is er te zien dat er twee clusters van de twee groepen, die vergeleken worden, aanwezig zijn. In model "Colon 2 R vs K" is er een staal van de K-groep dat in de cluster van R-groep valt. In het "Colon 1 A vs W" model is dit ook het geval.



Figuur 4.20: Het OPLS-DA model "Rood vlees versus wit vlees (kip)" in de colon distaal (colon 2) stalen

De geselecteerde discriminerende ionen, die gebruikt werden om de nieuwe OPLS-DA modellen op te bouwen, worden opgelijst in Tabel 4.13 en Tabel 22 t.e.m. 26 in BIJLAGE V. Bovendien werd er geprobeerd om de chemische formule van de geselecteerde discriminerende ionen te achterhalen. Dit werd enkel bepaald voor het model van de vergelijking tussen rood (en verwerkt) en wit vlees. (zie Tabel 4.13)

Tabel 4.13 : Geselecteerde discriminerende en geselecteerde ionen (+/- modus) van het "colon distaal R vs K" model (rood versus wit vlees)

	+/- modus	RT (min)	m/z	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/ voor	
1	+	1,17	170,9805		C6H5ONS2 of C5H06N	R
2	+	1,86	320,8964			R
3	-	1,55	154,032	C4H12O2P2		/
	-				CH5O14N2; C2H010N6 of C13H07 ;C4H3011N3 of C6H5O12; C7H08N4 of C9H309; C5H309N;	
4		1,81	268,9976	C1H12O6N4P3	C5H3012N; C12H06N2	K

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

5. DISCUSSIE

5.1. OPTIMALISATIE VAN DNA-ADDUCTEXTRACTIE

Bij de vergelijking van de 4 protocollen op basis van adenine en guanine, is geen enkel protocol consequent beter dan de andere protocollen. Bovendien kan in de meeste vergelijkingen tussen de protocollen geen significant verschil aangetoond worden op basis van adenine en guanine. Er zijn tussen de protocollen geen grote verschillen in de gemiddelde piekoppervlakteverhoudingen van de componenten O⁶-methylguanine en CroG aanwezig. Er kan eveneens geen significant verschil tussen de protocollen voor de extractie van O⁶-methylguanine en CroG aangetoond worden. Er kan besloten worden dat het uitvoeren van een extra pH-neutralisatiestap en/of een wasstap geen noemenswaardige invloed heeft op de efficiëntie van de DNA-adductextractie. Er wordt daarom gekozen om de DNA-adductextractie van de varkensstalen uit te voeren met een ongewijzigd protocol, beschreven door Vanden Bussche et al. [59].

5.2. VARKENSPROEF

5.2.1. Gerichte DNA-adductanalyse

Enkel de ijklijnen van M₁G, CroG, O⁶-methylguanine en N³-methyladenine ($R^2 > 0,98$) kunnen gebruikt worden om deze DNA-adducten in de varkensstalen kwantitatief te bepalen. Bij de gekende DNA-adducten wordt er gekeken naar de stalen waarin een DNA-adduct aanwezig is. Er werd geen statistiek uitgevoerd op de bekomen resultaten wegens te weinig stalen waarin de DNA-adducten gedetecteerd werden. Een correctere manier zou zijn (indien de concentraties van de DNA-adducten in de stalen bepaald kunnen worden) om concentraties in de stalen waarin geen DNA-adducten gedetecteerd werden, gelijk te stellen aan de detectielimiet van het DNA-adduct (LOD)/2 (mits deze gekend is). Vervolgens kunnen de gemiddelden van de concentraties in de stalen van de verschillende groepen bepaald worden, om dan op basis van deze gemiddelden een vergelijking tussen de verschillende diëten te maken. In deze masterproef kon de concentratie niet altijd bepaald worden (cf. supra). Bovendien is de LOD van N³-methyladenine en N⁷-methylguanine niet gekend.

M₁G is een DNA-adduct dat kan ontstaan indien malondialdehyde (een lipide peroxidatie product) bindt aan guanine in het DNA. Malondialdehyde kan endogeen of dieet-gerelateerd (o.a. heemrijk vlees) gevormd worden. [43][66]. In deze varkensproef kon in 9 van de 128 stalen M₁G gedetecteerd worden. In de lever- en ileumstalen wordt er enkel M₁G gedetecteerd in de rood (en verwerkt) vlees dieetgroepen. In de stalen van het proximale colon waarin M₁G gedetecteerd werd, is een verschil aanwezig tussen de westers-rood (en verwerkt) vlees dieetgroep en de

westers-wit vlees (kip) dieetgroep. Het eten van rood (en verwerkt) vlees zou (op basis van deze resultaten) zorgen voor een verhoogde vorming van M₁G in het proximale colon. In het distale colon hebben de stalen van de wit vlees dieetgroep en de rood (en verwerkt) dieetgroep een even hoge concentratie (rekening houdend met de standaarddeviatie). In de stalen waarin M₁G gedetecteerd werd is er wel een trend te zien waarbij M₁G voornamelijk in de stalen van rood vlees diëten gevormd wordt. Er wordt echter een vergelijking gemaakt op basis van een selectie van stalen, waardoor een algemene conclusie niet gemaakt kan worden.

Het volgende DNA-adduct is CroG, dat ontstaat wanneer crotonaldehyde (een lipide peroxidatie product) bindt aan guanine in het DNA. [43] In de studie van L.Y Hemeryck et al. [41] werden verhoogde concentraties CroG gevonden in ratten die rundsvlees (rood vlees) gegeten hadden. In deze varkensproef werd in 24 stalen CroG gevonden. CroG is voornamelijk gedetecteerd in de lever en in mindere mate in het ileum en het colon proximaal. Er is een trend te zien waarbij de stalen van de aanbevolen rood-vlees dieetgroepen een hogere concentratie hebben dan de stalen van de aanbevolen wit vlees dieetgroepen. Deze trend geldt voor een selectie van de stalen. Er kan hieruit geen algemeen besluit genomen worden.

O⁶-methylguanine is het derde DNA-adduct waarnaar gezocht werd tijdens de gerichte DNA-adductanalyse. De vorming van O⁶-methylguanine is geassocieerd met de vorming van N-nitroso verbindingen. Het DNA-adduct ontstaat door methylatie van guanine in het DNA, wat gelinkt kan worden aan de alkylatie door N-nitroso verbindingen. Eerder werd het DNA-adduct reeds aangeduid als een potentiële merker voor de consumptie van rood vlees. [43][68] In de varkensproef zijn er 9 stalen van de 128 stalen waarin O⁶-methylguanine gedetecteerd werd. Er kon echter maar in 1 staal (lever: aanbevolen-wit vlees (kip)) een concentratie bepaald worden a.d.h.v. de ijklijn. In de overige stalen kan enkel vermeld worden dat de concentraties lager dan 0,05 ng/mL zijn. De verklaring hiervoor is dat de piekoppervlakteverhoudingen van O⁶-methylguanine in de overige 8 stalen niet binnen de range van de ijklijn vallen. Er wordt daarom gekeken naar de gecorrigeerde piekoppervlakteverhoudingen van de stalen waarin O⁶-methylguanine gedetecteerd werd. In de stalen is geen trend te zien dat O⁶-methylguanine voornamelijk in de stalen van biggen die rood (en verwerkt) vlees kregen, gevormd wordt. Dit is echter voor een selectie van stalen. Er kan geen algemeen conclusie getrokken worden.

N³-methyladenine is het laatste DNA-adduct dat kwantitatief bepaald werd. In de literatuur is nog niet veel gekend over dit DNA-adduct. Slechts in 5 stalen van het distale colon werd in deze proef N³-methyladenine teruggevonden. De stelling dat N³-methyladenine voornamelijk in het colon distaal gevormd wordt, kan statistisch

niet bevestigd worden. Binnen in het colon distaal weefsel zijn er twee dieetgroepen waarin N³-methyladenine gedetecteerd werd, namelijk de aanbevolen-rood (en verwerkt) vlees dieetgroep en de westers-wit vlees (kip) groep. De concentratie in de (selectie van) stalen van de westers-kip groep is groter dan in de stalen van de aanbevolen-rood (en verwerkt) vlees groep. Door het beperkte aantal stalen is verder onderzoek aangewezen voor dit DNA-adduct.

De vorming van O⁶-carboxymethylguanine is gelinkt aan de vorming van N-nitroso verbindingen. Eerdere studies hebben aangetoond dat het eten van heemrijk rood vlees kan zorgen voor verhoogde productie van dit DNA-adduct. [43][66]. In 11 stalen kon O⁶- carboxymethylguanine teruggevonden worden. Op basis van deze stalen is er geen duidelijk verschil in de vorming van O⁶- carboxymethylguanine aanwezig tussen de verschillende diëten (gelijkaardige gecorrigeerde piekoppervlakteverhouding).

Het DNA-adduct N⁷-methylguanine werd teruggevonden in de 82 stalen. Dit DNA-adduct is minder bestudeerd in de literatuur. Er werd gekeken naar de gecorrigeerde piekoppervlakteverhouding. Deze verhouding is het laagst in de (selectie van) leverstalen. In de (selectie van) stalen van de overige weefsels is de piekoppervlakteverhouding gelijkaardig. De stalen van de 4 diëten binnen in het ileum, het colon proximaal en het colon distaal hebben een gelijkaardige gecorrigeerde piekoppervlakteverhouding. In de selectie van de stalen is er dus geen trend te zien waarbij N⁷-methylguanine in een bepaalde groep meer gevormd wordt. Voor dit DNA-adduct is verder onderzoek vereist.

5.2.2. Niet-gerichte DNA-adductanalyse (DNA-adductomics)

Het PCA-X model wordt gebruikt voor een eerste visuele beoordeling om de variabiliteit binnen de stalen na te gaan, ter controle van het verloop van de analyse en van de aanwezigheid van uitbijters. Er zijn 4 clusters van de 4 weefseltypes te zien in het PCA-X model. De clusters van het colon proximaal en het ileum liggen dicht bij elkaar, terwijl de clusters van de lever en het colon distaal duidelijker van elkaar te onderscheiden zijn. Dit onderscheid kan verklaard worden door het feit dat de lever en het colon distaal qua anatomische samenstelling meer verschillen van elkaar dan dat het colon proximaal en het ileum van elkaar verschillen. Het verloop van de analyse wordt gecontroleerd aan de hand van de posities van de standaarden in het plot, waaruit blijkt dat het verloop stabiel was.

De meeste karakteristieken van de OPLS-DA modellen op basis van alle ionen uit het massaspectrum voldoen niet aan de voorwaarden en kunnen bijgevolg niet gevalideerd worden. Er werden daarom nieuwe OPLS-DA modellen gemaakt op basis van de geselecteerde discriminerende ionen (Jack-knifed interval > 0, VIP > 1 en p(corr) en p-

waarden (zie 3.4.5.2.)). De karakteristieken R^2X , R^2Y en Q^2 zijn voor elk model groter dan 0,5, behalve bij de Q^2 waarden van model 'lever: rood versus wit (kip) vlees' en model 'lever: aanbevolen versus westers dieet'. De p-waarde voldoet telkens aan het criterium, behalve bij 'lever: rood versus wit (kip) vlees'. De permutatietesten van de OPLS-DA modellen zijn niet optimaal, maar de andere bovenvermelde parameters (met uitzondering van de twee modellen (cf. supra)) wel. Alle modellen kunnen gevalideerd worden, behalve de twee bovenstaande modellen. Hierbij toont elk model op basis van de geselecteerde discriminerende ionen een verschil aan tussen de twee groepen.

Er werd in een volgende stap nagegaan welke ionen (DNA-adducten) gelinkt kunnen worden aan een bepaald dieet, door de aanwezigheid van de ionen in de verschillende dieetgroepen na te gaan. Er waren ionen die discriminerend waren voor een bepaald dieet. Het ion met een m/z -waarde van 535,9809 en een retentietijd van 0,89 min werd tweemaal gedetecteerd in de lever voor het westers-rood (en verwerkt) vlees dieet. Het ion met een m/z -waarde van 362,7566 en een retentietijd van 1,02 min, het ion met een m/z -waarde van 202,0614 en een retentietijd van 3,14 min, het ion met een m/z -waarde van 335,0627 en een retentietijd van 0,99 min en het ion met een m/z -waarde van 422,8483 en een retentietijd van 0,82 min werden in het ileum telkens tweemaal gelinkt aan respectievelijk een wit vlees (kip)-dieet, een westers dieet, een westers-wit vlees (kip) dieet en een westers-wit vlees (kip) dieet.

Mogelijke ionen die discriminerend zijn in het colon proximaal voor een rood (en verwerkt) vlees dieet en een aanbevolen dieet zijn respectievelijk het ion met een m/z -waarde van 281,0329 en een retentietijd van 1,76 min en het ion met een m/z -waarde van 192,0564 en een retentietijd van 4,92 min. Het ion met een m/z -waarde van 320,8964 en een retentietijd van 1,86 min en het ion met een m/z -waarde van 286,0679 en een retentietijd van 4,98 min kunnen mogelijke biomerkers zijn voor respectievelijk een rood (en verwerkt) vlees dieet en een westers-rood (en verwerkt) vlees dieet in het colon distaal. Er waren ook enkele ionen die discriminerend waren voor een dieet in meerdere weefsels. Het ion met een m/z -waarde van 366,9331 en een retentietijd van 2,82 min, het ion met een m/z -waarde van 355,0627 en een retentietijd van 0,99 min, het ion met een m/z -waarde van 286,0679 en een retentietijd van 4,98 min en het ion met een m/z -waarde van en een retentietijd van 0,89 min zijn mogelijks discriminerend voor respectievelijk een aanbevolen-rood(en verwerkt) vlees dieet (in ileum en colon proximaal), een westers dieet (ileum en colon proximaal), een rood (en verwerkt) vlees dieet (colon proximaal en distaal) en een westers-wit vlees (kip) dieet (colon proximaal en distaal).

Finaal werd ook getracht om de chemische formule van de ionen (DNA-adducten) te bepalen. In de resultaten worden de chemische formules (van de ionen van rood (en verwerkt) versus wit vlees vergelijking) die bepaald konden worden, weergegeven. Aangezien de piekoppervlakte van de C12-component telkens relatief laag was, kon de piek van het C13-isotoop van de component niet teruggevonden worden. Hierdoor kon het aantal koolstoffen in de verbinding niet berekend worden en kon de chemische formule niet bevestigd worden. Voor sommige componenten werden wel chemische formules voorgesteld. Er werd getracht om m.b.v. in-house database de chemische formules te identificeren. Er kon echter geen voorstel tot identificatie gedaan worden. Voorlopig is dus enkel de retentietijd en m/z -waarde van de ionen bekend. Bijkomend onderzoek zal nodig zijn om de mogelijke DNA-adducten te identificeren en om het eventuele verband met de ontwikkeling van CRK te verklaren.

6. CONCLUSIES

Uit de resultaten van de gerichte analyse is gebleken dat de gekende DNA-adducten teruggevonden kunnen worden in de varkensstalen. Zo wordt M₁G in 9 van de 128 stalen teruggevonden, CroG in 24 stalen, O⁶-methylguanine in 9 stalen, N³-methyladenine in 5 stalen, O⁶-CMG in 11 stalen en N⁷-methylguanine in 82 stalen. Er waren echter te weinig stalen die deze DNA-adducten in een concentratie boven de detectielimiet bevatten en bijgevolg was het niet mogelijk om de verschillen tussen de diëten statistisch te bevestigen. Daarom kan noch geconcludeerd noch bevestigd worden dat deze gekende DNA-adducten voornamelijk in een bepaald weefsel of bij de consumptie van rood (en verwerkt) vlees en/of een westers dieet gevormd worden.

Uit de resultaten van de DNA-adductomics is gebleken dat naast de gekende DNA-adducten andere DNA-adducten gevormd werden. Er waren ionen/DNA-adducten die specifiek aanwezig waren in een bepaald dieet. Elk dieet kan leiden tot vorming van bepaalde DNA-adducten. Er moet echter opgemerkt worden dat een DNA-adduct sneller hersteld kan worden waardoor het geen schade aanricht. Bovendien zorgt niet elk DNA-adduct voor mutaties waardoor dit niet altijd leidt tot de ontwikkeling van kanker in de weefsels. Er werd getracht om de DNA-adducten te identificeren, maar door de lage concentratie was dit niet altijd mogelijk. Voor sommige componenten werden wel chemische formules voorgesteld. Na koppeling met de in-house database kon echter geen voorstel tot identificatie gedaan worden. Voorlopig zijn enkel de retentietijd en *m/z*-waarde van de ionen/DNA-adducten bekend.

Uit de literatuur kan besloten worden dat de consumptie van rood (en verwerkt) vlees kan leiden tot een verhoogd risico op de ontwikkeling van CRK. De resultaten uit deze masterproef tonen aan dat in de varkensstalen van de 4 diëten DNA-adducten gevormd worden. De verschillen tussen rood (en verwerkt) en wit vlees kunnen echter niet statistisch bevestigd worden. Naast de DNA-adducten uit de gerichte analyse zijn er nog andere DNA-adducten aanwezig die mogelijks discriminerend zijn voor rood (en verwerkt) vlees dieet. Er is bijkomend onderzoek nodig om de ongekende DNA-adducten verder te identificeren, het ontstaan van deze DNA-adducten te linken aan het dieet en hun rol in de ontwikkeling van CRK op te helderen. Een studie waarbij volwassen varkens een aanbevolen of westers dieet in combinatie met rood (en verwerkt) vlees of wit vlees krijgen gedurende 4 weken, zou het onderzoek gunstig kunnen beïnvloeden. Volwassen varkens zijn immers langer blootgesteld aan voedsel en andere stoffen uit de omgeving (ze hebben een hogere baseline) dan biggen. Bovendien kunnen biggen een grote turnover hebben, waardoor schade sneller hersteld kan worden.

7. LITERATUURLIJST

- [1] stichting tegen Kanker, "colorectale kanker of dikkedarmkanker - algemeen." [Online]. Available: https://www.kanker.be/alles-over-kanker/alle-types-kanker/colorectale-dikkedarmkanker?gclid=CjwKCAiAqt7jBRACeiwAof2uK4lfDL2-zo0SeQrxOV-4fiCHzx7nCaBQ2-NjLSZK2qz_ORt2kpTXUBoCtMUQAvD_BwE. [Accessed: 01-Mar-2019].
- [2] "Kanker - de betekenis volgens Bas Vreugdenhil," 2014. [Online]. Available: <https://www.ensie.nl/bas-vreugdenhil/kanker>. [Accessed: 05-Mar-2019].
- [3] G. M. Cooper, "The Development and Causes of Cancer," 2000.
- [4] S. A. FRANK, "History of Theories," *Dyn. Cancer*, pp. 51–74, 2018.
- [5] D. Demeyer, B. Mertens, S. De Smet, and M. Ulens, "Mechanisms Linking Colorectal Cancer to the Consumption of (Processed) Red Meat: A Review," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 56, no. 16, pp. 2747–2766, 2016.
- [6] K. Simon, "Colorectal cancer development and advances in screening.," *Clin. Interv. Aging*, vol. 11, pp. 967–76, 2016.
- [7] F. Stracci, M. Zorzi, and G. Grazzini, "Colorectal Cancer Screening: Tests, Strategies, and Perspectives," *Front. Public Heal.*, 2014.
- [8] "Uitnodiging en test - Dikkedarm Kanker." [Online]. Available: <https://dikkedarmkanker.bevolkingsonderzoek.be/nl/uitnodiging-en-test>. [Accessed: 19-Apr-2019].
- [9] V. Overheid, "bevolkingsonderzoek dikkedarmkanker." [Online]. Available: <https://www.vlaanderen.be/nl/gezin-welzijn-en-gezondheid/gezondheidszorg/bevolkingsonderzoek-dikkedarmkanker>. [Accessed: 26-Feb-2019].
- [10] "Bevolkingsonderzoek | Stop Darmkanker." [Online]. Available: <https://www.stopdarmkanker.be/bevolkingsonderzoek/>. [Accessed: 19-Apr-2019].
- [11] "Hoe verloopt het onderzoek? - Dikkedarm Kanker." [Online]. Available: <https://dikkedarmkanker.bevolkingsonderzoek.be/nl/hoe-verloopt-het-onderzoek-0>. [Accessed: 19-Apr-2019].
- [12] "SITUATIESCHETS Bevolkingsonderzoek naar dikkedarmkanker."
- [13] "Vlaams bevolkingsonderzoek dikkedarmkanker - Bond Moyson - West-Vlaanderen," 2018. [Online]. Available: https://www.bondmoyson.be/wvl/gezond-actief/gezond-leven/levensstijl-welzijn/gezonde-gewoontes/Pages/Vlaams-bevolkingsonderzoek-dikkedarmkanker.aspx?setregion=wvl#tab=ctl00_PlaceHolderMain_hrefstab4. [Accessed: 19-Apr-2019].
- [14] "Wat is een coloscopie? - Dikkedarm Kanker." [Online]. Available: <https://dikkedarmkanker.bevolkingsonderzoek.be/nl/wat-is-een-coloscopie>. [Accessed: 19-Apr-2019].
- [15] I. Country-specific, B. Cancer, R. Method, and M. Country-specific, "11 498 527," vol. 851, pp. 2018–2019, 2019.
- [16] S. Asia, S. Asia, and H. Hdi, "Colo-Rectal Cancer.," *Ann. Intern. Med.*, vol. 86, no. 4, p. 517, 2013.
- [17] M. Arnold, M. S. Sierra, M. Laversanne, I. Soerjomataram, A. Jemal, and F. Bray, "Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality," *Gut*, vol. 66, no. 4, pp. 683–691, 2017.
- [18] M. W. Saif and E. Chu, "Biology of colorectal cancer," *Cancer J.*, vol. 16, no. 3, pp. 196–201, 2010.
- [19] L. Y. Hemeryck, "Het verband tussen consumptie van rood en verwerkt vlees en een verhoogd risico op (colorectale) kanker : belangrijkste feiten en hypothesen op een rij," vol. 11, no. 6, pp. 8–12, 2017.
- [20] P. Anand *et al.*, "Expert Review Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes."
- [21] J. Linseisen *et al.*, "Meat consumption in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohorts: results from 24-hour dietary recalls," *Public Health Nutr.*, vol. 5, no. 6b, p. 1243, Dec. 2002.
- [22] K. J. M. Van Hoof, L. Y. Hemeryck, and L. Vanhaecke, "Consumptie van rood en verwerkt vlees en humane colorectale kanker: Is er een verband?," *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.*, vol. 84, no. 1, pp. 3–9, 2015.
- [23] "KONINKLIJK BESLUIT van 8 juni 1983 betreffende de fabricage van en de handel in bereid vlees en vleesbereidingen," *Belgisch Staatsbl.*, p. 9530.
- [24] W. R. Bruce, "Perspectives in Cancer Research Recent Hypotheses for the Origin of Colon Cancer," 1987.
- [25] K. Windey, V. De Preter, and K. Verbeke, "Relevance of protein fermentation to gut health," *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 56, no. 1, pp. 184–196, Jan. 2012.
- [26] K. Puangsombat, P. Gadgil, T. A. Houser, M. C. Hunt, and J. S. Smith, "Occurrence of heterocyclic amines in cooked meat products," *Meat Sci.*, vol. 90, no. 3, pp. 739–746, Mar. 2012.

- [27] N. M. Bastide, F. H. F. Pierre, and D. E. Corpet, "Heme Iron from Meat and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis and a Review of the Mechanisms Involved," *Cancer Prev. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 177–184, Feb. 2011.
- [28] D. E. Corpet, "Red meat and colon cancer: Should we become vegetarians, or can we make meat safer?," *Meat Sci.*, vol. 89, no. 3, pp. 310–316, Nov. 2011.
- [29] A. Ayala, M. F. Muñoz, and S. Argüelles, "Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2014, p. 360438, 2014.
- [30] L. J. Marnett, "Lipid peroxidation—DNA damage by malondialdehyde," *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 424, no. 1–2, pp. 83–95, Mar. 1999.
- [31] P. H. Fernandes, H. Wang, C. J. Rizzo, and R. S. Lloyd, "Site-specific mutagenicity of stereochemically defined 1,N2-deoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxynonenal in mammalian cells," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 42, no. 2, pp. 68–74, Jan. 2003.
- [32] M. Csala *et al.*, "On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1852, no. 5, pp. 826–838, May 2015.
- [33] F. Pierre, S. Taché, C. R. Petit, R. Van der Meer, and D. E. Corpet, "Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats," *Carcinogenesis*, vol. 24, no. 10, pp. 1683–90, Oct. 2003.
- [34] F. Pierre, S. Tache, F. Gueraud, A. L. Rerole, M.-L. Jourdan, and C. Petit, "Apc mutation induces resistance of colonic cells to lipoperoxide-triggered apoptosis induced by faecal water from haem-fed rats," *Carcinogenesis*, vol. 28, no. 2, pp. 321–327, Jul. 2006.
- [35] A. J. Cross and R. Sinha, "Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 44, no. 1, pp. 44–55, 2004.
- [36] U. Förstermann and W. C. Sessa, "Nitric oxide synthases: regulation and function.," *Eur. Heart J.*, vol. 33, no. 7, p. 829–37, 837a–837d, Apr. 2012.
- [37] S. J. Green *et al.*, "Nitric oxide: Cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens," *Immunol. Lett.*, vol. 43, no. 1–2, pp. 87–94, Dec. 1994.
- [38] G. G. C. Kuhnle and S. A. Bingham, "Dietary meat, endogenous nitrosation and colorectal cancer," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 35, no. 5, pp. 1355–1357, Nov. 2007.
- [39] N. IJssennagger *et al.*, "Dietary Heme Alters Microbiota and Mucosa of Mouse Colon without Functional Changes in Host-Microbe Cross-Talk," *PLoS One*, vol. 7, no. 12, p. e49868, Dec. 2012.
- [40] N. IJssennagger *et al.*, "Dietary haem stimulates epithelial cell turnover by downregulating feedback inhibitors of proliferation in murine colon," *Gut*, vol. 61, no. 7, pp. 1041–1049, Jul. 2012.
- [41] L. Y. Hemeryck, T. Van Hecke, E. Vossen, S. De Smet, and L. Vanhaecke, "DNA adductomics to study the genotoxic effects of red meat consumption with and without added animal fat in rats," *Food Chem.*, vol. 230, pp. 378–387, Sep. 2017.
- [42] S. Balbo, R. J. Turesky, and P. W. Villalta, "DNA adductomics," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 27, no. 3, pp. 356–66, Mar. 2014.
- [43] L. Y. Hemeryck, A. I. Declodt, J. Vanden Bussche, K. P. Geboes, and L. Vanhaecke, "High resolution mass spectrometry based profiling of diet-related deoxyribonucleic acid adducts," *Anal. Chim. Acta*, vol. 892, pp. 123–131, Sep. 2015.
- [44] N. Tretyakova, M. Goggin, D. Sangaraju, and G. Janis, "Quantitation of DNA adducts by stable isotope dilution mass spectrometry," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 25, no. 10, pp. 2007–35, Oct. 2012.
- [45] S. J. Mathews, Christopher K.; Van Holde, K.E.; Appling, Dean R.; Anthony-Cahill, *biochemistry (fourth edition)*. 2013.
- [46] N. Tretyakova, P. W. Villalta, and S. Kotapati, "Mass spectrometry of structurally modified DNA," *Chem. Rev.*, vol. 113, no. 4, pp. 2395–436, Apr. 2013.
- [47] K. Dettmer, P. A. Aronov, and B. D. Hammock, "Mass spectrometry-based metabolomics.," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 26, no. 1, pp. 51–78, 2007.
- [48] P. Koivisto and K. Peltonen, "Analytical methods in DNA and protein adduct analysis," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 6, pp. 2563–2572, Nov. 2010.
- [49] S. Liu and Y. Wang, "Mass spectrometry for the assessment of the occurrence and biological consequences of DNA adducts.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 44, no. 21, pp. 7829–54, Nov. 2015.
- [50] D. Giri, "High Performance Liquid Chromatography (HPLC) : Principle, Types, Instrumentation and Applications |

- LaboratoryInfo.com," *Medical Laboratory Professionals*, 2015. [Online]. Available: <https://laboratoryinfo.com/hplc/>. [Accessed: 15-Apr-2019].
- [51] P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, M. Miró, and P. Jandera, "LIQUID CHROMATOGRAPHY | Normal Phase," *Encycl. Anal. Sci.*, pp. 162–173, Jan. 2013.
- [52] S. Fanali, P. R. Haddad, C. F. Poole, P. J. Schoenmakers, and D. (Engineer) Lloyd, *Liquid chromatography : applications*. Elsevier Science, 2013.
- [53] "The Theory of HPLC Gradient HPLC."
- [54] S. Taylor, "Electrospray ionization process. The analyte solution is pumped through... | Download Scientific Diagram." [Online]. Available: https://www.researchgate.net/figure/Electrospray-ionization-process-The-analyte-solution-is-pumped-through-a-needle-to-which_fig6_282547733. [Accessed: 15-Apr-2019].
- [55] A. Michalski *et al.*, "Mass spectrometry-based proteomics using Q Exactive, a high-performance benchtop quadrupole Orbitrap mass spectrometer," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 10, no. 9, p. M111.011015, Sep. 2011.
- [56] unity lab services training courses (european training institute), "Exactive plus and Q exactive operations: training course manual."
- [57] "Orbitrap mass spectrometers offer the highest levels of accuracy and precision." [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/be/en/home/industrial/mass-spectrometry/liquid-chromatography-mass-spectrometry-lc-ms/lc-ms-systems/orbitrap-lc-ms.html>. [Accessed: 16-Apr-2019].
- [58] P. Villalta and S. Balbo, "The Future of DNA Adductomic Analysis," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 18, no. 9, p. 1870, Aug. 2017.
- [59] J. Vanden Bussche, S. A. Moore, F. Pasmans, G. G. C. Kuhnle, and L. Vanhaecke, "An approach based on ultra-high pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry to quantify O6-methyl and O6-carboxymethylguanine DNA adducts in intestinal cell lines," *J. Chromatogr. A*, vol. 1257, pp. 25–33, Sep. 2012.
- [60] S. Goethals *et al.*, "Impact of Red versus White Meat Consumption in a Prudent or Western Dietary Pattern on the Oxidative Status in a Pig Model," *J. Agric. Food Chem.*, 2019.
- [61] S. Devriese, I. Huybrechts, M. Moreau, and H. Van Oyen, "De Belgische Voedselconsumptiepeiling 1 -2004," 2004.
- [62] "Voedingsdriehoek | Vlaams Instituut Gezond Leven." [Online]. Available: https://www.gezondleven.be/themas/voeding/voedingsdriehoek?gclid=CjwKCAjwwZrmBRA7EiwA4iMzBELGbjJTUNDhJNqod7aPQGZX3ae3LffLID4eytnhNhC7DNdIsQgxbxoCog0QAvD_BwE. [Accessed: 29-Apr-2019].
- [63] H. Usda, "2015 Dietary Guidelines Advisory Committee Report," 2015.
- [64] D. Hariharan, K. Vellanki, and H. Kramer, "The Western Diet and Chronic Kidney Disease," *Curr. Hypertens. Rep.*, vol. 17, no. 3, p. 16, Mar. 2015.
- [65] "T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers."
- [66] L. Y. Hemeryck *et al.*, "In vitro DNA adduct profiling to mechanistically link red meat consumption to colon cancer promotion," *Toxicol. Res. (Camb.)*, vol. 5, no. 5, pp. 1346–1358, Sep. 2016.
- [67] C. Leuratti *et al.*, "Detection of malondialdehyde DNA adducts in human colorectal mucosa: relationship with diet and the presence of adenomas," *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 11, no. 3, pp. 267–73, Mar. 2002.
- [68] L. Y. Hemeryck, C. Rombouts, T. Van Hecke, E. Vossen, S. De Smet, and L. Vanhaecke, "Lieselot Hemeryck DNA ADDUCTOMICS TO UNRAVEL THE POTENTIAL CAUSAL ASSOCIATION BETWEEN RED MEAT DIGESTION AND COLORECTAL CANCER."

BIJLAGEN

BIJLAGE I: BEREKENINGEN

Berekening 1: 0.05% azijnzuur in UP-H₂O in totaal volume van 1L (= 1000 ml) UP-H₂O

$$\frac{0.05 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} \times 1000 \text{ ml} = 0.5 \text{ ml} = 500 \mu\text{L}$$

$$1000 \text{ ml} - 0.5 \text{ ml} = 999,5 \text{ ml (UP H}_2\text{O)}$$

Berekening 2: DNA-adductstandaarden: van 5 ng/ μL naar 1 ml (= 1000 μL) van 0.1 ng/ μL (0.05% azijnzuur)

$$\frac{0.1 \text{ ng}}{\mu\text{L}} \times 1000 \mu\text{L} = 100 \text{ ng}$$

$$\frac{100 \text{ ng}}{5 \text{ ng}/\mu\text{L}} = 20 \mu\text{L (standaard van 5 ng}/\mu\text{L)}$$

$$1000 \mu\text{L} - 20 \mu\text{L} = 980 \mu\text{L (0.05% HAc)}$$

Berekening 3: Van 5 ng/ μL naar 1 ml van 0.1 ng/ μL (0.05% HAc); alle standaarden en interne standaarden = 14

$$\frac{0.1 \text{ ng}}{\mu\text{L}} \times 1000 \mu\text{L} = 100 \text{ ng}$$

$$\frac{100 \text{ ng}}{5 \text{ ng}/\mu\text{L}} = 20 \mu\text{L}$$

$$20 \mu\text{L} \times 14 = 280 \mu\text{L}$$

$$1000 - 280 \mu\text{L} = 720 \mu\text{L (0.05% HAc in UP H}_2\text{O)}$$

Berekening 4: Interne standaard

- 06-d3-MeG aan 20 ng/ml

$$\frac{20 \text{ ng}}{\text{mL}} \times 10 \text{ ml} = 200 \text{ ng}$$

$$\frac{200 \text{ ng}}{5 \text{ ng}/\mu\text{L}} = 40 \mu\text{L} \quad (5 \text{ ng}/\mu\text{L is van de werkstockoplossing})$$

- M₁G* aan 1 ng/ml

$$\frac{1 \text{ ng}}{\text{mL}} \times 10 \text{ ml} = 10 \text{ ng}$$

0.5 ng/ μL verdunning van 5 ng/ μL werkstockoplossing aanmaken:

$$\frac{5 \text{ ng}}{\mu\text{L}} \times 100 \mu\text{L} = 500 \text{ ng}$$

$$\frac{500 \text{ ng}}{1000 \mu\text{L}} = \frac{0.5 \text{ ng}}{\mu\text{L}}$$

Gebruik maken van deze verdunde oplossing:

$$\frac{10 \text{ ng}}{0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}} = 20 \mu\text{L}$$

- Alpha-Me-gamma-OH-PdG* aan 1 ng/ml

$$\frac{1 \text{ ng}}{\text{mL}} \times 10 \text{ ml} = 10 \text{ ng}$$

0.5 ng/ μL verdunning van 5 ng/ μL werkstockoplossing aanmaken:

$$\frac{5 \text{ ng}}{\mu\text{L}} \times 100 \mu\text{L} = 500 \text{ ng}$$

$$\frac{500 \text{ ng}}{1000 \mu\text{L}} = \frac{0.5 \text{ ng}}{\mu\text{L}}$$

Gebruik maken van deze verdunde oplossing:

$$\frac{10 \text{ ng}}{0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}} = 20 \mu\text{L}$$

$$10\text{L} (= 10\,000 \mu\text{L}) - 40 \mu\text{L} - 20 \mu\text{L} = 9,94 \text{ ml UP- H}_2\text{O}$$

Berekening 5: 0.1 M mierenzuur in UP-H₂O

$$\frac{0.1 \text{ mmol}}{\text{ml}} \times 100 \text{ ml} = 10 \text{ mmol}$$

$$10 \text{ mmol} \times 46.03 \text{ mg/mmol} = 460.3 \text{ mg}$$

$$\frac{460,3\text{mg}}{1220 \text{ mg/ml}} = 0.380 \text{ ml} = 380 \mu\text{L formic acid}$$

BIJLAGE II: OPTIMALISATIE VAN DNA-ADDUCTEXTRACTIE

Protocol DNA-adductextractie: protocol 1 (protocol van Vanden Bussche et al)

Extractie:

- Aan elk staal 50 μ L ISTD oplossing toevoegen
- + 2 mL 0.1 M mierenzuur in UP-H₂O, vortexen
- In heating block op 80°C voor exact 30 min. Dopje op flesjes plaatsen!
- Afkoelen in ijswater (min. 15 min.)
- SPE-extractie met Oasis HLB kolommetjes (30 mg, 1 mL):
 - Conditioneren met 2x1 mL MeOH (niet droog),
 - Equilibreren met 2x1 mL UP-H₂O (niet droog),
 - Volledige oplossing opbrengen (pasteurpipet, lukt niet in 1 keer),
 - Laatste restje; gedurende 1 min. droogtrekken (niet wassen!).
 - Elueren met 2x1 mL MeOH (plastic buizen; gelabeld!).
- Droogdampen door 90 min. in speedvac op 20°C.
- Heroplossen in 100 μ L eluens (0.05% azijnzuur in UP-H₂O), goed vortexen en overbrengen naar HPLC vial (gelabeld!).
- Bewaren in frigo (< 24u tot analyse) of bij -20°C (> 24u tot analyse).

Protocol DNA-adductextractie: protocol 2: met pH-neutralisatie

Extractie:

- Aan elk staal 50 μ L ISTD oplossing toevoegen
- + 2 mL 0.1 M mierenzuur in UP-H₂O, vortexen
- In heating block op 80°C voor exact 30 min. Dopje op flesjes plaatsen!
- Afkoelen in ijswater (min. 15 min.)
- pH neutralisatie (7 – 7.4)
 - voor PH stijging: kan er gebruik gemaakt worden van een 0,1; 1 of 5 M NaOH-oplossing
 - voor PH daling: kan er gebruik gemaakt worden van een 1 of 6 M HCl-oplossing
- SPE-extractie met Oasis HLB kolommetjes (30 mg, 1 mL):
 - Conditioneren met 2x1 mL MeOH (niet droog),
 - Equilibreren met 2x1 mL UP-H₂O (niet droog),
 - Volledige oplossing opbrengen (pasteurpipet, lukt niet in 1 keer),

- Laatste restje; gedurende 1 min. droogtrekken (niet wassen!).
- Elueren met 2x1 mL MeOH (plastic buizen; gelabeld!).
- Droogdampen door 90 min. in speedvac op 20°C .
- Heroplossen in 100 µL eluens (0.05% azijnzuur in UP-H₂O), goed vortexen en overbrengen naar HPLC vial (gelabeld!).
- Bewaren in frigo (< 24u tot analyse) of bij -20°C (> 24u tot analyse) .

Protocol DNA-adductextractie: protocol 3 : extra wasstap

Extractie:

- Aan elk staal 50 µL ISTD oplossing toevoegen
- + 2 mL 0.1 M mierenzuur in UP-H₂O, vortexen
- In heating block op 80°C voor exact 30 min. Dopje op flesjes plaatsen!
- Afkoelen in ijswater (min. 15 min.)
- SPE-extractie met Oasis HLB kolommetjes (30 mg, 1 mL):
 - Conditioneren met 2x1 mL MeOH (niet droog),
 - Equilibreren met 2x1 mL UP-H₂O (niet droog),
 - Volledige oplossing opbrengen (pasteurpipet, lukt niet in 1 keer),
 - Staal laten doorlopen (geen vacuum!),
 - Wassen met 1 mL H₂O,
 - Gedurende 1 min. droogtrekken (vacuum),
 - Elueren met 2x1 mL MeOH (plastic buizen; gelabeld!).
- Droogdampen door 90 min. in speedvac op 20°C .
- Heroplossen in 100 µL eluens (0.05% azijnzuur in UP-H₂O), goed vortexen en overbrengen naar HPLC vial (gelabeld!).
- Bewaren in frigo (< 24u tot analyse) of bij -20°C (> 24u tot analyse) .

Protocol DNA-adductextractie: protocol 4: met pH-neutralisatie en wasstap

Extractie:

- Aan elk staal 50 μ L ISTD oplossing toevoegen
- + 2 mL 0.1 M mierenzuur in UP-H₂O, vortexen
- In heating block op 80°C voor exact 30 min. Dopje op flesjes plaatsen!
- Afkoelen in ijswater (min. 15 min.)
- pH neutralisatie (7 – 7.4)
 - voor PH stijging: kan er gebruik gemaakt worden van een 0,1; 1 of 5 M NaOH-oplossing
 - voor PH daling: kan er gebruik gemaakt worden van een 1 of 6 M HCl-oplossing
- SPE-extractie met Oasis HLB kolommetjes (30 mg, 1 mL):
 - Conditioneren met 2x1 mL MeOH (niet droog),
 - Equilibreren met 2x1 mL UP-H₂O (niet droog),
 - Volledige oplossing opbrengen (pasteurpipet, lukt niet in 1 keer),
 - Staal laten doorlopen (geen vacuum!),
 - Wassen met 1 mL H₂O,
 - Gedurende 1 min. droogtrekken (niet wassen!),
 - Elueren met 2x1 mL MeOH (plastic buizen; gelabeld!).
- Droogdampen door 90 min. in speedvac op 20°C .
- Heroplossen in 100 μ L eluens (0.05% azijnzuur in UP-H₂O), goed vortexen en overbrengen naar HPLC vial (gelabeld!).
- Bewaren in frigo (< 24u tot analyse) of bij -20°C (> 24u tot analyse) .

BIJLAGE III: DNA-EXTRACTIE MN NUCLEOSPIN DNA RAPIDLYSE: (PROTOCOL VOOR VERSE, DIEPGEVROREN EN IN ETHANOL BEWAARDE STALEN)

- Afwegen en wassen staal:
 - Tot 40 mg (zo veel mogelijk, maar maximaal 40 mg) afwegen
 - Staal wassen/afspoelen met UP H₂O (ethanolresten verwijderen, droogdeppen?)
 - Staal fijnpletten/knippen
 - Staal in 2 mL epje (geen 1,5 mL epje!) overbrengen
- Lyse van het staal:
 - 150 µL Buffer RLY toevoegen
 - 10 µL Liquid Proteinase K ("2019", in -20°C) toevoegen
 - Vortexen
 - Maximaal 1 uur bij 56°C; elke 5 min. vortexen en visueel controleren op lyse
 - Van zodra gelyseerd, overgaan naar stap 3.
- Aanpassing DNA-bindingscondities
 - 440 µL Buffer RLB toevoegen
 - Vortexen
- Binding DNA
 - Overbrengen op 'NucleoSpin DNA RapidLyse Column' op een 2 mL collectietube (zie doos leverancier)
 - Centrifugeren: 1 min aan 11000 xg
 - 'NucleoSpin DNA RapidLyse Column' op een nieuwe collectietube (zie doos leverancier) plaatsen
 - (oude collectietube mag weg)
- Wassen silicamembraan
 - 1^{ste} maal:
 - Toevoegen 500 µL Buffer RLW
 - Centrifugeren: 1 min aan 11000 xg
 - Weggieten wat door kolom vloeide en kolom terug op zelfde collectietube plaatsen
 - 2^{de} maal:
 - Toevoegen 500 µL Buffer RLW
 - Centrifugeren: 1 min aan 11000 xg
 - Weggieten wat door kolom vloeide en kolom terug op zelfde collectietube plaatsen
- Drogen silicamembraan
- Centrifugeren: 1 min aan 11000 xg

- Elutie van DNA:

- 1^{ste} maal:

- 'NucleoSpin DNA RapidLyse Column' op een 1.5 mL epje plaatsen (= **substaal 1**)
 - (oude collectietube mag weg)
 - 100 µL Buffer RLE op kolom brengen
 - 4 min incuberen bij kamertemperatuur
 - Centrifugeren: 1 min aan 11000 xg

- 2^{de} maal:

- 'NucleoSpin DNA RapidLyse Column' op een nieuw 1.5 mL epje plaatsen (= **substaal 2**)
 - (Ander epje (substaal 1) sluiten en bewaren!)
 - Opnieuw 100 µL Buffer RLE op de kolom brengen
 - 4 min incuberen bij kamertemperatuur
 - Centrifugeren: 1 min aan 11000 xg
 - Epje (substaal 2) sluiten en bewaren

- Bewaring bij -20°C

BIJLAGE IV: AANMAAK VAN DE IJKLIJN

- Voor de ijklijnoplossingen:

- 2 ng/mL:
 - 20 µL van het 100 ng/mL mengsel pipetteren & aanlengen tot 1,00 ml met 0,05 % HAc (980 µL) in een glazen vial (eerst HAc en dan mengsel toevoegen)
 - vortexen
 - 10 ng/mL:
 - 50 µL van het 100 ng/mL mengsel pipetteren & aanlengen tot 0,5 ml met 0,05% HAc (450 µL) in een glazen vial (eerst HAc en dan mengsel toevoegen)
 - vortexen
 - 0,2 ng/mL:
 - 50 µL van het 2 ng/mL ijklijnoplossing pipetteren & aanlengen tot 0,5 ml met 0,05% HAc (450 µL) in een glazen vial (eerst HAc en dan ijklijnoplossing van 2 ng/mL toevoegen)
 - Vortexen

- Voor de ijklijnstalen:

- Algemeen:
 - Hoeveelheid UP-H2O pipetteren in glazen vial
 - Ijklijnoplossing pipetteren in glazen vial
 - CT-DNA pipetteren in glazen vial
 - ISTD pipetteren in glazen vial
 - Vortexen

Schema volgen voor de verschillende oplossingen:

	CT- DNA (μL)	ISTD (μL)	Ijkoplossing van 0,2 ng/mL (μL)	UP-H2O (μL)
A	100	50	0	350
B	100	50	125	225
C	100	50	250	100
	CT- DNA (μL)	ISTD (μL)	Ijkoplossing van 2 ng/mL (μL)	UP-H2O (μL)
D	100	50	50	300
E	100	50	100	250
F	100	50	150	200
G	100	50	200	150
H	100	50	250	100
	CT- DNA (μL)	ISTD (μL)	Ijkoplossing van 10 ng/mL (μL)	UP-H2O (μL)
I	100	50	125	225
J	100	50	200	100

BIJLAGE V: TABELLEN

Tabel 1: gegevens van de varkensproef : Eerste kolom geeft weer welk nr big het is, A/W staat voor aanbevolen dieet/Westerse dieet, K/R staat voor kip/rood vlees

nr big	A/W	K/R	Sow nr	PEN	slachtdag
1	A	K	14126	3	1
5	A	K	13545	3	1
12	A	K	15907	7	2
16	A	K	16154	7	2
19	A	K	14385	3	3
23	A	K	14628	3	3
26	A	K	15911	7	4
30	A	K	15843	7	4
2	A	R	14126	4	1
3	A	R	16154	8	1
10	A	R	15911	8	2
14	A	R	14628	4	2
17	A	R	15907	8	3
21	A	R	15843	8	3
28	A	R	14385	4	4
32	A	R	13545	4	4
6	W	K	15907	9	1
7	W	K	14126	6	1
9	W	K	16154	9	2
13	W	K	14628	6	2
20	W	K	15911	9	3
24	W	K	15843	9	3
27	W	K	14385	6	4
31	W	K	13545	6	4
4	W	R	14385	5	1
8	W	R	14126	5	1
11	W	R	15911	10	2
15	W	R	16154	10	2
18	W	R	13545	5	3
22	W	R	14628	5	3
25	W	R	15907	10	4
29	W	R	15843	10	4

Tabel 2: Gedetailleerde lijst van de ingrediënten: lijst van levensmiddelen die worden gebruikt om de vier diëten samen te stellen, uitgedrukt in g / kg (versgewichtbasis, links) en in g / dag geconsumeerd door mensen (rechts). De laatste term werd gekozen omdat de dieetformulering gebaseerd was op menselijke voedingsrichtlijnen (aanbevolen (prudent)) en op het gemiddelde dieet van de Belgische bevolking (westers).

		prudent		Western		prudent		Western	
		chicken	R&P ^a	chicken	R&P ^a	chicken	R&P ^a	chicken	R&P ^a
		g/kg				g/day consumed (calculated for humans)			
red (62%) & red processed meat (38%)	total red & processed red meat		145		197		291		291
	total fresh red meat		89.4		121		180		180
	total processed red meat		55.3		75.2		111		111
	lean beef (Belgian Blue)		39.9		54.3		80.5		80.5
	lean pork meat		29.3		39.8		59.0		59.0
	minced pork		13.9		18.9		28.0		28.0
	minced meat (pork and beef)		4.46		6.06		8.98		8.98
	sheep meat		0.29		0.40		0.59		0.59
	beef liver		1.51		2.06		3.05		3.05
	smoked ham		1.43		1.94		2.88		2.88
	white sausage		1.68		2.29		3.39		3.39
	black pudding		0.84		1.14		1.69		1.69
	smoked horsemeat		0.34		0.46		0.68		0.68
	smoked bacon		4.88		6.63		9.83		9.83
	meatloaf		0.17		0.23		0.34		0.34
	filet d'Anvers		2.27		3.09		4.58		4.58
	filet de sax		10.1		13.7		20.3		20.3
	cooked ham		17.4		23.6		35.0		35.0
	ham sausage		1.18		1.60		2.37		2.37
Paté		1.60		2.17		3.22		3.22	
salami		13.5		18.3		27.1		27.1	
chicken meat	chicken	145		197		292		292	
cereal products and potatoes	Total	304	304	199	199	612	612	294	294
	white bread	20.2	20.2	68.6	68.6	40.7	40.7	102	102
	whole-wheat bread	104	104	11.4	11.4	210	210	16.9	16.9
	sandwiches			17.1	17.1			25.4	25.4
	biscuit	1.47	1.47			2.97	2.97		
	potatoes	109	109	72.4	72.4	220	220	107	107
	white rice			16.9	16.9			25.0	25.0
	whole-wheat rice	38.7	38.7			78.0	78.0		
pasta	29.8	29.8	12.1	12.1	60.0	60.0	18.0	18.0	
fruits	total	126	126	81.1	81.1	254	254	120	120
	apple	18.4	18.4	11.9	11.9	37.2	37.2	17.6	17.6
	banana	11.3	11.3	7.25	7.25	22.7	22.7	10.7	10.7
	pear	10.4	10.4	6.68	6.68	20.9	20.9	9.90	9.90
	orange	29.7	29.7	19.1	19.1	59.8	59.8	28.3	28.3
	pineapple	2.77	2.77	1.78	1.78	5.58	5.58	2.64	2.64
	strawberry	9.71	9.71	6.24	6.24	19.6	19.6	9.25	9.25
	grape	21.1	21.1	13.6	13.6	42.6	42.6	20.1	20.1

Tabel 2 : Gedetailleerde lijst van de ingrediënten: lijst van levensmiddelen die worden gebruikt om de vier diëten samen te stellen, uitgedrukt in g / kg (versgewichtbasis, links) en in g / dag geconsumeerd door mensen (rechts). De laatste term werd gekozen omdat de dieetformulering gebaseerd was op menselijke voedingsrichtlijnen (aanbevolen (prudent)) en op het gemiddelde dieet van de Belgische bevolking (westers) (Vervolg)

	mango	1.43	1.43	0.92	0.92	2.88	2.88	1.36	1.36
	melon	6.28	6.28	4.04	4.04	12.7	12.7	5.99	5.99
	lemon	2.97	2.97	1.91	1.91	5.98	5.98	2.83	2.83
	lime	1.08	1.08	0.70	0.70	2.19	2.19	1.03	1.03
	plum	0.14	0.14	0.09	0.09	0.29	0.29	0.14	0.14
	grapefruit	4.00	4.00	2.57	2.57	8.06	8.06	3.81	3.81
	blueberry	0.91	0.91	0.59	0.59	1.84	1.84	0.87	0.87
	papaya	1.08	1.08	0.70	0.70	2.19	2.19	1.03	1.03
	orange juice	2.28	2.28	1.47	1.47	4.60	4.60	2.18	2.18
	red currant	0.17	0.17	0.11	0.11	0.35	0.35	0.16	0.16
	pomegranate	0.91	0.91	0.59	0.59	1.84	1.84	0.87	0.87
	raspberry	0.86	0.86	0.55	0.55	1.73	1.73	0.82	0.82
	kiwi	0.63	0.63	0.40	0.40	1.27	1.27	0.60	0.60
vegetables	total	173	173	91.5	91.5	349	349	136	136
	carrot	11.6	11.6	6.14	6.14	23.4	23.4	9.11	9.11
	beetroot	0.97	0.97	0.51	0.51	1.95	1.95	0.76	0.76
	parsnip	0.22	0.22	0.12	0.12	0.44	0.44	0.17	0.17
	turnip	2.12	2.12	1.12	1.12	4.27	4.27	1.66	1.66
	celeriac	0.76	0.76	0.40	0.40	1.53	1.53	0.59	0.59
	fennel	3.27	3.27	1.73	1.73	6.59	6.59	2.56	2.56
	celery	13.4	13.4	7.07	7.07	27.0	27.0	10.5	10.5
	onion	8.15	8.15	4.30	4.30	16.4	16.4	6.38	6.38
	garlic	0.30	0.30	0.16	0.16	0.61	0.61	0.24	0.24
	leek	11.1	11.1	5.86	5.86	22.3	22.3	8.68	8.68
	asparagus	2.76	2.76	1.46	1.46	5.55	5.55	2.16	2.16
	salsify	1.88	1.88	0.99	0.99	3.78	3.78	1.47	1.47
	mushroom	21.2	21.2	11.2	11.2	42.7	42.7	16.6	16.6
	zucchini	4.60	4.60	2.43	2.43	9.28	9.28	3.61	3.61
	eggplant	4.06	4.06	2.14	2.14	8.18	8.18	3.18	3.18
	bell pepper	3.03	3.03	1.60	1.60	6.10	6.10	2.37	2.37
	pumpkin	1.15	1.15	0.61	0.61	2.32	2.32	0.90	0.90
	haricot	2.36	2.36	1.25	1.25	4.76	4.76	1.85	1.85
	tomato	19.4	19.4	10.2	10.2	39.1	39.1	15.2	15.2
	soybean shoot	4.24	4.24	2.24	2.24	8.54	8.54	3.32	3.32
	cucumber	0.61	0.61	0.32	0.32	1.22	1.22	0.47	0.47
	broccoli	2.36	2.36	1.25	1.25	4.76	4.76	1.85	1.85
	cauliflower	2.76	2.76	1.46	1.46	5.55	5.55	2.16	2.16
	green cabbage	3.12	3.12	1.65	1.65	6.29	6.29	2.44	2.44
	white cabbage	8.42	8.42	4.45	4.45	17.0	17.0	6.59	6.59
	Brussels-sprouts	13.6	13.6	7.20	7.20	27.5	27.5	10.7	10.7
	red cabbage	2.63	2.63	1.39	1.39	5.31	5.31	2.06	2.06
	lettuce	11.5	11.5	6.08	6.08	23.2	23.2	9.01	9.01
	chicory	4.84	4.84	2.56	2.56	9.76	9.76	3.80	3.80
	avocado	6.72	6.72	3.55	3.55	13.5	13.5	5.27	5.27
	watercress	0.09	0.09	0.05	0.05	0.18	0.18	0.07	0.07

Tabel 2 : Gedetailleerde lijst van de ingrediënten: lijst van levensmiddelen die worden gebruikt om de vier diëten samen te stellen, uitgedrukt in g / kg (versgewichtbasis, links) en in g / dag geconsumeerd door mensen (rechts). De laatste term werd gekozen omdat de dieetformulering gebaseerd was op menselijke voedingsrichtlijnen (aanbevolen (prudent)) en op het gemiddelde dieet van de Belgische bevolking (westers) (Vervolg)

dairy products and eggs	total	243	243	143	143	490	490	212	212	
	cheese (Belgian Gouda)	15.1	15.1	20.6	20.6	30.5	30.5	30.5	30.5	
	semi-skimmed milk	223	223	97.7	97.7	450	450	145	145	
	cream (35% fat)			18.3	18.3			27.1	27.1	
	eggs	4.7	4.7	6.4	6.4	9.5	9.5	9.5	9.5	
butter and cooking fats	total	8.62	8.62	14.3	14.3	17.4	17.4	21.2	21.2	
	baking and frying fat	0.8	0.8	2.3	2.3	1.7	1.7	3.4	3.4	
	margarine	0.2	0.2	0.6	0.6	0.4	0.4	0.8	0.8	
	plant-based frying oil	0.0	0.0	4.6	4.6	0.0	0.0	6.8	6.8	
	sunflower oil	0.0	0.0	4.6	4.6	0.0	0.0	6.8	6.8	
	peanut oil	0.0	0.0	2.3	2.3	0.0	0.0	3.4	3.4	
	rapeseed oil	3.4	3.4	0.0	0.0	6.8	6.8	0.0	0.0	
	olive oil	4.2	4.2	0.0	0.0	8.5	8.5	0.0	0.0	
	fats & sweets (and nuts)	total	0.51	0.51	275	275	1.04	1.04	408	408
		hazelnuts	0.5	0.5	0.3	0.3	1.0	1.0	0.5	0.5
milk chocolate				6.9	6.9			10.2	10.2	
fries				32.0	32.0			47.5	47.5	
mayonnaise				7.8	7.8			11.5	11.5	
ketchup				20.6	20.6			30.5	30.5	
fruitcake				20.6	20.6			30.5	30.5	
profiteroles				11.4	11.4			16.9	16.9	
pancakes				3.2	3.2			4.7	4.7	
millefeuille				12.6	12.6			18.6	18.6	
coke				68.6	68.6			101.7	101.7	
lemonade				68.6	68.6			101.7	101.7	
sugar				16.6	16.6			24.7	24.7	
croquettes			5.7	5.7			8.5	8.5		
total diet		1000	1000	1000	1000	2015	2015	1482	1482	

^a R&P = red & processed meat

Tabel 3: Geformuleerde (formulated) en geanalyseerde (analyzed) nutritionele samenstelling van de vier diëten

	formulated				analyzed			
	prudent		Western		prudent		Western	
	chicken	R&P ^a	chicken	R&P ^a	chicken	R&P ^a	chicken	R&P ^a
energy ^b , kcal/kg	1089	1089	1482	1482	1263	1265	1743	1726
proportion of energy from proteins, %	22.6	23.8	18.1	19.3	20.7	20.4	17.7	16.4
proportion of energy from fat, %	29.2	28.8	40.2	39.6	22.5	24.9	32.5	35.6
crude protein, g/100 g	5.99	6.40	6.57	7.15	6.44	6.35	7.61	6.97
crude fat, g/100 g	3.45	3.46	6.53	6.54	3.13	3.47	6.24	6.76
dry matter, g/100 g	25.5	24.7	33.3	32.2	26.0	26.1	30.9	31.2

^a R&P = red & processed meat (rood en verwerkt vlees)

^b De energie van de geformuleerde diëten komt overeen met de metaboliseerbare energie en werd geschat door het gebruik van Atwater-factoren, terwijl de geanalyseerde energie overeenkomt met de bruto-energie zoals bepaald door de hoeveelheid warmte die in een bomcalorimeter is vrijgemaakt.

Tabel 4: Gemiddelde (gecorrigeerde) concentratie M₁G per dieet en weefseltype

	AK-groep			AR-groep			WK-groep			WR-groep		
	#	Gem. conc. ($\frac{ng}{mL}$)	Gecorrigeerde conc.	#	Gem. Conc. ($\frac{ng}{mL}$)	Gecorrigeerde conc.	#	Gem. Conc. ($\frac{ng}{mL}$)	Gecorrigeerde conc.	#	Gem. Conc. ($\frac{ng}{mL}$)	Gecorrigeerde conc.
Lever	NF	NF	NF	1	0,021	3,08	NF	NF	NF	1	0,011	0,87
Ileum	NF	NF	NF	1	0,043	4,76	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Colon 1	NF	NF	NF	NF	NF	NF	2	0,018	1,202	1	0,034	NF
Colon 2	NF	NF	NF	2	0,036	2,12	1	0,033	2,69	NF	NF	NF

^a # = aantal stalen

^b Not Found (NF) = indien niet gedetecteerd

Tabel 5 : Gemiddelde (gecorrigeerde) concentratie CroG per dieet en per weefseltype

	AK-groep			AR-groep			WK-groep			WR-groep		
	#	Gem. conc. ($\frac{ng}{mL}$)	Gecorrigeerde conc.	#	Gem. Conc. ($\frac{ng}{mL}$)	Gecorrigeerde conc.	#	Gem. Conc. ($\frac{ng}{mL}$)	Gecorrigeerde conc.	#	Gem. Conc. ($\frac{ng}{mL}$)	Gecorrigeerde conc.
Lever	1	3,66E-04	0,040	4	3,08E-03	0,353	4	3,97E-03	0,628	2	4,69E-03	0,600
Ileum	NF	NF	NF	2	1,34E-03	0,102	2	6,40E-04	0,073	2	9,33E-04	0,096
Colon 1	1	6,46E-04	0,042	3	1,07E-03	0,104	1	3,71E-04	0,031	2	1,14E-03	0,097
Colon 2	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF

^a# = aantal stalen

^b Not Found (NF) = indien niet gedetecteerd

Tabel 6: Gemiddelde (gecorrigeerde) concentratie van N³-methyladenine per dieet en weefseltype

	AK-groep			AR-groep			WK-groep			WR-groep		
	#	Gem. conc. ($\frac{ng}{mL}$)	Gecorrigeerde conc.	#	Gem. Conc. ($\frac{ng}{mL}$)	Gecorrigeerde conc.	#	Gem. Conc. ($\frac{ng}{mL}$)	Gecorrigeerde conc.	#	Gem. Conc. ($\frac{ng}{mL}$)	Gecorrigeerde conc.
Lever	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Ileum	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Colon 1	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Colon 2	NF	NF	NF	2	10,79	970,62	3	18,20	1329,52	NF	NF	NF

^a# = aantal stalen

^b Not Found (NF) = indien niet gedetecteerd

Tabel 7: Geselecteerde discriminerende en geselecteerde ionen (+/- modus) van het "lever R: A vs W" model (rood vlees in combinatie met een aanbevolen dieet of een westers dieet).

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor:
1	+	2,33	180,6211		WR
2	+	1,28	181,6232	C9H3404N9P1	WR
3	+	1,48	181,6234		WR
4	+	2,35	187,6293		WR
5	+	1,37	452,9079		/
6	+	1,33	202,6286		/
7	+	1,63	202,6287		/
8	+	1,59	273,0043		AR
9	+	1,66	287,1242		WR
10	+	2,26	314,9631		/
11	+	0,79	362,9329	C13H308N1P2	AR
12	+	0,96	526,8583		AR
13	+	5,45	609,2371		/
14	-	1,03	228,8635		AR
15	-	1,67	264,9954	C2H8010N3P1	AR
16	-	1,05	288,8392		AR
17	-	0,9	424,7928		/
18	-	0,96	369,8118		AR
19	-	0,93	502,7602		AR
20	-	1,11	458,6626	C35H56013N10P3	/
21	-	0,96	481,726		WR
22	-	0,95	509,659		WR
23	-	0,89	535,9809		WR
24	-	0,97	570,7592		/
25	-	1,07	661,2314	C25H4208N7P3	WR

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 8: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "lever K: A vs W" model (kip (wit vlees) in combinatie met een aanbevolen dieet of een westers dieet)

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	1,76	146,165		AK
2	+	1,82	221,6712	C17H45O6N7	AK
3	+	0,94	568,1288		/
4	+	1,42	226,1364		AK
5	+	4,25	237,9412		/
6	+	1,07	274,1868		/
7	+	1,21	275,1592	C6H24O4N6P1	/
8	+	1,35	380,2784	C16H39O3N5P1	AK
9	+	0,98	448,0578		/
10	+	1,34	477,3077		AK
11	+	1,4	578,2283		/
12	-	1,78	369,0502		/
13	-	0,81	402,9033		/
14	-	0,86	413,0014		/
15	-	1	471,6162	C49H40O6N9P3	/
16	-	1,05	476,9658		/
17	-	1,21	478,1322		AK
18	-	1,01	483,0125	C17H9O6N8P2	/
19	-	0,9	540,8227		/
20	-	1,09	582,0152		AK
21	-	0,98	601,391		/
22	-	1,07	661,2314	C25H42O8N7P3	AK
23	-	0,94	681,3428		/

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 9: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "lever A vs W" model (een aanbevolen dieet versus een westers dieet)

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule
1	+	3,64	311,1691	C13H32O1N1P3
2	-	1,05	476,9658	
3	-	0,96	481,726	
4	-	1,08	482,7323	
5	-	0,95	579,7441	
6	-	1,01	579,7441	
7	-	0,97	619,4177	
8	-	1,05	613,7501	

Tabel 10: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "lever A: R vs K" model (een aanbevolen dieet in combinatie met rood vlees of wit vlees (kip))

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	5,24	219,1488	C13H19O1N2	AK
2	+	0,95	289,0896		/
3	+	1,14	324,1541	C9H23O4N7P1	AK
4	+	1,56	527,1978	C12H35O10N9P2	AK
5	-	5,45	238,075		/
6	-	0,96	338,9211		/
7	-	0,89	440,7697		/
8	-	1,07	402,0689		/
9	-	1,01	483,0125	C17H9O6N8P2	/
10	-	0,95	509,659		AK
11	-	1,11	603,2262		/
12	-	1,07	661,2314	C25H42O8N7P3	AK

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 11: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "lever W: R vs K" model (een westers dieet in combinatie met rood vlees of wit vlees (kip))

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	3,61	231,1814		WK
2	+	1,22	249,1262		WK
3	+	0,89	265,121		WR
4	+	3,43	290,1704		/
5	+	5,46	301,1945		WK
6	-	0,89	338,9881		/
7	-	0,9	251,9791		/
8	-	0,99	329,0988		/
9	-	0,92	430,9581	C9H6O7N8P3	/
10	-	0,89	535,9809		WR
11	-	1,09	582,0152		/

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 12: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "ileum R: A vs W" model (rood vlees in combinatie met een aanbevolen of een westers dieet)

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	4,66	111,1044	C10H29N3P1	WR
2	+	1,78	124,034	C4H12N9P2	WR
3	+	1,15	144,0504	C5H2101N7P3	AR
4	+	3,14	202,0614	C13H2809N1P2	WR
5	+	1,07	274,9311		WR
6	+	1,32	327,1067		WR
7	+	1,02	362,7566		WR
8	+	0,93	382,9106		AR
9	-	0,92	519,8671		AR
10	-	0,82	609,6852		AR

Tabel 13: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "ileum K: A vs W" model (wit vlees (kip) in combinatie met een aanbevolen of een westers dieet)

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	1,39	157,1337		AK
2	+	2,53	203,139		AK
3	+	1,06	331,2078	C25H6305N9P3	AK
4	+	0,99	335,0627		WK
5	+	3,77	352,918		/
6	+	1,1	405,1967		AK
7	+	0,82	422,8483	C41H9706N7P2	WK
8	+	4,13	460,2389		AK
9	-	0,93	589,811		WK

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 14: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "ileum A vs W" model (een aanbevolen versus een westers dieet)

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	2,22	116,0167	C4H703N7P1	A
2	+	1,4	127,1232		W
3	+	1,38	128,1434		W
4	+	3,14	202,0614	C13H2809N1P2	W
5	+	1,31	257,0501		A
6	+	1,9	291,1549		/

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 15: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "ileum A: R vs K" model (een aanbevolen dieet in combinatie met rood vlees of wit vlees (kip))

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	3,66	179,0884	C13H3007N2[32]S1	AK
2	+	1,01	242,9392	C4H5014N6P3[32]S1	AR
3	+	1,02	362,7566		AK
4	+	2,82	366,9331		AR
5	-	0,93	463,9433	C6H8012N7P2[32]S1	AK
6	-	0,96	466,8083	C1H1015N4P2[32]S3	AR
7	-	0,86	477,3802	C21H5002N8P1	AR
8	-	0,93	589,811	C17H105N6P3[32]S4	AR
9	-	0,95	687,4163		AR

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 16: Geselecteerde de discriminerende en geselecteerde ionen (+/- modus) van het "ileum W: R vs K" model (een westers dieet in combinatie met rood vlees of wit vlees (kip))

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	2,11	187,144		WR
2	+	1,08	194,1389	C16H4008N2	WR
3	+	1,16	233,015		WK
4	+	1,25	290,1884		/
5	+	0,99	335,0627		WK
6	+	0,99	352,6818	C22H6208N9P3[32]S1	WR
7	+	0,87	357,8965	C2H6010N3P2[32]S2	WK
8	+	5,16	370,1422		WR
9	+	1,98	384,1866		WR
10	+	0,82	422,8483	C41H9706N7P2	WK
11	-	0,94	685,5922	C32H7707N8	WK

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 17: Geselecteerde discriminerende (+/- modus) van het "colon proximaal R: A vs W" model (rood vlees in combinatie met een aanbevolen of een westers dieet)

	+/- modus	RT (min)	m/z	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	1,28	144,0325		WR
2	+	2,02	173,0267		AR
3	+	1,69	186,1184		/
4	+	4,92	192,0564	C4H12N5P2	AR
5	+	1,73	196,0026		AR
6	+	1,27	209,6292		AR
7	+	1,8	223,6392		AR
8	+	1,07	273,6522		AR
9	+	1,11	275,5131		WR
10	+	0,83	284,9594		WR
11	+	4,98	286,0679		AR
12	+	1,18	296,9435		AR
13	+	0,82	282,9648		WR
14	+	3,97	314,9625		/
15	+	1,35	328,9846		WR
16	+	1,49	386,1256		AR
17	+	1,09	424,3045		AR
18	+	0,86	453,7047		AR
19	-	1,72	232,0277		WR
20	-	5,37	232,9693	C7H803P3	WR
21	-	1,56	311,0439	C12H1206N2P1	WR
22	-	0,89	440,7697		AR
23	-	0,92	515,7814		AR
24	-	0,94	544,3605		WR
25	-	1,42	559,2725	C23H4403N7P3	WR
26	-	0,88	572,598	C34H7602N4	WR
27	-	0,99	638,1061		AR
28	-	0,95	655,4808		WR

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 18: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "colon proximaal K: A vs W" model (wit vlees (kip) in combinatie met een aanbevolen of een westers dieet)

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	1,03	148,112	C10H14N1	AK
2	+	0,96	190,1589	C13H20N1	AK
3	+	1,28	308,1235		AK
4	+	1,29	244,1654	C7H25O3N4P1	AK
5	+	1,1	260,1123	C9H26O2P2[32]S1	/
6	+	2,69	278,942	C2H11O13N9P3[32]S3	WK
7	+	2,33	320,8828		WK
8	+	1,58	323,9911		WK
9	-	0,92	515,7814	C9H109N3P3[32]S4	WK
10	-	0,93	550,666	C42H70015N7P3[32]S3	WK
11	-	0,97	581,7092		WK
12	-	0,9	635,7843	C15H1014N3P3[32]S3	WK

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 19: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "colon proximaal A vs W" model (een aanbevolen dieet versus een westers dieet)

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	2,59	144,0219		/
2	+	4,92	192,0564	C4H12N5P2	A
3	+	2,06	235,1181		A
4	+	5,32	327,116		A
5	+	2,45	375,2225	C14H29O5N7	A
6	+	5,22	400,1536		A
7	+	2,2	432,2081		A
8	+	2,41	432,2069		/
9	+	1,02	648,2402		A
10	+	4,92	653,2397	C35H36O6N5P1	A
11	-	0,86	202,0822		/
12	-	0,97	203,8852		/
13	-	0,9	230,114		/
14	-	1,02	245,075		A
15	-	1,05	354,1302		A
16	-	1,48	365,1385	C29H53O13N2P3	/
17	-	3,21	427,0316	C8H20011N3P3	W

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 20: Geselecteerde discriminerende (+/- modus) van het "colon proximaal A: K vs R" model (een aanbevolen dieet in combinatie met rood vlees en wit vlees (kip))

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	5,32	128,0193		AR
2	+	1,04	164,1262		AK
3	+	0,96	170,9807		AR
4	+	4,88	239,0758	C7H28O13N9[32]S1	AK
5	+	1,11	275,5131		AK
6	+	2,69	278,942	C2H11O13N9P3[32]S3	AR
7	+	2,78	311,1423		AK
8	+	1,01	314,0911		AK
9	+	1,66	318,0837		AK
10	+	2,82	366,9331		AR
11	-	1,22	248,023		AK
12	-	1,56	311,0439	C12H12O6N2P1	AK
13	-	0,89	379,1006	C14H15O7N6	AK

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 21: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "colon proximaal W: R vs K" model (een westers dieet in combinatie met rood vlees of wit vlees (kip))

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	1,4	129,5945	C5H25O1N9[32]S1	WR
2	+	1	183,0704		/
3	+	1,78	420,8682		WK
4	+	1,27	209,6292		WK
5	+	1,6	241,0555	C7H13O9	WK
6	+	1,09	257,0503	C16H29O6N5P1[32]S3	/
7	+	1,05	270,9966		WR
8	+	1,76	281,0329	C3H16O5N4P3	WR
9	+	0,99	335,0627		WR
10	-	0,97	288,1196	C9H26O2N2P2[32]S1	WR
11	-	5,4	306,1455	C13H28N2P2[32]S1	WK
12	-	0,95	434,0713		WK
13	-	0,9	572,9289	C10H9O12N9P2[32]S2	WR
14	-	0,92	515,7814	C9H10N3P3[32]S4	WK

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 22: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "colon distaal : R; A vs W" model (rood vlees in combinatie met een aanbevolen of een westers dieet)

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	3,71	144,0986		WR
2	+	4,74	160,0393	C4H1903N8P3	AR
3	+	4,98	286,0679	C3H1205N9[32]S1	WR
4	+	4,99	318,9294		WR
5	+	4,8	329,1371		WR
6	+	4,83	442,1991	C26H2603N4	WR
7	-	5,17	198,0056		AR
8	-	5,37	271,0951	C9H2007P1	/
9	-	1,77	322,8943	C1H109N5[32]S3	/
10	-	1,33	317,1002	C13H1304N6	AR
11	-	0,92	348,0089	C2H14012N4P2	WR
12	-	0,94	453,3741		AR

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 23: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "colon distaal : K: A vs W" model (wit vlees (kip) in combinatie met een aanbevolen dieet of een westers dieet)

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	1	150,0582	C4H1704N10P1	WK
2	+	1,07	180,9819	C1H402N5P1[32]S1	WK
3	+	4,4	246,9943	C5H308N4	WK
4	+	1,58	323,9911		WK
5	+	5,44	341,9408		WK
6	-	1,01	115,9908		WK
7	-	1,59	297,9382	C13H302N1P3	WK
8	-	1,56	338,0552	C3H12012N7	WK
9	-	0,98	406,0487	C12H21N6P3[32]S2	AK
10	-	0,88	658,7648		AK

Tabel 24: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "colon distaal A vs W" model (een aanbevolen versus een westers dieet)

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	2,66	316,0693	C1H14012N7	/
2	-	1,13	141,9956		A
3	-	5,17	198,0056		/
4	-	1,57	360,0074		/
5	-	1,22	436,5739		A
6	-	0,92	617,5496		/

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 25: Geselecteerde discriminerende ionen (+/- modus) van het "colon distaal A: R vs K" model (een aanbevolen dieet in combinatie met rood vlees of wit vlees (kip))

	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	0,95	87,1003		/
2	+	0,92	183,0845		/
3	+	2,61	188,0681	C3H9N8P1	AK
4	+	2,01	241,055	C14H31011N1P3	AK
5	+	0,98	241,9996	C2H9O2N6P3	AK
6	+	1,86	320,8964		AR
7	+	3,83	326,1458		AR
8	+	1,03	434,7792		AR
9	-	1,79	300,9217	C5H508N1P2[32]S1	AR
10	-	1,89	327,1079	C5H2307N5P2	AK
11	-	0,97	581,7092		/
12	-	0,91	606,8309		AK

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

Tabel 26: Geselecteerde discriminerende en geselecteerde ionen (+/- modus) van het "colon distaal W: R vs K" model (een westers dieet in combinatie met rood vlees of wit vlees (kip))

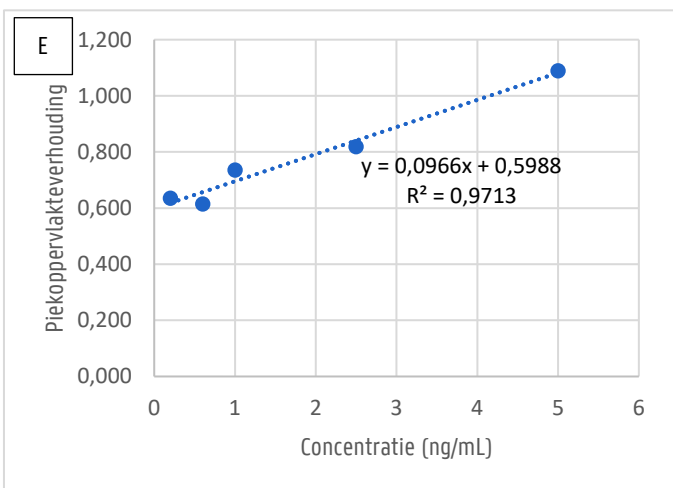
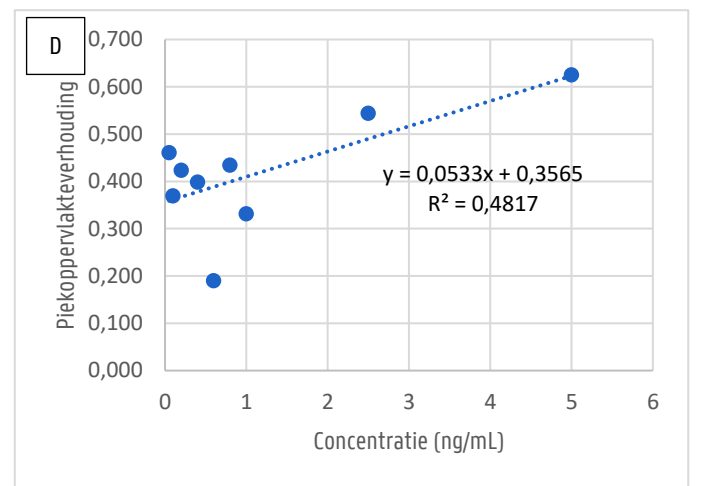
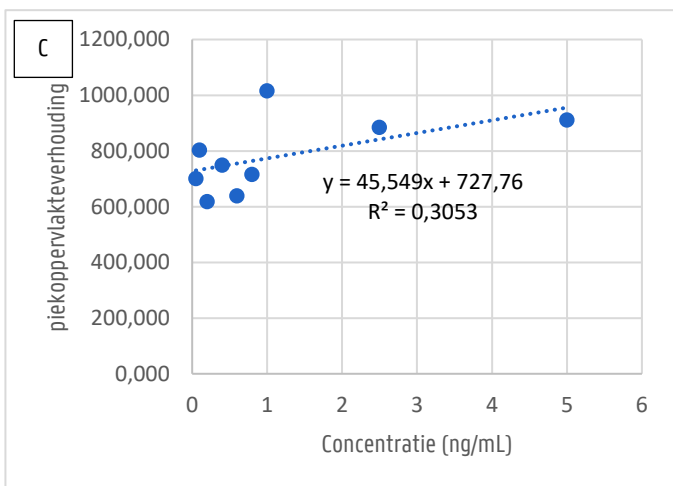
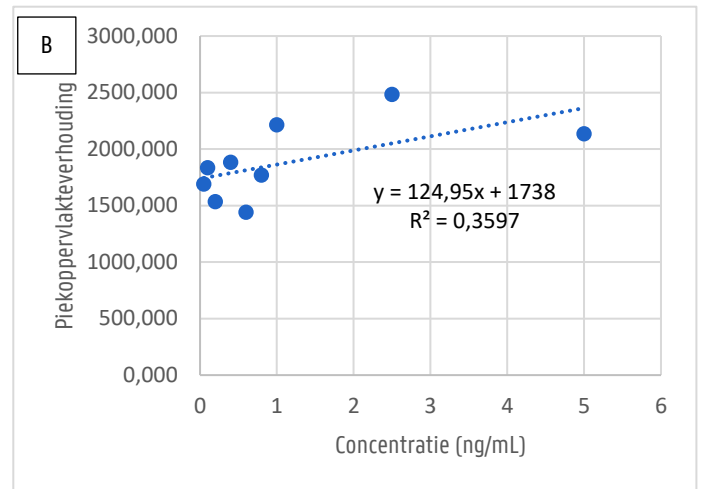
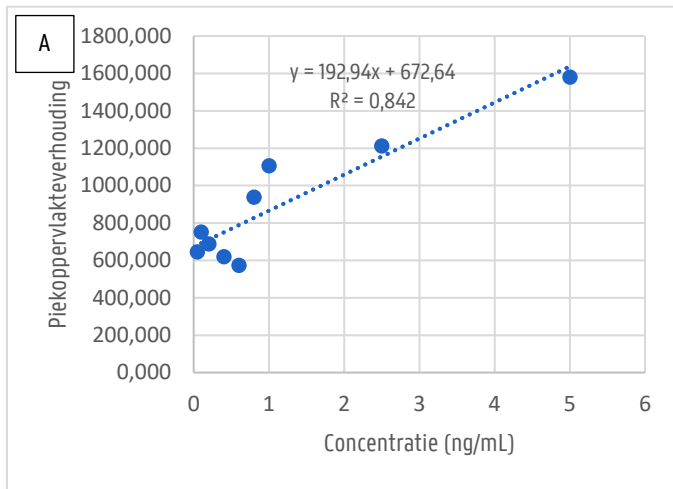
	+/- modus	RT (min)	<i>m/z</i>	Voorgestelde chemische formule	Discriminerend in/voor
1	+	1,78	238,935	C1H5010P2	WK
2	+	1,37	252,9958		WR
3	+	0,91	245,1127		WK
4	+	5,16	262,9633		WR
5	+	4,98	286,0679	C3H1205N9[32]S1	WR
6	-	3,54	601,3176	C18H5405N9P3[32]S1	WR
7	-	1,01	483,0125	C17H906N8P2	WR

^a Niet discriminerend in/voor een bepaald dieet = /

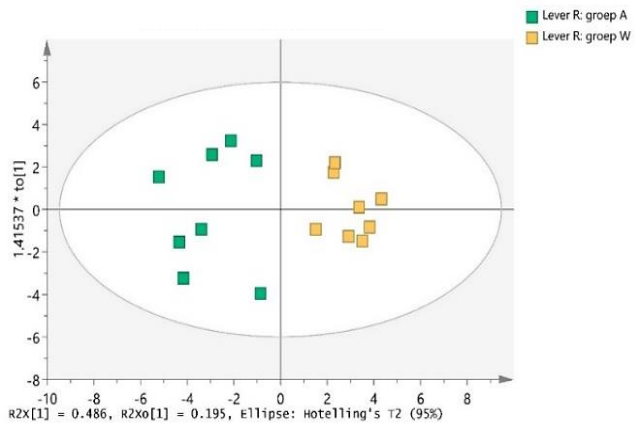
Tabel 27: DNA-concentraties (ng/mL) in de varkenstalen

	DNA-conc. (ng/mL) in lever	DNA-conc. (ng/mL) in ileum	DNA-conc. (ng/mL) in colon proximaal	DNA-conc. (ng/mL) in colon distaal
Aanbevolen-kip dieet				
Big 1	0,71582	0,9112	0,9784	0,7891
Big 5	0,5737	0,7694	1,3455	1,511
Big 12	0,5624	1,1371	1,1648	2,7062
Big 16	0,9046	1,3406	0,7534	1,3153
Big 19	0,6198	1,1438	1,1377	1,7646
Big 23	0,616	1,9728	1,2214	2,0947
Big 26	0,8509	1,2361	1,5239	1,4788
Big 30	0,6129	2,0828	0,811	0,8037
Aanbevolen-rood (en verwerkt) vlees dieet				
Big 2	0,6283	1,4635	0,8772	0,6333
Big 3	0,5668	0,8292	0,7739	1,6721
Big 10	1,5878	1,1622	1,3219	1,6892
Big 14	1,5143	1,2916	0,8215	1,483
Big 17	0,3909	0,9018	1,0996	1,3717
Big 21	0,5787	1,5168	1,0011	1,2317
Big 28	0,6974	1,1794	1,0247	0,8998
Big 32	1,3272	1,4643	1,1735	1,3269
Westers- kip dieet				
Big 6	0,5975	0,7382	1,266	0,965
Big 7	0,6438	1,2513	1,7201	0,8775
Big 9	0,5938	0,7199	1,0324	1,3634
Big 13	0,7421	1,0815	1,2043	1,6414
Big 20	1,4736	1,057	1,5988	1,2348
Big 24	1,1448	1,2895	1,3554	1,0416
Big 27	1,2994	1,8181	1,1958	1,5769
Big 31	0,3913	1,3479	0,8815	1,3965
Westers- rood (en verwerkt) vlees dieet				
Big 4	0,8055	1,4948	1,4558	1,5188
Big 8	0,7388	1,0913	0,9882	1,3091
Big 11	0,8896	1,1121	0,8141	0,9707
Big 15	0,514	1,2408	1,1066	0,9007
Big 18	1,0882	0,8988	0,9701	3,0911
Big 22	0,7752	1,4255	1,2193	2,0813
Big 25	1,1007	1,3259	1,3398	1,4309
Big 29	1,3162	1,8804	1,1301	1,4841

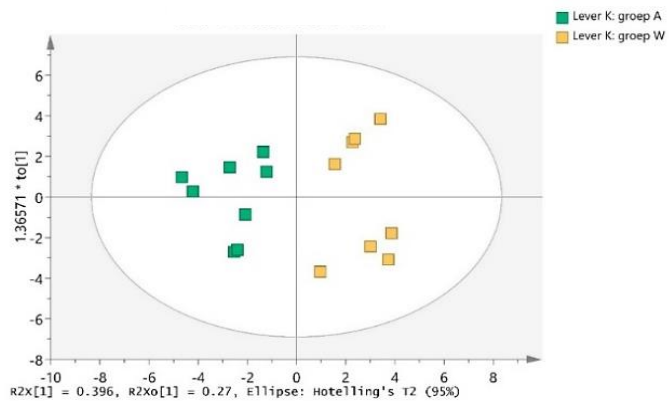
BIJLAGE VI: FIGUREN



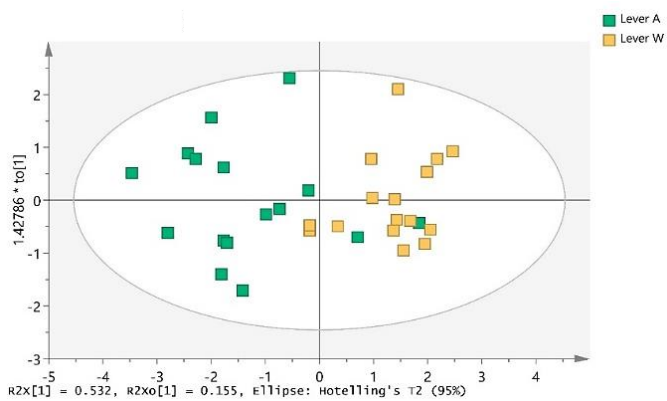
Figuur 1: Weergave van de ijklijnen waarbij de piekoppervlakteverhouding in functie staat van de concentratie (ng/mL): A) ijklijn van component N⁷-methylguanine B) ijklijn van component adenine C) ijklijn van guanine D) ijklijn van cytosine E) ijklijn van thymine



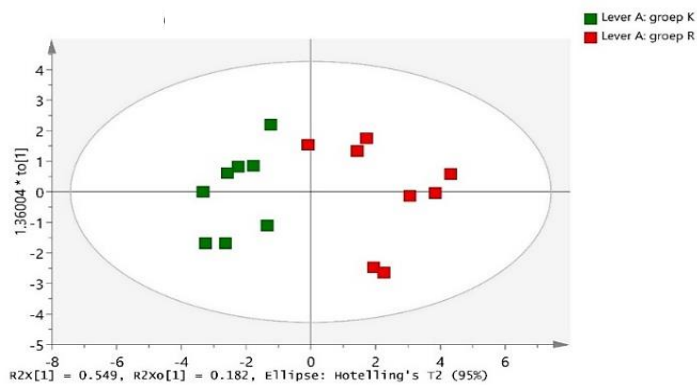
Figuur 2: Het OPLS-DA model "lever R: A vs W"



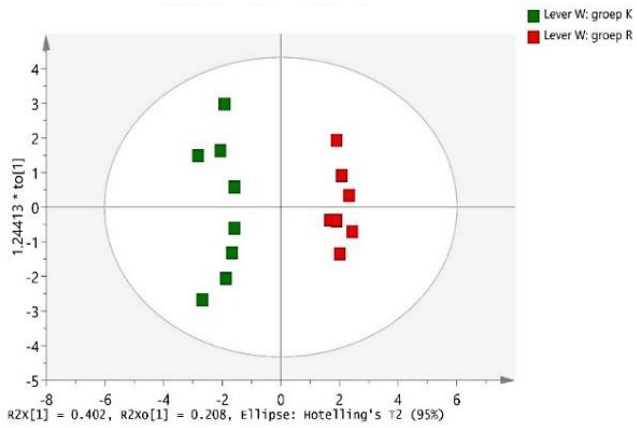
Figuur 3: Het OPLS-DA model "lever K: A vs W",



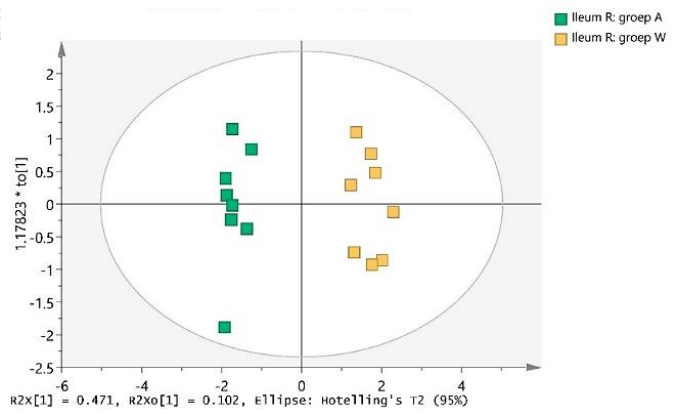
Figuur 4: Het OPLS-DA model "lever A vs W"



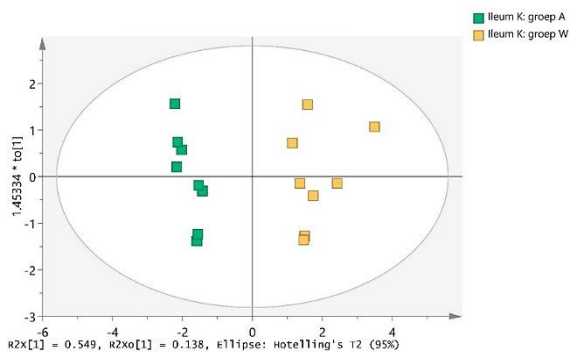
Figuur 5: Het OPLS-DA model "lever A: R vs K"



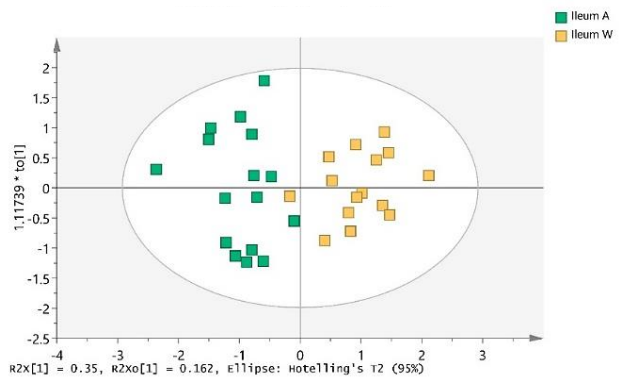
Figuur 6: Het OPLS-DA model "lever W: R vs K"



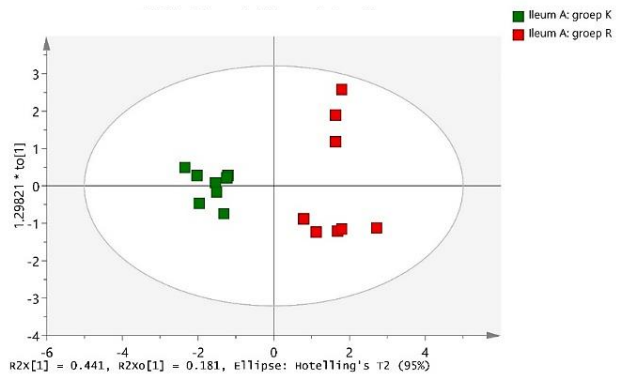
Figuur 7: Het OPLS-DA model "ileum R: A vs W"



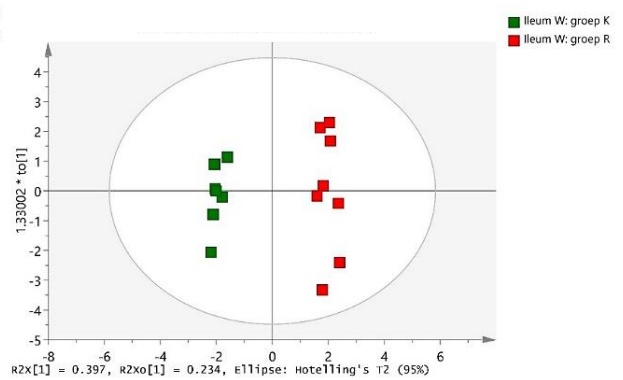
Figuur 8: Het OPLS-DA model "ileum K: A vs W"



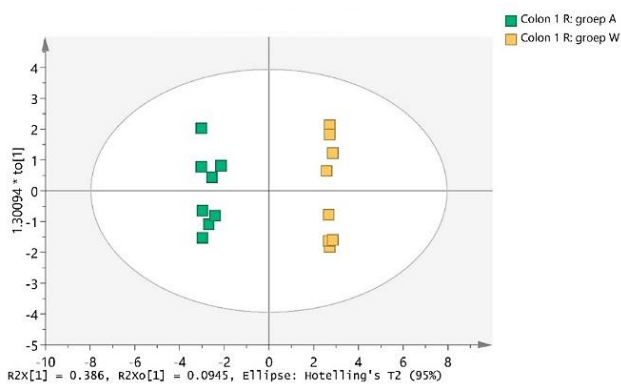
Figuur 9: Het OPLS-DA model "ileum A vs W"



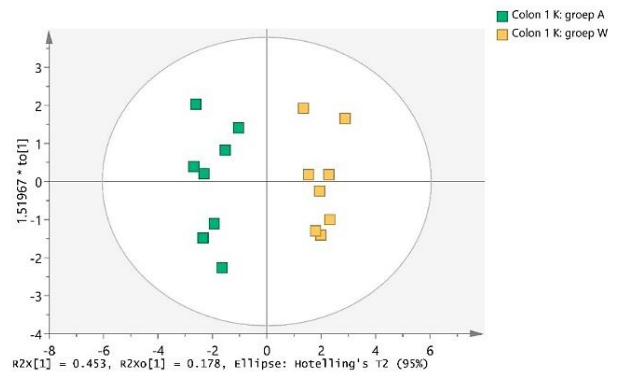
Figuur 10: Het OPLS-DA model "Ileum A: R vs K"



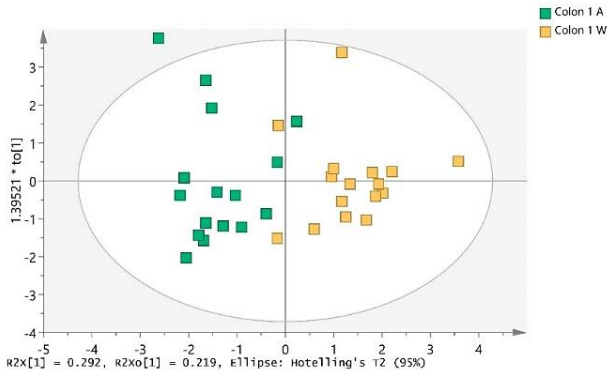
Figuur 11: Het OPLS-DA model "Ileum W: R vs K"



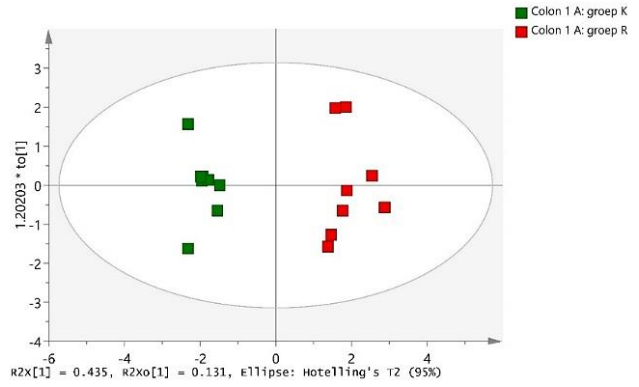
Figuur 12: Het OPLS-DA model "colon proximaal R: A vs W"



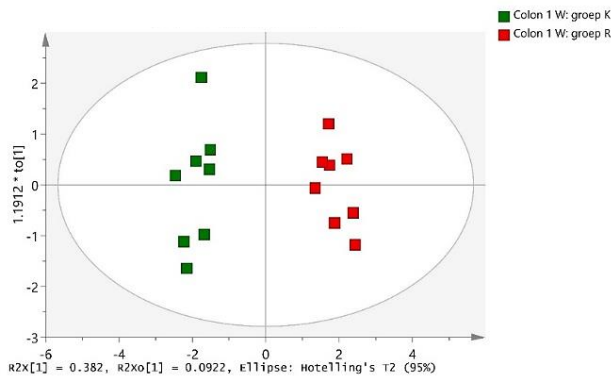
Figuur 13: Het OPLS-DA model "colon proximaal K: A vs W"



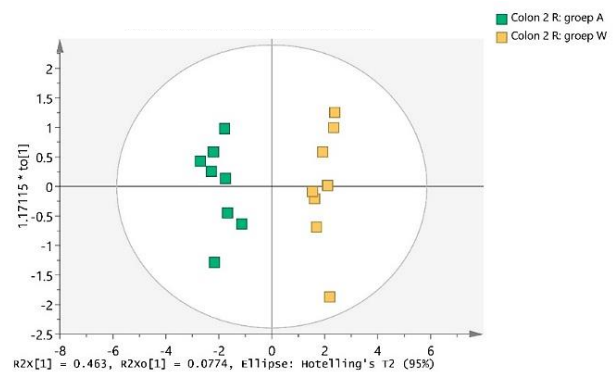
Figuur 14: Het OPLS-DA model "colon proximaal A vs W"



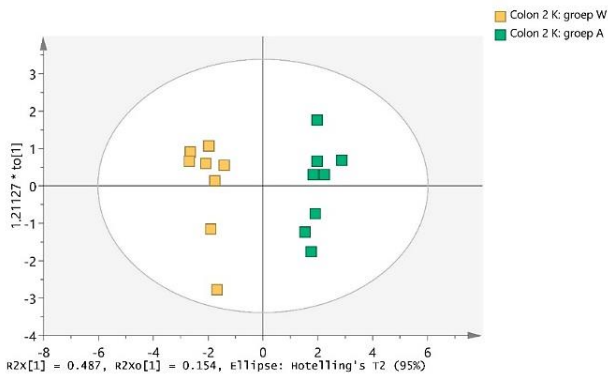
Figuur 15: Het OPLS-DA model "colon proximaal A: R vs K"



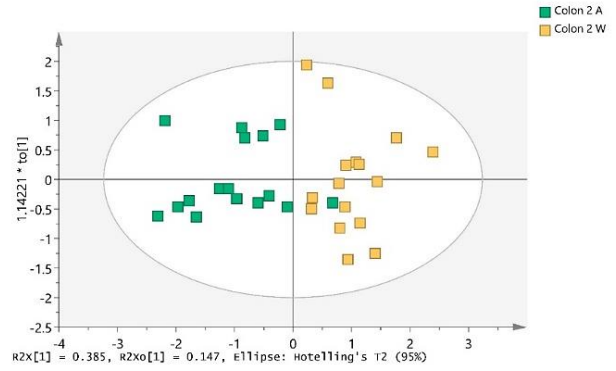
Figuur 16: Het OPLS-DA model "colon proximaal W: R vs K"



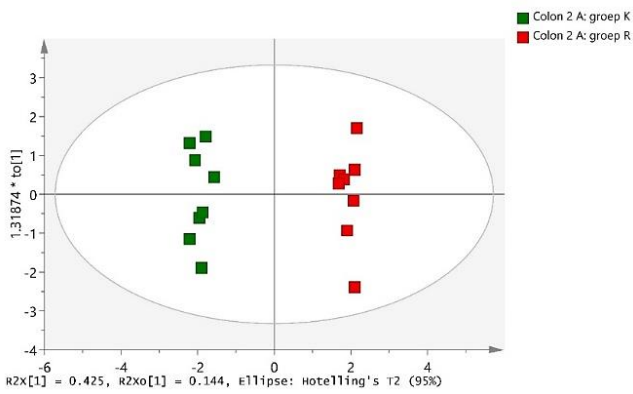
Figuur 17: Het OPLS-DA model "colon distaal R: A vs W"



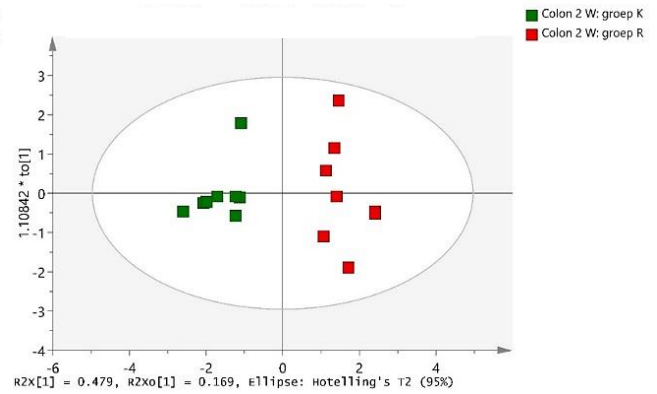
Figuur 18: Het OPLS-DA model "colon distaal K: A vs W"



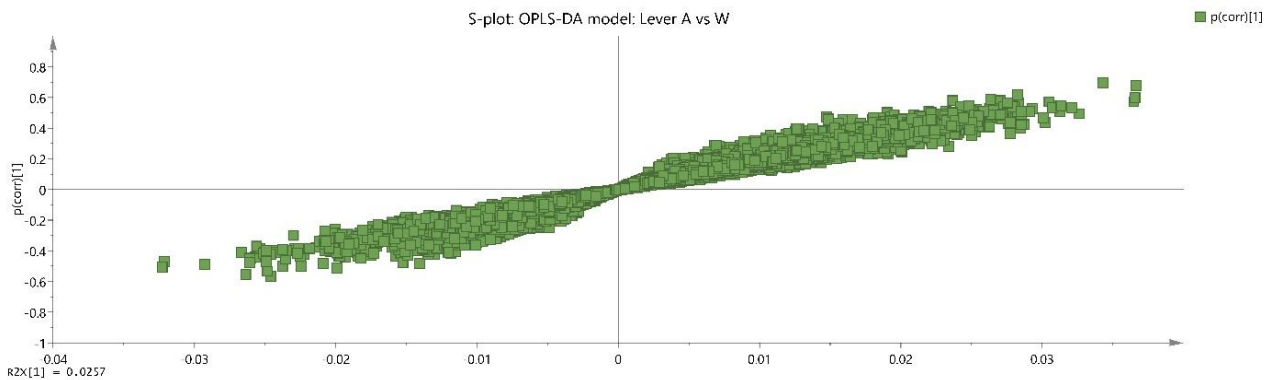
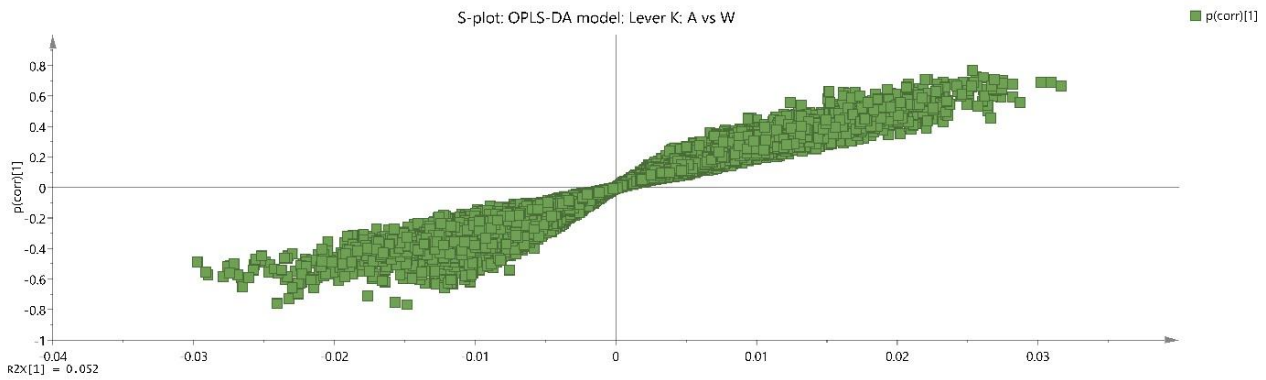
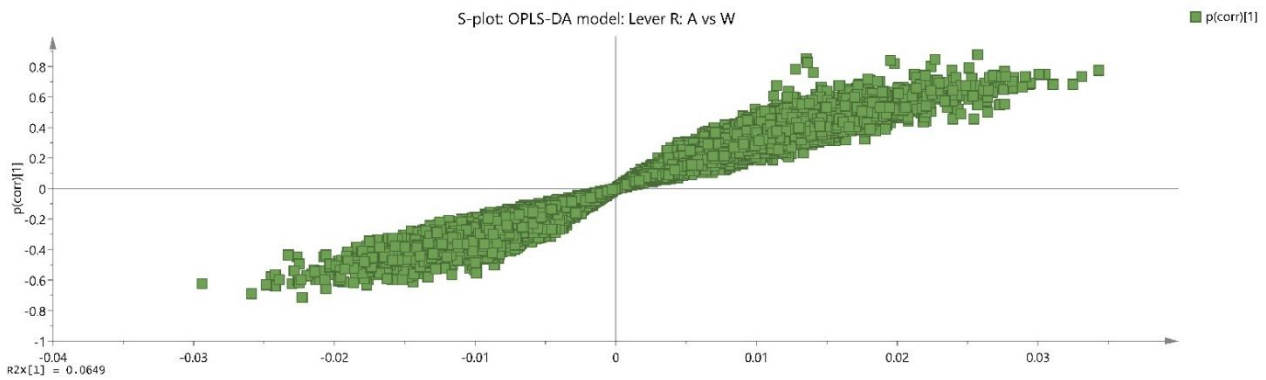
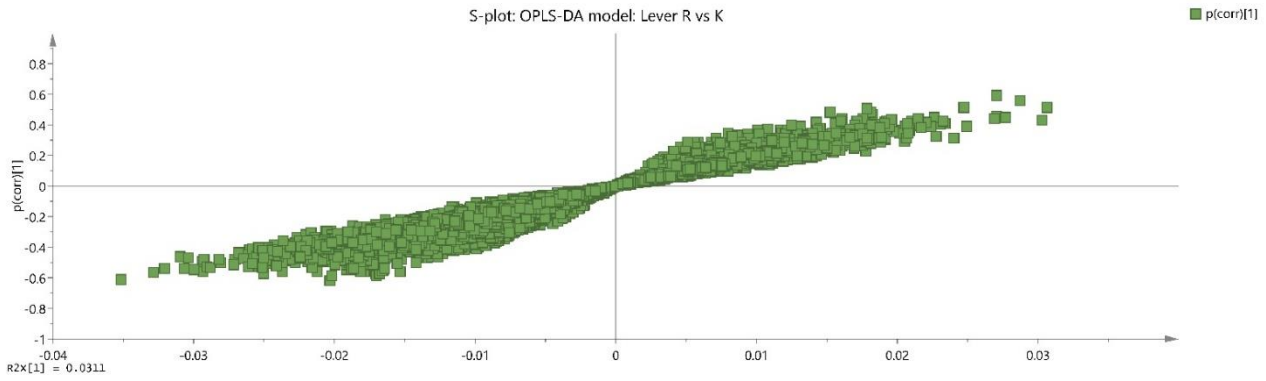
Figuur 19: Het OPLS-DA model "colon distaal A vs W"



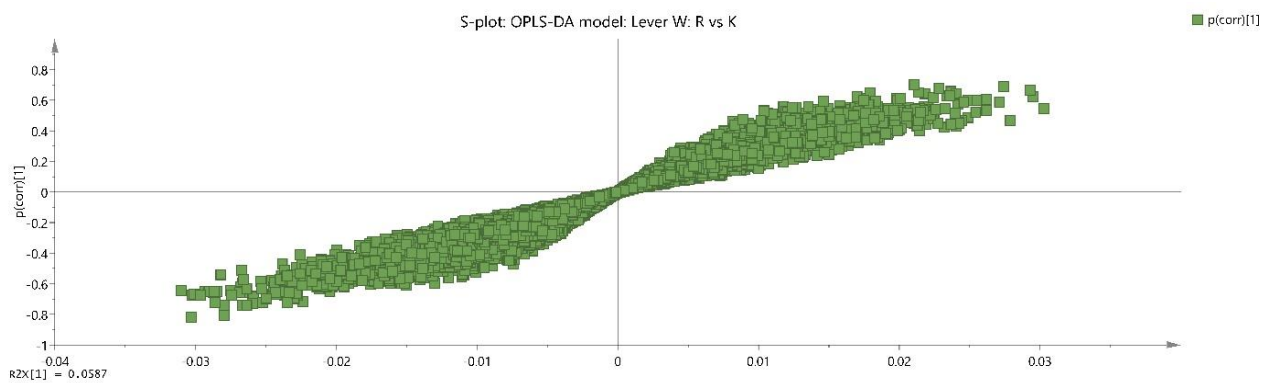
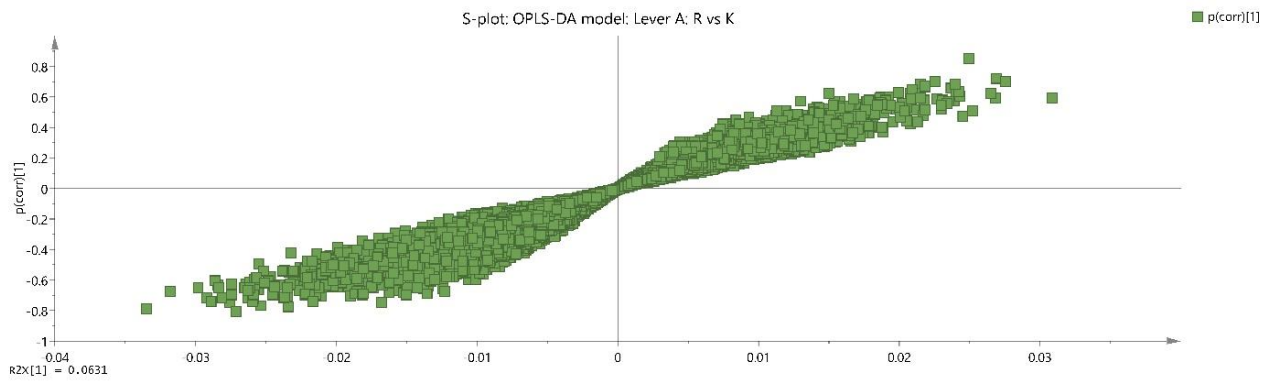
Figuur 20: Het OPLS-DA model "colon distaal A: R vs K"



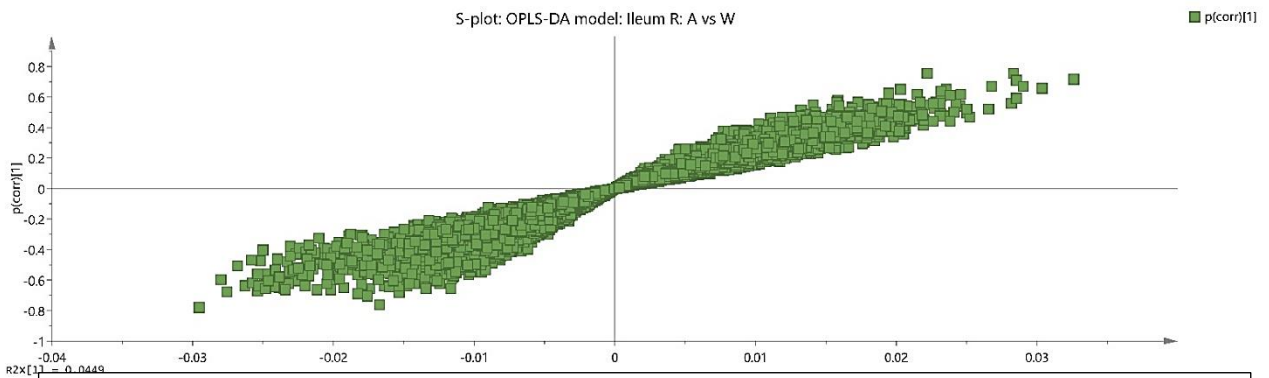
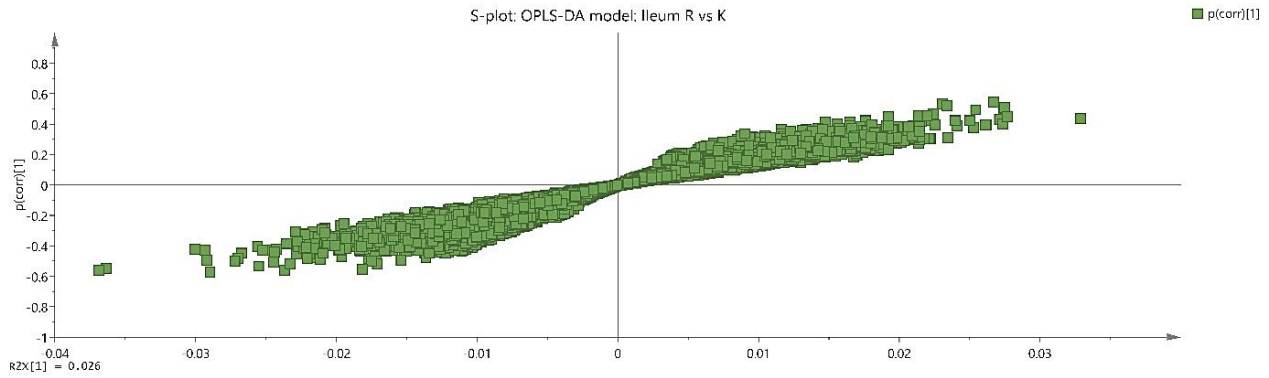
Figuur 21: Het OPLS-DA model "colon distaal W: R vs K"



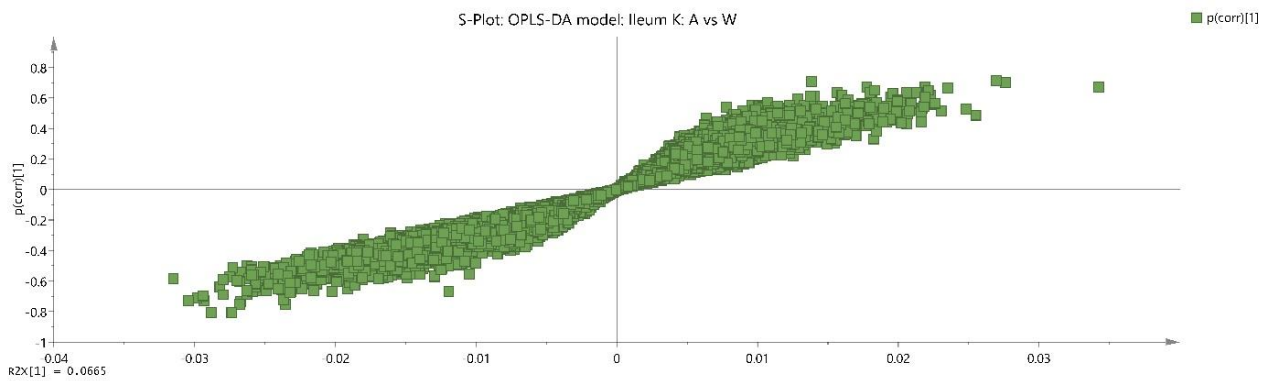
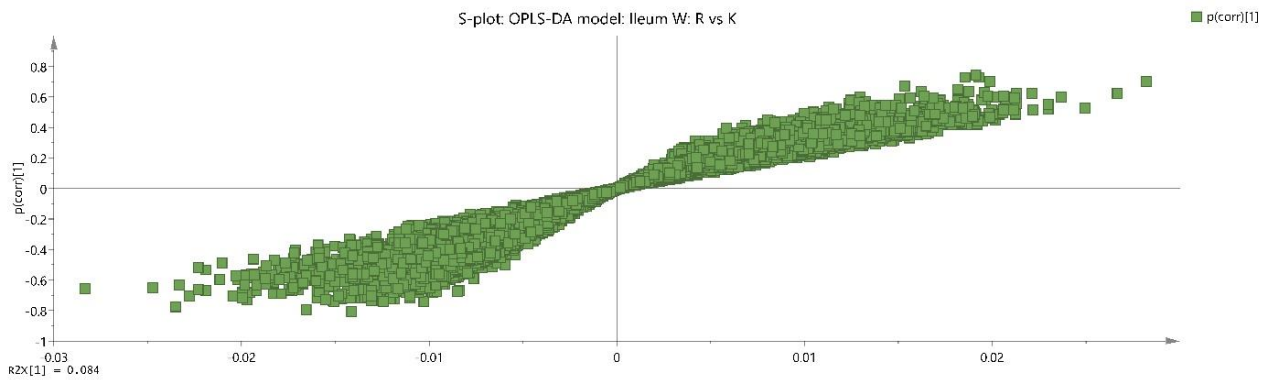
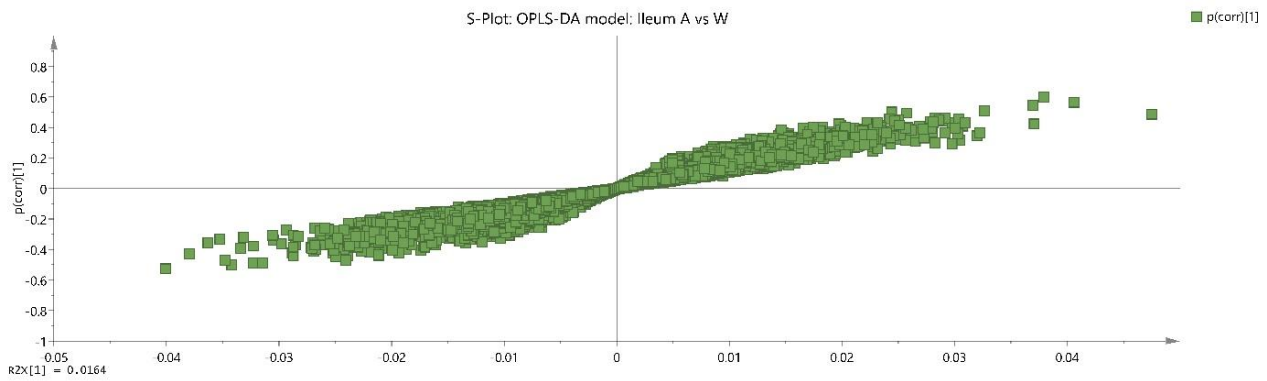
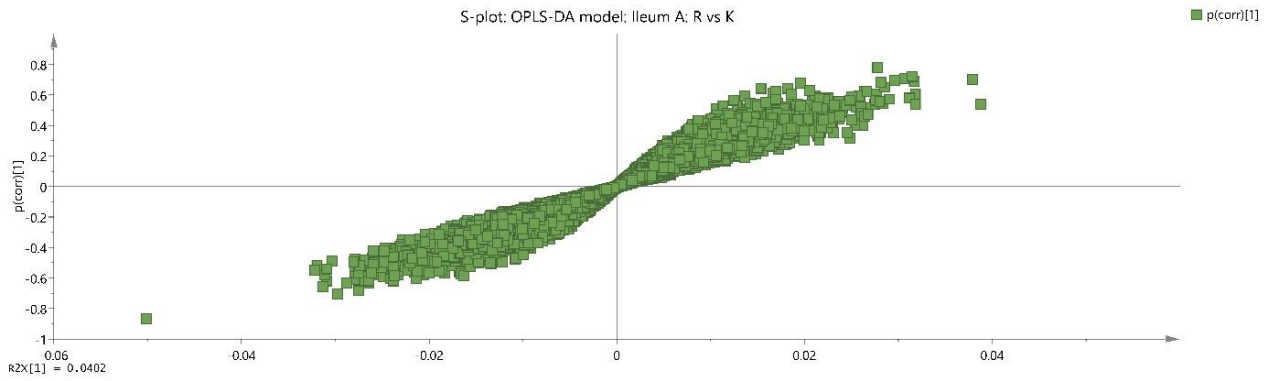
Figuur 22: S-plots van de lever OPLS-DA modellen op basis van alle ionen uit het massaspectrum



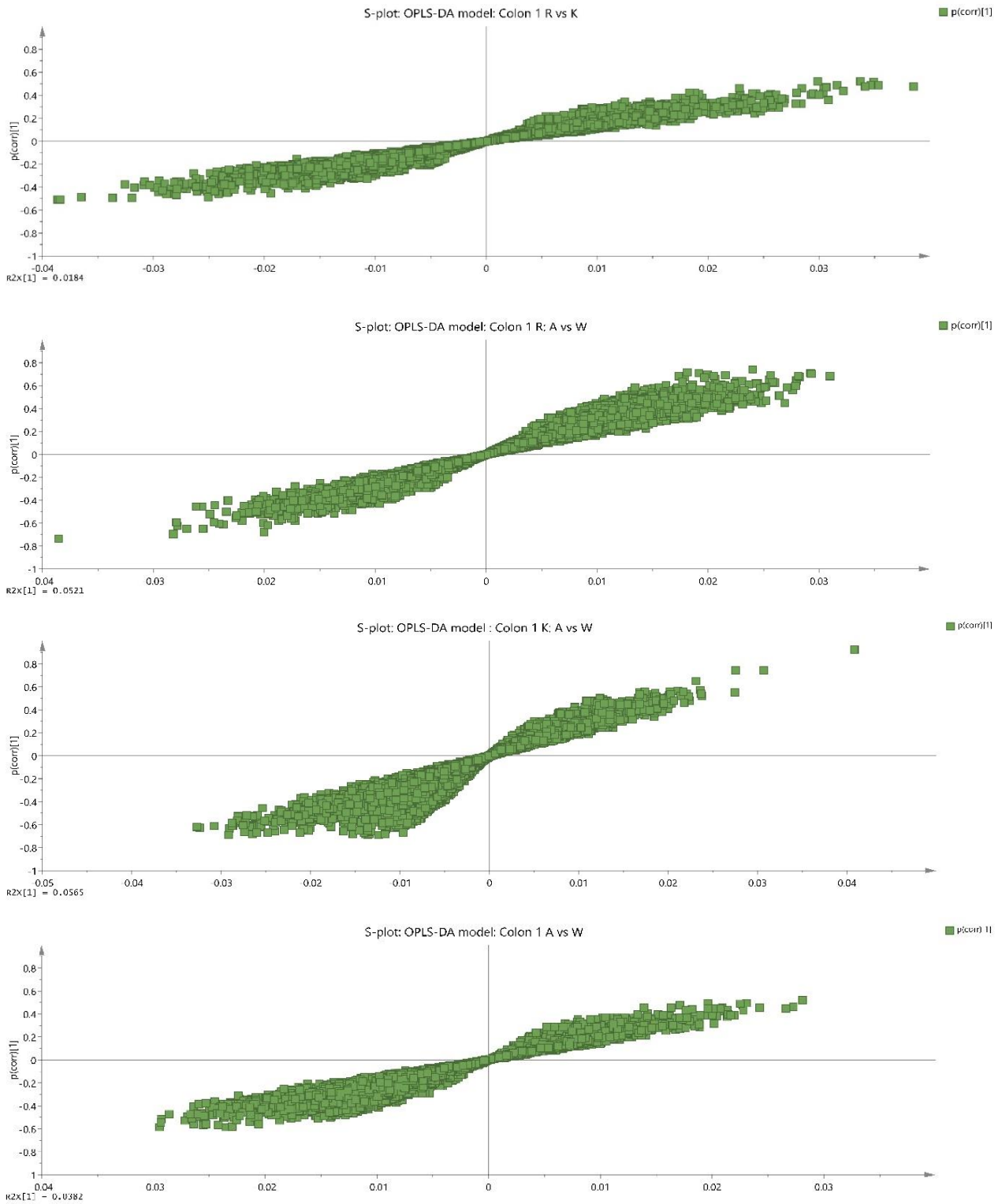
Figuur 22: S-plots van de lever OPLS-DA modellen op basis van alle ionen uit het massaspectrum (vervolg)



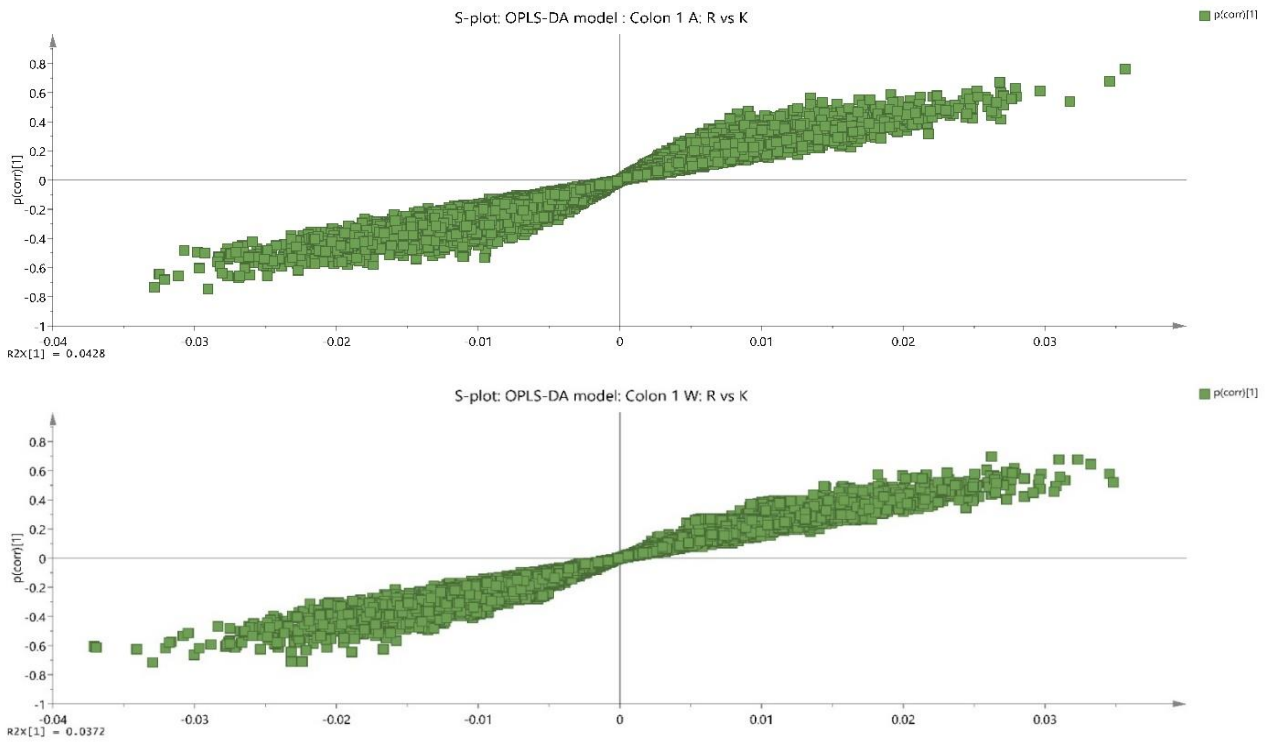
Figuur 23: S-plots van de ileum OPLS-DA modellen op basis van alle ionen uit het massaspectrum



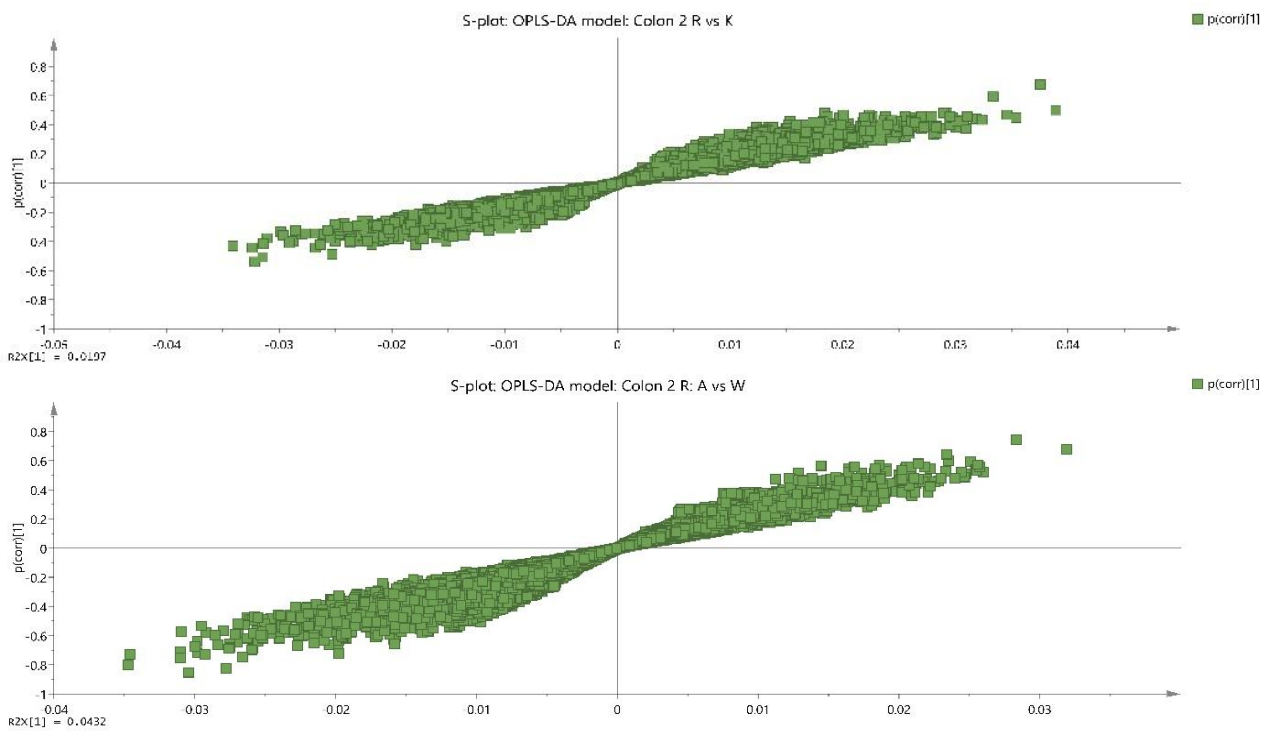
Figuur 23: S-plots van de ileum OPLS-DA modellen op basis van alle ionen uit het massaspectrum (vervolg)



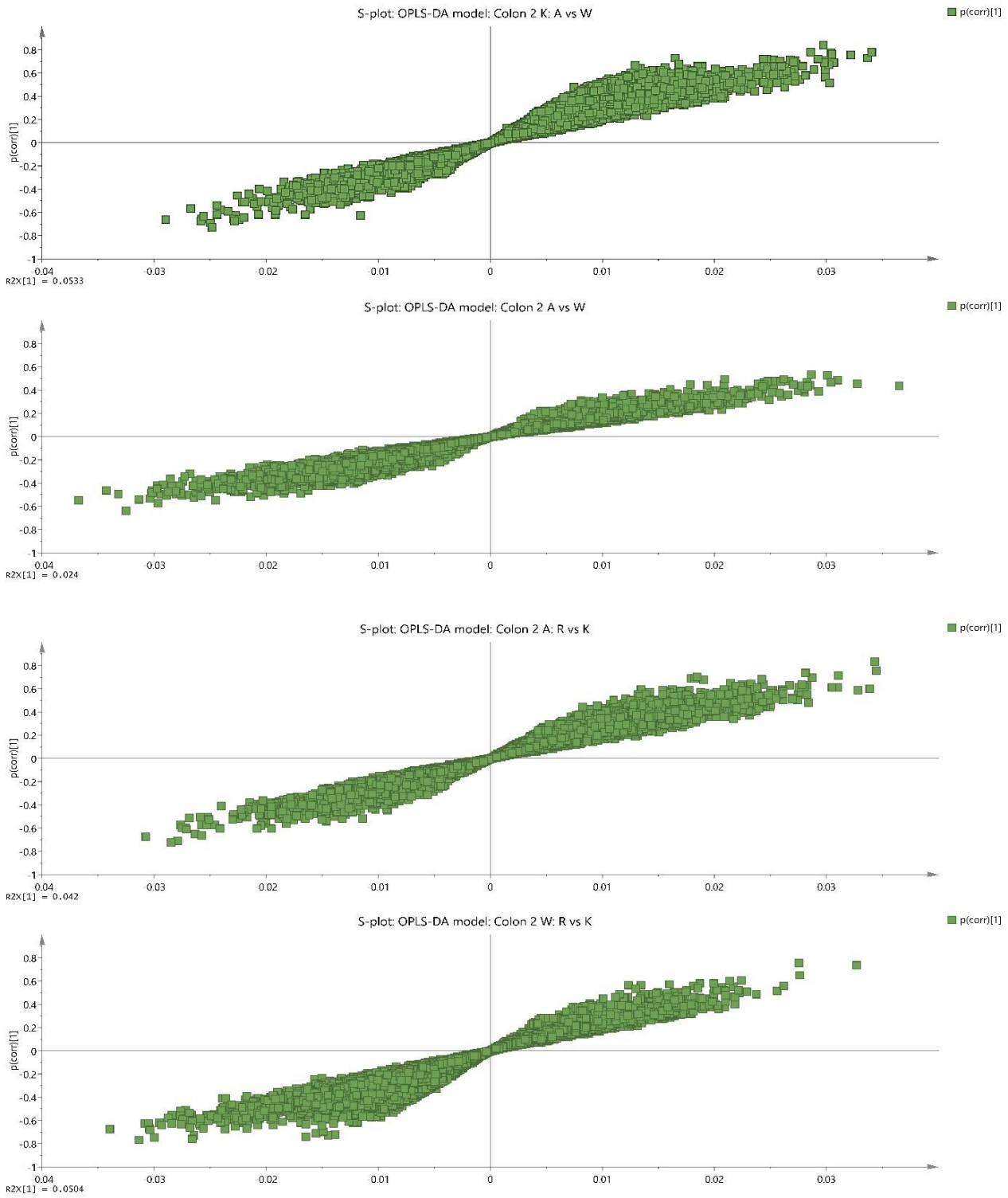
Figuur 24: S-plots van de colon proximaal OPLS-DA modellen op basis van alle ionen uit het massaspectrum



Figuur 24: S-plots van de colon proximaal OPLS-DA modellen op basis van alle ionen uit het massaspectrum (vervolg)



Figuur 25: S-plots van de colon distaal OPLS-DA modellen op basis van alle ionen uit het massaspectrum



Figuur 25: S-plots van de colon distaal OPLS-DA modellen op basis van alle ionen uit het massaspectrum (vervolg)

Collen-Francqui Leerstoel 2018-2019: 'Pillen zonder zorgen? De kunst van het geneesmiddelengebruik'

Prof. dr. Marcel Bouvy (12 februari 2019)

Prof. dr. Marcel Bouvy is sinds 1994 officina-apotheker in Apotheek Stevenshof in Leiden. Hij is tevens een gerenommeerd onderzoeker naar goed gebruik van geneesmiddelen. Het gebruik van geneesmiddelen wordt beslist op basis van evidence-based medicine. De waarden en overtuigingen van de patiënt, de klinische expertise en het best beschikbare bewijs werden hierbij in rekening gebracht. Vroeger bestond de taak van de apotheker er voornamelijk in alleen geneesmiddelen te bereiden. Hier kwam verandering in: de klemtoon is niet alleen verschoven naar distributie van medicatie, maar vooral naar de farmaceutische zorg. Productkennis blijft nog altijd even belangrijk. Een apotheker moet de nodige aandacht hebben voor verschillende problemen zoals het correct bewaren van medicatie bij de patiënt thuis, wat noodzakelijk is voor de correcte werking van het geneesmiddel. Een ander probleem is dat sommige patiënten moeite hebben met het openen van de verpakking. Het is aan de apotheker om voor dit probleem een oplossing te vinden. 5 tot 10% van de ziekenhuisopnames heeft als oorzaak verkeerd geneesmiddelengebruik; daarvan is de helft vermijdbaar. Naast de effectiviteit is de veiligheid dus een belangrijk aspect waarop de apotheker moet toezien. Beoordeling van medicatie houdt verschillende aspecten in: nagaan welke ziektes de patiënt heeft, nagaan welke medicatie de patiënt gebruikt en luisteren naar de patiënt. Op die manier kan de apotheker achterhalen wat voor de patiënt belangrijke gezondheidscriteria zijn, en hoe therapietrouw hij is. Er kunnen m.a.w. fouten gebeuren in het gehele proces, zowel bij het voorschrijven, als het ophalen, afleveren en het innemen en uiteindelijk in het klinisch effect van het geneesmiddel. Er is vooral een daling in therapietrouw tussen het afleveren en het innemen van de medicatie. De patiënten denken er niet aan de nodige medicatie te nemen. Er zijn verschillende mogelijkheden om dit te stimuleren o.a. wekker gebruiken, app gebruiken, of de patiënt contacteren. De apotheker bezit een unieke kennis over geneesmiddelen en gezondheid, en heeft de taak deze kennis en informatie op een begrijpbare manier aan de patiënten over te brengen.

Pharmacogenetics: do you have your DNA passport?

Prof. dr. Ron van Schaik (21 maart 2019)

In de farmacogenetica wordt onderzoek gedaan naar variaties in het DNA die de reactie van een individu op een medicijn kunnen beïnvloeden of die m.a.w. de effectiviteit ervan beïnvloeden. Bijwerkingen of het niet werken van medicatie kunnen hierdoor verklaard worden. Voor een optimale behandeling is het belangrijk dat het juiste geneesmiddel, in de juiste dosis aan de juiste patiënt gegeven wordt; dit is precision medicine. Hoe goed een geneesmiddel werkt, hangt af van de dosering, de nierfunctie en de metaboliserende capaciteit van de lever. Cytochroom P40 enzymen zijn enzymen die 80% van de geneesmiddelen omzetten. Er zijn verschillende types, onder andere CYP 3A4, CYP 2D6. De werking van deze enzymen verschilt van persoon tot persoon. Er zijn trage, intermediaire, normale of ultrasnelle metaboliseerders. De verklaring hiervoor is farmacogenetica. Bij het CYP 2D6 enzym bijvoorbeeld kan er variatie zijn in het allel, dat codeert voor dit enzym. Sommige varianten zijn nog actief, andere leiden niet langer tot werking. Een groot aantal geneesmiddelen wordt gemetaboliseerd door CYP2D6. In de psychiatrie worden antidepressiva gebruikt die vaak niet werken. Algemeen worden de bloedspiegels na een week gemeten en wordt de dosis aangepast tot de werking optimaal is. Een andere mogelijkheid is de startdosis bepalen door vooraf vast te stellen welk type metaboliseerder de patiënt is. Trage metaboliseerders bijvoorbeeld hebben een lagere dosis nodig dan snelle metaboliseerders. Trage metaboliseerders hebben sneller de kans op hoge concentraties, met meer kans op bijwerkingen, wat kan leiden tot non-compliance met geen werking tot gevolg. Anderzijds kunnen snelle metaboliseerders snel onder het therapeutisch venster zitten, waardoor eveneens geen werking is. Ook in de cardiologie, in de oncologie en bij pijnbehandeling is het bepalen van het type metaboliseerder belangrijk. 90% van de mensen hebben variatie in hun genoom. Het is mogelijk op specifieke plaatsen in het genoom te gaan kijken of er mutaties zijn. Deze informatie wordt weergegeven op een kaartje en kan afgegeven worden aan arts of apotheker.

Precision medicine in respiratory disease, are we beyond fiction?

Prof. Dr. Anke-Hilse Maitland-van der Zee (4 april 2019)

Respiratoire aandoeningen zijn één van de grootste doodoorzaken. Er wordt verwacht dat er tegen 2025 410 miljoen COPD-patiënten, meer dan 400 miljoen astmapatiënten en 2.5 miljoen nieuwe gevallen van longkanker zullen zijn. Een inhalatiecorticosteroïd (ICS) is samen met een bronchodilator de standaardbehandeling voor astmapatiënten. ICS gaat de ontsteking in de luchtwegen tegen. De bronchodilator zorgt ervoor dat er geen vernauwing van de luchtwegen is. Beide moeten levenslang worden ingenomen. Deze behandeling geneest de ziekte niet, het verbetert enkel de symptomen. Er zijn patiënten van wie de toestand goed onder controle te houden is; bij andere is dit gedeeltelijk of zelfs helemaal niet het geval. Deze laatste ongecontroleerde populatiegroep ondervindt dus geen verbetering van de klachten door de behandeling en raakt vaak geïsoleerd waardoor de patiënten niet meer deelnemen aan activiteiten. Astma is een aandoening met verschillende karakteristieken. Verschillende biologische oorzaken kunnen aanleiding geven tot deze ziekte. Aangezien er verschillen zijn tussen patiënten, zal niet elke behandeling even goed werken bij elke patiënt. Het is dus belangrijk om elke patiënt individueel een optimale behandeling te geven a.d.h.v. precisie medicatie. Men maakt hiervoor onder andere gebruik van farmacogenetica om na te gaan of genetische factoren een invloed kunnen hebben op de behandeling. Er wordt naar SNP's gezocht, die geassocieerd zijn met de longfunctie of met exacerbaties. Deze worden vervolgens gelokaliseerd in een bepaalde locus in een chromosoom, die dan een invloed kunnen hebben op de longfunctie. Op basis van het genotype kan vervolgens de behandeling met ICS en/of LABA aangepast worden. Een andere mogelijkheid is het gebruik maken van metabolomics. Hierbij worden met behulp van de spironose metabolieten gedetecteerd in de uitgeademde lucht. Deze metabolieten worden vergeleken tussen verschillende groepen: gezonde individuen, astmapatiënten, COPD-patiënten en longkankerpatiënten. Diezelfde data geven ook 5 clusters van genotypes. Aan de hand van deze gegevens kan bepaald worden of iemand een bepaalde longziekte heeft en welke behandeling voor deze persoon optimaal is.

Masterproef voorgelegd aan de faculteit Farmaceutische Wetenschappen, uitgevoerd i.s.m. het Laboratorium voor Chemische Analyse, Vakgroep Veterinaire Voedselveiligheid en Volksgezondheid, Universiteit Gent, Faculteit Diergeneeskunde

Promotor: Prof. dr. L. Vanheacke

Commissarissen: Prof. dr. S. De Saeger en dr. L. Van Meulenbroek

De informatie, conclusies en standpunten opgenomen in deze masterthesis zijn op rekening van de auteur en vertegenwoordigen niet noodzakelijk de mening van de promotor of zijn/haar onderzoeksgroep.

