

Samenvatting

Het projectvoorstel werd geschreven met het ‘grotere beeld’ in het achterhoofd, een klassiek diagnostisch doel, dat gemakkelijk te vertalen is naar praktische toepassingen in de menselijke gezondheidszorg: identificatie van multi-mycotoxineprofielen in biologische monsters, geassocieerd met de incidentie van colorectale of hepatocellulaire carcinogenese, om zo een onderscheid te maken tussen de zieken en de gezonde controlegroep. Voorlopige gegevens toonden echter al snel een zeer lage correlatie aan tussen het kwantificeren van indirecte, externe blootstelling door middel van dieetanalyse, en directe, interne blootstellingsmetingen door middel van kwantitatieve analyse van bloed- of urinestalen van de European Food Consumption Validation (EFCOVAL) project cohort. Op basis van deze bevindingen werden de projectdoelstellingen dynamisch geheroriënteerd met als doel het maximaliseren van de waarde van de gegenereerde data.

Hoewel de externe metingen werden gezien als variabel, werd dit aspect van het onderzoek uitgevoerd door promotor Dr. Inge Huybrechts en masterstudenten Lore De Crop en Mona Delagrangé van het IARC in Lyon, Frankrijk. De andere kant van deze onevenwichtige vergelijking, interne metingen, zou aan de Universiteit Gent ontwikkeld worden langs twee complementaire assen: de opname van gemetaboliseerde vormen, en de verbetering van de signaalsterkte. De eerste voorzorgsmaatregel bij gerichte detectiemethoden is ervoor te zorgen dat de juiste doelwitten worden gevolgd, aangezien chemische modificaties van mycotoxine doelwitten bij het passeren van het lichaam kunnen leiden tot valse-negatieve resultaten. Gezien de lage niveaus van toxische moleculen die naar verwacht-

ing gevonden zullen worden onder de EFCOVAL cohortdeelnemers, mits de deelnemers gezond moesten zijn voor opname, was het streven naar de doel-moleculen in elk monster zo efficiënt mogelijk te laten detecteren door het instrument.

Het *in vitro* metabolisme van verschillende mycotoxinen, waaronder aflatoxine B1, citrinine, deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol, ochratoxine A, T-2 toxine en zearalenone werd onderzocht met behulp van levermicrosomen van zowel dieren als mensen. Gebruikmakende van deze methode konden sommige metabolieten in kleine hoeveelheden worden geproduceerd die voldoende waren voor de ontwikkeling van gerichte massaspectrometrische methoden. Dit zou een uitgebreidere screening op de blootstelling aan mycotoxinen vergemakkelijken. Sommige metabolieten die in de literatuur werden gerapporteerd, werden echter niet waargenomen door deze *in vitro* productiemethode, zoals dihydrocitrinone. Mogelijk zijn gecompliceerdere systemen nodig om een breder spectrum van mogelijke metabolieten te produceren, of met voldoende opbrengst voor gebruik bij de ontwikkeling van gerichte analysemethoden.

Massaspectrometrische methoden voor de detectie van mycotoxinen en verschillende bekende metabolieten werden verfijnd en aangepast voor opname in één enkele analysemethode. Dit vereiste enig compromis met betrekking tot het maximaliseren van de signaalsterkte van elk doelwit, en tevens te garanderen dat er tegelijkertijd 60 doelwitten in een enkele reeks gedetecteerd kunnen worden. Verdere optimalisaties van de chromatografische scheiding van deze doelwitten maakten een analysetijd per monster van minder dan 15 minuten mogelijk.

Bij het voorbereiden van verschillende soorten monsters voor analyse werden verschillende ontwikkelingen gerealiseerd om de procedures voor de extractie van analytische targets uit menselijke serum- en urinestalen te versnellen en te vereenvoudigen. Deze matrices bleken zeer variabel qua samenstelling te zijn tussen de verscheidene proefstalen en, in het geval van urine, zelf tussen monsters van dezelfde persoon. Daarom was een nauwkeurig

en uitgebreid gebruik van interne normen voor het normaliseren van de waargenomen signalen van het grootste belang.

Na de ontwikkeling van complete analysemethoden, van monstervoorbereiding tot dataverzameling, werden echte monsters van het EFCOVAL-project geanalyseerd. Indirecte, externe blootstellingsmetingen werden uitgevoerd met behulp van twee 24-uur dieetenquêtes (24-HDR) in combinatie met gegevens van de European Food Safety Authority (EFSA) over de mycotoxinebesmetting van voedselproducten. Directe, interne blootstellingsmetingen werden uitgevoerd met behulp van serum en twee 24-uurs urinecollecties. Elk monster werd enkele weken van elkaar genomen, hoewel elk van de twee 24-HDR's dezelfde dag bestreek waarop de 24-uurs urinestalen werden genomen.

De verschillende soorten blootstellingsmetingen werden vergeleken in overeenstemming met de screening op positieve of negatieve detecties, alsook in termen van gekwantificeerde mycotoxineblootstelling. Er werden matige correlaties waargenomen tussen twee tijdstippen voor metingen van hetzelfde type, en er werden enkele significante correlaties waargenomen tussen de niveaus gemeten in serum- en urinestalen. Er waren echter zeer weinig significante positieve correlaties tussen de berekende 24-HDR-blootstelling en de in beide biologische monsters gedetecteerde niveaus.

Metingen van de blootstelling aan mycotoxinen in biologische vloeistoffen lijken beter te zijn voor het onderzoek naar acute blootstelling dan chronische blootstelling. Verder onderzoek is nodig om een overbrugging te maken tussen de interpretatie van gegevens met een lage resolutie die grote gebieden en hele oogstseizoenen vertegenwoordigen, en gegevens met een hoge resolutie die representatief zijn voor het individu op een tijdschaal van uren. Bovendien kan een metabolomische profilering van mycotoxineblootstellingen via de voeding niet alleen helpen bij een uitgebreide beoordeling van acute blootstellingen, maar ook bij de identificatie van specifiek chronische blootstellingsbiomarkers. Een dergelijke gedetailleerde karakterisering zou helpen om de blootstelling van de bevolking te beoordelen en bij de interpre-

tatie van transversale onderzoeken.