

Samenvatting

Slokdarmkanker behoort tot de twaalf meest voorkomende kankers wereldwijd, waarbij er twee primaire histologische vormen bestaan: slokdarmadenocarcinoom en slokdarm plaveiselcelcarcinoom (SPCC). Deze tweede vorm is de meest voorkomende histologische vorm en is verantwoordelijk voor meer dan 90% van alle slokdarmkanker-gevallen wereldwijd. SPCC vertoont een uitgesproken geografische spreiding, met de hoogste incidentiecijfers in Oost- en Zuidelijk Afrika (de Afrikaanse SPCC -corridor) en Zuidoost-Azië (de Aziatische SPCC-corridor). Alcohol en tabak zijn bekende risicofactoren voor SPCC, terwijl hete dranken, blootstelling aan rook van biomassa, slechte voeding, mondhygiëne en het gebruik van niet-leidingwater vermoedelijke risicofactoren zijn.

Hoewel DNA-schade een noodzakelijke stap is in de ontwikkeling van kanker, is de relatie tussen externe schadelijke invloeden en interne schade (d.w.z. DNA-schade) in de pathogenese van SPCC nog onvoldoende begrepen. DNA-adducten zijn belangrijke biomarkers van covalente modificaties van DNA, en vormen een essentiële stap in chemische carcinogenese. Gezien de cruciale rol van externe invloeden (het externe exposoom) en hun overeenkomstige biologische consequenties/responsen (het interne exposoom, in de context van DNA-adducten), was het primaire doel van dit doctoraatsonderzoek het vaststellen van de associatie tussen omgevings-, leefstijl- of voedingsblootstellingen (de specifieke componenten van het externe exposoom, besproken in **Hoofdstuk 3**) en de predispositie tot DNA-adductvorming. Vervolgens werd het verband na gegaan tussen DNA-adduct vorming en een verhoogde SPCC-risico bij personen die wonen in gebieden met een hoge SPCC-incidentie in Afrika (**Hoofdstuk 7**).

Hoofdstuk 1 is het inleidende hoofdstuk en biedt een uitgebreid overzicht van de ontwikkeling van kanker, met bijzondere aandacht voor de etiologie van SPCC. Er wordt ingegaan op huidige epidemiologische studiedesigns en hun beperkingen bij het aanpakken van de kennishiaten in de etiologie van ESCC. Om de kennis over de etiologie van slokdarmkanker te vergroten, wordt een paradigmaverschuiving voorgesteld: van traditioneel hypothese gedreven onderzoek, zoals vaak toegepast in epidemiologische studies, naar meer ongelimiteerd hypothesevrij onderzoek met gebruik van het exposoom-concept. Verder in dit hoofdstuk worden de essentiële elementen van DNA-adduct(omic)-analyse besproken.

Hoofdstuk 2 bespreekt de onderzoek hiaten in de etiologie van SPCC en presenteert de doelstellingen van dit onderzoek. Naast het primaire doel (**Hoofdstuk 7**) en het overzicht van het externe exposoom van SPCC (**Hoofdstuk 3**), had dit onderzoek als doel: 1) het vaststellen van kennis, attitudes en praktijken (KAP) die samenhangen met een verhoogd SPCC-risico in Sub-Sahara Afrika (SSA) (**Hoofdstuk 4**); 2) het uitvoeren van een pilootstudie met een (on)gerichte DNA-adductomics-benadering als *proof-of-concept* (**Hoofdstuk 5**); en 3) het ontwikkelen van een gerichte DNA-adductmethode voor de gelijktijdige kwantificering van oxidatieve en alkylerende adducten in DNA-monsters van humane leukocyten (**Hoofdstuk 6**).

Hoofdstuk 3 presenteert een kritisch overzicht van leefstijl-, sociaaleconomische, omgevings- en voedingsfactoren die geassocieerd zijn met een hoger SPCC-risico. De voornaamste risico's zijn externe blootstellingen zoals alcohol- en tabaksgebruik, consumptie van hete dranken, blootstelling aan biomassa-brandstof, mycotoxinen en een gebrekkige mondhygiëne. Een kritieke paradox is echter dat, hoewel de meeste van deze factoren modificeerbaar zijn, de incidentie van SPCC in SSA zorgwekkend stijgt. Deze stijging duidt op een significant kennisdeficit betreffende de specifieke etiologie van ESCC binnen deze hoog-risicopopulaties. Aangezien de onderliggende moleculaire mechanismen die externe carcinogenen aan de ziekte linken onvolledig begrepen zijn, biedt dit een unieke kans om de rol van het interne exposoom in de pathogenese van SPCC verder te exploreren.

Hoofdstuk 4 beoordeelde de KAP met betrekking tot een verhoogd SPCC-risico bij personen die wonen in SPCC-endemische regio's van SSA. Hoewel etiologisch bewijs (zie **Hoofdstuk 3**) het kritieke aandeel van modificeerbare risicofactoren benadrukt, is de kennis over bewustzijn, percepties en gedrag van individuen ten aanzien van SPCC-etnologie beperkt in de zwaarst getroffen regio's van Afrika. De huidige studie had tot doel de KAP te beoordelen bij inwoners van Malawi, een regio met de hoogste leeftijd gestandaardiseerde incidentie van ESCC wereldwijd. De totale kennis score over SPCC bedroeg 51% (158/309), de attitude score 57% (177/309) en de praktijkscore 52% (161/309). Belangrijke voorspellers die samenhangen met kennis over SPCC-risico waren vrouwelijk geslacht (gecorrigeerde oddsratio [aOR] = 2.1) en een hoger middeninkomen per maand (aOR = 2.8). Het hebben van een matig bewustzijn van factoren die bijdragen aan een verhoogd SPCC-risico bij individuen, en de wisselwerking tussen verschillende risicofactoren (zoals besproken in **Hoofdstuk 3**) kan de hogere SPCC incidentie in de regio mede verklaren.

In **Hoofdstuk 5**, werd de *(un)targeted* DNA-adductmethode (*ultra-high-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, UHPLC-HRMS*), bedoeld voor gebruik in **Hoofdstuk 7**, getest met DNA-stalen van humane leukocyten die waren verkregen van

niertransplantatiepatiënten. Naast het overkoepelende doel (*proof-of-concept* voor **Hoofdstuk 7**) beoogde dit hoofdstuk het verband te onderzoeken tussen bepaalde intrinsieke (bijv. leeftijd) en exogene risicofactoren (bijv. inname van immunosuppressiva) bij niertransplantatiepatiënten door DNA-adductvorming te bestuderen. Bepaalde intrinsieke en exogene factoren (zoals roken) waren geassocieerd met verhoogde niveaus van 8-oxoguanine (8-oxoG), terwijl immunosuppressiva samenhangen met hogere niveaus van DNA-alkylering, met name *N*3-methyladenine (*N*3-meA). Leefstijlgewoonten, met name alcoholgebruik, waren gekoppeld aan verhoogde niveaus van α -methyl- γ -hydroxy-1,*N*²-propano-2'-deoxyguanosine (CrG) en *N*⁶-methyladenine (*N*⁶-meA). De detectie van deze DNA-adducten bij niertransplantatiepatiënten rechtvaardigt vervolgonderzoek.

In **Hoofdstuk 6** werd een gerichte methode met *ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry* (UHPLC-MS/MS) ontwikkeld om oxidatieve en alkylerende DNA-adducten te profileren in DNA-stalen van humane leukocyten. Men veronderstelde dat de UHPLC-MS/MS-methode een vergelijkbare gevoeligheid heeft als UHPLC-HRMS voor gerichte analyse van oxidatieve en alkylerende DNA-adducten; daarom werd deze toegepast om de structurele identiteit van DNA-adducten uit **Hoofdstukken 5 en 7** te bevestigen. Toegepast op 30 DNA-stalen van humane leukocyten van niertransplantatiepatiënten maakte deze nieuwe UHPLC-MS/MS-methode de detectie mogelijk van *N*3-meA, *N*7-meG, *O*⁶-meG, M₁G en CrG. *N*²-etG en AcrG konden niet worden gedetecteerd. Er werd geconcludeerd dat de nieuwe UHPLC-MS/MS-methode kan dienen als een aanvullende methode voor het kwantificeren van *N*3-meA en AcrG ten opzichte van de UHPLC-HRMS-methode (besproken in **Hoofdstuk 5**) - die over het algemeen een betere gevoeligheid heeft. Vanwege beperkt staalvolume (voor de ESCC-gevallen en -controles in **Hoofdstuk 7**) zijn geen verdere UHPLC-MS/MS-analyses op die monsters uitgevoerd met de nieuw ontwikkelde methode.

Hoofdstuk 7 had als primair doel DNA-adducten te screenen in DNA-stalen van humane leukocyten, verkregen van SPCC-patiënten en -controles, met de UHPLC-HRMS-methode (ontwikkeld in **hoofdstuk 5**). Deze stalen waren afkomstig uit Tanzania en Kenia als onderdeel van een grootschalige, studie naar preventie van plaveiselcelcarcinoom slokdarm in Afrika (ESCAPE). Naast het hoofddoel (*untargeted* screening van DNA-adducten) werd ook een *targeted* analyse van oxidatieve en alkylerende DNA-adducten op de monsters uitgevoerd. Vanwege administratieve beperkingen konden de ongerichte data echter niet worden verwerkt. De bevindingen uit de *targeted* analyse toonden geen significante associatie tussen oxidatieve of alkylerende DNA-adducten en een verhoogd SPCC-risico, met

uitzondering van *N*6-mA (waarbij een inverse associatie werd waargenomen). De biologische rol van *N*6-meA moet in toekomstige studies worden gevalideerd.

Hoofdstuk 8 vat de belangrijkste bevindingen (uit **Hoofdstukken 1–7**) samen en formuleert algemene conclusies.

Hoofdstuk 9 beschrijft het toekomstig onderzoek naar de rol van het DNA-adductoom in slokdarmcarcinogenese, dat aanzienlijke methodologische, technologische en conceptuele vooruitgang vereist. Methodologisch dienen toekomstige studiedesigns —om de statistische power te vergroten— te kiezen voor grootschalige, prospectieve cohortopzetten. Deze ontwerpen moeten ook mogelijke vertekeningen aanpakken die ontstaan door onevenwichtige rekrutering van deelnemers (bijv. onbalans in leeftijd, geslacht, land). Technologisch is winst te behalen door de toepassing van nog gevoeliger en selectievere massaspectrometrische technieken, zoals multistaps-HRMS (HRMS/MSⁿ). Onderzoekers zouden DNA-adductprofielen uit biologische stalen (zoals bloed, speeksel of urine) moeten valideren tegen profielen uit controlestalen (d.w.z. bloed vs. slokdarmbiopsie) om goed onderbouwde conclusies te kunnen trekken in situaties waarin toegang tot of beschikbaarheid van controlestalen niet altijd haalbaar is (bijv. om ethische of logistieke redenen). Conceptueel moet DNA-adductomics verder gaan dan éénpunts metingen. Het onderzoeksveld moet het dynamische exposoom op verschillende kritieke levensfasen evalueren om de complexiteit van het exposoom vast te leggen. Uiteindelijk zouden de ontwikkelingen in DNA-adductomics-onderzoek en biomarker identificatie moeten resulteren in bruikbare maatregelen voor de volksgezondheid die kosteneffectieve screening en verbeterde SPCC-risicofraterificatie mogelijk maken, met name voor risicogroepen in ontwikkelingslanden.