

Samenvatting

Hoofdstuk 1 bevat een algemene introductie in de carcinogenese van hoofd-hals kanker (HNSCC) en de etiologie, klinische presentatie, histopathologische en genetische kenmerken van deze aandoening. HNSCC kenmerkt zich door een slechte 5-jaars overleving van circa 50%. Factoren die bijdragen aan deze slechte prognose worden toegelicht. Een van de belangrijkste hiervan is de frequente aanwezigheid van multiple mucosale laesies die voorstadia van HNSCC bevatten (dysplasie), en zich kunnen ontwikkelen tot HNSCC. Het belang van vroege detectie van deze potentieel maligne laesies wordt toegelicht, alsmede een overzicht van de huidige, meest frequent gebruikte detectie methoden hiervoor. Histopathologische beoordeling van weefsel coupes uit bipten is tot op heden de gouden standaard voor de analyse van premaligne en maligne hoofd-hals laesies. Echter, histopathologische beoordeling, waarvoor drie internationaal geaccepteerde classificaties bestaan, kenmerkt zich door een hoge variabiliteit in diagnoses indien een coupe door verschillende onafhankelijke pathologen wordt beoordeeld (inter-observer variabiliteit). Dit resulteert in een onbetrouwbare diagnose met betrekking tot het risico op maligne ontaarding en leidt tot onduidelijkheid voor de behandelend arts omtrent welke beslissing hij/zij dient te nemen ten aanzien van eventuele behandeling of follow-up van de betreffende laesie. De noodzaak voor het aan de diagnostiek van premaligne hoofd-hals laesies toevoegen van additionele, meer betrouwbare, moleculaire markers wordt benoemd. Een belangrijke potentiële marker voor het voorspellen van maligne progressie van een laesie is Chromosomale Instabiliteit (CI), welke gebaseerd is op de genotypische kenmerken van een laesie, losstaand van fenotypische veranderingen. De verschillende methoden om CI aan te tonen, waaronder de detectie van veranderingen in kopie aantal (CNV) van de chromosomen 1 en 7 door middel van Fluorescente In Situ Hybridisatie (FISH), worden belicht, met de nadruk op klinische toepasbaarheid. Ten slotte volgt een nadere toelichting op de doelen van dit proefschrift.

De inter-observer variabiliteit bij het toepassen van de drie internationaal geaccepteerde histopathologische classificatie systemen, te weten de WHO-, SIN- en Ljubljana classificatie, wordt in **Hoofdstuk 2** geanalyseerd en onderling vergeleken in een groep premaligne larynx laesies. Het blijkt dat de drie classificatie systemen zich alle kenmerken door een hoge inter-observer variabiliteit. Een vereenvoudigende modificatie van deze classificatie systemen naar een twee of drie-graads indeling resulteert in een verbetering van de overeenkomst tussen de beoordelingen van de verschillende pathologen, uitgedrukt in een “redelijke” Kappa-waarde. Daarnaast blijkt dat er meer

consensus ten aanzien van de diagnose wordt bereikt indien meerdere pathologen tegelijk een weefselcoupe beoordelen. Door het introduceren van een histopathologische indeling voor premaligne hoofd-hals laesies, bestaande uit twee of drie keuzemogelijkheden, kan de inter-observer variabiliteit worden gereduceerd, een positief effect zal hebben op de prognostische informatie geleverd door histopathologische beoordeling.

In **Hoofdstuk 3** wordt CI detectie, gebaseerd op de detectie van CNV's van chromosoom 1 en 7 door middel van FISH met behulp van chromosoom 1- en 7- specifieke centromeer DNA-probes (FISH 1c/7c) op een serie premaligne larynxlaesies beschreven. Deze techniek werd reeds eerder toegepast in een eerdere pilot-studie op premaligne larynxlaesies door Veltman et al. (2000). De betrouwbaarheid van deze potentiële marker in het kader van voorspelling van maligne progressie werd retrospectief geanalyseerd. Daarnaast werd immunohistochemisch aangetoonde overexpressie van de eiwitten p53, FADD, pFADD en Cycline D1 gecorreleerd met eventuele maligne progressie op basis van de beschikbare klinische patiëntendata. De laesies waarin CI werd gedetecteerd, vertoonden vrijwel alle een verhoogd kopie aantal van chromosoom 1 en/of 7 (gain), te weten trisomie, tetrasomie en polysomie. Laesies met CI bleken een sterk verhoogde kans te hebben op maligne ontaarding. Een opvallende bevinding was dat in alle voorloper stadia, variërend van hyperplasie tot ernstige dysplasie, CI werd gedetecteerd, in een min of meer oplopende mate, al naar gelang de ernst van de histopathologische diagnose. Geen van de onderzochte eiwit-markers bleek significant geassocieerd met maligne progressie in de univariate analyse. Ook histopathologie (WHO-classificering) bleek geen significante voorspeller van maligne progressie, met name voor de lagere histopathologische classificeringen, te weten hyperplasie, geringe en matige dysplasie. De prognostische betrouwbaarheid van histopathologie nam toe door een gedichotomiseerde indeling toe te passen, bestaande uit twee keuzemogelijkheden, waarbij hyperplasie en geringe dysplasie versus matige en ernstige dysplasie respectievelijk werden beschouwd als laesies met "laag risico" en "hoog risico". Logistische regressie analyse toonde aan dat de combinatie van CI, gedichotomiseerde histopathologische diagnose, p53 en FADD samen gebruikt kan worden als een bruikbaar, betrouwbaar model voor de voorspelling van maligne progressie in premaligne larynx laesies. De laatste twee eiwit-markers dragen positief bij aan de reductie van het aantal fout-negatieven.

De waarde van CI bepaling in het kader van het voorspellen van maligne progressie in premaligne mondholtelaesies werd onderzocht in **Hoofdstuk 4**. CI detectie vond hier plaats door middel van FISH 1c/7c alsmede door analyse van de DNA ploidie status door middel van DNA Image Cytometrie (ICM),

waarbij alle ploidie configuraties buiten de normale diploide status werden beschouwd als CI. Met beide methoden kon CI worden aangetoond en was significant geassocieerd met maligne progressie. Beide methoden toonden maligne progressie-kans aan met een vergelijkbare Hazard Ratio (HR), hetgeen aanduidt dat beide technieken vergelijkbare prognostische informatie leveren. Dit geeft aan dat CI detectie met FISH 1c/7c, waarbij er slechts twee chromosomen worden geanalyseerd, een betrouwbare indruk geeft van de algemene ploidie status van een laesie. Beide methoden kennen voor- en nadelen. FISH 1c/7c kan bijvoorbeeld kleine groepjes celkernen met CI detecteren, welke niet zouden leiden tot een afwijkende ploidie status bij ICM analyse. Daarnaast is deze techniek geschikt voor kleine weefselbiopten (zoals van de larynx) waarbij vaak te weinig materiaal bestaat voor ICM bepaling.

De prognostische informatie van de histopathologische diagnose bleek niet afdoende om te discrimineren tussen progressieve en niet progressieve laesies, met name in de WHO classificaties hyperplasie, geringe en matige dysplasie. Dichotomisatie, waarbij hyperplasie en geringe dysplasie werden gebundeld tot een “laag risico” groep en matige en ernstige dysplasie tot een “hoog risico” groep, leidde tot een betere prognostische waarde van histopathologie als parameter, uitgedrukt in een significant slechtere ziekte-vrije overleving voor de laatste groep. Deze uitkomst was vergelijkbaar met de bevindingen in premaligne larynx laesies, zoals beschreven in Hoofdstuk 3.

Vervolgens werden van 12 patiënten verschillende weefselbiopten, afkomstig van dezelfde localisatie, door middel van FISH 1c/7c en ICM geanalyseerd, met als doel de ploidie status in de voorstadia in de tijd tot aan maligne ontaarding te meten. Het bleek dat vrijwel alle aneuploide tumoren aneuploide voorlopers hadden en het merendeel van de diploide tumoren diploide voorlopers. Tevens werden enkele gevallen gezien waarbij een aneuploide status werd gevolgd door een diploide status en vice versa. Ook werd een uitzonderlijk lange tijdspanne tot maligne ontaarding van meer dan 9 jaar waargenomen in twee gevallen.

Op basis van de gegevens verkregen door middel van CI detectie (FISH 1c/7c en ICM) en histopathologische beoordeling werd een risicoprofiel-indeling gemaakt bestaande uit drie categorieën: 1) diploid-laag risico (lage ontaardingskans), 2) diploid-hoog risico en aneuploid-laag risico (intermediaire ontaardingskans) en 3) aneuploid-hoog risico (hoge ontaardingskans). Deze indeling van premaligne laesies zou de basis kunnen zijn voor een klinische indeling met betrekking tot de behandeling van laesies respectievelijk: geen follow-up, strikte follow-up en (chirurgische) behandeling.

De prognose van patiënten met HNSCC wordt sterk negatief beïnvloed door het wel of niet optreden van een (loco)regionaal recidief door de aanwezigheid

van achtergebleven tumorcellen (minimal residual disease) of premaligne cellen, die potentieel kunnen uitgroeien tot HNSCC. In dit kader werd in **Hoofdstuk 5** retrospectief een kleine groep mondholletumoren geanalyseerd, welke histopathologisch radicaal waren geresecteerd. Klinische gegevens met betrekking tot tumor recidief werden verzameld. Door middel van FISH 1c/7c werd onderzocht of er in de resectievlakken van de betreffende preparaten CI aanwezig was en of dit geassocieerd was met later tumor recidief. Daarnaast werd door middel van immunohistochemie p53 eiwit overexpressie gemeten in de resectievlakken en de associatie met maligne progressie bepaald. CI bleek significant geassocieerd met het optreden van tumor recidief. P53 was niet significant geassocieerd met tumor recidief. Op basis van deze gegevens en naar aanleiding van de bevestiging van deze resultaten in een recent gepubliceerde vervolgstudie over CI in resectieranden (Pierssens et al. 2017), dient CI detectie in resectieranden te worden overwogen.

Hoofdstuk 7 bevat een nadere analyse van de evaluatie criteria voor FISH 1c/7c in het kader van CI detectie in premaligne hoofd-hals laesies. Deze criteria dienen maximaal objectief te zijn en goed klinisch toepasbaar. FISH 1c/7c werd toegepast op 4 µm formaline-gefixeerde paraffine coupes op een groep premaligne larynxlaesies (ernstige dysplasie en carcinoma in situ werden geëxcludeerd), met als doel het aantonen van veranderingen in kopie aantal van één of beide chromosomen (CNV). Voor het bepalen van CNV's wordt in het algemeen in de diagnostiek van diverse soorten kanker gebruik gemaakt van 1) het bepalen van een chromosoom ratio tussen de twee chromosomen in een bepaald aantal te beoordelen celkernen, of 2) het objectief aantal afwijkende celkernen (die CNVs bevatten voor een of beide chromosomen) per vastgesteld aantal celkernen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een afkappunt, uitgedrukt in een percentage afwijkende celkernen.

In de studiepopulatie werd de chromosoom 7: chromosoom 1 ratio (CR) berekend op basis van het totaal aantal getelde signalen per 100 celkernen. Normaalwaarden voor de CR ($\geq 0.84 \leq 1.16$) werden berekend vanuit de CR's gevonden in een serie van 25 coupes van normaal plaveiselcel epitheel. Vervolgens werd volgens de tweede gangbare methode het percentage afwijkende celkernen (geteld per 100 celkernen) vastgesteld per laesie (PAN). Het optimale afkappunt werd vastgesteld op $\geq 10\%$ afwijkende celkernen. De uitkomsten werden gecorreleerd met de klinische patiëntendata en de associatie met maligne progressie werd berekend. Hieruit bleek met name bij het gebruik van PAN een sterke associatie met maligne progressie. CR en PAN werden ook gebruikt in combinatie met gedichotomiseerde histopathologische diagnose (hyperplasie versus geringe en matige dysplasie

samengevoegd) in een multivariate regressie analyse, waarbij de betrouwbaarheid van de test toenam.

Voor de beoordeling van FISH 1c/7c lijkt op basis van deze data PAN de meest betrouwbare en minst complexe beoordelingsmethode voor weefselcoupes.

De gedichotomiseerde histopathologische diagnose in combinatie met PAN (met een afkappunt van $\geq 10\%$) levert een positieve bijdrage in de zin van een toename van de sensitiviteit van de test. Deze studie is de basis voor verdere toekomstige implementatie van CI detectie door middel van FISH 1c/7c in de diagnostiek van premaligne hoofd-hals laesies en/ of resectieranden van hoofd-halstumoren.

Hoofdstuk 8 bevat de algemene discussie en conclusie van de resultaten van dit proefschrift toekomst perspectieven worden besproken.