

Hoofdstuk 1 is een algemene introductie met informatie over hoofd-halskanker. Dit hoofdstuk beschrijft onder meer de behandeling van patiënten met een hoofd-halsplaveiselcelcarcinoom (HNSCC). De behandeling is met name gebaseerd op de TNM-stadiëring, beeldvorming en klinische variabelen zoals leeftijd op moment van diagnose en locatie van de tumor. Daarnaast is de behandeling afhankelijk van histologisch onderzoek, maar dit geldt met name voor tumoren die primair chirurgisch worden behandeld¹. Door de recente introductie van TNM 8² kan de prognose van patiënten al beter voorspeld worden, maar aanvullende prognostische modellen zijn nodig om patiënten nauwkeuriger in groepen met goede en slechte prognose in te delen zodat het mogelijk is de behandeling hierop aan te passen en patiënten beter te kunnen informeren. Het toevoegen van biomarkers aan prognostische modellen is een mogelijkheid om deze modellen nauwkeuriger te maken. Biomarkers kunnen belangrijke maar subtiele verschillen in tumorbiologie beter weergeven dan conventionele prognostische variabelen zoals tumorgrootte. Voor oropharynxtumoren (OPSCC) is aan- of afwezigheid van HPV de belangrijkste biomarker. Derhalve werd een aparte stadiëring voor deze tumoren opgenomen in TNM 8², waarbij gebruik gemaakt werd van een surrogaatmarker voor HPV (p16 immuunhistochemie). HPV zou ook relevant kunnen zijn voor tumoren buiten de oropharynx, maar de standaardtest die gebruikt wordt voor oropharynxtumoren is onvoldoende betrouwbaar voor deze subsites^{3,4} en een nauwkeurig alternatief ontbreekt. Hierdoor worden studies met betrekking tot de rol van HPV buiten de oropharynx bemoeilijkt.

Het doel van dit onderzoek was de identificatie en evaluatie van nieuwe prognostische biomarkers voor HNSCC in het algemeen of voor HNSCC op specifieke tumorlocaties. Er is een betrouwbaar HPV-teststelsel voor tumoren in de oropharynx, maar helaas niet voor tumoren in ander subsites terwijl het wel van groot prognostisch belang zou kunnen zijn. In het onderzoek dat wordt beschreven in **Hoofdstuk 2** werd daarom een moleculair HPV-teststelsel (HPV-rTcore assay) ontwikkeld dat toegepast kan worden op gearcheerd materiaal van niet-oropharyngeale HNSCC. Tumormateriaal werd verzameld door stansbipten te nemen uit tumorrijke regio's, en vervolgens werd DNA en RNA uit deze bipten geëxtraheerd. Voorts werden PCR-technieken gebruikt voor detectie van HPV-DNA van 15 hoog-risico HPV typen. Een positief resultaat werd gevalideerd door middel van E6- mRNA-detectie. Dit testalgoritme werd gevalideerd in oropharynxtumoren (OPSCC) en mondholtetumoren (OSCC) met een nauwkeurigheid van 97% in OPSCC en 100% in OSCC. De HPV-rTcore assay wordt momenteel gebruikt om de prevalentie te bepalen van HPV in niet-oropharyngeale HNSCC, en zou de nieuwe standaard kunnen worden voor HPV diagnostiek in OPSCC. In dit proefschrift is de test gebruikt om HPV te detecteren daar waar nodig.

In **Hoofdstuk 3** wordt een prognostisch model gepresenteerd wat is gebaseerd op genexpressieprofielen. Allereerst wordt gebruik gemaakt van microarraydata van OSCC om een genexpressieprofiel te selecteren van 22 genen die voorspellend zijn voor lymfekliermetastasering (N-stadium) en een profiel van 40 genen die voorspellend zijn voor de prognose van patiënt. Vervolgens werden deze profielen gevalideerd in een onafhankelijk OSCC-cohort, waarbij gebruik gemaakt werd van kwantitatieve PCR om de mate van expressie te bepalen. Het N-stadium profiel kon de aanwezigheid van occulte lymfekliermetastasen voorspellen met een negatieve voorspellende waarde van 84% in patiënten met een cT1-2N0 tumor. Daarnaast werd een nauwkeurig prognostisch model gevonden door het prognostische genexpressieprofiel te combineren met klinische en pathologische variabelen. Dit model presteerde beter dan het TNM-stadium. Tot slot werd een subpopulatie geïdentificeerd met een slechte prognose, ondanks ontbreken van bekende negatieve prognostische kenmerken. Deze resultaten kunnen gebruikt worden voor het beter informeren van patiënten over hun prognose en voor behandeling op maat: selectie van patiënten waarbij geen halsklierdissectie vereist is of waarbij adjuvante therapie meerwaarde kan hebben. Hierbij moeten we wel opmerken dat de gouden standaard, histopathologisch onderzoek van het chirurgisch preparaat, eveneens een zeer sterke voorspellende waarde bleek te hebben. Biomarkeranalyses zijn dus belangrijker voor tumoren die niet-chirurgisch behandeld worden.

In **Hoofdstuk 4** is voor een andere benadering gekozen voor de ontwikkeling van prognostische modellen voor HNSCC: biomarkers op basis van beeldvorming. Er wordt gebruik gemaakt van blanco T1-gewogen

MRI-scans van patiënten met OSCC en HPV-negatieve OPSCC om kwantitatieve eigenschappen af te leiden van de handmatig ingetekende tumoren. Deze methode wordt ook wel 'radiomics' genoemd. In deze studie werden 545 eigenschappen afgeleid die de signaalintensiteit beschrijven van de tumor, alsmede de vorm en textuur. Overbodige eigenschappen werden verwijderd, gevolgd door een factoranalyse met de overgebleven kerneigenschappen. Deze werden vervolgens gebruikt voor trainen en valideren van prognostische modellen. De modellen gebaseerd op MRI-radiomics bevatten additionele prognostische informatie. De meest nauwkeurige modellen werden gevonden door combinaties te maken van klinische variabelen en MRI-radiomics. Er was een grote variatie in MRI-fabrikanten en acquisitieprotocollen in deze studie, maar dit hinderde het vervaardigen van de prognostische modellen niet. Dat laat onverlet dat standaardisatie van apparatuur en protocollen, en het gebruik van meer data uit de MRI-beelden, de prognostische modellen kan verbeteren. De vervaardigde modellen kunnen makkelijk geïntegreerd worden met de standaard diagnostiek aangezien blanco T1-gewogen MRI al gebruikt wordt in de meeste protocollen.

Recidief HNSCC kan vaak chirurgisch nog behandeld worden, mits de recidief-tumor ontdekt wordt in een vroeg stadium. Dit is helaas vaak niet het geval. Recidief-tumoren zijn lastig te ontdekken en de gouden standaard, onderzoek in narcose met biopsafname van verdachte afwijkingen, is invasief en daarmee niet geschikt voor routinematige screening. Vroegdiagnostiek zou wellicht mogelijk gemaakt kunnen worden door detectie van circulerend tumor DNA (ctDNA) wat wordt verspreid door apoptotische tumorcellen. In **Hoofdstuk 5** behandelt een detectiemethode voor ctDNA in HNSCC, gericht op het opsporen van somatische mutaties, chromosomale afwijkingen (kopie nummer aberratie (CNA)) en HPV-DNA. De hypothese was dat de sensitiviteit van ctDNA-detectie toe zou nemen door gebruik te maken van een gecombineerde analyse van verschillende moleculaire veranderingen vanwege de genetische heterogeniteit tussen hoofd-halstumoren. Somatische mutaties werden gedetecteerd in plasma van 67% van de patiënten, terwijl CNAs aanwezig waren in het plasma van 52%. HPV-DNA werd gedetecteerd in 100% van de patiënten met een HPV-positieve tumor. Een gecombineerde analyse verhoogde inderdaad het percentage van gedetecteerd tumor-DNA naar 78%. Kennis van de moleculaire veranderingen in de primaire tumor verbeterde de detectie van somatische mutaties in plasma, maar detectie van CNAs en HPV-DNA werd hierdoor niet beïnvloed. De positieve resultaten uit deze studie bieden ruimte voor verdere validatie door longitudinale screening in een prospectief cohort.

Hoewel het mogelijk lijkt om prognostische modellen te ontwikkelen op basis van biomarkers, lijken de prestaties van de verschillende modellen een suboptimaal maximum te bereiken. Dit impliceert dat er wellicht een biologische factor is waardoor de applicatie van tumorbiomarkers gelimiteerd wordt. In **Hoofdstuk 6** wordt gehypotheetiseerd dat dit gerelateerd kan zijn aan intratumorale genetische heterogeniteit die gedetecteerd kan worden op moment van diagnose of naar voren komt door de behandeling en daardoor gereflecteerd wordt door genetische verschillen tussen de primaire tumor en het lokaal recidief. In deze studie werden inderdaad genetische verschillen gevonden tussen biopsen uit verschillende regio's van de tumor, maar de CNA-profielen leken sterk op elkaar. Analyses van somatische mutaties zijn wellicht superieur om intratumorale heterogeniteit aantonen, en dit wordt momenteel onderzocht in een vervolgstudie. Daarnaast werd in deze studie heterogeniteit meer uitgesproken door het vergelijken van de primaire tumor en het lokaal recidief na chemoradiatie. De helft van de recidief-tumoren na chemoradiotherapie leken genetisch niet gerelateerd aan de primaire tumor, wat impliceert dat recidief-tumoren waarschijnlijk ontstaan uit zeer kleine subklonen in de primaire tumor die niet worden gedetecteerd door analyse van bulk-DNA, maar die chemoradiatieresistent zijn. Deze bevinding impliceert ook dat de prestaties van prognostische modellen met biomarkers gebaseerd op bulk-DNA/mRNA tegen beperkingen aanlopen, aangezien kleine subklonen bepalend kunnen zijn voor het optreden van recidief en derhalve de prognose. Toekomstige studies dienen rekening te houden met deze bepalende factor.

In **Hoofdstuk 7** worden gepresenteerde data bediscussieerd en in een breder perspectief gezet.