

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het merendeel van de tumoren in de mondholte zijn orale plaveiselcelcarcinomen (OPCC's), die uitgaan van het mondslijmvlies. Wanneer OPCC's uitzaaien gaat dit vrijwel altijd eerst naar de lymfeklieren in de hals, dit worden regionale metastasen genoemd. In een later stadium kunnen ook metastasen via de bloedbaan "op afstand" ontstaan naar bijvoorbeeld de longen. De aan- of afwezigheid van regionale metastasen is een belangrijke prognostische factor voor de uitkomst van de ziekte en voor de keuze van de behandeling van OPCC's. Echter niet alle regionale metastasen zijn klinisch te detecteren met de huidige diagnostische technieken, zoals de computertomografie (CT) scan, magnetic resonance imaging (MRI) scan of de echogeleide cytologische punctie. Ondanks dat ze met deze relatief gevoelige klinische technieken niet detecteerbaar zijn, blijken er toch regionale metastasen in de lymfklier aanwezig te zijn in 23-37% van de patiënten met een vroeg stadium OPCC (cT1-2N0). Deze klinisch niet te detecteren regionale en afstandsmetastasen worden occulte metastasen genoemd. Occulte regionale metastasen werden in het verleden gediagnosticeerd door de lymfklieren van level I-III van de hals als één blok met de omgevende weke delen te verwijderen, een zogenoemde electieve halsklierdissectie. Een electieve halsklierdissectie kreeg de voorkeur nadat onderzoek aantoonde dat dit voor een betere overleving zorgde in vergelijking met het achterwege laten van een halsklierdissectie en te volstaan met poliklinische controle. Echter met deze electieve halsklierdissectie worden de 63-77% patiënten, die geen occulte metastase blijken te hebben, onnodig geopereerd. Een dergelijke ingreep heeft risico's op postoperatieve morbiditeit, bijvoorbeeld schouderpijn of een bewegingsbeperking van de schouder en de arm. Dit nadeel geeft aan dat er een noodzaak is voor nauwkeurige en minder invasieve methoden om occulte metastasen te kunnen detecteren. In dit proefschrift deden we onderzoek naar de voorspellende waarde voor het aantonen van occulte metastasen door gebruik te maken van de schildwachtklierbiopsie procedure, histopathologische karakteristieken en moleculaire tumormarkers.

Nadat verschillende studies hadden aangetoond dat tumor infiltratiediepte en extranodale groei sterk prognostisch waren voor de overleving na de behandeling van het OPCC, werden deze histopathologische karakteristieken toegevoegd aan de 8^e editie van de American Joint Committee on Cancer TNM classificatie. De studies die de basis vormden voor de aanpassing van de TNM classificatie, bevatten echter geen patiënten die een conservatieve behandeling van de hals hebben gehad, terwijl deze toevoegingen aan de TNM classificatie mogelijk vooral invloed hebben op de behandeling van patiënten met een vroeg stadium tumor. In **hoofdstuk 2** bepaalden we de klinische impact van de aanpassingen in de nieuwe TNM classificatie in een retrospectieve database van 211 patiënten met een eerste primaire pT1-2 OPCC die allemaal primair chirurgisch zijn behandeld. Honderddrieënzeventig

van deze patiënten werden behandeld met een halsklierdissectie en 38 werden alleen poliklinisch gecontroleerd op uitgroei van occulte metastasen. Classificatie volgens de 8^e TNM editie resulteerde voor 36% van de patiënten in een hogere T staging en in 16% van de patiënten in een hogere N staging. De T3 gestageerde patiënten hadden een kortere overleving dan de T2 gestageerde patiënten. Aan de hand van de 8^e TNM classificatie had in 3% van de patiënten een aanvullende postoperatieve behandeling met chemo- of radiotherapie overwogen kunnen worden. We concludeerden dat de toevoeging van tumor infiltratiediepte en extranodale groei aan de 8^e editie van de TNM classificatie zorgt voor de identificatie van meer OPCC patiënten met een slechtere prognose en van meer patiënten die mogelijk voordeel hebben van een (intensieve) adjuvante behandeling.

De schildwachtklierbiopsie (SWK-biopsie) procedure werd geïntroduceerd voor OPCC's als minder invasieve stageringsmethode voor de hals, in vergelijking met de electieve halsklierdissectie, om te vermijden dat patiënten zonder occulte metastasen een halsklierdissectie ondergaan. Meta-analyses naar de accuratesse van de SWK-biopsie laten veel verschillen tussen studies zien als het gaat om referentie standaarden, beeldvormende technieken en histopathologische beoordelingen. In **hoofdstuk 3** bepaalden we de accuratesse van de SWK-biopsie voor het detecteren van occulte metastasen in 91 patiënten met een primaire cT1-2N0 OPCC, die primair chirurgisch werden behandeld en een SWK-biopsie ondergingen tussen 2008 en 2016. De SWK-biopsie procedure bestond uit SWK detectie met een lymfoscintigrafie scan, SPECT-CT scan en een gamma-probe. Poliklinische controle diende als referentie voor de 63% van de patiënten met een negatieve SWK-biopsie. Histopathologisch onderzoek van de SWK bestond uit het snijden van de schildwachtklier op meerdere niveau's en de detectie van occulte metastasen op basis van standaard histopathologisch onderzoek en een cytokeratine kleuring. In alle 91 patiënten werden SWK's gevonden. In totaal hadden 27% van de patiënten een metastase-positieve SWK. Vier patiënten werden gediagnosticeerd met een regionaal recidief nadat er eerder met de SWK-biopsie geen occulte metastase was aangetroffen. Dat resulteert in een sensitiviteit van 85% en een negatief voorspellende waarde van 94%. We concludeerden dat de SWK-biopsie procedure betrouwbaar is voor het stageren van de hals van cT1-2N0 OPCC patiënten.

Het is bekend dat 20-30% van de patiënten met een OPCC een lokaal recidief krijgen en dat deze patiënten een jaarlijks risico hebben van 3-4% op een tweede primaire tumor. Eerdere behandelingen van de hals kunnen de lymfogene drainagepatronen veranderen. De literatuur over mogelijk afwijkende drainagepatronen in eerder voor een OPCC behandelde patiënten, in kaart gebracht met de SWK-biopsie procedure, is beperkt tot twee kleine studies. In **hoofdstuk 4** onderzochten we retrospectief 53 cT1-2N0 OPCC patiënten uit drie hoofd-hals oncologie centra, die een SWK-biopsie procedure hebben ondergaan tussen

2007 en 2016, nadat ze eerder chirurgische of radiotherapeutische behandeling van de hals hebben gehad. De SWK-biopsie procedure was gelijk aan de procedure zoals beschreven in hoofdstuk 3. SWK's werden in de 85% van de patiënten gedetecteerd. De SWK-biopsie procedure had een sensitiviteit van 75% en een negatief voorspellende waarde van 98%. Drainagepatronen naar onverwachte locaties waren aanwezig in 30% van de patiënten en bij 12% kon helemaal geen drainagepatroon worden aangetoond. We concludeerden dat de SWK-biopsie procedure een betrouwbare techniek lijkt te zijn voor het stageren van de hals van patiënten met een OPCC. Daarnaast maakt de SWK-biopsie procedure het mogelijk om onverwachte lymfogene drainagepatronen te visualiseren in de hals van cT1-2N0 OPCC patiënten die eerder behandeling van de hals hebben ondergaan.

Patiënten met een OPCC uitgaande van de bovenkaak (maxilla) komen minder vaak voor in vergelijking met de andere locaties in de mond, zoals de tong of mondbodem en worden nauwelijks geïnccludeerd in onderzoeken naar lymfogene drainagepatronen van dit gebied. In het verleden werden lage metastaseringspercentages verondersteld en daarnaast bestond de indruk dat de drainage vooral naar parafaryngeaal gelegen lymfeklieren plaatsvindt. In **hoofdstuk 5** onderzochten we retrospectief de drainage patronen van 11 patiënten met een OPCC uitgaande van de maxilla aan de hand van de SWK-biopsie procedure. In 10 patiënten werden de SWK's gevonden in cervicale hals levels. In twee patiënten werden daarnaast parafaryngeaal gelokaliseerde lymfeklieren gevonden. We concludeerden dat in de meerderheid van een OPCC uitgaande van de maxilla, op basis van de SWK's, de drainage naar de cervicale lymfeklieren verloopt.

Een andere techniek om te voorkomen dat patiënten zonder occulte metastasen een halsklierdissectie ondergaan, is de selectie aan de hand van prognostische moleculaire markers in de primaire tumor. Het voordeel hiervan is dat dit een niet invasieve methode voor het stageren van de hals is. Chromosoom regio 11q13, waarop onder meer de genen *CCND1*, Fas-associated death domain (*FADD*) en *CTTN* zijn gelegen, is vaak geamplificeerd in OPCC's met regionale metastasen. Echter, het bewijs dat amplificatie van het 11q13 chromosoom of de over-expressie van de daarop gelegen genen, voorspellend is voor de aanwezigheid van occulte metastasen is nog minimaal. In **hoofdstuk 6** gebruikten we 158 patiënten met een vroeg stadium tong of mondbodem PCC om de moleculaire markers *CCND1* amplificatie en de expressie van cycline D1 (*CCND1*), *FADD* en cortactin (*CTTN*) te correleren met occulte metastasen. *CCND1* amplificatie en cycline D1 expressie correleerden met de aanwezigheid van occulte metastasen. De validatie van cycline D1 in een onafhankelijk multicenter cohort, bevestigde de correlatie met occulte metastasen voor vroeg stadium mondbodem tumoren. We concludeerden dat cycline D1 een voorspellende marker is voor de aanwezigheid van occulte metastasen.

Preoperatieve selectie van patiënten met een hoog risico op occulte metastasen met moleculaire markers kan leiden tot een meer individuele behandelstrategie voor de hals, met poliklinische controle voor laag risico patiënten. Voor patiënten met een gemiddeld tot hoog risico is een SWK-biopsie de eerste keus en een electieve halsklierdissectie in de gevallen waar een SWK-biopsie niet betrouwbaar kan worden verricht. De meer gedetailleerde informatie over drainage patronen, micrometastasen en geïsoleerde tumorcellen die wordt verkregen met de SWK-biopsie kan van invloed zijn op de klinische waarde van moleculaire markers die eerder zijn geassocieerd met lymfeklierstatus. In **hoofdstuk 7** werden markers, eerder beschreven als voorspellend voor lymfeklierstatus (cortactin, cycline D1, FADD, RAB25 en S100A9), geassocieerd met occulte metastasen in 87 patiënten met een vroeg stadium OPCC die een SWK-biopsie hebben ondergaan. Cortactin was geassocieerd met de aanwezigheid van occulte metastasen in patiënten met een pT1 tumor en een tumor infiltratiediepte van minder dan 4 mm met een negatief voorspellende waarde van 92%. We concludeerden dat cortactin een veelbelovende marker is voor de selectie van vroeg stadium OPCC patiënten voor een klinische controle in plaats van een SWK-biopsie.

Naast het detecteren van occulte metastasen is de vroegdetectie van lokale recidieven en tweede primaire tumoren een grote uitdaging in OPCC patiënten. Het aanzienlijke percentage lokale recidieven en tweede primaire tumoren (20-30%) wordt respectievelijk veroorzaakt door residuale tumorcellen van de eerste primaire tumor en/of door de aanwezigheid van premaligne epitheel dat (nog) niet klinisch zichtbaar is. Aangezien PCC cellen die loskomen van het oppervlakte van de tumor terechtkomen in het speeksel, kan het zijn dat de detectie van tumor-specifieke DNA methylatie in DNA uit speekselcellen kan dienen als een techniek voor het detecteren van lokale recidieven of tweede primaire tumoren. In **hoofdstuk 8** selecteerden we genomische gebieden van zes genen (*C11orf85*, *CMTM2*, *FERMT3*, *KCNA5*, *SIPA1* en *TBX4*) die gemethyleerd zijn in OPCC's en niet in normale cellen. Voor de identificatie van deze OPCC-specifieke methylatie markers werd gebruik gemaakt van een screening van het totale methyloom van 12 OPCC's en controle weefsels met behulp van een MethylCap-Seq analyse. Daarnaast selecteerden we vier markers uit de literatuur die werden beschreven als gemethyleerd in speeksel van OPCC patiënten (*EDNRB*, *HOXA9*, *NID2* en *TIMP3*). Een kwantitatieve methylatie specifieke PCR analyse van speeksel van tien OPCC patiënten in vergelijking met het speeksel van tien niet-OPCC controles liet alleen een verschil zien voor de methylatie van *KCNA5*. Wanneer *KCNA5* werd gecombineerd met andere markers was een 100% diagnostisch potentieel zichtbaar voor de combinatie met *TIMP3* in het detecteren van OPCC patiënten en niet-OPCC controles van dezelfde leeftijd aan de hand van het speeksel. Op basis van onze pilotstudie concludeerden we

dat *KCNA5* een potentiële nieuwe methylatiemarker is voor de vroegdetectie van lokale recidieven of tweede primaire tumoren in het speeksel van OPCC patiënten en dat grotere studies ter bevestiging van de klinische waarde van deze markers gerechtvaardigd zijn.