

## SAMENVATTING

Wereldwijd vormt baarmoederhalskanker een belangrijk probleem voor de volksgezondheid. Het is de vierde meest voorkomende vorm van kanker onder vrouwen die met name hoge incidentie- en sterftcijfers in ontwikkelingslanden heeft in vergelijking tot de Westerse wereld. Dit verschil wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de combinatie van het gebrek aan effectieve screeningsmethoden voor het opsporen van (voorloperstadia van) baarmoederhalskanker en de slechte toegang tot gezondheidszorg in ontwikkelingslanden. In Nederland en andere westerse landen heeft de introductie van het bevolkingsonderzoek op basis van cytologie screening in de jaren zestig geleid tot een drastische verlaging van de incidentie en mortaliteit van baarmoederhalskanker.

De ontdekking van hoog risico types van het humaan papillomavirus (HPV) als de veroorzaker van baarmoederhalskanker heeft tot de volgende niveaus van preventie geleid: 1. primaire preventie: het profylactisch vaccineren tegen hoog-risico HPV types om daarmee de ontwikkeling van voorloperstadia en baarmoederhalskanker bij gezonde personen te voorkomen; 2. secundaire preventie: een op HPV of cytologie gebaseerd screeningsprogramma voor de detectie van voorloperstadia en baarmoederhalskanker bij vrouwen gevolgd door behandeling; en 3. tertiaire preventie: de follow-up na de behandeling van voorloperstadia of baarmoederhalskanker middels het testen van cytologie of cytologie gecombineerd met HPV.

De preventie van baarmoederhalskanker door middel van screening is gebaseerd op de tijdige detectie en adequate behandeling van voorloperstadia: cervicale intra-epitheliale neoplasie (CIN). Het graderen van CIN laesies (CIN1, CIN2 of CIN3), op basis waarvan de behandeling wordt bepaald, is lastig en slechts matig reproduceerbaar. Tevens kunnen pathologen niet voorspellen of een laesie zich progressief of regressief zal gedragen. Dit leidt tot een verschil in de behandeling van CIN laesies door gynaecologen, met name voor CIN2. Om er zeker van te zijn dat er geen baarmoederhalskanker kan ontstaan, worden laesies laagdrempelig verwijderd. Echter doordat een deel van de laesies ook spontaan kan genezen, is er sprake van overbehandeling. Behandeling vergroot het risico op negatieve zwangerschapsuitkomsten, en is met name relevant voor jonge vrouwen met een kinderwens.

Het toepassen van betrouwbare moleculaire biomarkers waarvan bekend is dat zij een rol spelen in het ontstaan van baarmoederhalskanker, kan resulteren in een meer accurate screening en gradatie van CIN laesies. Dit proefschrift beschrijft de mogelijke impact van dergelijke biomarkers op de detectie, classificatie en behandeling van cervicale neoplasieën en biedt een basis voor een meer accurate, betrouwbare en gestandaardiseerde preventie van baarmoederhalskanker.

**Hoofdstuk 1** geeft een algemene inleiding over baarmoederhalskanker, HPV, primaire, secundaire en tertiaire preventie strategieën en een overzicht van potentiële moleculaire biomarkers die toepasbaar zijn in de preventie van baarmoederhalskanker.

## DEEL 1 HPV SCREENING MET MOLECULAIRE TRIAGE TESTEN

Een belangrijke verbetering in de screening naar baarmoederhalskanker is de introductie van het testen op de aanwezigheid van het HPV virus. Vergeleken met primaire cytologie screening leidt primaire HPV screening tot een eerdere detectie van CIN3 laesies en kanker (CIN3+). Daarnaast biedt het een betere bescherming tegen baarmoederhalskanker op de lange termijn. Om deze redenen is het Nederlandse bevolkingsonderzoek in 2017 aangepast en is screening middels cytologie vervangen door screening middels een HPV test. In dit nieuwe programma worden vrouwen tussen de 30 en 60 jaar elke vijf jaar uitgenodigd om deel te nemen. Voor vrouwen van 40 jaar en ouder die daarbij HPV negatief testen zijn de screeningsintervallen tot 10 jaar verlengd. Bij hen worden de screeningsrondes op 45 en 55 jarige leeftijd overgeslagen.

Vergeleken met cytologie is de specificiteit van het testen op HPV 3-5% lager doordat de meeste gedetecteerde HPV infecties van voorbijgaande aard zijn en dus geen cervicale afwijkingen veroorzaken. Om binnen de groep HPV positieve vrouwen hen te identificeren met een door HPV veroorzaakte klinisch relevante afwijking (i.e. hooggradige CIN laesie of baarmoederhalskanker) is een tweede zogenaamde triage-test noodzakelijk. In Nederland is in het nieuwe bevolkingsonderzoek gekozen voor triage middels cytologie met herhaling van cytologie na 6 maanden. In [Deel 1](#) van dit proefschrift wordt de longitudinale veiligheid van het primair testen op HPV in vergelijking met cytologie geëvalueerd. Tevens wordt de waarde van recent ontwikkelde innovatieve moleculaire triage strategieën geanalyseerd.

In [Hoofdstuk 2](#) wordt de longitudinale 14-jaars follow-up data van de POBASCAM trial (n=43 339) beschreven, waarbij screening middels HPV- en cytologie wordt vergeleken met screening middels cytologie. De resultaten van deze data ondersteunen de beslissing van de overheid om het bevolkingsonderzoek in Nederland aan te passen. De cumulatieve incidentie van baarmoederhalskanker (0.09%) en CIN3+ (0.56%) voor HPV negatieve vrouwen op baseline na drie screeningsrondes was vergelijkbaar met die van cytologie negatieve vrouwen op baseline na twee screeningsrondes (respectievelijk 0.09% en 0.69%). Het lange termijn risico op baarmoederhalskanker en CIN3+ voor HPV negatieve vrouwen op baseline bleek zeer laag en dit ondersteunt de verlenging van het screeningsinterval voor deze vrouwen tot 10 jaar. Het tegenovergestelde geldt voor HPV positieve vrouwen op baseline met een negatieve triage test, onafhankelijk van de gekozen triage strategie (i.e. cytologie, herhaalcytologie, HPV 16 / 18 genotypering, of een combinatie). Voor deze vrouwen was het lange termijn risico op CIN3+ te hoog om een verlenging van het screeningsinterval te kunnen rechtvaardigen. De analyse waarin de risico's op baarmoederhalskanker voor vrouwen onder en boven de 40 jaar werden vergeleken was niet conclusief. Dit valt waarschijnlijk te verklaren door het lage aantal vrouwen

met baarmoederhalskanker in de POBASCAM trial. Met de invoering van verlenging van het screeningsinterval tot 10 jaar is het belangrijk in de toekomst het risico op een intervalkanker nauwlettend in de gaten te houden.

De analyse van methylering van promoter gebieden in genen van de gastheercel die betrokken zijn in het ontstaan van baarmoederhalskanker is een veelbelovende nieuw ontwikkelde triage strategie voor HPV positieve vrouwen gebaseerd op moleculaire biomarkers. Wanneer er sprake is van een gehypermethyleerde status van bepaalde genen kan het detecteren hiervan CIN laesies identificeren met een hoog korte termijn risico op progressie naar baarmoederhalskanker. In **Hoofdstuk 3** wordt geanalyseerd wat de waarde is van het testen van hypermethylering van de genen *CADM1*, *MAL* en miR124-2 met behulp van een multiplex panel (PreCursor-M®, Self-screen, Nederland) op cervicale uitstrijkjes van HPV positieve CIN laesies en baarmoederhalskanker. De levels van methylering en het aantal hypergemethyleerde genen bleek op te lopen met de ernst van de onderliggende CIN laesie. Bovendien waren de levels van methylering zeer hoog in een grote groep vrouwen met baarmoederhalskanker (n=79). Alle samples van vrouwen met baarmoederhalskanker waren methylering positief. Een interessante bevinding was daarnaast dat een substantieel deel van vrouwen met kanker van het endometrium ook positief testte voor dit methyleringspanel (n=16/21, 76%).

## **DEEL 2 SCREENING OP BASIS VAN BIOMARKERS IN ONTWIKKELINGSLANDEN**

De implementatie van een effectief screeningsprogramma ter preventie van baarmoederhalskanker is bijzonder uitdagend in ontwikkelingslanden. De morbiditeitscijfers in deze landen zijn hoog met name vanwege het gebrek aan een landelijk bevolkingsonderzoek voor screening naar baarmoederhalskanker, gecombineerd met een hoge prevalentie van het humaan immunodeficiëntievirus (HIV). Infectie met HIV is een belangrijke risicofactor voor de persistentie van HPV infecties en daarmee de ontwikkeling van hooggradige CIN laesies en baarmoederhalskanker. In **Deel 2** van dit proefschrift wordt de waarde van screeningstesten met behulp van biomarkers geëvalueerd binnen HIV geïnfecteerde vrouwen.

In **Hoofdstuk 4** wordt de klinische waarde bepaald van primaire HPV screening in combinatie met de analyse van de hypermethylering status van de genen *CADM1*-, *MAL*- en miR124-2 toegepast op cervicale uitstrijkjes van een Zuid Afrikaans studiecohort (n=355) bestaande uit vrouwen geïnfecteerd met HIV. Het primair testen op HPV leverde een sensitiviteit voor CIN3+ op van 83.6% met een specificiteit van 67.7%. Het combineren van HPV met hypermethylering analyse leidde tot een sensitiviteit voor CIN3+ van 73.8% met een specificiteit van 81.5%. Primaire hypermethylering analyse leverde een goede sensitiviteit voor CIN3+ op van 85.2%, maar een

lagere specificiteit van 49.6%. Alle geteste strategieën hadden een 100% kanker detectie (n=44). De lage specificiteit van primair hypermethylering analyse kan mogelijk worden verklaard door de relatief hoge methylering levels in cervicale uitstrijkjes van HIV positieve vrouwen in vergelijking met HIV negatieve vrouwen. Het is daarom noodzakelijk om deze testen te optimaliseren voordat implementatie van hypermethylering analyse als primaire screenings strategie haalbaar is binnen een populatie met een hoge HIV prevalentie.

Deze optimalisatie hebben we nagestreefd in **Hoofdstuk 5**, waarbij we een hypermethylering analyse hebben kunnen ontwikkelen met een specifieke drempel voor positiviteit afgestemd op vrouwen geïnfecteerd met HIV. Hypermethylering analyse van de genen *ASCL1* dan wel *LHX8* getest op DNA materiaal geïsoleerd uit cervicale uitstrijkjes van HIV geïnfecteerde vrouwen toonde een acceptabele sensitiviteit voor CIN3+ (respectievelijk 72.1% en 73.8%) met een goede specificiteit van 75%. Ook voor deze markers testten alle uitstrijkjes van kanker patiënten positief. Onze bevindingen rechtvaardigen een verdere ontwikkeling van de methyleringstest, zodat beter betaalbare, 'point-of-care' testen (testen met direct resultaat) beschikbaar komen. Dergelijke manieren van screenen zouden geïmplementeerd kunnen worden in een effectieve 'screen-and-treat' strategie, waarbij screening en behandeling in een tijdsmoment kunnen plaatsvinden. Het in één bezoek detecteren en behandelen van kanker en hooggradige CIN laesies is met name relevant voor screening in ontwikkelingslanden. Hier is de toegang tot zorg vaak slecht waardoor veel vrouwen slechts één tot twee screeningsmomenten in hun leven hebben, en hebben vrouwen een relatief hoog risico op baarmoederhalskanker.

## **DEEL 3 HET OPTIMALISEREN VAN DE CLASSIFICATIE VAN CIN LAESIES DOOR HET GEBRUIK VAN BIOMARKERS**

Baarmoederhalskanker screening is gericht op de detectie en behandeling van CIN laesies. Een nauwkeurige en reproduceerbare classificatie van deze laesies is daarbij essentieel. In **Deel 3** van dit proefschrift bestuderen we de toegevoegde waarde van het gebruik van biomarkers voor de onderbouwing en standaardisering van de gradering van CIN laesies.

**Hoofdstuk 6** vergelijkt de nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid van de huidige CIN gradering met die van een immunoscore gradering systeem, waarbij uitsluitend gekeken wordt naar de expressie van immunohistochemische (IHC) biomarkers Ki-67 en p16<sup>ink4a</sup>. De nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid van het immunoscore gradering systeem was hoger in vergelijking met de huidige gradering van CIN, met name voor CIN3 (noodzaak tot behandeling) en CIN1 (geen behandeling nodig). Hiermee zou de heterogene groep CIN2 grotendeels kunnen worden opgesplitst in accuraat gegradeerde CIN3 en CIN1 laesies waardoor mogelijke onder- en overbehandeling kan worden voorkomen. In de kliniek zou het gebruik van het meer accurate

Ki-67 en p16<sup>ink4a</sup> immunoscore systeem de gynaecoloog kunnen helpen in de keuze voor behandeltrajecten van CIN laesies.

**Hoofdstuk 7** beschrijft de expressie van het HPV-E4-eiwit, een biomarker indicatief voor het begin van een productieve HPV-infectie, en de analyse van de hypermethylering status van *CADM1*, *MAL*- en *miR124-2*-genen, een biomarker indicatief voor een transformerende HPV-infectie. De expressie van deze biomarkers werd geanalyseerd binnen cervicale afwijkingen (n=115) ingedeeld op basis van zowel de huidige CIN gradering als de Ki-67 en p16<sup>ink4a</sup> immunoscore gradering. Uitgebreide E4-expressie werd het meest gevonden in laaggradige CIN en nam af bij het toenemen van de ernst van de CIN laesie, tot een afwezigheid van uitgebreide E4-expressie in carcinomen. De hypermethylering status van *CADM1*-, *MAL*- en *miR124-2*-genen nam juist toe met toenemende ernst van CIN, tot een 100% positiviteit in carcinomen. Laesies met uitgebreide E4-expressie waren geassocieerd met een zeer weinig positieve hypermethyleringsstatus. De expressieprofielen van zowel E4 als hypermethylering illustreren de geleidelijke overgang van vroege productieve CIN, met een laag progressierisico op korte termijn voor het ontstaan van baarmoederhalskanker, naar late transformerende CIN, met een hoog progressierisico op korte termijn voor het ontstaan van baarmoederhalskanker. Hiermee zouden deze biomarkers het karakteriseren van CIN laesies verder kunnen onderbouwen.

## **DEEL 4 FOLLOW-UP NA BEHANDELING**

Vrouwen die worden behandeld voor een hooggradige CIN laesie houden na deze ingreep een verhoogd risico (~10-15%) op een recidief. Daarom is strikte follow-up van deze vrouwen na behandeling noodzakelijk. In **Deel 4** van dit proefschrift wordt de waarde van biomarkers in het follow-up traject na behandeling van CIN2/3 geëvalueerd voor de detectie van recidief afwijkingen.

In **Hoofdstuk 8** wordt de SIMONATH trial (n=364) beschreven, een prospectieve multicenter cohort studie waarin vrouwen behandeld voor een CIN2/3 laesie tot na één jaar na behandeling werden vervolgd. Recidief afwijkingen werden onderverdeeld in persistente (onvolledig behandelde) en incidente (opnieuw ontstaande) CIN laesies. In de follow-up van deze vrouwen testte het merendeel van de vrouwen met een persisterende CIN2/3 positief voor de *CADM1/MAL*-methylering assay. Tevens testte alle vrouwen met een incident recidief CIN2 hypermethylering negatief, terwijl alle vrouwen met baarmoederhalskanker gedetecteerd na de behandeling hypermethylering positief testte. Ook was een positieve hypermethylering status op baseline voor behandeling en in de follow-up na behandeling geassocieerd met een significant verhoogd risico op recidief CIN2/3 in vergelijking met een hypermethylering negatieve status. De implementatie van de analyse van de hypermethylering status van de genen *CADM1* en *MAL* kan het follow-up traject na behandeling verder verbeteren.

Tot slot staat in **Hoofdstuk 9** een algemene discussie beschreven betreffende de resultaten gepresenteerd in de verschillende delen van dit proefschrift in de context van de beschikbare literatuur. Daarnaast worden toekomst perspectieven en mogelijke klinische implicaties van het onderzoek in dit proefschrift beschreven.