

VU Research Portal

The Role of EBV Markers in Diagnosis, Treatment and Monitoring of Nasopharyngeal Carcinoma in Jakarta, Indonesia

Adham, M.

2014

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Adham, M. (2014). *The Role of EBV Markers in Diagnosis, Treatment and Monitoring of Nasopharyngeal Carcinoma in Jakarta, Indonesia*. [Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Het nasopharynxcarcinoom (NPC) heeft een hoge incidentie in Indonesië. Het is hier de meest voorkomende tumor in het hoofd-halsgebied. De piekincidentie ligt tussen de 40 en 50 jaar. Hierdoor beïnvloedt het patiënten in de bloei van hun leven en vormt NPC een sociaal-economisch probleem voor de Indonesische samenleving. NPC wordt vaak pas in een laat stadium ontdekt, omdat de eerste klachten specifiek zijn en lijken op een verkoudheid en griepklachten. Daarnaast zijn huisartsen vaak niet op de hoogte van de hoge incidentie van NPC in hun regio en missen zij kennis over de symptomen passend bij NPC. Ook de bevolking weet weinig over NPC waardoor zij pas laat naar een dokter gaan bij klachten.

De belangrijkste pijler in de behandeling van een vroeg stadium NPC is radiotherapie. Wanneer de tumor verder gevorderd is, wordt chemotherapie in combinatie met radiotherapie gegeven. Het probleem is echter dat er in Indonesië is een enorm gebrek aan radiotherapeutische faciliteiten. De Indonesische archipel bestaat uit 17.508 eilanden met in totaal 248 miljoen inwoners. Er zijn in totaal 26 radiotherapeutische centra met samen ongeveer 8 2D, 14 3D-apparaten en 4 IMRT apparaten. Deze zijn voornamelijk gelegen in de regio Jakarta. Ter vergelijking, alleen al in de regio Amsterdam zijn net zoveel faciliteiten.

Veel NPC patiënten in Indonesië zullen nooit gediagnosticeerd worden omdat ze überhaupt niet naar het ziekenhuis komen. Ook tijdens en na de behandeling worden veel patiënten uit het oog verloren omdat ze besluiten niet meer terug te komen. Dit, in combinatie met het ontbreken van een landelijk registratiesysteem, maakt het moeilijk om een duidelijk beeld te krijgen van de daadwerkelijke omvang van de NPC incidentie en de gerelateerde problemen. De hoge uitval voor, tijdens en na de behandeling wordt onder andere veroorzaakt door sociaal-economische omstandigheden, lange afstanden naar het dichtstbijzijnde ziekenhuis, verzekeringskwesties, de invloed van de hele familie bij de besluitvorming van de behandeling en de keuze voor alternatieve geneesmiddelen als behandeling. Verschillende studies in dit proefschrift hebben problemen ondervonden door het grote aantal patiënten dat is uitgevallen.

Negentig procent van de patiënten in dit proefschrift presenteerde zich met een laat stadium van de ziekte in het ziekenhuis. De prognose van de behandeling was hierdoor bij de meeste patiënten matig. Een vroegere diagnose van de tumor zal bijdragen tot een beter behandelingsresultaat.

Het Epstein-Barr virus (EBV) is causaal verbonden met NPC en is actief aanwezig in alle tumorcellen. NPC patiënten ontwikkelen een karakteristieke IgA antistof respons tegen EBV eiwitten. Hierdoor kan EBV als potentiële biomarker voor de NPC diagnostiek worden gebruikt. De virale hoeveelheid DNA in de neuskeelholte (nasopharynx) kan bepaald worden met behulp van een borsteltje dat langs de nasopharynxwand gehaald is. Deze methode

kan mogelijk het invasieve biopt vervangen bij de diagnose NPC. In dit proefschrift werd onderzocht of door middel van kwantificering van de EBV-DNA lading in de borstel uit de nasopharynx en in het volbloed, in combinatie met de humorale IgA immuunrespons tegen VCA-p18 en EBNA1, NPC vroegtijdig opgespoord kon worden. Daarnaast werd gekeken of deze biomarkers kunnen helpen bij de controle van de patiënten na de behandeling. Tevens is onderzocht of fotodynamische therapie een optie kan zijn voor de behandeling van NPC en is gekeken hoe de bekendheid van NPC bij artsen kan worden verbeterd.

Hoofdstuk 2 beschrijft de epidemiologie, incidentie, etiologie, en klachten bij presentatie van 1121 patiënten met NPC, die behandeld werden in het Dr. Cipto Mangunkusumo Universitair Ziekenhuis in Jakarta in de periode van 1996-2005. De incidentie van NPC werd bepaald door interne ziekenhuisgegevens te combineren met de gegevens van andere centra in Indonesië, zoals Surabaya, Yogyakarta, Makassar, Bali, Bandung en Medan. De NPC incidentie was zeer hoog in heel Indonesië. Op jaarbasis zijn er ongeveer 12.000-15.000 nieuwe NPC gevallen, neerkomend op een incidentie van 6/100.000. Door de beperkte registratie van oncologische patiënten is het werkelijke aantal NPC gevallen waarschijnlijk veel hoger. NPC is de meest voorkomende tumor in het hoofd-halsgebied (28,4%). De bevolkingsgroep met het hoogste incidentie was de Javaanse bevolking, maar NPC kwam bij alle etnische groepen in Indonesië voor. Aanvankelijk werd gedacht dat met name een Chinese genetische achtergrond een risico vormde voor NPC, maar onze resultaten laten zien dat NPC een multi-etnisch probleem is in Indonesië. Onze studies lieten zien dat patiënten op een relatief jonge leeftijd werden getroffen door NPC (de piekleeftijd was 30-49 jaar). Twintig procent was jonger dan 30 jaar. Een bimodale leeftijdsverdeling, zoals in de literatuur gesuggereerd, werd niet gezien.

Het hoge aantal jonge patiënten met een vergevorderd stadium van NPC geeft het belang aan van vroegtijdige diagnose om betere behandelresultaten te verkrijgen. Van alle patiënten had 60,6% eenzijdige oorproblemen. Deze behoren tot de vroege symptomen van NPC. Patiënten gaven aan dat zij deze symptomen al enkele maanden hadden voordat ze een bezoek aan de KNO-afdeling brachten. Een beter bewustzijn van NPC bij zowel patiënten als dokters en een goede screening van de jonge patiënten met klachten passend bij NPC kunnen bijdragen tot een eerdere diagnose en dus betere behandelresultaten.

De sterke associatie tussen EBV en NPC levert potentiële biomarkers op voor NPC. In **hoofdstuk 3** wordt een niet-invasieve techniek geanalyseerd, waarbij een borsteltje via de neus langs het nasopharynxoppervlak wordt gehaald. De virale DNA lading in de borstel werd kwantitatief gemeten en getest op de diagnostische waarde bij nieuwe NPC patiënten. Deze borsteltjes werden ontwikkeld als alternatieve test voor het verkrijgen van tumorcellen uit de primaire tumor, ter vervanging van de pijnlijke invasieve biopsie. De EBV DNA lading werd

gekwantificeerd en vergeleken met gezonde individuen en patiënten met andere hoofdhalstumoren. We vonden een significant verschil in het niveau van EBV DNA tussen NPC patiënten en de controlepopulaties. Extreem hoge EBV-DNA waarden (tot 10^7 kopieën per borstel) werden gevonden bij patiënten met NPC, terwijl de gezonde EBV dragers maximaal $1,5 \times 10^3$ kopieën per borstel hadden. Tevens werd gevonden dat EBV-RNA een marker kan zijn voor aanwezigheid van intacte “levende” tumorcellen. Er werd geen correlatie gevonden tussen de EBV-DNA lading en het tumorstadium. Dit kan worden verklaard door het kleine oppervlakte dat bereikt wordt door de borstel. De studie toonde aan dat EBV-DNA kwantificering, in combinatie met de IgA EBNA1, een betrouwbaar diagnosticum is om aanwezigheid van NPC tumorcellen te detecteren.

EBV-DNA spiegels in volbloedmonsters waren niet voldoende informatief voor de diagnose van NPC. Dit kwam met name door het hoge aantal fout-negatieve uitslagen bij NPC patiënten. Na de behandeling zou de borstel ook informatie kunnen verschaffen over de aan- of afwezigheid van lokale tumor. Hiermee zouden recidieven of residuen vroegtijdig opgespoord kunnen worden. De virale lading in de borstels weerspiegelt carcinoomspecifieke EBV betrokkenheid. Nochtans kan deze procedure het bipt nog niet vervangen, omdat histopathologisch onderzoek nog steeds beschouwd wordt als de gouden standaard, maar mogelijk kan dit wel in de toekomst.

In **hoofdstuk 4 en 5** wordt gekeken of de biomarkers, naast de primaire diagnostiek, ook gebruikt kunnen worden om het effect van de behandeling vast te stellen en of ze effectief zijn in de follow-up na behandeling. Tevens werd naar de ervaring van patiënten gevraagd. De afname van de borstel werd niet als pijnlijk ervaren. Definitieve diagnose van NPC wordt gesteld door een endoscopisch geleide biopsie van de primaire tumor in de nasopharynx. In Indonesië is dit alleen mogelijk in de academische ziekenhuizen. Het huidige verzekeringssysteem maakt een directe verwijzing van de huisarts naar een academisch ziekenhuis onmogelijk. Derhalve kan een ongewenste vertraging in de diagnose worden veroorzaakt. Meer dan 95% van onze NPC patiënten ($n = 228$) bleek een hoge virale lading te hebben in de borstel. De cut-off-waarden (COV) werden bepaald met behulp van gezonde controles ($n = 53$). We hebben aangetoond dat EBV-DNA load in de borstels een zeer specifiek en minimaal invasief diagnosticum is voor de primaire NPC diagnose. Het had eenzelfde gevoeligheid als EBV-IgA serologie en was superieur aan de bepaling van de EBV-DNA lading in het bloed. De virale lading in de borstel was niet gecorreleerd aan het TNM-stadium. Na de behandeling nam de EBV-DNA lading aanzienlijk af. Dit zagen we niet in de IgA immuunrespons tegen VCA-p18 en EBNA1. De virale lading bleef hoog in meerdere gevallen na twee maanden na de behandeling hetgeen suggereert dat ofwel de detectie van de markers alléén niet voldoende is voor bepaling van de respons ofwel dat er nog

tumorrest aanwezig is als gevolg van slechte c.q. onvolledige behandeling. Dit laatste is het meest waarschijnlijk gezien de lokale behandelingsituatie in Indonesië. Patiënten met een EBV-DNA load onder de COV na de behandeling hadden een betere overleving na twee jaar. EBV-DNA load in het bloed weerspiegelt de afscheiding van DNA-fragmenten uit apoptotisch tumorweefsel, die snel geklaard worden uit de circulatie. Een hoge EBV-DNA lading in het bloed zouden aanhoudend tumorapoptose en necrose kunnen weerspiegelen in plaats van een groeiende tumormassa (hoofdstuk 3). Het virale DNA gehalte in volbloed verkregen twee maanden na de behandeling was bij de meeste patiënten lager dan in het initiële diagnostische monster. Aangezien veel volbloedmonsters negatief waren in de diagnostische afnames en in de follow-up, is de virale lading in volbloed geen goede indicator voor de behandelrespons. De virale lading in volbloed correleerde wel met het N en M stadium.

Mogelijk is het gekozen tijdstip van twee maanden na de behandeling te kort om volledige klaring van EBV-DNA te verkrijgen. Afnemende EBV activiteit was kenmerkend voor een complete respons, terwijl gedeeltelijke of non-responders een stabiel of zelfs stijgend EBV DNA niveau hadden. Langere follow-up is nodig om de klinische relevantie van persisterende EBV DNA-lading in de borstel te bepalen.

In **hoofdstuk 5** werd de dynamiek van de virale biomarkers tijdens de follow-up van patiënten uitgebreider geanalyseerd. De analyse van de virale lading twee jaar na de behandeling liet zien dat de meerderheid van de monsters onder de klinische COV lagen. Bij recidiverende ziekte was de virale lading in de borstel licht gestegen. Echter, de virale lading in het bloed en de antilichamen tegen VCA-p18 en EBNA1 waren niet informatief bij de opsporing van recidieven. De biomarkers, gemeten bij diagnose, gaven geen voorspelling op de algemene overlevingstijd van de patiënten. Wanneer de IgA antilichaamrespons twee maanden na de behandeling hoog bleef, werd een betere prognose gezien (IgA - VCA - p18 $p = 0,042$ en IgA - EBNA $p = 0,041$). De analyse van de dynamiek van virale biomarkers was niet indicatief voor het detecteren van recidieven zoals verwacht, maar het gebrek aan adequate behandeling in combinatie met de onregelmatige afname van de samples maakt analyse minder betrouwbaar.

Hoofdstuk 6 beschrijft NPC bij kinderen en jongvolwassenen. Negentig procent van deze jonge patiënten in de kliniek presenteerde zich met een gevorderd ziektestadium. Er was geen verschil in demografie en klachtenpatronen tussen de kinderen en de jongvolwassenen groep. Van de 49 patiënten presenteerde 14% zich met afstandsmetastasen. In de literatuur presenteert slechts 1-4% van de kinderen zich met metastasen op afstand. Ook vonden we een zeer lage totale overleving in vergelijking met de literatuur (respectievelijk 7-19% versus 52-77%). Hieruit blijkt dat de oncologische zorg van jonge NPC patiënten in de regio Jakarta serieus aandacht moet krijgen en verbeterd dient te worden. De ziekte zou in een eerder

stadium gediagnosticeerd moeten worden, de juiste behandeling moet op tijd gegeven worden en de follow-up moet verbeterd worden om overlevingskansen te vergroten.

Onze studie toont aan dat bijna alle patiënten een lange wachttijd hadden voor aanvang van de radiotherapie. Dit weerspiegelt de reeds bestaande druk op de gezondheidszorg. De ambitieuze plannen van de huidige regering om een zorgverzekering voor de gehele bevolking te verstrekken (gestart vanaf 2014) zal deze druk verder vergroten.

Behandeling van persistent en/of recidiverend NPC blijft een uitdaging, vooral in Indonesië. Lokale persistente of recidiverende ziekte in de nasopharynx kan worden behandeld met herbestraling of chirurgie. Met radiotherapie dient de tweede dosis echter hoger te zijn dan de initiële dosis, waardoor ernstige bijwerkingen kunnen optreden. In Indonesië is her-bestraling sowieso niet realistisch wegens de beperkte capaciteit van de radiotherapiefaciliteiten. Chirurgische procedures voor de nasopharynx zijn ingewikkeld en ook hiervoor ontbreken voldoende voorzieningen. In **hoofdstuk 7** wordt een nieuwe therapie besproken die dit probleem deels kan oplossen. Fotodynamische therapie (PDT) is een therapie waarbij gebruik wordt gemaakt van een lichtgevoelige stof in combinatie met laserlicht om tumorderstructie te induceren. We deden een haalbaarheidsstudie met 21 patiënten met lokaal recidiverend of persistent NPC en behandelden hen met Temoporfine gemedieerd PDT. PDT was veilig en effectief. PDT met de nasopharyngeale applicator is een betrekkelijk eenvoudige techniek, welke kan worden gebruikt om recidieven van NPC, beperkt tot de nasopharynx, te behandelen. Aangezien deze procedure onder plaatselijke verdoving kan worden uitgevoerd en geen dure apparatuur nodig is, is de behandeling een geschikte optie voor regionale ziekenhuizen in Indonesië. PDT is een “one hit” behandeling met beperkte bijwerkingen op de lange termijn. PDT zou ook kunnen worden gebruikt bij de primaire behandeling om de wachttijd voor radiotherapie (vaak meer dan 6 maanden) te overbruggen. Een haalbaarheidsstudie is gepland om deze hypothese te onderzoeken.

Aangezien de meeste patiënten in een laat stadium bij de ziekenhuizen aankomen, moeten inspanningen worden gestart om meer kennis van NPC te verschaffen aan zorgverleners en de bevolking. In **hoofdstuk 8** wordt de noodzaak van het creëren van kennis over NPC onder huisartsen besproken. Betere kennis van de vroege symptomen van NPC kan resulteren in een eerdere verwijzing naar ziekenhuizen, waardoor de ziekte in een eerder stadium vastgesteld kan worden. Voor een juiste en vroegtijdige diagnose van NPC is de kennis van huis- en regioartsen die de eerste zorg verlenen voor patiënten cruciaal. Deze studie gaf aan dat lezingen en symposia effectieve leermiddelen waren om (huis)artsen te trainen. Onderwijs over de vroege symptomen van NPC, diagnose en risicofactoren, resulteerde in een verhoogde kennis op korte termijn. Vragenlijsten lieten de noodzaak van verdere opleiding zien. Deze onderwijsprogramma's moeten niet alleen worden voortgezet voor

NPC, maar moeten ook worden uitgebreid voor andere vormen van kanker, omdat kanker steeds meer wordt erkend als de belangrijkste doodsoorzaak in Indonesië. Een spanningsveld tussen de noodzaak van betere opsporing en de beperkte behandelingsmogelijkheden op dit moment roept ethische vragen op.