

Samenvatting proefschrift

Stratum corneum biomarkers for inflammatory skin diseases

Verstoring van de barrièrefunctie van de huid

Sjors Koppes¹

Onze huid vormt een barrière met de buitenwereld: ze zorgt ervoor dat stoffen het lichaam niet kunnen binnen dringen en dat andere stoffen – zoals water – het lichaam niet kunnen verlaten. De barrièrefunctie van de huid wordt vooral door de bovenste laag, het stratum corneum (SC), vervuld. Deze laag bestaat uit dode, verhoorde cellen die corneocyten worden genoemd. Wanneer de huid met allergenen of irriterende stoffen in aanraking komt, kan dit leiden tot allergisch contactdermatitis (ACD) of irritatief contactdermatitis (ICD), twee vormen van contactdermatitis (CD). Bij bepaalde beroepen, zoals schoonmakers en kappers, maar ook bij werknemers in de zorg en de horeca vormt CD een groot deel van het totale aantal arbeidsgerelateerde aandoeningen. Veel van deze werknemers hebben ook atopische dermatitis (AD), een inflammatoire huidziekte waarbij de huidbarrière eveneens verstoord is. Deze mensen lopen een hoger risico om een chronische vorm van ACD of ICD te ontwikkelen en is het van belang diagnostische middelen te hebben, opdat de juiste behandeling en/of preventieve maatregelen kunnen worden ingezet. Een probleem in de huidige diagnostiek van ACD en ICD is dat klinische symptomen niet specifiek genoeg zijn om ACD van ICD te onderscheiden en dat de anamnese niet altijd duidelijkheid kan bieden. Bovendien kunnen ACD, ICD en AD tegelijkertijd bij dezelfde patiënt voorkomen. In die gevallen kunnen indicatoren van de huidbarrièrefunctie en mediators van het ontstekingsproces mogelijk uitkomst bieden. Deze stoffen, ook wel biomarkers genoemd, kunnen niet alleen bijdragen aan de diagnostiek maar ook in worden gezet om het effect van een (lokale) therapie te monitoren. In het huidige onderzoek worden biomarkers veelal uit bloedmonsters bepaald of, om een beeld van de lokale situatie te krijgen, uit huidbiopten. Deze methodes zijn invasief, wat het gebruik in een arbeidsgeneeskundige en klinische setting in de weg staat. Daar het functioneren van de huidbarrière voor een groot deel bepaald wordt door het SC, kunnen biomarkers verkregen uit het SC een goed beeld geven van eventuele barrièrestoornissen. Bovendien zijn de ontstekingsprocessen bij ICD, ACD en AD lokaal van aard. Recente vooruitgang in de gevoeligheid van analysetechnieken en nieuwe inzichten in de mechanismen die een belangrijke rol spelen bij ontwikkeling van CD en AD hebben het mogelijk gemaakt om een grote diversiteit aan biomarkers uit het SC te bepalen. Dit proefschrift evalueert uit het SC verkregen biomarkers voor diagnostiek, therapie en monitoring van ACD, ICD en AD. De volgende twee hoofddoelen

zijn geformuleerd met de daarbij samenhangende vragenstellingen:

Doel I: Inzicht krijgen in SC-biomarkers gerelateerd aan huidbarrièrefunctie en ontstekingsreactie bij ACD en ICD

Onderzoeksvraag 1: Welke biomarkers zijn gerelateerd aan ACD en ICD en wat is de potentie van deze biomarkers in onderzoek en kliniek?

Onderzoeksvraag 2: Welke uit het SC verkregen biomarkers van de huidbarrière en lokale ontstekingsreactie kunnen worden gebruikt om ACD van ICD te onderscheiden?

Doel II: Evaluatie van de bruikbaarheid van verschillende uit het SC verkregen biomarkers voor de klinische praktijk van AD

Onderzoeksvraag 3: Welke uit het SC verkregen biomarkers van huidbarrière en lokale ontstekingsreactie kunnen worden gebruikt voor de monitoring van AD-therapie?

1. Onderzoeksvraag: Welke biomarkers zijn gerelateerd aan ACD en ICD en hoe kunnen ze gebruikt worden in onderzoek en kliniek?

In **Hoofdstuk 2** wordt twee niet-systematische reviews een overzicht gegeven van de verschillende biomarkers die bekend zijn voor ACD (**hoofdstuk 2.1**) en ICD (**hoofdstuk 2.2**).

In het onderzoeksveld van ACD ligt de nadruk op de immunologische component van de aandoening. Daarbij zijn verschillende mediators van het aangeboren immuunsysteem en het T-cell gemedieerde immuunsysteem geïdentificeerd die een cruciale rol spelen in het sensitisatie-proces en het elicitatie-proces. Hoewel meerdere studies wijzen op het belang van de huidbarrière bij de ontwikkeling van ACD, zijn er weinig studies bekend die hun focus hebben op biomarkers van huidbarrière bij ACD. Er zijn wel meerdere studies naar genetische variatie bij ACD, die laten zien dat bepaalde polymorfismen die van belang zijn bij metabolisme, immuun reactie en huidbarrière, predisponeren voor ACD en daarom mogelijk geschikte biomarkers zijn om gevoelige individuen te identificeren.

Huidbarrierebeschadiging is de onderliggende oorzaak van ICD en de meest gebruikte biofysische parameter om een dergelijke beschadiging te meten is trans-epidermaal waterverlies. Er zijn ook onderzoeken die laten zien dat

¹ Promotie instituut: Universiteit van Amsterdam; promotiedatum: 8 november 2017

concentraties van IL-1 α en NMF, na blootstelling aan een irriterende stof, verminderen in concentratie. Helaas is dit slechts voor een beperkte groep irriterende stoffen onderzocht. Daarnaast is er epidemiologisch onderzoek bij werknemers die vaak in aanraking komen met irriterende stoffen, dat laat zien dat FLG LOF en polymorfismen in de genen die verantwoordelijk zijn voor de pro-inflammatoire cytokines TNF- α en IL-1 α het risico op het ontwikkelen van ICD beïnvloeden.

Tot nu toe heeft geen van de onderzochte biomarkers een toepassing gehad in de klinische praktijk, bijvoorbeeld om ACD van ICD te onderscheiden, of als test-uitkomst bij plak-proeven.

2. Onderzoeksvraag: Welke uit het SC verkregen biomarkers van de huidbarrièrefunctie en lokale ontstekingsreactie kunnen worden gebruikt om ACD van ICD te onderscheiden?

In een klinische studie, beschreven in **hoofdstuk 3.1 en 3.2**, is gezocht naar een biomarker die ACD van ICD zou kunnen onderscheiden. De huidbarrière-biomarker NMF, de Dermal Texture Index (DTI, het gemiddelde aantal Circular Nano-Objects (CNO) ook wel 'villous protrusions' (VP) genoemd) op het oppervlak van de corneocyten, proteases en verschillende ontstekingsmediatoren zijn daarvoor bepaald bij ICD en ACD. Bij een groep van 27 patiënten is ACD voor vier allergenen geïnduceerd: chroom (Cr), nikkel (Ni), methyl(chloro)isothiazolinone (MCI/MI) of parafenyleendiamine (PPD) en een ICD voor één irriterend (sodiumlaurylsulfaat (SLS)). SC-monsters zijn vervolgens van deze huidtestlocaties afgenomen en hieruit zijn de NMF-concentratie en ontstekingsmediatoren bepaald. Tevens is er atomic force microscopy (AFM) gebruikt om de oppervlakte van corneocyten in kaart te brengen. Abnormaliteiten in de textuur van het oppervlak van de corneocyten, de CNO's, zijn daarbij geteld en uitgedrukt in DTI. De resultaten laten zien dat MCI/MI, als enige allergene een significante daling in NMF-concentratie bewerkstelligt vergelijkbaar met SLS. De resultaten van proteaseactiviteit en in de in **hoofdstuk 3.2** beschreven uitkomsten van IL-1 α -concentratie laten gelijkenissen tussen MCI/MI en SLS zien. Op microscopische schaal vertonen de MCI/MI-monsters tevens een afwijkende morfologie (echter, zonder stijging van de DTI). De morfologische veranderingen bij MCI/MI suggereren, samen met de overeenkomsten tussen MCI/MI en SLS wat betreft NMF, proteases en IL-1 α , dat een irriterende component deel uitmaakt van de pathogenese van MCI/MI-geïnduceerd ACD. Ten slotte lijkt het gemiddelde aantal CNO's op de corneocyten, uitgedrukt in de DTI, te kunnen differentiëren tussen SLS en de geteste allergenen; SLS is de enige onderzochte stof die een verhoging van de DTI veroorzaakt. Deze resultaten zijn veelbelovend voor onderzoek en klinische doeleinden en dienen verder te worden bestudeerd.

In **hoofdstuk 3.2** worden lokale ontstekingsmediatoren in het SC van de geïnduceerde ACD en ICD-laesies bepaald en wordt hun onderscheidend vermogen (tussen ACD en ICD) geëvalueerd. In totaal zijn er 32 mediators bepaald. De resultaten laten zien dat MCI/MI een uitzonderlijk profiel heeft. In zijn algemeenheid zijn de veranderingen in inflammatoire mediators bij MCI/MI hoger dan bij de andere allergenen; de concentraties van INF- γ , IL-8/CXCL8, IP10/CXCL10, MDC/CCL22, Eotaxin-1, IL-7 en VEGF laten significante veranderingen zien bij MCI/MI maar niet bij de andere allergenen. Met betrekking tot de verschillen tussen ICD en ACD, lijkt IL-16 indicatief te zijn voor ACD: IL-16 is significant verhoogd in test-geïnduceerde ACD-laesies van Cr, Ni, MCI/MI maar niet in SLS.

3. Onderzoeksvraag: Welke uit het SC verkregen biomarkers van huidbarrièrefunctie en lokale ontstekingsreactie kunnen worden gebruikt voor de monitoring van AD-therapie?

Om te kunnen bestuderen welke uit het SC verkregen biomarkers geschikt zijn voor het monitoren van therapie bij AD, beschrijft dit proefschrift drie klinische studies (**hoofdstuk 4**). In de eerste studie (**hoofdstuk 4.1**) is gekeken hoe NMF en DTI zich tot elkaar verhouden in een populatie van AD-patiënten waarbij meer dan de helft drager was van een filaggrin loss-of-function (FLG LOF) mutatie. Resultaten van deze studie laten zien dat NMF en DTI sterk gecorreleerd zijn, zowel voor als na behandeling (repectievelijk $r = -0.80$ en 0.77 ; $p < 0.001$). Patiënten met een FLG LOF mutatie laten na behandeling, ondanks klinische verbetering, een persisterend hoog DTI zien. Veel (maar niet alle) CNO's hebben het eiwit corneodesmosin op het oppervlak, met name bij homozygote en (compound) heterozygote FLG LOF-patiënten. Dit laatste kan wijzen op een mogelijk probleem in de uitrijping van de corneocyten. Deze resultaten tonen aan dat patiënten met een FLG LOF-mutatie een uitgesproken corneocytmorfologie hebben, die afwijkt van die van patiënten zonder FLG LOF-mutatie. Dit kan mogelijk de slechtere behandelingsuitkomsten bij deze groep verklaren en aanzetten tot nieuwe behandelingsstrategieën en het stratificeren van patiënten in verschillende groepen.

In **hoofdstuk 4.2** zijn verschillende biomarkers (NMF, ontstekingsmediatoren) en klinische en biofysische parameters (TEWL, SC-hydratie, SCORAD) ingezet om, in een gerandomiseerde klinische studie, de effectiviteit van drie verschillende therapieën voor AD te beoordelen bij patiënten met milde tot matige AD. In deze studie is de effectiviteit van een crème die onder andere ceramides en magnesium (Cer-Mg) bevat, vergeleken met (1) Unguentum leniens (UL), een zalf die uit 70% vette componenten bestaat en (2) een zwak werkend corticosteroïd, te weten hydrocortisonacetaat (HC). De resultaten laten zien dat Cer-Mg en HC vergelijkbare verbetering laten zien met betrekking tot TEWL en SCORAD. Daarnaast laat de Cer-Mg crème een significant grotere daling zien ten opzichte van UL met betrekking tot

SCORAD en TEWL. Ten slotte laat de Cer-Mg creme zien dat het effectiever is in het verbeteren van huidhydratie in vergelijking met HC en UL. Anders dan HC en UL, die de NMF levels in het SC verminderen, bleef de NMF hoeveelheid in het SC onder de de Cer-Mg therapie gelijk. Een daling van NMF heeft mogelijk negatieve gevolgen op het verdere beloop van de aandoening en de gevolgen van een therapie-geïnduceerde daling zal daarom geëvalueerd moeten worden. In **Hoofdstuk 4.3** zijn de gevolgen van de Cer-Mg-behandeling voor ontstekingsmediatorenprofiel in het SC geëvalueerd. 24 (uit een totaal van 38) ontstekingsmediatoren konden vanuit SC-monsters worden gekwantificeerd; de meeste van deze mediators zijn niet eerder uit dergelijke SC-monsters bepaald. Van alle mediators blijken IL-8 en met name TARC/CCL17, het meest geschikt voor de evaluatie van de effectiviteit van de therapie en het inschatten van de ernst van de aandoening. De afname in deze ontstekingsmediators correleren het sterkst (respectievelijk $r=0.56$ en $r=0.45$) met de afname van klinische symptomen bij patiënten met een matig ernstige vorm van de ziekte.

In de derde klinische studie (**hoofdstuk 4.4**) worden Raman-spectromicroscopie en HPLC, twee methoden om NMF te meten, met elkaar vergeleken. Beide methoden laten zien dat NMF diepte afhankelijk is en dat lage NMF-concentraties bij patiënten met FLG-mutaties aanwezig zijn. De correlatie tussen de resultaten van beide methodes is significant ($r^2=0.61$; $p<0.0001$). De overeenkomst bij beide methoden tussen metingen aan linker- en rechterarm tonen de robuustheid en reproduceerbaarheid van de methoden aan. Daar beide methoden vergelijkbare prestaties laten zien, is de keuze voor een groot deel afhankelijk van praktische overwegingen, zoals studieontwerp, kosten en tijdsrestricties.

Conclusie

Biomarkers, verkregen uit het SC, hebben potentie in diagnostiek en monitoren en evalueren van therapie bij patiënten met ACD, ICD en AD. Het aantal CNO's op het oppervlak van de corneocyt, uitgedrukt in DTI en de concentratie van IL-16 in het SC hebben de potentie om ACD van ICD te kunnen onderscheiden. Of deze resultaten generaliseerbaar zijn voor alle allergenen moet vervolgonderzoek bevestigen.

Voor het monitoren van AD-therapie zijn verschillende biomarkers geïdentificeerd. TARC/CCL17 en IL-8 hebben hierbij de meeste potentie: begin concentraties van TARC/CCL17 en IL-8 correleren significant met ernst van de ziekte en afname in de concentraties voor en na therapie zijn geassocieerd met verbetering van klinische symptomen.

NMF is een goede fenotypische biomarker voor het filagrinne genotype. Daarnaast is NMF ook een geschikte biomarker voor het monitoren van ongewenste effecten op de huidbarrière bij AD-therapie met corticosteroiden. Bovendien kan NMF worden gebruikt om veranderingen

van de huidbarrière door allergenen en irriterende stoffen te onderzoeken.

Atomic force microscopy kan worden gebruikt om veranderingen van het oppervlak van corneocyten te onderzoeken. Patiënten die drager zijn van een FLG LOF mutatie laten een ander oppervlakprofiel op corneocyten zien dan patiënten die deze mutatie niet hebben. Dit afwijkende oppervlakprofiel persisteert, zelfs na klinische verbetering en het effect is in bijzonder zichtbaar bij de patiënten met 2 FLG LOF mutaties. Dit verklaart mogelijk de moeilijker te behandelen klachten van deze patiëntengroep. Deze kennis zou kunnen helpen bij een meer persoonlijk gerichte therapie.