Ramanspectroscopie

Stappen richting de dermatologische diagnostiek

G. Puppels[1], P. Caspers[2], T. Bakker Schut[2], A. Nouwen[3], F. Weesie[4], R. van den Bos[5], S. Pasmans[6], T. Nijsten[5]

Ramanspectroscopie is een niet-invasieve optische techniek die gedetailleerde informatie verschaft over de moleculaire samenstelling van de huid met, waar gewenst, een hoog ruimtelijk oplossend vermogen. In een eerder nummer van dit tijdschrift is de basis van de technologie al eens uiteengezet. [1] In datzelfde artikel is ook een potentiële klinisch diagnostische toepassing besproken; namelijk het bepalen van het gehalte van de *natural moisturizing factor* (NMF) in de huid.
Dat de weg van een geslaagd wetenschappelijk onderzoek naar een kant-en-klare toepassing voor gebruik in de kliniek een lange is, zal geen verbazing wekken.
In dit artikel willen we kort enkele recente vorderingen richting daadwerkelijke toepassing in de kliniek bespreken.

Atopische dermatitis

Zoals bekend zijn filaggrinemutaties een belangrijke risicofactor voor de ontwikkeling van atopische dermatitis (AD). In het stratum corneum wordt het filaggrine enzymatisch afgebroken in de samenstellende aminozuren en afgeleiden daarvan. Dit mengsel vormt een belangrijk bestanddeel van het NMF. Minder filaggrineaanmaak als gevolg van een *loss-of-function*-mutatie, betekent minder NMF in het stratum corneum.
In afwezigheid van filaggrinemutaties vormt de NMF-fractie ongeveer 25-30% van het droog massagewicht van het stratum corneum. Een dergelijke mutatie leidt dus tot een zeer forse verandering in de moleculaire samenstelling van het stratum corneum. Aangezien het stratum corneum de belangrijkste schakel is in de barrièrefunctie van de huid, is het een logische gedachte dat dit ook van invloed is op de kwaliteit van die barrière. Een van de hypothesen is dat door een verminderde barrièrefunctie het lichaam vaker in aanraking komt met allergenen uit de omgeving, wat leidt tot sensibilisatie van het immuunsysteem.

In het eerdere artikel is beschreven hoe de bepaling van het NMF-gehalte met behulp van ramanspectroscopie gebruikt zou kunnen worden voor het vroeg identificeren van pasgeborenen met een verhoogd risico op de ontwikkeling van atopische dermatitis en voor het stratificeren van AD-patiënten. [1] Daar is in de tussentijd handen en voeten aan gegeven.
In de Erasmus MC Kinderhaven polikliniek voor kinderdermatologie wordt van alle AD-patiënten (0-17 jaar) sinds enige jaren het NMF-gehalte gemeten. Dit wordt gedaan door middel van metingen in de palm van de hand met behulp van een gen2-Skin Composition Analyzer van RiverD International B.V. (Rotterdam). Een eerste artikel is in voorbereiding dat laat zien dat AD-patiënten met een laag NMF-gehalte een sterk verhoogde kans hebben op ernstig eczeem, op sensibilisatie voor voedselallergenen en inhalatieallergenen, en op de ontwikkeling van voedselallergie en astma. [2]

Omdat de bestaande apparatuur te duur is voor inzet in de kliniek is inmiddels door RiverD International ook een prototype ramaninstrument ontwikkeld, dat helemaal is afgestemd op NMF-bepalingen: de NMF-scan (figuur 1). Een meting aan de handpalm duurt ongeveer een minuut. De NMF-scan wordt op dit moment getest in drie klinische centra in Europa, waarvan twee zich richten op onderzoek naar de mogelijkheden van preventie van AD door vroegdetectie van risicofactoren, zoals filaggrinemutaties bij pasgeborenen en het nemen van preventieve maatregelen. [3] Het derde centrum richt zich op preventie van arbeidsgerelateerde huidaandoeningen. Zoals bekend hebben AD-patiënten met een filaggrinemutatie een zeer sterk verhoogde kans op de ontwikkeling van orthoergisch eczeem. [4] De gedachte is dat met name in risicoberoepen (metaal, kappers, gezondheidszorg) de identificatie van deze groep patiënten kan helpen bij het nemen van doeltreffende preventieve maatregelen.

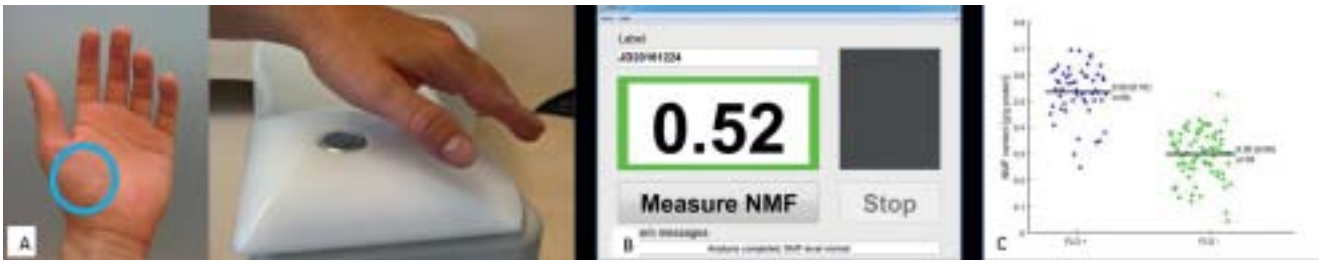
1. Universitair hoofddocent, afdeling Dermatologie, Erasmus MC, Rotterdam en Directeur RiverD International B.V.
2. Sr. onderzoeker, afdeling Dermatologie, Erasmus MC, Rotterdam en Sr. Scientist RiverD International B.V.
3. Masterstudent Geneeskunde, Erasmus MC, Rotterdam
4. Arts-onderzoeker, afdeling Dermatologie, Erasmus MC, Rotterdam
5. Dermatoloog, afdeling Dermatologie, Erasmus MC, Rotterdam
6. Dermatoloog, afdeling dermatologie, Erasmus MC-Sophia Kinderziekenhuis & Kinderhaven, Rotterdam

Mohschirurgie

Een tweede ontwikkeling richting de kliniek is de beoordeling van resectievlakken tijdens mohschirurgie. De beoordeling van resectievlakken is nu een tijdrovende, arbeidsintensieve en subjectieve stap. Ramanspectroscopie kan met hoge precisie tumorweefsel onderscheiden van omliggend gezond weefsel (figuur 2). [5] Op dit moment wordt onderzocht hoe deze eigenschap zou kunnen worden ingezet tijdens mohschirurgie.
De beoogde voordelen zijn dat de analyse direct op het resectieweefsel zou kunnen worden uitgevoerd wat vriescoupes en kleuringen overbodig maakt en dat de beoordeling objectief is. Het bewijs voor deze aanpak is geleverd in het onderzoekslaboratorium. [6] Nu volgt de lange weg naar uitontwikkeling tot een product dat geschikt is voor inzet in de klinische setting. Daartoe zijn als eerste stap twee prototype instrumenten ontwikkeld, die op dit moment worden getest in het Erasmus MC en aan de University of Nottingham (Groot-Brittannië).

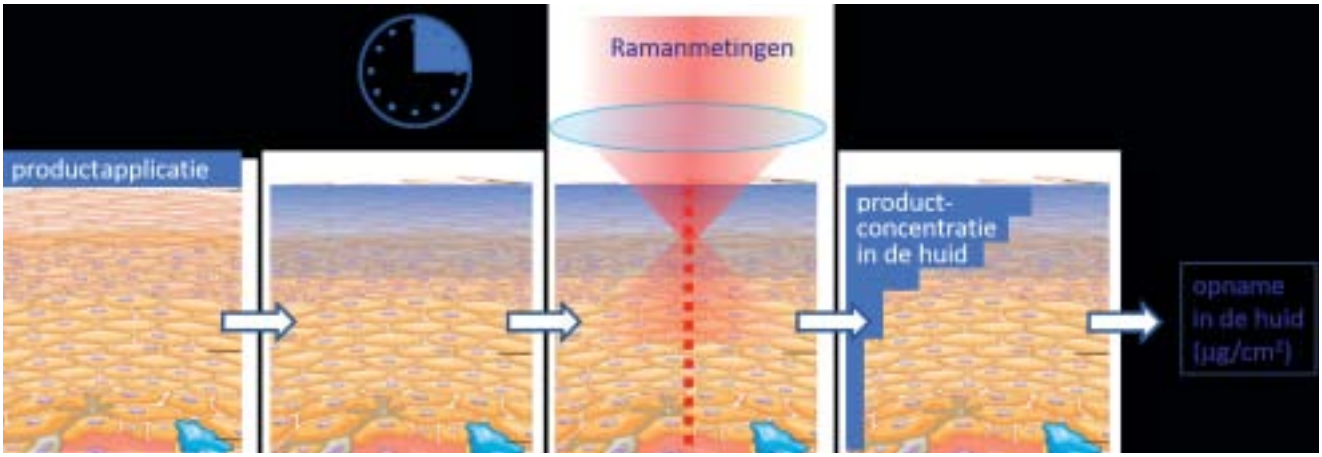
In het vat

Eén van de belangrijke functies van de huid is het vormen van een barrière tussen het lichaam en de buitenwereld. Over die barrièrefunctie weten we nog maar verbazingwekkend weinig in kwantitatieve zin. We weten niet goed wat de intacte huid tegenhoudt en hoe goed de huid dat doet. Dat komt doordat er geen directe kwantitatieve niet-invasieve in-vivomeetmethoden voor bestaan, behoudens transepidermaal waterverlies



Figuur 1. Illustratie van een meting met de NMF-scan. A. Metingen vinden plaats op de muis van de hand. Deze wordt op het meetvenster geplaatst. B. Het instrument meet vervolgens automatisch ramanspectra op een aantal locaties en berekent op basis daarvan het NMF-gehalte (in g_{NMF}/g_{eiwit}). C. Het NMF-gehalte laat zien of het huidfenotype overeenkomt met het fenotype van een drager van een 'loss-of-function'-mutatie in het filaggrinegen.

Figuur 2. Prototype ramaninstrument voor inspectie van resectievlakken tijdens mohschirurgie. A. Het specimen wordt in een cassette geplaats, waarbij het snijvlak in contact is met een venster, waardoorheen de ramanmetingen worden uitgevoerd. B,C. De cassette wordt in het instrument geplaatst, waarna de analyse start. D. Het instrument onderzoekt automatisch op microscopische schaal het hele snijvlak en geeft aan het eind van de analyse aan waar in het snijvlak zich nog tumorweefsel bevindt.



Figuur 3. Kwantitatieve bepaling van de penetratie van op de huid aangebrachte stoffen. Na applicatie en het verstrijken van de applicatietijd worden ramanmetingen verricht in de huid, op verschillende dieptes in de huid. Uit de ramanspectra kan op deze dieptes de concentratie worden bepaald van de op de huid aangebrachte stof en daarmee ook de totale hoeveelheid van de stof die in de huid is doorgedrongen.

(TEWL)-metingen waarmee kan worden vastgesteld hoeveel water door de huid heen ontsnapt. We weten daarmee dus ook niet hoe de barrièrefunctie tussen individuen verschilt, welke gevolgen dit zou kunnen hebben (bijvoorbeeld in de blootstelling aan allergenen), of hoe dit van invloed zou kunnen zijn op bijvoorbeeld transdermale toediening van medicijnen.

Om in deze lacune te voorzien is recent methodologie en data-analysesoftware ontwikkeld (SkinTools 3.0, RiverD International B.V.), die op basis van in-vivoramanspectra van de huid kan vaststellen hoeveel van een op de huid aangebrachte stof in de huid doordringt (in microgrammen per cm^2 huidoppervlak) (figuur 3). De verwachting is dat de industrie met producten voor de persoonlijke verzorging en de farmaceutische industrie deze ontwikkeling snel zullen oppakken voor het ontwikkelen en testen van producten en behandelingen. Maar als volgende stap liggen ook onderzoek naar individuele verschillen in barrièrefunctie van de huid, de relatie met (huid)aandoeningen en mogelijk de ontwikkeling van diagnostische huidbarrière-tests in het verschiet.

Ten slotte

Er wordt voortdurend nieuwe technologie ontwikkeld, die op zoek gaat naar toepassingen; de zogenaamde *technology push*, de hamer op zoek naar spijkers. De optische gereedschapskist is het makkelijkst toepasbaar op de buitenkant van het lichaam. Daarmee zit de dermatologie op de eerste rij.

De ontwikkeling van nieuwe diagnostische technieken, gebaseerd op optische methoden, is gebaat bij intensieve interactie met en (pro-)actieve sturing uit de kliniek. De gewenste sturing bestaat uit het zo duidelijk mogelijk formuleren van klinische problemen en de (diagnostische en praktische) eisen waaraan een technologische oplossing zou moeten voldoen. Daarna blijft zeer actieve betrokkenheid van de kliniek nodig om de klinische wensen en eisen en de technische mogelijkheden zo goed mogelijk op elkaar af te stemmen.

De ramanspectroscopie heeft als techniek voor in-vivohuidonderzoek twintig jaar geleden haar intrede gedaan. Dat heeft veel nieuwe informatie over de moleculaire samenstelling van de huid opgeleverd, die zich nu langzaamaan ook begint te vertalen in de ontwikkeling van diagnostische toepassingen, zoals kort gepresenteerd in dit artikel. Dat proces vergt de nodige inzet en geduld, maar resulteert in toenemende mate in mooie resultaten.

Literatuur

1. *Puppels GJ, Caspers PJ, Koljenović S, Neumann HAM. Identificatie van pasgeborenen met een hoog risico voor de ontwikkeling van atopische dermatitis met behulp van Ramanspectroscopie. Ned Tijdschr Dermatol Venereol 2013; 23:144-6.*
2. *Nouwen AEM, Karadavut D, Pasmans SGMA, et al. Natural Moisturizing Factor as a clinical marker in atopic dermatitis, submitted for publication.*
3. *Simpson EL, Chalmers JR, Hanifin JM, et al. Emollient enhancement of the skin barrier from birth offers effective atopic dermatitis prevention. J Allergy Clin Immunol 2014;134:818-23.*
4. *Visser MJ, Landeck L, Campbell LE, et al. Impact of atopic dermatitis and loss-of-function mutations in the filaggrin gene on the development of occupational irritant contact dermatitis. Br J Dermatol 2013;168:326-32.*
5. *Santos IP, Barroso EM, Bakker Schut TC, et al. Raman spectroscopy for cancer detection and cancer surgery guidance: translation to the clinics. Analyst 2017;142:3025-47.*
6. *Boitor R, Kong K, Shipp D, et al. Automated multimodal spectral histopathology for quantitative diagnosis of residual tumour during basal cell carcinoma surgery. Biomed Optics Express 2017;8:5749-66.*

Samenvatting

Ramanspectroscopie is een van de optische technieken, die stap voor stap dichterbij daadwerkelijke toepassing in de dermatologische diagnostiek komen. In dit artikel worden kort de recente vorderingen op het gebied van atopische dermatitis en de mohschirurgie besproken, alsook een nieuwe ontwikkeling: kwantitatieve bepaling van de penetratie van stoffen door de huid.

Trefwoorden

atopische dermatitis – mohschirurgie – huidpenetratie

Summary

Raman spectroscopy is one of the optical techniques, which is getting closer and closer to being utilized in dermatological diagnostics. In this paper recent developments in the areas of atopic dermatitis and Mohs surgery are briefly discussed, as well as a new development; quantitative determination of the penetration of compounds through the skin.

Keywords

atopic dermatitis – Mohs surgery – skin penetration

Gemelde (financiële) belangenverstrengeling
Dr. ir. G.J. Puppels, dr. ir. P.J. Caspers en dr. ir. T. Bakker Schut hebben een deeltijdbetrekking bij RiverD International BV, een spin-offbedrijf van het Erasmus MC dat onder andere ramanspectroscopische instrumenten voor in-vivohuidanalyse in haar productaanbod heeft.

Correspondentieadres

Gerwin Puppels
E-mail: g.puppels@erasmusmc.nl