



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Taking a closer look: non-invasive tools for in-depth characterisation of vulvar diseases**

Pagan, L.

### **Citation**

Pagan, L. (2023, December 12). *Taking a closer look: non-invasive tools for in-depth characterisation of vulvar diseases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3666289>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3666289>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).



De vulva is het zichtbare gedeelte van de vrouwelijke geslachtsdelen. De vulva moet tegen veel invloeden bestand zijn, waaronder frictie van wandelen of fietsen, alsook urine en vaginale afscheiding. Daarnaast vervult de vulva een seksuele rol. Zodoende is het begrijpelijk dat aandoeningen van de vulva voor aanzienlijke lichamelijke en psychologische problemen kunnen zorgen. Desondanks zijn vulvaire aandoeningen een onderbelicht onderwerp in de geneeskunde, mede door taboe in de samenleving.

Vulvaire ziekten kunnen goedaardig en kwaadaardig zijn. De focus van dit proefschrift ligt op premaligne vulvaire laesies. Vulvakanker is zeldzaam, maar de voorstadia van vulvakanker zijn relatief veelvoorkomend. Er worden twee aparte ontstaansvormen van vulvakanker erkend. Ongeveer 30% van de vulvatumoren kunnen ontstaan vanuit vulvaire HSIL (hooggradige squameuze intra-epitheliale laesies). Deze huidaandoening komt door een infectie met het humaan papillomavirus (HPV), hetzelfde virus dat ook baarmoederhalskanker veroorzaakt. De overige 70% van vulvakanker ontstaat zonder HPV vanuit huidafwijkingen genaamd gedifferentieerde vulvaire intra-epitheliale neoplasie (dVIN). Deze ziekte komt op diens beurt vaak voor in een achtergrond van lichen sclerosus (LS), een chronische inflammatoire huidaandoening dat ongeveer 0.3% van alle mannen, vrouwen en kinderen treft. LS is een veelvoorkomende, levenslange aandoening dat voor jeuk en verdunning van de genitale huid zorgt. Het gevolg bij vrouwen met LS is dat structuren zoals de kleine schaamlippen en de clitoris over tijd kunnen verdwijnen. De oorzaak van LS is onbekend. Wel zijn er aanwijzingen voor een genetische aanleg en wordt een associatie gezien met auto-immuunziekten.

Deze nauw verbonden vulvaire aandoeningen hebben met elkaar gemeen dat de bestaande behandelopties suboptimaal zijn. Vulvakanker en gedifferentieerde VIN worden operatief behandeld door middel van resectie van het aangedane vulvaire weefsel. Desalniettemin hebben beide ziekten ongeveer 40% kans om terug te keren met een zogenaamd recidief. Bovendien heeft opereren in een delicaat gebied zoals de vulva aanzienlijke gevolgen op dagelijks functioneren en seksualiteit. Vulvaire HSIL kan operatief of met lasertherapie worden behandeld. Topicale vulvaire HSIL-behandeling kan met imiquimod crème, welke immuun cellen stimuleert via inductie van de Toll-like 7 receptor (TLR-7). Helaas is imiquimod op termijn niet patiëntvriendelijk door bijwerkingen van pijn en irritatie, wat de toepassing en effectiviteit van imiquimod beperkt. Bovendien is de kans op een recidief vulvaire HSIL-laesie ongeveer 50%. Ondanks behandeling blijft er een kans van ongeveer 3%

dat alsnog vulvakanker ontstaat vanuit een vulvaire HSIL-laesie. LS wordt niet operatief behandeld, maar door levenslang smeren met ultra-potente (klasse 4) corticosteroiden, zoals clobetasol. Dit kan de jeukklachten doen verminderen en ziekteprogressie afremmen, maar niet volledig voorkomen. Veel klinici en patiënten zijn nog altijd huiverig over het inzetten van een ultra-potent middel, aangezien topicale corticosteroiden doorgaans niet is geïndiceerd voor applicatie op de delicate genitale huid. Zodoende wordt LS vaak niet agressief genoeg behandeld. Deze terughoudendheid kan desastreuze gevolgen hebben op de ziekteprogressie. Alle patiëntengroepen rapporteren hoge psychosociale en lichamelijke morbiditeit ten gevolge van hun vulvaire aandoening.

Bij al deze vulvaire ziekten is er dus een gebrek aan effectieve, specifieke en patiëntvriendelijke behandelopties. Om nieuwe therapie op de markt te brengen moet het ontstaan en beloop van een ziekte goed te begrepen en herkend worden. Pas daarna kan gerichte therapie worden ontwikkeld en getest. Veranderingen door nieuwe therapie worden in beeld gebracht door middel van zogenaamde 'biomarkers' die ziekte kunnen onderscheiden van een gezonde staat. Met deze meetmethoden kan je het effect van je nieuwe therapie beter volgen en beoordelen of een nieuwe therapie werkzaam is in klinische trials. Dit proefschrift beschrijft onderdelen van de ontwikkeling van nieuwe therapieën en herkenningpunten voor de behandeling van vulvakanker en voorstadia van vulvakanker. De these bestaat uit twee onderdelen:

**Sectie I** beschrijft de ontwikkeling en validatie van verschillende beeldvormende biomarkers voor vulvaire en HPV-gemedieerde ziekten.

In **Sectie II** wordt kennis opgedaan over het vulvaire microbiom. Hierdoor zijn inzichten vergaard met betrekking tot de ontstaansgeschiedenis van vulvaire ziekten, alsmede worden nieuwe biomarkers en targets voor therapie geïdentificeerd.

## SECTIE I: TOEPASSING EN VALIDATIE VAN BEELDVORMENDE BIOMARKERS VOOR VULVAIRE EN HPV-GEMEDIEERDE ZIEKTEN

Meetmethoden die nauwkeurig de ziekte-ernst en -last van vulvaire ziekten kunnen bepalen zijn schaars. Het eerste onderdeel van dit proefschrift focust op de ontwikkeling van betere beeldvormende biomarkers voor vulvaire en HPV-gemedieerde aandoeningen. Allereerst wordt de validatie van driedimensionale (3D) fotografie bij vulvaire HSIL, genitale wratten en wratten van de handen en voeten gerapporteerd. Vervolgens is een studie

uitgevoerd waarbij een multimodale aanpak is ingezet om vulvaire HSIL en LS te typeren en vergeleken met gezonde vrijwilligers. Tijdens deze diepe fenotypering zijn onder andere technieken zoals dermatoscopie, dynamische optische coherentie tomografie (D-OCT) en reflecterende confocale microscopie (RCM) toegepast. Vervolgens wordt een studie beschreven waarbij 3D fotografie is ingezet in een klinisch onderzoek met een nieuw geneesmiddel tegen wratten op de handen.

Wanneer nieuwe therapieën worden getest, is het van belang om het verschil in grootte over tijd accuraat vast te kunnen stellen. Vulvaire HSIL-laesies zijn vaak grillig van vorm en de oppervlakte van de aandoening wordt slechts matig ingeschat. In **hoofdstuk 2** wordt verbetering van de groottebepaling van HPV-gemedieerde laesies door middel van 3D fotografie gevalideerd. Deze techniek is vervolgens toegepast in later beschreven klinische studies in dit proefschrift. Tijdens de technische validatie bleek 3D fotografie zeer precies, accuraat en nauwkeurig voor de bepaling van de grootte van vulvaire HSIL, genitale wratten en wratten van de handen en voeten. Deze precisie werd gereproduceerd wanneer multipelen personen waren de beoordeling en metingen uitvoerden. De nauwkeurigheid van 3D fotografie werd vergeleken met de gouden standaard: de schuifmaat. Hier werden kleine verschillen gevonden de bepaling van de diameter van wratten van handen en voeten, genitale wratten en vulvaire HSIL. Bovendien werd een discrepantie gezien voor de bepaling van de hoogte van wratten van handen en voeten. 3D fotografie blijkt ook toepasbaar voor het opmeten van de oppervlakte en het volume van laesies. De conclusie van deze technische en klinische validatie is dat 3D fotografie de grootte van een HPV-gemedieerde laesie nauwkeurig kan vervolgen over tijd. Deze techniek kan zodoende worden ingezet om de werkzaamheid van een nieuwe therapie in te bepalen een vroege klinische fase.

Vervolgens is een grote multimodale studie uitgevoerd waarbij een scala aan beeldvormingstechnieken en analysemethoden zijn ingezet om vulvaire HSIL en LS te typeren en vergelijken met gezond vulvaweefsel. In **hoofdstuk 3** worden de resultaten van twee beeldvormingstechnieken, dermatoscopie en D-OCT besproken en vergeleken met histologie. Het doel van deze studie was om karakteristieken per ziekte te identificeren en om de praktische applicatie en verdraagzaamheid van deze technieken te onderzoeken. Hiervoor zijn in totaal 5 vrouwen met vulvaire HSIL, 10 vrouwen met LS en 10 gezonde vrijwilligers geïnccludeerd in een prospectieve studie. Hieruit bleek dat dermatoscopie en D-OCT beiden goed werden getolereerd door de

patiënten en gezonde vrijwilligers om toe te passen op het vulvaire gebied. Bij dermatoscopische analyse werd gezien dat de meeste karakteristieken niet onderscheidend genoeg zijn tussen de verschillende ziekte-entiteiten en gezond vulvaire weefsel. Wel was een wrachtige structuur specifiek voor vulvaire HSIL, echter is deze bevinding klinisch niet van toegevoegde waarde aangezien deze structuur ook zichtbaar is tijdens visuele inspectie tijdens het gynaecologisch onderzoek. Bij LS werden dikke vertakkende vaten geobserveerd in een subset van de patiënten. Dit is niet eerder herkend door andere auteurs die dermatoscopie bij LS hebben onderzocht. Deze toename aan vaten in LS wordt teruggevonden in verhoogde bloeddorstrooming gemeten met de D-OCT. Bij vulvaire HSIL werd gevonden dat niet-zieke vulvaire huid van vulvaire HSIL-patiënten verhoogde bloeddorstrooming vertoonden opzichte van de vulvaire huid van gezonde vrijwilligers. Deze bevinding benadrukt de consensus dat gezond-ogende huid bij patiënten niet als gezonde controle meegenomen dient te worden, aangezien ook veranderingen in de aangrenzende huid optreden ten gevolge van het ziekteproces of de toegepaste therapieën. Epidermale dikte kan gemeten worden met een geïntegreerd algoritme van de D-OCT, maar deze blijkt niet geoptimaliseerd voor de oneven vulvaire huid. Bij handmatige nameting van de epidermale dikte werd gezien dat de huid van LS dunner is dan gezonde controles, een bevinding die teruggezien werd in histologie. Al in al demonstreert deze studie dat dermatoscopie na verdere validatie in een vulvaire kliniek mogelijk kan worden ingezet om de beeldvorming en opvolging van vulvaire ziekten te bevorderen. D-OCT lijkt in dit stadium meer geschikt voor onderzoeksdoel-einden, allereerst met technische optimalisatie en vervolgens voor translatie van observaties naar klinisch relevante eindpunten.

In dezelfde multimodale studie bij patiënten met vulvaire HSIL, LS en gezonde vrijwilligers is een techniek genaamd confocale microscopie (RCM) toegepast. Deze bevindingen zijn beschreven in **hoofdstuk 4**. RCM is een op laser gebaseerde techniek welke op non-invasieve wijze de epidermis en dermis tot cellulaire resolutie kan visualiseren tot een diepte van 250 µm. Deze techniek is al veelvuldig ingezet onderzoek naar melanomen en andere huid-ziekten, maar nog zelden op de vulva. Bovendien was het onbekend of de RCM technisch uitvoerbaar was op de vulva en of patiënten het een verdraagbare techniek vonden. Het doel van deze studie was daarom om de technische applicatie en patiënt verdraagzaamheid van de RCM-techniek te onderzoeken en karakteristieken van vulvaire HSIL, LS en gezonde vulvaire huid te

beschrijven. De bevindingen laten zien dat de RCM als applicatie, na enkele praktische aanpassingen welke uitgebreid beschreven zijn in het manuscript, technisch goed uit te voeren is door getrainde artsen en onderzoekers. Patiënten en gezonde vrijwilligers vonden de RCM-techniek verdraagzaam. De huid van vulvaire HSIL werd gekarakteriseerd door een atypische honingraatstructuur en aanwezigheid van melanofagen en lymfocyteninfiltraat in de dermis en epidermis. Bij LS werden vergelijkbare karakteristieken teruggevonden, maar specifiek ook de aanwezigheid van dermale sclerose en gehyelaniseerde vaten. Gezonde vulvaire huid werd gekarakteriseerd door het gebrek van deze karakteristieken in aanwezigheid van een intacte junctie van de epidermis naar de dermis. Deze bevindingen zijn bekende ziekte-karakteristieken die worden teruggevonden in biopten. RCM non-invasief en daarmee patiëntvriendelijker en toepasbaarder dan biopten, alhoewel histologie voor deze ziekten nog lang de gouden standaard zal blijven. Voordat RCM voor zodanige doeleinden kan worden ingezet moet de applicatie worden gevalideerd in een grotere, diverse groep patiënten bij de vulvapoli om de kennis en specificiteit van de hier beschreven bevindingen te objectiveren.

Nieuwe meetmethoden en biomarkers op zichzelf dragen nog niet bij aan de ontwikkeling van nieuwe en verbeterde therapieën voor vulvaire ziekten. Deze inzichten over beeldvormingstechnieken moeten daarvoor ook worden ingezet in de studies naar het effect van geneesmiddelen. In **hoofdstuk 5** wordt de 3D-camera techniek geïncorporeerd in een vroege-fase klinische dubbelblind gerandomiseerde, placebo-gecontroleerde klinische studie. Hierbij werd een nieuw synthetisch peptide, CY-002, werd getest bij 63 patiënten met wratten op de handen. Wratten op de handen of in het genitale gebied zijn veelvoorkomende, benigne laesies die door HPV worden veroorzaakt. Dit zijn andere fylotypen dan de HPV-typen die vulvaire en cervicale dysplasie veroorzaken. Rekrutering van patiënten met vulvaire aandoeningen voor klinisch wetenschappelijk onderzoek verloopt in de praktijk moeizaam, mede door de zeldzaamheid, morbiditeit en taboe rondom de ziekte. Daarom is het soms mogelijk om in andere patiëntengroepen potentiële targets voor nieuwe HPV-gemedieerde geneesmiddelen te onderzoeken. Wratten op de handen of genitale wratten komen veelvuldig voor en zijn kunnen daarom fungeren als model voor onderzoek naar behandelingen voor HPV-gemedieerde aandoeningen. De huidige behandelvormen van hand- en genitale wratten zijn ontoereikend. In plaats van eliminatie de HPV-infectie staat in huidige behandelingen destructie van het geïnfecteerde epitheel voorop. De

infectiehaard is daarmee niet altijd weggenomen, waardoor patiënten hardnekkige laesies kunnen behouden ondanks therapie. In deze klinische studie naar wratten op de handen stond onderzoek van patiëntveiligheid voorop, aangevuld met een exploratieve analyse voor klinisch effect. Deze effectmaten werden in kaart gebracht door het vervolgen van de klinische response, waaronder aantal en grootte van de laesies. Tevens zijn biomarkers waaronder HPV virale lading, OCT, 3D-fotografie, biopten en morfologische analyse van de laesies onderzocht. Het beoogde werkingsmechanisme van CY-002 is gebaseerd op een discrepantie in de lading van het celmembraan van maligne en HPV-geïnfecteerde cellen ten opzichte van gezonde cellen. Preklinisch werd in multipale tumorcellijnen celdood geïnduceerd door CY-002, terwijl normale cellen werden gespaard. Dit maakt CY-002 een potentieel middel dat gericht maligne of HPV-geïnfecteerde cellen uit de weg kan ruimen. In deze klinische studie werd het werkingsmechanisme van dit middel allereerst in een benigne aandoening getoetst. CY-002 werd veilig bevonden met geen of minimale lokale irritatie na 4 weken dagelijks toedienen onder occlusie. Helaas werd geen significant effect gevonden tussen CY-002 en placebo in de exploratieve analyse van het klinische effect, noch bij de additionele biomarkers. Dit kan mogelijk te verklaren zijn door een hoge mate van geobserveerde effecten in de placebogroep. Bovendien heeft de huid heeft een barrièrefunctie die lastig te penetreren kan zijn door geneesmiddelen. Het zodoende mogelijk dat CY-002 ondanks de occlusie niet volledig tot de HPV-geïnfecteerde cellen in de handwrat is doorgedrongen. Al in al kan deze klinische studie als voorbeeld dienen om toetsing van het werkingsmechanisme van topicale geneesmiddelen in de allereerste klinische fase te integreren om zo rationele geneesmiddelenontwikkeling in kracht bij te zetten.

## SECTIE II: HET VULVAIRE MICROBIOOM

Het menselijk lichaam is in symbiose met een spectrum aan bacteriën, virussen, fungi en parasieten. Dit geheel heet het microbiom. Het microbiom speelt een grote rol in het behouden van gezondheid en het ontstaan van ziekte. Ondanks het feit dat er al veelvuldige connecties zijn gevonden tussen ontregelingen in het microbiom en kanker, is nog niet eerder gekeken naar de rol van het vulvaire microbiom op het ontstaan van vulvakanker, LS en vulvaire HSIL. Dit is des te opmerkelijker aangezien het welbekend is dat een micro-organisme, HPV, verantwoordelijk is voor het ontstaan van vulvaire HSIL. Alhoewel er geen eerder onderzoek is gedaan naar de het vulvaire



microbioom in relatie tot kanker, is er wel veel bekend in hoeverre het cervicovaginale microbioom verstaat tot cervicale dysplasie. Daaruit blijkt dat het verdwijnen van *Lactobacillus* in combinatie met een meer divers vaginaal milieu bijdraagt aan hogere cervicale dysplasie. Evenzo verhoudt de samenstelling van het vaginale microbioom tot het verkrijgen en aanhouden van een HPV-infectie en de progressie tot cervicale kanker.

Als wij vergelijkbare correlaties willen identificeren bij vulvaire aandoeningen is het van belang om allereerst een overzicht te krijgen van de samenstelling van het gezonde vulvaire microbioom. Bevindingen hier naar vanuit een systematische review van de literatuur zijn beschreven in **hoofdstuk 6**. In deze review zijn 10 studies geïdentificeerd waarbij de microbioom samenstelling van de vulva in 261 vrouwen zijn bepaald door middel van sequencing technieken. Negen van de tien studies bepaalden de bacteriële samenstelling door middel van 16S rRNA sequencing en slechts één studie bepaalde ook de fungale fractie van het microbioom middels ITS2 sequencing. De bacteriële compositie van de vulva bestaat uit verschillende genera waaronder *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* en *Prevotella*. Zodoende lijkt het microbioom van de gezonde vulva te correleren aan het vaginale milieu. Toch lijkt de vulva uit een meer diverse samenstelling te bestaan dan de vagina, met bacteriën die vaak op de huid en feces worden gevonden. Bovendien zijn er aanwijzingen dat er locatieafhankelijke diversiteit bestaat afhankelijk van verschillende plekken van de vulva. Deze bevindingen reflecteren de functie van de vulva als overgangsepitheel van de vaginale mucosa naar de genitale huid. Echter ontbreekt kennis van de compositie van het vulvaire fungoom en viroom. Metagenomische sequencing is een techniek die een completer beeld geeft van de volledige microbioom samenstelling dan andere technieken, inclusief de niet-bacteriële fractie. Zodoende werd de aanbeveling vanuit de systematische review gedaan om de gezonde vulvaire microbioom samenstelling, bepaald door middel van metagenomische sequencing, te vergelijken met vulvaire HSIL, LS en vulvakanker in een prospectieve klinische studie.

**Hoofdstuk 7** rapporteert de bevindingen van deze klinische studie, een onderdeel van de multimodale studie, waar de vulvaire microbioom samenstelling van patiënten met vulvaire HSIL en LS is vergeleken met gezonde vrouwen. De vaginale en anale microbioom samenstelling werd ook meegenomen in deze analyse. Vrouwen met vulvakanker konden helaas niet worden gerekruteerd. De labia minora van vrouwen met LS bevatten voornamelijk

genera van *Lactobacillus*, *Prevotella* en *Gardnerella*. Vulvaire HSIL-laesies worden voornamelijk gekoloniseerd door *Prevotella* en *Alphapapillomavirus*. Gezonde vrouwen hebben vooral *Prevotella* en *Lactobacillus* op de vulva. Bij LS werd een grotere proportie *Papillomaviridae* gevonden, terwijl er minder *Bacteroidia* aanwezig zijn ten opzichte van de gezonde controles. In vulvaire HSIL was proportioneel meer *Alphapapillomavirus* en minder *Actinobacteria* te vinden vergeleken met gezonde huid. Waterdoorlaatbaarheid (TEWL) is een proxy voor de barrièrefunctie van de huid. Deze kan aangetast zijn door ziekteprocessen (zoals bij eczeem), maar was hiervoor zelden getest bij LS of vulvaire HSIL. In deze studie werd daarom tegelijkertijd met de microbioom analyse gekeken naar de waterdoorlaatbaarheid van de vulvaire huid. Dit blijft een studie in een klein aantal patiënten en gezonde controles, en deze bevindingen zullen moeten worden gevalideerd in grotere cohorten met een diverse groep patiënten (o.a. met vSCC en dVIN) voordat robuuste conclusies geformuleerd kunnen worden. Mogelijk kunnen er zo in de toekomst vanuit het microbioom-onderzoek aanwijzingen voor de oorzaak voor LS of modulators van maligne progressie voor deze vulvaire aandoeningen worden geïdentificeerd. Tegenwoordig worden voor de vaginale niche gerichte microbioom-modulerende therapieën getest in klinische trials ter preventie van hivinfecties en behandeling van bacteriële vaginose of genito-urinaire symptomen van de menopauze. Voor de vulvaire ziekten beschreven in dit proefschrift ontbreken momenteel effectieve, specifieke en patiëntvriendelijke behandelopties. Met de beperkte beschikbare kennis is ontwikkeling van microbioom-gerichte therapie voor deze vulvaire aandoeningen echter nog toekomstmuziek.

### Perspectieven

De bevindingen in dit proefschrift worden in **hoofdstuk 8** samengevat en in perspectief van de literatuur en huidige kennis geplaatst. Hierbij ligt de focus op de toekomstige applicatie van de bevindingen voor het klinische veld. Beeldvormingstechnieken kunnen de herkenning van laesies bevorderen. In het geval van LS of vulvaire HSIL is het belangrijk om maligne progressie zo vroeg mogelijk op te sporen en behandelen. Microbioom analyses van de vulva kunnen hopelijk nieuwe aanknopingspunten voor begrip over het ontstaan van ziekte of factoren maligne progressie geven, ofwel een focus geven voor het ontwikkelen van nieuwe therapieën. Voordat de non-invasieve beeldvormingstechnieken of microbioom analyses klinisch worden

ingezet, moeten deze eerst gevalideerd worden op een grote groep patiënten met een grote groep aan vulvaire aandoeningen. Tevens is het van belang dat de gekozen karakteristieken om een ziekte te beschrijven onderscheidend genoeg zijn van de gezonde toestand en van andere ziekten. Verbeterde biomarkers kunnen ook worden ingezet tijdens geneesmiddelenonderzoek om klinische effecten op farmacologisch niveau te bewijzen. Momenteel worden slechts enkele studies uitgevoerd naar nieuwe therapieën voor vulvaire HSIL en LS. Elk geneesmiddel wordt ontwikkeld met een beoogd werkingsmechanisme waarom het aangrijpt in het ziekteproces. Om deze ‘proof-of-concept’ te bevestigen moeten betrouwbare biomarkers worden ingezet. Dit proefschrift heeft een voorzet gedaan van enkele potentiële biomarkers voor onderzoek naar vulvaire ziekten. Het proefschrift laat mogelijke toepassingen zien in hoeverre deze nieuwe biomarkers in een vroege fase kunnen worden ingezet om therapie-effectiviteit beter te herkennen.