

Uniwersytet Jagielloński  
Collegium Medicum

Katarzyna Milian-Ciesielska

Badanie zmian w mikrounerwieniu i lokalnych mechanizmów  
neurogennych w przebiegu liszaja twardzinowego sromu.

*Praca doktorska*

Promotor: prof. dr hab. med. Dariusz Adamek

Pracę wykonano w Katedrze Patomorfologii, Zakładzie Patomorfologii  
Klinicznej i Doświadczalnej; Uniwersytet Jagielloński Collegium  
Medicum

Kierownik jednostki: prof. dr hab. med. Dariusz Adamek

Kraków, 2020



## Spis treści

<b>1</b>	<b>Streszczenie pracy</b>	<b>6</b>
1.1	Wprowadzenie i uzasadnienie wyboru tematu	6
1.2	Cel pracy	7
1.3	Metodologia	7
1.3.1	Materiał badawczy	7
1.3.2	Badania immunohistochemiczne	7
1.4	Wyniki	8
1.5	Dyskusja	8
1.6	Wnioski	9
1.7	Podsumowanie	9
<b>2</b>	<b>Summary</b>	<b>10</b>
2.1	Introduction	10
2.2	Aim of the study	11
2.3	Method	11
2.3.1	Material	11
2.3.2	Immunohistochemistry	11
2.4	Results	11
2.5	Discussion	12
2.6	Conclusions	13
2.7	Summary	13
<b>3</b>	<b>Wstęp</b>	<b>14</b>
3.1	Liszaj Twardzinowy	14
3.1.1	Informacje ogólne	14
3.1.2	Epidemiologia	14
3.1.3	Obraz kliniczny	14
3.1.4	Patogeneza	15
3.1.5	Obraz histologiczny	17
3.1.6	Diagnostyka i leczenie	17
3.2	Świąd	19
3.2.1	Wstęp	19
3.2.2	Neurofizjologia świądu	21
3.2.3	Świąd neuropatyczny	33
3.2.4	Leczenie świądu	34
3.3	Neuropatia drobnych włókien nerwowych jako potencjalny element patofizjologii liszaja twardzinowego	35
3.4	Śródnaskórkowa gęstość włókien nerwowych w chorobach skóry	36
3.5	Unerwienie sromu	37
3.5.1	Zmiany w unerwieniu sromu w różnych jednostkach chorobowych	38
3.6	Uzasadnienie wyboru tematu	40
<b>4</b>	<b>Cel pracy</b>	<b>41</b>

<b>5</b>	<b>Wybrane zagadnienia metodologiczne</b>	<b>42</b>
5.1	Wybór grupy badawczej i grupy kontrolnej	42
5.2	Dobór technik i metod badawczych	43
5.2.1	Badania histopatologiczne	43
5.2.2	Badania immunohistochemiczne	45
5.2.3	Ocena śródskórkowej gęstości włókien nerwowych (ŚGWN)	48
5.2.4	Analiza morfometryczna obrazu	50
5.2.5	Analiza statystyczna wyników	50
5.3	Zakres czasowy	50
<b>6</b>	<b>Wyniki</b>	<b>51</b>
6.1	PGP 9,5	51
6.2	CGRP	53
6.3	VIP	55
6.4	GAP-43	56
6.5	Receptor opioidowy $\mu$	58
6.5.1	ŚGWN $\mu+$	59
6.5.2	Ekspresja receptora opioidowego $\mu$ w keratynocytach	61
6.5.3	Ekspresja receptora opioidowego $\mu$ w leukocytach	63
6.6	Porównanie immunoekspresji badanych antygenów w obrębie włókien nerwowych sromu	65
6.7	Receptor PAR-2	65
6.7.1	Receptor PAR-2 w keratynocytach	65
6.7.2	Receptor PAR-2 w leukocytach	68
6.7.3	Receptor PAR-2 w mieszkach włosowych, fibroblastach, gruczołach potowych i gruczołach łojowych	70
6.7.4	Receptor PAR-2 w śródbłonkach	73
6.7.5	Receptor PAR-2 w mastocytach wokół nerwów	75
6.8	Mastocyty	76
6.8.1	Podnaskórkowe mastocyty znakowane tryptazą	78
6.8.2	Mastocyty w warstwie siatkowatej skóry właściwej (tryptaza+)	78
6.8.3	Mastocyty wokół nerwów (tryptaza+)	79
<b>7</b>	<b>Dyskusja</b>	<b>80</b>
7.1	Śródskórkowa gęstość nerwów (ŚGWN)	80
7.1.1	PGP 9.5	80
7.1.2	GAP-43	81
7.1.3	Potencjalne przyczyny zmniejszenia śródskórkowej gęstości nerwów	82
7.1.4	CGRP	82
7.2	Receptor opioidowy $\mu$	83
7.2.1	Ekspresją receptora opioidowego $\mu$ na leukocytach	83
7.2.2	Ekspresja receptora opioidowego $\mu$ na zakończeniach nerwów czuciowych	83
7.2.3	Ekspresja receptora opioidowego $\mu$ w keratynocytach	84

7.3	Mastocyty	85
7.4	PAR-2	87
<b>8</b>	<b>Nowe kierunki badań w lokalnym leczeniu świądu i bólu na tle uzyskanych wyników</b>	<b>89</b>
8.1	Agoniści i antagoniści receptorów opioidowych	89
8.2	Leczenie przeciwświądowe ukierunkowane na receptor PAR-2	89
8.3	Nerwowy czynnik wzrostu (nerve growth factor- NGF)	90
<b>9</b>	<b>Wnioski</b>	<b>91</b>
<b>10</b>	<b>Podsumowanie</b>	<b>91</b>
<b>11</b>	<b>Bibliografia</b>	<b>92</b>

# 1 Streszczenie pracy

## 1.1 Wprowadzenie i uzasadnienie wyboru tematu

Liszaj twardzinowy (LT) jest przewlekłą chorobą zapalną skóry i błon śluzowych o nie w pełni wyjaśnionej etiologii. W patogenezie sugeruje się udział czynników genetycznych, hormonalnych i autoimmunologicznych. Chociaż częstość występowania LT sromu w oparciu o praktykę ginekologiczną określa się na poziomie ok 2%, wydaje się że jest ona niedoszacowana. Najnowsze doniesienia opisują dwukrotny wzrost liczby zdiagnozowanych przypadków na przestrzeni 10 lat, co może mieć związek z większą znajomością choroby i wzrostem ilości wykonywanych badań histopatologicznych prowadzących do postawienia diagnozy (Krapf, Mitchell, Holton, & Goldstein, 2020). Zmiany chorobowe u kobiet lokalizują się głównie w okolicy anogenitalnej. Typowo mają charakter zlewających się, porcelanowo białych grudek o nierównej powierzchni, którym towarzyszą nasilony świąd, uczucie pieczenia i bolesność podczas stosunku. Z czasem prowadzą do bliznowacenia i zaniku zajętych struktur (Calonje, 2012). Uporczywe i często nieodpowiadające na leczenie objawy czuciowe oraz wymagające leczenia chirurgicznego zmiany bliznowate prowadzą do znacznego obniżenia jakości życia chorych (Krapf et al., 2020). Patomorfologiczne i patofizjologiczne podłoże objawów czuciowych w przebiegu LT w tym w szczególności świądu, będącego najbardziej dokuczliwym objawem schorzenia nie zostało dotychczas opisane.

Z punktu widzenia fizjologii powstawania uczucia świądu, najbardziej powszechny i najlepiej ugruntowany w badaniach naukowych podział wyróżnia: świąd histaminergiczny, zależny od aktywacji receptorów histaminowych na włóknach nerwowych i świąd niehistaminergiczny, zależny od aktywacji neuronów posiadających receptory aktywowane przez proteazy -2 (proteinase activated receptors-2, PAR-2) (Jeffrey, Kim, & Chen, 2011). Chroniczny świąd towarzyszący przewlekłym chorobom zapalnym skóry jest indukowany głównie na drodze niezależnej od histaminy. Neurony niehistaminergiczne poprzez aktywację receptora PAR-2 mogą być pobudzone m. in. przez endogenne pruritogeny, wydzielane w przebiegu neurogennego zapalenia. Jest ono wynikiem udziału nerwów oraz neuropeptydów przez nie wydzielanych w rozwoju odczynu zapalnego w skórze, jak również wynikiem interakcji włókien nerwowych z komórkami otaczającymi, przede wszystkim z keratynocytami, mastocytami i limfocytami (Steinhoff, Ständer, et al., 2003). Badania nad przewlekłym świądem wskazują również na istotną rolę zmian morfologicznych w mikrounerwieniu na terenie skóry (tzw. świąd neuropatyczny powstający w zmienionym chorobowo układzie nerwowym). W części chorób przebiegających ze świądem jak neuropatia drobnych włókien nerwowych (NDWN), neuropatia mieszana i neuropatia w sytuacji przewlekłego ucisku na nerw (Dellon, 2015) oraz w stanach przewlekłego drapania (Pereira, Mühl, Pogatzki-Zahn, Agelopoulos, & Ständer, 2016) uszkodzenie nerwów objawia się zmniejszeniem gęstości włókien nerwowych. Z kolei w skórze chorych z przewlekłymi zapalnymi chorobami jak łuszczyca (Szepietowski & Reich, 2016) i atopowe zapalenie skóry (AZS) (Tominaga & Takamori, 2014a) oraz w vulwodynii (Tommola et al., 2016) zaobserwowano zwiększoną gęstość nerwów i obniżenie progu ich pobudliwości.

W badaniach nad zaburzeniami mikrounerwienia skóry w ostatnich latach pojawił się nowy, wystandardyzowany parametr, jakim jest ocena śródnaskórkowej gęstości włókien nerwowych (ŚGWN). Dokonuje się jej na terenie wycinka skórno, obliczając wyznakowane immunohistochemicznie lub immunofluorescencyjnie włókna nerwowe przechodzące przez granicę skórno-naskórkową na 1mm długości granicy skórno-naskórkowej. Badanie to jest obecnie złotym standardem w diagnostyce NDWN (Lauria et al., 2010), jest też wykorzystywane do opisu

zmian morfologicznych mikrounerwienia w przebiegu chorób zapalnych skóry. Do czasu publikacji pierwszych wyników niniejszego badania (Milian-Ciesielska et al., 2017) w piśmiennictwie nie znaleziono opisu zmian mikrounerwienia w przebiegu LT sromu.

Podsumowując, symptomatologia zmian (np. uporczywy świąd) oraz obecność zmian troficznych w miejscach zmienionych chorobowo, sugerują możliwość występowania również mechanizmów neurogennych w patogenezie objawów LT. Najnowsze badania z zakresu dystrybucji mikrounerwienia na terenie skóry i błon śluzowych w wielu jednostkach chorobowych wskazują na związek zmian morfologicznych w mikrounerwieniu z objawami klinicznymi. Ostatnie doniesienia na temat roli mechanizmów neurogennych i neurotroficznych w rozwoju i ustępowaniu stanu zapalnego oraz na temat patogenetycznych zaburzeń czuciowych jak świąd i ból niosą szansę na opracowywanie nowych, przyczynowych metod ich leczenia. Rola czynników neurogennych w rozwoju objawów czuciowych LT nie została dostatecznie poznana. Dzięki zastosowaniu metod immunohistochemicznych jest możliwa szczegółowa ocena zarówno ilościowa jak i jakościowa mikrounerwienia sromu (charakter włókien nerwowych, typ receptorów itp.) i jego zmian w przebiegu LT, co może rzucić światło na stopień zaangażowania i rolę czynników neurogennych w patogenezie objawów tej choroby. Uzyskana w ten sposób wiedza ma szansę zaowocować wskazówkami dotyczącymi nowych sposobów farmakoterapii LT.

## 1.2 Cel pracy

Celem pracy było sprawdzenie czy w tkankach sromu zmienionych w przebiegu LT występują zmiany w mikrounerwieniu i różnice w immunoekspresji neuropeptydów (CGRP, VIP), receptorów świądu (opiod receptor  $\mu$ , PAR-2), markera regeneracji nerwów (GAP-43) i w ilości mastocytów (również wyznakowanych immunohistochemicznie przeciwciałem dla tryptazy mastocytarnej), w porównaniu do prawidłowych tkanek sromu.

## 1.3 Metodologia

### 1.3.1 Materiał badawczy

Materiał badawczy stanowiły wycinki ze skóry sromu, utrwalone w formalinie zatopione w parafinie (formalin-fixed, paraffine-embedded, FFPE), pochodzące z archiwum Katedry Patomorfologii UJCM. Do grupy badawczej zaliczono 20 wycinków z potwierdzonym histologicznie LT sromu, do grupy kontrolnej wybrano 20 wycinków z niezmięnionej skóry sromu lub z niezmięnionej skóry z sąsiedztwa łagodnych albo odczynowych zmian skóry sromu, usuniętych z szerokim marginesem otaczających tkanek. Wiek pacjentek w grupie badawczej wynosił pomiędzy 34-76 lat (średnia 62 lata), w grupie kontrolnej pomiędzy 29-77 lat (średnia 53 lata). Wycinki zostały poddane ponownej ocenie histologicznej, a przypadki LT zostały zaklasyfikowane do jednego z trzech etapów choroby (wczesny, pośredni, późny).

### 1.3.2 Badania immunohistochemiczne

Na wyłonionym materiale zostały wykonane odczyny immunohistochemiczne w celu oceny ilościowej i jakościowej mikrounerwienia (PGP 9.5, VIP, CGRP), ekspresji markera regeneracji nerwów (GAP 43), ekspresji receptorów świądu (opiod receptor  $\mu$ , PAR-2) i oceny ilościowej mastocytów (przeciwciało dla tryptazy mastocytarnej).

Do oceny mikrounerwienia, w celu obliczenia śródnaskórkowej gęstości włókien nerwowych (ŚGWN) zastosowano zmodyfikowany protokół badania oparty koncepcyjnie na metodyce oceny drobnych włókien nerwowych przyjętej w pracy Lauria G i wsp. 2010. Obliczono punkty

przekraczania przez włókna nerwowe granicy skórno-naskórkowej w relacji do długości tej granicy, którą oszacowano z zastosowaniem metody komputerowej analizy obrazu cyfrowych zdjęć preparatów histologicznych. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej i graficznej.

## 1.4 Wyniki

W badaniu stwierdzono istotne statystycznie zmniejszenie ŚGWN znakowanych PGP 9.5 (5.92 vs 11,47,  $p=0,0049$ ) i GAP-43 (7,2 vs 17,68,  $p=0,013$ ) w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT w porównaniu do prawidłowej skóry sromu. Natomiast ŚGWN znakowanych CGRP (6,26 vs 3,38,  $p=0,03$ ) w tkankach zmienionych chorobowo była istotnie zwiększona. Zaobserwowano znaczące zwiększenie ekspresji receptora opioidowego  $\mu$  w leukocytach w skórze zmienionej chorobowo ( $p=0,01$ ) oraz znaczące zwiększenie ekspresji receptora PAR-2 w śródbłonkach ( $p=0,0002$ ) i w mastocytach wokół nerwów ( $p=0,04$ ) w skórze zmienionej chorobowo. Liczba mastocytów bezpośrednio pod naskórkiem (17,5 vs 8,  $p=0,0005$ ), w skórze właściwej (46 vs 24,5,  $p=0,01$ ) i wokół skórnych włókien nerwowych (5 vs 2,  $p=0,002$ ) była znacznie zwiększona w grupie chorych z LT w porównaniu do grupy kontrolnej.

## 1.5 Dyskusja

Wyniki badania, zgodnie z wiedzą autorki stanowią pierwsze doniesienie w literaturze o występowaniu istotnych zmian w mikrounerwieniu tkanek sromu zmienionych w przebiegu LT, w porównaniu do niezmienionych tkanek sromu.

Istotne zmniejszenie ŚGWN w skórze pacjentek z LT wyraźnie wskazuje na możliwość występowania procesu niszczenia drobnych włókien nerwowych w przebiegu choroby i w kontekście doniesień o rzadkim (ok 10% przypadków) bezobjawowym przebiegu choroby (Kirtschig, 2016) pozwala przypuszczać, iż przynajmniej w części badanych przypadków objawy czuciowe mogły być wywołane także przez uszkodzenie drobnych włókien nerwowych. Znaczące zmniejszenie ilości śródskórnokowych włókien nerwowych wykazujących ekspresję GAP 43, markera regeneracji i plastyczności nerwów (Fantini & Johansson, 1992) w skórze zmienionej w przebiegu liszaja twardzinowego, najprawdopodobniej odzwierciedla zmniejszony potencjał do regeneracji i zmian w budowie (remodelowania) włókien nerwowych w przebiegu tej jednostki chorobowej. Podobne zjawisko zaobserwowano w różnych typach NDWN (Scheytt, Riediger, Braunsdorf, Sommer, & Üçeyler, 2015). Opisane w LT niszczenie białek macierzy zewnątrzkomórkowej i zaburzenia ich składu (Gambichler et al., 2012), (De Oliveira et al., 2012) oraz obecność auto-przeciwciał przeciwko białku macierzy zewnątrzkomórkowej 1 (ECM1) (I. Chan, 2004) mogą mieć znaczący wpływ na proces wydłużania włókien nerwowych i ich zdolność do przenikania przez błonę podstawną naskórka (Tominaga & Takamori, 2014b). Z kolei zaobserwowany w niniejszym badaniu wzrost ilości śródskórnokowych nerwów wykazujących ekspresję CGRP jest zgodny z wynikami badań nad innymi przewlekłymi dermatozami przebiegającymi ze świadem np. łuszczycą (J. Chan, Smoller, Raychauduri, Jiang, & Farber, 1997) i może być tłumaczony zjawiskiem wzmożonej syntezy CGRP w stanach uszkodzenia nerwów i w przewlekłych stanach zapalnych (Russell, King, Smillie, Kodji, & Brain, 2014).

Opisane w prezentowanym badaniu zwiększenie ekspresji receptora opioidowego  $\mu$  w leukocytach w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT jest zgodne z obserwacjami dotyczącymi jego istotnej roli w modulowaniu stanu zapalnego (Ninković & Roy, 2013) i najprawdopodobniej jest związane z jego immunosupresyjnym działaniem, w odpowiedzi na przewlekłe utrzymujący się stan zapalny.



Podwyższona koncentracja mastocytów, w tym mastocytów wokół nerwów w LT sromu, tak jak w innych dermatozach przebiegających ze świądem (Siiskonen & Harvima, 2019), silnie sugeruje istotny wpływ mastocytów na patogenezę objawów czuciowych oraz stanowi morfologiczny dowód na interakcję pomiędzy mastocytami, a włóknami nerwowymi i obecność neurogenego stanu zapalnego w przebiegu LT. Mastocyty wokół włókien nerwowych stanowią głównie źródło proteaz potrzebnych do aktywacji receptora PAR-2 i wywołania uczucia świądu na drodze nie-histaminergicznej (Rothmeier & Ruf, 2012). Dodatkowo, hipotezę o roli mastocytów i receptora PAR-2 w patogenezie objawów LT potwierdza stwierdzona w niniejszym badaniu silniejsza ekspresja receptora PAR-2 w mastocytach wokół włókien nerwowych. Wykazana także silniejsza ekspresja receptora PAR-2 w śródbłódkach naczyń skóry zmienionej w przebiegu LT, zgodna z danymi z literatury mówiącymi o wzroście ekspresji receptora PAR-2 w śródbłódkach w chorobach zapalnych skóry (Cevikbas et al., 2011), pozwala przypuszczać, iż również w przebiegu LT sromu pod wpływem aktywacji receptora PAR-2 śródbłócki wydzielają cytokiny prozapalne, co przyczynia się do rozwoju stanu zapalnego.

Warto zwrócić uwagę, że w nowych kierunkach badań nad lokalnym leczeniem świądu i bólu w chorobach skóry na pierwszy plan wysuwają się substancje hamujące receptor PAR-2 (Cao, Tan, Kim, & Tey, 2017), (Kim & Kim, 2018), (Barr et al., 2019), (Sakai et al., 2016) i neurogeny stan zapalny (Lee, Jeong, & Lee, 2010). Prowadzone są również badania nad zastosowaniem antagonistów receptorów opioidowych (Bigliardi et al., 2007) i nerwowego czynnika wzrostu (Rocco, Soligo, Manni, & Aloe, 2018).

## 1.6 Wnioski

1. Badanie wykazało, iż w przebiegu LT w skórze sromu zachodzą istotne zmiany w mikrounerwieniu, ekspresji receptorów świądu i ilości mastocytów, w porównaniu do skóry prawidłowej.
2. Zmiany w mikrounerwieniu mają charakter zarówno ilościowy (zmniejszenie ŚGWN) jak i jakościowy (zwiększenie ŚGWN wykazujących immunoekspresję CGRP i zmniejszenie ŚGWN wykazujących immunoekspresję GAP-43) i mogą do pewnego stopnia odpowiadać za powstawanie objawów czuciowych w przebiegu LT.
3. Zwiększenie immunoekspresji ekspresji receptora PAR-2 i receptora opioidowego  $\mu$  oraz zwiększenie ilości mastocytów w tkankach sromu zmienionych w przebiegu LT świadczy o udziale mechanizmów niehistaminergicznych i neurogenego stanu zapalnego w przebiegu tej jednostki chorobowej.
4. Konieczne są dalsze badania nad patomechanizmami objawów czuciowych LT w celu opracowania nowych metod przyczynowego leczenia schorzeń świądowych skóry.

## 1.7 Podsumowanie

Objawy czuciowe w przebiegu liszaja twardzinowego sromu nie zawsze odpowiadają na obecnie stosowane leczenie i prowadzą do znacznego obniżenia jakości życia chorych (Krapf et al., 2020). Niniejsze badanie stanowi pierwszy w literaturze opis zjawisk mogących odpowiadać za patofizjologiczne i patomorfologiczne podłoże ich występowania. W tkankach zmienionych chorobowo stwierdzono istotny zanik śródnaskórkowych włókien nerwowych, wzrost ekspresji receptorów świądu (PAR-2 i receptor opioidowy  $\mu$ ) i zwiększenie ilości mastocytów, głównych komórek odpowiedzialnych za zjawisko neurogenego stanu zapalnego. Pojawiające się nowe możliwości terapeutyczne ukierunkowane na leczenie opisanych wyżej zaburzeń, wskazują na konieczność prowadzenia dalszych badań w tym temacie.

## 2 Summary

### 2.1 Introduction

Lichen sclerosus (LS) is a chronic inflammatory disease affecting skin and mucosal membranes, the pathogenesis of which is not fully understood. Genetic, hormonal and autoimmune background is postulated. Although in general gynaecological practise LS has been found to affect around 2 in 100 women, the latest data suggest that prevalence of LS is most probably underestimated. A recent report from the Netherlands reveals that the incidence of histology-proven LS per 100,000 women rose around twofold in 20 years. The authors propose that this rise in incidence reflects an increased awareness of the condition leading to higher rates of biopsy and diagnosis (Krapf, Mitchell, Holton, & Goldstein, 2020). In women skin lesions are located mainly in anogenital region. Typically, they manifest as coalescent, ivory-white papules with an uneven surface, accompanied by severe pruritus, and burning sensation, what typically results in dyspareunia. With time, skin lesions may lead to atrophy and scarring of involved sites (Calonje, 2012). Persistent and frequently poorly responding to topical treatment sensory sensations and progressive scarring often requiring surgical treatment seriously impact patients' quality of life (Krapf et al., 2020). To the author's best knowledge, the pathophysiological and pathomorphological background of sensory symptoms in LS including especially the itch, being the most nagging of them, has not been yet investigated.

Based on physiology, the two distinct pathways of itch are described: a histamine-stimulated pathway that uses mechanically insensitive C-fibers and a cowhage -stimulated pathway primarily involving polymodal C-fibers containing proteinase activated receptors-2 (PAR-2) on their peripheral endings (Jeffrey, Kim, & Chen, 2011). Chronic itch that accompanies chronic skin conditions is mediated mainly through histamine-independent mechanisms. Cowhage-sensitive itch neurons are aroused by activation of PAR-2 receptor by endogen pruritogens secreted in neurogenic inflammation. Neurogenic inflammation (neuroinflammation) is described as a complex interaction between peripheral nerves, immune and endocrine system and almost all skin cells, mediated among others by neuropeptides released from nerve endings (Steinhoff et al., 2003). In addition to itch induced by pruritogenic substances, itch evoked by the diseased neurons has been described (neuropathic itch that is caused by damage in central or peripheral nervous system). In some neuropathies, like small fiber neuropathy (SFN), mixed fiber neuropathy, chronic nerve compression (Dellon, 2015) or in chronic scratching (Pereira, Mühl, Pogatzki-Zahn, Agelopoulos, & Ständer, 2016) nerve damage results in decrease of nerve fiber density. On the other hand, in pruritic skin conditions like some forms of psoriasis (Szepietowski & Reich, 2016), atopic dermatitis (Tominaga & Takamori, 2014a) and in vulvodynia (Tommola et al., 2016) the increase in nerve fiber density and their peripheral sensitisation have been described.

In recent years a new, standardised parameter describing skin innervation has emerged. Intraepidermal nerve fiber density (IENFD) is evaluated in skin samples by calculation of nerve fibers (stained by immunohistochemistry or immunofluorescence) that cross dermo-epidermal junction per 1 mm of length of dermo-epidermal junction. IENFD is now a golden standard in diagnosis of SFN (Lauria et al., 2010); it is also used in research to describe alterations in small nerve fibers in various inflammatory skin conditions. At the time of publication of primary results of the present research (Milian-Ciesielska et al., 2017) no description of changes in small nerve fibers in vulvar LS had been found in literature.

To summarise, the presence of sensory symptoms (e.g. persistent itch) and trophic changes in involved sites suggest possibility of presence of neurogenic mechanisms in pathogenesis of vul-

var LS symptoms. Recent studies concentrating on alterations of skin innervation in many conditions reveal a relation between morphological changes in nerve system and clinical symptoms. What is more, expanding knowledge on the role of neurogenic factors in development and resolution of inflammation and pathogenesis of sensory symptoms, may result in development of novel therapeutic options. The role of neurogenic mechanisms in origin of sensory symptoms in LS has not been yet reported. Immunohistochemical methods enable to describe quantitative and qualitative changes (type of nerve fibers and receptors) in small nerves, which may elucidate the role of neurogenic mechanism in pathogenesis of sensory symptoms in LS and in consequence help to identify new therapeutic targets.

## 2.2 Aim of the study

To investigate whether in vulvar LS tissues occur changes in innervation and differences in expression of neuropeptides (PGP 9.5, CGRP, VIP), pruritic receptors (opioid receptor  $\mu$ , PAR-2), marker of nerve regeneration (GAP-43) and number of mast cells (marked by mast cell tryptase antibody) in comparison to normal vulvar tissues.

## 2.3 Method

### 2.3.1 Material

20 formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens of skin biopsies of histologically confirmed vulvar LS were collected from the files of the Department of Pathomorphology, Jagiellonian University. As a control group, surrounding healthy tissue from FFPE samples of 20 cases of benign and non-inflammatory vulvar lesions from the files of the Department of Pathomorphology were analysed. In the LS group, patients aged between 34 and 76 years (mean 62 years) and ranged between 29 and 77 years (mean 53 years) in the control group. All cases were re-evaluated and LS cases were arbitrarily classified into three stages of the disease: early, intermediate and advanced.

### 2.3.2 Immunohistochemistry

Immunohistochemical stains to evaluate quantitative and qualitative changes in small nerve fibers (PGP 9.5, CGRP, VIP), expression of marker of nerve regeneration (GAP-43), pruritic receptors (opioid receptor  $\mu$ , PAR-2) and number of mast cells (marked by mast cell tryptase antibody) were performed.

To assess alterations in small fiber innervation an adapted protocol conceptually based on evaluation of IENFD in diagnosis of SFN (Lauria et al., 2010) was applied. Number of small nerve fibers crossing dermo-epidermal junction per 1mm was calculated. Length of dermo-epidermal junction was measured with the use of the ImageJ program on digital photographs of the slides. The obtained results were analysed statistically and graphically.

## 2.4 Results

The decrease of mean IENFD, marked with PGP 9,5 (5.92/mm vs 11,47/mm,  $p=0,0049$ ) and GAP-43 (7,2/mm vs 17,68,  $p=0,013$ ) in vulvar LS tissues compared to normal vulvar tissues was found to be of high statistical significance. In turn, the increase of mean IENFD of CGRP-positive nerve fibers in lesional skin compared to normal skin was also shown to be significant (6,26/mm vs 3,38,  $p=0,03$ ). The significant increase of expression of opioid receptor  $\mu$  in leukocytes ( $p=0,01$ ), PAR-2 receptor in endothelial cells ( $p=0,0002$ ), and in mast cells around dermal

nerves ( $p=0,04$ ) in vulvar LS skin compared to normal vulvar skin was also observed. Number of tryptase positive mast cells located in all distinguished sites, i.e. directly under epidermis, in dermis, and around dermal nerves was increased in LS group in comparison to normal skin with statistical significance (directly under epidermis 17,5 vs 8,  $p=0,0005$ , in dermis 46 vs 24,5,  $p=0,01$ , and around dermal nerves 5 vs 2,  $p=0,002$ ).

## 2.5 Discussion

To the authors best knowledge, the results of the present study describing significant alterations in innervation of lesional skin in vulvar LS, compared to healthy vulvar skin are the first in the literature. Unequivocal decrease in IENFD in vulvar LS strongly suggests possibility of existence of nerve damaging process in course of the disease and, having in mind the reports of rather rare asymptomatic course – approx. 10% (Kirtschig, 2016) it allows to assume, that at least in some of the examined cases sensory symptoms might have been evoked by damage to nerve fibers. Significant decrease in number of nerve fibers expressing GAP-43 - an established marker of nerve regeneration and plasticity (Fantini & Johansson, 1992) - in lesional skin in LS most probably reflects the reduced regenerative and remodelling potential of nerve fibers. Similar phenomenon was observed in different forms of SFN (Scheytt, Riediger, Braunsdorf, Sommer, & Üçeyler, 2015). Additionally previously described in LS damage to proteins of extracellular matrix and alterations in their number and composition (Gambichler et al., 2012), (De Oliveira et al., 2012) and presence of autoantibodies against extracellular matrix protein-1 (ECM-1) (I. Chan, 2004) may have important influence on the elongation of nerve fibers' processes and their ability to penetrate epidermal basal membrane (Tominaga & Takamori, 2014b). What is more, the significant increase of CGRP-positive nerve fibers in vulvar LS is consistent with results of the other studies on chronic pruritic skin conditions e. g. psoriasis (J. Chan, Smoller, Raychaudhuri, Jiang, & Farber, 1997) and may be explained by observed phenomenon of the rise in CGRP synthesis in nerve damage and in chronic inflammatory conditions (Russell, King, Smillie, Kodji, & Brain, 2014).

The increased expression of opioid receptor  $\mu$  in leukocytes in lesional skin in vulvar LS described in the present study is in accordance with its important role in modulation of inflammation (Ninković & Roy, 2013) and most probably is related to its immunosuppressive role in persistent inflammatory conditions.

Higher concentration of mast cells, especially mast cells around dermal nerve fibers in vulvar LS, like in other pruritic dermatoses (Siiskonen & Harvima, 2019) strongly suggests significant role of mast cells in pathogenesis of symptoms of the disease and is a morphological proof of interaction between mast cells and nerve fibers, and provides the evidence of neurogenic inflammation in vulvar LS. Mast cells around nerve fibers are the main source of proteases necessary to activate PAR-2 receptor, which results among others in triggering the histamine-independent itch (Rothmeier & Ruf, 2012). Additionally, the hypothesis of important role of mast cells and PAR-2 receptor in pathogenesis of sensory symptoms in vulvar LS is supported by higher number of mast cells around nerve fibers expressing PAR-2 receptor in lesional skin, compared to healthy one described in the present study. Also the increase in PAR-2 expression in endothelial cells is consistent with previous reports on this phenomenon in chronic dermatoses (Cevikbas et al., 2011) and allows to presume, that also in vulvar LS due to activation of PAR-2 receptor the endothelial cells secrete proinflammatory cytokines, which contribute to development of chronic inflammation.

It is noteworthy that the ongoing new researches on novel local therapeutic agents in chronic pruritus focus on substances inhibiting PAR-2 receptor (Cao, Tan, Kim, & Tey, 2017), (Kim & Kim, 2018), (Barr et al., 2019), (Sakai et al., 2016) and neurogenic inflammation (Lee, Jeong, &

Lee, 2010). Also, the potential utility of the antagonists of opioid receptors (Bigliardi et al., 2007) and nerve growth factor (Rocco, Soligo, Manni, & Aloe, 2018) is under investigation.

## 2.6 Conclusions

1. The investigations showed marked alterations in skin innervation, expression of pruritic receptors and number of mast cells in vulvar LS skin compared to normal vulvar skin.
2. The changes in small nerve fibers, i.e. quantitatively investigated decrease of mean IENFD, and qualitatively observed increase of CGRP positive IENFD and similarly assessed decrease of GAP-43 positive IENFD may possibly contribute to the pathomechanism of sensory symptoms in LS.
3. The increase of expression of opioid receptor  $\mu$  and PAR-2 receptor and the increase in number of mast-cells demonstrate the involvement of non-histaminergic mechanisms and neuroinflammation in development of vulvar LS.
4. Further exploration of the non-histaminergic mechanisms and of neuroinflammatory processes in pathomechanism of LS are necessary for the development of novel causative therapeutic approaches to pruritic skin conditions like LS.

## 2.7 Summary

Sensory symptoms in vulvar LS do not always respond to conventional treatment and often severely affect quality of patients' life (Krapf et al., 2020). The present study is the first in literature to describe their possible pathophysiological and pathomorphological background. In the lesional skin in LS, as compared to healthy skin, the significant decrease in IENFD and increase in expression of pruritic receptors (opioid receptor  $\mu$ , PAR-2) and in number of mast cells - main cells responsible for presence of neurogenic inflammation - was shown. Emerging new therapeutic options targeting aforementioned alterations indicate the necessity of further investigations in this field.

## 3 Wstęp

### 3.1 Liszaj Twardzinowy

#### 3.1.1 Informacje ogólne

LT jest przewlekłą chorobą zapalną skóry i błon śluzowych, mediowaną przez limfocyty jednakże o nie w pełni wyjaśnionej etiologii. Zmiany chorobowe lokalizują się głównie w okolicy anogenitalnej u kobiet i genitalnej u mężczyzn. Kobiety skarżą się na świąd, uczucie pieczenia i bolesność podczas stosunku, a mężczyźni na trudności w mikcji i bolesność podczas stosunku. Chociaż histologiczny opis choroby znany jest od połowy XX w., patofizjologiczne podłoże choroby i jej objawów pozostaje niecałkowicie scharakteryzowane. Sugeruje się udział czynników genetycznych, hormonalnych i autoimmunologicznych. W ostatnim czasie badania koncentrują się na opisie zmian na granicy skórno-naskórkowej, w celu identyfikacji potencjalnego molekularnego czynnika wzbudzającego reaktywność limfocytów (Fergus et al., 2020).

#### 3.1.2 Epidemiologia

Częstość występowania LT wydaje się niedoszacowana ze względu na niecharakterystyczny początek choroby oraz możliwy długotrwały, bezobjawowy przebieg. Przybliżone szacunki chorobowości w oparciu o praktykę dermatologiczną wynoszą pomiędzy 1:300 a 1:1000. W oparciu o dane z praktyki ginekologicznej częstość występowania u kobiet przyjmuje się na ok 2%. Choroba dotyka kobiety dziesięć razy częściej niż mężczyzn i występuje częściej u osób rasy białej. Obserwuje się dwa szczyty występowania liszaja twardzinowego; u kobiet pierwszy przed pokwitaniem i drugi w wieku okołomenopauzalnym a u mężczyzn pierwszy przed pokwitaniem a drugi w młodym i średnim wieku (Fergus et al., 2020).

#### 3.1.3 Obraz kliniczny

##### 3.1.3.1 Lokalizacja zmian

Zmiany chorobowe lokalizują się głównie w okolicy anogenitalnej u kobiet i genitalnej u mężczyzn. Kiedy choroba zaczyna się przed pokwitaniem, zwykle ma charakter postępujący. U dziewczynek LT może wystąpić bardzo wcześnie, w postaci krwotocznych zmian w okolicy odbytu. Zaparcia mogą wystąpić jako powikłanie bolesnych szczelin kanału odbytu. Jeżeli wystąpi znaczące zajęcie okolicy odbytu, w diagnostyce różnicowej należy uwzględnić zmiany po wykorzystaniu seksualnym. U płci męskiej zmiany okołoodbytnicze nie są obserwowane, ale u młodych chłopców liszaj twardzinowy jest najczęstszą przyczyną stulejki (Calonje, 2012). Zmiany na skórze poza okolicą genitalną występują u 11% kobiet z genitalną postacią liszaja twardzinowego i lokalizują się w malejącej częstości występowania na skórze górnej części grzbietu, pachwinach, kończynach górnych, szyi, dolnej części grzbietu i kończynach dolnych. Zajęcie owłosionej skóry głowy i twarzy jest rzadkie; w tych przypadkach może się objawiać łysieniem. Sporadyczne przypadki zajęcia stóp zostały również opisane w literaturze (Caspary, Carpena, & De Almeida, 2009). Zmiany w tych okolicach mogą występować także bez zajęcia okolicy genitalnej. Zmiany chorobowe mogą także pojawiać się na przeszczepionych fragmentach skóry. Zajęcie jamy ustnej, w tym warg, może towarzyszyć postaci genitalnej LT lub może mieć charakter izolowany. Dodatkowo LT może współwystępować z liszajem płaskim (Marren, Millard, Chia, & Wojnarowska, 1994), co dodatkowo utrudnia diagnostykę zmian w jamie ustnej i może przyczyniać się do niedoszacowania częstości występowania LT w tej okolicy.

### 3.1.3.2 Makroskopowy wygląd zmian

Typowe zmiany skórne mają charakter zlewających się, porcelanowo białych grudek o nierównej powierzchni. Często towarzyszą im wybroczyny i nadmierne rogowacenie, zwłaszcza w ujściu przydatków skórnych, które są poszerzone i przypominają zaskórniki. Pęcherze występują rzadko. U kobiet zajęcie okolicy genitalnej i okołodbytniczej jest zwykle obustronne i symetryczne i jest opisywane jako objaw “ósemki” w przypadku zajęcia obu wyżej wymienionych okolic. Zmiany lokalizują się głównie na wewnętrznej części warg sromowych mniejszych, w okolicach łechtaczki, przedsionka pochwy i spoidła tylnego. U mężczyzn zmiany chorobowe dotyczą głównie trzonu i żołądźdź prącia oraz napletka. Jednakże dominującym objawem może być stulejka. LT ma charakter bliznowaciejący. U kobiet zwykle dochodzi do zaniku warg sromowych mniejszych, bliznowacenia okolicy łechtaczki i ujścia cewki moczowej. Zmiany w obrębie samej cewki są niezwykle rzadkie, a w obrębie pochwy nie są obserwowane. U mężczyzn w sytuacji lokalizacji zmian na napletku, zgrubiały, bliznowato zmieniony napletek tworzy zrosty z żołądźdź i jest trudny do odprowadzenia, co sprzyja powstawaniu stulejki lub załupka (Calonje, 2012).

### 3.1.3.3 Objawy kliniczne

U kobiet głównym objawem jest silny świąd w okolicy sromu, który może nasilać się w nocy i zaburzać sen. Choć uczucie świądu może być bardzo silne, to tzw. lichenizacja (pogrubienie naskórka, wzmożone bruzdowanie i poletkowanie skóry wywołane przewlekłym drapaniem) może nie być nasiloną. Kolejnymi objawami zgłaszanymi przez chore są uczucie bólu i pieczenia, bolesność podczas stosunku, zaburzenia oddawania moczu i zaparcia. U mężczyzn przy zajęciu okolicy okołocewkowej dochodzi do zaburzeń oddawania moczu. Pod wpływem mikrourazów zmienionej chorobowo okolicy mogą tworzyć się krwotoczne pęcherze, nadżerki oraz owrzodzenia, nasilające powstawanie zmian bliznowatych (Calonje, 2012).

### 3.1.3.4 Związek z rakiem

Ważnym choć stosunkowo rzadkim powikłaniem LT jest rozwój dysplazji i raka płaskonabłonkowego na obszarach zmienionych chorobowo (Kirtschig, 2016). Dysplazja klinicznie manifestuje się jako białe-szare obszary nadmiernego rogowacenia, nadżerki lub rumień. Obszary o powyższej morfologii muszą zostać poddane histologicznej weryfikacji. U mniej niż 4% pacjentek z LT sromu dochodzi do rozwoju raka płaskonabłonkowego. Zaobserwowano obecność parakeratozy, dyskeratozy, hiperplazji i atypii komórek warstwy podstawnej (tzw. śródnabłonkowej neoplazji sromu typu zróżnicowanego) u pacjentek z LT sromu u których doszło do rozwoju raka płaskonabłonkowego. Sugeruje się, iż stwierdzenie powyższych cech u pacjentek z LT sromu, może świadczyć o zwiększonym ryzyku rozwoju raka. U mężczyzn częstość rozwoju raka płaskonabłonkowego na podłożu LT szacuje się na 4-8%. W preparatach pooperacyjnych od pacjentów z rakiem płaskonabłonkowym prącia, współwystępowanie LT obserwuje się w ok 32-50% przypadków. W obrębie prącia zmiany przewlekłe, niesymetryczne, rumieniowe, nadżerkowe, owrzodziałe i brodawkowate powinny być traktowane jako wysoce podejrzaną i zostać poddane badaniu histopatologicznemu (Calonje, 2012).

### 3.1.4 Patogeneza

Etiologia LT nie jest w pełni wyjaśniona i prawdopodobnie ma charakter wieloczynnikowy. Postulowany jest udział czynników genetycznych, hormonalnych, autoimmunologicznych, infekcyjnych i środowiskowych. Przypadki występowania rodzinnego są dobrze udokumentowane u

obu płci, jak również w przypadku bliźniąt jedno- i dwujajowych. Dodatni wywiad rodzinny stwierdza się u około 12% chorych, co sugeruje silne tło genetyczne (Sherman et al., 2010).

U ok. 21% pacjentów stwierdza się współwystępowanie chorób z autoagresji takich jak: łysienie plackowate, bielactwo, nadczynność i niedoczynność tarczycy, anemia złośliwa i cukrzyca. Został opisany znaczący związek pomiędzy występowaniem LT, a obecnością antygenów klasy II jak HLA-DQ7, -DR7, -DQ9 (pojedynczo lub w kombinacji). Krążące przeciwciała klasy IgG przeciwko glikoproteinom macierzy zewnątrzkomórkowej (extracellular matrix protein 1-ECM1) są obecne u ok 75% pacjentek z LT sromu (Oyama et al., 2003). Przeciwciała te wpływają na wiązanie ECM1 z metalopeptydazą 9, co prowadzi do nadmiernej syntezy kolagenu, szczególnie typu V oraz degradacji i pogrubienia błony podstawnej (Krapf et al., 2020). U ok 33% pacjentek obserwuje się przeciwciała przeciwko błonie podstawnej (basement membrane zone- BMZ) (Howard, Dean, Cooper, Kirtshig, & Wojnarowska, 2004).

Proces włóknienia i nadmiernej syntezy kolagenu jest wybitnie nasilony w przebiegu LT i odpowiada za wiele z jego powikłań prowadzących do obniżenia jakości życia chorych. W LT sromu w zmienionej chorobowo skórze zaobserwowano liczne zaburzenia w składzie białek macierzy zewnątrzkomórkowej (Gambichler et al., 2012) i zaburzenia dystrybucji metaloproteinaz i ich inhibitorów (De Oliveira et al., 2012). W naskórku tkanek zmienionych w przebiegu LT sromu poziom galektyny 7, białka pochodzącego z keratynocytów, hamującego proliferację fibroblastów i nasilającego syntezę kolagenu I i III jest istotnie zwiększony w porównaniu do prawidłowego naskórka (Zhao, Zhao, Li, Qin, & Wu, 2018). W badaniach molekularnych opisano znaczące zwiększenie ekspresji microRNA-155-5p, co jak wykazano ma pobudzający wpływ na proliferację fibroblastów (Ren, Zhao, Huo, & Wu, 2018).

Profil ekspresji genów w LT wskazuje na zapalne tło choroby z nadekspresją cytokin wydzielanych przez limfocyty pomocnicze Th1. Wykazano związek pomiędzy limfocytami Th1 a chorobami autoimmunologicznymi. Z opisaną powyżej stwierdzoną w LT nadekspresją microRNA-155 (miR-155), które jest związane z promowaniem dojrzewania limfocytów Th1, wiąże się utratę tolerancji na własne antygeny i indukowanie stanu zapalnego, co prowadzi do rozwoju chorób z autoagresji. Do innych zaburzeń związanych z nadekspresją miR-155 zalicza się zwiększoną syntezę kolagenu (Krapf et al., 2020). W stanie zapalnym ze znaczną ilością cytokin pochodzących z limfocytów Th1 obserwuje się uwalnianie reaktywnych form tlenu, które sprzyjają autoagresji i transformacji nowotworowej (Krapf et al., 2020).

Postuluje się tło hormonalne choroby ze względu na zwiększoną częstość występowania LT u kobiet w okresach niedoboru estrogenów. LT rozwijający się u kobiet przed menopauzą może mieć związek ze stosowaniem doustnych środków antykoncepcyjnych, szczególnie tych o właściwościach antyandrogennych (Calonje, 2012).

Nie jest w pełni wyjaśniona rola czynników infekcyjnych w rozwoju LT. Związek pomiędzy występowaniem choroby a infekcją *Borrelia burgdorferi* został opisany w Europie, co nie zostało potwierdzone u pacjentów z USA (Fujiwara et al., 1997). Obecność wirusa HPV (typ 6,16 i 18) została opisana w 70% przypadków LT penisa u dzieci i w 17,4% przypadków u dorosłych, w porównaniu do 8,7% u osób zdrowych. Lokalne leczenie LT maściami sterydowymi może prowadzić do reaktywacji infekcji HPV. Jednakże nie stwierdzono obecności wirusa HPV w przypadkach LT sromu. Epidemiologia i obraz kliniczny LT nie odpowiadają chorobie infekcyjnej ani przenoszonej drogą płciową.

U mężczyzn nieprawidłowości budowy anatomicznej oraz urazy wydają się mieć znaczenie w rozwoju LT. W szczególności LT wydaje się mieć związek ze spodziectwem i jego leczeniem (Calonje, 2012).



### 3.1.5 Obraz histologiczny.

Obraz histologiczny zmian w przebiegu LT jest niezależny od lokalizacji zmian chorobowych. Na wczesnym etapie obserwuje się obfity liszajowaty naciek zapalny (pasmowaty, limfocytarny naciek zapalny na granicy skórno-naskórkowej, zacierający jej budowę) egzocytozę limfocytów w obręb naskórka, pogrubienie błony podstawnej, ogniska atrofii naskórka i utratę włókien elastycznych w obrębie skóry właściwej. W części przypadków obserwuje się nasiloną, nieregularną akantozę, w postaci „zębów piły” (tzw. squamous cell hyperplasia). W tych przypadkach zalecana jest szczególnie wnikliwa diagnostyka w kierunku obecności zmian dysplastycznych lub raka inwazyjnego. W przypadkach raka płaskonabłonkowego rozwijającego się na podłożu LT obserwuje się typ zróżnicowany neoplazji śródnabłonkowej (differentiated vulvar intraepithelial neoplasia). W późnym etapie ewolucji wykwitów w przebiegu LT obserwuje się atrofię naskórka, zwyrodnienie wodniczkowe warstwy podstawnej, zczopowanie ujęść mieszków włosowych oraz szerokie pasmo szkliwienia w górnej części skóry właściwej, często z obecnym poniżej limfocytarno-histocytarnym naciekiem zapalnym. W wycinkach ze zmian narządów płciowych atrofia naskórka może być słabiej zaznaczona, obserwuje się zmiany jak w lichen simplex chronicus, spongiozę naskórka i obecność eozynofilii w skórze właściwej. W obszarach pozagenitalnych opisano cechy elastofagocytozy, niestwierdzonej w okolicy narządów płciowych (Calonje, 2012).

### 3.1.6 Diagnostyka i leczenie

W wielu przypadkach diagnoza LT jest stawiana na podstawie wywiadu klinicznego, charakterystycznej morfologii i lokalizacji zmian. Badanie histopatologiczne wycinka ze zmienionej skóry jest przeprowadzane w nietypowych przypadkach związanych z hiperpigmentacją lub nadmiernym rogowaceniem, przy podejrzeniu zmian nowotworowych lub przednowotworowych oraz w przypadkach zmian wątpliwych i nie poddających się leczeniu (Fergus et al., 2020).

Głównymi celami w leczeniu LT sromu są: złagodzenie objawów czuciowych, zapobieganie powstawaniu zmian bliznowaciejących i zapobieganie transformacji nowotworowej. W farmakoterapii LT na pierwszy plan wysuwa się leczenie przeciwzapalne (Krapf et al., 2020).

Leczeniem pierwszego rzutu są stosowane miejscowo kortykosteroidy, które wykazują działanie przeciwzapalne, przeciwmiotyczne i immunosupresyjne. Działanie przeciwzapalne opiera się na obkurczaniu naczyń krwionośnych, hamowaniu uwalniania fosfolipazy A2 (tym samym hamowaniu produkcji prostaglandyn i leukotrienów), oraz na zwiększaniu ekspresji genów przeciwzapalnych i pośrednio hamowaniu ekspresji genów prozapalnych. Działanie przeciwmiotyczne w skórze hamuje proliferację komórek i syntezę kolagenu. Działanie immunosupresyjne obejmuje hamowanie odpowiedzi humoralnej oraz hamowanie dojrzewania, różnicowania i proliferacji leukocytów (Gabros & Zito, 2020). W leczeniu stosuje się w szczególności propionian klobetazolu w postaci maści lub kremu przez okres do 3 miesięcy. W badaniach klinicznych odpowiedź na leczenie stwierdza się u 73-90% chorych. Niektórzy klinicyści stosują kortykosteroidy lokalnie długoterminowo (Fergus et al. 2020). Badania kliniczne wskazują, iż długoterminowe, zgodne z zaleceniami stosowanie kortykosteroidów wiąże się ze zmniejszonym ryzykiem transformacji złośliwej (Krapf et al., 2020). Alternatywnym sposobem leczenia o udowodnionej, aczkolwiek mniejszej skuteczności jest zastosowanie inhibitorów kalcyneuryny, które blokują uwalnianie cytokin zapalnych z limfocytów T. Stosuje się takrolimus (odpowiedź na leczenie u 63% chorych) lub pimerkrolimus (odpowiedź na leczenie u 53% chorych). Leczenie to jednak powinno być uważane za eksperymentalne ze względu na wątpliwości co do bezpieczeństwa stosowania tych leków (Fergus et al., 2020). W specjalistycznej literaturze spotyka się doniesienia na temat stosowania krioterapii jako leczenia przeciwzapalnego i przeciwbólowego w terapii

objawowej. W badaniach opisano również skuteczność terapii fotodynamicznej, w której pod wpływem fotouczulacza i światła o odpowiedniej długości fali dochodzi do apoptozy limfocytów i keratynocytów oraz zmian w ekspresji cytokin i metaloproteaz, które biorą udział w przebudowie skóry (Prodromidou, Chatziioannou, Daskalakis, Stergios, & Pergialiotis, 2018). Do nowych obiecujących metod leczenia zalicza się zastosowanie zogniskowanej fali ultradźwiękowej o wysokiej częstotliwości (high intensity focused ultrasound- HIFU), co stymuluje proliferację komórek, syntezę białek i powstawanie nowych naczyń krwionośnych. Obecnie trwa randomizowane, podwójnie zaślepienie badanie kliniczne nad zastosowaniem w leczeniu LT sromu lasera frakcyjnego CO<sub>2</sub>, który stymuluje wzrost fibroblastów i aktywuje biosyntezę i odkładanie kolagenu w macierzy zewnątrzkomórkowej. Badania na małej ilości pacjentów nad zastosowaniem osocza bogatopłytkowego, które pobudza gojenie poprzez stymulowanie uwalniania cytokin i czynników wzrostu nie wykazały jednoznacznej skuteczności tej metody (Krapf et al., 2020). Do innych metod leczenia stosowanych z różnym skutkiem zalicza się cyklosporynę, metotreksat i retinoidy. Leczenie hormonalne nie jest już zalecane, aczkolwiek w przypadku wystąpienia zmian atroficznych w przebiegu LT u kobiet po menopauzie powinno się zastosować miejscowe leczenie estrogenami (Fergus et al., 2020). W terapii zaawansowanych zmian bliznowatych stosuje się leczenie chirurgiczne (Krapf et al., 2020).

## 3.2 Świąd

### 3.2.1 Wstęp

Świąd może być zdefiniowany jako nieprzyjemne uczucie skórne powodujące silną potrzebę drapania. Przewlekły lub intensywny świąd prowadzi do powstawania zmian skórnych i uwolnienia mediatorów zapalnych, które mogą wywoływać lub intensyfikować uczucie świądu. Ten samonapędzający się mechanizm powstawania uczucia świądu jest często oporny na lokalne lub systemowe próby terapii.

Świąd jest jednym z najczęstszych objawów w medycynie, a w szczególności w dermatologii. Może towarzyszyć stanom zapalnym, nowotworom złośliwym, chorobom metabolicznym, infekcjom, chorobom psychiatrycznym, stresowi oraz może być efektem ubocznym wielu leków. Dowody wskazują na istnienie interaktywnej sieci pomiędzy skórą oraz obwodowym i centralnym systemem nerwowym, która reguluje odpowiedź na mechanizmy świądotwórcze. Wedle najnowszej wiedzy świąd nie jest „podtypem” uczucia bólu, ale stanowi odrębny rodzaj wrażenia czuciowego (Steinhoff et al., 2006a).

Z klinicznego punktu widzenia można wyodrębnić następujące rodzaje świądu:

- świąd towarzyszący zmianom skórnym - mediowany głównie przez histaminę, interleukiny, prostaglandyny i proteazy,
- świąd w chorobach systemowych (niewydolność wątroby, niewydolność nerek) - mediowany przez opiaty i interleukiny,
- świąd neuropatyczny wywołany uszkodzeniem włókien nerwowych - mediowany neuropeptydami (substancja P) lub proteazami,
- świąd psychogeny (urojenia, stres, depresja) - mediowany przez serotoninę i noradrenalinę,
- świąd mieszany - wynikający z nałożenia powyższych przyczyn (Ikoma, Steinhoff, Ständer, Yosipovitch, & Schmelz, 2006).

W piśmiennictwie można również spotkać podział świądu oparty na mechanizmie jego powstawania, wyróżniający:

- świąd wywołany w zdrowym układzie nerwowym przez obwodowe lub ośrodkowe mechanizmy świądotwórcze
- świąd wywołany uszkodzeniem neuronów (świąd neuropatyczny) (Ikoma et al., 2006).

Z punktu widzenia fizjologii powstawania uczucia świądu, najpowszechniejszy i najlepiej ugruntowany w badaniach naukowych podział wyróżnia:

- świąd histaminergiczny,
- świąd niehistaminergiczny.

Opisane w dalszej części rozdziału różnice w tych dwóch ścieżkach pobudzania i przewodzenia uczucia świądu odpowiadają za różnice w przebiegu klinicznym i w odpowiedzi na leczenie w

obrębie jednostek chorobowych przebiegających ze świądem. Wraz ze wzrostem wiedzy o świądzie pojawiają się nowe możliwości terapeutyczne, ukierunkowane na zwiększenie skuteczności i zmniejszenie efektów ubocznych stosowanych leków (Dhand & Aminoff, 2014).

W literaturze przedmiotu spotyka się również podział świądu ze względu na czas trwania objawów:

- świąd ostry,
- świąd przewlekły.

Istnieją istotne różnice pomiędzy ostrym i przewlekłym świądem, który definiuje się jako świąd trwający dłużej niż 3 miesiące. Ostry świąd występuje, kiedy czynnik wywołujący ma kontakt ze skórą i zazwyczaj drapanie i związane z tym uczucie bólu powoduje zmniejszenie jego natężenia. Przewlekły świąd jest przetrwałym doznaniem spowodowanym różnymi przyczynami (dermatozy, choroby układowe, infekcje, neuropatie, choroby psychiatryczne), które nie może być zniesione przez drapanie czy uczucie bólu. Co więcej, w tych schorzeniach uczucie bólu często może być odbierane jako świąd. Analogicznie do mechanizmów generowania bólu postuluje się dwa prawdopodobne mechanizmy powstawania przetrwałego uczucia świądu. Pierwszym jest obwodowa sensytyzacja związana z obniżonym progiem pobudzenia i zwiększoną aktywnością bazową receptorów dla świądu i włókien nerwowych. Drugim postulowanym mechanizmem jest centralna sensytyzacja wynikająca z neuroplastyczności, która pojawia się w rdzeniu kręgowym i mózgu i sprawia, że bodźce nieświadotwórcze są odbierane jako świąd lub zwiększają jego nasilenie (Dhand & Aminoff, 2014).

## 3.2.2 Neurofizjologia świądu

### 3.2.2.1 Drogi przewodzenia świądu

Fizjologicznie uczucie świądu rozpoczyna się skórze po zadziałaniu czynnika świądotwórczego. Czynniki te aktywują pewne receptory obecne między innymi na drobnych, specyficznych dla świądu (itch sensitive), niezmielinizowanych włóknach nerwowych C, pochodzących z neuronów, których ciała znajdują się w zwojach korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych (dorsal root ganglia- DRG). Zostały opisane dwie odrębne i niezależne, obwodowe i rdzeniowo-wzgórzowe drogi nerwowe przewodzące uczucie świądu: histaminergiczna, zależna od aktywacji receptorów histaminowych i niehistaminergiczna, zależna od aktywacji receptorów aktywowanych przez proteazy-2 (proteinase activated receptors-2, PAR-2). Receptory PAR-2 aktywowane są egzogennie przez kolce tropikalnej rośliny, *Świerzbca właściwego* (*Mucuna pruriens*, Cowhage) i stąd pochodzi często używana w piśmiennictwie nazwa tej drogi przewodzenia: "Cowhage pathway". W obrębie drogi rdzeniowo- wzgórzowej biegną odrębne neurony aktywowane przez histaminę i Cowhage.

Badania wykazały, że drogi przewodzenia świądu - histaminergiczna i niehistaminergiczna - mają odrębną reprezentację korową. Badanie z wykorzystaniem fMRI wykazało, iż w przypadku świądu wywołanego histaminą w mózgu aktywowane są: wzgórze, pierwszo- i drugorzędowa kora somatosensoryczna (S1 i S2), przedklinek, klinek, tylny zakręt kory obręczy (PCC), przedni zakręt kory obręczy (ACC), dolna i tylna kora ciemieniowa (inferior and posterior parietal cortices), górny i środkowy zakręt skroniowy, bardziej obustronnie i symetrycznie niż w przypadku świądu wywołanego przez Cowhage. Histamina klinicznie wywołuje ostry świąd, a leki przeciwhistaminowe blokujące receptor H1 nie znalazły zastosowania w leczeniu przewlekłego świądu.

Przewlekły świąd jest indukowany na drodze niezależnej od histaminy. Neurony niehistaminergiczne zawierają receptory PAR-2 i mogą być pobudzane przez endogenne lub egzogenne pruritogeny, jak proteazy, cytokiny, chemokiny i aminy. W badaniu fMRI ośrodkowa reprezentacja dla świądu wywołanego przez Cowhage jest zbliżona do reprezentacji dla świądu wywołanego histaminą, aczkolwiek stwierdzono wzmocnienie sygnałów po stronie lewej (w przeciwieństwie do symetrii sygnałów w przypadku histaminy). Świąd wywołany przez Cowhage, w porównaniu do świądu wywołanego histaminą, wywołuje również zwiększoną aktywację kory wyspy i przedmurza oraz jąder podstawy i przeważająco po przeciwnej stronie (Papoiu, Coghill, Kraft, Wang, & Yosipovitch, 2012).

### 3.2.2.2 Czynniki świądotwórcze i receptory świądu.

#### 3.2.2.2.1 Histamina

Histamina jest głównym czynnikiem świądotwórczym w ostrym świądzie. Jest uwalniana głównie przez mastocyty, w mniejszym stopniu przez bazofile i keratynocyty. Wśród receptorów histaminowych receptory H1 wydają się mieć znaczącą rolę w reakcjach skórnych wywołanych przez histaminę. Inhibitory receptora H1 skutecznie hamują świąd wywołany histaminą, pokrzywkę i rumień wywołany na drodze odruchu aksonalnego. Chociaż związki te znalazły zastosowanie w leczeniu niektórych chorób przebiegających ze świądem (niektóre typy pokrzywki), w wielu innych (np. w AZS) okazały się nieskuteczne (Ikoma et al., 2006). Receptory histaminowe H1 i H4 obecne na neuronach histaminergicznych, wiążą histaminę i aktywują receptor przejściowego potencjału TRPV1 przez system fosfolipaz. Pobudzone neurony histaminergiczne również uwalniają neuropeptydy: peptyd pochodny genu kalcytoniny (calcitonin gene related

protein, CGRP) i substancję P (substance P, SP), które powodują “neurogenne zapalenie” objawiające się miejscowym poszerzeniem naczyń krwionośnych, wysiękiem i degranulacją mastocytów (Yosipovitch, Rosen, & Hashimoto, 2018).

#### 3.2.2.2.2 Proteazy i ich receptory

Receptory aktywowane przez proteazy (proteinase-activated receptors, PAR) należą do rodziny śródbłonowych receptorów związanych z białkiem G. Jak dotąd zidentyfikowano cztery rodzaje tych receptorów. Jakkolwiek stwierdzono obecność receptorów PAR1, PAR2 i PAR4 na neuronach, dotychczas opisano jedynie rolę receptora PAR2 w patofizjologii świądu. Receptor PAR2 bierze udział w powstawaniu uczucia świądu na drodze niehistaminergicznej i może być aktywowany przez roślinę Cowhage, której substancja czynna (mucunian) jest proteazą serynową (Jeffrey et al., 2011). W tkankach receptor PAR-2 jest pobudzany przez liczne proteazy serynowe jak trypsyna, tkankowe kalikreiny, czynniki krzepnięcia VIIa i Xa, tryptazę (uwalnianą przez mastocyty) i transbłonowe proteazy serynowe. Ponadto receptor PAR-2 może być aktywowany przez egzogenne proteazy (np. pochodzenia bakteryjnego), co może wywoływać reakcję zapalną lub alergiczną. Receptor PAR-2 należy do rodziny receptorów związanych z białkiem G. Reakcja proteolizy wywołwana przez proteazy w obrębie zewnątrzkomórkowego końca aminowego receptora powoduje odsłonięcie endogennego ligandu dla miejsca wiążącego, następową aktywację receptora i w dalszej kolejności aktywację białka G. Aktywowane białko G wpływa na działanie wewnątrzkomórkowej fosfolipazy C (PLC), co skutkuje powstaniem 1, 4, 5-trifosforanu inozytolu (IP3) i diacyloglicerolu (DAG). Te dwa wtórne przekaźniki regulują aktywność kinazy białkowej C (PKC) i wewnątrzkomórkowe stężenie jonów wapnia. Fosforylacja zależna od PKC i wewnątrzkomórkowy wzrost poziomu wapnia powodują obniżenie progu pobudliwości dla receptorów TRPV1 (Rothmeier & Ruf, 2012).

Dodatkowo zaobserwowano doświadczalnie uwalnianie neuropeptydów takich jak SP i CGRP w odpowiedzi na aktywację receptora PAR-2, co przyczynia się do rozwoju neurogennego stanu zapalnego i nasila uczucie świądu i bólu. Tak więc aktywacja receptora PAR-2 w obrębie wolnych zakończeń nerwowych poprzez obniżenie progu pobudzenia receptorów TRPV1 prowadzi do rozwoju nadwrażliwości, a poprzez stymulację uwalniania neuropeptydów nasila neurogeny stan zapalny (Rothmeier & Ruf, 2012).

Opisany mechanizm uwalniania neuropeptydów w odpowiedzi na stymulację tryptazą doprowadził do hipotezy o powstawaniu uczucia świądu w dermatozach na skutek aktywacji receptora PAR2 na włóknach czuciowych przez proteiny. Dodatkowo receptor PAR-2 obecny także na keratynocytach, ulegający zwiększonej ekspresji w naskórku pacjentów z AZS, może mediuować świąd indukowany przez endogenne (trypsyna, kalikreina) lub egzogenne (np. pochodzenia bakteryjnego) proteazy. Ponadto u chorych z AZS poziom endogennego agonisty receptora PAR-2 – tryptazy, był zwiększony czterokrotnie, a ekspresja PAR-2 była znacznie zwiększona na nerwach czuciowych w skórze zmienionej chorobowo. Z drugiej strony nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniu histaminy pomiędzy skórą zdrową i zmienioną chorobowo, co sugeruje, iż w AZS świąd wywołany przez tryptazę, odgrywa istotniejszą rolę. Co więcej u tych chorych śródskórne podanie agonistów receptora PAR-2 wywoływało silne i przedłużone uczucie świądu. Obserwacje te mogą tłumaczyć słabą odpowiedź na leki przeciwhistaminowe u pacjentów z AZS (Steinhoff et al., 2006a).

Ekspresję receptora PAR-2 opisano w skórze na keratynocytach, fibroblastach, komórkach śródbłonka i zakończeniach aferentnych włókien nerwowych. Ponadto również leukocyty jak eozynofile, neutrofile, monocyty, makrofagi, mastocyty, limfocyty T i komórki dendrytyczne wykazują ekspresję PAR2. Tryptaza uwalniania przez mastocyty może w sposób auto- i parakryny

aktywować receptor PAR-2 obecny na mastocytach, co powoduje ich aktywację i degranulację i przyczynia się do rozwoju i podtrzymania stanu zapalnego (Siiskonen & Harvima, 2019).

Wydaje się, iż antagoniści receptora PAR-2 i inhibitory proteaz mogą stanowić obiecujący kierunek badań nad nowymi lekami przeciwświądowymi (Steinhoff et al., 2006a).

### 3.2.2.2.3 Opioidy

Kolejna grupa neuropeptydów - opioidy była używana jako analgetyki przez ponad 2000 lat. Poza centralnym systemem nerwowym obecność receptorów opioidowych została opisana na zakończeniach włókien nerwowych w naskórku, keratynocytach, melanocytach, komórkach miesza włosowego, fibroblastach, mastocytach, limfocytach, granulocytach, makrofagach i komórkach Langerhansa. Receptory opioidowe są metabotropowymi (związanymi z białkiem G) receptorami błonowymi, które zostały podzielone na trzy główne podtypy: receptory opioidowe  $\mu$  (MOR), receptory opioidowe  $\delta$  (DOR) i receptory opioidowe  $\kappa$  (KOR). Endogennymi ligandami, hamującymi uczucie bólu są endorfiny i enkefaliny dla MOR i DOR oraz dynorfiny dla KOR. MOR, KOR i w mniejszym zakresie DOR występują na peptydergicznych zakończeniach nerwów czuciowych. DOR zlokalizowane są wyłącznie na aksonach i wolnych zakończeniach nerwowych niezmielinizowanych włókien C (J. Kopsky, 2018). Aktywowane receptory opioidowe łączą się z białkiem G hamującym, które hamuje działanie cykazy adenylowej prowadząc do spadku produkcji cAMP oraz wchodzi w bezpośrednią interakcję z kanałami wapniowymi, zmniejszając napływ jonów  $Ca^{2+}$  do wnętrza komórki. W efekcie prowadzi to do redukcji pobudliwości i przewodnictwa włókien nerwowych oraz do zmniejszenia uwalniania z nich prozapalnych neuropeptydów takich jak SP i CGRP. Agoniści receptorów opioidowych osłabiają pobudliwość wolnych zakończeń nerwowych oraz zmniejszają uwalnianie prozapalnych neuropeptydów, co dopowiada za ich działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne, szczególnie w tkankach uszkodzonych (Busch-Dienstfertig & Stein, 2010).

Obwodowe zapalenie wywołuje zwiększoną syntezę, transport aksonalny i akumulację receptorów opioidowych na zakończeniach nerwów czuciowych, których ilość dodatkowo wzrasta w mechanizmie „kiełkowania”. Ponadto obserwuje się migrację leukocytów wykazujących ekspresję receptorów opioidowych. Spadek pH w tkankach wywołany stanem zapalnym powoduje zwiększenie skuteczności agonistów receptorów opioidowych. Wzrost ekspresji receptorów zależy od ich typu i czasu trwania zapalenia. Gęstość receptorów MOR na neuronach i liczba neuronów wykazujących ekspresję MOR rośnie wraz z czasem trwania zapalenia, podczas gdy powinowactwo agonistów do receptorów nie zmienia się (Sehgal, Smith, & Manchikanti, 2011). W modelu zwierzęcym bólu neuropatycznego opisano zmniejszenie bólu i przeczulicy po miejscowym zastosowaniu agonistów receptorów opioidowych, aczkolwiek wymagane były większe dawki niż w modelu bólu wywołanego stanem zapalnym (Obara et al., 2009). W tym samym badaniu w modelu bólu neuropatycznego opisano zmniejszenie ekspresji mRNA dla wszystkich typów receptora opioidowego w rdzeniu kręgowym i zwojach korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych (dorsal root ganglia- DRG), co może być wynikiem przewlekłego charakteru tego stanu i może tłumaczyć zmniejszoną skuteczność opioidów i konieczność stosowania ich w wyższych dawkach. W badaniach na modelu zwierzęcym przewlekłego zapalenia w neuronach DRG stwierdzono zwiększenie ekspresji mRNA dla receptora opioidowego  $\mu$  po 2 i 96h i dla receptora  $\kappa$  po 12h. Z kolei krótko trwające bodźce zapalne nie powodują zwiększenia ekspresji receptorów opioidowych (Busch-Dienstfertig & Stein, 2010).

Kolejnym mechanizmem odpowiadającym za przeciwbólowe i przeciwzapalne działanie opioidów jest interakcja pomiędzy komórkami zapalnymi, będącymi ich endogennym źródłem i wykazującymi ekspresję receptorów opioidowych, a zakończeniami nerwów czuciowych. Komórki

układu immunologicznego gromadzące się wokół uszkodzonych nerwów, czy w zapalnie zmienionych tkankach zawierają ok. 35% peptydów opioidowych, które są z nich uwalniane po stymulacji noradrenaliną (NA), czynnikiem uwalniającym kortykotropinę (CRF) i cytokinami prozapalnymi takimi jak TNF- $\alpha$  i interleukina 1 $\beta$ . Tak więc efekt przeciwbólowy pojawia się, gdy aktywowane leukocyty są obecne w miejscu uszkodzenia i nie jest obecny w tkankach niezmiennych zapalnie. Na wczesnych etapach stanu zapalnego głównymi komórkami zawierającymi opioidy są granulocyty, w późniejszych stadiach przeważają monocyty, makrofagi i limfocyty (J. Kopsky, 2018).

Dodatkowo w przebiegu AZS opisano różnice w lokalizacji receptora opioidowego  $\mu$  w obrębie naskórka i zjawisko przemieszczenia receptora z błony komórkowej w obszar okołojądrowy keratynocytów (internalizacja receptora). Autorzy badania postawili hipotezę, mówiącą, że internalizacja receptora na terenie keratynocytów zwiększa dostępność i możliwość pobudzenia tego samego receptora na zakończeniach śródskórkowych włókien nerwowych poprzez endogenne opioidy obecne na terenie naskórka, tym samym przyczyniając się do powstawania uczucia świądu (Bigliardi-Qi, Lipp, Sumanovski, Buechner, & Bigliardi, 2005). Co więcej, leczenie antagonistą receptora opioidowego  $\mu$  powoduje wzrost jego ekspresji na powierzchni keratynocytów i tym samym „kompetycyjne” hamowanie pobudzania tego receptora na zakończeniach śródskórkowych włókien nerwowych, co prawdopodobnie skutkuje redukcją uczucia świądu (Bigliardi et al., 2007).

Uwzględniając wszystkie powyższe doniesienia miejscowe zastosowanie opioidów ich agonistów i antagonistów wydaje się być obiecującym kierunkiem badań nad leczeniem przewlekłego świądu, stanu zapalnego, bólu neuropatycznego i przewlekłych bolesnych zmian skórnych (J. Kopsky, 2018).

#### Efekty obwodowe opioidów

Wstrzyknięte śródskórnio opioidy aktywują mastocyty na drodze nie mediowanej przez receptory. W przeciwieństwie do morfiny, silny agonista receptorów MOR – fentanyl, nie powoduje degranulacji mastocytów, nawet w stężeniach przewyższających te typowe dla morfiny. Wydaje się więc, że wywołana przez morfinę degranulacja mastocytów odbywa się bez pośrednictwa receptorów MOR. Jako że, do degranulacji mastocytów wymagane są wysokie lokalne stężenia opioidów, świąd wywołany systemowym podawaniem tych leków ma prawdopodobnie pochodzenie centralne. Nie ma dowodów na bezpośrednie pobudzanie wolnych zakończeń nerwowych przez egzogenne opioidy, nawet w wysokich stężeniach. Przy tej okazji warto odnotowania jest, że z kolei obwodowo aplikowane kannabioidy hamują świąd indukowany przez histaminę, poprzez oddziaływanie przez receptory CB1 i CB2 obecne na zakończeniach nerwowych. Hamujący efekt wydaje się przynajmniej w części być mediowany poprzez wtórne uwolnienie endogennych opioidów na terenie skóry. Ponadto wykazano, iż endogenne kannabioidy takie jak anandamid aktywują receptor TRPV1 (Steinhoff et al., 2006a).

#### Efekty centralne opioidów.

Jak wskazuje doświadczenie, uczucie świądu może być stłumione przez uczucie bólu wywołane drapaniem lub przez inne odczucia bólowe, spowodowane przez bodźce termiczne, chemiczne lub mechaniczne. Jedną z metod elektroterapii - skórna stymulacja pola (cutaneous field sensitisation), jest skutecznie używana do hamowania świądu wywołanego histaminą przez kilka godzin, na relatywnie dużym obszarze (ok 20cm średnicy), co sugeruje wpływ centralnego systemu nerwowego (pole receptorowe somatosensorycznej kory mózgowej jest większe niż pole



receptorowe pobudzanych zakończeń nerwowych). Nie tylko świąd jest hamowany przez uczucie bólu, ale również zahamowanie odczucia bólu może redukować jego inhibicyjny efekt i tym samym wzmacniać odczucie świądu. To zjawisko jest szczególnie istotne przy dordzeniowym podawaniu agonistów receptora MOR, które powodują segmentalną analgezję, często w połączeniu z segmentalnym świądem. Ten mechanizm może również odpowiadać za przeciwświądowe działanie antagonistów receptora MOR (nalmefene, naloxone, naltrexone) obserwowane w eksperymencie wywołanym świądem, tak jak i w chorobach skóry przebiegających ze świądem. Świąd wywołany dordzeniowym podaniem agonistów receptora MOR, w połowie przypadków jest wrażliwy na podanie naloxonu.

Podczas gdy antagoniści receptora MOR znacząco zmniejszają świąd, eksperymenty na zwierzętach wykazały, iż antagoniści receptora KOR wzmacniają to odczucie. Co więcej, agoniści receptora KOR, jak nalbuphine i TRK-820 redukują uczucie świądu. Ponieważ receptory są obecne na wolnych zakończeniach nerwowych, zrozumienie ich roli w mechanizmie powstawania świądu wydaje się mieć istotne znaczenie (Steinhoff et al., 2006a).

#### 3.2.2.2.4 Cytokiny

Świąd często towarzyszy skórnym chorobom zapalnym i alergicznym. W stanach tych opisano nasiloną odpowiedź ze strony limfocytów Th2, produkujących cytokinę IL-31, która wywołuje uczucie świądu poprzez aktywację kompleksu receptora złożonego z receptora A dla IL-31 i receptora onkostatyny M. Dodatkowo wywołanie uczucia świądu zależnego od IL-31 wymaga aktywacji zarówno receptora TRPV1 jak i receptora TRPA1. W skórze źródłem IL-31 są limfocyty T i mastocyty. Oprócz bezpośredniego pobudzania włókien nerwowych wykazano rolę IL-31 w stymulowaniu ich rozrostu i „kielkowania” (nerve sprouting). Opisano rolę IL-31 w przebiegu chorób przebiegających ze świądem, jak atopowe zapalenie skóry, świerzbiączka guzkowa i skórny chłoniak z komórek T (Siiskonen & Harvima, 2019).

#### 3.2.2.2.5 Neuropeptydy.

##### 3.2.2.2.5.1 Substancja P (substance P, SP)

Pod wpływem egzo- lub endogennych czynników pobudzających, wolnoprzewodzące, histamino-wrażliwe włókna C przekazują do centralnego systemu nerwowego uczucie świądu, jednocześnie uwalniając neuropeptydy takie jak SP i CGRP. Śródskórne podanie SP powoduje uwalnianie histaminy z mastocytów, która ma właściwości pruritogenne. Ponadto SP zwiększa śródskórną koncentrację tlenu azotu, który może nasilać świąd wywołany przez SP. Związanie SP z receptorem 1 dla neurokinin (neurokinin-1 receptor, NK-1) na powierzchni mastocytów, powoduje wzrost poziomu TNF- $\alpha$ , co może uwrażliwiać wolne zakończenia nerwowe. Tak więc neuropeptydy mogą w sposób pośredni prowadzić do aktywacji wolnych włókien nerwowych poprzez wyzwalanie uwalniania pruritogenów przez komórki takie jak: mastocyty (histamina, tryptaza, chymaza, TNF- $\alpha$ ), komórki śródbłonna (kininy, endotelina), keratynocyty (prostanoidy, NGF) i komórki układu odpornościowego (cytokiny). Ten mechanizm odpowiada prawdopodobnie za wywołanie uczucia świądu w atopowym zapaleniu skóry, łuszczycy i świerzbiączce guzkowej (Steinhoff et al., 2006a).

##### 3.2.2.2.5.2 Peptyd pochodny genu kalcyoniny (calcitonin gene related protein, CGRP)

Opisano wzrost ilości włókien nerwowych CGRP-dodatnich w chorobach skóry przebiegających ze świądem, jak atopowe zapalenie skóry, egzema i świerzbiączka guzkowa (Steinhoff et al., 2006a). Stwierdzono również znaczące zwiększenie ilości włókien nerwowych w tym włókien

wykazujących ekspresję CGRP i SP w skórze i naskórku u myszy już po 3-7 dniach od zadziałania czynnika drażniącego, wywołującego drapanie (Yamaoka, Di, Sun, & Kawana, 2007). Poza rolę w przewodzeniu uczucia bólu, CGRP moduluje stan zapalny wywołując obrzęk tkanek poprzez zwiększenie przepuszczalności ścian naczyń krwionośnych oraz moduluje uczucie świądu i przedłuża okres latencji świądu po podaniu SP, co sugeruje inhibitoryjny wpływ CGRP na świąd wywołany SP (Steinhoff et al., 2006a). Z piśmiennictwa wiadomo, iż CGRP jest uwalniany z zakończeń nerwowych po aktywacji receptora z rodziny receptorów przejściowego potencjału TRPV1 (patrz dalsza część rozdziału) np. kapsaicyną czy endogennymi kannabiodami jak anandamid. Podobne działanie wykazuje również inny receptor z tej rodziny - TRPA1. Wydaje się, iż w skórze poza włóknami nerwowymi również keratynocyty i leukocyty mogą być źródłem CGRP. Doświadczalnie wykazano hamowanie świądu przez antagonistów CGRP (Russell et al., 2014).

#### 3.2.2.2.5.3 Wazoaktywny peptyd jelitowy (vasoactive intestinal peptide, VIP)

Śródskórne podanie wazoaktywnego peptydu jelitowego (VIP), neurotensyny i sekretyny powodowało powstanie świądu zależnego od histaminy. W prawidłowej skórze VIP wykazywał podobne działanie świądotwórcze jak SP. Udowodniono również, że w świerzbiączce guzkowej VIP nasila świąd indukowany acetylocholiną (Steinhoff et al., 2006a).

VIP powoduje poszerzenie naczyń krwionośnych poprzez indukowanie syntezy tlenu azotu i proliferację i migrację keratynocytów oraz najprawdopodobniej stymuluje uwalnianie histaminy z mastocytów (Steinhoff, Ständer, et al., 2003).

#### 3.2.2.2.6 Neurotrofiny

Neurotrofiny takie jak nerwowy czynnik wzrostu (nerve growth factor- NGF) i neurotrofina 4 wydają się również odgrywać rolę w patofizjologii świądu. NGF jest uwalniany przez keratynocyty, makrofagi, fibroblasty i mastocyty. Aktywacja jego receptora trk A na włóknach czuciowych powoduje ich namnażanie i sensytyzację. W surowicy krwi osób z atopowym zapaleniem skóry obserwuje się podwyższony poziom NGF, co powoduje uwalnianie pruritogennego mediatora- tryptazy. Również keratynocyty i mastocyty pacjentów z AZS produkują duże ilości NGF, co może być stymulowane przez histaminę. Dodatkowo u tych pacjentów zostały stwierdzone podwyższone poziomy neurotrofyny-4 i chemotaktyczny wpływ na eozynofilie czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego- BDNF (Steinhoff et al., 2006a).

#### 3.2.2.2.7 Kininy, kalikreiny

Kalikreiny należą do grupy proteaz serynowych. Są one produkowane przez granulocyty obojętno-chłonne, ich obecność stwierdza się również w górnych warstwach naskórka, gdzie odpowiadają prawdopodobnie za jego złuszczenie. Kalikreiny oraz peptydy powstałe w wyniku ich aktywności, głównie powodująca ból bradykinina mogą powodować powstanie świądu poprzez aktywację histamino-wrażliwych włókien C. Ponadto wykazano, że u gryzoni antagoniści receptora bradykininy typu 2 mogą redukować świąd wywołany kwasem deoxycholinowym. Co więcej, w tym modelu inhibicja tkankowej kalikreiny hamowała uczucie świądu, co wskazuje na rolę naskórkowej kalikreiny w powstawaniu świądu. Zwiększona aktywność kalikreiny i zmniejszona aktywność kininogenu została odkryta w grudkowych wykwitach skórnych, którym towarzyszył świąd. Śródskórne podanie kalikreiny u szczurów nie spowodowało znaczącego świądu, ale zaobserwowano silny świąd u myszy z nadekspresją naskórkowej kalikreiny-7 (Steinhoff et al., 2006a).

### 3.2.2.2.8 Rodzina receptorów przejściowego potencjału (transient receptor potential, TRP).

Doniesienia z literatury wskazują, iż mediatory świądu działają również poprzez aktywację receptorów z rodziny receptorów przejściowego potencjału, TRP (mających charakter kanałów jonowych). Rodzina receptorów TRP należy do nioselektywnych kanałów kationowych, przepuszczających jony wapnia i zarazem reagujących na bodźce chemiczne i fizyczne. Rodzina ta składa się z sześciu podrodzin, do których należą TRPC (canonical subfamily), TRPV (vanilloid subfamily), TRPM (melastatin subfamily), TRPP (policystin subfamily), TRPML (mucolipin subfamily) i TRPA (ankyrin subfamily). Kanały te poprzez przepuszczanie jonów wapnia (a zarazem będąc chemoreceptorami) biorą udział w detekcji smaku, ciepła, gorąca, zimna oraz zmian osmotyczno/mechanicznych (Steinhoff et al., 2006a). Z powszechnego doświadczenia wiadomo, że podwyższona temperatura nasila uczucie świądu, a niska temperatura je łagodzi. Niektóre z tych kanałów biorących udział w detekcji zimna, są pobudzane przez mentol, środek stosowany miejscowo w zmniejszaniu uczucia świądu (Greaves, 2010).

Receptor TRPV1- domniemana znacząca rola w patogenezie i terapii świądu.

Obecność TRPV1 została opisana na neuronach czuciowych przewodzących ból, a TRPV1 został zidentyfikowany jako (również) receptor dla kapsaicyny. W wyższych dawkach i po przedłużonym czasie ekspozycji kapsaicyna powoduje desensytyzację neuronów czuciowych (który to efekt jest od dawna wykorzystywany praktycznie w postaci miejscowego stosowania maści z kapsaicyną). Poza kapsaicyną TRPV1 może być aktywowany przez szereg substancji zwanych „endovanilloidami”, jak: eikozanoidy, bradykinina, prostaglandyny i neurotrofiny (NGF, neurotrofina 3 i -4). Wykazano, że pobudzenie włókien czuciowych zależne od histaminy i aktywacji receptora PAR2 wiąże się z aktywacją TRPV1.

Przedłużona lub powtarzana aplikacja vanilloidów skutkuje zmniejszeniem ilości neuropeptydów takich jak SP we włóknach C, co hamuje interakcję pomiędzy neuronami czuciowymi a mastocytami. Eksperymentalne miejscowe podanie kapsaicyny zapobiega powstawaniu świądu wywołanego histaminą. Kapsaicyna jest stosowana w terapii świądu w wielu chorobach skórnych, jak: świerzbieżka guzkowa, przewlekła neuropatia czuciowa, świąd odbytu, świąd związany z hemodializami i mocznicą.

Ponadto obecność kanałów TRPV1 została opisana na keratynocytach, mastocytach skórnych, komórkach dendrytycznych oraz komórkach mieszka włosowego. Co więcej, zaobserwowano znacznie zwiększoną ekspresję TRPV1 w keratynocytach u pacjentów ze świerzbieżką guzkową, która uległa normalizacji po leczeniu kapsaicyną (Steinhoff et al., 2006a).

Receptory: TRPV2, TRPV3, TRPV4.

Pierwotnie opisano rolę TRPV2, TRPV3 i TRPV4 w detekcji temperatury. W dalszych badaniach wykazano wzór ekspresji neuronalnej TRPV3 zbliżony do ekspresji TRPV1. Postuluje się, iż podjednostki TRPV3 mogą formować heteromultimeryczne struktury, poprzez interakcję z TRPV1 i w ten sposób modulować jego funkcję (Steinhoff et al., 2006a). U myszy, nieposiadających TRPV3 stwierdzono deficyty w odpowiedzi na temperatury zarówno nieszkodliwe jak i uszkadzające.

TRPV3 i TRPV4 również ulegają ekspresji na keratynocytach. Badania wykazały aktywację TRPV4 przez produkty peroksydacji lipidów, jak eikozanoidy, które wykazują również pruritogenne działanie mediowane przez TRPV1.

Ekspresja TRPV2 i TRPV4 została stwierdzona również na mastocytach. Co więcej, wykazano, iż termiczna i mechaniczna aktywacja TRPV2 na mastocytach skutkowałą degranulacją zależną od aktywności ścieżki sygnałowej kinazy proteinowej A (kluczowej w inicjacji sensytyzacji TRPV1) (Steinhoff et al., 2006a).

### 3.2.2.3 Rola nerwów skórnych w powstawaniu uczucia świądu

Skóra jest silnie unerwiona przez somatyczne nerwy czuciowe, pozazwojowe nerwy przywspółczulne cholinergiczne i nerwy pozazwojowe współczulne, które tworzą bogatą i złożoną sieć aferentno-eferentną. W obrębie skóry twarzy część włókien przywspółczulnych jest odpowiedzialnych za uczucie „czerwienienia się”. Neurony unerwiające skórę, oprócz klasycznych neurotransmiterów jak katecholaminy i acetylocholina produkują neuropeptydy takie jak: substancja P (SP), peptyd związany z genem kalcytoniny (CGRP), opioidy, kannabioidy (CB) i niektóre neurotrofiny: czynnik wzrostu nerwów (NGF) i neurotrofinę 4 (neurotrophin-4).

Niektóre podtypy niezmielinizowanych włókien C są obecne w naskórku. Tak więc jest możliwe bezpośrednie, wzajemne oddziaływanie neuromediatorów, keratynocytów i komórek Langerhansa. Jednym z potencjalnych mediatorów tych interakcji mogą być  $\beta$ -endorfiny. Z piśmiennictwa wiadomo, iż kannabioidy powodują uwalnianie  $\beta$ -endorfin z keratynocytów, co powoduje aktywację neuronów czuciowych i moduluje uczucie bólu. Tak więc zaburzenia w obrębie funkcji skóry (uraz, zmiany pH, infekcja, stan zapalny, promieniowanie UV) mogą w sposób bezpośredni lub pośredni stymulować zakończenia nerwowe i powodować uczucie świądu (Steinhoff et al., 2006a).

### 3.2.2.4 Rola naskórka w powstawaniu uczucia świądu.

Uczucie świądu może być wywołane poprzez zaburzenie funkcji barierowej skóry w stanach szczególnego wysuszenia skóry (xerosis), atopowym zapaleniu skóry, łuszczycy czy liszaju płaskim. W tym kontekście świąd prawdopodobnie nie jest związany z mastocytami. Naskórek jest unerwiony przez wolne zakończenia włókien nerwowych, anatomicznie związane z keratynocytami i komórkami Langerhansa. Najnowsze badania wykazały, że keratynocyty po stymulacji mogą uwalniać mediatory świądotwórcze oraz hamujące uczucie świądu takie jak: endovanilloidy, endorfiny, neuropeptydy, proteazy i cytokiny. Kanały jonowe, w tym kanały bramkowane napięciem, bramkowane ATP i TRPV mogą być bezpośrednio zaangażowane w przekazywanie sygnału świądu poprzez aktywację keratynocytów w stanie szczególnego wysuszenia skóry. Keratynocyty wykazują ekspresję receptorów dla neuropeptydów, neurotrofin (NGF, neurotrophin-4), kannabioidów, receptora PAR-2 (proteinase-activated receptor-2) i kanału jonowego TRPV1, które odgrywają rolę w wywoływaniu uczucia świądu (Steinhoff et al., 2006b). W literaturze można spotkać nawet stwierdzenie, iż naskórek jako całość wraz z wnikałymi w jego obręb wolnymi zakończeniami włókien nerwowych stanowi swoisty „receptor świądu” (Greaves, 2010).

### 3.2.2.5 Mastocyty.

Mastocyty pełnią wyjątkową rolę dzięki wydzielanym aktywnym biologicznie substancjom: specyficznym mediatorom magazynowanym w ziarnistościach zasadochłonnych oraz mediatorom wtórnym syntetyzowanym *de novo*.

Do mediatorów gromadzonych w ziarnistościach należą: histamina, proteoglikany (heparyna, siarczan chondroityny), obojętne proteazy (tryptaza, chymaza, karboksypeptydaza), metaloproteinazy (MMP-2, MMP-3 i MMP-9), peroksydaza, dysmutaza nadtlenkowa, kwaśne hydrolazy (arylosulfataza B,  $\beta$ -glukuronidaza,  $\beta$ -heksozaminidaza,  $\beta$ -galaktozydaza), elastaza, katepsyna G, kininogenaza, a także cytokiny: TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , interleukina 8 (IL-8, CXCL8), interleukiny IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-18, IL-31, TGF- $\beta$ , VEGF, bFGF. Mediatorami wtórnymi są: leukotrieny (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>), prostaglandyny (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>), tromboksan A<sub>2</sub>, czynnik aktywacji płytek krwi - PAF. Duża część tych mediatorów (histamina, tryptaza, IL-31, leukotrien LTB<sub>4</sub>) w sposób bezpośredni lub pośredni jest odpowiedzialna za powstanie uczucia świądu (Zawadzka et al., 2016).

#### 3.2.2.5.1 Mediatory świądu związane z mastocytami.

Od dawna znana była kluczowa rola mastocytów w wywoływaniu ostrego świądu na skutek ich degranulacji w przebiegu reakcji nadwrażliwości typu I. W przeszłości uważano, iż degranulacja mastocytów wynikająca z ich aktywacji poprzez przyłączenie przeciwciał klasy IgE i mostkowanie ich przez alergeny, ma charakter "wszystko albo nic". Obecnie wiadomo, że niektóre mediatory mogą być wydzielane przez mastocyty bez ich degranulacji i nawet substancje magazynowane w tego samego typu ziarnistościach mogą być uwalniane selektywnie (Steinhoff et al., 2006a). Poza histaminą do mediatorów biorących udział w wywoływaniu świądu, wydzielanych przez mastocyty należą: tryptaza, IL-31 oraz leukotrieny i prostaglandyny (Siiskonen & Harvima, 2019).

##### 3.2.2.5.1.1 Tryptaza i PAR-2

Tryptaza jest jedną z głównych proteaz wydzielanych przez mastocyty i wywołuje ona aktywację receptora PAR-2 obecnego nie tylko na włóknach nerwowych, ale także na leukocytach i samych mastocytach (co powoduje ich auto- i parakrynną aktywację). Opisano zwiększenie ilości mastocytów wykazujących ekspresję receptora PAR-2 w skórze chorych z łuszczycą (da Silva Carvalho, Nilsson, & Harvima, 2010). Pobudzenie receptora PAR-2 na powierzchni mastocytów powoduje uwrażliwienie receptora TRPV1 obecnego na samych mastocytach oraz czuciowych włóknach nerwowych i następowy wzrost wydzielania SP i CGRP (Amadesi et al., 2004). U pacjentów z atopowym zapaleniem skóry (AZS) w skórze zmienionej chorobowo stwierdzono obecność włókien nerwowych wykazujących silniejszą ekspresję PAR-2 z obecnością licznych mastocytów w ich bezpośrednim sąsiedztwie, w porównaniu do skóry zdrowej (Steinhoff, Neisius, et al., 2003).

##### 3.2.2.5.1.2 IL-31

IL-31 jest produkowana przez mastocyty oraz limfocyty T. Wykazano, że wywołuje ona uczucie lekkiego świądu z towarzyszącym rumieniem średnio po upływie 143 min po podaniu w formie punktowego testu skórniego (prick test), podczas gdy histamina powoduje świąd już po 5 min (Hawro et al., 2014). IL-31 wpływa również na wydłużanie i rozgałęzianie się włókien nerwowych (Feld et al., 2016). Dodatkowo histamina z IL-31 zwiększają wydzielanie mózgowego peptydu natriuretycznego (brain natriuretic peptide- BNP), który pobudza komórki dendrytyczne

i keratynocyty do produkcji cytokin i innych mediatorów stanu zapalnego i świądu (Meng et al., 2018).

#### 3.2.2.5.1.3 Leukotrieny i prostaglandyny

Śródskórne podanie leukotrienu B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) wywołuje uczucie świądu. Mastocyty poza produkcją LTB<sub>4</sub> posiadają również dla niego receptory (leukotriene receptors BLT<sub>1</sub>, BLT<sub>2</sub>). LTB<sub>4</sub> jest uwalniany także przez keratynocyty w odpowiedzi na aktywację receptora PAR-2 i bierze udział w kaskadzie reakcji powodujących świąd mediowanych przez SP i IL-31 (Siiskonen & Harvima, 2019). Z kolei prostaglandyna D<sub>2</sub> produkowana przez mastocyty zmniejsza uwalnianie histaminy i drapanie w modelu zwierzęcym (Hashimoto, Arai, Tanaka, & Nakaike, 2005).

#### 3.2.2.6 Neurogenne zapalenie: interakcja mastocyty- układ nerwowy- skóra

Najnowsze doniesienia wskazują na rolę nerwów skórnych w wywoływaniu, podtrzymywaniu i regulowaniu stanu zapalnego w skórze. Opisany, choć nie w pełni poznany, złożony model interakcji pomiędzy ośrodkowym i obwodowym układem nerwowym, układem odpornościowym, endokrynnym i niemal wszystkimi komórkami skóry został nazwany zapaleniem neurogennym. Nerwy skórne poprzez uwalnianie neuromediatorów oddziałują na keratynocyty, mastocyty, komórki Langerhansa, śródbłónki, fibroblasty i leukocyty. Te interakcje wpływają na wiele fizjologicznych i patofizjologicznych procesów takich jak wzrost i dojrzewanie komórek, reakcje naczyń ruchowe i reakcje nadwrażliwości, napływ leukocytów, świąd i gojenie. Istnieją też mechanizmy, które w warunkach fizjologicznych hamują odpowiedź na działanie neuropeptydów.

Wolne zakończenia włókien nerwowych mogą być aktywowane przez liczne mediatory stanu zapalnego (bradykinina, leukotrieny, tlenek azotu) oraz czynniki fizyczne jak ciepło. Neuromediatory uwalniane w wyniku aktywacji wolnych zakończeń nerwowych powodują rozwój i nasilenie stanu zapalnego poprzez poszerzenie arterioli (CGRP) i zwiększenie przepuszczalności ścian żyłek oraz aktywację mastocytów. Aktywowane mastocyty, poza licznymi mediatorami stanu zapalnego (histamina, serotonina, prostaglandyny) uwalniają tryptazę, która poprzez receptor PAR-2 pobudza wolne zakończenia nerwowe. Aktywacja receptora PAR-2 skutkuje nasileniem uwalniania SP i CGRP oraz obniżeniem progu pobudliwości dla receptorów TRP, co skutkuje powstaniem uczucia świądu i bólu. Z drugiej strony równocześnie istnieje wiele mechanizmów hamujących rozwój neurogennego zapalenia. Komórki posiadające receptory dla neuropeptydów posiadają również enzymy je degradujące takie jak obojętna endopeptydaza i enzym konwertujący angiotensynę. Także tryptaza uwalniana przez mastocyty powoduje rozkład CGRP. Prawdopodobnie niedobory enzymów degradujących neuropeptydy mogą prowadzić do rozwoju przewlekłego stanu zapalnego (Steinhoff, Ständer, et al., 2003).

#### 3.2.2.6.1 Rola mastocytów w zapaleniu neurogennym

Badania nad przewlekłymi chorobami skóry przebiegającymi ze świądem (łuszczyca, atopowe zapalenie skóry, pokrzywka) wskazują na istotną rolę mastocytów i ich współdziałanie z czuciowymi włóknami nerwowymi w wywoływaniu neurogennego zapalenia i prowadzeniu do przewlekłości objawów. Niektóre neuropeptydy wydzielane przez czuciowe neurony w skórze mogą aktywować mastocyty i powodować ich degranulację. Zalicza się do nich nerwowy czynnik wzrostu (nerve growth factor, NGF) działający przez receptor TrkA, substancję P (substance P, SP), peptyd pochodny genu kalcytoniny (calcitonin gene-related peptide, CGRP) i wazoaktywny peptyd jelitowy (vasoactive intestinal peptide, VIP) (Siiskonen & Harvima, 2019). W wyniku aktywacji neuropeptydami oprócz histaminy uwalniane są prozapalne cytokiny (TNF i IL-1 $\beta$ ),

co wskazuje na udział mastocytów w rozwoju i podtrzymaniu neurogennego stanu zapalnego w skórze. W badaniach nad przewlekłymi chorobami skóry przebiegającymi ze świądem (łuszczyca, atopowe zapalenie skóry, pokrzywka, świerzbączka guzkowa) wykazano nie tylko zwiększoną koncentrację mastocytów w zmienionej chorobowo skórze, ale również stwierdzono bliski kontakt pomiędzy SP-dodatnimi i CGRP-dodatnimi włóknami nerwowymi i mastocytami, co stanowi morfologiczny dowód na istnienie interakcji pomiędzy nerwami i mastocytami i ich rolę w patogenezie neurogennego stanu zapalnego (Siiskonen & Harvima, 2019).

Co więcej, w wyniku interakcji pomiędzy mastocytami a obwodowym układem nerwowym może dochodzić nie tylko do wywołania, ale także do wy tłumienia uczucia świądu. Ta nie w pełni udowodniona hipoteza opiera się o następujące przesłanki. Zostało wykazane, iż mastocyty uwalniają dużą ilość proteaz (tryptaza, chymaza, karboksypeptydaza A i katepsyna), które powodują degradację/inaktywację peptydów pruritogennych. Przykładowo, enzymy pochodzące z mastocytów hamują neurogeny stan zapalny w skórze poprzez rozkład SP, CGRP i VIP. Chymaza również pochodząca z mastocytów dezaktywuje endotelinę-1 (ET-1), neuropeptyd który indukuje uczucie świądu, pieczenia i bólu. Degradacja ET-1 przez chymazę wymaga wcześniejszej aktywacji mastocytów przez samą ET-1, która łączy się swoiście z receptorem na powierzchni mastocytów. Wydaje się więc, że kiedy dochodzi do uwolnienia ET-1 i wywołania uczucia świądu lub bólu jednocześnie dochodzi do inicjacji programu naprawczego, mającego na celu degradację ET-1 (Steinhoff et al., 2006a).

Część proteaz jest uwalniana przez mastocyty w sposób ciągły i nie wymaga ich wcześniejszej aktywacji, co pozwala na nieustanną regulację poziomu neuropeptydów na terenie skóry. Dodatkowo, mastocyty mogą przyczyniać się do hamowania neurogenego zapalenia i uczucia świądu poprzez regulację ekspresji tkankowej obojętnej endopeptydazy i enzymu konwertującego angiotensynę, dwóch metaloproteinaz cynkowych, które efektywnie kontrolują poziom neuropeptydów w skórze. Stwierdzono, że poziom tych dwóch metaloproteinaz wzrasta w odpowiedzi na różne czynniki prozapalne, produkowane przez mastocyty. Co więcej, te czynniki prozapalne, w szczególności czynnik martwicy guza  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) zmniejszają ekspresję receptorów dla SP i hormonu uwalniającego kortykotropinę (CRH). Tak więc mediatory uwalniane z mastocytów mogą ograniczać świąd w miejscu zapalenia poprzez eliminację neuropeptydów przez metaloproteinazy (Steinhoff et al., 2006a). Badania na myszach pozbawionych aktywności mastocytów (MC-deficient KitW/KitW-v mice) wykazały, że częstość i/lub czas trwania drapania w odpowiedzi na pruritogeny jest zbliżony lub nawet zwiększony u myszy pozbawionych aktywności mastocytów (Hayashi et al., 2001).

Wszystkie powyższe doniesienia silnie sugerują rolę mastocytów nie tylko w inicjacji, ale także terminacji uczucia świądu (Steinhoff et al., 2006a).



### 3.2.3 Świąd neuropatyczny

Świąd neuropatyczny dotyczy pierwotnie niezmienionej chorobowo skóry lub błony śluzowej i jest wynikiem uszkodzenia centralnego lub obwodowego układu nerwowego. Miejscowe objawy zapalne mogą mu towarzyszyć w przypadku neurogennego zapalenia lub w przypadku pojawienia się wtórnych zmian skórnych na skutek długotrwałego drapania. Obraz kliniczny i dystrybucja objawów zwykle zależą od lokalizacji uszkodzenia w układzie nerwowym (neuropatia drobnych włókien nerwowych, mono- lub oligoneuropatie). W centralnym systemie nerwowym każda zmiana obejmująca drogi przewodzenia świądu może skutkować wystąpieniem świądu neuropatycznego, nawet po upływie miesięcy czy lat, jak to ma miejsce w wypadku udaru. Świądowi neuropatycznemu może towarzyszyć ból neuropatyczny lub utrata czucia. Współwystępowanie bólu i świądu wydaje się paradoksalne (jako że w prawidłowym układzie nerwowym ból hamuje świąd) i świadczy o zaburzeniach w drogach przewodzenia tych odczuć. Utrata czucia w przebiegu neuropatii pojawia się późno i świadczy o nasilonym zaniku włókien nerwowych C. Diagnostyka świądu neuropatycznego opiera się o wywiad, badanie kliniczne, wykluczenie potencjalnych chorób skóry lub chorób systemowych przebiegających ze świądem i badania w kierunku typowych przyczyn takich jak cukrzyca czy półpasiec. Konieczne może być zastosowanie badań obrazowych układu nerwowego oraz elektromiografii (Steinhoff, Schmelz, Szabó, & Oaklander, 2018). Standardem w diagnostyce neuropatii drobnych włókien nerwowych stała się biopsja skóry z określeniem śródskórkowej gęstości włókien nerwowych (ŚGWN) (Lauria et al., 2010). Patofizjologiczne podłoże świądu neuropatycznego nie jest w pełni wyjaśnione. Opisano liczne obwodowe i centralne mechanizmy prowadzące do zaburzeń czucia w przebiegu neuropatii. Obwodową pierwotną przyczyną wydaje się być sensytyzacja, czyli uwrażliwienie włókien nerwowych polegające na spontanicznym powstawaniu potencjałów czynnościowych, zmniejszeniu progu pobudzenia oraz nadmiernej odpowiedzi na bodźce w uszkodzonych skórnych włóknach nerwowych C. Opisano rolę receptorów TRP i kanałów sodowych bramkowanych napięciem w procesie sensytyzacji włókien nerwowych. Leukocyty gromadzące się w miejscu uszkodzenia wydzielają liczne cytokiny zapalne (NO, ATP, prostaglandyny), które przyczyniają się do uwrażliwienia włókien nerwowych i nasilenia obrzęku tkanki, który może prowadzić do dalszego uszkodzenia nerwów. Komórki Schwanna wydzielają NGF oraz metaloproteiny, które pośrednio przyczyniają się do nasilenia tego procesu (Rosenberger, Blechschmidt, Timmerman, Wolff, & Treede, 2020). Także niektóre mediatory stanu zapalnego biorące udział w neuropatiach takie jak katepsyna S czy IL-31 są wydzielane przez degenerujące włókna nerwowe i mogą pobudzać receptory świądu. Niewykluczone jest więc, że u podłoża świądu neuropatycznego leżą również podobne mechanizmy jak w przypadku zapalnych chorób skóry (Steinhoff et al., 2018).

### 3.2.4 Leczenie świądu

W każdym przypadku leczenie świądu powinno być ukierunkowane na leczenie jego podstawowej przyczyny. Dostępne są liczne opcje nefarmakologiczne oraz farmakologiczne stosowane miejscowo i ogólnie. Do metod nefarmakologicznych zalicza się częste nawilżanie i chłodzenie skóry, unikanie czynników drażniących, terapię behawioralną i redukcję stresu. W leczeniu miejscowym stosuje się glikokortykosteroidy, inhibitory kalcyneuryny, mentol, kapsaicynę i doksepinę, a systemowo leki przeciwhistaminowe, antagonistów opioidowego receptora  $\mu$ , agonistów opioidowego receptora  $\kappa$ , leki przeciwdepresyjne, przeciwpadaczkowe, immunosupresyjne, glikokortykosteroidy (Nowak & Yeung, 2017).

W leczeniu świądu neuropatycznego nie ma jednoznacznych rekomendacji i odbywa się ono w oparciu o doświadczenie i wytyczne dla leczenia bólu neuropatycznego (lidokaina stosowana powierzchniowo lub nasiękowo w blokadach, leki przeciwpadaczkowe, przeciwdepresyjne i opioidy). Stosuje się również maści z małymi dawkami kapsaicyny lub podskórne zastrzyki z toksyny botulinowej A. Leki przeciwhistaminowe są w większości przypadków nieskuteczne, ale ich uspokajające działanie może mieć korzystny wpływ na sen i zredukować nocne drapanie i stany zapalne skóry. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku stosowanych miejscowo glikokortykosteroidów, które chociaż są nieskuteczne w leczeniu pierwotnych przyczyn neuropatii, mogą hamować wtórne stany zapalne. Większość opisanych metod terapeutycznych była stosowana w badaniach klinicznych na niewielkiej grupie pacjentów i potrzebne są duże, wielośrodkowe badania, które mogłyby określić ich skuteczność i zaowocować algorytmami terapeutycznymi (Steinhoff et al., 2018).

Wraz z postępem wiedzy na temat patofizjologii świądu opracowane zostały nowe związki chemiczne których przydatność jest obecnie sprawdzana w trwających badaniach klinicznych. Do związków tych zalicza się antagonistów opioidowego receptora  $\mu$ , agonistów opioidowego receptora  $\kappa$ , antagonistów receptora PAR, antagonistów receptora endoteliny A, antagonistów receptora cytokin, inhibitorów kinaz janusowych i inhibitorów kinazy receptora tropomiozyny (Steinhoff et al., 2018).

### 3.3 Neuropatia drobnych włókien nerwowych jako potencjalny element patofizjologii liszaja twardzinowego

Neuropatia drobnych włókien nerwowych (NDWN) jest definiowana jako uszkodzenie najmniejszych włókien nerwowych: zmielinizowanych włókien A-delta i niezmielinizowanych włókien C. Choroba ta wiąże się z występowaniem zaburzeń czucia i zaburzeń układu autonomicznego, które mogą znacząco obniżać jakość życia. Dokładna częstość występowania nie jest znana, ale najnowsze doniesienia z Holandii mówią o 12 nowych przypadkach na 100 000 mieszkańców i zachorowalności na poziomie 53 chorych na 100 000 mieszkańców (Basantsova et al., 2019).

Najczęstszą przyczyną NDWN jest cukrzyca typu 2 i nietolerancja glukozy. Obserwuje się ją też w przebiegu chorób autoimmunologicznych (zespół Sjögrena, celiakia, toczeń trzewny), w zespołach paraneoplazmatycznych, sarkoidozie, infekcjach (HIV, HCV, borelioza i trąd), uszkodzeniach polekowych (metronidazol, nitrofurantoina, linezolid, bortezomib, statyny i inhibitory TNF- $\alpha$ ), poalkoholowych i w zatruciu talem. Występowanie NDWN zostało opisane też w przebiegu chorób uwarunkowanych genetycznie, jak w mutacjach w zakresie kanałów sodowych, chorobie Fabry'ego, Pompego czy Ehlersa-Danlosa. Pomimo rosnących możliwości diagnostycznych nawet do 50% przypadków NDWN ma charakter idiopatyczny.

Typowymi objawami klinicznymi są zaburzenia czucia, którym mogą towarzyszyć zaburzenia ze strony autonomicznego układu nerwowego. NDWN może też występować pod postacią izolowanych objawów ze strony autonomicznego układu nerwowego. Chorzy skarżą się głównie na uczucie mrowienia i drętwienia, przeczulicę, piekący ból i świąd, przeważnie w dystalnych częściach kończyn. Dla NDWN charakterystyczna jest manifestacja powyższych objawów w sposób symetryczny i obustronny w dystalnych częściach kończyn i stopniowe powiększanie się zajętego obszaru w kierunku proksymalnym (length-dependent pattern). Najczęstszymi zaburzeniami ze strony układu autonomicznego są zaburzenia potliwości, uczucie suchości w ustach, przebarwienia skórne oraz spowolniona motoryka w przewodzie pokarmowym i drogach moczowych.

Diagnostyka NDWN opiera się o wywiad i historię choroby pacjenta. Dostępne są skale opisujące natężenie poszczególnych objawów. Od 2010 roku „złotym standardem” w diagnostyce NDWN stała się biopsja skóry z barwieniem immunofluorescencyjnym lub immunohistochemicznym z przeciwciałem PGP 9.5 w celu wyznakowania włókien nerwowych i oszacowania śródnaskórkowej gęstości włókien nerwowych-ŚGWN (intraepidermal nerve fiber density-INFD) (Lauria et al., 2010). Definiuje się ją jako ilość włókien nerwowych przekraczających granicę skórno-naskórkową w przeliczeniu na 1mm długości granicy skórno-naskórkowej. U chorych z NDWN liczba nerwów śródnaskórkowych jest znacząco zmniejszona w stosunku do wartości referencyjnych zależnych od płci i wieku. Biopsję typowo wykonuje się na podudziu nad kostką boczną. Szacuje się, że powyższa metoda charakteryzuje się czułością i swoistością metody pomiędzy 88-92% (Basantsova et al., 2019).

### 3.4 Śródnaskórkowa gęstość włókien nerwowych w chorobach skóry.

W ostatnich latach biopsja skóry z oceną ŚGWN stała się najważniejszym narzędziem w diagnostyce różnicowej przewlekłego świądu. Obniżenie gęstości nerwów śródnaskórkowych w stosunku do wartości referencyjnych dla płci i wieku, w łączności ze zgodnymi danymi klinicznymi pozwala na rozpoznanie neuropatii drobnych włókien nerwowych, która może być wynikiem wielu stanów chorobowych wymienionych wcześniej (Pereira et al., 2016). Należy jednak pamiętać, iż zmniejszenie ilości drobnych włókien nerwowych w obrębie naskórka jest obserwowane nie tylko w przebiegu NDWN, ale również w przebiegu neuropatii mieszanych (związanych z uszkodzeniem drobnych i dużych włókien nerwowych) oraz w sytuacji przewlekłego ucisku na nerw (Dellon, 2015). Opisano również zmniejszenie ŚGWN wywołane samym drapaniem, co dodatkowo utrudnia interpretację wyniku badania u chorych z przewlekłym świądem (Pereira et al., 2016).

W badaniach klinicznych ten wystandaryzowany parametr może służyć do opisu zmian w mikrounerwieniu w przebiegu innych chorób, w szczególności chorób skóry przebiegających ze świądem. Opisano zmniejszenie ŚGWN u chorych ze świerzbiączką guzkową, co najprawdopodobniej jest związane z przewlekłym drapaniem, gdyż dalsze badania u tych chorych nie potwierdziły uszkodzenia włókien nerwowych (Pereira et al., 2017). Z kolei u chorych z łuszczycą (Szepietowski & Reich, 2016) i atopowym zapaleniem skóry (Tominaga & Takamori, 2014a) zaobserwowano zwiększoną gęstość nerwów śródnaskórkowych, która jest skutkiem neurogenego zapalenia i przypuszczalnie odpowiada za obniżenie progu wrażliwości na czynniki świądotwórcze.

### 3.5 Unerwienie sromu

Unerwienie czuciowe przedniej części warg sromowych większych pochodzi z nerwu biodrowo-pachwinowego (ze splotu lędźwiowego) przez nerwy wargowe przednie, części tylnej z nerwu sromowego przez nerwy wargowe tylne oraz z gałęzi kroczykowych nerwu skórniego tylnego uda. Oprócz tego do warg sromowych większych dochodzi gałąź płciowa nerwu płciowo udowego ze splotu lędźwiowego. Łechtaczka otrzymuje odrębny nerw grzbietowy łechtaczki z nerwu sromowego (Bochenek & Reicher, 1998). Wargi sromowe mniejsze są zaopatrzone w obfite sploty nerwowe, których zakończenia w części tworzą w skórze specjalne ciała dotykowe- Vatera-Pacinięgo i Meissnera (Schober, Cooney, Pfaff, Mayoglou, & Martín-Alguacil, 2010). Niektórzy podają, że również część końcową pochwy w pobliżu jej ujścia do przedsionka zaopatrują gałązki czuciowe nerwu sromowego. Unerwienie autonomiczne sromu pochodzi ze splotu podbrzusznego dolnego poprzez nerwy jamiste łechtaczki (Bochenek & Reicher, 1998).

W literaturze można znaleźć opis unerwienia warg sromowych mniejszych dotyczący obecności i kształtu wolnych zakończeń nerwowych w skórze (Schober, Aardsma, Mayoglou, Pfaff, & Martín-Alguacil, 2015). Autorzy cytowanego badania wspominają również o obecności drobnych włókien nerwowych w obrębie wszystkich warstw naskórka oraz o obecności ciałek dotykowych Vatera-Pacinięgo i Meissnera na terenie skóry warg sromowych mniejszych. Badanie to zostało przeprowadzone na grupie 10 dziewczynek w wieku od 1 roku do 9 lat i miało charakter wyłącznie opisowy. Istnieje doniesienie na temat obecności w naskórku warg sromowych mniejszych ciałek przypominających ciała Pacinięgo (Pacinian-like corpuscule) (Martín-Alguacil et al., 2011). Zbudowane są one z wypustki komórki nerwowej otoczonej przez rdzeń wewnętrzny, zewnętrzny, torebkę zewnętrzną i łącznotkankowe podścielisko. Na terenie wymienionych struktur szczegółowo opisano ekspresję PGP 9.5, VIP, neuropeptydu Y (NPY), neuroswoistej enolazy (neuron-specific enolase), transportera 5-hydroksytryptaminy (5-hydroxytryptamine transporter -5HTT), receptora 5-hydroksytryptaminy (5-hydroxytryptamine receptor 1A- 5HT1A), neuronalnej syntazy tlenku azotu (neuronal nitric oxide synthase -nNOS), i receptorów estrogenowych  $\alpha$  i  $\beta$  (estrogen receptors ER  $\alpha$ ,  $\beta$ ).

W badaniach neuroanatomicznych okolic żeńskich narządów płciowych zewnętrznych wykorzystywano metody immunohistochemiczne w celu identyfikacji poszczególnych neurotransmiterów na terenie włókien nerwowych. W tkankach pochwy zidentyfikowano włókna nerwowe zawierające neuropeptyd Y (neuropeptide Y-NPY), VIP, CGRP, SP i syntazę tlenku azotu (NO synthase, NOS). Włókna nerwowe zawierające VIP znajdują się także na wargach sromowych i w łechtaczce. Dalsze badania wykazały koekspresję VIP i neuropeptydu Y w nerwach na terenie ciał jamistych oraz koekspresję SP i CGRP na terenie żołądźci łechtaczki (Martín-Alguacil, Schober, Kow, & Pfaff, 2006).

Ostatnio w literaturze pojawiły się szczegółowe opisy gęstości unerwienia i wariantów anatomicznych przebiegu nerwu grzbietowego łechtaczki, co ma istotne znaczenie w planowaniu zabiegów operacyjnych w obrębie sromu i prewencji jego uszkodzenia. Przerwanie ciągłości nerwu lub jego odgałęzień może prowadzić do utraty czucia, przewlekłego bólu i zaburzeń funkcji seksualnych. W cytowanym badaniu mierzono również gęstość nerwów w obrębie trzonu i żołądźci łechtaczki oraz warg sromowych mniejszych, znakowanych immunohistochemicznie  $\beta$ III tubuliną. Gęstość nerwów określano jako procent powierzchni przekroju zajmowanego przez wyznaczoną tkankę nerwową. Badanie wykazało zwiększoną gęstość włókien nerwowych w grzbietowej części trzonu łechtaczki w porównaniu do jej części brzusznej. Stwierdzono również większą gęstość nerwów w dystalnej części warg sromowych mniejszych w porównaniu do ich części proksymalnych, która choć nieistotna statystycznie jest wspomniana również w innych badaniach i ma wpływ na planowanie zakresu zabiegu operacyjnego (Jackson et al., 2019). Również

w starszych badaniach gęstość nerwów w obrębie warg sromowych mniejszych była określana jako ilość włókien nerwowych na mm<sup>2</sup> powierzchni wycinka (Kelishadi et al., 2016).

W literaturze przedmiotu nie ma wielu prac dotyczących neuroanatomii sromu, z charakterystyką poszczególnych włókien nerwowych i poszczególnych lokalizacji. Brak jest szczegółowych opisów gęstości unerwienia tkanek sromu, w warunkach prawidłowych, w zależności od szczegółowej topografii, wieku pacjentki itp. Tym bardziej skąpe są dane dotyczące ŚGWN, zwłaszcza u kobiet zdrowych.

### 3.5.1 Zmiany w unerwieniu sromu w różnych jednostkach chorobowych

W badaniu wycinków histologicznych pobranych z przedsionka pochwy od pacjentek cierpiących na vestibulodynię (silny ból wywołany dotykiem lub naciskiem na przedsionek pochwy, bez innej przyczyny) stwierdzono znaczący wzrost gęstości śródskórkowych włókien nerwowych, w porównaniu do tkanek prawidłowych. Ponieważ w wielu badaniach u pacjentek z vestibulodynią opisano obniżenie progu pobudzenia dla dotyku oraz czucia bólu i temperatury autory stawiają hipotezę, że przyczyną nasilonych objawów czuciowych może być zwiększenie gęstości włókien nerwowych bogatych w receptory, które ulegają nadmiernemu pobudzeniu (Tomola et al., 2016). We wcześniejszych badaniach nad podłożem vulvodynii (przewlekłym bólem sromu bez uchwytnej przyczyny) szeroko rozważane było neuropatyczne podłoże objawów z uwzględnieniem uszkodzeń układu nerwowego powstałych na skutek wcześniejszych procesów chorobowych (stan zapalny, mechanizmy neuropatyczne jak hiperplazja włókien nerwowych, obwodowe i centralne zaburzenia czucia bólu, nieprawidłowe wydzielanie neurotransmiterów i neuropeptydów oraz zajęcie sąsiadujących struktur anatomicznych). Uczucie bólu może być wynikiem obwodowej sensytyzacji w skórze, centralnej sensytyzacji w rdzeniu kręgowym lub kombinacji obu wymienionych mechanizmów. U podłoża obwodowej sensytyzacji może leżeć proces zapalny w skórze, skutkujący wydzielaniem cytokin i nerwowych czynników wzrostu, które powodują (odpowiednio): uwrażliwienie receptorów bólowych i wzrost ilości włókien nerwowych i nocycceptorów. Dodatkowo stale uwrażliwiane włókna czuciowe mogą rozwinąć nieprawidłowe mechanizmy neurosekrecji, skutkujące przetrwałym uczuciem bólu. Centralna sensytyzacja polega na wzroście pobudliwości neuronów w centralnym systemie nerwowym, co powoduje powstanie nieprawidłowej odpowiedzi po zadziałaniu typowego bodźca. Przedłużona aktywacja nerwów w zwojach grzbietowych może prowadzić do przewlekłego uwalniania substancji neuroaktywnych i reorganizacji funkcjonalnej rogów grzbietowych w rdzeniu kręgowym co skutkuje zaburzeniami w przewodzeniu czucia bólu. Mechanizmy sensytyzacji obwodowej i centralnej wydają się być odpowiedzialne za przewlekły charakter objawów, utrzymujących się pomimo ustania czynnika wywołującego (Ventolini, 2013).

Rolą biopsji skóry w diagnostyce vulvodynii jest przede wszystkim znalezienie uchwytnej przyczyn objawów, jako że diagnoza vulvodynii jest zasadniczo diagnozą z wykluczenia. W badaniu klinicznym obejmującym 90 kobiet z vulvodynią które nie zareagowały na leczenie empiryczne biopsja skóry pozwoliła u 55 z nich (61%) na zdiagnozowanie konkretnej jednostki chorobowej odpowiedzialnej za wystąpienie objawów. W malejącej częstości występowania były to: liszaj twardzinowy, alergiczne zapalenie skóry, liszaj płaski, zapalenie Zoono, łuszczyca, śródnabłonkowa neoplazja i mikroinwazyjny rak płaskonabłonkowy, pozasutkowa choroba Pageta oraz infekcje bakteryjne i grzybicze (Bowen et al., 2008).

W momencie rozpoczęcia niniejszego badania w literaturze przedmiotu nie znaleziono doniesień na temat zmian w unerwieniu tkanek sromu w przebiegu liszaja twardzinowego. Częściowe wyniki niniejszego badania dotyczące zmian w gęstości unerwienia tkanek sromu zmienionych w

przebiegu liszaja twardzinowego w porównaniu do prawidłowych tkanek sromu zostały opublikowane (Milian-Ciesielska et al., 2017).

### 3.6 Uzasadnienie wyboru tematu

LT sromu jest stosunkowo częstą chorobą zapalną skóry, która może prowadzić do powstania zmian bliznowatych, znacznego obniżenia jakości życia wynikającego z uporczywości objawów czuciowych i jest związana ze zwiększonym ryzykiem rozwoju raka płaskonabłonkowego. Choć częstość występowania LT sromu w oparciu o praktykę ginekologiczną określa się na poziomie ok. 2%, wydaje się, że jest ona niedoszacowana. Najnowsze doniesienia opisują dwukrotny wzrost liczby zdiagnozowanych przypadków na przestrzeni 10 lat co może mieć związek z większą znajomością choroby i wzrostem ilości badań histopatologicznych prowadzących do postawienia diagnozy (Krapf et al., 2020). W badaniach nad patogenezą LT sromu zwracają uwagę czynniki genetyczne, autoimmunologiczne i hormonalne chociaż ich dokładne znaczenie i wzajemne relacje nie zostały dostatecznie wyjaśnione. Natomiast według wiedzy autorki w literaturze nie istnieją szczegółowe doniesienia dotyczące patogenyzy objawów czuciowych LT.

Symptomatologia LT sromu (np. uporczywy świąd) oraz obecność zmian troficznych w miejscach zmienionych chorobowo, sugerują możliwość występowania mechanizmów neurogennych w patogenezie objawów. Najnowsze badania z zakresu dystrybucji mikrounerwienia na terenie skóry i błon śluzowych w wielu jednostkach chorobowych wskazują na związek zmian morfologicznych w mikrounerwieniu z objawami klinicznymi. Ostatnie doniesienia na temat roli mechanizmów neurogennych i neurotroficznych w rozwoju i ustępowaniu stanu zapalnego oraz na temat patogenyzy zaburzeń czuciowych takich jak świąd i pieczenie niosą szansę na opracowanie nowych, przyczynowych metod leczenia. Rola czynników neurogennych w powstawaniu objawów LT nie została dotychczas poznana. Dzięki zastosowaniu metod immunohistochemicznych jest możliwa szczegółowa ocena zarówno ilościowa jak i jakościowa mikrounerwienia (charakter włókien nerwowych, typ receptorów itp.) sromu i jego zmian w przebiegu LT, co może rzucić światło na stopień zaangażowania i rolę czynników neurogennych w patogenezie objawów tej choroby. Uzyskana w ten sposób wiedza ma szansę zaowocować wskazówkami dotyczącymi nowych sposobów farmakoterapii LT.



## 4 Cel pracy

Głównym celem pracy było sprawdzenie czy w tkankach sromu zmienionych w przebiegu LT występują zmiany w mikrounerwieniu, różnice w ekspresji neuropeptydów, receptorów świądu, markera regeneracji nerwów i ilości mastocytów w porównaniu do prawidłowych tkanek sromu.

Szczegółowymi celami badawczymi były:

1. Zbadanie zmian w mikrounerwieniu (gęstości i typu unerwienia) tkanek sromu zmienionych w przebiegu LT w porównaniu do niezmiennych tkanek sromu z użyciem adaptowanego protokołu liczenia ŚGWN dla NDWN.
2. Zbadanie zmian ekspresji markera regeneracji nerwów (GAP 43), pruriceptorów (PAR-2, opioid receptor  $\mu$ ) i zmian ilości mastocytów w tkankach sromu w przypadkach LT w porównaniu do tkanek niezmiennych.
3. Określenie relacji wyżej opisanych zmian do podstawowych danych klinicznych, stopnia zaawansowania schorzenia i wieku pacjentek.
4. W oparciu o uzyskane wyniki oraz dane z piśmiennictwa, analiza perspektyw nowych możliwości terapeutycznych w leczeniu LT sromu, wykorzystujących wiedzę na temat lokalnych czynników neurogennych, w rozwoju zmian chorobowych.

## 5 Wybrane zagadnienia metodologiczne

Badanie zostało wykonane w Katedrze Patomorfologii UJ CM, w Zakładzie Patomorfologii Klinicznej i Doświadczalnej oraz w Zakładzie Neuropatologii. Środki finansowe pozwalające na realizację badania pochodziły z projektów statutowych nr K/ZDS/005739 i K/DSC/003594. Badanie zostało objęte zgodą komisji bioetycznej.

### 5.1 Wybór grupy badawczej i grupy kontrolnej.

Materiał badawczy stanowią zarchiwizowane w Katedrze Patomorfologii UJ CM utrwalone w formalinie zatopione w parafinie wycinki ze skóry sromu spełniające poniższe kryteria włączenia i wyłączenia dla grupy badanej i grupy kontrolnej. Do badania zostały zakwalifikowane preparaty histologiczne LT sromu (20 przypadków) oraz została wyłoniona grupa kontrolna (20 przypadków) wycinków pochodzących z niezmięnionej patologicznie skóry sromu, z sąsiedztwa przysyłanych do badania histopatologicznego łagodnych zmian skórnych (acrochordon, znamie barwnikowe), usuniętych z szerokim marginesem otaczających tkanek. W tabeli nr 1 zestawiono kryteria włączenia i wyłączenia przypadków do obu badanych grup. Wycinki skóry sromu zostały pobrane w poradniach ginekologicznych i dermatologicznych współpracujących z Katedrą Patomorfologii w zakresie diagnostyki histopatologicznej. Zgodnie z opinią komisji bioetycznej, w przypadkach badań na tkankach ludzkich pobranych do weryfikacji histopatologicznej w procesie diagnostycznym, nie jest wymagana zgoda pacjentów na udział w badaniach.

#### Kryteria włączenia

Grupa kliniczna	Grupa kontrolna
Wycinek ze skóry sromu z postawioną histopatologicznie diagnozą LT sromu	Wycinek ze skóry sromu niezmięnionej chorobowo lub wycinek ze skóry sromu niezmięnionej chorobowo pochodzący z sąsiedztwa łagodnej zmiany nowotworowej lub rozrostowej.
Pierwszy pobrany od danej pacjentki wycinek, z którego postawiono diagnozę LT sromu	Długość wycinka min 2mm
Długość wycinka min 2mm	Wiek $\geq$ 25 lat
Wiek $\geq$ 25 lat	Diagnoza od 2005
Diagnoza od 2005	

#### Kryteria wyłączenia

Grupa kliniczna	Grupa kontrolna
Obecność na terenie wycinka innych dodatkowych schorzeń dermatologicznych, cech infekcji lub dysplazji nabłonka	Nieodpowiednia do oceny jakości wycinka
Nieodpowiednia do oceny jakości wycinka	Brak podstawowych danych klinicznych
Brak podstawowych danych klinicznych	

Tabela 1. Zestawienie kryteriów włączenia i wyłączenia wycinków skórnych do grupy klinicznej i kontrolnej

W grupie klinicznej wiek pacjentek wynosił pomiędzy 34 a 76 lat (średnio 62 lata) a w grupie kontrolnej pomiędzy 29–77 lat (średnio 53 lata). Wszystkie przypadki były diagnozowane w latach 2006-2014.

## 5.2 Dobór technik i metod badawczych

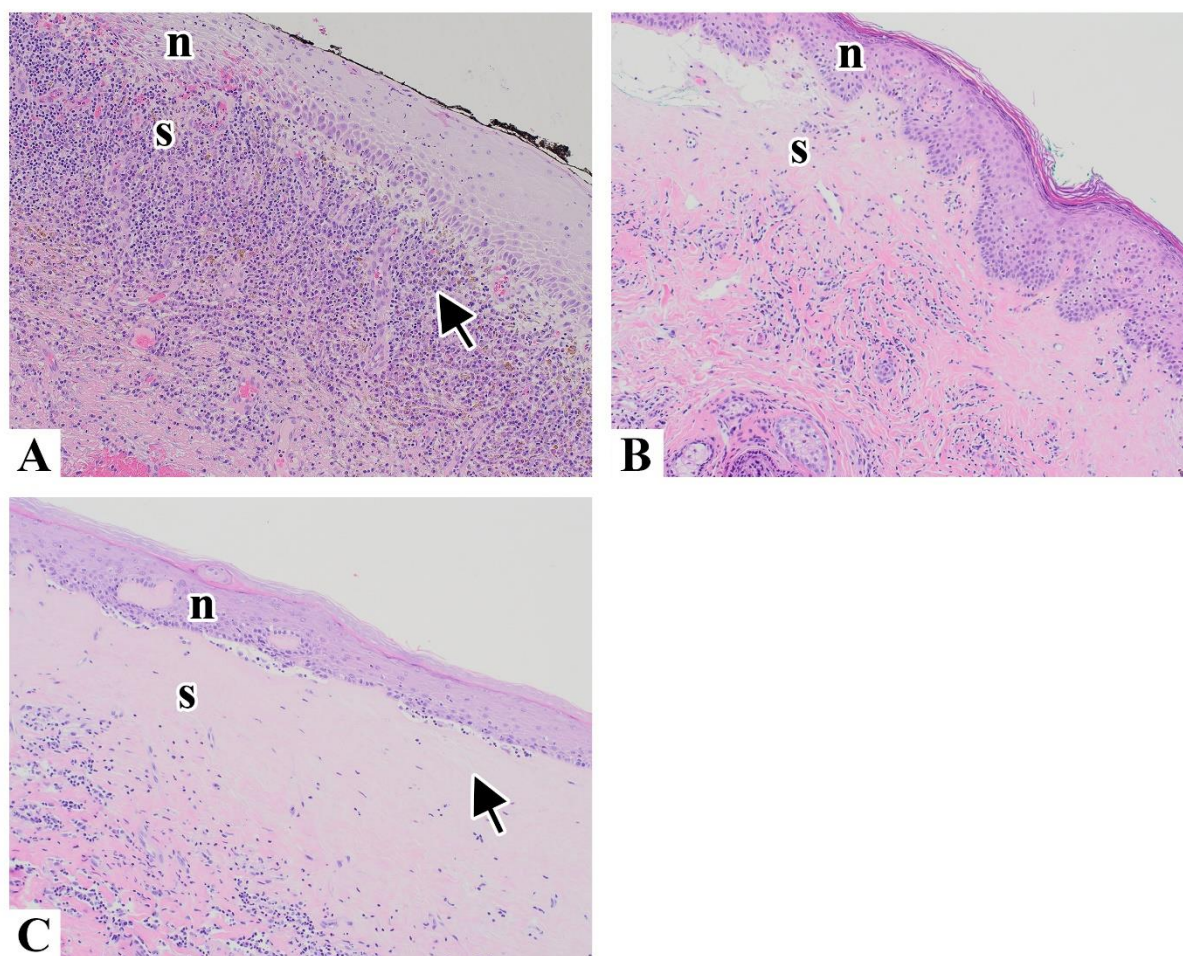
Badania zostały przeprowadzone z zastosowaniem metod i technik badawczych powszechnie wykorzystywanych w naukach medycznych. Do najważniejszych należały:

### 5.2.1 Badania histopatologiczne

Wyłonione przypadki (łącznie 40 bloczków parafinowych) zostały ponownie skrojone na cienkie skrawki (grubości 3  $\mu$ ), zabarwione hematoksyliną i eozyną i poddane ponownej szczegółowej analizie histologicznej (z uwzględnieniem ilości i składu nacieku zapalnego, stopnia homogenizacji kolagenu w skórze właściwej, atypii nabłonka). Ponadto analizowane przypadki LT zostały zakwalifikowane, do jednego z trzech etapów zaawansowania choroby (zob. niżej).

Ponieważ nie istnieje jednolity system określania stopnia zaawansowania LT sromu, w oparciu o dostępny w literaturze histologiczny opis choroby, arbitralnie opracowano skalę histologicznego zaawansowania schorzenia (faza wczesna, pośrednia i późna).

Na wczesnym etapie choroby w obrazie histologicznym dominuje nasilona hiperkeratoza i obfity liszajowaty, limfocytny naciek zapalny na granicy skórno-naskórkowej. Pośredni etap choroby charakteryzuje się hiperkeratozą, początkami homogenizacji włókien kolagenowych w skórze właściwej i mniej nasilonym limfocytnym naciekiem zapalnym, obecnym głównie w skórze właściwej. W zaawansowanych przypadkach liszaja twardzinowego stwierdza się nasiloną homogenizację kolagenu w skórze właściwej, atrofię naskórka z wygładzeniem brodawek skórnych i wypłaszczenie granicy skórno-naskórkowej (rycina nr 1).



Ryc.1. Liszaj twardzinowy sromu

(A) Etap wczesny z widocznym obfitym liszajowatym naciekiem na granicy skórno-naskórkowej (strzałka).

(B) Etap pośredni z niewielkim naciekiem i początkami homogenizacji kolagenu w skórze.

(C) Etap zaawansowany z grubym pasmem zhomogenizowanego kolagenu w skórze (strzałka).

Barwienie HE, powiększenie 100x.

Według powyższych kryteriów w badanym zbiorze chorych z LT 6 przypadków odpowiadało stopniowi wczesnemu liszaja twardzinowego, 9 pośredniemu i 5 późnemu (tabela nr 2).

	Liczba pacjentek	Wiek pacjentek
<i>Liszaj twardzinowy</i>	20	34-76
<i>Wczesny stopień zaawansowania</i>	6	54-72
<i>Pośredni stopień zaawansowania</i>	9	34-68
<i>Późny stopień zaawansowania</i>	5	50-76
<i>Kontrola</i>	20	29-77

Tabela 2. Zestawienie liczebności i wieku pacjentek w badanych grupach

## 5.2.2 Badania immunohistochemiczne

Tabela nr 3 zawiera zestawienie klonów przeciwciał użytych w badaniu, wraz z podstawowymi danymi z protokołów barwienia.

Przeciwciało	Nr katalogowy	Rodzaj, pochodzenie przeciwciała	Producent	Rozcieńczenie przeciwciała	Czas inkubacji z przeciwciałem	Odmaskowanie
PGP 9.5	PA0291 Clone: 10A1	Monoklonalne	NovocastraTM,	1:50	60 min	EDTA 20 min
VIP	sc-25347 Clone: H-6	Monoklonalne mysie	Santa Cruz Biotechnology	1:50	30 min	EDTA 20 min
CGRP	Ab54274	Poliklonalne królicze	Abcam Cambridge UK	1:100	24h w temp. 4°C st.	Bufor cytrynianowy 20 min
GAP -43	Sc-33705 Clone: 7B10	Monoklonalne mysie	Santa Cruz Biotechnology	1:50	30 min	EDTA 30 min
Anti Opioid receptor	Ab134054 Clone: UMB3	Monoklonalne królicze	Abcam Cambridge UK	1:50	60 min	EDTA 20 min
PAR2	Ab138479	Poliklonalne królicze	Abcam Cambridge UK	1:50	24h w temp. 4°C	Bufor cytrynianowy 35 min
Tryptaza	PA0019 Clone: 10D11	Monoklonalne mysie	Leica biosystem	Ready to use	30 min	EDTA 30 min

Tabela 3. Zestawienie przeciwciał immunohistochemicznych użytych w badaniu

### 5.2.2.1 Markery wolnych zakończeń nerwowych: PGP 9.5, VIP, CGRP.

Na wyłonionym materiale zostały wykonane odczyny immunohistochemiczne w kierunku oceny ilościowej i jakościowej mikrounerwienia z użyciem markerów wolnych zakończeń nerwowych: PGP-9.5, VIP, CGRP. Przeciwciała PGP 9.5 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-1, UCH-L1) jest powszechnie używanym markerem drobnych włókien nerwowych, zalecanym w protokole oceny ŚGWN (Lauria et al., 2010). W danych z piśmiennictwa wiadomo, że skórne włókna nerwowe wykazują ekspresję VIP i CGRP (Dalsgaard et al., 1989) również w obrębie żeńskich zewnętrznych narządów płciowych (Martin-Alguacil et al., 2006). Do oceny gęstości ŚGWN zastosowano własny protokół oparty koncepcyjnie na protokole do diagnostyki NDWN, opisany w dalszej części rozdziału.

#### 5.2.2.1.1 Protokół barwienia

Z zakwalifikowanych do badania bloczków parafinowych wykonano cienkie skrawki, grubości 3µm. Na potrzeby barwienia w kierunku PGP 9.5 zabezpieczono 3 seryjne przekroje. Po rutynowym odparafinowaniu i uwodnieniu skrawków aktywność endogennej peroksydazy została zablokowana poprzez zanurzenie przez 20 min w temperaturze pokojowej w świeżo przygotowanym roztworze 3% nadtlenu wodoru na metanolu. W celu odmaskowania antygenów preparaty umieszczono w buforach: EDTA o pH 9,0 dla barwienia PGP 9.5 i VIP oraz w buforze cytrynianowym o pH6,0 dla CGRP, a następnie zastosowano ogrzewanie mikrofalami przez 20 min. Do barwień immunohistochemicznych użyto następujących przeciwciał: PGP 9.5 (klon 10A1, Novocastra™, rozcieńczenie 1:50, czas inkubacji 1 godzina), VIP (klon H-6, Santa Cruz - sc-25347 mouse monoclonal antibody - rozcieńczenie 1:50, czas inkubacji 30 min w temperaturze pokojowej), CGRP (abcam ab54274 - rabbit polyclonal – rozcieńczenie 1:100, czas inkubacji 24 godziny, przez noc w temperaturze 4 – 8°C). Następnie skrawki przepłukano buforem TRIS, zastosowano system detekcji LabVision (Thermo Fisher Scientific, USA) z chromogenem DAB (3,3'- diaminobenzidine) i zabarwiono hematoksyliną. W kontroli jakości wykonana barwienie kontrolne pozytywne i negatywne zalecane przez producentów.

#### 5.2.2.2 Markery pruriceptorów: PAR-2, opioid receptor $\mu$ .

Ekspresję receptora PAR-2 opisano w skórze na keratynocytach, fibroblastach, komórkach śródbłonna, zakończeniach aferentnych włókien nerwowych i leukocytach (eozynofile, limfocyty T, neutrofile, monocyty), oraz na makrofagach, mastocytach i komórkach dendrytycznych (Steinhoff et al., 2006a). Protokół własny oceny ekspresji odczynu obejmował ocenę siły zabarwienia i obecności odczynu osobno w dolnej i górnej warstwie naskórka. Ponadto metodą półilościową oceniano ekspresję odczynu na terenie mieszków włosowych, gruczołów potowych, łojowych, fibroblastów, śródbłonek, mastocytów (w tym osobno w obrębie mastocytów wokół nerwów), komórek nacieku zapalnego i komórek dendrytycznych. Ekspresję oceniano: jako ujemną, jeżeli dodatni odczyn wykazywało poniżej 25% komórek, małą - przy dodatniej ekspresji pomiędzy 25-50% komórek, średnią - przy dodatniej ekspresji pomiędzy 50-75% komórek i dużą przy dodatniej ekspresji powyżej 75% komórek.

Ekspresję receptora opioidowego  $\mu$  opisano na zakończeniach niezmielinizowanych włókien nerwowych, melanocytach, keratynocytach, komórkach mieszka włosowego, fibroblastach i leukocytach (J. Kopsky, 2018). W wykonanych odczynach oceniano ekspresję receptora na terenie keratynocytów (odrębnie górna i dolna warstwa), komórek nacieku zapalnego (podobnie jak w przypadku PAR-2: odczyn ujemny- 0-25% wybarwionych leukocytów, odczyn słabo dodatni-

25-50% wybarwionych leukocytów, odczyn średnio dodatni- 50-75% wybarwionych leukocytów, odczyn silnie dodatni- >75% wybarwionych leukocytów) i na terenie zakończeń nerwowych (obliczono ŚGWN z zastosowaniem własnego protokołu oparty koncepcyjnie na protokole do diagnostyki NDWN, opisanego w dalszej części rozdziału).

#### 5.2.2.2.1 Protokół barwienia

Z zakwalifikowanych do badania bloczków parafinowych wykonano cienkie skrawki, grubości 5  $\mu$ . Po rutynowym odparafinowaniu i uwodnieniu skrawków aktywność endogennej peroksydazy została zablokowana poprzez zanurzenie przez 20 min. w temperaturze pokojowej w świeżo przygotowanym roztworze 3% nadtlenu wodoru na metanolu. W celu odmaskowania antygenów preparaty umieszczono w buforach: EDTA pH 9,0 dla barwienia w kierunku receptora opioidowego  $\mu$  oraz w buforze cytrynianowym pH 6,0 dla PAR-2 i włożono do kuchenki mikrofalowej na 20 min (receptor opioidowy  $\mu$ ) i 35 min (PAR-2). Do barwień immunohistochemicznych użyto następujących przeciwciał: Anti-PAR2 klon: ab138479 – rabbit polyclonal - rozcieńczenie 1:50, czas inkubacji 24h przez noc w temperaturze 4 -8 °C, Anti Opioid Receptor klon: ab134054- rabbit monoclonal antibody, clone UMB3, rozcieńczenie 1:50, czas inkubacji 60 min. w temperaturze pokojowej. Następnie dodano wtórne biotynylowane przeciwciało (30 min. w temperaturze pokojowej), stosując jako system detekcji kompleks awidyny z biotyną i peroksydazą chrzanową (ABC-HRP) (30 min. w temperaturze pokojowej) z chromogenem DAB (3,3'-diaminobenzidine) (8 min. w temperaturze pokojowej) i zabarwiono hematoksyliną (30s). W ramach kontroli jakości wykonano barwienia kontrolne pozytywne i negatywne zalecane przez producentów. Kontrolą pozytywną dla PAR-2 była ludzka tkanka raka prostaty, dla receptora opioidowego  $\mu$  ludzka tkanka jelita grubego. W kontroli negatywnej pierwotne przeciwciało zastąpiono buforowaną fosforanem solą fizjologiczną (PBS).

#### 5.2.2.3 Marker regeneracji nerwów- GAP 43

GAP 43 (growth-associated protein 43, neuromodulina) jest błonową fosfoproteiną specyficzną dla układu nerwowego. Bierze udział w wydłużaniu aksonów i ich regeneracji oraz w modulowaniu przewodnictwa synaptycznego (Fantini & Johansson, 1992).

W wykonanych odczynach obliczono ŚGWN wykazujących ekspresję GAP43 z zastosowaniem jak wcześniej wspomniano, własnego protokołu opartego koncepcyjnie na protokole do diagnostyki NDWN, opisanego w dalszej części rozdziału.

#### 5.2.2.3.1 Protokół barwienia

Z zakwalifikowanych do badania bloczków parafinowych wykonano cienkie skrawki, grubości 5  $\mu$ . Po rutynowym odparafinowaniu i uwodnieniu skrawków aktywność endogennej peroksydazy została zablokowana poprzez zanurzenie przez 20 min. w temperaturze pokojowej w świeżo przygotowanym roztworze 3% nadtlenu wodoru na metanolu. W celu odmaskowania antygenów preparaty umieszczono w buforze EDTA o pH 9,0 i włożono do kuchenki mikrofalowej na 30 min. Do barwienia immunohistochemicznego użyto przeciwciała: GAP-43 sc33705- mouse monoclonal antibody (klon 7B10), rozcieńczenie 1:50, czas inkubacji 30 min. w temperaturze pokojowej. Następnie dodano wtórne biotynylowane przeciwciało (30 min w temperaturze pokojowej), zastosowano system detekcji kompleks awidyny z biotyną i peroksydazą chrzanową (ABC-HRP) (30 min. w temperaturze pokojowej) z chromogenem DAB (3,3'- diaminobenzidine) (8 min w temperaturze pokojowej) i zabarwiono hematoksyliną (30s). W ramach kontroli jakości wykonano barwienia kontrolne pozytywne i negatywne zalecane przez producentów.

Kontrolą pozytywną była ludzka tkanka jelita grubego. W kontroli negatywnej pierwotne przeciwciała zastąpiono buforowaną fosforanem solą fizjologiczną (PBS).

#### 5.2.2.4 Marker mastocytów- tryptaza mastocytowa.

Przeciwciała dla tryptazy mastocytowej jest powszechnie stosowanym markerem do oznaczania mastocytów. W wykonanych odczynach obliczano ilość mastocytów w dużym polu widzenia bezpośrednio pod naskórkiem, w głębszych warstwach skóry właściwej i wokół włókien nerwowych w skórze właściwej.

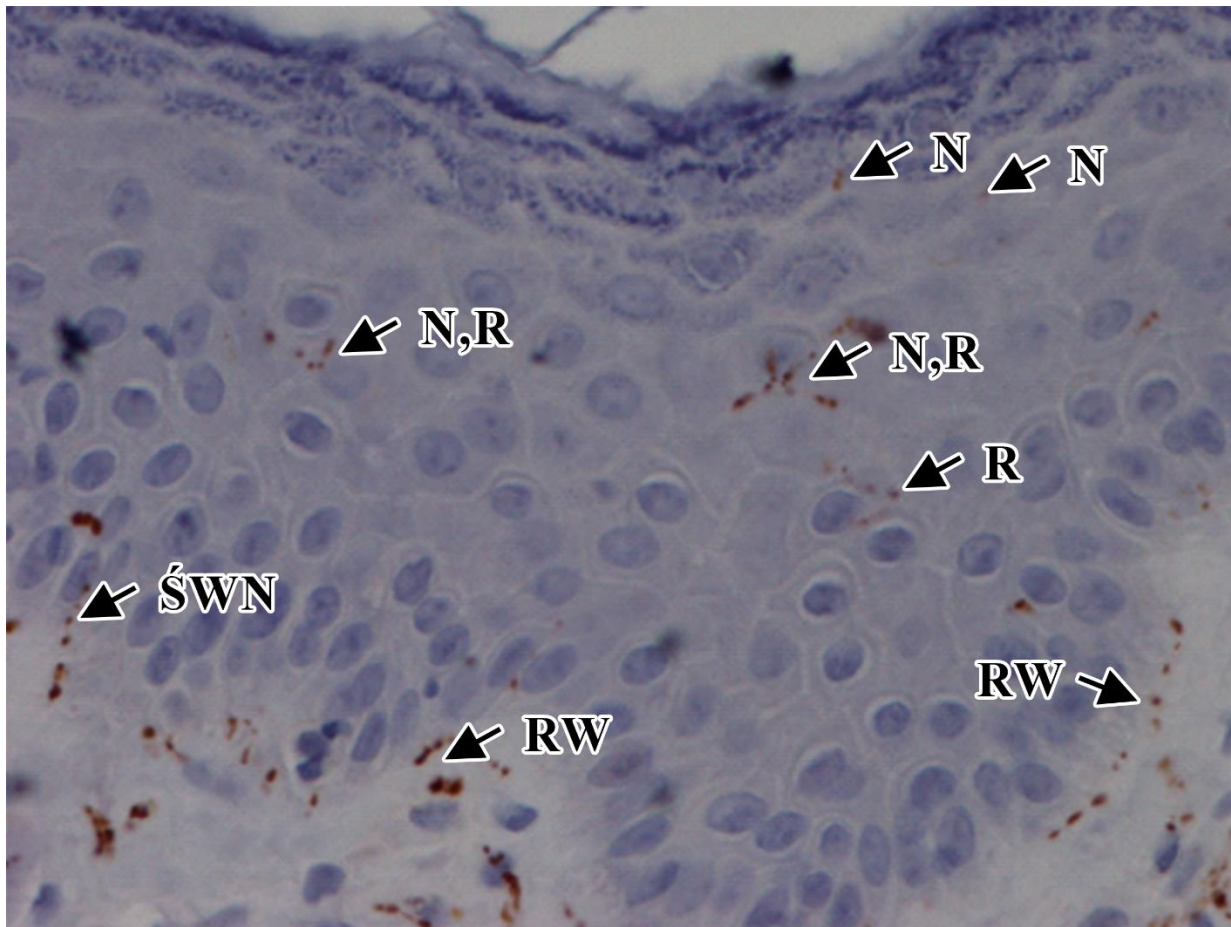
##### 5.2.2.4.1 Protokół barwienia

Z zakwalifikowanych do badania bloczków parafinowych wykonano cienkie skrawki, grubości 5  $\mu$ . Po rutynowym odparafinowaniu i uwodnieniu skrawków aktywność endogennej peroksydazy została zablokowana poprzez zanurzenie przez 20 min. w temperaturze pokojowej w świeżo przygotowanym roztworze 3% nadtlenku wodoru na metanolu. W celu odmaskowania antygenów preparaty umieszczono w buforze EDTA o pH 9,0 i włożono do kuchenki mikrofalowej na 30 min. Do barwienia immunohistochemicznego użyto przeciwciała: Ready-to-use primary antibody Mast Cell Tryptase PA0019 mouse monoclonal (klon: 10D11) , czas inkubacji 30 min. w temperaturze pokojowej. Następnie dodano wtórne biotynylowane przeciwciała (30 min. w temperaturze pokojowej), zastosowano system detekcji kompleks awidyny z biotyną i peroksydazą chrzanową (ABC-HRP) (30 min w temperaturze pokojowej) z chromogenem DAB (3,3'- diaminobenzidine) (8 min w temperaturze pokojowej) i zabarwiono hematoksyliną (30s). W ramach kontroli jakości wykonano barwienia kontrolne pozytywne i negatywne zalecane przez producentów. Kontrolą pozytywną była ludzka tkanka jelita grubego. W kontroli negatywnej pierwotne przeciwciała zastąpiono buforowaną fosforanem solą fizjologiczną (PBS).

#### 5.2.3 Ocena śródnaskórkowej gęstości włókien nerwowych (ŚGWN)

Do oceny mikrounerwienia, w celu obliczenia śródnaskórkowej gęstości włókien nerwowych (ŚGWN) zastosowano protokół badania oparty koncepcyjnie na metodyce oceny drobnych włókien nerwowych przyjętej w pracy Lauria G i wsp. 2010. Obliczono ŚGWN jako liczbę punktów przekraczania granicy skórno-naskórkowej przez wyznakowane immunohistochemicznie włókna nerwowe, w relacji do długości tej granicy. Ze względu na fakt, że badanie oparto na materiale tkankowym standardowo utrwalonym w formalinie (co może powodować fragmentację włókien nerwowych) oraz na skrawkach o rutynowej grubości dla badań immunohistochemicznych 3 $\mu$ m, wyznakowane włókna nerwowe w barwieniu w kierunku PGP 9,5 miały nieciągły wygląd, przypominający linię przerywaną. W obliczeniach uwzględniono tylko te włókna nerwowe, których przebieg mógł zostać jednoznacznie odtworzony jako linia na podstawie uwidocznionych punktów z ekspresją PGP 9.5 i w ten sposób wyznaczona linia przekraczała granicę skórno-naskórkową. Tak jak w protokole oceny ŚGWN dla NDWN nie brano pod uwagę fragmentów włókien widocznych wyłącznie poniżej lub powyżej granicy skórno-naskórkowej ani wtórnych rozgałęzień nerwów na terenie naskórka. Rycina nr 2 przedstawia szczegółowo wyznakowane immunohistochemicznie PGP 9.5 włókna nerwowe na terenie skóry, wraz z opisem obserwowanych wariantów ich przebiegu i uwzględnieniem wariantu włączonego do obliczeń. W barwieniu na PGP 9.5 obliczenia wykonano na trzech seryjnych przekrojach, w barwieniach na GAP-43 i receptor opioidowy  $\mu$  obliczenia wykonano na pojedynczym przekroju. Przy pomocy analizy morfometrycznej obrazu cyfrowego obliczono w mm długość granicy skórno-naskórkowej. Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci ilości włókien nerwowych na 1mm długości granicy skórno-naskórkowej.

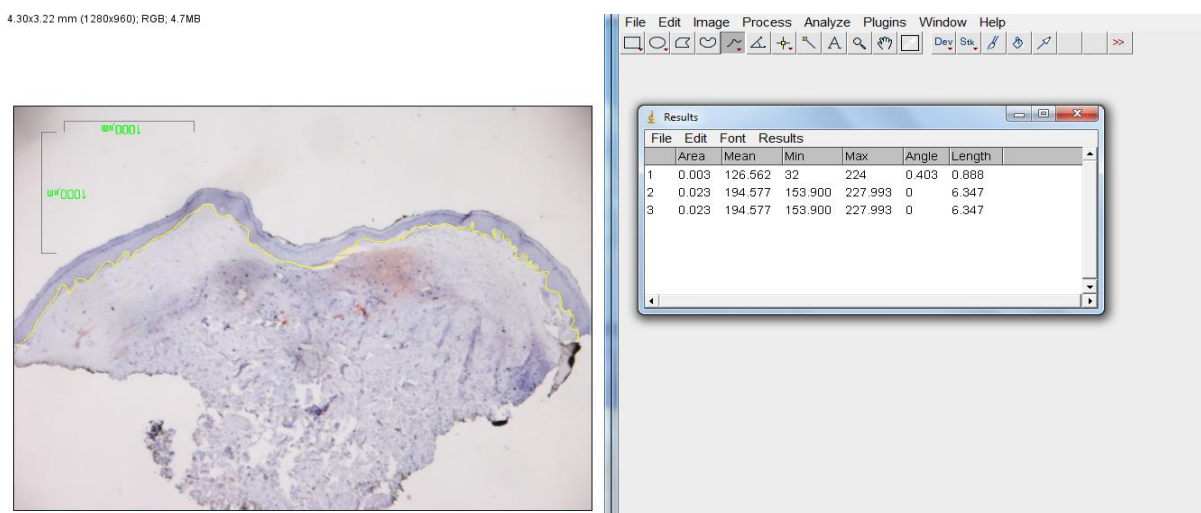




Ryc. 2. Barwienie immunohistochemiczne fragmentu biopsji skórnej w kierunku PGP 9.5.  
 ŚWN - włókno przekraczające granicę skórno-naskórkową uwzględnione w obliczeniach.  
 RW - włókna nerwowe biegnące równoległe do granicy skórno-naskórkowej,  
 N - włókna nerwowe widoczne wyłącznie w górnych partiach naskórka,  
 R - włókna nerwowe rozgałęziające się. Włókna typu RW, N i R nie były uwzględnione w analizie.

## 5.2.4 Analiza morfometryczna obrazu

Wykonano zdjęcia cyfrowe odczynów immunohistochemicznych. Następnie przy pomocy programu ImageJ obliczono dokładnie długość granicy skórno-naskórkowej (rycina 3).



Ryc. 3. Po lewej zdjęcie odczynu immunohistochemicznego biopsji skóry z zaznaczoną na żółto granicą skórno-naskórkową. Po prawej obliczenia wykonane w programie ImageJ.

## 5.2.5 Analiza statystyczna wyników

Obliczenia statystyczne i graficzna prezentacja wyników zostały wykonane przy użyciu programów SAS University Edition i Python Data Analysis Library and Matplotlib. Liczebność grup została ustalona przy pomocy testu statystycznego obliczającego minimalną liczebność próby. Wyniki dla grup zostały przedstawione w postaci średnich lub median. Do badania zgodności z rozkładem normalnym używano testu Shapiro-Wilka. Hipotezy testowano przy użyciu testu parametrycznego t-Studenta, testu Manna-Whitney'a i jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z następnym testem post-hoc Fishera. Przy określaniu poziomu istotności wartość  $p < 0.05$ .

## 5.3 Zakres czasowy

Badanie zostało wykonane w latach 2014-2018.

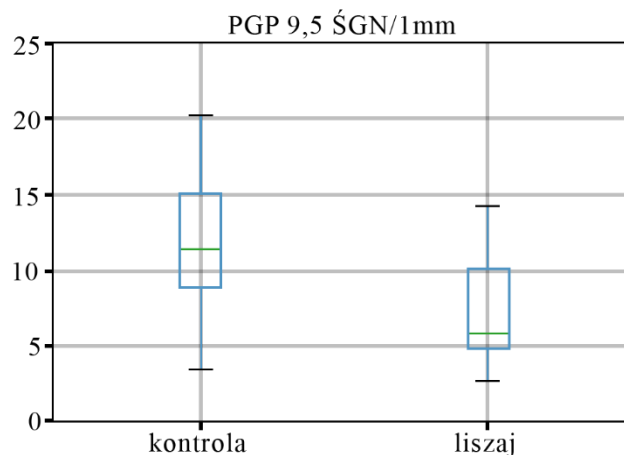
## 6 Wyniki

### 6.1 PGP 9,5

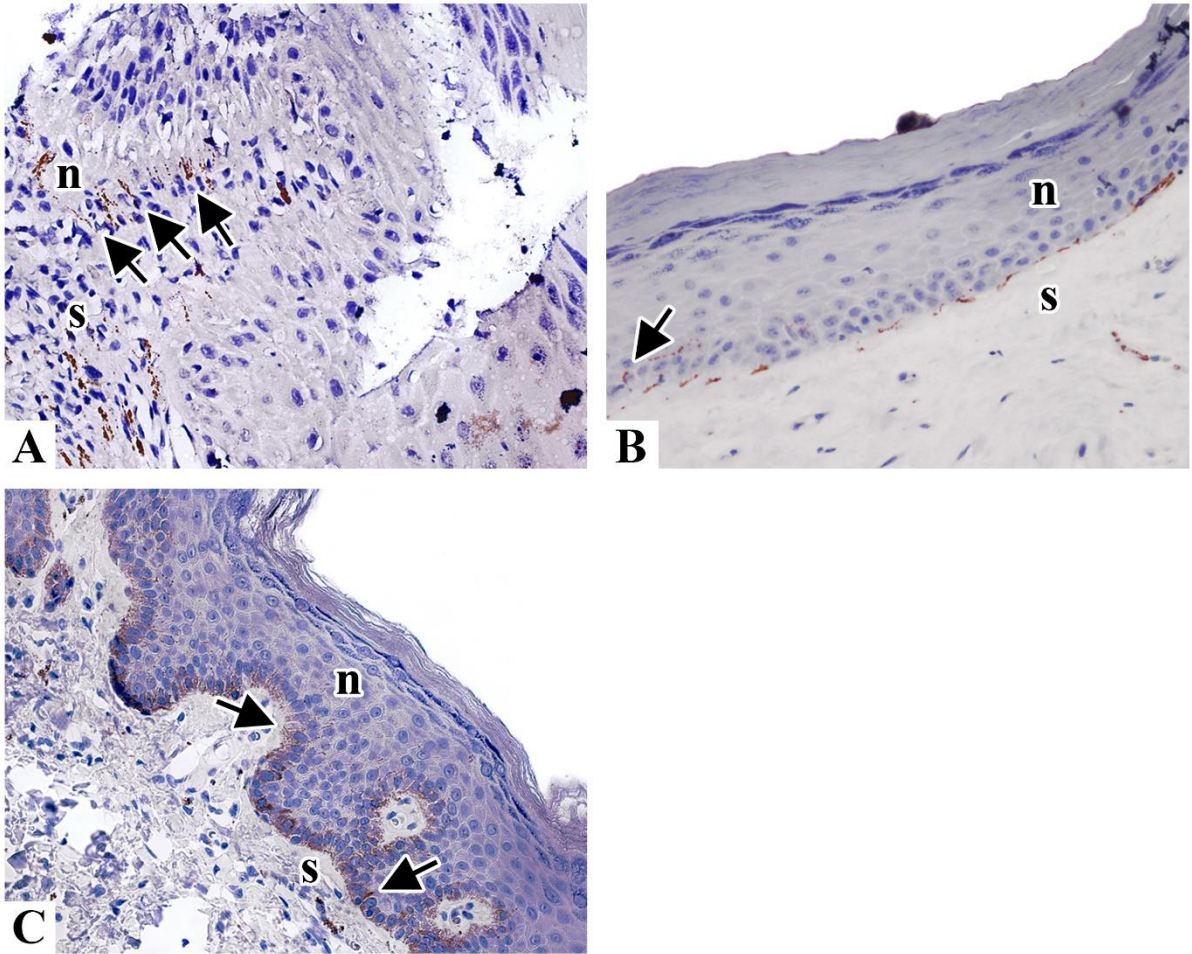
Stwierdzono obecność włókien nerwowych wykazujących ekspresję PGP 9,5 na terenie skóry właściwej i naskórka, zarówno w grupie badawczej jak i w grupie kontrolnej. W obu grupach uwidoczniło drobne włókna nerwowe przechodzące przez granicę skórno-naskórkową (rycina 4). Średnia ŚGWN u chorych z LT wynosiła 7,52/mm, mediana 5,92/mm (wartości wynosiły pomiędzy 2,69 a 20,15), natomiast w grupie kontrolnej średnia wynosiła 12,25, mediana 11,47 (wartości wynosiły pomiędzy 3,52 a 24,74) (wykres 1). Test U Manna-Whitneya potwierdził istotną statystycznie różnicę pomiędzy oboma grupami ( $p=0.0049$ ).

Analiza korelacji wykazała nieznaczny wzrost ŚGWN wraz z wiekiem pacjentek zarówno w grupie klinicznej jak i w grupie kontrolnej.

Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wykazała stopniowe zmniejszenie ŚGWN wraz ze stopniem zaawansowania choroby, przy czym w analizie post hoc stwierdzono istotne statystycznie różnice w średniej ŚGWN pomiędzy wczesnym i późnym stopniem zaawansowania LT a grupą kontrolną, natomiast nie wykazano istotnych różnic pomiędzy stopniami zaawansowania choroby.



Wykres. 1. Analiza śródnaskórkowej gęstości nerwów w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT, barwionej immunohistochemicznie PGP 9,5.



Ryc. 4. Barwienie immunohistochemiczne PGP 9.5

(A) Liczne włókna nerwowe (strzałki) przekraczające granicę skórno-naskórkową we wczesnej fazie liszaja twardzinowego sromu.

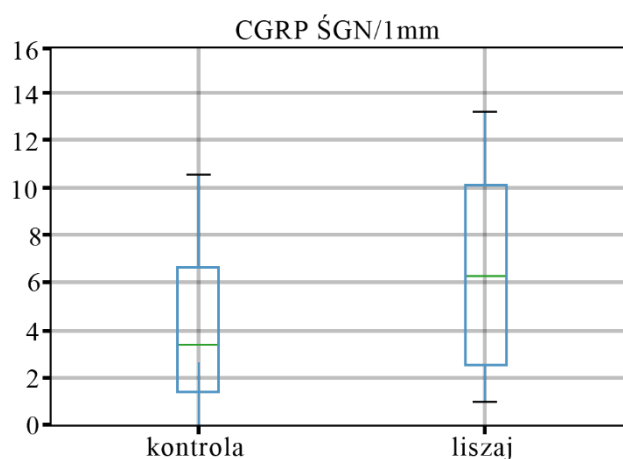
(B) Pojedyncze włókno nerwowe (strzałka) przekraczające granicę skórno-naskórkową w zaawansowanym liszaju twardzinowym sromu.

(C) Liczne włókna nerwowe (strzałki) wnikające w naskórek w prawidłowej skórze sromu.

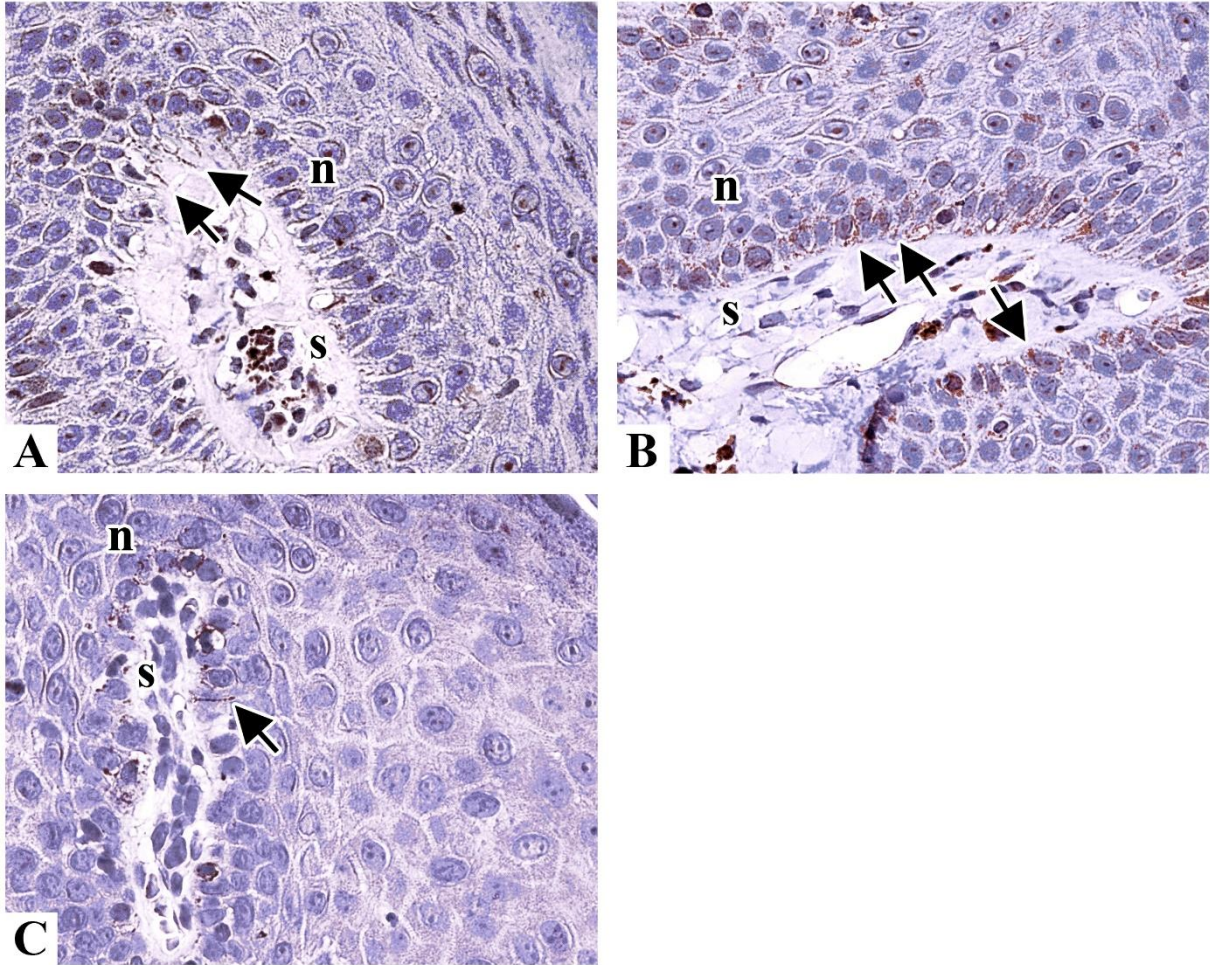
n, naskórek, s, skóra

## 6.2 CGRP

CGRP-dodatnie włókna nerwowe zostały uwidocznione w skórze i naskórku w obu badanych grupach (rycina 5). Średnia ŚGWN wyznakowanych CGRP wynosiła 7,35/mm a mediana 6,26/mm w grupie chorych z LT (wartości znajdowały się w przedziale pomiędzy 0,99 a 30,69), natomiast w prawidłowej skórze sromu średnia wynosiła 4,14/mm a mediana 3,38 (wartości znajdowały się w przedziale pomiędzy 0,00 a 10,54). Test U Manna-Whitneya wykazał istotną statystycznie różnicę pomiędzy medianami w obu badanych grupach ( $p=0,03$ ) (wykres 2).



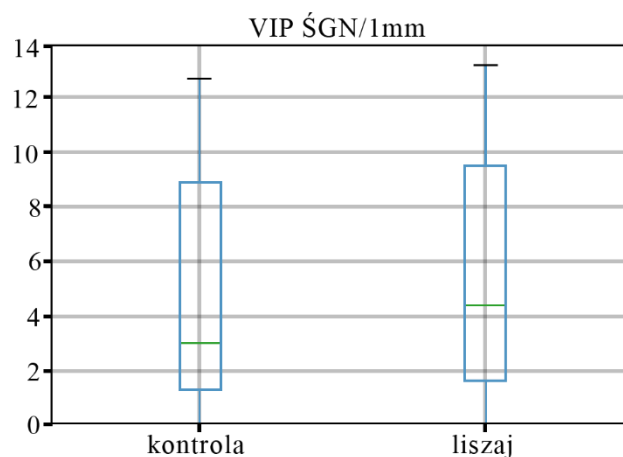
Wykres 2. Analiza śródnaskórkowej gęstości nerwów w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT, barwionej immunohistochemicznie przeciwciałem w kierunku CGRP.



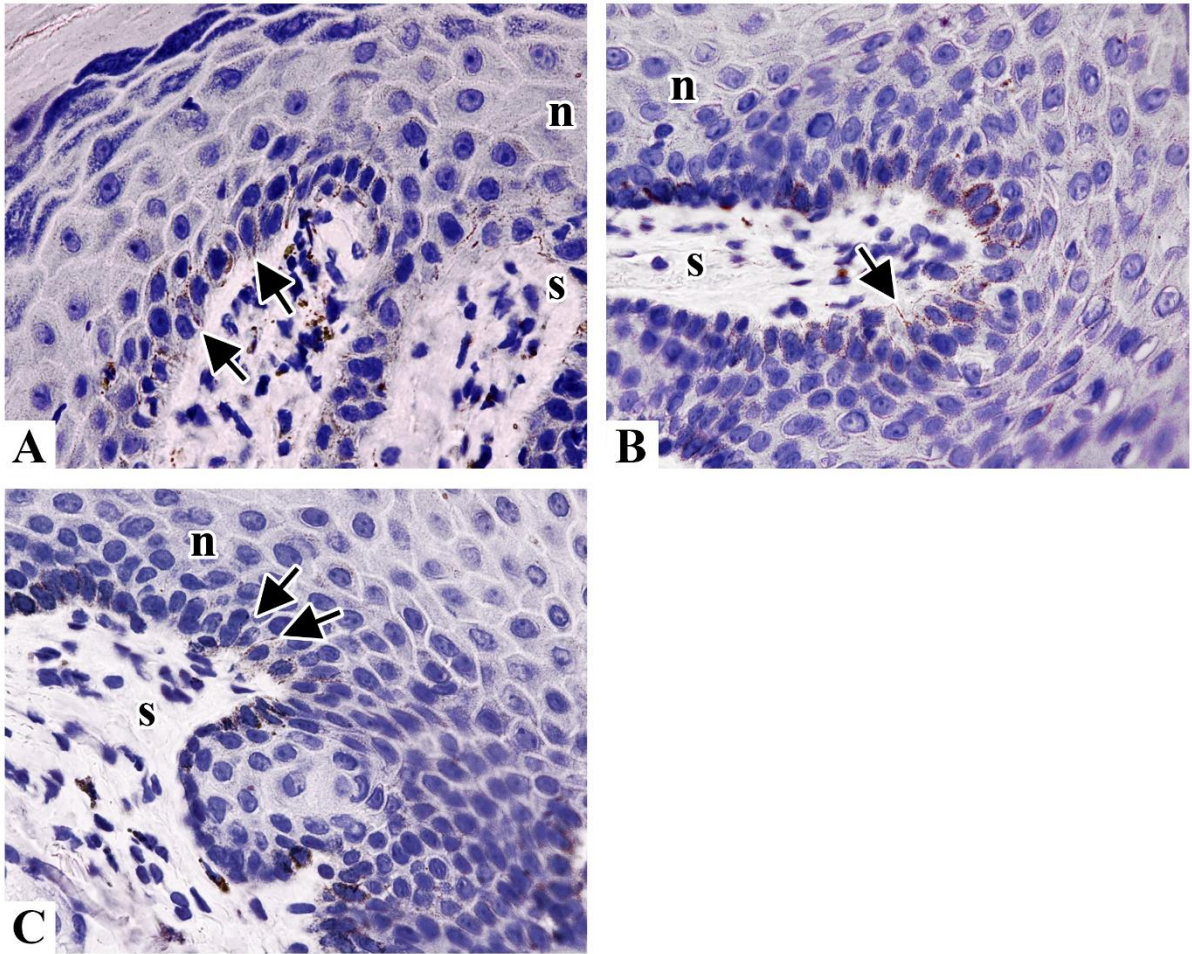
Ryc. 5. Barwienie immunohistochemiczne w kierunku CGRP  
 (A), (B) Drobne włókna nerwowe (strzałki) przekraczające granicę skórno-naskórkową w liszaju twardzinowym.  
 (C) Pojedyncze włókno nerwowe (strzałka) przekraczające granicę skórno-naskórkową w prawidłowej skórze sromu.  
 n, naskórek, s, skóra, powiększenie 400x

### 6.3 VIP

Włókna nerwowe wykazujące ekspresję VIP zostały zaobserwowane głównie wokół gruczołów łojowych i potowych, mieszków włosowych i w skórze właściwej a w mniejszym stopniu (w porównaniu z wyżej opisanymi barwieniami) na terenie naskórka (rycina 6). Średnia ŚGWN wyznakowanych VIP w skórze zmienionej w przebiegu LT wynosiła 5,44/mm, mediana 4,39 (wartości mieściły się w przedziale pomiędzy 0,00 a 13,20) a w prawidłowej skórze sromu średnia wynosiła 4,54/mm, mediana 3,01 (wartości mieściły się w przedziale pomiędzy 0,00 a 12,72) (wykres 3). Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy wymienionymi wartościami (test U Manna-Whitneya,  $p=0.18$ ).



Wykres 3. Analiza śródnaskórkowej gęstości nerwów w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT, barwionej immunohistochemicznie przeciwciałem w kierunku VIP.



Ryc. 6. Barwienie immunohistochemiczne w kierunku VIP

(A) Drobne włókna nerwowe (strzałki) przekraczające granicę skórno-naskórkową w liszaju twardzinowym.

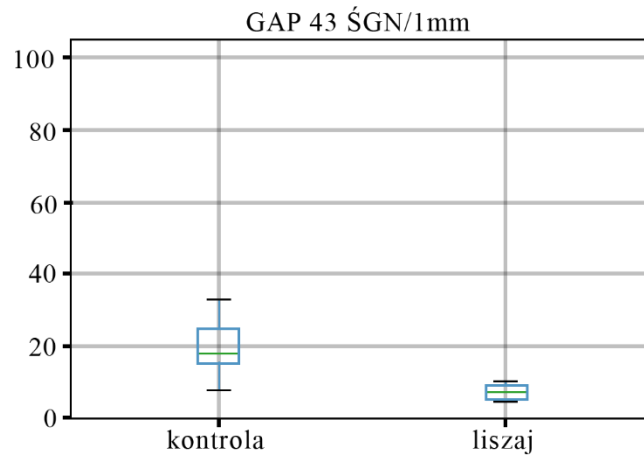
(B), (C) Drobne włókna nerwowe (strzałki) przekraczające granicę skórno-naskórkową w prawidłowej skórze sromu.

n, naskórek, s, skóra, powiększenie 400x

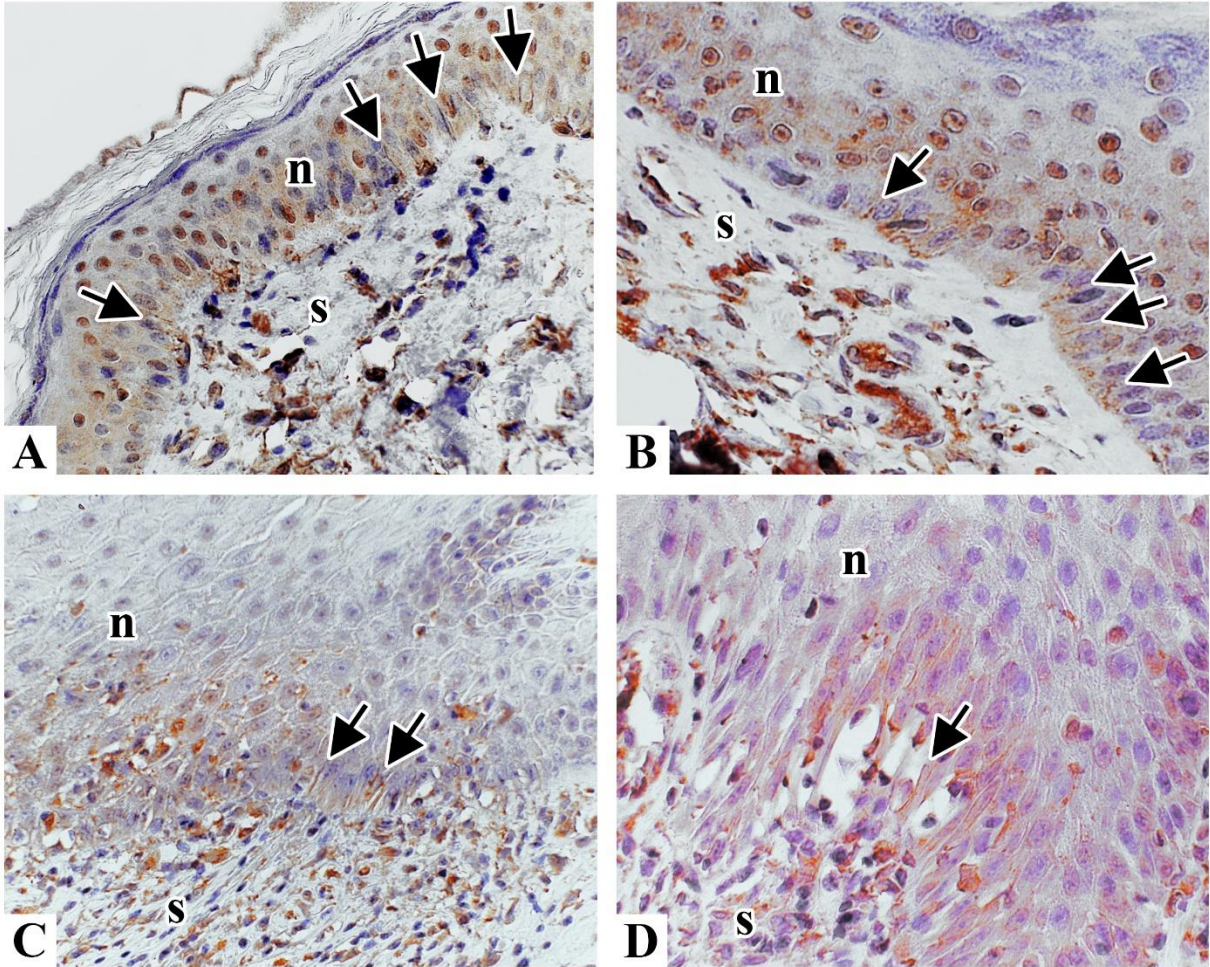


## 6.4 GAP-43

W barwieniu immunohistochemicznym w kierunku GAP-43 uwidoczniono drobne włókna nerwowe przekraczające granicę skórno-naskórkową (rycina 7). Ich średnia gęstość w grupie chorych wynosiła 8,51/mm, mediana 7,2/mm (wartości mieściły się w przedziale 7,69 a 100) a w grupie kontrolnej średnia wynosiła 25,43/mm, mediana 17,68/mm (wartości mieściły się w przedziale 4,34 a 23,63) (wykres 4). Test U Manna-Whitneya wykazał istotną statystycznie różnicę pomiędzy medianami w obu badanych grupach ( $p=0,013$ ).



Wykres 4. Analiza śródnaskórkowej gęstości nerwów w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT, barwionej immunohistochemicznie przeciwciałem w kierunku GAP-43



Ryc. 7. Barwienie immunohistochemiczne w kierunku GAP-43.

(A), (B) Liczne drobne włókna nerwowe (strzałki) na granicy skórno-naskórkowej w prawidłowej skórze sromu.

(C), (D) Pojedyncze włókna nerwowe (strzałki) na granicy skórno-naskórkowej w skórze sromu zmienionej w przebiegu liszaja twardzinowego.

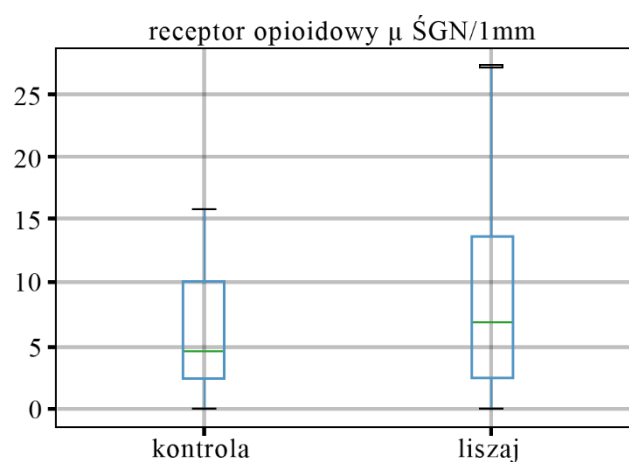
n, naskórek, s, skóra właściwa, powiększenie 400x.

## 6.5 Receptor opioidowy $\mu$

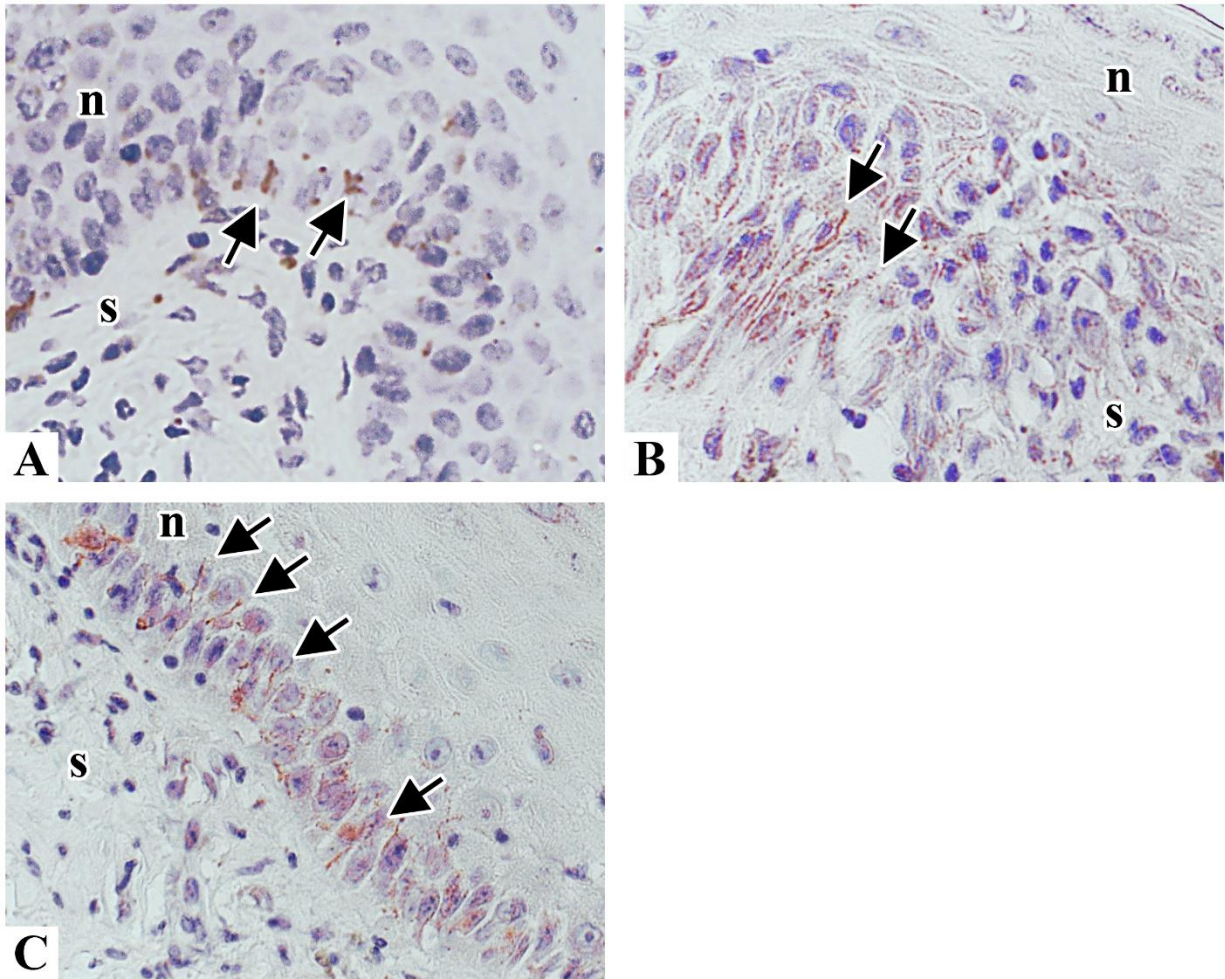
Ekspresję receptora opioidowego  $\mu$  stwierdzono w obrębie drobnych włókien nerwowych (rycina 8), keratynocytów (rycina 9) i w obrębie leukocytów (rycina 10).

### 6.5.1 ŚGWN $\mu+$

Do oceny ekspresji receptora na terenie drobnych włókien nerwowych zastosowano, tak jak w poprzednich przypadkach protokół dla oceny ŚGWN. Ich średnia gęstość w grupie chorych wynosiła 10,4/mm, mediana 6,81/mm (wartości mieściły się w przedziale 0 a 27,27) a w grupie kontrolnej średnia wynosiła 7,05/mm, mediana 4,54/mm (wartości mieściły się w przedziale 0 a 27,27) (wykres 5). Test U Manna-Whitneya nie wykazał istotnych statystycznie różnic pomiędzy medianami w obu badanych grupach ( $p=0,11$ ).



Wykres 5. Analiza śródnaskórkowej gęstości nerwów w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT, barwionej immunohistochemicznie przeciwciałem w kierunku receptora opioidowego  $\mu$ .

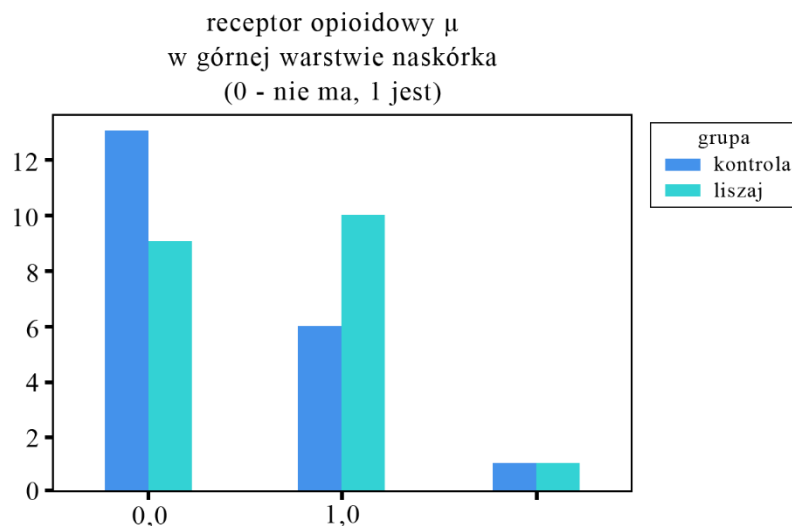


Ryc. 8. Barwienie immunohistochemiczne w kierunku receptora opioidowego  $\mu$  na terenie drobnych włókien nerwowych przekraczających granicę skórno-naskórkową (strzałki) w prawidłowej skórze sromu (A), i w przypadkach liszaja twardzinowego sromu (B), (C).  
n, naskórek, s, skóra właściwa, powiększenie 400x.

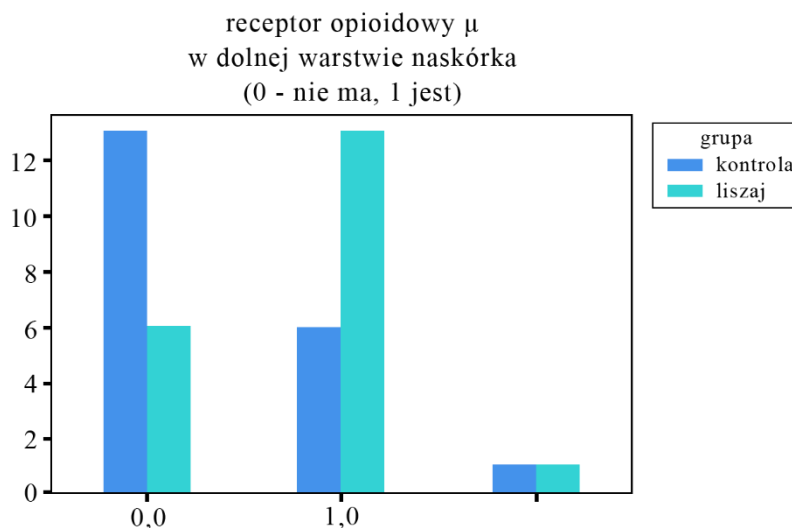
### 6.5.2 Ekspresja receptora opioidowego $\mu$ w keratynocytach

Ekspresję receptora opioidowego  $\mu$  w obrębie keratynocytów oceniono osobno w obrębie górnej i dolnej warstwy naskórka, ponieważ stwierdzono różnice w tym zakresie (rycina 9).

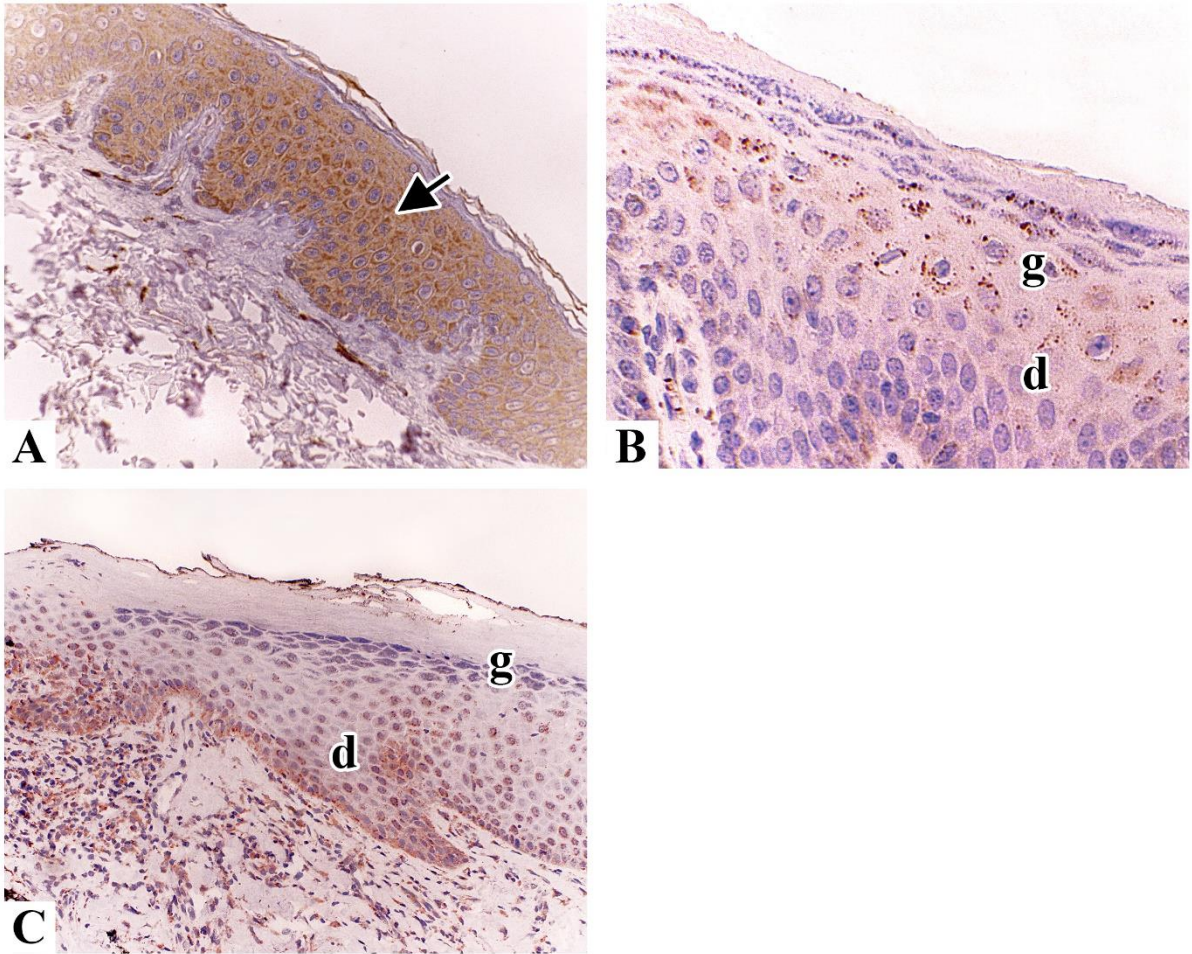
Rozkład zmiennych w obu grupach przedstawiają wykresy 6 i 7. Testy Fishera i  $\chi^2$  nie stwierdziły różnic pomiędzy badanymi grupami (odpowiednio  $p=0.32$  i  $p=0.05$ ).



Wykres 6. Analiza immunоекспresji receptora opioidowego  $\mu$  w górnej warstwie naskórka w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT



Wykres 7. Analiza immunоекспresji receptora opioidowego  $\mu$  w dolnej warstwie naskórka w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.



Ryc. 9. Dodatnie barwienie immunohistochemiczne w kierunku receptora opioidowego  $\mu$  na terenie keratynocytów (strzałka) w prawidłowej skórze sromu (A). Dodatni odczyn w kierunku receptora opioidowego  $\mu$  w górnej warstwie naskórka (g), ujemny odczyn w dolnej warstwie (d) w przypadku liszaja twardzinowego sromu (B). Ujemne barwienie immunohistochemiczne w kierunku receptora opioidowego  $\mu$  na terenie górnej warstwy naskórka (g), dodatnie barwienie w dolnej warstwie (d) w przypadku liszaja twardzinowego sromu (C). g, warstwa górna, d, warstwa dolna, powiększenie 400x.

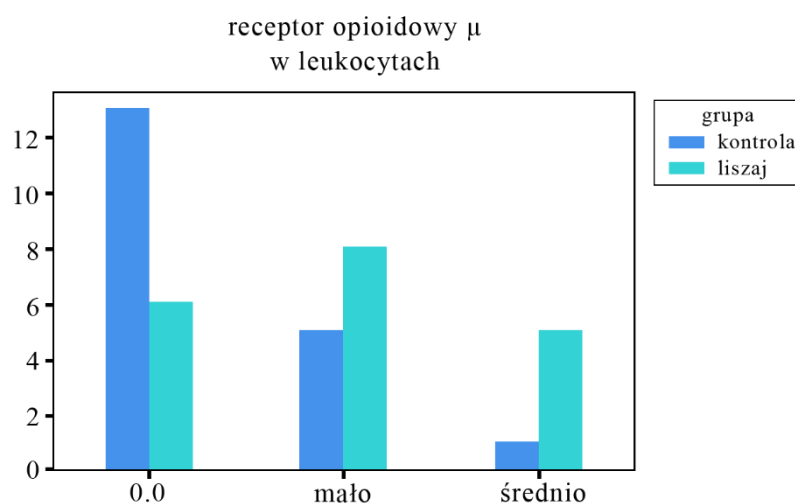
### 6.5.3 Ekspresja receptora opioidowego $\mu$ w leukocytach

Ekspresję receptora opioidowego  $\mu$  w leukocytach oceniano metodą półilościową w dużym polu widzenia (high power field, HPF), w polu o najsilniejszej ekspresji odczynu i w miejscu najgęstszego nacieku zapalnego. Ekspresję oceniano jako ujemną - jeżeli ekspresję wykazywało poniżej 25% leukocytów, mało - przy dodatniej ekspresji pomiędzy 25-50% leukocytów, średnią - przy dodatniej ekspresji pomiędzy 50-75% leukocytów i dużą - przy dodatniej ekspresji powyżej 75% leukocytów. Szczegółowe wyniki przedstawia tabela 4 i wykres 8. W grupie chorych w 8 przypadkach stwierdzono małą, a w 5 przypadkach średnią ekspresję receptora opioidowego  $\mu$  w leukocytach, natomiast w grupie kontrolnej w 5 przypadkach stwierdzono małą, a w 1 średnią ekspresję. Analiza statystyczna przy użyciu testu Manna-Whitneya wykazała istotne różnice pomiędzy badanymi grupami ( $p=0.01$ ), co oznacza, że w przypadkach LT jest więcej przypadków z małą i średnią ekspresją receptora opioidowego  $\mu$  na terenie leukocytów niż w grupie kontrolnej.

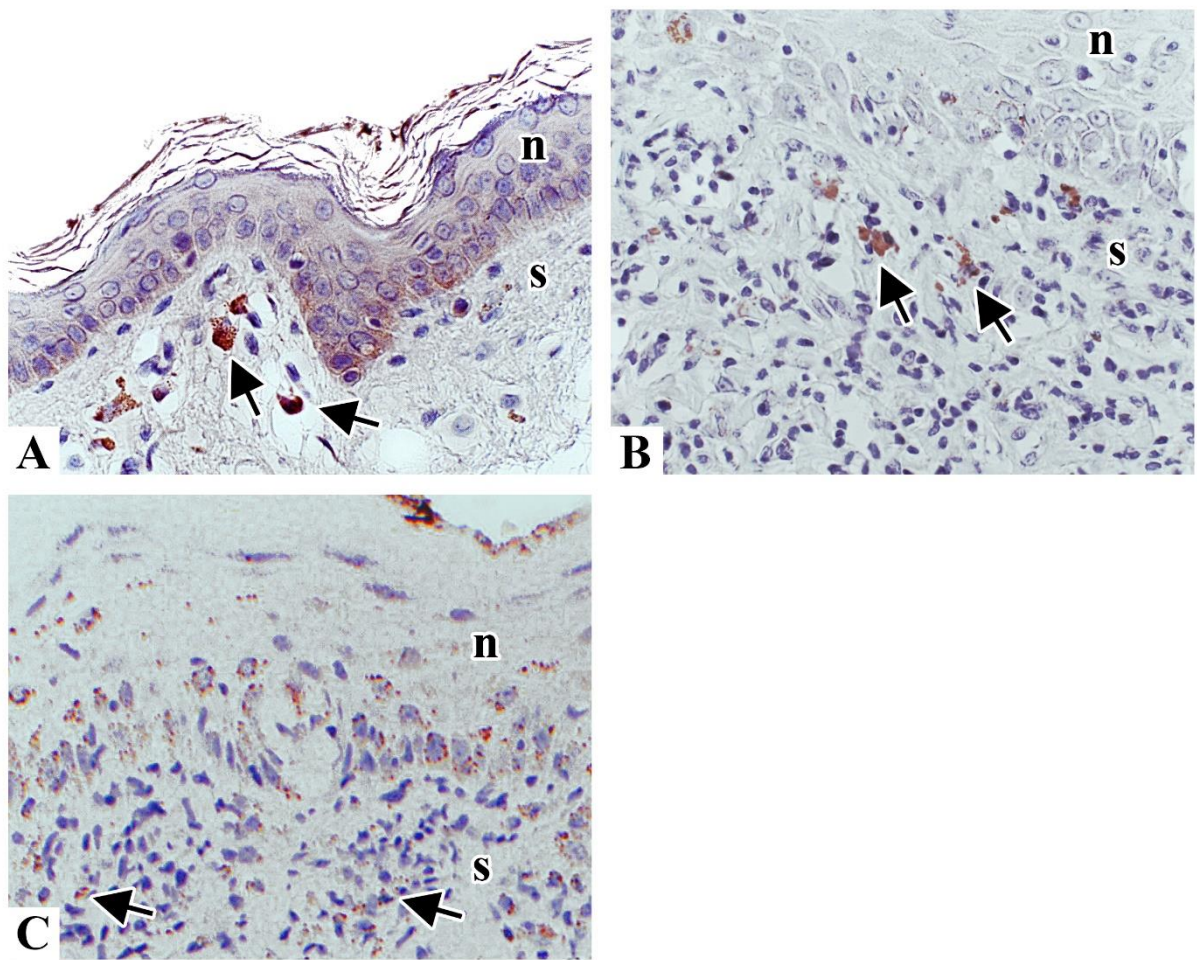
Receptor opioidowy  $\mu$  leukocyty/HPF

grupa	kontrola	liszaj
Ujemny	13	6
Mało	5	8
Średnio	1	5

Tabela 4. Zestawienie ilości przypadków wykazujących ujemną, małą i średnią ekspresję receptora opioidowego  $\mu$  w leukocytach w badanych grupach.



Wykres 8. Analiza immunoekspresji receptora opioidowego  $\mu$  w obrębie leukocytów w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.



Ryc. 10. Barwienie immunohistochemiczne w kierunku receptora opioidowego  $\mu$  na terenie leukocytów (strzałki) w prawidłowej skórze sromu (A), i we wczesnych przypadkach liszaja twardzinowego sromu (B), (C). n, naskórek, s, skóra właściwa, powiększenie 400x.



## 6.6 Porównanie immunoekspresji badanych antygenów w obrębie włókien nerwowych sromu

Tabela nr 5 zawiera zbiorcze zestawienie wyników obliczeń badanych antygenów we włóknach nerwowych. Czcionką pogrubioną zostały wyróżnione oznaczenia immunohistochemiczne, których wyniki różniły się istotnie w obu badanych grupach.

	kontrola				Liszaj twardzinowy			
	Średnia	Mediana	Min	Max	Średnia	Mediana	Min	Max
<b>PGP 9,5</b>	<b>12,25</b>	<b>11,47</b>	<b>3,52</b>	<b>24,74</b>	<b>7,52</b>	<b>5,92</b>	<b>2,69</b>	<b>20,15</b>
<b>CGRP</b>	<b>4,14</b>	<b>3,38</b>	<b>0,00</b>	<b>10,54</b>	<b>7,35</b>	<b>6,26</b>	<b>0,99</b>	<b>30,69</b>
VIP	4,54	3,01	0,00	12,72	5,44	4,39	0,00	13,2
<b>GAP-43</b>	<b>25,43</b>	<b>17,68</b>	<b>7,69</b>	<b>100</b>	<b>8,51</b>	<b>7,2</b>	<b>4,34</b>	<b>23,63</b>
Rec. $\mu$	7,05	4,54	0,00	27,27	10,4	6,81	0,00	27,27

Tabela 5. Zestawienie liczby i wartości gęstości śródskórkowych nerwów znakowanych różnymi markerami. Istotne statystycznie różnice są napisane czcionką pogrubioną.

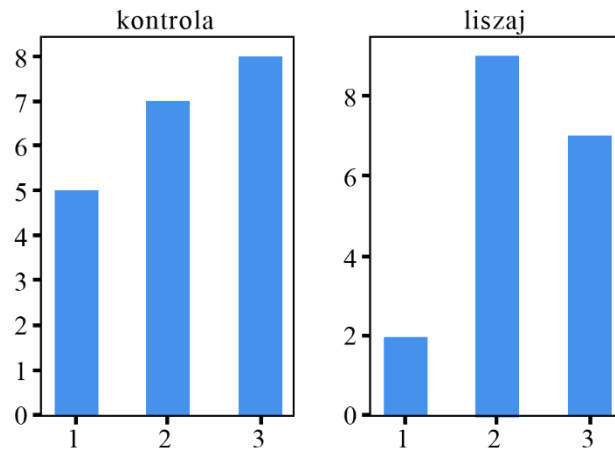
## 6.7 Receptor PAR-2

Ekspresję receptora PAR-2 stwierdzono w obrębie keratynocytów (rycina 11), leukocytów (rycina 12), mieszków włosowych, komórek dendrytycznych, fibroblastów, gruczołów potowych, łojowych (rycina 13), w komórkach śródbłonna (rycina 14) i na terenie mastocytów wokół skórných włókien nerwowych (rycina 15).

### 6.7.1 Receptor PAR-2 w keratynocytach

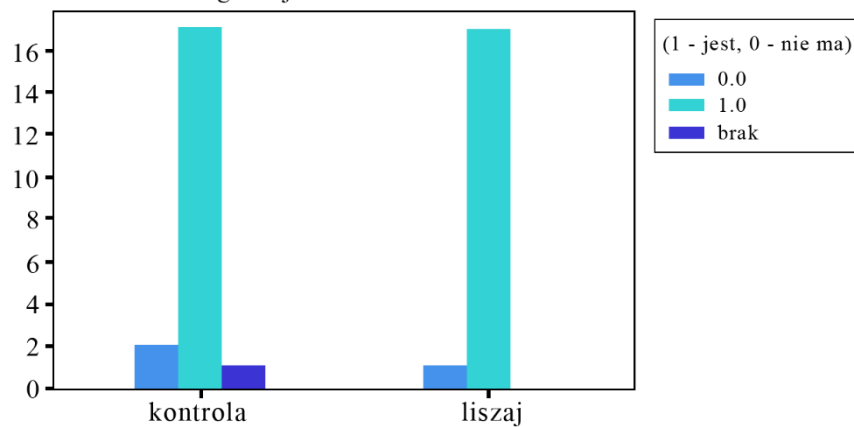
W obrębie keratynocytów oceniano intensywność barwienia: barwienie słabe: 1+, średnie: 2+ i silne: 3+ (rycina 11 A, B, C) (wykres 9) oraz obecność barwienia w górnej i dolnej warstwie naskórka (rycina 11 D, E, F) (wykresy 10 i 11). Testy Fishera i  $\chi^2$  nie stwierdziły występowania istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami w zakresie intensywności i lokalizacji barwienia (odpowiednio  $p=0.32$ ,  $p=0.96$  i  $p=0.49$ ).

intensywność barwienia PAR-2  
w keratynocytach



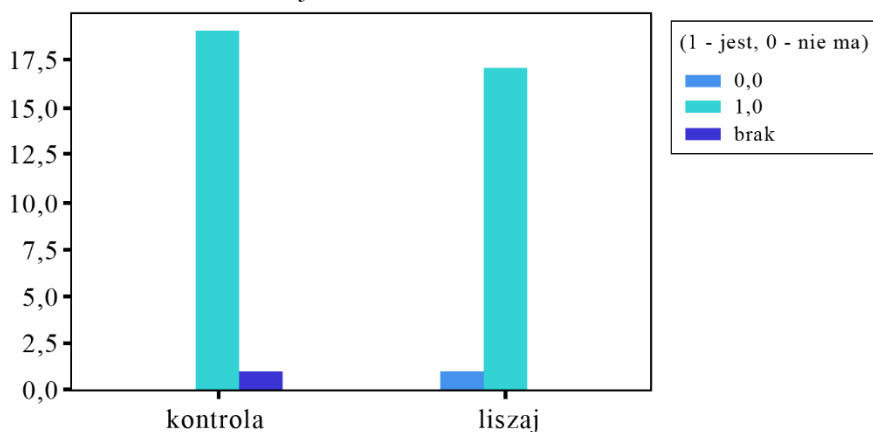
Wykres 9. Analiza intensywności barwienia immunohistochemicznego w kierunku PAR-2 w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.

ekspresja PAR-2  
w górnej warstwie naskórka

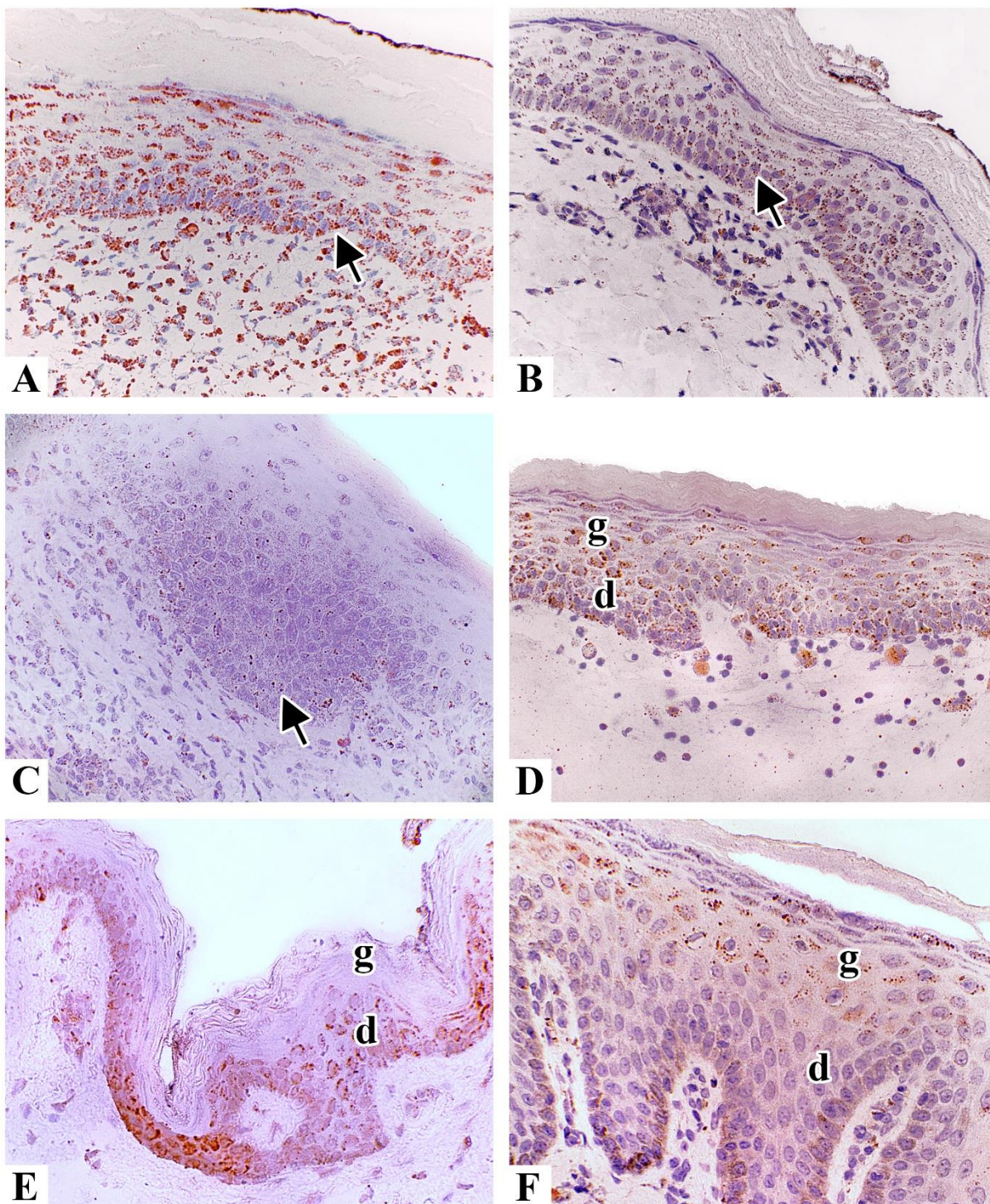


Wykres 10. Analiza immunoekspresji receptora PAR-2 w górnej warstwie naskórka w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.

ekspresja PAR-2  
w dolnej warstwie naskórka



Wykres 11. Analiza immunoekspresji receptora PAR-2 w dolnej warstwie naskórka w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.



Ryc. 11. Barwienie immunohistochemiczne keratynocytów w kierunku PAR-2.

(A), (B), (C) Intensywność odczynu. (A) Silne barwienie 3+, (B) średnie barwienie 2+, (C) słabe barwienie 1+.

(D), (E), (F) Lokalizacja odczynu. (D) Barwienie w górnej (g+) i dolnej (d+) warstwie, (E) barwienie w dolnej warstwie (d+), (F) barwienie w górnej warstwie (g+).

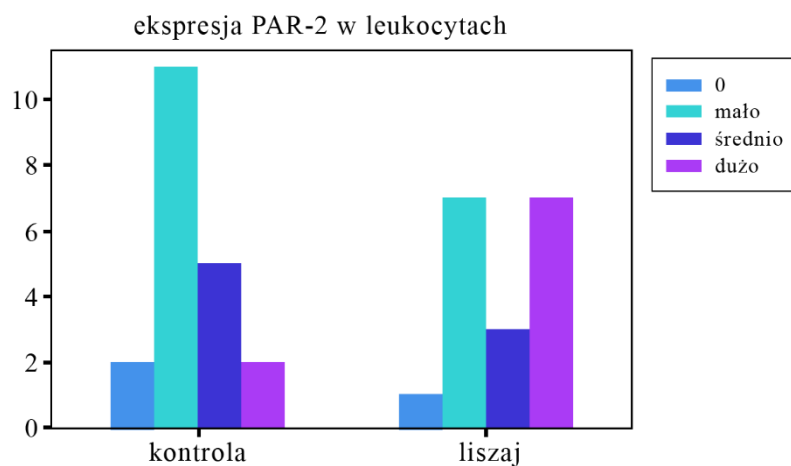
## 6.7.2 Receptor PAR-2 w leukocytach

Ekspresję receptora PAR-2 w leukocytach oceniano w dużym polu widzenia (high power field, HPF), w polu o najsilniejszej ekspresji odczynu i w miejscu najgęstszego nacieku zapalnego. Ekspresję oceniano jako ujemną - jeżeli ekspresję wykazywało poniżej 25% leukocytów, małą - przy dodatniej ekspresji pomiędzy 25-50% leukocytów, średnią - przy dodatniej ekspresji pomiędzy 50-75% leukocytów i dużą - przy dodatniej ekspresji powyżej 75% leukocytów. Zestawienie opisanych zmiennych przedstawiają tabela 6 i wykres 12. Analiza statystyczna wykazała brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami, przy granicznej wartości poziomu istotności  $p=0.05$ .

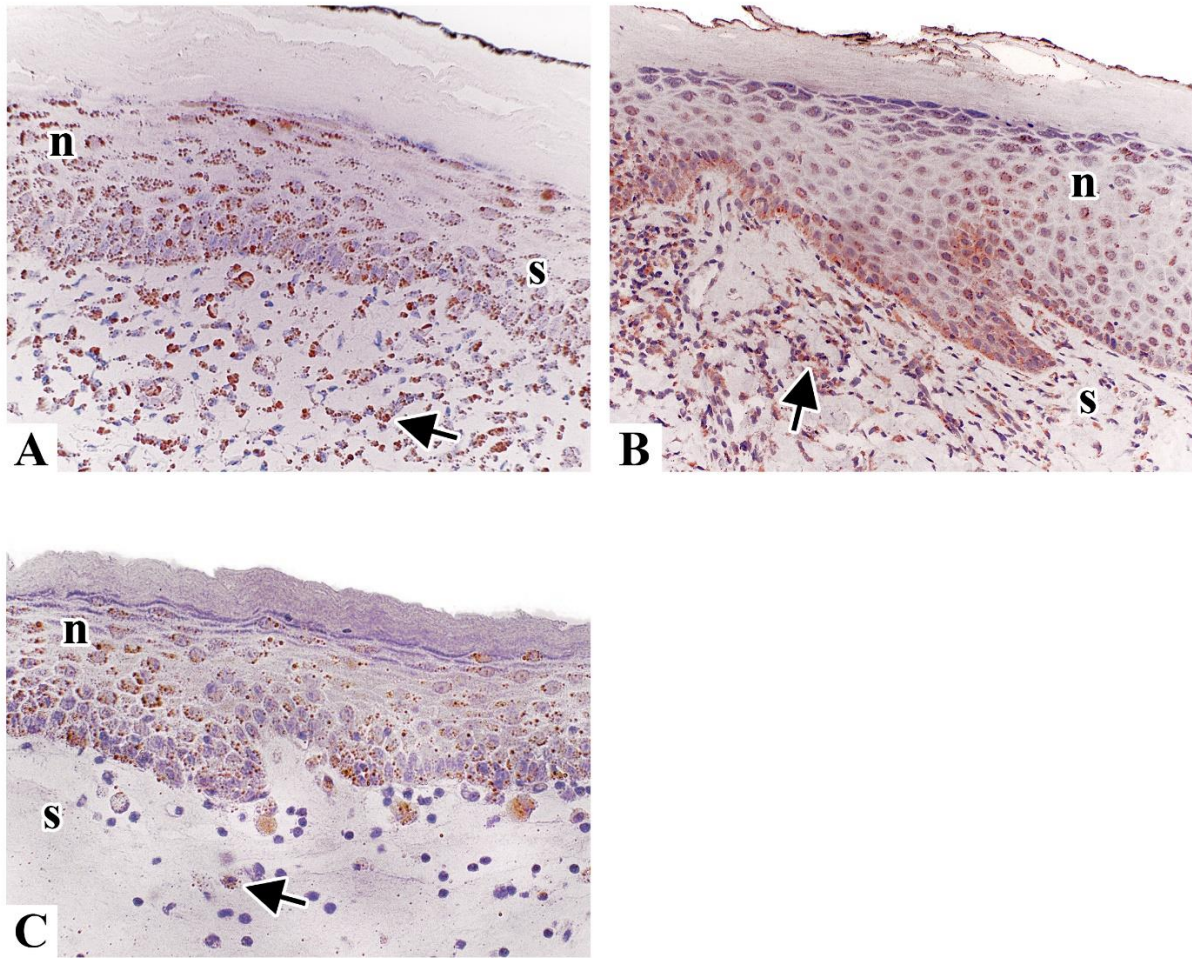
PAR-2 leukocyty/HPF

	kontrola	liszaj
ujemny	2	1
mała	11	7
średnia	5	3
duża	2	7

Tabela 6. Zestawienie ilości przypadków wykazujących ujemną, małą, średnią i dużą ekspresję receptora PAR-2 w leukocytach w badanych grupach.



Wykres 12. Analiza immunоекспresji receptora PAR-2 w leukocytach w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.

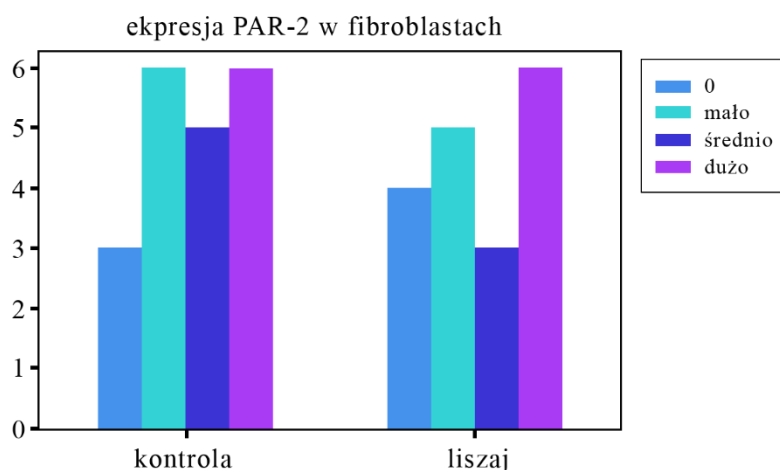


Ryc. 12. Dodatnie barwienie immunohistochemiczne receptora PAR-2 na terenie leukocytów (strzałki). Silne w liszaju twardzinowym (A), średnie w liszaju twardzinowym (B) i słabe w prawidłowej skórze (C).  
n, naskórek, s, skóra właściwa,

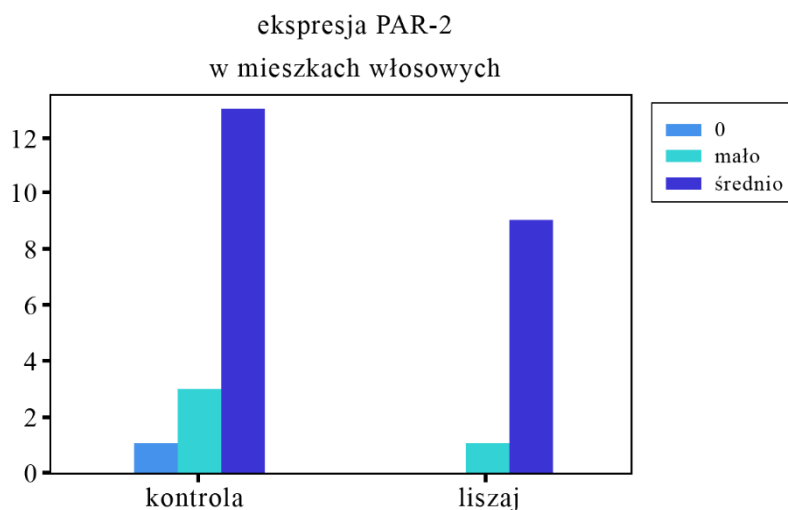
### 6.7.3 Receptor PAR-2 w mieszkach włosowych, fibroblastach, gruczołach potowych, i gruczołach łojowych

Ekspresję receptora PAR-2 w mieszkach włosowych, fibroblastach gruczołach potowych, łojowych, mastocytach wokół nerwów i w śródbłonkach oceniano jak w przypadku wcześniejszych parametrów w dużym polu widzenia (high power field, HPF), w polu o najsilniejszej ekspresji odczynu. Ekspresję oceniano metodą półilościową jako ujemną, jeżeli ekspresję wykazywało poniżej 25% ocenianych komórek, małą przy dodatniej ekspresji pomiędzy 25-50%, średnią przy dodatniej ekspresji pomiędzy 50-75% i dużą przy dodatniej ekspresji powyżej 75%. Zestawienie opisanych zmiennych przedstawiają wykresy: 13, 14, 15, 16.

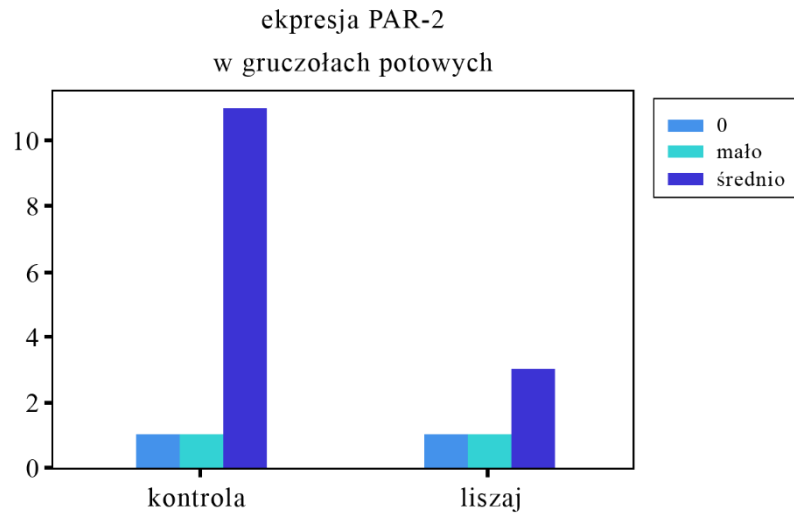
Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami w ekspresji receptora PAR-2 na terenie fibroblastów ( $p=0,41$ ), mieszków włosowych ( $p=0,19$ ), gruczołów potowych ( $p=0,15$ ) i łojowych ( $p=0,3$ ).



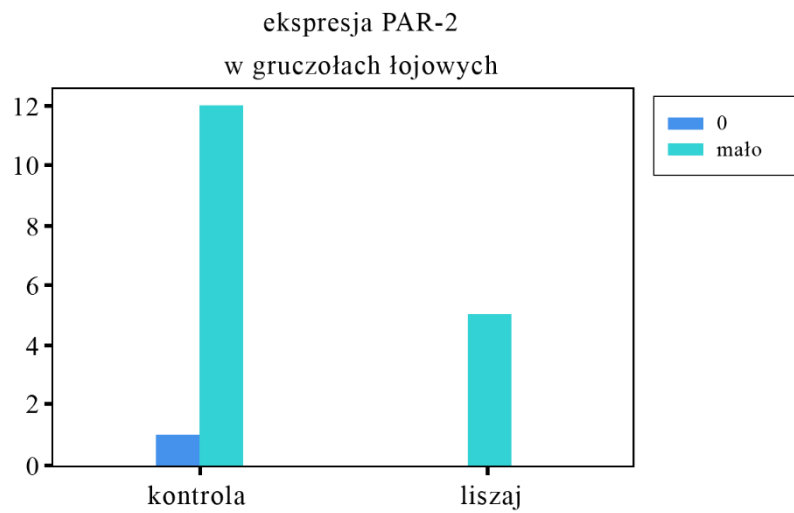
Wykres 13. Analiza immunоекспresji receptora PAR-2 w fibroblastach w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.



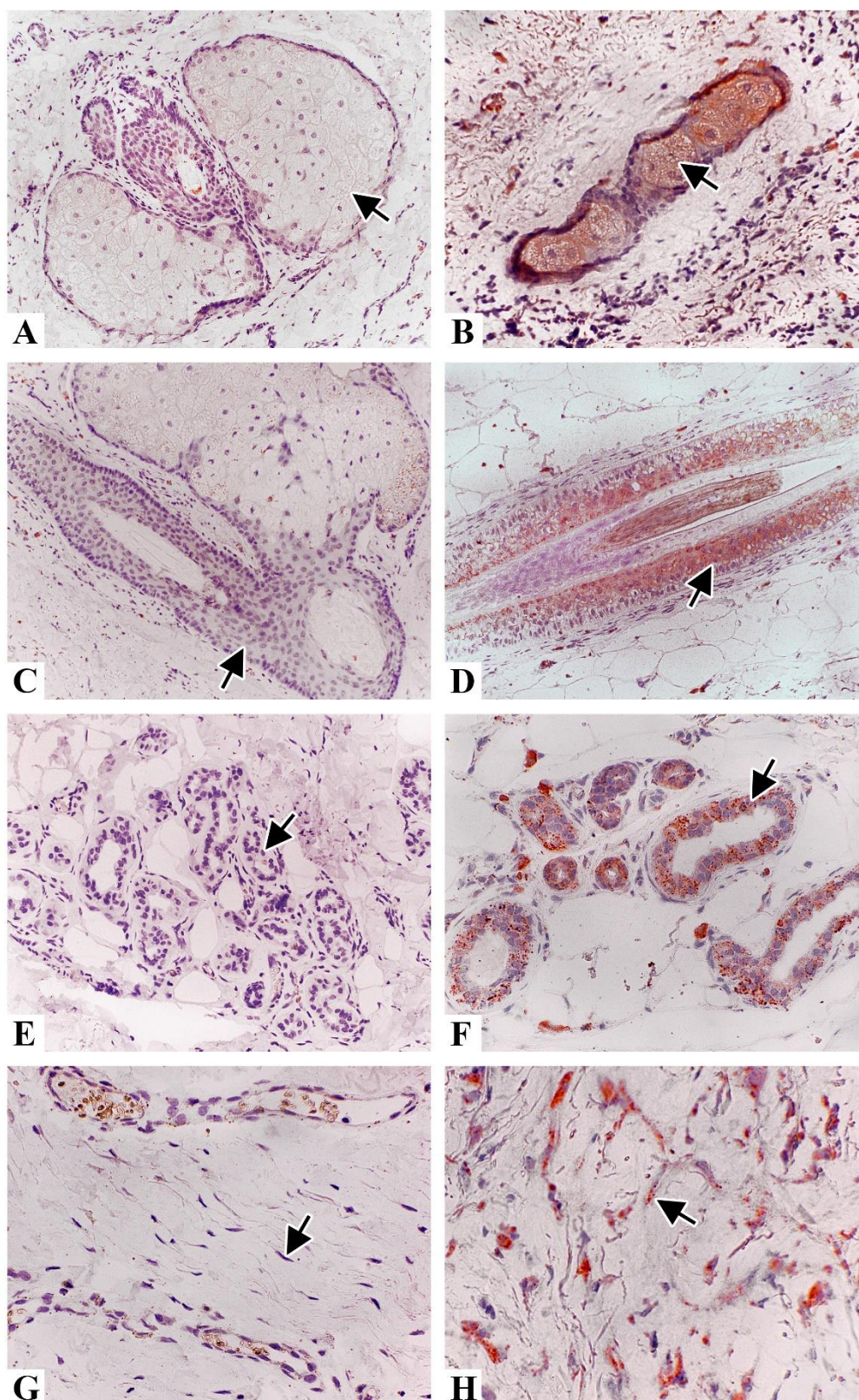
Wykres 14. Analiza immunоекспresji receptora PAR-2 w mieszkach włosowych w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.



Wykres 15. Analiza immunоекспresji receptora PAR-2 w gruczołach potowych w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.



Wykres 16. Analiza immunоекспresji receptora PAR-2 w gruczołach łojowych w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.



Ryc. 13. Barwienie immunohistochemiczne w kierunku PAR-2.

(A), (B) Gruczoły łojowe (strzałki), (A) ujemny w prawidłowych tkankach, (B) dodatni w lizaju twardzinowym.  
 (C), (D) Mieszki włosowe (strzałki), (C) ujemny w prawidłowych tkankach, (D) dodatni w prawidłowych tkankach.  
 (E), (F) Gruczoły potowe (strzałki), (E) ujemny w prawidłowych tkankach, (F) dodatni w prawidłowych tkankach.  
 (G), (H) Fibroblasty (strzałki), (G) ujemne w lizaju twardzinowym, (H) dodatni w lizaju twardzinowym.



#### 6.7.4 Receptor PAR-2 w śródbłonkach

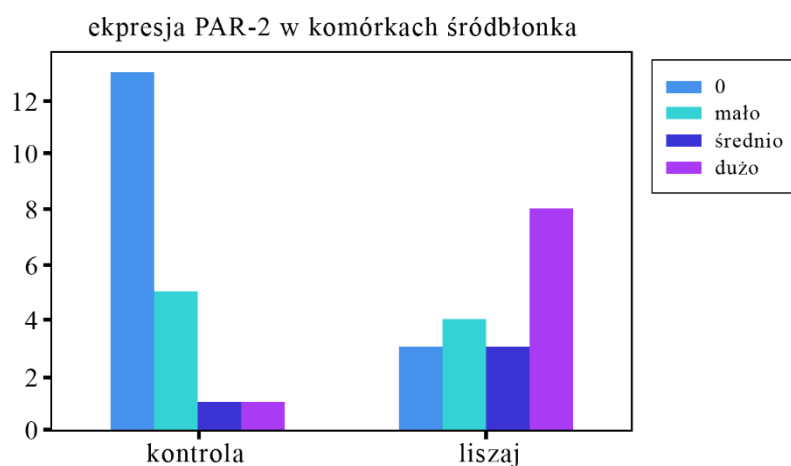
Ekspresję receptora PAR-2 w śródbłonkach oceniano jak w przypadku wcześniejszych parametrów w dużym polu widzenia (high power field, HPF), w polu o najsilniejszej ekspresji odczynu. Ekspresję oceniano metodą półilościową jako ujemną, jeżeli ekspresję wykazywało poniżej 25% ocenianych komórek, małą przy dodatniej ekspresji pomiędzy 25-50%, średnią przy dodatniej ekspresji pomiędzy 50-75% i dużą przy dodatniej ekspresji powyżej 75%. Zestawienie opisanych zmiennych przedstawiają wykres 17 i tabela nr 7.

Analiza statystyczna przy użyciu testu Manna-Whitneya wykazała obecność istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami w ekspresji receptora PAR-2 na terenie komórek śródbłonka naczyń krwionośnych ( $p=0.0002$ ), co oznacza, że w liszaju twardziny jest więcej przypadków występowania ekspresji receptora PAR-2 w komórkach śródbłonka.

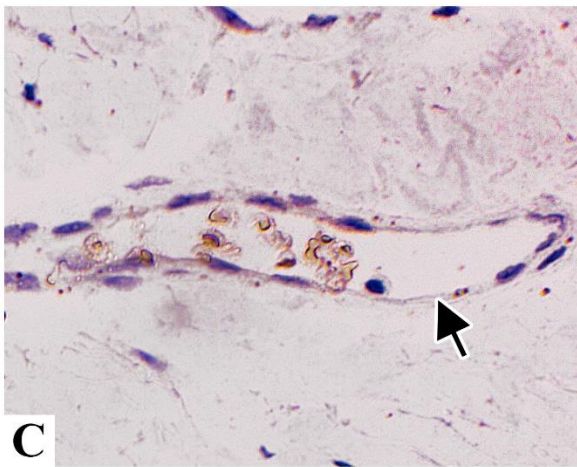
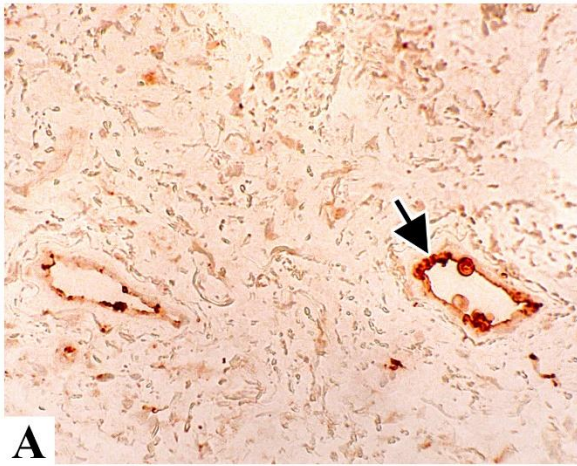
Rec. PAR-2 śródbłonek

	kontrola	liszaj
ujemny	13	3
Mało	5	4
Średnio	1	3
Dużo	1	8

Tabela 7. Zestawienie ilości przypadków wykazujących ujemną, małą, średnią i dużą ekspresję receptora PAR-2 w śródbłonkach w badanych grupach.



Wykres 17. Analiza immunoekspresji receptora PAR-2 w komórkach śródbłonka w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.



Ryc 14. Dodatnie barwienie immunohistochemiczne w kierunku receptora PAR-2 na terenie śródbłonek (strzałki). Silne w liszaju twardzinowym (A), średnie w liszaju twardzinowym (B) i ujemne w prawidłowej skórze (C).

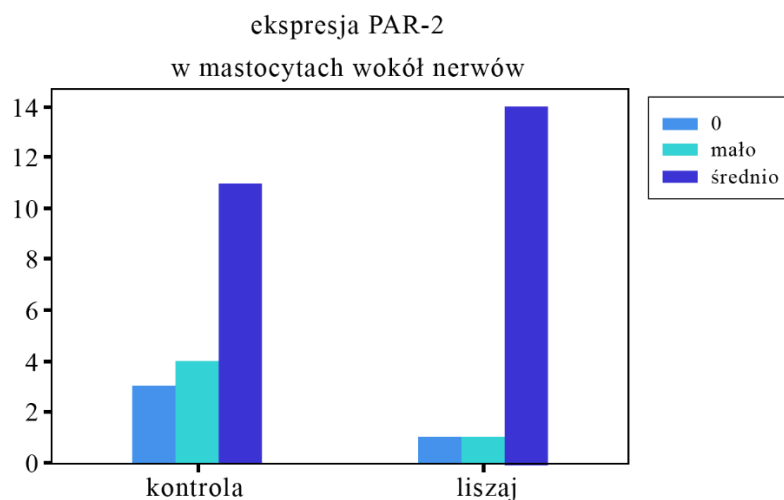
### 6.7.5 Receptor PAR-2 w mastocytach wokół nerwów

Ekspresję receptora PAR-2 w mastocytach wokół skórnych włókien nerwowych oceniano jak w przypadku wcześniejszych parametrów w dużym polu widzenia (high power field, HPF), w polu o najsilniejszej ekspresji odczynu. Ekspresję oceniano metodą półilościową jako ujemną, jeżeli ekspresję wykazywało poniżej 25% ocenianych komórek, małą przy dodatniej ekspresji pomiędzy 25-50%, średnią przy dodatniej ekspresji pomiędzy 50-75% i dużą przy dodatniej ekspresji powyżej 75%. Zestawienie opisanych zmiennych przedstawiają wykres 18 i tabela nr 8. Analiza statystyczna przy użyciu testu Manna-Whitneya wykazała obecność istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami w ekspresji receptora PAR-2 w mastocytach wokół nerwów ( $p=0.04$ ), co oznacza, że w liszaju twardzinowym jest więcej przypadków występowania ekspresji receptora PAR-2 w mastocytach zlokalizowanych wokół włókien nerwowych.

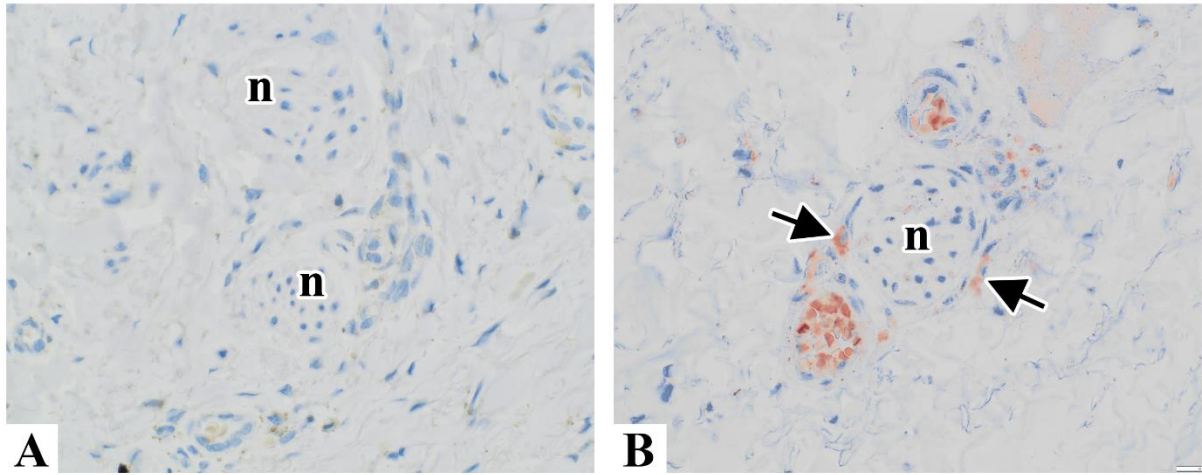
Receptor PAR-2 mastocyty wokół nerwów

	kontrola	liszaj
Ujemny	3	1
Mało	4	1
średnio	11	14

Tabela 8. Zestawienie ilości przypadków wykazujących ujemną, małą i średnią ekspresję receptora PAR-2 w mastocytach wokół nerwów w badanych grupach.



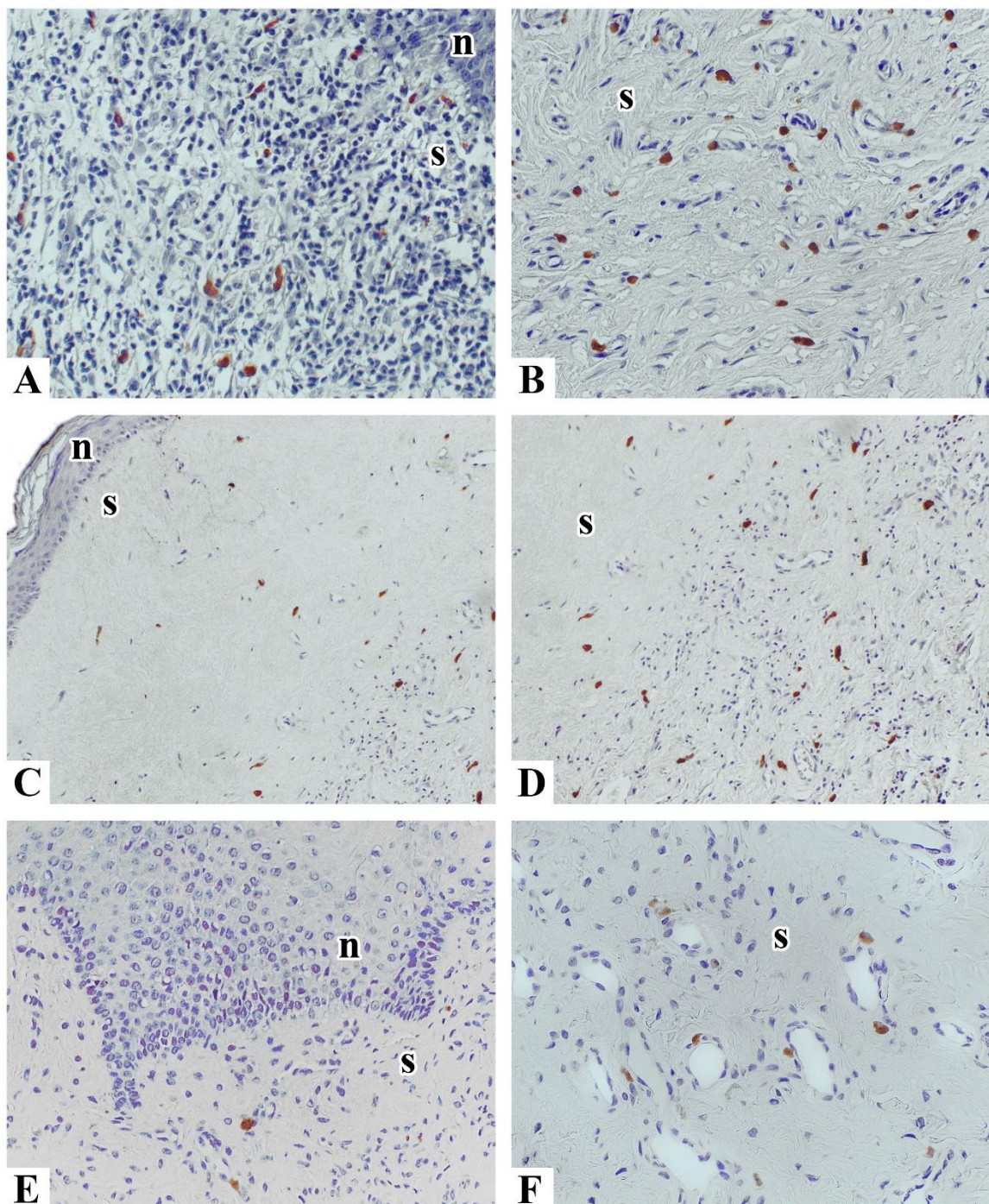
Wykres 18 Analiza immunоекспresji receptora PAR-2 w mastocytach wokół nerwów w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.



Ryc. 15. Barwienie immunohistochemiczne w kierunku PAR-2.  
(A), Włókna nerwowe (n) bez widocznych mastocytów wykazujących ekspresję PAR-2 w sąsiedztwie, w prawidłowej skórze sromu.  
(B) Włókno nerwowe (n) z widocznymi mastocytami (strzałki) w bezpośrednim sąsiedztwie, wykazującymi ekspresję PAR-2 w liszaju twardzinowym.  
powiększenie 400x.

## 6.8 Mastocyty

Mastocyty wyznakowane immunohistochemicznie tryptazą mastocytarną obliczono w jednym dużym polu widzenia (HPF) w miejscu najbardziej intensywnego ich nacieku, odrębnie bezpośrednio pod naskórkiem (rycina 16 A, C, E), w głębszej warstwie (warstwie siatkowatej) skóry właściwej (rycina 16 B, D, F) i wokół włókien nerwowych na terenie skóry właściwej (rycina 17).

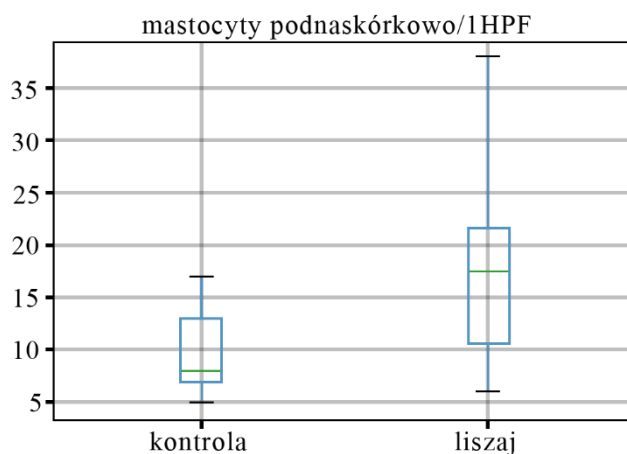


Ryc 16. Barwienie immunohistochemiczne tryptazą znakujące mastocyty.

Liczne mastocyty podnaskórkowe (A) i w skórze właściwej (B) we wczesnej fazie liszaja twardzinowego sromu. Mastocyty podnaskórkowe (C) i w skórze właściwej (D) w zaawansowanym liszaju twardzinowym sromu. Nieliczne mastocyty podnaskórkowe (E) i w skórze właściwej (F) w prawidłowej skórze sromu. n, naskórek, s, skóra właściwa, powiększenie 400x.

### 6.8.1 Podnaskórkowe mastocyty znakowane tryptazą

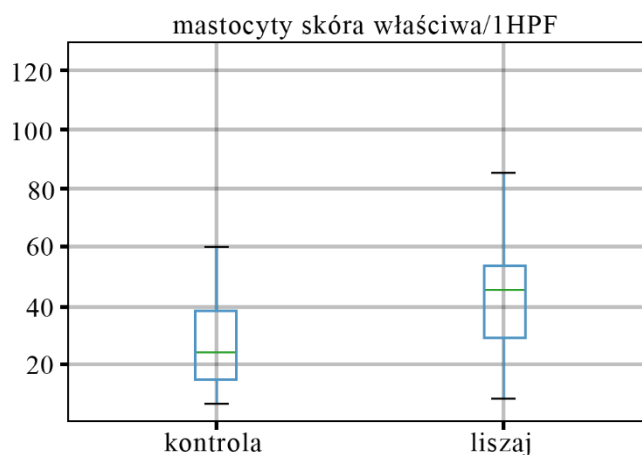
Podnaskórkowo średnia ilość mastocytów w grupie chorych wynosiła 17,75/HPF, mediana 17,5/HPF (wartości mieściły się w przedziale 5 a 38) a w grupie kontrolnej średnia ilość mastocytów wynosiła 9,55/HPF, mediana 8/HPF (wartości mieściły się w przedziale 5 a 17) (wykres 19). Test U Manna-Whitneya wykazał istotne statystycznie różnice pomiędzy medianami w obu badanych grupach ( $p=0,0005$ ).



Wykres 19. Analiza ilości mastocytów/1HPF znakowanych immunohistochemicznie tryptazą obecnych pod naskórkem w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.

### 6.8.2 Mastocyty w warstwie siatkowatej skóry właściwej (tryptaza+)

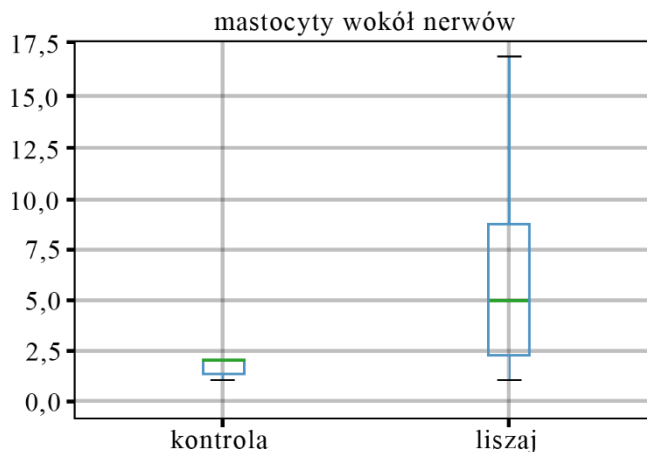
W warstwie siatkowatej skóry właściwej średnia ilość mastocytów w grupie chorych wynosiła 45,05/HPF, mediana 46,00/HPF (wartości mieściły się w przedziale 9 a 115) a w grupie kontrolnej średnia ilość mastocytów wynosiła 31,05/HPF, mediana 24,5/HPF (wartości mieściły się w przedziale 7 a 125) (wykres 20). Test U Manna-Whitneya wykazał istotne statystycznie różnice pomiędzy medianami w obu badanych grupach ( $p=0,01$ ).



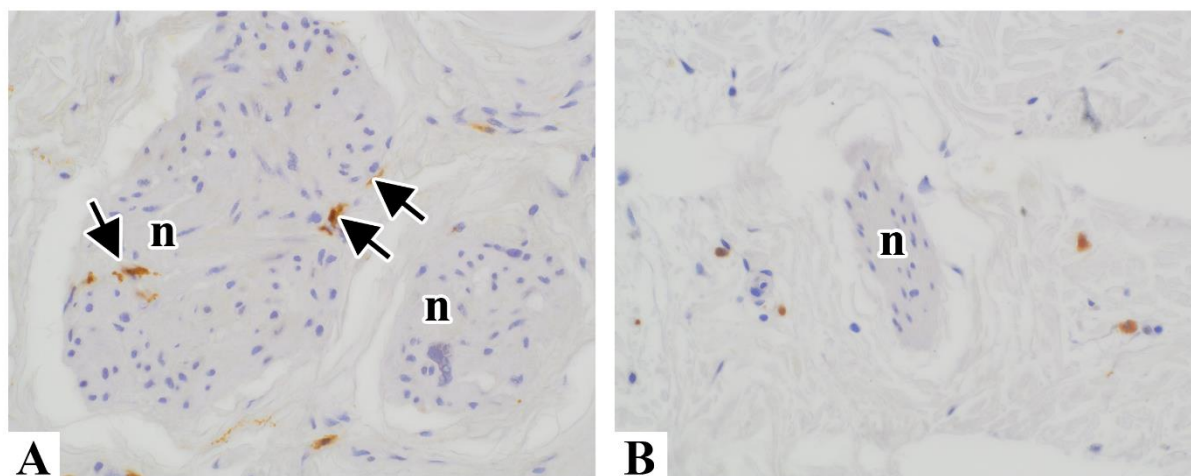
Wykres 20. Analiza ilości mastocytów/1HPF znakowanych immunohistochemicznie tryptazą obecnych w warstwie siatkowatej skóry w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.

### 6.8.3 Mastocyty wokół nerwów (tryptaza+)

Średnia ilość mastocytów wokół włókien nerwowych w grupie chorych wynosiła 6,11/HPF, mediana 5,00/HPF (wartości mieściły się w przedziale 1 a 17) a w grupie kontrolnej średnia ilość mastocytów wokół włókien nerwowych wynosiła 2,83/HPF, mediana 2,00/HPF (wartości mieściły się w przedziale pomiędzy 0 a 9) (wykres 21). Test U Manna-Whitneya wykazał istotne statystycznie różnice pomiędzy medianami w obu badanych grupach ( $p=0,002$ ).



Wykres 21. Analiza ilości mastocytów/1HPF znakowanych immunohistochemicznie tryptazą obecnych wokół skórnych włókien nerwowych w prawidłowej skórze sromu i w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT.



Ryc. 17. Barwienie immunohistochemiczne w kierunku tryptazy.  
(A), Włókna nerwowe (n) z widocznymi mastocytami (strzałki) w sąsiedztwie, w liszaju twardzinowym.  
(B) Włókno nerwowe (n) bez widocznych mastocytów w sąsiedztwie, w prawidłowej skórze sromu.  
powiększenie 400x.

## 7 Dyskusja

Głównym celem pracy było sprawdzenie, czy w tkankach sromu zmienionych w przebiegu LT występują zmiany w mikrounerwieniu i różnice w ekspresji neuropeptydów, receptorów świądu, markera regeneracji nerwów i ilości mastocytów w porównaniu do prawidłowych tkanek sromu. Opublikowane częściowo wyniki badania (Milian-Ciesielska et al., 2017), zgodnie z wiedzą autorki stanowią pierwsze doniesienie w literaturze o występowaniu istotnych zmian w mikrounerwieniu tkanek sromu zmienionych w przebiegu LT, w porównaniu do niezmienionych tkanek sromu.

### 7.1 Śródnaskórkowa gęstość nerwów (ŚGWN)

#### 7.1.1 PGP 9.5

Badanie ŚGWN, przeprowadzone przy użyciu markera PGP 9,5, z zastosowaniem zmodyfikowanego protokołu do oceny neuropatii drobnych włókien nerwowych (NDWN), wykazało istotne jej zmniejszenie w skórze pacjentek z LT. Wyniki te wskazują na możliwość występowania procesu niszczenia drobnych włókien nerwowych w przebiegu choroby i sugerują jego rolę w patogenezie objawów czuciowych. Przy przeprowadzaniu badania nie dysponowano danymi dotyczącymi rodzaju i stopnia nasilenia tych objawów. W kontekście doniesień z literatury o rzadkim (ok 10% przypadków) bezobjawowym przebiegu choroby (Kirtschig, 2016.) można przypuszczać, iż przynajmniej w części badanych przypadków występował świąd, który mógł być wywołany przez uszkodzenie drobnych włókien nerwowych.

Zmniejszenie gęstości śródnaskórkowych włókien nerwowych opisano także w przebiegu wielu chorób z autoagresji jak zespół Sjögrena (Göransson, Brun, Harboe, Mellgren, & Omdal, 2006), celiakia (Brannagan et al., 2005), czy toczeń trzewny (Omdal et al., 2002). Dane te mogą przemawiać za istotnym udziałem patologicznych procesów w obwodowym układzie nerwowym w schorzeniach autoimmunologicznych. Jest bardzo prawdopodobne, że nie wszystkie badane przypadki LT były wywołane obecnością autoprzeciwciał. Przeciwciała w klasie IgG przeciwko glikoproteinom macierzy zewnątrzkomórkowej (extracellular matrix protein 1, ECM-1) są obecne w surowicy krwi u ok. 75% pacjentek (Oyama et al., 2003), a liczba pacjentek posiadających przeciwciała przeciwko błonie podstawnej (basement membrane zone- BMZ) jest jeszcze niższa – ok. 33% (Howard et al., 2004). Badanie kliniczne określające relację gęstości śródnaskórkowych włókien nerwowych do poziomu autoprzeciwciał w surowicy pacjentek z LT mogłoby wnieść cenne informacje w tym zakresie.

Spektra objawów czuciowych NDWN i LT w znacznej części pokrywają się. W oparciu o mechanizm powstawania uczucia świądu, można spekulować, iż przynajmniej do pewnego stopnia świąd występujący w przebiegu LT sromu ma charakter zbliżony do neuropatii obwodowej, związanej z uszkodzeniem, drobnych włókien nerwowych. W badaniu nie można było zastosować ścisłych kryteriów służących do postawienia diagnozy NDWN ze względu m. in. na brak wartości referencyjnych dotyczących gęstości unerwienia tkanek sromu w zależności od wieku pacjentek. Należy również zauważyć, iż zmniejszenie gęstości śródnaskórkowych włókien nerwowych jest opisywane nie tylko w przebiegu NDWN. Może być ono wywołane uszkodzeniem dużych nerwów (np. w sytuacji przewlekłego ucisku) lub nawet samym drapaniem, co dodatkowo utrudnia interpretację wyników (Dellon, 2015). Dalsze badania powinny mieć powyższe na uwadze i uwzględnić możliwość występowania innych przyczyn uszkodzenia drobnych włókien nerwowych.



### 7.1.2 GAP-43

Niniejsze badanie wykazało również znaczące zmniejszenie ilości śródnaskórkowych włókien nerwowych wykazujących ekspresję GAP 43 w skórze zmienionej w przebiegu liszaja twardzielowego, w porównaniu do prawidłowej skóry sromu. Białko GAP-43 jest uważane za marker regeneracji i plastyczności nerwów (Fantini & Johansson, 1992) i w prawidłowych warunkach jego ekspresję wykrywa się u ludzi w śródnaskórkowych i skórnych włóknach nerwowych (Verzé, Carla, Maurizo, Monica, & Giancarlo, 2003). Według wiedzy autorki dotychczas nie przeprowadzono badania określającego ekspresję białka GAP-43 w skórze zmienionej w przebiegu LT. W literaturze opisano zmniejszenie gęstości śródnaskórkowych włókien nerwowych wykazujących ekspresję GAP-43 w NDWN (Scheytt et al., 2015) jak i w szczególnej postaci NDWN związanej z cukrzycą typu 2 (Bursova et al., 2012). Co więcej, w grupie pacjentów z wczesną (trwającą do 3 lat) NDWN, obejmującej przypadki o różnorodnej etiologii, stwierdzono zwiększenie ekspresji genu kodującego GAP-43 w skórze uda w porównaniu do grupy kontrolnej. U pacjentów z dłuższą trwającą neuropatią nie stwierdzono takiej zależności (Scheytt et al., 2015). Opisana również na zwierzęcym modelu uszkodzenia nerwu zwiększona ekspresja czynników związanych z regeneracją, w tym białka GAP-43, utrzymująca się do 6 miesięcy od momentu uszkodzenia (Sulaiman & Gordon, 2013) może mieć kluczowe znaczenie w możliwości odpowiedzi organizmu na leczenie.

Ponieważ z doniesień z literatury wynika, iż ekspresja białka GAP-43 odzwierciedla potencjał do regeneracji i zmian w budowie (remodelowania) włókien nerwowych, wydaje się, iż jest on zmniejszony w przebiegu NDWN, przynajmniej w dłuższej trwającej chorobie. Wyniki opisywanego badania wskazują również na możliwość występowania tego zjawiska w LT sromu.

W badaniach prawidłowej ludzkiej skóry zaobserwowano większą ilość włókien nerwowych wykazujących ekspresję GAP-43 na terenie naskórka w porównaniu do głębszych warstw skóry. Zwiększony potencjał do regeneracji i przebudowy naskórkowych zakończeń nerwowych wydaje się częściowo tłumaczyć fakt ciągłego przemieszczania się komórek naskórka w kierunku powierzchni i ich dalszego złuszczenia. Stała utrata komórek naskórka w warunkach prawidłowych może być jednym z lokalnych czynników promujących ekspresję GAP-43 na terenie śródnaskórkowych włókien nerwowych (Verzé et al., 2003). Ścieńczenie i zanik naskórka obserwowane w przebiegu LT mogą mieć również opisany powyżej wpływ na zmniejszenie ilości włókien nerwowych wykazujących ekspresję GAP-43.

W literaturze istnieją sprzeczne doniesienia na temat związku pomiędzy wzrostem ekspresji GAP-43 na terenie włókien nerwowych, a występowaniem objawów czuciowych. Opisano wzrost gęstości śródnaskórkowych włókien nerwowych znakowanych GAP-43 u pacjentów zgłaszających uczucie piekącego bólu w przebiegu NDWN związanej z cukrzycą, w porównaniu do pacjentów z cukrzycową NDWN niezgłaszających objawów bólowych (Galosi et al., 2018). Można również znaleźć badania, w których nie stwierdzono związku pomiędzy ekspresją GAP-43 na terenie włókien nerwowych a występowaniem objawów bólowych w przebiegu cukrzycowej NDWN (Bönhof et al., 2017). W niniejszym badaniu ze względu na brak danych klinicznych dotyczących objawów czuciowych u pacjentek nie można rozważać takiej zależności.

Podsumowując, ekspresja białka GAP-43 na terenie włókien nerwowych w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT świadczy o zachowanym do pewnego stopnia ich potencjale do regeneracji i remodelingu. Prawdopodobnie jest on jednak zbyt mały, by odpowiednio przeciwdziałać toczącemu się procesowi uszkodzenia włókien nerwowych. Interesującym kierunkiem badań wydaje się być ocena ekspresji białka GAP-43 w nowo zdiagnozowanych przypadkach LT

sromu, która pozwoliłaby ocenić potencjał regeneracyjny nerwów na wczesnym etapie zaawansowania choroby i ewentualnie rozważyć celowość wcześniej wdrożonego leczenia stymulującego rozrost włókien nerwowych (np. podawanie nerwowych czynników troficznych – nerve growth factors).

### 7.1.3 Potencjalne przyczyny zmniejszenia śródnaskórkowej gęstości nerwów

Chociaż zjawisko zmniejszenia gęstości śródnaskórkowych włókien nerwowych w tkankach sromu zmienionych w przebiegu LT nie budzi wątpliwości, patofizjologiczne podłoże tego procesu nie jest wyjaśnione. W bolesnej neuropatii cukrzycowej za proces zaniku włókien nerwowych odpowiadają między innymi zmiany w mikrounacznieniu nerwów i lokalne zaburzenia przepływu krwi (Rosenberger et al., 2020). Nie jest więc wykluczone, iż w procesie postępującego włóknienia i bliznowacenia tkanek w LT może dochodzić do zaburzeń ukrwienia, niedotlenienia i następowego zaniku włókien nerwowych. W chorobach skóry przebiegających ze świadem postuluje się również istnienie mechanizmu sprzężenia zwrotnego, który prowadziłby do samoregulującej się hipoplazji nerwów w sytuacji nadmiernego pobudzenia, co miałoby modyfikować intensywność i liczbę przekazywanych sygnałów. Dowodem na istnienie tego mechanizmu wydaje się być zmniejszenie liczby włókien nerwowych w skórze pacjentów z neuropatią obwodową (Tominaga & Takamori, 2014b). Na proces wydłużania się włókna nerwowego i jego przenikania przez błonę podstawną naskórka mają wpływ, nie w pełni poznane wzajemne zależności pomiędzy neurotrofinami, wiązaniem się intergryn z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej i wydzielaniem metaloproteinaz w obrębie stożka wzrostu aksonu. Opisano rolę metaloproteinazy 2 i 8 w procesie elongacji włókien nerwowych oraz stymulację ich syntezy przez ich substraty jak różne typy kolagenu (typ I, III i IV) i białka macierzy zewnątrzkomórkowej (laminina, fibronektyna) (Tominaga & Takamori, 2014b). W LT sromu w zmienionej chorobowo tkance zaobserwowano liczne zaburzenia w składzie białek macierzy zewnątrzkomórkowej (Gambichler et al., 2012), zaburzenia dystrybucji metaloproteinaz i ich inhibitorów (De Oliveira et al., 2012) oraz obecność autoprzeciwciał przeciwko białku macierzy zewnątrzkomórkowej 1 (ECM1) (I. Chan, 2004) i ich wpływ na nieprawidłowe odkładanie kolagenu (Godoy et al., 2015). Niszczenie białek macierzy zewnątrzkomórkowej i zaburzenia ich składu mogą mieć znaczący wpływ na proces wydłużania włókien nerwowych i ich przenikania przez błonę podstawną naskórka, potrzebne są jednak dalsze badania pozwalające bliżej opisać te zależności.

### 7.1.4 CGRP

Z drugiej strony w wielu przewlekłych zapalnych chorobach skóry przebiegających ze świadem jak atopowe zapalenie skóry (Tominaga & Takamori, 2014a), czy niektóre postacie łuszczycy (Szepietowski & Reich, 2016) stwierdzono wzrost ŚGWN. Unerwienie naskórka jest wynikiem równowagi pomiędzy czynnikami pobudzającymi wzrost włókien nerwowych, takich jak czynnik wzrostu nerwów (nerve growth factor, NGF) a czynnikami hamującymi i chemorepulsywnymi („odpychającymi” neurony) jak semaforina 3A (semaphorin 3A) (Tominaga & Takamori, 2014a). Zwiększoną ilość śródnaskórkowych włókien nerwowych wykazujących ekspresję CGRP wykazano w skórze zmienionej chorobowo w przebiegu łuszczycy (J. Chan et al., 1997), przewlekłej spontanicznej pokrzywki (Kay et al., 2014), czy w bliznach przerostowych poparzeniowych (Kwak et al., 2014). Ostatnio opisany został wzrost ilości śródnaskórkowych drobnych niezmielinizowanych włókien nerwowych typu C wykazujących ekspresję CGRP w modelu zwierzęcym „suchej skóry” z towarzyszącym drapaniem (Andoh, Asakawa, & Kuraishi, 2018). W literaturze przedstawiony został mechanizm szybkiego (już po 1-3 dni) wzrostu ilości skórnych włókien nerwowych i wzrostu poziomu CGRP i innych neuropeptydów w odpowiedzi

na drapanie (Russell et al., 2014). Zaobserwowany w niniejszym badaniu wzrost ilości śródskórkowych nerwów wykazujących ekspresję CGRP może być również spowodowany przewlekłym drapaniem. Wy tłumaczeniem dla tych obserwacji może być również opisane zjawisko wzmożonej syntezy CGRP w stanach uszkodzenia nerwów i w przewlekłych stanach zapalnych (Russell et al., 2014), które można zaobserwować również w LT.

## 7.2 Receptor opioidowy $\mu$

W naszych badaniach wykazaliśmy ekspresję receptora opioidowego  $\mu$  w obrębie keratynocytów, drobnych włókien nerwowych i w obrębie leukocytów. Analiza statystyczna nie wykazała różnic w ŚGWN wykazujących ekspresję receptora opioidowego  $\mu$  i lokalizacji receptora w obrębie keratynocytów pomiędzy grupą kontrolną i LT, natomiast stwierdzono istotne różnice w ilości leukocytów z ekspresją tego receptora. Oznacza to, że w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT więcej leukocytów wykazuje ekspresję receptora opioidowego  $\mu$  niż w grupie kontrolnej.

### 7.2.1 Ekspresją receptora opioidowego $\mu$ na leukocytach

Obwodowe przeciwbólowe i przeciwzapalne efekty działania opioidów obserwowane są w tkankach zmienionych zapalnie, gdzie endogenne opioidy (beta-endorfina, met-enkefalina i dynorfina A) są uwalniane głównie z pęcherzyków wydzielniczych aktywowanych komórek układu odpornościowego pod wpływem NA, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  i CRF. 30-40% leukocytów obecnych w miejscu zapalenia zawiera opioidy. We wczesnych etapach zapalenia są to głównie neutrofile, w późniejszych monocyty i makrofagi. Uwolnione opioidy poprzez swoje receptory obecne na zakończeniach czuciowych włókien nerwowych hamują uczucie bólu, co zapobiega dalszemu uszkodzeniu i przyspiesza gojenie tkanek (Sehgal, Smith, & Manchikanti, 2011). Dodatkowo endogenne opioidy uwalniane przez leukocyty działają immunosupresyjnie, w sposób auto- i parakryny hamując ich działanie i dalszy napływ do miejsca zapalenia, poprzez zmniejszenie uwalniania cytokin i chemokin (Ninković & Roy, 2013). Opisano obecność receptora opioidowego  $\mu$  na limfocytach T i B, neutrofilach, makrofagach/monocytach i komórkach dendrytycznych. Jego aktywacja w odpowiedzi na opioidy egzo- i endogenne prowadzi do hamowania układu immunologicznego (Ninković & Roy, 2013). W badaniach z wykorzystaniem agonistów receptora opioidowego  $\mu$  u ludzi i u zwierząt oraz w badaniach z wykorzystaniem myszy pozbawionych genu tego receptora wykazano, iż immunosupresyjne działanie opioidów zachodzi głównie za jego pośrednictwem. Pobudzenie receptora prowadzi do zahamowania funkcji limfocytów T i NK, spadku produkcji przeciwciał i cytokin prozapalnych, zahamowania proliferacji limfocytów, indukcji apoptozy oraz zahamowania fagocytozy i właściwości bójczych makrofagów i neutrofilów (Eisenstein, 2019). W literaturze niewiele jest doniesień na temat ekspresji receptora opioidowego  $\mu$  na terenie leukocytów w chorobach zapalnych skóry. Opisane w prezentowanym badaniu zwiększenie jego ekspresji w leukocytach w skórze sromu zmienionej w przebiegu LT jest zgodne z obserwacjami dotyczącymi jego istotnej roli w modulowaniu stanu zapalnego i najprawdopodobniej jest związane z jego immunosupresyjnym działaniem w odpowiedzi na przewlekle utrzymujący się stan zapalny.

### 7.2.2 Ekspresja receptora opioidowego $\mu$ na zakończeniach nerwów czuciowych

Badania na modelu zwierzęcym wykazały, iż wraz z rozwojem stanu zapalnego zwiększa się synteza receptora opioidowego  $\mu$  w ciałach komórek zwojów korzeni grzbietowych nerwów rdzeniowych i jego transport aksonalny do zakończeń nerwowych. W późniejszych etapach zapalenia zaobserwowano zwiększenie ilości receptora na zakończeniach włókien nerwowych oraz

zwiększenie ilości nerwów wykazujących ekspresję receptora, podczas gdy jego powinowactwo do agonistów nie zmienia się. Receptor aktywowany jest przez endogenne opioidy uwalniane z leukocytów, co prowadzi do zahamowania powstawania uczucia bólu w zapalnie zmienionych tkankach (Sehgal et al., 2011). Dodatkowo w stanie zapalnym opisano zwiększenie przepuszczalności tzw. bariery perineurialnej (onierwialnej), co zwiększa dostępność receptora opioidowego  $\mu$  na czuciowych zakończeniach nerwowych i nasila lokalne przeciwbólowe działanie opioidów w miejscach zmienionych zapalnie (Sehgal et al., 2011). Chociaż w literaturze można znaleźć opisy dotyczące wzrostu gęstości śródskórkowych włókien nerwowych w chorobach skóry przebiegających ze świądem i bólem oraz relacji ilości śródskórkowych nerwów do ekspresji receptora opioidowego  $\mu$  na terenie naskórka (vide dalsza część rozdziału) według wiedzy autorki w chorobach skóry nie została zbadana gęstość śródskórkowych włókien nerwowych wykazujących ekspresję tego receptora. Stwierdzony w prezentowanym badaniu brak różnic w gęstości unerwienia naskórka włóknami nerwowymi zawierającymi receptor opioidowy  $\mu$  może świadczyć, iż nie odgrywa on istotnej roli w patogenezie objawów czuciowych w przebiegu LT.

### 7.2.3 Ekspresja receptora opioidowego $\mu$ w keratynocytach

W badaniach immunohistochemicznych i molekularnych stwierdzona została obecność receptora opioidowego  $\mu$  w obrębie keratynocytów (Bigliardi-Qi, Lipp, Sumanovski, Buechner, & Bigliardi, 2005). W atopowym zapaleniu skóry, w badaniu przeprowadzonym na biopsjach skóry od 13 pacjentów stwierdzono immunohistochemicznie spadek ilości receptora opioidowego  $\mu$  oraz zmniejszenie ekspresji jego mRNA na terenie keratynocytów naskórka. Dodatkowo opisano różnice w lokalizacji receptora w obrębie naskórka (w skórze zdrowej głównie bezpośrednio nad warstwą podstawną, natomiast w skórze pacjentów z AZS głównie w warstwie ziarnistej) i przemieszczenie receptora z błony komórkowej w obszar okołojądrowy keratynocytów (internalizacja receptora). Autorzy badania postawili hipotezę, mówiącą, że internalizacja receptora na terenie keratynocytów pośrednio i relatywnie zwiększa dostępność i możliwość pobudzenia tego samego receptora na zakończeniach śródskórkowych włókien nerwowych poprzez endogenne opioidy obecne na terenie naskórka, tym samym przyczyniając się do powstawania uczucia świądu (Bigliardi-Qi et al., 2005). Jednak w innych badaniach u pacjentów z AZS nie potwierdzono różnic w ekspresji receptora opioidowego  $\mu$  na terenie naskórka, w porównaniu do prawidłowej skóry, opisano natomiast zmniejszenie ekspresji receptora opioidowego  $\kappa$  u pacjentów z AZS w porównaniu do skóry pacjentów zdrowych. Co więcej, po leczeniu fotochemioterapią (PUVA) stwierdzono spadek ekspresji receptora opioidowego  $\mu$ , przy niezmienionej ekspresji receptora  $\kappa$  (Tominaga, Ogawa, & Takamori, 2007). Podobnie brak różnic w ekspresji receptora opioidowego  $\mu$  i spadek ekspresji receptora  $\kappa$  w porównaniu do zdrowej skóry opisano u pacjentów z łuszczycą (Taneda et al., 2011). Wyniki te wskazują na rolę receptorów opioidowych obecnych na terenie naskórka w wywoływaniu i modulowaniu uczucia świądu, jakkolwiek nie jest ona dostatecznie poznana i wydaje się być wieloczynnikowa. Postawiona została również hipoteza o wpływie nieneuronalnych receptorów opioidowych na produkcję czynników świądotwórczych przez keratynocyty (Tominaga et al., 2007). W badaniu klinicznym z użyciem placebo wykazano skuteczność leczenia przewlekłego świądu, przy stosowaniu miejscowym antagonisty receptora opioidowego  $\mu$ , naltrexonu (Bigliardi et al., 2007). W badaniu tym stwierdzono również zmniejszoną ekspresję receptora opioidowego  $\mu$  na terenie naskórka u chorych z przewlekłym świądem i wzrost jego ekspresji po zastosowanym leczeniu, szczególnie w warstwie ziarnistej. Chociaż obecność zaburzeń w układzie opioidowym na terenie naskórka w przewlekłych chorobach skóry jest znana badaczom, brak odpowiednich narzędzi przez dłuższy czas uniemożliwiał dalsze poznawanie tych złożonych zależności. W opublikowanym niedawno badaniu na

hodowlach komórkowych keratynocytów z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie peptydów opioidowych, opisano dynamikę interakcji pomiędzy receptorem opioidowym  $\mu$  a jego ligandem. Potwierdzone też zostało zjawisko internalizacji receptora do wnętrza komórki po jego połączeniu z ligandem. Dodatkowo stwierdzono, że w obecności antagonisty receptora (naltrexonu) znacznie zredukowane były procesy przyłączania ligandu i przemieszczania się receptora do wnętrza komórki. Stwierdzono też intensywniejszą immunоекspresję receptora na powierzchni dojrzałych keratynocytów w stosunku do niedojrzałych, znajdujących się fizjologicznie w dolnych warstwach naskórka (Leong et al., 2017). Opisane zjawiska wydają się potwierdzać hipotezę o roli naskórkowego receptora opioidowego w modulowaniu uczucia świądu. Wzrost jego ekspresji na powierzchni keratynocytów po leczeniu naltrexonem powoduje „kompetycyjne” hamowanie pobudzania tego receptora na zakończeniach śródnaskórkowych włókien nerwowych, co prawdopodobnie skutkuje redukcją uczucia świądu (Bigliardi et al., 2007).

Jak wynika z powyższych publikacji pozaneuronalne receptory opioidowe mają złożony i nie w pełni poznany wpływ na wywoływanie i modulowanie uczucia świądu w zmienionej chorobowo skórze. W opisywanym badaniu, podobnie jak w innych dermatozach przebiegających z uczuciem świądu, na terenie naskórka nie stwierdzono istotnych różnic w ekspresji receptora opioidowego  $\mu$  pomiędzy grupą chorych na LT a grupą kontrolną. Nawiązując do doniesień dotyczących innych przewlekłych chorób skóry przebiegających ze świądem, wskazane byłoby oznaczenie ekspresji receptora po zastosowaniu leczenia jego antagonistą, co mogłoby poszerzyć wiedzę dotyczącą możliwości wpływu receptora opioidowego  $\mu$  na wywoływanie objawów czuciowych w LT.

### 7.3 Mastocyty

W niniejszym badaniu stwierdzono zwiększoną ilość mastocytów w skórze chorych z LT w porównaniu do skóry zdrowej, zarówno bezpośrednio pod naskórkiem jak i w warstwie siatkowej skóry właściwej oraz w bezpośrednim sąsiedztwie nerwów skóry właściwej. Mastocyty pełnią istotną rolę nie tylko w wywoływaniu ostrego świądu, mediowanego przez histaminę pochodzącą z ich ziarnistości, ale także w inicjacji, podtrzymywaniu i modulowaniu neurogenego stanu zapalnego, który wiąże się z powstaniem przewlekłego świądu. W literaturze przedmiotu funkcjonuje pojęcie świądu histaminergicznego - ostrego, zależnego od histaminy i świądu niehistaminergicznego - przewlekłego, zależnego od aktywacji receptora PAR-2. Opisano odrębne drogi nerwowe przewodzące dwa powyższe rodzaje świądu (Dhand & Aminoff, 2014). *Nota bene* w jednej z prac użyto pojęcia „neurony histaminergiczne” w odniesieniu do obwodowych włókien nerwowych zawierających receptory histaminowe H1 i H4 i ulegających pobudzeniu po aktywacji receptorów przez histaminę (Yosipovitch et al., 2018). Takie określenie wydaje się nie być w pełni ścisłe, ponieważ „neurony histaminergiczne” definiuje się raczej jako neurony syntetyzujące i zawierające histaminę (Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., 1999). Wydaje się, że bardziej właściwie byłoby określać neurony posiadające receptor dla histaminy jako "histaminoreceptywne".

Neuromediatory uwalniane w wyniku aktywacji wolnych zakończeń nerwowych powodują rozwój i nasilenie stanu zapalnego oraz aktywację mastocytów. Aktywowane mastocyty poza licznymi mediatorami stanu zapalnego (histamina, serotonina, prostaglandyny) uwalniają tryptazę, która aktywuje receptor PAR-2 obecny na zakończeniach nerwów czuciowych. Pobudzenie receptora PAR-2 skutkuje nasileniem uwalniania SP i CGRP oraz obniżeniem progu pobudliwości dla receptorów TRP, co poza obrzękiem skutkuje powstaniem uczucia świądu i bólu. W badaniach nad przewlekłymi chorobami skóry przebiegającymi ze świądem (łuszczyca, atopowe zapalenie skóry, pokrzywka, świerzbączka guzkowa) wykazano nie tylko zwiększoną koncentrację

cję mastocytów w zmienionej chorobowo skórze, ale również stwierdzono morfologiczny kontakt pomiędzy SP-dodatnimi i CGRP-dodatnimi włóknami nerwowymi i mastocytami, co stanowi morfologiczny mocny argument na istnienie interakcji pomiędzy nerwami i mastocytami i ich rolę w patogenezie neurogennego stanu zapalnego (Siiskonen & Harvima, 2019). Aktywacja receptora PAR-2 jest kluczowa dla rozwoju lokalnego stanu zapalnego. Chemiczna ablacja czuciowych włókien nerwowych skutkuje redukcją stanu zapalnego wywołanego przez agonistę receptora PAR-2. Natomiast zahamowanie degranulacji mastocytów nie powoduje takiego efektu. Wydaje się więc, że pobudzenie receptora PAR-2 odgrywa kluczową rolę w rozwoju neurogenego stanu zapalnego, a mastocyty wokół włókien nerwowych stanowią głównie źródło proteaz potrzebnych do aktywacji receptora (Rothmeier & Ruf, 2012).

Wyniki niniejszego badania są zgodne z doniesieniami dotyczącymi podwyższonej koncentracji mastocytów w innych dermatozach przebiegających ze świądem i silnie sugerują istotny wpływ mastocytów na patogenezę objawów czuciowych, a także stanowią morfologiczny dowód na interakcję pomiędzy mastocytami a włóknami nerwowymi i obecność neurogenego stanu zapalnego w przebiegu LT. Należy jednak zaznaczyć, iż w chorobach skóry z silnie wyrażonym neurogenym zapaleniem obserwuje się wzrost gęstości śródskórnokowych włókien nerwowych, który jest między innymi wynikiem wzrostu wydzielania NGF przez mastocyty i naskórek. Natomiast w LT zaobserwowano wyraźne zmniejszenie gęstości nerwów śródskórnokowych, co może świadczyć, iż w tej jednostce chorobowej przeważają procesy uszkodzające tkanki, w tym włókna nerwowe, dodatkowo powodujące ich nadmierną wrażliwość, a procesy prowadzące do wzrostu gęstości unerwienia, wynikające z przewlekłego, neurogenego stanu zapalnego mają mniejsze znaczenie.

Poza rolę w wywoływaniu i regulacji stanu zapalnego mastocyty biorą udział w procesach gojenia i przebudowy tkanki łącznej oraz stymulują proliferację komórek. W procesach włóknienia, związanych z gojeniem i przebudową tkanek wiodącą rolę odgrywa proliferacja fibroblastów. Opisane zostało zjawisko pobudzania proliferacji fibroblastów przez mastocyty na drodze parakrynej. Badania wykazały, iż mediatorami w tym procesie są tryptaza i receptor PAR-2, natomiast proces ten nie jest mediowany przez histaminę czy TNF- $\alpha$  (Albrecht et al., 2005). W literaturze przedmiotu niewiele jest doniesień na temat roli receptora PAR-2 w procesach przebudowy tkanek w chorobach zapalnych skóry. Opisano zwiększenie ekspresji receptora PAR-2 w fibroblastach skóry zmienionej w przebiegu twardziny układowej. Ponadto w cytowanym badaniu autorzy opisują zaobserwowane *in vitro* zjawisko aktywacji receptora PAR-2 na fibroblastach wyłącznie pod wpływem wcześniejszego zadziałania czynników uszkodzających (Cevikbas et al., 2011).

Chociaż w niniejszym badaniu nie stwierdzono istotnie zwiększonej ekspresji receptora PAR-2 na terenie fibroblastów w skórze zmienionej w przebiegu LT w porównaniu do skóry zdrowej (zob. dalsza część rozdziału), w większości przypadków LT była ona wysoka lub średnia. Przypuszcza się, iż za nasilenie procesu włóknienia i przebudowy tkanki łącznej odpowiada nie tylko ilość i skład receptorów na powierzchni fibroblastów, ale także ilość tryptazy i TNF- $\alpha$  wydzielanych przez mastocyty (Albrecht et al., 2005). Biorąc pod uwagę znacznie zwiększoną ilość mastocytów w skórze chorych z LT i ich lokalizację w bliskim sąsiedztwie fibroblastów wydaje się, iż mogą one również odgrywać istotną rolę w wybitnie nasilonym procesie przebudowy tkanki łącznej, charakterystycznym dla tej jednostki chorobowej. Dotychczas w LT sromu opisano wpływ autoprzeciwciał klasy IgG przeciwko glikoproteinom macierzy zewnątrzkomórkowej na wiązanie glikoprotein z metalopeptydazą 9, co prowadzi do nadmiernej syntezy kolagenu, szczególnie typu V oraz degradacji i pogrubienia błony podstawnej (Krapf et al., 2020). Stwierdzono również wpływ galektyny-7 (białka pochodzącego z keratynocytów) na zahamowanie proliferacji fibroblastów i wzrost syntezy kolagenu I i III. W naskórku tkanek zmienionych w

przebiegu LT sromu poziom galektyny 7 jest istotnie zwiększony w porównaniu do prawidłowego naskórka (Zhao, Zhao, Li, Qin, & Wu, 2018). W badaniach molekularnych opisano znaczące zwiększenie ekspresji microRNA-155-5p, co jak wykazano ma pobudzający wpływ na proliferację fibroblastów (Ren, Zhao, Huo, & Wu, 2018).

Podsumowując, proces włóknienia i nadmiernej syntezy kolagenu jest wybitnie nasilony w przebiegu LT i odpowiada za wiele z jego powikłań prowadzących do obniżenia jakości życia chorych. Z przeglądu piśmiennictwa na temat tego procesu w tkankach zmienionych w przebiegu LT wynika, iż jego podłoże nie zostało w pełni wyjaśnione, a badania koncentrują się odkryciu nowych, potencjalnych punktów uchwytu terapii, które mogłyby go zahamować. Wyniki niniejszej pracy stanowią przyczynek do dalszych badań nad rolą mastocytów i receptora PAR-2 w tym obszarze.

## 7.4 PAR-2

Ekspresję receptora PAR-2 stwierdzono w obrębie keratynocytów, mieszków włosowych, komórek dendrytycznych, leukocytów, fibroblastów, gruczołów potowych, łojowych w komórkach śródbłonna i na terenie drobnych włókien nerwowych zarówno w skórze zdrowej jak i w skórze zmienionej w przebiegu LT. Analiza statystyczna wykazała obecność istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami w ekspresji receptora PAR-2 na terenie komórek śródbłonna naczyń krwionośnych ( $p=0.0002$ ) i w mastocytach wokół nerwów ( $p=0.04$ ), co oznacza że w LT jest więcej przypadków występowania ekspresji receptora PAR-2 w komórkach śródbłonna i mastocytach zlokalizowanych wokół włókien nerwowych w porównaniu do skóry zdrowej.

Silniejsza ekspresja receptora PAR-2 w mastocytach wokół włókien nerwowych w LT, w połączeniu z opisaną uprzednio ich większą liczbą w tej lokalizacji silnie sugeruje istotną rolę mastocytów i receptora PAR-2 w patogenezie LT. Uzyskane wyniki według wiedzy autorki są pierwszymi opisującymi znaczenie mastocytów i receptora PAR-2 w LT sromu, jednocześnie są one zgodne z wynikami opublikowanych badań nad innymi przewlekłymi chorobami skóry przebiegającymi ze świądem. In vitro aktywacja receptora PAR-2 na mastocytach skutkuje ich degranulacją, uwolnieniem histaminy i TNF- $\alpha$  (V. Shpacovitch, Feld, Hollenberg, Luger, & Steinhoff, 2008). Rola aktywacji receptora PAR-2 na mastocytach w skórze zdrowej i zmienionej chorobowo nie została w dostatecznie poznana. Opisano zwiększenie ilości mastocytów wykazujących ekspresję receptora PAR-2 w skórze chorych z łuszczycą, liszajem płaskim i rakiem podstawnocomórkowym w porównaniu do skóry zdrowej. Dodatkowo w cytowanym badaniu stwierdzono in vitro wzrost wydzielania IL-8 przez mastocyty po podaniu agonisty receptora PAR-2 (da Silva Carvalho, Nilsson, & Harvima, 2010). IL-8 jest cytokiną prozapalną, która wykazuje działanie chemotaktyczne dla neutrofilów oraz stymuluje ich degranulację i proliferację (Kany, Vollrath, & Relja, 2019). Ponadto odgrywa rolę w pobudzaniu tworzenia nowych naczyń krwionośnych (neoangiogeneza) i włóknienia (fibrogeneza) (Elieh Ali Komi, Wöhrle, & Bielory, 2019), procesach związanych z gojeniem i przebudową tkanki łącznej, silnie wyrażonych również w przebiegu LT sromu. Chociaż rola IL-8 w LT nie została dotychczas zbadana, biorąc pod uwagę również doniesienia dotyczące jej udziału w rozwoju liszaja płaskiego błony śluzowej jamy ustnej i prawdopodobnie w transformacji nowotworowej do raka płaskonabłonkowego (Elieh Ali Komi et al., 2019), wydaje się ona być obiecującym kierunkiem dalszych badań. Dodatkowo u pacjentów z atopowym zapaleniem skóry (AZS) w skórze zmienionej chorobowo stwierdzono obecność włókien nerwowych wykazujących silniejszą ekspresję PAR-2 z obecnością licznych mastocytów w ich bezpośrednim sąsiedztwie, w porównaniu do skóry zdrowej (Steinhoff et al., 2003).

W niniejszym badaniu stwierdzono również silniejszą ekspresję receptora PAR-2 w śródbłonkach naczyń skóry zmienionej w przebiegu LT w porównaniu do skóry zdrowej. Wyniki te są zgodne z danymi z literatury mówiącymi o wzroście ekspresji receptora PAR-2 w śródbłonkach w chorobach zapalnych skóry (Cevikbas et al., 2011). W komórkach śródbłonka drobnych, skórnych naczyń krwionośnych twierdzono jego pobudzające działanie na syntezę cytokin prozapalnych (IL-6, IL-8). Udowodniono również jego wpływ na napięcie ścian naczyń krwionośnych i proliferację komórek śródbłonka (V. M. Shpacovitch et al., 2002). Opisano również prozapalną rolę receptora PAR-2 na terenie śródbłonek naczyń krwionośnych w procesie tworzenia płytek miażdżycowych, który po aktywacji bezpośrednio i pośrednio stymuluje komórki śródbłonka do produkcji czynników chemotaktycznych dla leukocytów (IL-8), co nasila proces zapalny w ścianach naczyń (Sandberg et al., 2009). W oparciu o powyższe doniesienia wyniki niniejszego badania pozwalają przypuszczać, iż również w przebiegu LT sromu pod wpływem aktywacji receptora PAR-2 śródbłonki wydzielają cytokiny prozapalne, co przyczynia się do rozwoju stanu zapalnego.

Receptor PAR-2 poprzez swoją rolę zarówno w procesach zapalnych jak i świądotwórczych stanowi interesujące ogniwo łączące oba te procesy i obiecujący punkt uchwytu dla nowych metod terapeutycznych. Opisana po raz pierwszy w niniejszym badaniu jego zwiększona ekspresja w tkankach sromu zmienionych w przebiegu LT jest obiecującym kierunkiem dalszych badań.



## 8 Nowe kierunki badań w lokalnym leczeniu świądu i bólu na tle uzyskanych wyników.

### 8.1 Agoniści i antagoniści receptorów opioidowych

W modelu zwierzęcym bólu neuropatycznego wykazano zależną od dawki skuteczność miejscowego podawania agonistów receptorów opioidowych  $\mu$ ,  $\kappa$  i  $\delta$ . Skuteczna dawka dla agonistów receptorów opioidowych  $\mu$  i  $\kappa$  w leczeniu bólu neuropatycznego była znacznie wyższa, niż skuteczna dawka w leczeniu bólu wywołanego stanem zapalnym (Obara et al., 2009). W badaniach klinicznych wykazano skuteczność przeciwbólowego leczenia podawanymi lokalnie opioidami przewlekłych ran skórnych, głównie odleżyn i ran nowotworowych (Graham et al., 2013), (Dzierżanowski & Ciałkowska-Rysz, 2019). W literaturze istnieją też doniesienia o skutecznym leczeniu przewlekłego świądu u pacjentów z AZS poprzez miejscowe podanie antagonisty receptora opioidowego  $\mu$ - naltrexonu (Bigliardi et al., 2007).

### 8.2 Leczenie przeciwświądowe ukierunkowane na receptor PAR-2.

Wobec licznych doniesień o roli receptora PAR-2 w wywoływaniu przewlekłego świądu i neurogennego zapalenia rozważane jest kilka opcji terapeutycznych, takich jak zahamowanie aktywności proteaz, zahamowanie ekspresji PAR-2 z wykorzystaniem technologii siRNA, zablokowanie samego receptora swoistym antagonistą i zablokowanie przekazu sygnału z receptora do białka G. Zahamowanie aktywności proteaz może być uzyskane poprzez miejscowe podanie inhibitorów proteaz. W badaniu klinicznym na grupie chorych z przewlekłym świądem występującym w przebiegu schyłkowej niewydolności nerek (u których również stwierdzono zwiększoną ekspresję receptora PAR-2) zaobserwowano znaczną redukcję świądu po podaniu inhibitora proteaz. Co więcej, zauważono także poprawę funkcji barierowej naskórka. Należy jednak pamiętać, że proteazy pełnią także rolę w fizjologicznym złuszczeniu komórek naskórka, co może powodować istotne ograniczenie dla tej metody terapeutycznej u chorych z dermatozami (Lee et al., 2010). W pierwszym badaniu na zdrowych ochotnikach, podwójnie zaślepionym, z wykorzystaniem placebo wykazano skuteczne działanie selektywnego antagonisty receptora PAR-2 (metylbenzyl metylbenzimidazole piperidynyl methanone- MMP) w hamowaniu świądu wywołanego cowhage, w przeciwieństwie do świądu wywołanego histaminą (Cao et al., 2017). Został zsyntetyzowany również inny antagonist receptoru PAR-2- peptyd B (RRFSLRLRY), którego przeciwzapalne działanie zostało udowodnione *in vitro*, a bezpieczeństwo miejscowego stosowania u ludzi zostało wykazane z użyciem testów skórnych (Kim & Kim, 2018). W badaniu na mysim modelu AZS została wykazana skuteczność stosowania peptydu PZ-235, białka penetrującego błonę komórkową i blokującego przekaz sygnału pomiędzy receptorem PAR-2 a białkiem G. Zastosowane leczenie spowodowało szereg korzystnych zmian takich jak zmniejszenie nacieku zapalnego, redukcję grubości naskórka i jego łuszczenia oraz złagodzenie świądu mierzone liczbą przeczosów (ubytków naskórka wywołanych przewlekłym drapaniem) (Barr et al., 2019).

W rozważaniu prozapalnej i świądotwórczej roli receptora PAR-2 należy także wziąć pod uwagę odczyn pH, którego fizjologiczne wartości w warstwie rogowej wynoszące 5,0-5,5 są istotne w utrzymaniu barierowej funkcji naskórka i prawidłowej aktywności proteaz serynowych. Kwaśne pH naskórka zmniejsza także podatność na infekcje skórne (Lee et al., 2010). Wzrost pH warstwy rogowej naskórka obserwowany w dermatozach, szczególnie AZS skutkuje zaburzeniem funkcji

barierowej naskórka poprzez zmniejszenie aktywności enzymów odpowiedzialnych za dojrzewanie warstwy lipidowej i zwiększenie aktywności proteaz, które przyspieszają złuszczenie naskórka i aktywują receptor PAR-2, co prowadzi do produkcji cytokin prozapalnych przez keratynocyty i aktywacji mastocytów. W badaniu na mysim modelu AZS wykazano zwiększenie skuteczności działania antagonisty receptora PAR-2 (NPS1577) przy równoczesnym zastosowaniu leczenia obniżającego pH naskórka (lactobionic acid- LBA) w porównaniu do działania samego antagonisty (Sakai et al., 2016).

### 8.3 Nerwowy czynnik wzrostu (nerve growth factor- NGF)

Badania kliniczne wykazały efektywność miejscowego stosowania NGF w leczeniu trudno-gojących się owrzodzeń skórnych takich jak odleżyny, owrzodzenia w przebiegu zapalenia naczyń czy neuropatii cukrzycowej. W porównaniu do podskórnych zastrzyków z NGF, miejscowe podanie nie powoduje niepożądanych objawów czuciowych. Wydaje się więc, iż podawany lokalnie NGF oddziałuje głównie na keratynocyty, fibroblasty i komórki śródbłonna. Nie można jednak wykluczyć jego wpływu na przywrócenie unerwienia zniszczonej uprzednio skóry poprzez stymulację uwalniania neuropeptydów z zakończeń nerwowych (Rocco et al., 2018).

## 9 Wnioski

1. Badanie wykazało, iż w przebiegu LT w skórze sromu zachodzą istotne zmiany w mikrounerwieniu, ekspresji receptorów świądu i ilości mastocytów, w porównaniu do skóry prawidłowej.
2. Zmiany w mikrounerwieniu mają charakter zarówno ilościowy (zmniejszenie ŚGWN) jak i jakościowy (zwiększenie ŚGWN wykazujących immunoekspresję CGRP i zmniejszenie ŚGWN wykazujących immunoekspresję GAP-43) i mogą do pewnego stopnia odpowiadać za powstawanie objawów czuciowych w przebiegu LT.
3. Zwiększenie immunoekspresji ekspresji receptora PAR-2 i receptora opioidowego  $\mu$  oraz zwiększenie ilości mastocytów w tkankach sromu zmienionych w przebiegu LT świadczy o udziale mechanizmów niehistaminergicznym i neurogennej stanu zapalnego w przebiegu tej jednostki chorobowej.
4. Konieczne są dalsze badania nad patomechanizmami objawów czuciowych LT w celu opracowania nowych metod przyczynowego leczenia schorzeń świądowych skóry.

## 10 Podsumowanie

Objawy czuciowe w przebiegu LT sromu nie zawsze odpowiadają na obecnie stosowane leczenie i prowadzą do znacznego obniżenia jakości życia chorych. Niniejsze badanie stanowi pierwszy w literaturze opis neuropochodnych zjawisk mogących odpowiadać za patofizjologiczne i patomorfologiczne podłoże występowania objawów czuciowych LT. W tkankach zmienionych chorobowo stwierdzono istotny zanik śródnaskórkowych włókien nerwowych, wzrost ekspresji receptorów świądu (PAR-2 i receptor opioidowy  $\mu$ ) i zwiększenie ilości mastocytów - głównych komórek odpowiedzialnych za neurogeny stan zapalny. Pojawiające się na horyzoncie nowe możliwości terapeutyczne ukierunkowane na opisane wyżej zjawiska uzasadniają konieczność prowadzenia dalszych, szczegółowych badań w tym temacie.

## 11 Bibliografia

- Albrecht, M., Frungieri, M. B., Kunz, L., Rämisch, R., Meineke, V., Köhn, F. M., & Mayerhofer, A. (2005). Divergent effects of the major mast cell products histamine, tryptase and TNF-alpha on human fibroblast behaviour. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(23), 2867–2876. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5289-7>
- Amadesi, S., Nie, J., Vergnolle, N., Cottrell, G. S., Grady, E. F., Trevisani, M., ... Bunnett, N. W. (2004). Protease-Activated Receptor 2 Sensitizes the Capsaicin Receptor Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor 1 to Induce Hyperalgesia. *Journal of Neuroscience*, 24(18), 4300–4312. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5679-03.2004>
- Andoh, T., Asakawa, Y., & Kuraishi, Y. (2018). Non-myelinated C-fibers, but not myelinated A-fibers, elongate into the epidermis in dry skin with itch. *Neuroscience Letters*, 672, 84–89. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2018.02.034>
- Barr, T. P., Garzia, C., Guha, S., Fletcher, E. K., Nguyen, N., Wieschhaus, A. J., ... Kuliopulos, A. (2019). PAR2 Pepducin-Based Suppression of Inflammation and Itch in Atopic Dermatitis Models. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(2), 412–421. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.08.019>
- Basantsova, N. Y., Starshinova, A. A., Dori, A., Zinchenko, Y. S., Yablonskiy, P. K., & Shoenfeld, Y. (2019, July 1). Small-fiber neuropathy definition, diagnosis, and treatment. *Neurological Sciences*, Vol. 40, pp. 1343–1350. <https://doi.org/10.1007/s10072-019-03871-x>
- Bigliardi-Qi, M., Lipp, B., Sumanovski, L. T., Buechner, S. A., & Bigliardi, P. L. (2005). Changes of epidermal mu-opiate receptor expression and nerve endings in chronic atopic dermatitis. *Dermatology*, 210(2), 91–99. <https://doi.org/10.1159/000082563>
- Bigliardi, P. L., Stammer, H., Jost, G., Rufli, T., Büchner, S., & Bigliardi-Qi, M. (2007). Treatment of pruritus with topically applied opiate receptor antagonist. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 56(6), 979–988. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.01.007>
- Bochenek, & Reicher. (1998). *Anatomia człowieka. Trzewa Tom II*. Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa 2006.
- Bönhof, G. J., Strom, A., Püttgen, S., Ringel, B., Brüggemann, J., Bódis, K., ... Ziegler, D. (2017). Patterns of cutaneous nerve fibre loss and regeneration in type 2 diabetes with painful and painless polyneuropathy. *Diabetologia*, 60(12), 2495–2503. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4438-5>
- Bowen, A. R., Vester, A., Marsden, L., Florell, S. R., Sharp, H., & Summers, P. (2008). The role of vulvar skin biopsy in the evaluation of chronic vulvar pain. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 199(5), 467.e1-467.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2008.03.004>
- Brannagan, T. H., Hays, A. P., Chin, S. S., Sander, H. W., Chin, R. L., Magda, P., ... Latov, N. (2005). Small-fiber neuropathy/neuronopathy associated with celiac disease: skin biopsy findings. *Archives of Neurology*, 62(10), 1574–1578. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.10.1574>
- Bursova, S., Dubovy, P., Vlckova-Moravcova, E., Nemeč, M., Klusakova, I., Belobradkova, J., & Bednarik, J. (2012). Expression of growth-associated protein 43 in the skin nerve fibers of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of the Neurological Sciences*, 315(1–2), 60–63. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.11.038>
- Busch-Dienstfertig, M., & Stein, C. (2010, July 1). Opioid receptors and opioid peptide-producing leukocytes in inflammatory pain - Basic and therapeutic aspects. *Brain, Behavior, and Immunity*, Vol. 24, pp. 683–694. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.10.013>
- Calonje, E. (2012). *McKee's pathology of the skin: with clinical correlations*. Elsevier/Saunders.

- Cao, T., Tan, W. D., Kim, H., & Tey, H. L. (2017). Efficacy of a topical proteinase-activated receptor-2 inhibitor on cowhage-induced pruritus: a randomized placebo-controlled double-blind study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 31(4), e191–e192. <https://doi.org/10.1111/jdv.13919>
- Caspary, P., Carpena, A. B., & De Almeida, H. (2009). Plantar involvement in lichen sclerosus. *International Journal of Dermatology*, Vol. 48, pp. 662–663. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2009.04000.x>
- Cevikbas, F., Seeliger, S., Fastrich, M., Hinte, H., Metze, D., Kempkes, C., ... Steinhoff, M. (2011). Role of protease-activated receptors in human skin fibrosis and scleroderma. *Experimental Dermatology*, 20(1), 69–71. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01184.x>
- Chan, I. (2004). The role of extracellular matrix protein 1 in human skin. *Clinical and Experimental Dermatology*, 29(1), 52–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2004.01440.x>
- Chan, J., Smoller, B. R., Raychauduri, S. P., Jiang, W. Y., & Farber, E. M. (1997). Intraepidermal nerve fiber expression of calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal peptide and substance P in psoriasis. *Archives of Dermatological Research*, 289(11), 611–616. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9444383>
- da Silva Carvalho, R. F., Nilsson, G., & Harvima, I. T. (2010). Increased mast cell expression of PAR-2 in skin inflammatory diseases and release of IL-8 upon PAR-2 activation. *Experimental Dermatology*, 19(2), 117–122. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.00998.x>
- Dalsgaard, C. J., Jernbeck, J., Stains, W., Kjartansson, J., Haegerstrand, A., Hökfelt, T., ... Brown, J. C. (1989). Calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in nerve fibers in the human skin. Relation to fibers containing substance P-, somatostatin- and vasocactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity. *Histochemistry*, 91(1), 35–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2466816>
- De Oliveira, G. A. P., De Almeida, M. P., Soares, F. A., De Almeida Filho, G. L., Takiya, C. M., Otazu, I. B., & Nasciutti, L. E. (2012). Metalloproteinases 2 and 9 and their tissue inhibitors 1 and 2 are increased in vulvar lichen sclerosus. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 161(1), 96–101. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.12.003>
- Dellon, A. L. (2015, October 1). Abnormal skin biopsy for intraepidermal nerve fibers: When “decreased small nerve fibers” is not “small fiber neuropathy.” *Microsurgery*, 35(7), 505–506. <https://doi.org/10.1002/micr.22372>
- Dhand, A., & Aminoff, M. J. (2014). The neurology of itch. *Brain*, 137(2), 313–322. <https://doi.org/10.1093/brain/awt158>
- Dzierżanowski, T., & Ciałkowska-Rysz, A. (2019). Clinical research Topical morphine for treatment of cancer-related painful mucosal and cutaneous lesions: a double-blind, placebo-controlled cross-over clinical trial. *Arch Med Sci*, 15, 146–151. <https://doi.org/10.5114/aoms.2018.72566>
- Eisenstein, T. K. (2019). The Role of Opioid Receptors in Immune System Function. *Frontiers in Immunology*, 10(December), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02904>
- Elieh Ali Komi, D., Wöhr, S., & Bielory, L. (2019, December 12). Mast Cell Biology at Molecular Level: a Comprehensive Review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, pp. 1–24. <https://doi.org/10.1007/s12016-019-08769-2>
- Fantini, F., & Johansson, O. (1992). Expression of growth-associated protein 43 and nerve growth factor receptor in human skin: A comparative immunohistochemical investigation. *Journal of Investigative Dermatology*, Vol. 99, pp. 734–742. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12614465>

- Feld, M., Garcia, R., Buddenkotte, J., Katayama, S., Lewis, K., Muirhead, G., ... Homey, B. (2016). The pruritus- and TH2-associated cytokine IL-31 promotes growth of sensory nerves. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(2), 500-508.e24. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.02.020>
- Fergus, K. B., Lee, A. W., Baradaran, N., Cohen, A. J., Stohr, B. A., Erickson, B. A., ... Breyer, B. N. (2020). Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Treatment of Lichen Sclerosus: a systematic review. *Urology*, 0(0). <https://doi.org/10.1016/J.UROLOGY.2019.09.034>
- Fujiwara, H., Fujiwara, K., Hashimoto, K., Mehregan, A. H., Schaumburg-Lever, G., Lange, R., ... Gollnick, H. (1997). Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA (*B. garinii* or *B. afzelii*) in morphea and lichen sclerosus et atrophicus tissues of German and Japanese but not of US patients. *Archives of Dermatology*, 133(1), 41–44. <https://doi.org/10.1001/archderm.1997.03890370047008>
- Gabros, S., & Zito, P. M. (2020). Topical Corticosteroids. In StatPearls. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30422535>
- Galosi, E., La Cesa, S., Di Stefano, G., Karlsson, P., Fasolino, A., Leone, C., ... Truini, A. (2018). A pain in the skin. Regenerating nerve sprouts are distinctly associated with ongoing burning pain in patients with diabetes. *European Journal of Pain*, 22(10), 1727–1734. <https://doi.org/10.1002/ejp.1259>
- Gambichler, T., Skrygan, M., Czempiel, V., Tigges, C., Kobus, S., Meier, J. J., ... Kreuter, A. (2012). Differential expression of connective tissue growth factor and extracellular matrix proteins in lichen sclerosus. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 26(2), 207–212. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2011.04037.x>
- Godoy, C. A. P., Teodoro, W. R., Velosa, A. P. P., Garippo, A. L., Eher, E. M., Parra, E. R., ... Capelozzi, V. L. (2015). Unusual remodeling of the hyalinization band in vulval lichen sclerosus by type V collagen and ECM 1 protein. *Clinics*, 70(5), 356.
- Göransson, L. G., Brun, J. G., Harboe, E., Mellgren, S. I., & Omdal, R. (2006). Intraepidermal nerve fiber densities in chronic inflammatory autoimmune diseases. *Archives of Neurology*, 63(10), 1410–1413. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.10.1410>
- Graham, T., Grocott, P., Probst, S., Wanklyn, S., Dawson, J., & Gethin, G. (2013). How are topical opioids used to manage painful cutaneous lesions in palliative care? A critical review. *Pain*, 154(10), 1920–1928. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2013.06.016>
- Greaves, M. W. (2010, July 1). Pathogenesis and treatment of pruritus. *Current Allergy and Asthma Reports*, Vol. 10, pp. 236–242. <https://doi.org/10.1007/s11882-010-0117-z>
- Hashimoto, Y., Arai, I., Tanaka, M., & Nakaike, S. (2005). Prostaglandin D2 inhibits IgE-mediated scratching by suppressing histamine release from mast cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 98(1), 90–93. <https://doi.org/10.1254/jphs.sc0040209>
- Hawro, T., Saluja, R., Weller, K., Altrichter, S., Metz, M., & Maurer, M. (2014). Interleukin-31 does not induce immediate itch in atopic dermatitis patients and healthy controls after skin challenge. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 69(1), 113–117. <https://doi.org/10.1111/all.12316>
- Hayashi, K. ichi, Sato, H., Kaise, T., Ohmori, K., Ishii, A., Sano, J. ichi, & Karasawa, A. (2001). Roles of mast cells and sensory nerves in cutaneous vascular hyperpermeability and scratching behavior induced by poly-L-arginine in rats. *European Journal of Pharmacology*, 425(3), 219–227. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)01177-3](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)01177-3)
- Howard, A., Dean, D., Cooper, S., Kirtshig, G., & Wojnarowska, F. (2004). Circulating basement membrane zone antibodies are found in lichen sclerosus of the vulva. *The Australasian Journal of Dermatology*, 45(1), 12–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14961902>

- Ikoma, A., Steinhoff, M., Ständer, S., Yosipovitch, G., & Schmelz, M. (2006). The neurobiology of itch. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(7), 535–547. <https://doi.org/10.1038/nrn1950>
- J. Kopsky, D. (2018). Opioid Receptors in the Skin. *Austin Journal of Anesthesia and Analgesia*, 6(2), 2009–2010. <https://doi.org/10.26420/austinjanesthesiaandanalgesia.2018.1074>
- Jackson, L. A., Hare, A. M., Carrick, K. S., Ramirez, D. M. O., Hamner, J. J., & Corton, M. M. (2019). Anatomy, Histology, and Nerve Density of Clitoris and Associated Structures: Clinical Applications to Vulvar Surgery. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.06.048>
- Jeffrey, J., Kim, S., & Chen, Z.-F. (2011). *Itch Signaling in the Nervous System*. <https://doi.org/10.1152/physiol.00007.2011>
- Kany, S., Vollrath, J. T., & Relja, B. (2019, December 1). Cytokines in inflammatory disease. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20236008>
- Kay, A. B., Ying, S., Ardelean, E., Mlynek, A., Kita, H., Clark, P., & Maurer, M. (2014). Calcitonin gene-related peptide and vascular endothelial growth factor are expressed in lesional but not uninvolved skin in chronic spontaneous urticaria. *Clinical & Experimental Allergy*, 44(8), 1053–1060. <https://doi.org/10.1111/cea.12348>
- Kelishadi, S. S., Omar, R., Herring, N., Tutela, J. P., Chowdhry, S., Brooks, R., & Wilhelmi, B. J. (2016). The Safe Labiaplasty: A Study of Nerve Density in Labia Minora and Its Implications. *Aesthetic Surgery Journal*, 36(6), 705–709. <https://doi.org/10.1093/asj/sjw002>
- Kim, B., & Kim, H. S. (2018). Novel peptide inhibits inflammation by suppressing of protease activated receptor-2. *European Journal of Pharmacology*, 832, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.05.016>
- Kirtschig, G. (2016). *Lichen Sclerosus—Presentation, Diagnosis and Management*. <https://doi.org/10.3238/arztbl.2016.0337>
- Krapf, J. M., Mitchell, L., Holton, M. A., & Goldstein, A. T. (2020). Vulvar lichen sclerosus: Current perspectives. *International Journal of Women's Health*, Vol. 12, pp. 11–20. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S191200>
- Kwak, I. S., Choi, Y. H., Jang, Y. C., Lee, Y. K., Beldon, P., Clark, J. A., ... Szepietowski, J. C. (2014). Immunohistochemical analysis of neuropeptides (protein gene product 9.5, substance P and calcitonin gene-related peptide) in hypertrophic burn scar with pain and itching. *Burns : Journal of the International Society for Burn Injuries*, 40(8), 1661–1667. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.04.004>
- Lauria, G., Hsieh, S. T., Johansson, O., Kennedy, W. R., Leger, J. M., Mellgren, S. I., ... Valls-Solé, J. (2010). European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Ne. *European Journal of Neurology*, 17(7), 903–e49. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2010.03023.x>
- Lee, S. E., Jeong, S. K., & Lee, S. H. (2010, November). Protease and Protease-activated Receptor-2 signaling in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Yonsei Medical Journal*, Vol. 51, pp. 808–822. <https://doi.org/10.3349/ymj.2010.51.6.808>
- Leong, C., Neumann, C., Ramasamy, S., Rout, B., Wee, L. Y., Bigliardi-Qi, M., & Bigliardi, P. L. (2017). Investigating endogenous  $\mu$ -opioid receptors in human keratinocytes as pharmacological targets using novel fluorescent ligand. *PLoS ONE*, 12(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188607>
- Marren, P., Millard, P., Chia, Y., & Wojnarowska, F. (1994). Mucosal lichen sclerosus/lichen planus overlap syndromes. *British Journal of Dermatology*, 131(1), 118–123. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.1994.tb08468.x>

- Martín-Alguacil, N., Aardsma, N., Litvin, Y., Mayoglou, L., Dupré, C., Pfaff, D. W., & Schober, J. M. (2011). Immunocytochemical characterization of pacinian-like corpuscles in the labia minora of prepubertal girls. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 24(6), 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.jpag.2011.06.005>
- Martin-Alguacil, N., Schober, J., Kow, L. M., & Pfaff, D. (2006). Arousing Properties of the Vulvar Epithelium. *Journal of Urology*, 176(2), 456–462. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.03.029>
- Meng, J., Moriyama, M., Feld, M., Buddenkotte, J., Buhl, T., Szöllösi, A., ... Steinhoff, M. (2018). New mechanism underlying IL-31-induced atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(5), 1677-1689.e8. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.12.1002>
- Milian-Ciesielska, K., Chmura, L., Dyduch, G., Jagers, C., Radwanska, E., & Adamek, D. (2017). Intraepidermal nerve fiber density in vulvar lichen sclerosus and normal vulvar tissues. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 68(3).
- Ninković, J., & Roy, S. (2013, July). Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. *Amino Acids*, Vol. 45, pp. 9–24. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-1163-0>
- Nowak, D., & Yeung, J. (2017, December 1). Diagnosis and treatment of pruritus. *Canadian Family Physician*, Vol. 63. College of Family Physicians of Canada.
- Obara, I., Parkitna, J. R., Korostynski, M., Makuch, W., Kaminska, D., Przewlocka, B., & Przewlocki, R. (2009). Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. *Pain*, 141(3), 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.12.006>
- Omdal, R., Mellgren, S. I., Gøransson, L., Skjesol, A., Lindal, S., Koldingsnes, W., & Husby, G. (2002). Small nerve fiber involvement in systemic lupus erythematosus: A controlled study. *Arthritis & Rheumatism*, 46(5), 1228–1232. <https://doi.org/10.1002/art.10303>
- Oyama, N., Chan, I., Neill, S. M., Hamada, T., South, A. P., Wessagowit, V., ... McGrath, J. A. (2003). Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosus. *The Lancet*, 362(9378), 118–123. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13863-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13863-9)
- Papoiu, A. D. P., Coghill, R. C., Kraft, R. A., Wang, H., & Yosipovitch, G. (2012). A tale of two itches. Common features and notable differences in brain activation evoked by cowhage and histamine induced itch. *NeuroImage*, 59(4), 3611–3623. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2011.10.099>
- Pereira, M. P., Mühl, S., Pogatzki-Zahn, E. M., Agelopoulos, K., & Ständer, S. (2016). Intraepidermal Nerve Fiber Density: Diagnostic and Therapeutic Relevance in the Management of Chronic Pruritus: a Review. *Dermatology and Therapy*. <https://doi.org/10.1007/s13555-016-0146-1>
- Pereira, M. P., Pogatzki-Zahn, E., Snels, C., Vu, T. H., Üçeyler, N., Loser, K., ... Ständer, S. (2017). There is no functional small-fibre neuropathy in prurigo nodularis despite neuroanatomical alterations. *Experimental Dermatology*, 26(10), 969–971. <https://doi.org/10.1111/exd.13343>
- Prodromidou, A., Chatziioannou, E., Daskalakis, G., Stergios, K., & Pergialiotis, V. (2018). Photodynamic Therapy for Vulvar Lichen Sclerosus - A Systematic Review. *Journal of Lower Genital Tract Disease*, 22(1), 58–65. <https://doi.org/10.1097/LGT.0000000000000362>
- Ren, L., Zhao, Y., Huo, X., & Wu, X. (2018). MiR-155-5p promotes fibroblast cell proliferation and inhibits FOXO signaling pathway in vulvar lichen sclerosus by targeting FOXO3 and CDKN1B. *Gene*, 653, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.049>
- Rocco, M. L., Soligo, M., Manni, L., & Aloe, L. (2018). Nerve Growth Factor: Early Studies and Recent Clinical Trials. *Current Neuropharmacology*, 16(10), 1455–1465. <https://doi.org/10.2174/1570159x16666180412092859>



- Rosenberger, D. C., Blechschmidt, V., Timmerman, H., Wolff, A., & Treede, R. D. (2020, April 1). Challenges of neuropathic pain: focus on diabetic neuropathy. *Journal of Neural Transmission*, Vol. 127, p. 589. <https://doi.org/10.1007/s00702-020-02145-7>
- Rothmeier, A. S., & Ruf, W. (2012, January 6). Protease-activated receptor 2 signaling in inflammation. *Seminars in Immunopathology*, Vol. 34, pp. 133–149. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0289-1>
- Russell, F. A., King, R., Smillie, S.-J., Kodji, X., & Brain, S. D. (2014). Calcitonin Gene-Related Peptide: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 94(4).
- Sakai, T., Hatano, Y., Matsuda-Hirose, H., Zhang, W., Takahashi, D., Jeong, S. K., ... Fujiwara, S. (2016). Combined Benefits of a PAR2 Inhibitor and Stratum Corneum Acidification for Murine Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(2), 538–541. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2015.11.011>
- Sandberg, W. J., Halvorsen, B., Yndestad, A., Smith, C., Otterdal, K., Brosstad, F. R., ... Aukrust, P. (2009). Inflammatory Interaction Between LIGHT and Proteinase-Activated Receptor-2 in Endothelial Cells. *Circulation Research*, 104(1), 60–68. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.188078>
- Scheytt, S., Riediger, N., Braunsdorf, S., Sommer, C., & Üçeyler, N. (2015). Increased gene expression of growth associated protein-43 in skin of patients with early-stage peripheral neuropathies. *Journal of the Neurological Sciences*, 355(1–2), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.05.044>
- Schober, J., Aardsma, N., Mayoglou, L., Pfaff, D., & Martín-Alguacil, N. (2015). Terminal innervation of female genitalia, cutaneous sensory receptors of the epithelium of the labia minora. *Clinical Anatomy* (New York, N.Y.), 28(3), 392–398. <https://doi.org/10.1002/ca.22502>
- Schober, J., Cooney, T., Pfaff, D., Mayoglou, L., & Martin-Alguacil, N. (2010). Innervation of the Labia Minora of Prepubertal Girls. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*, 23(6), 352–357. <https://doi.org/10.1016/j.jpjg.2010.03.009>
- Sehgal, N., Smith, H., & Manchikanti, L. (2011). Narrative Review Peripherally Acting Opioids and Clinical Implications for Pain Control. *Pain Physician*, 14, 249–258. Retrieved from [www.painphysicianjournal.com](http://www.painphysicianjournal.com)
- Sherman, V., McPherson, T., Baldo, M., Salim, A., Gao, X., & Wojnarowska, F. (2010). The high rate of familial lichen sclerosus suggests a genetic contribution: An observational cohort study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 24(9), 1031–1034. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2010.03572.x>
- Shpacovitch, V., Feld, M., Hollenberg, M. D., Luger, T. A., & Steinhoff, M. (2008). Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(6), 1309–1322. <https://doi.org/10.1189/jlb.0108001>
- Shpacovitch, V. M., Brzoska, T., Buddenkotte, J., Stroh, C., Sommerhoff, C. P., Ansel, J. C., ... Steinhoff, M. (2002). Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce cytokine release and activation of nuclear transcription factor  $\kappa$ B in human dermal microvascular endothelial cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 118(2), 380–385. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01658.x>
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al., editors. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20385/>
- Siiskonen, H., & Harvima, I. (2019). Mast Cells and Sensory Nerves Contribute to Neurogenic Inflammation and Pruritus in Chronic Skin Inflammation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00422>
- Steinhoff, M., Bienenstock, J., Schmelz, M., Maurer, M., Wei, E., & Bíró, T. (2006a). Neurophysiological, neuroimmunological, and neuroendocrine basis of pruritus. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(8), 1705–1718. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700231>

- Steinhoff, M., Bienenstock, J., Schmelz, M., Maurer, M., Wei, E., & Bíró, T. (2006b). Neurophysiological, Neuroimmunological, and Neuroendocrine Basis of Pruritus. *Journal of Investigative Dermatology*, 126(8), 1705–1718. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700231>
- Steinhoff, M., Neisius, U., Ikoma, A., Fartasch, M., Heyer, G., Skov, P. S., ... Schmelz, M. (2003). Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: A novel pathway for pruritus in human skin. *Journal of Neuroscience*, 23(15), 6176–6180. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-15-06176.2003>
- Steinhoff, M., Schmelz, M., Szabó, I. L., & Oaklander, A. L. (2018). Clinical presentation, management, and pathophysiology of neuropathic itch. *The Lancet Neurology*, 17(8), 709–720. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30217-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30217-5)
- Steinhoff, M., Ständer, S., Seeliger, S., Ansel, J. C., Schmelz, M., & Luger, T. (2003, November). Modern Aspects of Cutaneous Neurogenic Inflammation. *Archives of Dermatology*, Vol. 139, pp. 1479–1488. <https://doi.org/10.1001/archderm.139.11.1479>
- Sulaiman, W., & Gordon, T. (2013). Neurobiology of peripheral nerve injury, regeneration, and functional recovery: From bench top research to bedside application. *Ochsner Journal*, 13(1), 100–108.
- Szepietowski, J. C., & Reich, A. (2016). Pruritus in psoriasis: An update. *European Journal of Pain*, 20(1), 41–46. <https://doi.org/10.1002/ejp.768>
- Taneda K, Tominaga M, Negi O, Tengara S, Kamo A, Ogawa H, Takamori K (2011) Evaluation of epidermal nerve density and opioid receptor levels in psoriatic itch. *British Journal of Dermatology* 165(2):277-84.
- Tominaga, M., Ogawa, H., & Takamori, K. (2007). Possible Roles of Epidermal Opioid Systems in Pruritus of Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 127, 2228–2235. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700942>
- Tominaga, M., & Takamori, K. (2014a). Itch and nerve fibers with special reference to atopic dermatitis: Therapeutic implications. *Journal of Dermatology*, 41(3), 205–212. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12317>
- Tominaga, M., & Takamori, K. (2014b). Sensitization of Itch Signaling: Itch Sensitization—Nerve Growth Factor, Semaphorins. In *Itch: Mechanisms and Treatment*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24830007>
- Tommola, P., Unkila-Kallio, L., Paetau, A., Meri, S., Kalso, E., & Paavonen, J. (2016). Immune activation enhances epithelial nerve growth in provoked vestibulodynia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.07.037>
- Ventolini, G. (2013). Vulvar pain: Anatomic and recent pathophysiologic considerations. *Clinical Anatomy*, 26(1), 130–133. <https://doi.org/10.1002/ca.22160>
- Verzè, L., Carla, V. P., Maurizo, S., Monica, S., & Giancarlo, P. (2003). Distribution of GAP-43 nerve fibers in the skin of the adult human hand. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 272(1), 467–473. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10056>
- Yamaoka, J., Di, Z. H., Sun, W., & Kawana, S. (2007). Changes in cutaneous sensory nerve fibers induced by skin-scratching in mice. *Journal of Dermatological Science*, 46(1), 41–51. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2006.12.007>
- Yosipovitch, G., Rosen, J. D., & Hashimoto, T. (2018). Itch: From mechanism to (novel) therapeutic approaches. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 142(5), 1375–1390. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2018.09.005>
- Zawadzka, A., Lange, M., Nedoszytko, B., Sikorska, M., Żmijewski, M., Zauszkiewicz-Pawlak, A., & Nowicki, R. (2016). Mastocyty i ich udział w patogenezie wybranych chorób skóry. *Forum Dermatologicum*, 2(1), 12–19.

Zhao, Y., Zhao, S., Li, H., Qin, X., & Wu, X. (2018). Expression of galectin-7 in vulvar lichen sclerosis and its effect on dermal fibroblasts. *Oncology Letters*, *16*(2), 2559–2564.  
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.8897>