

Streszczenie pracy doktorskiej lek. Katarzyny Milian-Ciesielskiej

Promotor: prof. dr hab. Dariusz Adamek

Temat pracy doktorskiej: „Badanie zmian w mikrounerwieniu i lokalnych mechanizmów neurogennych w przebiegu liszaja twardzinowego sromu” – monografia

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. 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 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 (protease 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 pobudzane 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-epidermalnego, 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 patogenetyki 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 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.

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 μ , PAR-2), markera regeneracji nerwów (GAP-43) i w ilości mastocytów (również wyznakowanych immunohistochemicznie przeciwciałem dla tryptazy mastocytarnej), w porównaniu do prawidłowych tkanek sromu.

Metodologia

1.1.1 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).

1.1.2 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 μ , PAR-2) i oceny ilościowej mastocytów (przeciwciała 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.

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 μ 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.

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 świądem 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 μ 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 przewlekle 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 śródbłonkach naczyń skóry zmienionej w przebiegu LT, zgodna

z danymi z literatury mówiącymi o wzroście ekspresji receptora PAR-2 w śródbłonkach w chorobach zapalnych skóry (Cevikbas et al., 2011), pozwala przypuszczać, iż również w przebiegu LT sromu pod wpływem aktywacji receptora PAR-2 śródbłonki 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).

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 μ oraz zwiększenie ilości mastocytów w tkankach sromu zmienionych w przebiegu LT świadczy o udziale mechanizmów niehistaminergicznych i neurogennego 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.

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 μ) i zwiększenie ilości mastocytów, głównych komórek odpowiedzialnych za zjawisko neurogennego stanu zapalnego. Pojawiające się nowe możliwości terapeutyczne ukierunkowane na leczenie opisanych wyżej zaburzeń, wskazują na konieczność prowadzenia dalszych badań w tym temacie.

STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU ANGIELSKIM

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, the 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 vulvar 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.

Aim of the study

To investigate whether in vulvar LS tissues occur the changes in innervation and the differences in expression of neuropeptides (PGP 9.5, CGRP, VIP), pruritic receptors (opioid receptor μ , 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.

Method

1.1.3 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.

1.1.4 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 μ , 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.

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, $p=0,03$). There was also observed the significant increase of expression of opioid receptor μ 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. 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, $p=0,002$).

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 μ 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.

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 μ 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.

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 μ , 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.