

SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET

Dubravka Vuković

RAZLIKE U DISTRIBUCIJI ŽIVČANIH VLAKANA I UPALNOG INFILTRATA U  
GENITALNOJ I EKSTRAGENITALNOJ VARIJANTI BOLESTI LICHEN SCLEROSUS

DOKTORSKA DISERTACIJA

U Splitu, 2023.

SVEUČILIŠTE U SPLITU  
MEDICINSKI FAKULTET

Dubravka Vuković

RAZLIKE U DISTRIBUCIJI ŽIVČANIH VLAKANA I UPALNOG INFILTRATA U  
GENITALNOJ I EKSTRAGENITALNOJ VARIJANTI BOLESTI LICHEN SCLEROSUS

DOKTORSKA DISERTACIJA

U Splitu, 2023.

Rad je izrađen u Laboratoriju za istraživanje ranog razvoja čovjeka Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Voditeljica rada: izv. prof. dr. sc. Snježana Mardešić

## ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Snježani Mardešić na pomoći, trudu i podršci tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost izražavam prof. dr. sc. Mirni Saraga Babić i kolegi doktoru medicine Marinu Ogorevcu na nesebičnoj pomoći i podršci prilikom izrade istraživanja. Hvala Vam od srca.

Također se zahvaljujem svim kolegama Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju te onima na Klinici za dermatovenerologiju na pomoći.

I na kraju zahvala mojoj obitelji i prijateljima.

## POPIS OZNAKA I KRATICA

*ANKRD18A* – gen proteina koji sadržava domenu ponavljanja ankirina 18A (engl. *ankyrin repeat domain-containing protein 18A*)

ANOVA – jednosmjerna analiza varijance (engl. *analysis of variance*)

BMZ – zona bazalne membrane (engl. *basement membrane zone*)

CD68 – protein klaster diferencijacije 68 (engl. *cluster of differentiation 68*)

*CD177* – gen klaster diferencijacije 177 (engl. *cluster of differentiation 177*)

*CD200* – gen klaster diferencijacije 200 (engl. *cluster of differentiation 200*)

*CDKN2A* – gen inhibitor ciklin ovisne kinaze 2A (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*)

CGRP – peptid vezan uz gen kalcitonina (engl. *calcitonin gene-related peptide*)

DAPI – 4',6'-diamidino-2-fenilindol (engl. *4',6'-diamidino-2-phenylindole*)

DEJ – dermo-epidermalna granica (engl. *dermo-epidermal junction*)

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)

EC – ekstragenitalne kontrole (engl. *extragenital controls*)

ECM1 – protein ekscelularnog matriksa 1 (engl. *extracellular matrix protein 1*)

EL – ekstragenitalni lihen (engl. *extragenital lichen sclerosus*)

G0 – faza staničnog ciklusa u kojoj se stanica ne dijeli

G2 – podfaza u interfazi, jednoj od faza staničnog ciklusa

GC – genitalne kontrole (engl. *genital controls*)

GL – genitalni lihen (engl. *genital lichen sclerosus*)

H & E – hematoksilin i eozin (engl. *hematoxylin and eosin*)

HLA – humani leukocitni antigeni (engl. *human leukocyte antigens*)

HPV – humani papiloma virus (engl. *human papillomavirus*)

IENF/mm – intraepidermalna živčana vlakana po milimetru (engl. *intraepidermal nerve fibers per millimeter*)

IENFD – gustoća intraepidermalnih živčanih vlakana (engl. *intraepidermal nerve fiber density*)

IL-31 – interleukin 31

IQR – interkvartilni raspon (engl. *interquartile range*)

KBC – Klinički bolnički centar

Ki-67 – nuklearni protein Ki-67

*LATS2* – gen velike tumor supresorske kinaze 2 (engl. *large tumor suppressor kinase 2*)

LKS – lokalni kortikosteroidi

LS – lihen sklerozus (lat. *lichen sclerosus*)

M – M faza ili mitozna

M1 – podtip makrofaga tj. inflamatorno, klasično aktivirani podtip

M2 – podtip makrofaga tj. antiinflamatorno, alternativno aktivirani podtip

MAP kinaza – mitogenima aktivirana protein-kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*)

miR-155 – mikroRNA-155 (engl. *microRNA-155*)

MMP-9 – matriksna metaloproteinaza-9

p53 – tumorski protein p53

PBS – fosfatom puferirana fiziološka otopina (engl. *phosphate-buffered saline*)

pd – papilarni dermis

PGP 9.5 – proteinski genski produkt 9.5 (engl. *protein gene product 9.5*)

PRP – plazma bogata trombocitima (engl. *platelet-rich plasma*)

rd – retikularni dermis

SAD – Sjedinjene američke države

SENF/mm – subepidermalna živčana vlakana po milimetru (engl. *subepidermal nerve fibers per millimeter*)

SENFD – gustoća subepidermalnih živčanih vlakana (engl. *subepidermal nerve fiber density*)

SP – tvar P (engl. *substance P*)

Th1 – podtip pomoćničkih T limfocita

Th2 – podtip pomoćničkih limfocita

TNF- $\alpha$  – tumor nekrotizirajući čimbenik rasta alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*)

TRP – tranzijentni receptorski kationski kanal (engl. *transient receptor potential channels*)

TRPA1 – tranzijentni receptorski kationski kanal podobitelj A član 1 (engl. *transient receptor potential cation channel subfamily A member 1*)

try – triptaza (engl. *tryptase*)

UCHL-1 – ubikvitin karboksi-terminalna hidrolaza 1 (engl. *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1*)

UVA1 – ultraljubičasto zračenje A1 (engl. *ultraviolet A 1 radiation*)

VAS – vizualna analogna skala

VIN – vulvarna intraepitelna neoplazija

VR1 – vaniloidni receptor 1 (engl. *vaniloid receptor 1*)

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Definicija bolesti .....	2
1.1.2. Povijesne činjenice .....	2
1.1.3. Epidemiologija bolesti.....	2
1.1.4. Etiopatogeneza bolesti.....	3
1.1.5. Klasifikacija bolesti .....	7
1.1.6. Klinička prezentacija.....	7
1.1.7. Patohistološka slika .....	10
1.1.8. Subjektivni simptomi.....	11
1.1.9. Dijagnoza.....	12
1.1.10. Diferencijalna dijagnoza.....	13
1.1.11. Liječenje .....	14
1.1.12. Tijek i prognoza bolesti .....	17
1.2. Neurogena upala.....	17
1.2.1. Intraepidermalna živčana vlakna .....	18
1.2.2. Tranzijentni receptorski kationski kanal vaniloida 1 .....	19
1.2.3. Peptid povezan s kalcitoninskim genom .....	20
1.2.4. PGP 9.5.....	22
1.2.5. Kaspaza-3 .....	23
1.2.6. Proliferacija .....	23
1.2.7. Makrofazi .....	24
1.2.8. Mastociti .....	25
2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA .....	27
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	29
4. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA .....	31
4.1. Prikupljanje uzoraka.....	32
4.2. Histokemijski i imunofluorescencijski postupak.....	32
4.3. Debljina epidermisa i gustoća upalnog infiltrata .....	35
4.4. Gustoća živčanih vlakana .....	35
4.5. Gustoća stanica, indeks proliferacije i kvantifikacija apoptoze.....	36
4.6. Statistička analiza .....	37
5. REZULTATI.....	39
5.1. Kliničke karakteristike bolesnika .....	40



5.2. Rezultati analize rezova obojenih hematoksilinom i eozinom .....	40
5.3. Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje na VR1 i CGRP .....	43
5.4. Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje na VR1 i PGP 9.5 .....	46
5.5. Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje na VR1 i triptazu .....	48
5.6. Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje na triptazu i Ki-67.....	51
5.7. Imunofluorescencijsko bojenje na kaspazu-3.....	53
5.8. Imunofluorescencijsko bojenje na PGP 9.5.....	55
5.9. Imunofluorescencijsko bojenje na CD68 .....	58
6. RASPRAVA.....	62
7. ZAKLJUČCI.....	68
8.LITERATURA.....	71
9. SAŽETAK.....	93
10. SUMMARY .....	95
11. ŽIVOTOPIS .....	97



## 1.1. Definicija bolesti

Lihen sklerozus (lat. *lichen sclerosus*, LS), sa sinonimima „*lichen sclerosus et atrophicus*“, „*balanitis xerotica obliterans*“, „*kraurosis vulvae*“, i „hipoplastična distrofija“ je kronična upalna bolest kože koja zahvaća ekstragenitalnu i genitalnu kožu (1). Etiologija bolesti je nepoznata, a tijek progresivan i nepredvidiv, obilježen sklerozom kože, bez zahvaćanja unutarnjih organa.

### 1.1.2. Povijesne činjenice

Prvo spominjanje LS-a datira iz devetnaestog stoljeća, preciznije, 1875. godine, kada je Weir opisao vulvarni ili oralni LS kao "ihtiozu", dok se pedijatrijski vulvarni LS prvi puta spominje 1901. godine. Godine 1885. Breisky uvodi naziv *kraurosis vulvae* za vulvarni LS. Tek 1892. g. Darier daje klasični patohistološki opis bolesti. Od tada je u uporabi bio naziv *lichen sclerosus et atrophicus*, koji je izmijenjen 1976. godine kada je sufiks „*et atrophicus*“ ukinut Friedrichovom spoznajom da se radi o distrofiji, a ne atrofiji zahvaćene kože. Internacionalno društvo za proučavanje vulvovaginalnih bolesti (engl. *International Society for the Vulvovaginal Disease*) je iste godine uvelo izraz *lichen sclerosus* kao službeni naziv bolesti te potaknulo izbjegavanje korištenja izraza „*kraurosis*“ i „*leucoplakia*“ (2).

### 1.1.3. Epidemiologija bolesti

Rezultati epidemioloških studija ukazuju na često nedovoljno prepoznatu i kasno postavljenu dijagnozu LS-a, uz prevalenciju od približno 0,1-0,3%, s omjerom 10:1 u korist žena (3, 4).

LS se može razviti u bilo kojoj životnoj dobi, no, najčešće se javlja u bimodalnoj distribuciji s dva vrška incidencije: kod predpubertetskih dječaka i predmenarhalnih djevojčica (prosjek 7,6 godina) i žena u postmenopauzi (prosjek 52,6 godina) te muškaraca srednje životne dobi (2, 3, 5-8). Postoje sumnje da je bimodalna distribucija bolesti možda detekcijska greška tj. „bias“ upravo zbog razloga koji su prethodno navedeni (9). Iako su epidemiološki podaci za pedijatrijske forme LS-a ograničeni, vjeruje se da se otprilike 7% do 15% svih slučajeva javlja kod djece (10). Otprilike 1 na 900 djevojčica će razviti vulvarni LS. Studija na 327 djevojčica je utvrdila prosječan početak bolesti u dobi od 5,4 godina, no uz često kašnjenje u postavljanju dijagnoze i do 1,6 godina (11). Retrospektivna analiza na 411 patohistoloških uzoraka prepucija koji nisu imali dijagnosticiranu dermatozu pokazala je kod otprilike 10% uzoraka tipičnu

patohistološku sliku LS-a (12). LS se vjerojatno pojavljuje mnogo češće nego što se ranije očekivalo, uz, kao što je i prethodno navedeno, i dalje veću pojavnost kod pripadnica ženskog spola (~3% u žena i >0,07% u muškaraca) (6, 13).

#### 1.1.4. Etiopatogeneza bolesti

Iako je etiologija LS-a još uvijek nejasna, možemo reći da se radi o multifaktorijalnoj bolesti u čijoj etiopatogenezi ulogu imaju: genetska predispozicija, autoimuna podloga, infektivno zbijanje, lokalna mehanička iritacija i hormonski status. Mnoga saznanja dobivena posljednjih godina sve više upućuju na autoimuno induciranu bolest kod genetski predisponiranih pojedinaca, uz eventualan utjecaj hormonalnih čimbenika te ulogu prethodne infekcije kao okidača, te traume i okluzivnog vlažnog okruženja kao precipitirajućih čimbenika (14). Postoji niz etioloških i epidemioloških studija o autoimunoj podlozi bolesti kod genetski predisponiranih pojedinaca. Obiteljske studije na preko 1000 žena opisuju kod njih 12% LS-a u osobnoj i obiteljskoj anamnezi (15, 16), a postoje i prikazi slučajeva koji opisuju LS vulve u monozigotnih blizanki (17, 18).

Utvrđena je visoka povezanost s genima koji reguliraju antigene klase II humanog leukocitnog antigena (engl. *human leukocyte antigens*, HLA), koji su uključeni u humoralni imunitet, kao što su DQ7, DR12, DRB1\*12 i DRB1\*13 (19-21). Žene s LS-om imaju povećanu prevalenciju HLA-DQ7, -DQ8, -DQ9, i -DR12 u usporedbi s kontrolama, a sam HLA-DQ7 prisutan je u 50% odraslih žena i 66% prepubertetskih ispitanica (8, 21).

Osobe s HLA-DR17 imaju manju pojavnost LS-a, što se može interpretirati kako HLA antigeni i njihovi povezani haplotipovi mogu uvjetovati i pojačanu, ali i smanjenu incidenciju LS-a, ovisno o antigenu (20, 22).

Ponavljane (repetitivne) nasljedne varijante određena četiri gena su prepoznate kao razlog nefunkcionalnosti ekstracelularnog matriks proteina u svih sedam zahvaćenih pacijenata, ali iste nisu pronađene u zdravih kontrola. Geni sa ovim varijantama uključuju *CD177* (engl. *cluster of differentiation 177*; aktivacija neutrofila), *CD200* (engl. *cluster of differentiation 200*; inhibicijski signal makrofaga), *ANKRD18A* (engl. *ankyrin repeat domain-containing protein 18A*; epigenetska regulacija) i *LATS2* (engl. *large tumor suppressor kinase 2*; ko-represor androgenog signaliziranja) (23).

Nedavno su epigenetski putovi implicirani kao uzročnici ili pospješivači bolesti, osobito mikroRNA-155 (engl. *microRNA-155*, miR-155), gen za ECM1 (engl. *extracellular matrix protein 1*) protein, galektin-7, tumorski protein p53 i epigenetske modifikacije na *CDKN2A* (engl. *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) (22).

LS pokazuje karakteristike u skladu s drugim autoimunim stanjima, uključujući veću prevalenciju među pripadnicama ženskog spola i povezanost s drugim autoimunim stanjima (15, 24, 25). LS se često javlja uz različite autoimune bolesti kod kojih su detektibilna serumska autoantitijela, kao što su morfea, autoimune bolesti štitnjače (Hashimotov tireoiditis i Gravesova bolest), reumatoidni artritis, perniciozna anemija, dijabetes melitus tipa I, *alopecia areata*, vitiligo i autoimune bulozne dermatoze tipa buloznog pemfigoida (26-30). U pojedinim studijama čak 12-16% žena s LS-om je imalo i autoimuni tireoiditis (24, 31).

U pretpostavljenom etiopatogenetskom modelu humoralne autoimunosti i stvaranja autoantitijela na proteine kože, u slučaju LS-a, pronađena su protutijela na protein ekstracelularnog matriksa 1 (glikoprotein koji djeluje kao "biološko ljepilo" na dermo-epidermalnom spoju) u bolesnica s anogenitalnim LS-om (32), a isto je bilo primjenjivo u imunopatogenezi LS-a penisa (5). Autoantitijela na ECM1, koja se nalaze u 74% žena s LS, utječu na regulatorno vezanje ECM1 na matriksnu metaloproteinazu-9 (MMP-9), te dovode po pojačane sinteze kolagena, posebice tipa V, što u konačnici dovodi do procesa skleroze (32, 33). MMP-9 i matriksna metaloproteinaza-2 su kolagenaze i želatinaze, važne u procesu remodeliranja kolagena, čiji je izražaj zajedno s izražajem njihovih tkivnih inhibitora, povišen u uzorcima vulvarnog LS-a (34). Navedeni proces olakšava i disregulacija keratinocitnog proteina galektina 7, čiju sintezu regulira p53, a uloga mu je inhibirati rast fibroblasta i povećati sintezu kolagena (35).

Do otkrića autoantitijela na ECM1 protein došlo se proučavanjem autosomno recesivne genodermatoze koja se naziva lipoidna proteinoza, a koja ima sličnu kožnu patologiju kao LS te umjesto humoralne autoimunosti u podlozi ima „*loss-of-function*“ mutaciju gena za ECM1 protein (32, 36-38).

Osim toga, nedavne studije (kako na animalnim modelima, tako i *in vivo*) su pokazale ulogu ECM1 proteina u genetskoj predispoziciji za upalne bolesti crijeva, za stjecanje imunološke tolerancije te za alergijske reakcije posredovane T limfocitima i aktivacijom B limfocita (37,

39-41). Međutim, autoimunost na ECM1 nije sama po sebi dostatna za objašnjenje patogeneze LS-a.

Uz autoantitijela na ECM1 protein spominju se i ona na antigen buloznog pemfigoida, iako njihova uloga u patogenezi bolesti nije razjašnjena, ali doprinosi hipotezi da je LS autoimuna bolest s humoralnim odgovorom (32). Osim već spomenute povezanosti s autoimunim bolestima i pojavom LS-a u obitelji, za povećano razumijevanje imunoloških i genetskih elemenata uključenih u patologiju LS-a treba uključiti i autoimunogenu aktivaciju, sklerozu tkiva i oksidativni stres (22).

Poznato je da odsutnost supresivne funkcije regulatornih T limfocita potiče autoimunu reakciju. Postoji utvrđena povezanost između odgovora Th1 limfocita i autoimunih bolesti (22). Upala u LS-u je posredovana pojačanom regulacijom citokina pomagačkih T limfocita Th1 podtipa, u čije je promicanje diferencijacije uključena miR-155 (42).

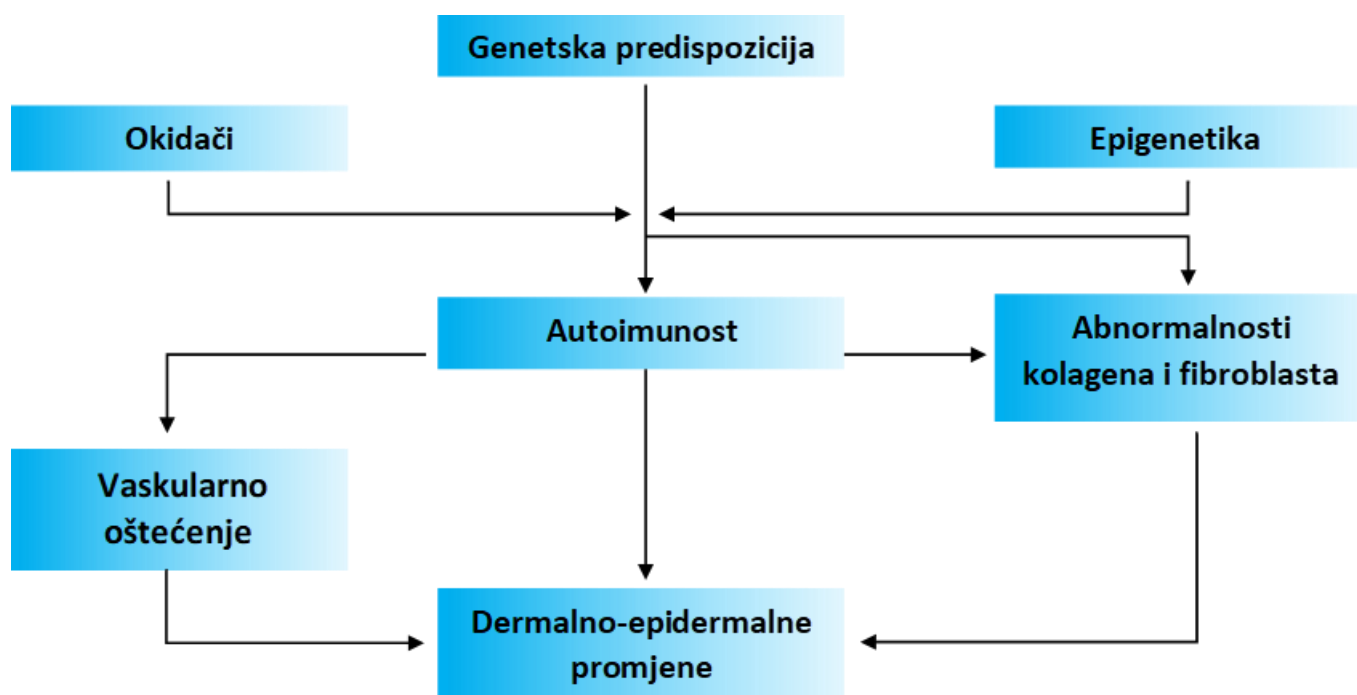
Kada je, kao u slučaju LS-a, miR-155 prekomjerno izražen to može poremetiti T regulatornim limfocitima posredovanu supresiju dovodeći do gubitka samotolerancije i potičući upalu, a time i autoimunost (22).

Disregulacija zbog prekomjernog izražaja miR-155 također je povezana s povećanom sintezom kolagena i stvaranja sklerotskog tkiva te inhibicijom supresorskih gena FOXO3 (engl. *forkhead box O3*) i CDKN1B (eng. *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*), što dovodi do pojačane sinteze kolagena (43). U pojedinim patohistološkim uzorcima otkriveno je oksidativno oštećenje DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*), koje ukazuje da samo oksidativno oštećenje DNA, lipida i proteina može doprinijeti sklerozu, autoimunosti i karcinogenezi u LS-u (44).

Naime Th1 citokini koji se luče tijekom upalnog procesa dovode do oslobađanja reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*), potičući autoimunost i oksidativni stres, koji potom pridonosi inaktivaciji tumorskih supresorskih gena, uključujući *p53* i *CDKN2A*, dovodeći do proliferacije stanica i karcinogeneze (22, 45). Do sada su implicirane virusne infekcije humanim papiloma virusom (engl. *human papillomavirus*, HPV) i virusom hepatitisa C, lokalne infekcije (uretritis, vulvovaginitis) te infekcija bakterijom *Borrelia burgdorferi*, uzročnikom Lajmske bolesti, okidačima za LS ali su dokazi kontradiktorni (46, 47). HPV je prisutan u značajnom broju penilnih lezija kod dječaka (48). Što se tiče *B. burgdorferi*, ona je dokazana u kožnim lezijama, različitim tehnikama, od bojanja srebrom, preko PCR-a i serologije (49-51). Međutim, većina potvrdnih studija je rađena na stanovništvu Austrije i

okolnih europskih zemalja, te nešto manje u Japanu, dok one provedene u Ujedinjenom Kraljevstvu, Sjedinjenim američkim državama (SAD) i Australiji nisu dokazale prisutnost *B. burgdorferi* u lezijama (49, 52-54). Treba imati na umu i geografske razlike u genotipovima, gdje u Europi dominiraju *B. garinii* i *B. afzelii*, a u SAD-u *B. burgdorferi sensu stricto*. Europski sojevi su detektirani i u lezijama morfee, lajmske bolesti te atrophoderme Pasini-Peirini (55).

Jedna od manifestacija vulvarnog LS-a je Koebnerov fenomen tj. pojava lezija na mjestima ozlijeđene ili traumatizirane kože uslijed češanja ili seksualne aktivnosti. Stoga ponovljena trauma i iritacija navedenog područja mogu djelovati kao precipitirajući čimbenik za bolest (56). Neki od čimbenika koji se također navode su nošenje tijesne odjeće, učestala vožnja bicikle, inkontinencija urina, radioterapija, mjesto vakcinacije, kronične rane te stome (37,38). Bimodalna distribucija bolesti u žena u predpubertetskom i postmenopauzalnom razdoblju sugerira povezanost pojavnosti LS-a s niskim razinama estrogena, iako nedostaju istraživanja koja bi dokazala ovu teoriju. U studijama se bilježi povišen izražaj receptora za estrogen u biopsijama kožnih promjena kod vulvarnog LS-a. Istraživanja pokazuju da je uzimanje kontracepcije samo progesteronom u negativnoj korelaciji s LS-om, kao i uzimanje supstitucijske terapije estrogenima. Također je uočena snižena vrijednost testosterona i androstendiona te gubitak receptora za testosteron u lezionalnoj koži (57, 58). Utvrđeno je da su razine dihidrotestosterona u serumu značajno smanjene u pacijentica s neliječenim LS-om vulve što upućuje na to da bi smanjena aktivnost 5 $\alpha$ -reduktaze mogla biti etiološki čimbenik za LS (57). Zbog navedenog, u prošlosti je pokušana terapija lokalnim preparatima testosterona, no navedeni modalitet liječenja je napušten zbog nedostatka dokaza o učinkovitosti (59). U jednoj retrospektivnoj studiji na premenopauzalnim ženama koje su uzimale oralne kontraceptive uočeno je da oni iz antiandrogene skupine mogu potaknuti razvoj LS-a vulve u predisponiranih žena (60). S obzirom na dvojbenu ulogu hormona ova je teorija o etiopatogenezi posljednjih godina stavljena po strani.



**Slika 1.** Shematski prikaz etiopatogeneze lihen sklerozusa. Slika je djelo autora.

#### 1.1.5. Klasifikacija bolesti

Klasifikacija stadija bolesti nužna je kako bi se postigla ujednačena podjela bolesnika i odredilo adekvatno liječenje (61-63).

Za sada ne postoji službena klasifikacija, ali se na temelju kliničke slike, anatomskih promjena i subjektivnih simptoma može govoriti o ranom i kasnom stadiju bolesti. Također se ista podjela može primijeniti i na temelju različitih patohistoloških elemenata u ranim i kasnim stadijima bolesti.

#### 1.1.6. Klinička prezentacija

Klinička slika LS-a se razlikuje po spolu, dobi pojavnosti i mjestu lezije, odnosno razlikujemo kliničku sliku kod muškaraca i žena, djece i odraslih te genitalne i ekstragenitalne forme bolesti (Slike 1 i 2). Genitalni LS u žena prezentira se zaravnjenim papulama boje slonovače, koje postupno konfluiraju u plakove različitih dimenzija, uz mogućnost prisutstva edema, vezikula, purpure, ekhimoza, krvarenja, erozija i ulceracija. Pojava purpure često je rani znak genitalnog LS-a u žena (64). Moguća je i pojava Koebner-ovog fenomena (izomorfni odgovor tj. pojava nove kožne lezije kod oboljelog na mjestu traume). Često se anogenitalno uoče hiperkeratotične lezije koje se sastoje od atrofičnog, bjelkastog epidermisa, distribuirane u formi broja osam.



Kod genitalnog LS-a u žena moguća je pojava sekundarne lihenifikacije uslijed učestalog češanja koja se izmjenjuje s hipertrofičnim arealima te se često naziva „miješana vulvarna distrofija“ (65). Atrofija kože često se opisuje kao koža poput pergamenta ili cigaret papira (tanka, naborana, blago udubljena koža). Rjeđa klinička obilježja su mali hiperkeratotični nodusi i papule (66), pojava hemoragičnih bula koje cijele s pojavom milija (67) te linearne lezije (68). Iako su lezije u genitalnom LS-u leukodermične, postoje i hiperpigmentirani areali koji su posljedica inkontinencije melanina (69, 70). Smatra se da je leukodermija posljedica smanjene sinteze melanina ili blokade u transferu melanina prema keratinocitima (71). Iako mukoza nije nikada zahvaćena postoji mogućnost ožiljkavanja što može rezultirati aglutinacijom malih usana, obliteracijom klitorisa i suženjem introitusa vagine. Približno 30% žena s LS-om razvije perianalne lezije, koje se šire na stražnjicu i prepone. Vodeći subjektivni simptom je intenzivan svrbež. Erozijske, pukotine i/ili suženje vaginalnog otvora mogu uzrokovati bol i bolan spolni odnos (59, 72). Genitalni LS u odraslih muškaraca obično se pojavljuje u vidu bjelkastih prstenastih areala na prepuciju, koronalnom sulkusu penisa i glansu penisa, ali rijetko na korpusu penisa. Rijetko je moguća i istovremena pojava ekstragenitalne lezije. Dugotrajne promjene stoga mogu uzrokovati zatezanje prepucija, i u konačnici rezultirati fimozom, što rezultira erektilnom disfunkcijom ili bolnom erekcijom (59). Kod obrezanih odraslih osoba LS se javlja u 11-30% navedenih (73, 74). Uz svrbež, kao vodeći simptom, moguće su i dizurične tegobe. Za razliku od žena, perianalne lezije i gastrointestinalne smetnje su u vrlo rijetke kod muškaraca, no zato su moguće posljedične strikture uretre (75).



**Slika 2.** Klinički oblici lihen sklerozusa. Sliku izradio autor.

Ekstragenitalni oblik bolesti se javlja u 6% do 20% bolesnika (76). Češće se javlja kod žena, i to na gornjoj polovini trupa, aksilama, stražnjici i bočnoj strani bedara te zapešćima i čelu. Rijede se javlja palmarno, plantarno, na koži prstiju, lica (77-79), vlasišta te na mjestu vakcinacije ili ozljede (80). Vrlo rijetko ekstragenitalne lezije se javljaju u Blashkovim linijama, bilateralno zosteriformno ili budu potencirane izlaganjem suncu (81). Tipične kožne lezije prezentiraju se plakovima boje slonovače, povremeno s mogućnošću hemoragije. Diferencijalno dijagnostički treba ih razlikovati od morfeje, koja za razliku od ekstragenitalnog LS-a nema hiperkeratotičan izgled praćen osjećajem svrbeža i boli (59). Kada govorimo o pedijatrijskoj prezentaciji kliničke slike, u djevojčica koje boluju od LS-a, njih 94,6% ima samo anogenitalne lezije, a preostalih 5,4% ima samo ekstragenitalne lezije ili anogenitalne i ekstragenitalne lezije. Svrbež, bol, dizurija i osjećaj žarenja u anogenitalnom području su najčešći prijavljeni simptomi. Otprilike 58–89% djevojčica ima opstipaciju i gastrointestinalne tegobe (82-85). U kliničkoj slici dominiraju hipopigmentirani i hiperpigmentirani areali kože, eritem, fisure, ekhimoze, atrofija kože i keratotične papule, distribuirani u genitalnoj regiji u obliku „osmice“ (male usne, klitoris i perianalno područje) (83). Povremeno se opisuju asimptomatske vaskularne lezije (angiokeratomi i telangiektazije) (86-89). Često su prisutne erozije, kao posljedica češanja uslijed intenzivnog svrbeža. U kasnijim fazama bolesti moguće su i anatomske promjene tipa sljepljivanja malih usana (90, 91). Svakako je bitno naglasiti da se genitalni LS ne smije zamijeniti sa spolnim zlostavljanjem oboljelog djeteta, koje ponekad

može biti ne samo diferencijalno dijagnostička, nego i konkomitantna dijagnoza te kao takva pogoršavati kliničku sliku zbog traumom inducirane upale tj. Koebnerovog fenomena (65, 84, 92). Kod dječaka u kliničkoj slici dominiraju redom: fimozom (52%), balanitis (13%) ili poremećaji korpusa penisa (10%) (93). U skupinu dječaka koji su skloniji razvoju LS-a pripadaju oni sa stečenom fimozom (94-96). Učestalost LS-a u neobrezanih dječaka s fimozom kreće se od 2% do 95%, a 30-tak najvećih kohortnih studija pokazuju 10-50% (97, 98). Fimoza se najčešće razvija posljedično zbog skleroze prepucija koji se manifestira bijelim prstenastim arealom. Rijede su prisutne i ostale promjene tipa ožiljkavanja, pigmentnih promjena, teleangiektazija, purpura i eritema (82, 99). Nakon operativnog liječenja fimoze često zaostaju simptomi poput dizurije, baloniranja prepucija, retencije urina i erektilne boli. Kod dječaka koža perianalne regije je iznimno zahvaćena te je opstipacija kao jedan od simptoma bolesti značajno rjeđa u usporedbi s djevojčicama.

Koža skrotuma nije nikada zahvaćena. Ekstragenitalni LS prisutan je u 0,4–6% dječaka s LS-om (82). Osim gore navedenih, klasičnih prezentacija bolesti, od nedavno postoje publikacije o rijetkoj formi LS-a usana, bukalne sluznice, gingive, jezika i nepca te o lijekom uzrokovanom LS-u. Promjene su asimptomatske i bez do sada opisane maligne alteracije (68).

Nedavne studije posebno ističu LS i lihen planus kao nuspojavu imunoterapije „checkpoint inhibitorima“ koja u nekim slučajevima postaje indikacija za prekid navedene onkološke terapije kako se postigla potpuna remisija (100). Opisan je i slučaj pojave penilnog LS-a nakon intrakavernozne aplikacije alprostadila, lijeka za erektilnu disfunkciju (101).

#### 1.1.7. Patohistološka slika

Genitalni LS dijeli patohistološke značajke s ekstragenitalnom varijantom (102). Trakasti infiltrat limfocita u gornjem dermisu, vakuolarna degeneracija bazalnog sloja epidermisa i blaga homogenizacija papilarnog dermisa vide se u ranim lezijama, dok je u kasnim lezijama prisutna ortokeratotička hiperkeratinizacija i epidermisa i gornjeg dermisa, hijalinizacija i skleroza dermisa i papilarnog dermisa, vaskularne promjene, teleangiektazije i intersticijski limfocitni infiltrat (102). Patohistološki je prisutan tipičan subepidermalni edem s homogeniziranim vlaknima kolagena koja se slabo bojaju na hemalaun i eozin te s vremenom ta zona postaje sklerotična i s dosta eozinofila uz postupno zadebljanje bazalne membrane i pojačan izražaj kolagena IV i VII te dilataciju tankih krvnih žila s povremeno prisutnom hemoragijom (103). Ispod edema nalazi se gust perivaskularni limfocitni infiltrat, s dominantno T limfocitima u

srednjem dermisu. Kod potpuno razvijene kliničke slike vulvarnog LS-a, u infiltratu se uočavaju plazma stanice i histiociti. Može se uočiti i eozinofilna spongioza, koja uz ekzorijacije i egzocitozu limfocita, često ide u prilog slabijem terapijskom odgovoru te mastociti i njihove otpuštene granule (104). Promjene u epidermisu kod vulvarnog LS-a, mogu biti različite, od hiperplazije do distrofije. Vulvarni LS bez pridruženog karcinoma često imitira *lichen simplex chronicus* i za njega je karakterističan epidermis koji može biti čak trostruko deblji od onog u ekstragenitalnoj varijanti bolesti. Adneksa je najčešće očuvana. Studije opisuju i makrofagnu elastofagocitozu na spoju homogeniziranog kolagena i podležećeg retikularnog dermisa, što se može smatrati jednim od razloga za smanjenje broja elastičnih vlakana u ovoj bolesti (105).

Moguće histološke vaskularne promjene u LS-u su leukocitoklastični vaskulitis (rijetko), limfocitni vaskulitis (nerijetko) te granulomatozni flebitis (ekstremno rijetko) (106, 107).

U ranim lezijama elastična vlakna bivaju potisnuta prema nižim slojevima od strane zone edema i postupno uništena. U gornjim slojevima dermisa uočava se smanjenje fibrilina, dok su njegove vrijednosti ispod zone bazalne membrane (BMZ) uredne. Tu se mogu naći i male količine mukopolisaharida uz mjestimične rupture na BMZ-i s fragmentima pozitivnim na bojenje perjudnom kiselinom u podležećem dermisu (104). Također su u razini lamine dense i lucide prisutne broje invaginacije i pukotine, dok je kod buloznih formi LS-a vidljiva kompletna separacija ispod lamine dense. Upalni infiltrat u ranim lezijama je obilan, superficijalno raspoređen i trakast, često imitirajući onaj u lichen planusu. Navedeni upalni infiltrat, uz apoptozu i vakuolizaciju je dio tzv. „interface dermatitisa“ ili lichenoidne reakcije. S vremenom upalni infiltrat postaje širi, raspršeniji i manje intenzivan, uz zahvaćanje adneksa (108).

U patohistološkom nalazu se može uočiti i proliferacija atipičnih melanocita nevoidnog ili malignog karaktera, koji proliferiraju uz umnoženi kolagen. Smatra se da citokini u izvanstaničnom okolišu te promjene u ekstracelularnom matriksu doprinose ovakvom fenotipu atipičnih melanocitnih lezija i čak melanoma u slučajevima vulvarnog LS-a (109).

#### 1.1.8. Subjektivni simptomi

Najintenzivniji simptom, posebice kod vulvarnog LS-a žena u postmenopauznoj dobi, je svrbež, rjeđe bol prilikom spolnog odnosa (31, 110). Kod muškaraca srednje dobi najčešći simptom je erektilna disfunkcija zbog fimoze i boli (5). Kod pedijatrijskih formi LS-a dječaci

se obično žale na suženje prepucija, što se diferencijalno dijagnostički treba razlikovati od fiziološke fimoze. Djevojčice obično imaju simptome anogenitalnog svrbeža te bolne defekacije i opstipacije (111).

#### 1.1.9. Dijagnoza

LS se dijagnosticira temeljem kliničke slike ili po potrebi nakon biopsije kože (44). U pedijatrijskoj populaciji dijagnoza se također temelji na kliničkoj slici i/ili simptomima. Kod djevojčica biopsije općenito nisu potrebne. Kod dječaka dijagnoza isključivo na temelju kliničke slike može dovesti do propusta dijagnoze LS-a, pa se kod njih češće radi patohistološka analiza (nakon terapijske cirkumcizije), ali korelacija između kliničke i patohistološke dijagnoze varira, u rasponu od 53% do 88% (112-115). Postoji nekoliko slučajeva u kojima je nužno napraviti biopsiju kožne promjene te istu i dokumentirati: u slučajevima kada je klinička dijagnoza nesigurna, kod atipične ekstragenitalne prezentacije, ako nije postignut zadovoljavajući terapijski odgovor na preporučeno liječenje prema smjernicama za liječenje bolesti, ukoliko se radi terapijska cirkumcizija te kod sumnje na malignu alteraciju (76).

Biopтира se granica između promijenjene i zdrave kože, hiperkeratotični areal, perzistirajuća erozija ili ulceracija te suspektna pigmentna promjena (79). Često se u dijagnostici služimo i dermatoskopijom (epiluminescentnom mikroskopijom), neinvazivnom *in vivo* tehnikom koja se primarno koristi pri pregledu kožnih promjena putem uređaja - dermatoskopa. Dermoskopijom LS lezija ponekad možemo doći do dijagnoze kod klinički dvojbenih slučajeva. Kod vulvarnog LS-a često vidimo sivo-plave točkice, u uzorku tzv. „pepperinga“, koje odgovaraju dermalnim melanofagima. Uočavaju se i ljuske te folikularni otvori poput komedona koji nisu vidljivi histološkim pregledom. Vaskularne lezije se prezentiraju u vidu vrlo rijetkih, nespecifično raspoređenih žila, uglavnom linearnog izgleda. U ranoj fazi bolesti krvne žile su točkastog izgleda. Patognomonična su bezstrukturalna mrljasta područja, bjelkaste do bijelo-žućkaste i ružičasto-bjelkaste boje na difuznoj bjelkastoj pozadini. Kod ekstragenitalnih formi LS-a tipično se uočavaju bjelkasta bezstrukturalna područja i otvori poput komedona (116).

Druga neinvazivna dijagnostička metoda koju koristimo je reflektivna konfokalna mikroskopija, metoda svjetlosne mikroskopije kojom se može detektirati svjetlost iz vrlo tankog sloja u uzorku. Kod LS-a se na istoj uočavaju rožnati folikularni čepovi, horizontalno postavljeni akrosiringijum u znatom sloju epidermisa te izmijenjena mreža kolagenih vlakana sa snopovima zadebljanih, valovitih ili homogenih kolagenih vlakana te različitim upalnim

infiltratom mononukleara (117). Vrlo rijetko primjenjuje se i elektronska mikroskopija, pomoću koje se uočava razgradnja i *de novo* sinteza površinskog dermalnog kolagena, prisutnost kolagena u međustaničnom prostoru epidermisa, nepravilnosti bazalne membrane i kondenzacija tonofilamenata u bazalnim stanicama epidermisa (118, 119). Osim dijagnoze samog LS-a, ukoliko temeljem kliničke procjene postoji indikacija, svakako treba isključiti potencijalno pridružene autoimune bolesti kao što je autoimuni tireoiditis, šećerna bolest tipa 1, sklerodermija i reumatoidni artritis (2). Ukoliko postoji sumnja na superinfekciju može se napraviti mikrobiološka obrada bakteriološki, virološki i mikološki te alergološka obrada u vidu epikutanog testa, kod sumnje na sekundarno nastali kontaktni alergijski dermatitis (npr. na topikalne preparate) (44).

#### 1.1.10. Diferencijalna dijagnoza

Najvažnija diferencijalna dijagnoza (Tablica 1) je morfea za ekstragenitalne forme i erozivni lihen planus za genitalne forme bolesti, potom slijede: bolest presatka protiv primatelja (engl. *Graft-Versus-Host Disease*), inverzna psorijaza, ekcem, vitiligo (osobito kod djece), vulvitis/balanitis plazma stanica, vulvarna intraepitelna neoplazija (VIN), penilna intraepitelna neoplazija i planocelularni karcinom (76). Mnogi autori opisuju bolesnike s LS-om i superimponiranom morfejom, ali postoji mogućnost da sekundarni limfedem i skleroza superficijalnog dermisa imitiraju kliničku i patohistološku sliku LS-a (120, 121). U jednoj retrospektivnoj studiji 5,7% od 472 bolesnika s morfejom imalo je i LS (122).

**Tablica 1.** Prikaz najčešćih diferencijalnih dijagnoza lihen sklerozusa.

Vulvarni LS	Muški genitalni LS	Oralni LS	Ekstragenitalni LS
Morfea			
Lihen planus			
Vitiligo			
Kontaktni dermatitis			
Autoimune bulozne dermatoze			
Intraepitelna neoplazija		Diskoidni lupus eritematozus	
Lihen simpleks kronikus		Lihenoidna varijanta bolesti presatka protiv primatelja	
Kandidijaza			Hipopigmentirani oblik Mikozis fungoidesa
Leukoplakija			
Postmenopauzalna atrofija	Zoon balanitis	Bijeli spužvasti nevus	

#### 1.1.11. Liječenje

Trenutno nema jedinstvene terapijske strategije za liječenje LS-a, djelomično i zbog heterogenosti u kliničkoj slici i razlikama u dobnim skupinama unutar kojih se javlja. Posljednje aktulne smjernice Europskog dermatovenerološkog društva datiraju iz 2015.-te godine te se odnose na anogenitalne forme LS-a. Liječenje LS-a sastoji se od općih mjera, lokalnog liječenja, sistemskog liječenja, kirurškog liječenja te ostalih modaliteta liječenja tipa fototerapije, fotodinamske terapije, liječenja laserom, injektiranja masnog tkiva, matičnih stanica i plazme bogate trombocitima (engl. *platelet-rich plasma*, PRP).

Opće mjere odnose se na genitalne forme adultnog i pedijatrijskog LS-a. Potrebno je bolešću zahvaćeno područje prati nježnim sindetima ili običnom vodom 1-2 puta dnevno uz obavezno nanošenje emolijensa zbog smanjenja suhoće kože i osjećaja svrbeža te u svrhu formiranja barijere prema tjelesnim izlučevinama u anogenitalnoj regiji (123). Također treba izbjegavati tijesnu odjeću te aktivnosti tipa jahanja i vožnje bicikla. Za osobe s urinarnom inkontinencijom jako je važno preporučiti pregled urologa. U lokalnom liječenju primjenjuju se preparati prve i druge linije liječenja. U prvoj liniji liječenja su ultra potentni i potentni kortikosteroidi, a u

drugoј liniji liječenja lokalni inhibitori kalcineurina („off-label“ primjena), takrolimus i pimekrolimus.

Lokalni potentni ili ultra potentni kortikosteroidi (LKS) su prva linija terapije (59, 124, 125). Najčešće se propisuje ultra potentni klobetazol propionat 0,05%, dok je potentni mometazon furoat 0,1% prvi izbor za blaže kliničke slike ili u fazi kada je bolest dobro kontrolirana. Preferira se podloga u vidu masti jer se bolje tolerira i rjeđe izaziva kontaktni dermatitis. Koriste se različiti režimi primjene lokalne terapije. Jedan od najčešćih je svakodnevna uporaba potentnih do ultra-potentnih lokalnih steroida (obično jednom dnevno) tijekom tri mjeseca. Drugi koriste LKS svaki dan tijekom jednog mjeseca, zatim izmjenjuju dane tijekom jednog mjeseca i dvaput tjedno tijekom jednog mjeseca (ovo bi moglo biti poželjno kod djece kako bi se izbjegla atrofija kože) s pregledom nakon 3 mjeseca. Preporuka za pacijenta je da bi 30 g LKS, što je pakiranje jedne tube, trebalo biti dostatno za 3-6 mjeseci terapije, pa i dulje (44). Proaktivna terapija ili terapija održavanja odnosi se na režim primjene dva puta tjedno, na primjer, masti mometazon furoata 0,1% ili masti klobetazol propionata 0,05% te je učinkovita i sigurna u održavanju remisije i može prevenirati nastanak zloćudnih promjena (125, 126). Dugotrajna uporaba vrlo potentnih ili potentnih lokalnih kortikosteroida je učinkovita i sigurna ako je potrebna, posebice kada govorimo o aktivnoj bolesti kod žena jer kod muškaraca prednost ima kurativno liječenje (76). Iako je broj studija malen, postoje izvještaji o intralezionalnoj primjeni kortikosteroida umjesto lokalne primjene i to za „zadebljane“ i pruritične forme LS-a.

Djelotvornost topikalnog takrolimusa od 0,1% u liječenju genitalnog LS-a vulve potvrđena u dvostruko slijepoj randomiziranoj studiji na pacijentima s vulvarnim LS-om, ali navedena skupina lijekova nije odobrena za liječenje LS-a (127). Lokalni takrolimus 0,1% također se pokazao učinkovitim u liječenju bolesnika oba spola te kod genitalne i ekstragenitalne varijante bolesti, u vremenskom periodu korištenja od 4 do 6 mjeseci. U liječenju pedijatrijskih formi LS-a lokalna 0,03% mast takrolimusa se pokazala učinkovitim (uglavnom u djevojčica s anogenitalnim LS-om) kao reaktivna terapija i kao terapija održavanja (dva puta tjedno), u svrhu minimalizacije pojave recidiva (128). Prema aktualnim europskim smjernicama inhibitori kalcineurina su druga linija liječenja u odnosu na klobetazol propionat zbog manje učinkovitosti od klobetazol propionata u kupiranju simptoma svrbeža, peckanja i boli (129). U pojedinim studijama inhibitori kalcineurina korišteni su kao „alternirajuća“ ili premošćujuća terapija tijekom smanjivanja učestalosti primjene lokalnih kortikosteroida, te u konačnici kao terapija



održavanja nakon ukidanja istih. Uporaba lokalnih preparata estrogena, testosterona i progesterona nije preporučena aktualnim smjericama za liječenje anogenitalnog LS-a (76).

Mnogi lokalni pripravci isprobani su u liječenju LS-a, međutim, samo je nekoliko njih ispitano u kliničkim studijama ili kao prikaz slučaja (lokalni kalcipotriol, oksatomid, lokalni agonist tranzijentnog receptorskog kationskog kanala melastatin 8, intralezionalna primjena adalimumaba, ispiranje kalijevim permanganatom, topikalnim klorkinaldolom, fitostimolin vaginalnom kremom/ovulama, lokalnim 1% cidofovirom i sl.) (76). Ukoliko se dobar terapijski odgovor ne postigne uporabom lokalne terapije postoje različiti oblici sistemske terapije koji se preporučuju u aktualnim europskim smjericama. Sistemski kortikosteroidi preporučuju se u pulsnoj dozi (1000 mg/dan tijekom 3 uzastopna dana, 1x mjesečno, do 6 mjeseci), uz mogućnost kombinacije s metotreksatom (15 mg/tjedno), i to za generalizirane forme, dominantno ekstragenitalnog LS-a, koji je rezistentan na ostale oblike terapije. Metotreksat u dozi od 10 i 15 mg/tjedno tijekom 6 mjeseci, uz mogućnost kombinacije sa sistemskim kortikosteroidima je terapijska opcija za terapijski rezistentni generalizirani LS (130, 131). Srednje doze ciklosporina (3-4 mg/kg/dan) tijekom 3 mjeseca pokazale su se učinkovitima u liječenju inače terapijski refrakternog vulvarnog LS-a (132), jednako kao i oralni retinoidi. Kada govorimo o uporabi vitamina u liječenju LS-a spominju se vitamin A, E i D. Kirurška terapija se primjenjuje kod genitalnih formi lihena. U slučaju vulvarnog LS-a indicirana je samo kod koegzistencije VIN-e ili fuzije usana, u protivnome riskiramo recidiv koji je čest oko ožiljaka (133). Kompletna cirkumcizija je terapijski izbor u većini slučajeva ranog i srednjeg LS-a kod dječaka i muškaraca, ograničenog na prepucij i glans, ali treba prethodno pokušati liječenje s ultra-potentnim lokalnim kortikosteroidima. U složenijim slučajevima sa zahvaćenošću uretre rekonstruktivna operacija je neophodna i daje dobre rezultate ako je izvode iskusni uretralni kirurzi (76). U ostale oblike liječenja LS ubrajamo: fototerapiju, fotodinamsku terapiju, liječenje laserom, injekcije masnog tkiva, matičnih stanica i PRP. Među njima izdvajamo fototerapiju ultraljubičastim zračenjem A1 (engl. *ultraviolet A 1 radiation*, UVA1, 340–400 nm) zrakama koje se pokazala kao potencijalna prva linija u liječenju ekstragenitalnog LS-a (134, 135) te terapijski najuspješnijom opcijom ukoliko primjena lokalnih kortikosteroida nije polučila rezultate u genitalnom LS-u. Kao najvažniju manjkavost UVA1 fototerapije za liječenje vulvarnog LS-a treba navesti povećanu incidenciju planocelularnog karcinoma kože nakon primjene ovog oblika fototerapije (136, 137).

### 1.1.12. Tijek i prognoza bolesti

Iako se LS opisuje kao sporo progredirajuća bolest s periodima „zatišja“, opisana je i spontana involucija i to kod djevojčica, po pojavi menarhe (65, 138-141). Dugotrajne genitalne forme adultnog LS-a mogu dovesti do ožiljkavanja i mutilacija, uz posljedične poremećaje mokrenja i seksualne aktivnosti, suženja uretre i povezanih fizičkih oboljenja (142, 143). Ono što se najviše izdvaja je povećani rizik od maligne alteracije u planocelularni karcinom (4,7-10,7%) (144, 145).

Apsolutni rizik nastanka planocelularnog karcinoma kod muškaraca s LS-om je između 0 i 0,91%, a kod žena između 0,21 i 3,88% (146). Dugotrajna i pravilna terapija značajno snižava navedeni rizik, čiji je patogenetski mehanizam još uvijek nepoznat. Pretpostavlja se da ulogu u karcinogenezi imaju kronična upala, oksidativni stres i tumor-supresorski proteini poput p53 (147, 148). Onkogeni tipovi HPV-a tipično se ne mogu detektirati u karcinomima povezanim s LS-om (149, 150). Kada govorimo o pedijatrijskim oblicima LS-a poznato je da je većina djevojčica imala kliničku sliku i simptome i nakon puberteta (151). Reaktivna i proaktivna terapija lokalnim kortikosteroidima djeluje povoljno na ublažavanje navedenih dugoročnih posljedica (11, 140). U dječaka s LS-om koji su podvrgnuti terapijskoj cirkumciziji nalazi patohistološke analize upućuju na fimozu, suženje otvora uretre i suženja same uretre, a u 7-20% dječaka obrezanih zbog LS-a naknadno je potrebno napraviti meatomiju ili meatoplastike u roku od nekoliko tjedana do nekoliko mjeseci. Neliječeni LS-a u dječaka može dovesti do komplikacija u vidu opstrukcije mokraćnog sustava, pa čak i do zatajenja bubrega (152). U pedijatrijskoj populaciji s LS-om nije zabilježen niti jedan slučaj maligne transformacije u planocelularni karcinom (153), ali je opisano 6 slučajeva melanoma vulve u kombinaciji s LS-om (109, 154).

### 1.2. Neurogena upala

„Neurogena upala“ je naziv za patogenetski model koji opisuje mehanizam kojim osjetni živci doprinose upalnom procesu. Kožna neurogena upala je izazvana (ili pojačana) pretjeranim otpuštanjem neuropeptida u koži, kao što su peptid povezan s genom kalcitonina (engl. *calcitonin gene-related peptide*, CGRP) i tvar P, iz aktiviranih senzornih živčanih završetaka. Oslobođeni neuropeptidi djeluju na stanice kože koje izražavaju srodne neuropeptidne receptore, mikrovaskularne strukture i rezidentne mastocite, što dovodi do degranulacije, vazodilatacije i ekstravazacije proteina plazme i leukocita, a navedeno se klinički u akutnoj fazi

bolesti manifestira kao crvenilo, toplina, edem i lokalizirani svrbež kože (155). Interakcija između rezidentnih stanica i neurona kože postoji u mnogim kroničnim upalnim bolestima kože, što dovodi do povećanog izražaja neurotransmitera i proliferacije živčanih vlakana. Upalni proces se može inducirati ili pojačati otpuštanjem tvari P (engl. *substance P*, SP) i CGRP, te stimulacijom vaniloidnih receptora 1 (engl. *vanilloid receptor 1*, VR1) i tranzijentnih receptorskih kationskih kanala podobitelj A član 1 (engl. *transient receptor potential cation channel subfamily A member 1*, TRPA1) (156). Spomenuti neuropeptidi se mogu otpustiti iz živčanih završetaka, ali i izravno sintetizirati u koži i osloboditi iz brojnih stanica kože, te mogu aktivirati različite vrste stanica i tako pokazati široki spektar biološkog djelovanja. Mogu inducirati otpuštanje histamina iz mastocita, regulirati protok krvi u koži i sudjelovati u regulaciji znojenja i nocicepciji, modulirati aktivnost stanica imunološkog sustava, djelujući kao mitotički i kemotaktički čimbenici, inhibirajući ili stimulirajući upalne mehanizme (157). Neuropeptidi i medijatori koje oslobađaju mastociti mogu djelovati na druge susjedne stanice, uključujući keratinocite, dendritične stanice, neutrofile i fibroblaste, dovodeći do poremećaja homeostaze kože, abnormalnog rasta kože, diferencijacije i/ili imunomodulacije. Navodi se da je kožna neurogena upala izrazito kompleksna s višestrukim, višesmjernim interakcijama koje vode do začaranog kruga procesa koji rezultiraju kroničnom upalom (156).

Specifični neuropeptidi imaju svoje receptore na epidermalnim stanicama, stoga se ovaj složeni sustav interakcija čini važnom komponentom u brojnim kroničnim kožnim bolestima, poput psorijaze, palmoplantarne pustuloze, atopijskog i kontaktnog dermatitisa, rozaceje, vitiliga, urtikarije pigmentoze ili *prurigo nodularis*-a te u konačnici i lihen sklerozusa (158).

#### 1.2.1. Intraepidermalna živčana vlakna

Nemijelizirana C vlakna nalaze se u papilarnom dermisu kao i u epidermisu, te se protežu sve do zrnatog sloja. Postojanje slobodnih intraepidermalnih živčanih vlakana, dugo je godina bila tema za raspravu, sve dok bojanja srebrom, histokemijskim i imunohistokemijskim tehnikama, nisu dokazala navedena vlakna u samom epidermisu (159). C-vlakna su peptidergična ili nepeptidergična na temelju prisutnosti ili odsutnosti izražaja peptida neurotransmitera kao što su SP ili CGRP. Oko 70% nemijeliniziranih C vlakana klasificirano je kao C-polimodalni nociceptori, koji reagiraju na različite trofičke podražaje određene izražajem njihovog membranskog proteina, kao što su kalcijevi i natrijevi kanali (npr. VR1) (155). Osim neurotrofnog utjecaja na stanice epidermisa poznat je blizak dodir između Langerhansovih stanica i živčanih vlakana koja sadrže CGRP, što potvrđuje mogućnost moduliranja djelovanja

ovih stnica putem navedenog neuropeptida i govori u prilog neuroimunološkim funkcijama kože (160, 161). Poznata je uloga različitih vrsta nemijeliniziranih C vlakana u provođenju osjeta svrbeža, od histamin-osjetljivih, a mehano-neosjetljivih vlakana do onih mehano-osjetljivih. Kronični svrbež, povezan s upalnim i sistemskim bolestima, najčešće ne odgovara na antihistaminike, što nas navodi na druge, o histaminu neovisne, puteve svrbeža (122). Neurogena upala se također smatra jednim od mogućih mehanizama koji bi mogao pojačati percepciju svrbeža, neugodnog osjećaja koji izaziva želju za češanjem (162, 163). Neki od perifernih medijatora svrbeža su i neuromedijatori koji aktiviraju ionske kanale, a koji su dio obitelji tranzijentnih receptorskih kationskih kanala (engl. *transient receptor potential channels*, TRP), čiji se predstavnik, VR1, nalazi i na keratinocitima i na C živčanim vlaknima (164). Iako postoje brojne varijacije, ovisno o anatomskoj regiji, na 1 kvadratni milimetar epidermisa u prosjeku dolazi 114 živčanih vlakana (165, 166). Liu i suradnici su proučavali gustoću intraepidermalnih vlakana u koži zdravih pojedinaca te su došli do zaključka da je ona neovisna o dobi, ali varira unutar različitih anatomskih regija tako što proksimalni dijelovi tijela imaju veću gustoću (167). Mjerenje gustoće intraepidermalnih živčanih vlakana najčešće se koristi pri diferencijaciji neuropatskih bolesti (168), ali i u proučavanju svrbeža kod tipično pruritičnih dermatozâ kao što je *prurigo nodularis* kod kojeg je strukturalna analiza pokazala smanjenje gustoće intraepidermalnih vlakana i povećan broj živčanih vlakana pozitivnih na SP i CGRP u dermisu (169). Također i kod pacijenata s numularnim ekcemom distribucija proteinski genski produkt 9.5 (engl. *protein gene product 9.5*, PGP 9.5) pozitivnih živčanih vlakana u epidermisu bila je značajno manja u odnosu na kontrolnu skupinu, ali ne i gustoća navedenih vlakana u papilarnom dermisu (170). Rad koji je proučavao gustoću živčanih vlakana u lezijama vulvarnog LS-a u odnosu na zdrave kontrole, utvrdio je značajne razlike u gustoći vlakana između uzoraka LS-a i kontrolne skupine te manje PGP 9.5 pozitivnih intraepidermalnih vlakana u uzorcima vulvarnog LS-a u odnosu na kontrolne, dok je broj CGRP pozitivnih epidermalnih vlakana u LS uzorcima bio veći nego u kontrolnoj skupini (171).

### 1.2.2. Tranzijentni receptorski kationski kanal vaniloida 1

Kod ljudi je identificirano 28 različitih prijelaznih receptorskih potencijskih kanala TRP, grupiranih u 6 obitelji. Jedna od obitelji su i vaniloidni TRP receptori, te je za sisavce reprezentativan upravo VR1. VR1 je neselektivni kationski kanal koji se aktivira protonima, toplinom i nekim vaniloidima, poput kapsaicina (172). Izražava se u nociceptorima i reagira na nociceptivne podražaje, transdukciju neuropatske boli i toplinske hiperalgezije izazvane

upalom. Izražaj VR1 pronađen je u senzornim i motornim neuronima ljudi i štakora (172, 173). Neka istraživanja na animalnim modelima ukazuju na utjecaj temperature površine kože na permeabilnost epidermalne barijere, te je oporavak iste najbrži pri temperaturi od 36-40 Celzijevih stupnjeva, što nas navodi na zaključak o ulozi TRPV receptora u homeostazi kožne barijere (174). Osim njegovog izražaja senzornim živcima, VR1, se nalazi u rezidentnim stanicama kože ili stanicama regrutiranim tijekom kožne neurogene upale te može pridonijeti intenzivnoj i uskoj komunikaciji unutar kože između osjetnih živčanih završetaka, kože i imunoloških stanica. Utjecaj pH vrijednosti na VR1 koja se događa tijekom upalnog procesa u koži dio je patofiziologije neurogene upale, boli i svrbeža (155). Uz otpuštanje neuropeptida, priljev kalcijevih iona u kožu, posredovan VR1, mogao bi potaknuti izražaj ili otpuštanje drugih proupalnih medijatora i utjecati na imunološke stanice kože, pridonoseći samoodržanju kožne neurogene i/ili kožne kronične upale (156). VR1 se izražava u osjetnim živcima i različitim ne-neuronskim stanicama kože: keratinocitima, sebocitima, nociceptorima, stanicama imunološkog sustava, te moguće na melanocitima i fibroblastima (175), što ukazuje na njegovu ulogu u patologiji brojnih kožnih bolesti praćenih svrbežom kao što su psorijaza, atopijski dermatitis i Nethertonov sindrom, alergijski kontaktni dermatitis, ali i u procesu cijeljenja rana (175). VR1 ima ulogu u upalnom procesu u koži zahvaćenoj psorijazom te potencijalno u kroničnom svrbežu (176-178). Lee i suradnici su na animalnom i humanom modelu pokazali da se inhibicijom aktivnosti VR1 i posljedičnom redukcijom otpuštanja CGRP-a može povoljno utjecati na svrbež i upalu u porijatičnim lezijama (179).

Procesi posredovani VR1 receptorom imaju ulogu i u patogenezi oralnog lihen planusa, što je još jedan primjer povećanog broja VR1-pozitivnih ne-neuralnih stanica u upalnim stanjima (180). Genski izražaj VR1 je značajno povećana i u eritematoznoj rozaceji (181). Do sada nema studija o izražaju VR1 u koži zahvaćenoj lihen sklerozusom.

### 1.2.3. Peptid povezan s kalcitoninskim genom

CGRP je neuromodulator koji postoji u C i A $\delta$  senzornim živčanim vlaknima te s sastoji od 37 aminokiselina (182, 183). CGRP pripada obitelji koja uključuje kalcitonin, adrenomedulin, amilin i adrenomedulin 2/intermedijarni protein. CGRP kod ljudi postoji u dva oblika:  $\alpha$ CGRP (visoko izražen u senzornim neuronima) i  $\beta$ CGRP (visoko izražen u crijevnom živčanom sustavu) (184).

Po djelovanju CGRP je vazodilatatorni sekretorni peptid koji se obično izražava u citoplazmi neurona malog promjera, kao i u velikim senzornim neuronima i motoneuronima u epidermisu kralježnjaka (172, 173, 185). Vazodilatatorno djelovanje CGRP-a dovodi do ekstravazacije plazme, rezultirajući neurogenom upalom s eritemom i edemom (186). Zajedno sa SP se ubraja u klasične neuropeptide koji djeluju izravno na vaskularne endotelne stanice i glatke mišićne stanice, ostvarujući tako prethodno spomenuti vaskularni učinak (142). Pokazalo se da CGRP pojačava prezentaciju antigena na Langerhansovim stanicama kad je u pitanju Th2 stanični odgovor pomoćničkih limfocita, dok inhibira iste za Th1 odgovor, čime pomiče aktivnost navedenih stanica prema prema Th2 staničnom odgovoru (187). CGRP može aktivirati mastocite izravno preko CGRP receptora na površini mastocita, što može dovesti do dvosmjerne pozitivne povratne sprege između živčanih vlakana i mastocita (188). CGRP, zajedno sa SP, povećava kemotaksu eozinofila, aktivaciju i preživljavanje istih (189).

CGRP ima važnu ulogu u patofiziologiji neuropatske i upalne boli, budući da se izražava u polimodalnim nociceptorima unutarnjih organa i kože (173). CGRP otpušten iz osjetnih živaca utječe na diferencijaciju keratinocita, izražaj citokina, te apoptozu putem moduliranja razine intracelularnog dušikovog oksida pojačavanjem aktivnosti sintetaze dušikovog oksida. U koži, CGRP utječe na neurogenu vazodilataciju, regrutiranje upalnih stanica, pomicanje Langerhansovih stanica prema Th2 odgovoru i aktivaciju mastocita (190). Bolesnici oboljeli od psorijaze praćene svrbežom imaju veći izražaj receptora za CGRP u usporedbi s onima bez svrbeža, dok oni s atopijskim dermatitisom imaju u koži brojna CGRP-pozitivna živčana vlakna (190). U lezionalnoj koži oboljelih od rozaceje nađen je povišen izražaj brojnih neuropeptida, uključujući CGRP-a, koji u ovoj bolesti djeluje kao potentan vazodilatator na glatke mišićne stanice arteriola (191). Sličnu ulogu, potentnog vazodilatatora ima i u patogenezi upalnog procesa u koži oboljelih od psorijaze gdje ostvaruje sinergistički učinak sa SP (192). Ispitivanje elektronskim mikroskopom pokazalo je da je broj živčanih vlakana imunoreaktivnih na CGRP povećan u dermisu prurigo nodularis lezija i da su lokalizirana zajedno s mastocitima i eozinofilima koji su također bili povećani u lezionalnoj koži u usporedbi s normalnom kožom dok u području bez živčanih vlakana nije bilo niti eozinofila niti mastocita, te da navedena vlakna koji mogu doprinijeti vazodilataciji opaženoj kod *prurigo nodularis*-a (193). U uzorcima vulvarnog LS-a uočena je hiperinervacija epidermisa CGRP pozitivnim živčanim vlaknima, te su autori studije to pripisali pojačanom češanju kože zbog intenzivnog svrbeža (171).

#### 1.2.4. PGP 9.5

PGP 9.5 je ubikvitin karboksil-terminalna hidrolaza L1 (engl. *ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1*, UCHL1) s dualnom hidrolaznom i ligaznom aktivnošću i molekulskom težinom od 27 kDa, kodirana *UCHL-1* genom. Također je deubikvitinacijski enzim (DUB) koji sudjeluje u posttranslacijskoj modifikaciji proteina dodavanjem i uklanjanjem ubikvitina iz poliubikvitinskih lanaca. Prvi je put otkriven prije više godina kao „protein specifičan za mozak”, a radi se o visoko očuvanom proteinu u neuronima i neuroendokrinim stanicama u kralješnjaka, kod kojih čini otprilike 5-10% citoplazmatskih proteina (194). Jedan je od najboljih pan-neuronskih biljega koji se izražava su citoplazmi većine neurona kao i u živčanim završecima i neuro-imuno-endokrinim stanicama kože. Sve (peptidergičke i nepeptidergičke) strukture perifernog živčanog sustava mogu se vizualizirati pomoću navedenog neurobiološkog biljega. Njegova količina čini do 3-5% ukupne količine proteina u mozgu (194). U koži je UCHL1/PGP 9.5 povezan sa živčanim završecima, ali je studija također utvrdila njegov izražaj u neuro-imuno-endokrinim stanicama kože (195). Također ga mogu sadržavati i keratinociti bazalnog i suprabazalnog sloja, melanociti, Merkelove i Langerhansove stanice (165, 195, 196). Nekoliko je studija pokazalo modifikaciju PGP 9.5 imunoreaktivnih aksonskih živčanih završetaka i neuro-imuno-endokrinih stanica u koži tijekom kronične kožne neurogene upale (197). Takve promjene u uznapredovalim kožnim lezijama mogu nalikovati imunološki posredovanoj ozljedi tkiva i uključiti keratinocite (kao u primjeru psorijaze) u daljnju transmisiju svrbeža (41, 198, 199). Promjene u rasporedu i gustoći PGP 9.5 pozitivnih živčanih vlakana imaju ulogu u kroničnim pruritičnim dermatozama, poput atopijskog dermatitisa i psorijaze (194, 200, 201). Kupczyk i suradnici su provodili studiju kojom su pokušali utvrditi novi neurobiološki biljeg za svrbež u psorijazi te su utvrdili da postoje razlike u gustoći PGP 9.5 pozitivnih živčanih vlakana u koži između zdravih pojedinaca i onih oboljelih od psorijaze. U koži zdravih pojedinaca PGP 9.5 bio je prisutan u dermalnim živčanim vlaknima, koja su mjestimično prelazila dermo-epidermalnu granicu te samo u pojedinačnim slučajevima su učena slobodna epidermalna vlakana koja su prodirala do stratum spinosum ili granulozuma. U epidermisu oboljelih od psorijaze bili su prisutni brojni živčani završetci, od kojih su neki čak dosežali stratum corneum, uz jak izražaj PGP 9.5 unutar sloja bazalnih keratinocita (200).

Zauzvrat, izražaj PGP 9.5 u psorijatičnim lezijama bio je raznovrsniji i pokazao je graduirane obrasce izražaja: izražaj PGP 9.5 primijećen je u bazalnim keratinocitima sa slobodnim PGP 9.5 pozitivnim epidermalnim živčanim završecima ili bez vidljivog izražaja unutar bazalnih keratinocita, ali s tendencijom prelaska sa slabog izražaja PGP 9.5 unutar živčanih završetaka

na jak izražaj PGP 9.5, kada gledamo prema suprabazalnim keratinocitima. Čini se da su živčani završeci u psorijatičnim lezijama izduženiji u usporedbi s onima u koži zdravih pojedinaca (200).

Kada se proučavala uloga PGP 9.5 imunoreaktivnih živčanih vlakana u još jednoj dermatози s lokaliziranim inetenzivnim svrbežom, lihen amiloidozusu, zaključak je bio da je u oboljelom tkivu došlo do smanjenja gustoće inervacije u epidermisu i dermoepidermalnom spoju, što bi, kroz senzibilizaciju postojećih živčanih vlakana, moglo biti odgovorno za jaki svrbež koji se vidi u ovom stanju (202).

Što se tiče ekspresije PGP 9.5 pozitivnih vlakana u koži bolesnika oboljelih od LS-a, do sada su dostupni samo podaci koji su uspoređivali raspodjelu navedenih vlakana u uzorcima adultnog vulvarnog LS-a i zdravih kontrola, a koji su pokazali manju gustoću intraepidermalnih PGP 9.5 pozitivnih vlakana u uzorcima vulvarnog LS-a, usporedno s kontrolom (171).

#### 1.2.5. Kaspaza-3

Kaspaze (cistein **aspartat** specifične proteaze) su skupina proteaza koje na aktivnom mjestu sadrže cistein te se aktiviraju u procesu programirane stanične smrti - apoptoze (203). Kaskadna aktivacija kaspaza može biti potaknuta iz same stanice (unutrašnji put) ili izvana (vanjski put) (204, 205). Razlikujemo inicijatorske i izvršne kaspaze, s tim da su inicijatorske kaspaze kaspaza-2, -8, -9 i -10, a izvršne kaspaza-3, -6 i -7 (204). Glavnu ulogu u procesu apoptoze ima kaspaza-3 jer u slučaju njene supresije apoptoza nije moguća, a s obzirom da je kaspaza-3 uključena i u unutrašnji i vanjski put stanične smrti, detekcija njezine aktivacije predstavlja izvrstan biljeg za apoptozu (206). Imunoreaktivnost aktiviranog oblika kaspaze-3 opisana je unutar lezija pruritičnih dermatosa kao što su psorijaza (203), i akutna faza atopijskog dermatitisa (207). Aktivacija kaspaze-3 u lezijama LS-a nije opisana u literaturi.

#### 1.2.6. Proliferacija

Proliferacija je umnožavanje ili uzastopno stvaranje novih stanica ubrzanim mitotičkim diobama tijekom stvaranja novoga tkiva. Fiziološka proliferacija javlja se tijekom embrionalnoga razvoja te u stanjima u kojima je potrebno ubrzano umnožavanje stanica, kao regeneracija tkiva ili upalnog procesa tkiva. Patološka proliferacija javlja se kod bujanja malignih tumorskih stanica. Intenzitet proliferacije može se procijeniti različitim citološkim i



histološkim postupcima. Od imunohistokemijskih metoda najviše se koristi određivanje antigena jezgre Ki-67 (Ki prema Kiel University, a 67 prema rednom broju u mikrotitarskim pločicama kada je otkriven). Ki-67 je nehistska jezgrina bjelančevina (208), koja se nalazi u stanicama u svim fazama staničnog ciklusa (G1, S, M i G2 faza staničnog ciklusa), dok u fazi mirovanja stanice (G0 fazi) nije prisutna. Stoga je izvrstan biljeg stanične proliferacije (209-211). U kontekstu neurogene upale brojni neuropeptidi imaju hiperproliferativan učinak na keratinocite (212). Živčana vlakna također komuniciraju s keratinocitima i induciraju epidermalnu proliferaciju (213). Imunohistokemijsko bojenje na Ki-67 je korisna tehnika za procjenu proliferativne aktivnosti epidermisa. U istraživanju u kojem su uspoređivane psorijatične lezije usporedno sa zdravim kontrolama uočeno je da su u zdravom epidermisu Ki-67-pozitivne stanice bile su rijetke u bazalnom sloju i sljedećem suprabazalnom sloju, dok su u psorijatičnom epidermisu bile obilne u oba navedena sloja i nekoliko slojeva iznad prvog suprabazalnog sloja (214). Ki-67 pozitivne stanice su mnogobrojnije u psorijatičnim lezijama, u usporedbi sa zdravom kožom, što korelira s kliničkom težinom psorijaze (215). Pokazalo se da je izražaj Ki-67 kod psorijaze bila značajno veća u usporedbi s blagim do umjerenim atopijskim dermatitisom i značajno manja u usporedbi s teškim atopijskim dermatitisom (216). Do sada su studije utvrdile prekomjerni izražaj Ki-67 u uzorcima kože oboljelih od genitalnog LS-a, u usporedbi s uzorcima oboljelih od ekstragenitalne varijante LS-a i zdravom kožom (217) te niži mitotski indeks Ki-67 u uzorcima kože pacijenata s penilnim LS i rekurentnim strikturama u odnosu na skupinu oboljelih sa neponavljajućim strikturama (218).

### 1.2.7. Makrofazi

Makrofazi su fagocitirajuće stanice koje uglavnom potječu iz krvnih monocita, a imaju važnu ulogu u prirođenom i stečenom imunitetu te u modeliranju upalnog procesa. Uslijed upalnog procesa, moguća je tkivna diferencijacija monocita u makrofage (219). Postoje dvije glavne skupine makrofaga, i to prema polarizaciji: klasično aktivirani makrofazi (M1) koji dovode do proupalnih odgovora i alternativno aktivirani makrofazi (M2) koji sudjeluju u modulaciji imunološke regulacije i remodeliranju tkiva (220-222). Osim toga, M2 se mogu dalje podijeliti na M2a, M2b, M2c, M2d na temelju transkripcijskih promjena nakon izlaganja različitim stimulusima (221).

Svaka bolest može dovesti do različitih polariziranih fenotipova makrofaga (223). M1 povezani su s kroničnom upalom i inhibicijom tumora, dok su M2 povezani s rastom tumorskih stanica i

metastazama kroz angiogenezu i remodeliranje tkiva (224). Alergijske reakcije su povezane s M2 (225, 226). Makrofazi i monociti u tkivu reguliraju reparaciju, regeneraciju i fibrozu tkiva pa njihov prekomjerni broj može dovesti do hiperprodukcije upalnih čimbenika. Makrofazi igraju ključnu ulogu u upali te se na početku upalnog procesa aktiviraju i djeluju destruktivno (227). Aktivacija makrofaga, koja uključuje indukciju više od 400 gena, rezultira povećanom sposobnošću eliminacije bakterija i regulacije mnogih drugih stanica putem oslobađanja citokina i kemokina, no međutim, prekomjerna aktivacija ima štetne učinke, poput septičkog šoka, koji može dovesti do sindroma disfunkcije više organa i smrti (227). U drugim situacijama, postojanost proupalne aktivnosti rezultira razvojem kronične upale uključujući kronične upalne bolesti kože kao što su psorijaza i atopijski dermatitis (227, 228). U AD-u makrofazi se mogu uočiti u akutnim i kroničnim kožnim lezijama (229). Monoklonsko protutijelo za CD68 (engl. *cluster of differentiation 68*) koristi se za prepoznavanje makrofaga koji se nalaze u različitim tkivima, uključujući kožu (230).

Imunofluorescencijskim tehnikama dokazano je da je broj CD68+ iNOS+ M1 povećan, a CD68+ CD163+ M2 smanjen u porijatičnim lezijama u usporedbi sa zdravom kožom (231). Drugo istraživanje pokazalo je nakupljanje dermalnih CD68+ makrofaga koji su izražavali tumor nekrotizirajući čimbenik rasta alfa (engl. *tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ) u psorijatičnim plakovima (232). Upalni infiltrati u uzorcima vulvarnog LS-a pokazali su povećani broj stanica obojenih monocitnim/makrofagnim biljegom CD68 (233).

### 1.2.8. Mastociti

Mastociti su stanice imunološkog sustava koje potječu iz koštane srži, a široko su rasprostranjene u tijelu, i to najgušće na mjestima potencijalnog izlaganja patogenu i alergenu kao što su koža, dišni i probavni sustav. Sudjeluju u upalnim procesima, ali i u imunoglobulinom E posredovanim alergijskim reakcijama te u oslobađanju solubilnih nosintetiziranih ili prethodno sintetiziranih medijatora, kao što su histamin, proteaze, citokini, kemokini, lipidni medijatori, prostaglandini, leukotrieni i TNF- $\alpha$  (234). Prisutni su u svim vaskulariziranim tkivima i njihova patološka aktivacija može dovesti do kronične upale i patološkog remodeliranja tkiva (235). Osnovne funkcije mastocita u koži su sudjelovanje u imunološkom i upalnom odgovoru kože, kožnim alergijskim reakcijama, remodeliranju i regeneraciji tkiva, te u procesu cijeljenja rana (236, 237). Prisutni su u većem broju u koži izloženoj suncu te u gornjem dermisu, bez obzira na spol i dob (238). Kod prikazivanja

mastocita, jedna od tehnika je i imunohistokemijsko bojanje na triptazu, enzim koji se uz kimazu nalazi u sekretornim granulama mastocita u koži (177). Svugdje u tijelu, pa tako i u koži, postoje poveznice sa živčanim sustavom, preko senzornih, nemijeliniziranih živčanih vlakana (C vlakna) koja sadrže neuropeptid CGRP i modificiranih makrofaga, mastocita i drugih stanica. Različiti neuropeptidi moduliraju funkciju mastocita (239). Eksperimentalni životinjski modeli, kao i biopsije kože oboljelih od psorijaze i atopijskog dermatitisa, potvrđuju recipročnu interakciju između osjetnih živaca i mastocita koji sadrže sekretorne granule, koje kada se oslobode uzrokuju svrbež (238). U uzorcima kože oboljelih od atopijskog dermatitisa i numularnog dermatitisa pronađen je veći broj kontakata između mastocita i živčanih vlakana, kako u lezionalnoj, tako i u nelezionalnoj koži, uz napomenu da je u lezionalnoj koži uočen značajno veći broj živčanih vlakana imunoreaktivnih na CGRP (240, 241). Do sada je povećan broj mastocita pronađen u drugim kožnim bolestima praćenim svrbežom, kao što su gornji dijelovi dermisa kod psorijatičnih lezija (242). Gore navedeno nas snažno upućuje na ulogu mastocita kao promotora neurogene upale, ali i kao perpetuatora iste, jer triptaza koju oslobađaju degranulirani tj. aktivirani mastociti stimulira daljnju sekreciju neuropeptida, kao što je CGRP, iz živčanih vlakana (243).

## 2. HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Svrbež u genitalnoj varijanti LS-a je intenzivniji u odnosu na ekstragenitalnu varijantu bolesti, a prisutan je u oboljeloj koži u odnosu na zdravu zbog razlika u elementima neurogene upale:

1. Distribucija CGRP, PGP 9.5 i VR1 pozitivnih živčanih vlakana razlikuje se u genitalnim i ekstragenitalnim varijantama LS-a, kao i u oboljeloj u odnosu na zdravu kožu
2. Proliferacija (Ki-67) i apoptoza (kaspaza-3) stanica je veća u koži zahvaćenoj LS-om u odnosu na zdravu kožu
3. Makrofazi u upalnom infiltratu (CD68 biljeg) gušće su raspoređeni u genitalnoj u odnosu na ekstragenitalnu varijantu bolesti
4. Gustoća i distribucija mastocita razlikuje se u genitalnoj i ekstragenitalnoj varijanti liheni

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Istražiti distribuciju živčanih vlakana, vaniloidnih receptora, biljega proliferacije i apoptoze keratinocita, te distribuciju mastocita i makrofaga u uzorcima tkiva genitalnog (vulvarnog) i ekstragenitalnog LS-a, kao i zdrave genitalne (vulvarne) i ekstragenitalne kože
2. Analizirati ko-lokalizacije za VR1 s CGRP i triptazom, kako bismo utvrdili je li VR1 prisutan u senzornim živčanim vlaknima i mastocitima u lezijama LS-a
3. Razmotriti daljnje razumijevanje uloge neurogene upale u patofiziologiji LS-a i otkriti potencijalne nove terapijske mete za liječenje navedenog patološkog stanja.

#### 4. MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA



#### 4.1. Prikupljanje uzoraka

Sve protokole ovog istraživanja odobrilo je Povjerenstvo za etiku i lijekove Kliničkog bolničkog centra (KBC) Split (urudžbeni broj: 2181-147/01/06/M.S.-22-02) i Opće bolnice Šibensko-kninske županije (urudžbeni broj: 01-23183/1-18), a izvedeni su u skladu s Helsinškom deklaracijom i drugim relevantnim propisima i smjernicama. Biopsije kože dobivene su od pacijenata na Klinici za dermatovenerologiju KBC-a Split nakon njihovog pisanog informiranog pristanka. Uzorci su prikupljeni od siječnja 2019. do prosinca 2021. od ukupno 40 pacijentica i podijeljeni u četiri skupine: zdrava ekstragenitalna koža, zdrava genitalna koža, ekstragenitalna koža zahvaćena LS-om i genitalna koža zahvaćena LS-om. Svaka skupina sadržavala je uzorke od 10 žena, što je dovoljna veličina uzorka prema Meadovoj jednadžbi resursa. Uzorci zdrave ekstragenitalne i genitalne kože dobiveni su iz okolnog tkiva u biopsijama i malim zahvatima zbog nekih drugih dijagnoza, obično uklanjanjem madeža (nevusa) na trupu i vulvi. Uzorci ekstragenitalne i genitalne kože zahvaćene LS-om uzeti su kao dio rutinske procedure u našoj ustanovi — svim lezijama s kliničkim značajkama LS-a radi se biopsija pri prvom prikazu, prije primjene bilo kakve terapije, kako bi se potvrdila dijagnoza. Pedijatrijski pacijenti s LS-om rijetko su podvrgnuti biopsiji, stoga nisu bili uključeni u našu studiju. Svi ekstragenitalni uzorci (zdravi i LS) uzeti su iz trupa, gdje se obično i nalaze ekstragenitalne lezije LS-a. Prikupljene su informacije o dobi svih pacijenata, kao i vremenu od početka bolesti i razini svrbeža mjerenoj vizualnom analognom ljestvicom (VAS) za bolesnike s LS-om.

#### 4.2. Histokemijski i imunofluorescencijski postupak

Tkiva su fiksirana u 4% paraformaldehidu u 0,1 molarnoj fosfatom puferiranoj fiziološkoj otopini (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) preko noći. Nakon ispiranja radnim PBS-om dehidrirana su u stupnjevanim otopinama etanola do 100%, uklopljena u prafinske blokove, serijski izrezana kao rezovi debljine 5  $\mu\text{m}$  i postavljena na predmetna stakalca. Kako bi se provjerila razina reza i očuvanost tkiva svako 10. staklo obojano je hematoksilin-eozinom (engl. *hematoxylin and eosin*, H & E) i pregledano na Olympus mikroskopu (BX40; Tokio, Japan). Slike rezova obojenih H & E snimljene su pomoću Cella Imaging Software for Life Sciences Microscopy (Olympus, Tokyo, Japan).

Rezovi određeni za imunofluorescencijsko bojanje podvrgnuti su deparafinizaciji u ksilenu i rehidraciji u vodenim otopinama etanola. Nakon ispiranja destiliranom vodom, uzorci su

inkubirani u natrijevom citratnom puferu (pH 6,0) kroz 30 minuta na 95 °C u kuhlalu na paru. Potom su ohlađeni na sobnu temperaturu te isprani radnom otopinom PBS-a. Uslijedila je inkubacija u puferu za blokiranje (Protein Block ab64226, Abcam, Cambridge, UK) tijekom 20 minuta, kako bi se spriječilo nespecifično vezanje sekundarnih protutijela. Nakon još jednog ispiranja u PBS-u, uzorci su inkubirani u vlažnoj komori preko noći s primarnim protutijelima (Tablica 2), nakon čega je uslijedilo dodatno ispiranje u PBS-u. Zatim su primijenjena odgovarajuća sekundarna protutijela (Tablica 2) i rezovi su inkubirani sat vremena u vlažnoj komori. Rezovi su zatim isprani u PBS-u posljednji put i jezgre su obojene sa 4,6-diamidino-2-fenilindolom (engl. *4',6'-diamidino-2-phenylindole*, DAPI). Na kraju, rezovi su isprani destiliranom vodom, osušeni na zraku 15 minuta i pokriveni stakalcima uz korištenje medija za poklapanje (Immuno-Mount, Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, SAD). Kako bi se isključilo nespecifično vezanje sekundarnih protutijela, napravljena su kontrolna stakalca izostavljanjem primarnih protutijela iz protokola, što je rezultiralo izostankom bojenja tkiva. Rezovi su ispitani pomoću Olympusovog fluorescencijskog mikroskopa (BX61; Tokio, Japan) s montiranom digitalnom kamerom (DP71; *Nikon Corporation*, Tokio, Japan). Mikrofotografije su snimljene pomoću fotoaparata *Nikon DS-Ri2* (*Nikon Corporation*, Tokio, Japan), a obrađene su pomoću programa *Adobe Photoshop v21.0.2*. (Adobe, San Jose, CA, SAD).

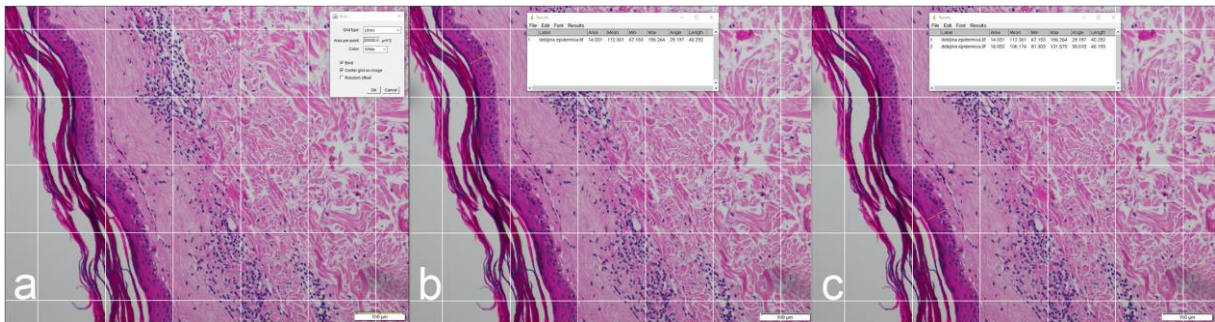
**Tablica 2.** Primarna i sekundarna protutijela korištena u studiji.

	<b>Protutijelo</b>	<b>Domaćin</b>	<b>Šifra br.</b>	<b>Razrjeđenje</b>	<b>Proizvođač</b>
<b>Primarna</b>	<i>Anti-CD68 antibody [ED1]</i>	Miš	ab31630	1:150	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
	<i>Anti-Ki-67 Antibody</i>	Kunić	AB9260	1:300	Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, Sjedinjene američke države (SAD)
	<i>Human/Mouse Active Caspase-3 Antibody</i>	Kunić	AF835	1:100	R&D Systems, Minneapolis, MN, SAD

	<i>Anti-Mast Cell Tryptase antibody [AA1]</i>	Miš	ab2378	1:500	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
	<i>Anti-TRPV1 antibody</i>	Kunić	ab3487	1:100	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
	<i>PGP9.5 Monoclonal Antibody (BH7)</i>	Miš	480012	1:500	Invitrogen, Waltham, MA, SAD
	<i>Anti-CGRP antibody</i>	Koza	ab36001	1:400	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
<b>Sekundarna</b>	Alexa Fluor®488 AffiniPure Anti- Mouse IgG (H+L)	Magarac	715-545-150	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD
	Alexa Fluor®488 AffiniPure Anti- Goat IgG (H+L)	Magarac	705-545-003	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD
	Alexa Fluor®488 AffiniPure Anti- Rabbit IgG (H+L)	Magarac	711-545-152	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD
	Rhodamine Red™- X (RRX) AffiniPure Anti- Goat IgG (H+L)	Magarac	705-295-003	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD
	Rhodamine Red™- X (RRX) AffiniPure Anti- Mouse IgG (H+L)	Magarac	715-295-151	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Baltimore, PA, SAD

### 4.3. Debljina epidermisa i gustoća upalnog infiltrata

Debljina epidermisa je mjerena na fotografijama rezova obojenih H & E od bazalnog sloja do početka rožnatog sloja pomoću modificirane verzije metode koju su opisali Therkildsen i sur. (244). Za svaki smo uzorak analizirali epidermis pri ukupnom povećanju od  $\times 100$  i izmjerili najkraću duljinu od dermo-epidermalne granice (engl. *dermo-epidermal junction*, DEJ) do rožnatog sloja na deset reprezentativnih područja odabranih nakon korištenja funkcije „grid“ (Slika 3) *ImageJ* softvera (NIH, Bethesda, MD, SAD). Prosječna vrijednost ovih duljina korištena je za daljnju analizu.



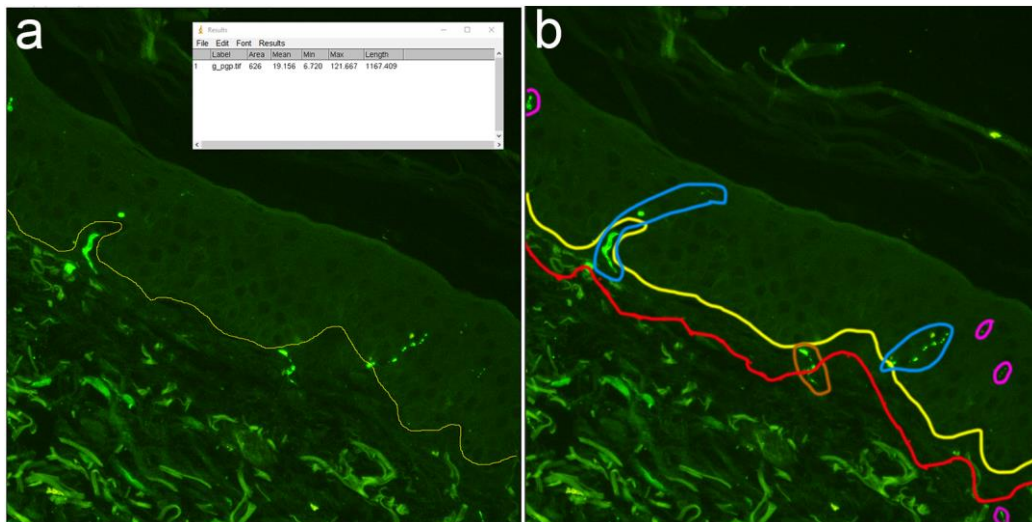
**Slika 3.** Izračun debljine epidermisa koristeći *ImageJ* (NIH, Bethesda, MD, SAD). Funkcijom „grid“ vidno polje je podijeljeno na kvadrate veličine  $20000 \mu\text{m}^2$  (a). Odabran je kvadrat u kojem je vidljiva čitava debljina epidermisa i izmjerena je duljina od dermo-epidermalne granice do roževine (b). Odabran je još jedan nesusjedni kvadrat na istom vidnom polju i ponovljen je isti postupak (c).

Gustoća upalnih infiltrata u LS uzorcima izmjerena je na neobrađenim slikama bojenja H & E koristeći „*freehand selection tool*“ i „*measure*“ funkcije *ImageJ* softvera kako bi se dobila veličina površine na kojem je prisutan infiltrat. Za izračunati gustoću upalnog infiltrata podijeli smo dobivenu vrijednost površine s duljinom DEJ-e izmjerene na istom rezu.

### 4.4. Gustoća živčanih vlakana

Gustoća intraepidermalnih živčanih vlakana (engl. *intraepidermal nerve fiber density*, IENFD) izračunata je kako je opisano u smjernicama „European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline“ (245). Ukratko, analizirali smo tri nesusjedna vidna polja u svakom uzorku fotografirana pomoću objektiva  $\times 40$ . Brojili smo živce obojene na PGP 9.5 ili CGRP koji su prešli DEJ-u, kao i živce prisutne isključivo intraepidermalno, bez očiglednog prelaska DEJ-e, ukoliko je odgovarajući subepidermalni dio živca bio prisutan.

Sekundarno grananje živaca unutar epidermisa nije uključeno u izračun. Gustoća subepidermalnih živčanih vlakana (engl. *subepidermal nerve fiber density*, SENFD) izračunata je na istim rezovima kao i IENFD, korištenjem modifikacije metode koju su opisali Vlcková-Moravcová i sur. (246). Prebrojili smo pojedinačna živčana vlakna pronađena u dermisu unutar 50  $\mu\text{m}$  od DEJ-e, ako nisu prešla DEJ-u ni imala odgovarajući intraepidermalni odsječak (Slika 4). Duljina DEJ-e izmjerena je pomoću *ImageJ* softvera (NIH, Bethesda, MD, SAD). Rezultati su izraženi kao broj izbrojanih živčanih vlakana po mm DEJ-e.

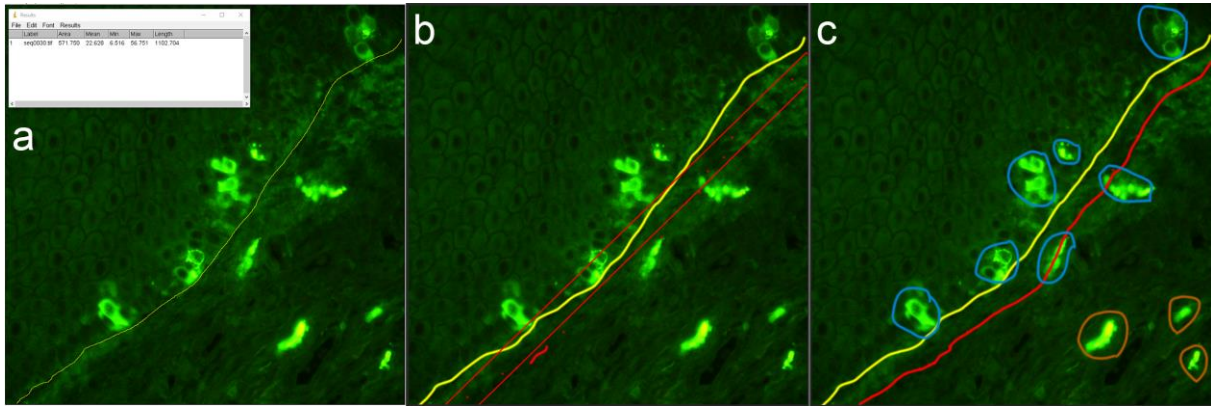


**Slika 4.** Određivanje gustoće živčanih vlakana korištenjem *ImageJ* softvera (NIH, Bethesda, MD, SAD). Označena i izmjerena je duljina dermo-epidermalne granice na vidnom polju (a). Prikazano je područje dermisa širine 50  $\mu\text{m}$  počevši od dermo-epidermalne granice (područje između crvene i žute linije; detaljniji opis ispod sljedeće slike). Označeni su intraepidermalni živci (plavo zaokruženi), subepidermalni živac (smeđe zaokruženi) i živci koji se ne ubrajaju u izračun prema smjernicama za izračun (ružičasto zaokruženi) (b).

#### 4.5. Gustoća stanica, indeks proliferacije i kvantifikacija apoptoze

Brojili smo mastocite i makrofage na uzorcima obojenim na triptazu, odnosno CD68. Tri nesusjedna vidna polja na svakom uzorku analizirana su pri ukupnom povećanju od  $\times 400$  i sve pozitivno obojene stanice su izbrojene nakon preklapanja staničnih biljega i DAPI bojenja pomoću programa *Adobe Photoshop v21.0.2*. (Adobe, San Jose, CA, SAD). Dodatno, podijelili smo svaki analizirani rez na površinsko područje, koje sadrži epidermis i dermis unutar 50  $\mu\text{m}$  od DEJ-e, i duboko područje, koje uključuje ostatak uzorka (Slika 5). Stanice smo prebrojili u oba područja. Gustoća stanica izračunata je kao omjer između broja stanica i duljine DEJ-e u

analiziranom rezu. Indeks proliferacije epidermisa izračunat je kao postotak Ki-67-pozitivnih bazalnih stanica (247). Kvantificirali smo apoptozu kao postotak kaspaza-3 pozitivnih epidermalnih stanica. Stanice su prebrojene pri ukupnom povećanju  $\times 400$  u tri nesusjedna vidna polja po uzorku.



**Slika 5.** Određivanje gustoće mastocita koristeći ImageJ program. Označena i izmjerena je duljina dermo-epidermalne granice na vidnom polju (a). Izrađen je pravokutnik širine  $50\ \mu\text{m}$  i prema njemu je određeno subepidermalno područje (između žute i crvene linije) (b). Označeni su mastociti površinske regije (intraepidermalni ili subepidermalni, plavo zaokruženi) i mastociti dublje regije (smeđe zaokruženi) (c).

#### 4.6. Statistička analiza

Svi podaci prikazani su kao aritmetička sredina vrijednosti skupina analiziranih uzoraka. Normalnost distribucije podataka testirana je Shapiro–Wilk-ovim testom. Postojanje statistički značajnih razlika utvrđeno je jednosmjernom analizom varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA), a razlike između pojedinih skupina utvrđene su nekorigiranim Fisherovim LSD post-hoc testom za IENFD i CGRP-pozitivna SENFD, dok su ANOVA po Welch-u i t-test za nevezane uzorke (Unpaired t) s Welch-ovom korekcijom korišteni kao post-hoc testovi za PGP 9.5-pozitivna SENFD. Postojanje statistički značajnih razlika u dobi, debljini epidermisa, indeksu proliferacije, apoptozi te gustoći mastocita i makrofaga utvrđeno je Kruskal-Wallis-ovim testom s nekorigiranim Dunn-ovim post-hoc testom. Mann-Whitney-ev U test korišten je za ispitivanje značajnosti razlika u gustoći upalnog infiltrata, vremena između početka bolesti i biopsije i VAS rezultata za svrbež. Izračun potrebne veličine uzorka proveden je korištenjem mrežnog programa koji se nalazi na mrežnoj stranici <http://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/>. Za izračun su korišteni preliminarni podaci iz pilot pokusa na pet uzoraka dobiveni analizom

fotografija kože za izračun intraepidermalne gustoće živčanih vlakana obojenih na PGP 9.5, sa sljedećim parametrima;  $\mu_1 = 2,7$ ,  $\mu_2 = 0,8$ ,  $\sigma = 1,5$ , power = 80%,  $p = 0,05$ , pri čemu je dobivena najmanja potrebna veličina uzorka  $n = 10$ . Statistička značajnost postavljena je na  $p < 0,05$ .

## 5. REZULTATI



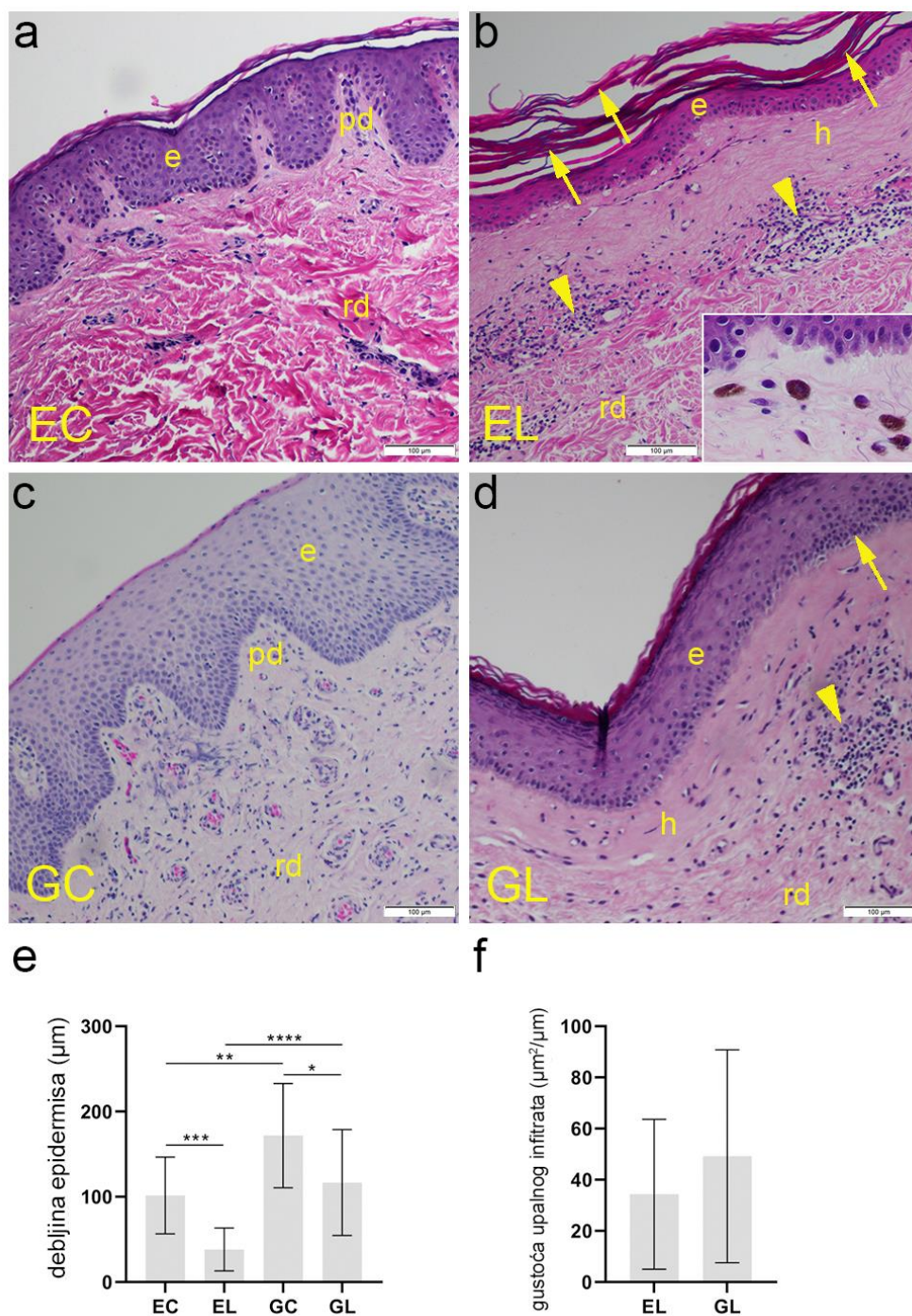
### 5.1. Kliničke karakteristike bolesnika

Prosječna dob bolesnika u studiji bila je 63 godine, s interkvartilnim rasponom (engl. *interquartile range*, IQR) od 57 do 70 godina. Nije bilo značajne razlike u dobi bolesnika između četiri analizirane skupine. Za bolesnike s ekstragenitalnim LS-om, medijan vremena između početka bolesti i prvog kliničkog pregleda kada je obavljena biopsija bio je 2 mjeseca (IQR 1-3 mjeseca). U slučaju bolesnika s genitalnim LS-om, prosječno je prošlo 8 mjeseci (IQR 6-10 mjeseci) između početka bolesti i postupka biopsije, što se značajno razlikovalo od bolesnika s ekstragenitalnim LS-om ( $p < 0,001$ ). Rezultati dobiveni putem VAS-e za prosječnu razinu svrbeža također su bili značajno različiti između dviju skupina ( $p < 0,001$ ). Medijan bolesnika s ekstragenitalnim LS-om mjeren VAS-om je bio 0 (IQR 0–1), pokazujući da nema svrbeža ili je on vrlo blag, dok je u bolesnika s genitalnim LS-om bio 8 (IQR 7–9), što označava izraziti svrbež.

### 5.2. Rezultati analize rezova obojenih hematoksilinom i eozinom

Na rezovima preparata normalne kože uočila su se uobičajena dva sloja - epidermis i dermis. Epidermis (mnogoslojni pločasti oroženi epitel) imao je približno 8-10 redova epitelnih stanica - keratinocita, s tankim površinskim slojem spljoštenih stanica bez jezgre (skvama). Valovitu granicu između epidermisa i dermisa formirali su epidermalni grebeni i dermalne papile. Ukupan broj redova keratinocita bio je manji na mjestima gdje su duboke papile prodrle u epidermis. Dermis je sadržavao papilarni i retikularni sloj. Papilarni sloj bio je površniji i sastojao se od rahlog vezivnog tkiva s malim krvnim žilama. Dublji, retikularni sloj sadržavao je nepravilne snopove kolagenih vlakana (Slika 6a). U usporedbi sa zdravom kožom, histološki rezovi kože s LS-om pokazali su stanjen epidermis s hiperkeratozom površinskog sloja, dok su u bazalnom sloju stanice pokazale karakterističnu vakuolarnu degeneraciju. DEJ je izgledala poravnano te je izgubila karakterističnu valovitost. Papilarni dermis sadržavao je homogenizirani kolagen, kapilare, a mjestimice i nakupljene melanofage (umetak na slici 7b). Limfocitni upalni infiltrat mogao se uočiti oko proširenih malih žila (Slika 6b). Rez uzoraka velikih usana pokazao je normalan, relativno debeo epidermis, s pojačanom pigmentacijom bazalnog sloja zbog veće pigmentacije kože vulve. DEJ je bila očuvana, s vrlo dubokim papilama i normalnom strukturom dermalnog vezivnog tkiva, koje je sadržavalo krvne žile i živce (Slika 6c). Iako patohistološka slika LS-a vulve može varirati, epidermis je bio stanjen u usporedbi sa zdravom kožom genitalija, pokazujući više skvama na površini. Gubitak

epidermalnih grebena bio je popraćen vakuolizacijom stanica i poravnanom DEJ-om. Bazalna membrana je bila fokalno zadebljana, s homogeniziranim i hijaliniziranim kolagenom u papilarnom sloju. Ispod hijaliniziranog područja, na papilarno-retikularnoj granici, nalazio se dermalni limfocitni infiltrat, ali je na pojedinim dijelovima bila prisutna i intraepidermalna limfocitna egzocitoza (Slika 6d). Prosječna debljina epidermisa u uzorcima ekstragenitalnog LS-a (engl. *extragenital lichen sclerosus*, EL) bila je 38,2  $\mu\text{m}$ , što je značajno niže ( $p < 0,001$ ) od 101,6  $\mu\text{m}$  u uzorcima ekstragenitalnih kontrola (engl. *extragenital controls*, EC). Prosječna debljina uzoraka genitalnog LS-a (engl. *genital lichen sclerosus*, GL) (116,7  $\mu\text{m}$ ) također je značajno niža ( $p = 0,026$ ) nego kod uzoraka genitalnih kontrola (engl. *genital controls*, GC) (171,8  $\mu\text{m}$ ). Također postojala je značajna razlika u debljini epidermisa ovisno o mjestu uzimanja, pri čemu je ekstragenitalni epidermis bio značajno tanji u usporedbi s genitalnim epidermisom, i između zdravih ( $p = 0,003$ ) i LS ( $p < 0,001$ ) uzoraka (Slika 6e). Iako je gustoća upalnog infiltrata bila veća u GL uzorcima (49,18  $\mu\text{m}^2$  po  $\mu\text{m}$  DEJ) u usporedbi s EL uzorcima (34,36  $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ ), razlika nije bila statistički značajna (Slika 6f).



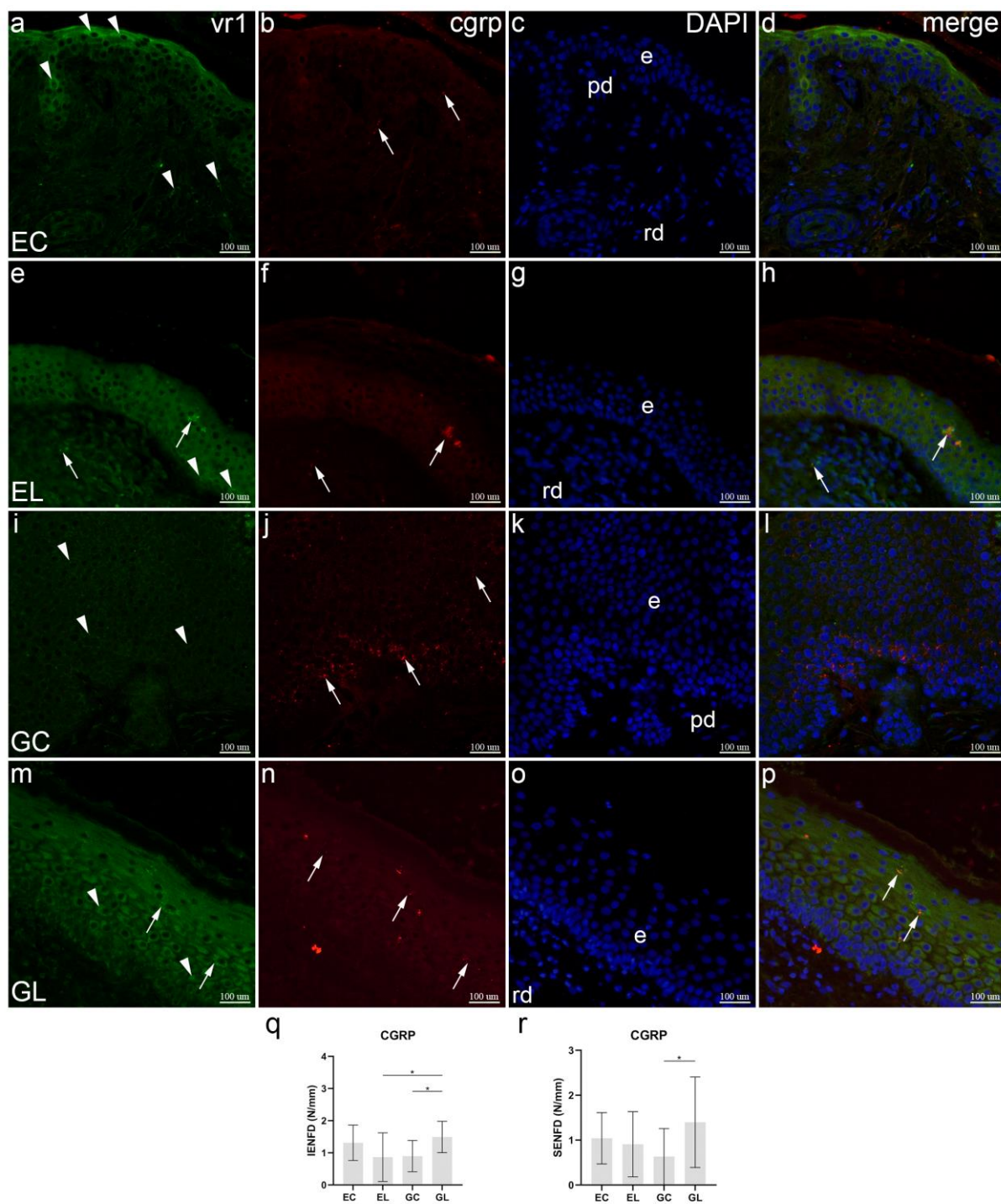
**Slika 6.** Morfologija normalne kože i LS uzoraka. EC (engl. *extragenital controls*) — normalna ekstragenitalna koža: mogu se uočiti tipične histološke karakteristike epidermisa (e), papilarnog dermisa (pd) i retikularnog dermisa (rd) (a). EL (engl. *extragenital lichen sclerosus*) — ekstragenitalna koža zahvaćena LS-om: mogu se uočiti stanjeni epidermis (e) s hiperkeratozom (strelice), homogenizacija i hijalinizacija papilarnog dermisa (h) i limfocitni infiltrati (vrhovi strelica) u retikularnom dermisu (rd). Na umetku (b) prikazana je nakupina melanofaga. GC

(engl. *genital controls*) — normalna koža vulve: može se vidjeti debeli epidermis (e) s vaskulariziranim papilarnim (pd) i retikularnim dermisom (rd) (c). GL (engl. *genital lichen sclerosis*) — koža vulve zahvaćena LS-om: može se vidjeti homogenizacija papilarnog dermisa (h), limfocitni infiltrat (vrh strelice) u retikularnom dermisu (rd) i egzocitoza limfocita (strelica) u stanjenom epidermisu (e) (d). Bojanje hematoksilinom i eozinom,  $\times 200$  ukupno povećanje; mjerne ljestvice u donjem desnom kutu predstavljaju  $100\ \mu\text{m}$ . Analiza debljine epidermisa (e); postojanje statistički značajnih razlika utvrđeno je Kruskal–Wallis-ovim testom. Analiza gustoće upalnog infiltrata mjerene kao omjer površine na kojoj je prisutan infiltrat ( $\mu\text{m}^2$ ) i duljine dermalno-epidermalnog spoja (f); postojanje statistički značajnih razlika provjereno je Mann–Whitney-jevim U testom. Grafikoni prikazuju aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama. Statistički značajna razlika označena je zvjezdicama: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  i \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 5.3. Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje na VR1 i CGRP

U epidermisu EC uzoraka uočena je imunoreaktivnost na VR1 u nekim stanicama folikula dlake, te intenzivna reaktivnost u površinskim keratinocitima. VR1 je bio slabo prisutan u samo nekoliko dermalnih stanica. CGRP-pozitivna živčana vlakna bila su uglavnom prisutna u dermisu i povremeno su se vidjela između bazalnih stanica epidermisa. Sve stanične jezgre prikazane su DAPI nuklearnim bojenjem. Spajanjem tri bojenja otkriveno je da VR1 ne kolokalizira s CGRP u istim stanicama ili vlaknima (Slika 7a-d). U usporedbi s EC, kod EL uzoraka VR1 je bio umjereno izražen u epidermalnim suprabazalnim stanicama, slabo u dermalnim živčanim vlaknima i snažno u živčanim vlaknima površinskih epidermalnih slojeva. Za razliku od zdrave kože, CGRP je jako obojio živčana vlakna u epidermisu, a tek povremeno u dermisu. Dok je kolokalizacija nedostajala u zdravoj koži, ovdje je primijećena u epidermalnim i nekim dermalnim živčanim vlaknima, ali ne i u epitelnim stanicama kože (Slika 7e-h). U GC uzorcima uočen je slab do umjeren izražaj VR1 u nekim epidermalnim bazalnim i stanicama nazubljenog sloja. U usporedbi s ekstragenitalnom kožom, CGRP je bio snažno izražen u živčanim vlaknima koja su prolazila između bazalnih stanica epidermisa, dok samo povremeno u suprabazalnom i nazubljenom epidermalnom sloju. Nije bilo kolokalizacije korištenih biljega (Slika 7i-l). U usporedbi s GC, izražaj VR1 u bolesnika s GL bio je jak u keratinocitima svih epidermalnih slojeva i u intraepidermalnim živčanim vlaknima. Jak izražaj CGRP karakterizirao je suprabazalni epitel. Za razliku od kontrolnog uzorka, kolokalizacija dvaju biljega uočena je u živčanim vlaknima epidermisa (Slika 7m-p). Srednja IENFD za

CGRP-pozitivna vlakna bila je 1,49 intraepidermalnih živčanih vlakana po milimetru (engl. *intraepidermal nerve fibers per millimeter*, IENF/mm) u GL uzorcima, što je bilo značajno više u usporedbi s 0,9 IENF/mm u GC uzorcima ( $p=0,028$ ) i 0,86 IENF/mm u EL uzorcima ( $p=0,021$ ). Nije bilo drugih značajnih razlika između ispitivanih skupina (Slika 7q). Analiza SENFD-e pokazala je značajnu razliku između GL uzoraka s prosjekom od 1,4 subepidermalnih živčanih vlakana po milimetru (engl. *subepidermal nerve fibers per millimeter*, SENF/mm) i GC uzoraka s 0,63 SENF/mm ( $p=0,028$ ), dok drugih značajnih razlika između analiziranih skupina nije bilo (Slika 7r).



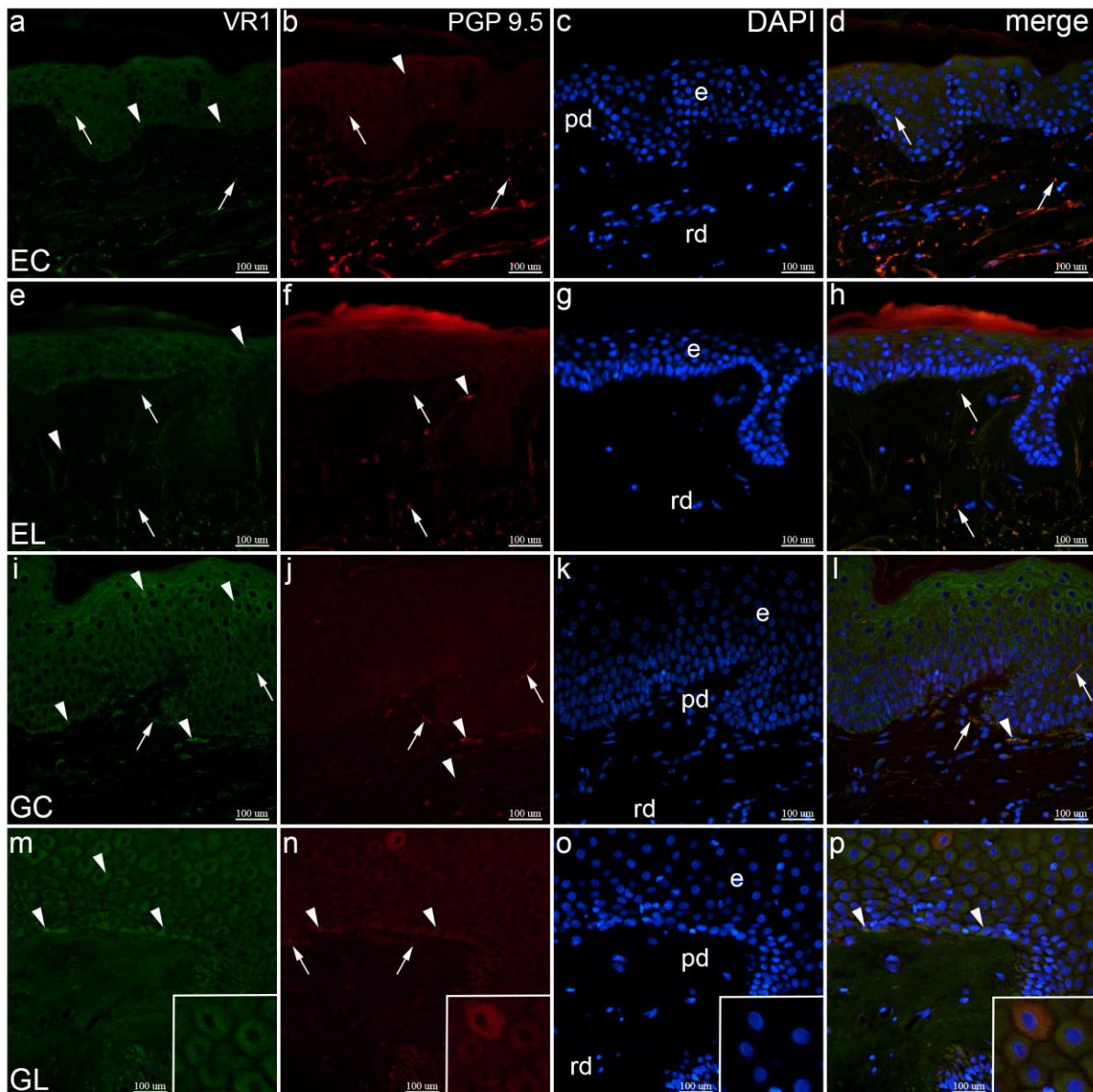
**Slika 7.** Izražaj VR1 i CGRP u uzorcima normalne kože i LS-om zahvaćene kože. Epidermis (e), papilarni dermis (pd) i retikularni dermis (rd) označeni su na slikama DAPI (engl. 4',6'-diamidino-2-phenylindole) bojenja (c,g,k,o). EC (engl. *extragenital controls*) — normalna ekstragenitalna koža (a–d): VR1 je izražen u nekoliko keratinocita i dermalnih stanica (vrhovi strelica, a). Izražaj CGRP-a opažen je u živčanim vlaknima (strelice, b); nema kolokalizacije VR1 i CGRP (d). EL (engl. *extragenital lichen sclerosus*) — ekstragenitalna koža zahvaćena

LS-om (e–h): VR1 se izražava u keratinocitima (vrhovi strelica) i živčanim vlaknima (strelice), i intra- i subepidermalno (e); CGRP se izražava u živčanim vlaknima (strelice, f); VR1 i CGRP su kolokalizirani u živčanim vlaknima (strelice, h). Epidermis ovog uzorka je zadebljan, što je neuobičajeno za ekstragenitalni LS, međutim, prisutna su druga obilježja LS, poput homogenizacije papilarnog dermisa. GC (engl. *genital controls*) — normalna koža vulve (i–l): izražaj VR1 se vidi u keratinocitima (vrhovi strelica, i); CGRP boji živčana vlakna (strelice, j); VR1 i CGRP nisu kolokalizirani (l). GL (engl. *genital lichen sclerosus*) — koža vulve zahvaćena LS-om (m–p): keratinociti (vrhovi strelica) i intraepidermalna živčana vlakna (strelice) izražavaju VR1 (m); intraepidermalni živci i vlakna izražavaju CGRP (strelice, n); kolokalizacija VR1 i CGRP prisutna je u živčanim vlaknima (strelice, p). Dvostruko imunofluorescentno bojenje na VR1 i CGRP,  $\times 400$  ukupno povećanje. Analiza CGRP-pozitivne gustoće intraepidermalnih živčanih vlakana (IENFD) (q); postojanje statistički značajnih razlika provjereno je jednosmjernom analizom varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA). Analiza CGRP-pozitivne gustoće subepidermalnih živčanih vlakana (SENFDF) (r); postojanje statistički značajnih razlika provjereno je jednosmjernom ANOVA-om. N/mm označava broj živčanih vlakana po mm dermalno-epidermalnog spoja. Grafikoni prikazuju aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama. Značajnost razlika označena je zvjezdicama: \*  $p < 0,05$ .

#### 5.4. Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje na VR1 i PGP 9.5

U uzorcima normalne ekstragenitalne kože, uočen je umjereni izražaj VR1 kroz cijeli epidermis, dok je slabi izražaj primijećen u intraepidermalnim i dubljim dermalnim živčanim vlaknima. Protutijelo za PGP 9.5 je intenzivno obojilo živčana vlakna, u površinskim i dubokim slojevima kože, te samo nekoliko stanica u epidermisu. Kolokalizacija VR1 i PGP 9.5 uočena je u intraepidermalnim i dermalnim živčanim vlaknima (Slika 8a–d). U usporedbi s kontrolnim uzorcima, izražaj VR1 bio je umjeren u bazalnim stanicama, nekim nazubljenim stanicama i u dermisu. PGP 9.5 je bio umjeren izražen u dermalnim živčanim vlaknima i nekim dermalnim stanicama, dok je njegov izražaj izostao u epidermisu. Njihova kolokalizacija bila je prisutna samo u dermalnim živčanim vlaknima, a nedostajala je intraepidermalno (Slika 8e–h). Umjereni do jaka imunoreaktivnost VR1 primijećena je u epidermisu vulve, osobito u površinskom sloju i u papilarnom dermisu. PGP 9.5 je bio jako izražen u vodoravno orijentiranim vlaknima papilarnog dermisa i u intraepidermalnim živčanim vlaknima. Njihova kolokalizacija uočena je u nekim horizontalnim dermalnim živčanim vlaknima, Schwannovim

stanicama i nekim intraepidermalnim živčanim vlaknima (Slika 8i–l). U usporedbi s kontrolnim uzorcima, u koži bolesnika sa genitalnim LS-om, u suprabazalnim stanicama i nekoliko bazalnih stanica uočen je umjereni izražaj VR1, dok u dermisu nije primjećena VR1 imunoreaktivnost. Umjereni do jaki izražaj PGP 9.5 karakterizira bazalne epidermalne stanice i mala živčana vlakna na DEJ-i. Spajanje svih biljega otkrilo je kolokalizaciju VR1 i PGP 9.5 u bazalnim stanicama, ali, za razliku od kontrolnog tkiva, ne i u živčanim vlaknima (Slika 8m–p).



**Slika 8.** Kolokalizacija VR1 i PGP 9.5 u uzorcima normalne kože i LS-om zahvaćene kože. Epidermis (e), papilarni dermis (pd) i retikularni dermis (rd) označeni su na slikama DAPI-jem (engl. *4',6'-diamidino-2-phenylindole*) obojenih preparata koje prikazuju sve stanične jezgre (c,g,k,o). EC (engl. *extragenital controls*) — normalna ekstragenitalna koža (a–d): keratinociti

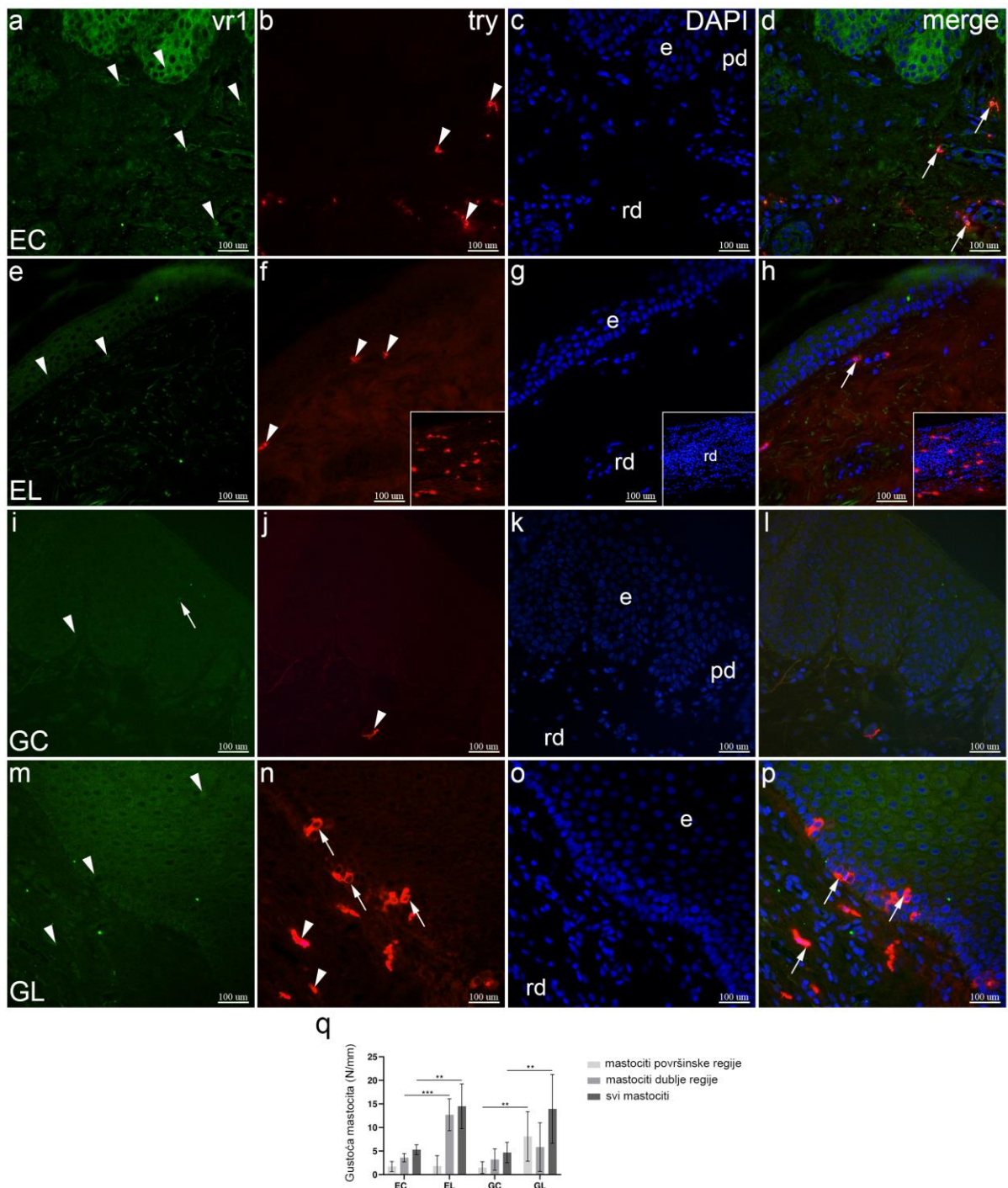


(vrhovi strelica) i živčana vlakna (strelice) izražavaju VR1 (a); keratinociti (vrh strelice) i živčana vlakna (strelice) također izražavaju PGP 9.5 (b); VR1 i PGP 9.5 su izraženi u živčanim vlaknima (strelice, d). EL (engl. *extragenital lichen sclerosus*) — ekstragenitalna koža zahvaćena LS-om (e–h): keratinociti i neke dermalne stanice (vrhovi strelica), kao i živčana vlakna (strelice) izražavaju VR1 (e); dermalne stanice (vrh strelice) i živčana vlakna (strelice) su PGP 9.5-pozitivne (f); VR1 i PGP 9.5 su izraženi u živčanim vlaknima (strelice, h). GC (engl. *genital controls*) — normalna koža vulve (i–l): keratinociti i neke dermalne stanice (vrhovi strelica) i živčana vlakna (strelice) izražavaju VR1 (i); dermalne stanice (vrhovi strelica) i živčana vlakna (strelice) također izražavaju PGP 9.5 (j); kolokalizacija VR1 i PGP 9.5 uočava se u živčanim vlaknima (strelice) i dermalnim stanicama (vrh strelice) (l). GL (engl. *genital lichen sclerosus*) — koža vulve zahvaćena LS-om (m–p): VR1 je izražen u keratinocitima (vrhovi strelica, (m)); keratinociti (vrhovi strelica) i živčana vlakna (strelice) izražavaju PGP 9,5 (n); kolokalizacija VR1 i PGP 9.5 vidljiva je u keratinocitima (vrhovi strelica, (p)); umetci pokazuju izražaj VR1 (m) i jaki izražaj PGP 9.5 (n) koji su kolokalizirani u keratinocitu (p). Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje na VR1, PGP 9,5 i DAPI, ×400 ukupno povećanje.

### 5.5. Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje na VR1 i triptazu

U EC uzorcima uočen je umjereni do jaki izražaj VR1 u epidermalnim stanicama i umjereni izražaj u dermalnim stanicama. Bojenjem protutijelom za triptazu (engl. *tryptase*, try) primijećena je snažna imunoreaktivnost u određenim dermalnim stanicama (mastociti), uglavnom u dubljem dermisu. Kolokalizacija VR1 i try bila je prisutna u mastocitima (Slika 9a–d). U usporedbi s EC, u uzorku tkiva bolesnika s EL, izražaj VR1 je bio slabiji u epidermalnim i nekim dermalnim stanicama. Bojenje triptazom prikazalo je mastocite u površinskom sloju dermisa i u infiltratu u dubljem dermisu. VR1 i triptaza bili su kolokalizirani u mastocitima (Slika 9e–h). U usporedbi sa zdravom ekstragenitalnom kožom, slabije bojenje protutijelom za VR1 primijećeno je u većem dijelu epidermisa i u intraepidermalnim živčanim vlaknima kontrolnog uzorka vulve. Protutijelo za try je obojilo mastocite u dermisu. Nije bilo kolokalizacije VR1 i try na preklopljenim slikama (Slika 9i–l). U uzorcima tkiva bolesnika s GL, u većini keratinocita i nekim dermalnim stanicama uočen je umjereni izražaj VR1, dok je bojenje protutijelom za try prikazalo nekoliko dermalnih i mnogo intraepidermalnih mastocita unutar bazalnog sloja. Za razliku od GC uzoraka, VR1 i try kolokalizirali su u mastocitima (Slika 9m–p). Srednja gustoća mastocita u EL uzorcima bila je 14,50 stanica/mm, što je bilo

značajno više od 5,30 stanica/mm u EC uzorcima ( $p = 0,001$ ). Isto je utvrđeno za GL uzorke s 13,95 stanica/mm, u usporedbi s GC uzorcima s 4,69 stanica/mm ( $p = 0,001$ ). Pri zasebnoj analizi površinskih i dubljih regija dermisa, pronašli smo razlike između tih područja. Srednja gustoća mastocita površinske regije u GL uzorcima iznosila je 8,10 stanica/mm i bila je značajno viša u usporedbi s 1,49 stanica/mm u GC uzorcima ( $p = 0,003$ ), dok nije bilo značajne razlike između EL i EC uzoraka u površinskoj regiji. Srednja gustoća mastocita dublje regije u EL uzorcima bila je 12,70 stanica/mm, što je značajno više od 3,59 stanica/mm u EC uzorcima ( $p < 0,001$ ), dok nije bilo značajne razlike između GL i GC uzoraka u dubljoj regiji (Slika 9q).

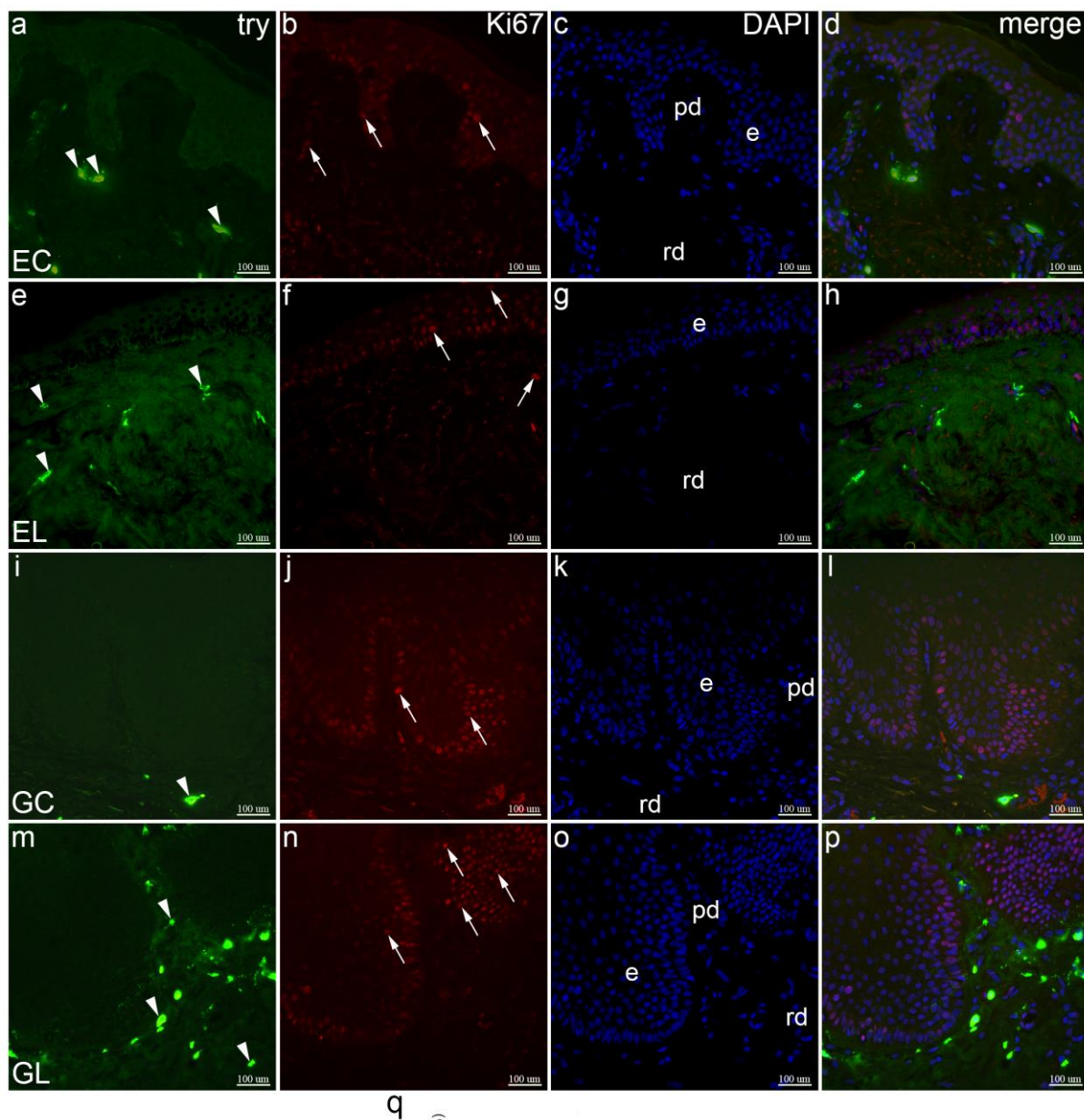


**Slika 9.** Kolokalizacija VR1 i triptaze (engl. *tryptase*, *try*) u uzorcima normalne kože i LS-om zahvaćene kože. Epidermis (e), papilarni dermis (pd) i retikularni dermis (rd) označeni su na slikama preparata obojenih DAPI-jem (engl. *4',6'-diamidino-2-phenylindole*) koje prikazuju sve stanične jezgre (c,g,k,o). EC (engl. *extragenital controls*) — normalna ekstragenitalna koža (a–d): izražaj VR1 opažen je u keratinocitima i dermalnim stanicama (vrhovi strelica, a); bojenje triptazom prikazuje dermalne mastocite (vrhovi strelica, b); VR1 i triptaza kolokaliziraju u mastocitima (strelice, (d)). EL (engl. *extragenital lichen sclerosus*) —

ekstragenitalna koža zahvaćena LS-om (e–h): keratinociti i dermalne stanice izražavaju VR1 (vrhovi strelica, e); dermalni mastociti izražavaju triptazu (vrhovi strelica, f); kolokalizacija VR1 i triptaze opažena je u mastocitu (strelica, h); umetci pokazuju infiltrat mastocita u retikularnom dermisu (f–h). GC (engl. *genital controls*) — normalna koža vulve (i–l): keratinociti (vrh strelice) i živčano vlakno (strelica) izražavaju VR1 (i); dermalna stanica izražava triptazu (vrh strelice, j); nema kolokalizacije u preklopljenoj slici (l). GL (engl. *genital lichen sclerosus*) — koža vulve zahvaćena LS-om (m–p): VR1 je izražen u keratinocitima i dermalnim stanicama (vrhovi strelica, m); dermalni (vrhovi strelica) i intraepidermalni (strelice) mastociti prikazani su triptazom (n); kolokalizacija VR1 i triptaze vidi se u mastocitima (strelice, p). Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje na VR1, triptazu i DAPI,  $\times 400$  ukupno povećanje. Analiza gustoće mastocita (q); postojanje statistički značajnih razlika provjereno je Kruskal–Wallis-ovim testom. N/mm označava broj mastocita po mm dermalno-epidermalnog spoja. Grafikoni prikazuju aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama. Značajnost razlika označena je zvjezdicama: \*\*  $p < 0,01$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 5.6. Dvostruko imunofluorescencijsko bojenje na triptazu i Ki-67

Koža EC uzoraka pokazala je jako try obojenje u nekoliko mastocita smještenih prvenstveno u papilarnom dermisu. Snažno Ki-67 bojenje bilo je ograničeno na bazalne i suprabazalne keratinocite i neke stanice u dermisu. Biljeg mastocita nije bio uočen u proliferirajućim Ki-67 pozitivnim stanicama (Slika 10a–d). U usporedbi s EC uzorcima, nekoliko mastocita bilo je pozitivno na try u dermisu, dok su Ki-67 pozitivne stanice viđene i u epidermisu i u dermisu EL uzoraka. Nije bilo kolokalizacije Ki-67 i try (Slika 10e–h). Bojenje protutijelom za try prikazalo je nekoliko mastocita u dermisu GC uzoraka, dok je u keratinocitima bazalnog sloja i nekih regija suprabazalnog sloja uočeno snažno Ki-67 obojenje. Biljeg mastocita nije bio uočen u proliferirajućim Ki-67 pozitivnim stanicama (Slika 10i–l). U usporedbi s GC uzorcima, bojenjem protutijelom za try otkriven je veliki broj mastocita u subepitelnom dijelu (papilarni sloj) dermisa, a nekoliko u dubljem dermisu. Jaki izražaj Ki-67 karakterizirao je bazalne i suprabazalne epidermalne slojeve. Biljeg mastocita – try - nije uočen u proliferirajućim Ki-67 pozitivnim stanicama (Slika 10m–p). Srednja vrijednost indeksa proliferacije epidermisa EL (33,07%) i GL (31,58%) uzoraka bila je značajno viša u usporedbi s njihovim kontrolama — 24,8% za EC ( $p < 0,001$ ) i 24% za GC ( $p = 0,002$ ). Nije bilo razlika u indeksu proliferacije s obzirom na mjesto uzorka (genitalno naspram ekstragenitalno), kako za LS tako i za kontrolne uzorke (Slika 10q).

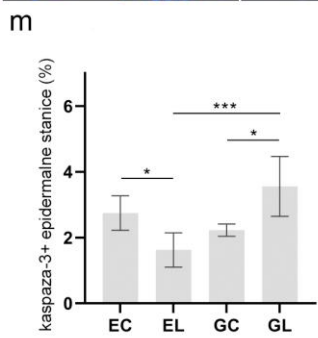
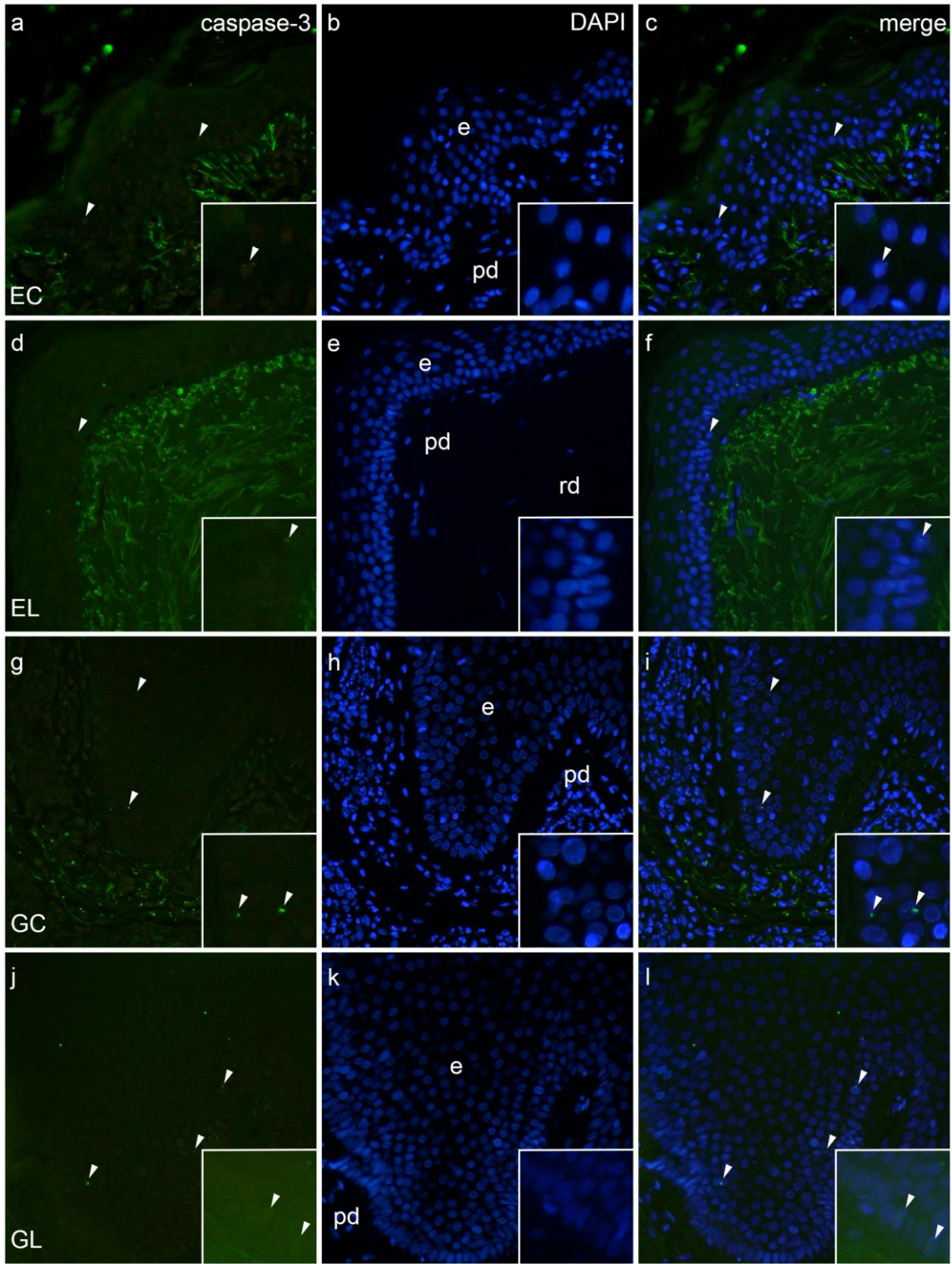


**Slika 10.** Kolokalizacija triptaze (engl. *tryptase*, try) i Ki-67 u uzorcima normalne kože i LS-om zahvaćene kože. Epidermis (e), papilarni dermis (pd) i retikularni dermis (rd) označeni su na slikama koje prikazuju DAPI-jem (engl. *4',6'-diamidino-2-phenylindole*) obojene sve stanične jezgre (c,g,k,o). EC (engl. *extragenital controls*) — normalna ekstragenitalna koža (a–d): izražaj triptaze opažen je u dermalnim mastocitima (vrhovi strelica, a); nuklearni izražaj Ki-67 u proliferirajućim stanicama u dermisu i epidermisu (strelice, b); nuklearno Ki-67 bojenje nije prisutno u mastocitima pozitivnim na triptazu (d). EL (engl. *extragenital lichen sclerosus*)

— ekstragenitalna koža zahvaćena LS-om (e–h): u dermalnim mastocitima vidljiv je izražaj triptaze (vrhovi strelica, e); u proliferirajućim stanicama dermisa i epidermisa uočljivo je nuklearno obojenje Ki-67 (strelica, f); kolokalizacija nuklearnog Ki-67 i triptaze nije opažena (h). GC (engl. *genital controls*) — normalna koža vulve (i–l): bojenje triptazom otkriva mastocite (vrh strelice, i); proliferacija epidermalnih stanica prikazana je nuklearnim bojenjem Ki-67 (strelice, j); nema kolokalizacije u preklopljenoj slici (l). GL (engl. *genital lichen sclerosus*) — koža vulve zahvaćena LS-om (m–p): mnogi dermalni mastociti prikazuju se bojenjem triptazom (vrhovi strelica, m); ekstenzivna proliferacija keratinocita prikazana je bojenjem Ki-67 (strelice, n); dermalni mastociti ne kolokaliziraju Ki-67 (p). Dvostruko imunofluorescentno bojenje na triptazu, Ki-67 i DAPI,  $\times 400$  ukupno povećanje. Analiza indeksa proliferacije epidermisa (q); postojanje statistički značajnih razlika provjereno je Kruskal–Wallis-ovim testom. Grafikoni prikazuju aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama. Značajnost razlika označena je zvjezdicama: \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 5.7. Imunofluorescencijsko bojenje na kaspazu-3

EC uzorci sadržavali su nekoliko stanica pozitivnih na aktiviranu kaspazu-3 u bazalnim i suprabazalnim dijelovima epidermisa, dok je u dermisu bila prisutna velika količina autofluorescencije porijeklom vlakana kolegena. Umetci većeg povećanja prikazuju nuklearnu lokalizaciju bojenja protutijelom za aktiviranu kaspazu-3 (Slika 11a-c). U usporedbi s EC, epidermis EL uzoraka sadržava manje stanica pozitivnih na aktiviranu kaspazu-3 (Slika 11d-f). U GC uzorcima uočen je sličan uzorak imunoreaktivnosti na aktiviranu kaspazu-3 poput EC uzoraka (Slika 11g-i). U usporedbi s GC uzorcima, najizraženiji izražaj biljega apoptoze (aktivirana kaspaza-3) je bio prisutna u GL uzorcima, i u bazalnom sloju (umetci) i suprabazalno (Slika 11j-l). Srednja vrijednost postotka apoptotičnih stanica epidermisa EL uzoraka (1,62%) bila je značajno niža ( $p=0,025$ ) u usporedbi s EC uzorcima (2,74%). Suprotno tome, srednja vrijednost postotka apoptotičnih stanica GL uzoraka (3,55%) bila je značajno viša i od GC (2,22%,  $p=0,038$ ) i EL uzoraka ( $p<0,001$ ). Nije bilo značajne razlike između ekstragenitalnih i genitalnih kontrola (Slika 11m).



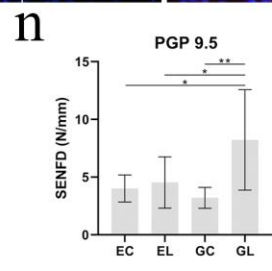
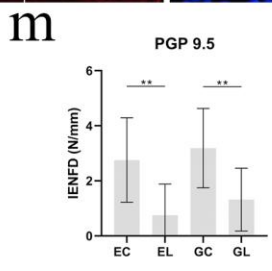
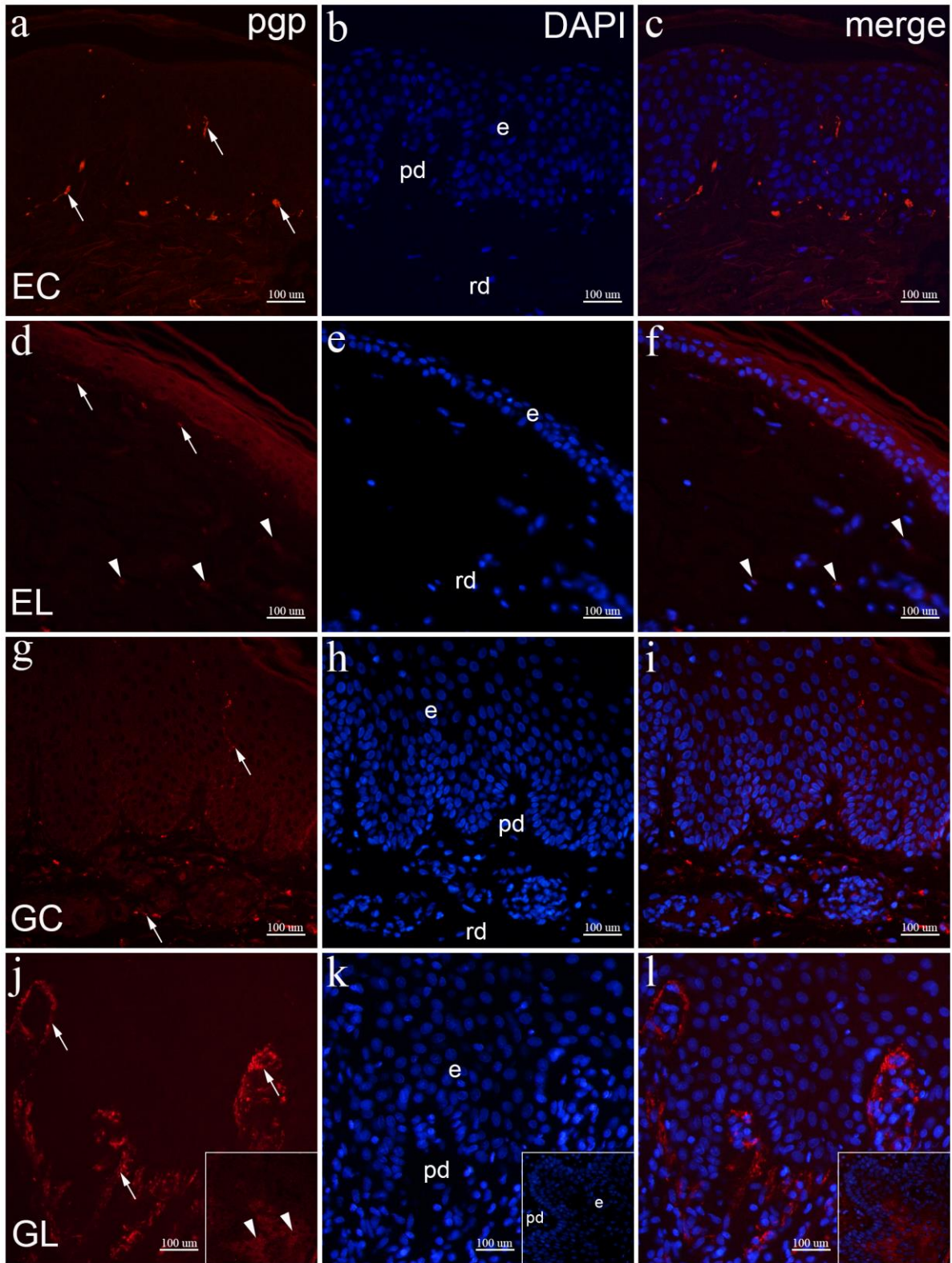
**Slika 11.** Izražaj aktivirane kaspaze-3 u uzorcima normalne kože i LS-om zahvaćene kože. Epidermis (e), papilarni dermis (pd) i retikularni dermis (rd) označeni su na slikama rezova obojenih DAPI-jem (engl. *4',6'-diamidino-2-phenylindole*) koje prikazuju sve stanične jezgre (b,e,h,k). EC (engl. *extragenital controls*) — normalna ekstragenitalna koža (a–c): u epidermisu prisutne kaspaza-3 pozitivne stanice (vrhovi strelica, a,c). EL (engl. *extragenital lichen sclerosis*) — ekstragenitalna koža zahvaćena LS-om (d–f): stanica bazalnog sloja pozitivna je na kaspazu-3 (vrh strelice, d,f). GC (engl. *genital controls*) — normalna koža vulve (g–i): prikazano par suprabazalnih stanica pozitivnih na kaspazu-3 vrhovi strelica, g,i). GL (engl. *genital lichen sclerosis*) — koža vulve zahvaćena LS-om (j–l): prikazano više kaspaza-3 pozitivnih stanica epidermisa (vrhovi strelica, j,l). Umetci prikazuju nuklearnu lokalizaciju kaspaza-3 bojenja. Imunofluorescencijsko bojenje na kaspazu-3 i DAPI,  $\times 400$  ukupno povećanje. Analiza udjela apoptotičnih stanica (m); postojnje statistički značajnih razlika provjereno je Kruskal–Wallis-ovim testom. Grafikoni prikazuju aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama. Značajnost razlika označena je zvjezdicama: \*  $p < 0,05$  i \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 5.8. Imunofluorescencijsko bojenje na PGP 9.5

EC uzorci sadržavali su mnogo PGP 9.5-pozitivnih živčanih vlakana u papilarnom dermisu, dok su u epidermisu i dubljim dijelovima dermisa bila manje prisutna (Slika 12a–c). U usporedbi s EC uzorcima, u papilarnom dermisu EL uzoraka, povremeno u dubljem dermisu, bilo je vidljivo manje živčanih vlakana u kojima se uočava umjereno do jako obojenje protutijelom za PGP 9.5, dok u epidermisu nisu bila prisutna živčana vlakna (Slika 12d–f). U GC uzorcima uočeno je mnogo PGP 9.5 pozitivnih živčanih vlakana u subepidermalnim i dubljim dijelovima dermisa, kao i u epidermisu, koja dopiru do površinskih dijelova nazubljenog sloja. U svim živčanim vlaknima vidjelo se snažno PGP 9.5 bojenje (Slika 12g–i). U usporedbi s GC uzorcima, u GL uzorcima se velika količina živčanih vlakana, koja su se intenzivno bojila protutijelom za PGP 9.5, nakupila u papilarnom dermisu, dok ih u epidermisu nije bilo (Slika 12j–l). Prosječna IENFD PGP 9.5-pozitivnih vlakana u EL uzorcima iznosila je 0,75 IENF/mm, što je u usporedbi s 2,75 IENF/mm u EC uzorcima bila značajno niža vrijednost ( $p = 0,002$ ). Prosječne vrijednosti IENFD u uzorcima GL (1,32 IENF/mm) i GC (3,19 IENF/mm) također su bile značajno različite ( $p = 0,003$ ). Nije bilo razlike između genitalnih i ekstragenitalnih uzoraka, kako za LS tako i za kontrolne uzorke (Slika 13m). SENFD GL uzoraka (8,22 SENF/mm), u usporedbi s GC (3,2 SENF/mm), EL (4,53 SENF/mm) i EC



uzorcima (4,01 SENF/mm) bio je značajno veći ( $p = 0,005$ ,  $p = 0,032$ ,  $p = 0,014$ , redom). Nije bilo značajne razlike između ostalih skupina (Slika 12n).

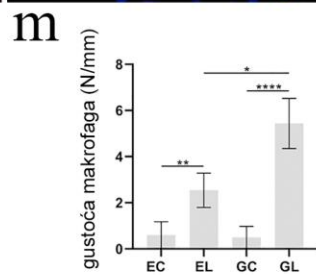
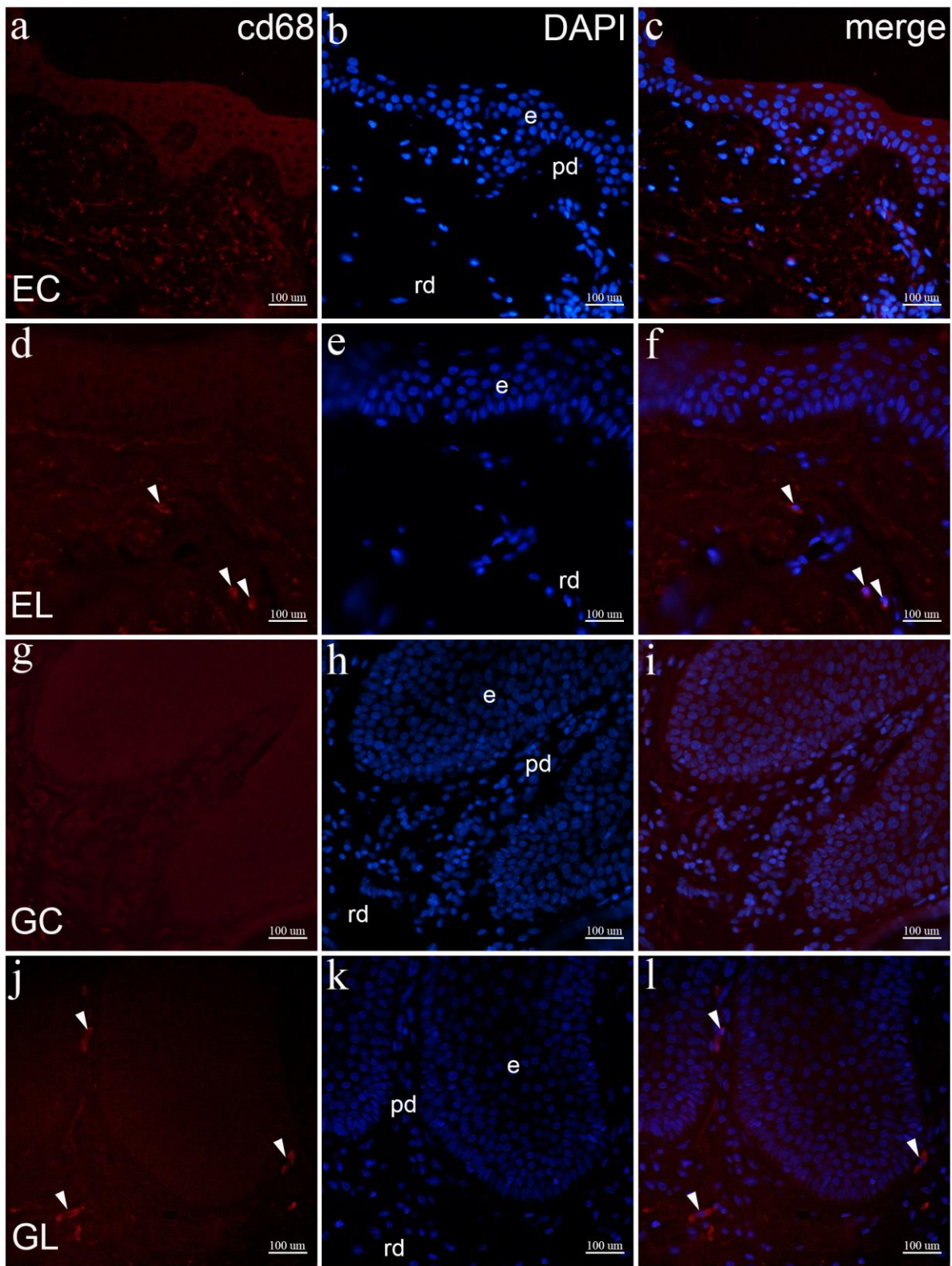


**Slika 12.** Izražaj PGP 9.5 u uzorcima normalne kože i LS-om zahvaćene kože. Epidermis (e), papilarni dermis (pd) i retikularni dermis (rd) označeni su na slikama rezova obojenih DAPI-jem (engl. *4',6'-diamidino-2-phenylindole*) koje prikazuju sve stanične jezgre (b,e,h,k). EC (engl. *extragenital controls*) — normalna ekstragenitalna koža (a–c): izražaj PGP 9.5 prisutan je u intraepidermalnim i subepidermalnim živčanim vlaknima (strelice, a). EL (engl. *extragenital lichen sclerosis*) — ekstragenitalna koža zahvaćena LS-om (d–f): u subepidermalnim živčanim vlaknima (strelice) i nekim dermalnim stanicama (vrhovi strelica) vidi se izražaj PGP 9.5 (d); citoplazmatski izražaj PGP 9.5 vidljiv je u dermalnim stanicama (vrhovi strelica, f). GC (engl. *genital controls*) — normalna koža vulve (g–i): u intraepidermalnim i subepidermalnim živčanim vlaknima vidljiv je izražaj PGP 9.5 (strelice, g)). GL (engl. *genital lichen sclerosis*) — koža vulve zahvaćena LS-om (j–l): jaki izražaj PGP 9.5 prisutan je u više subepidermalnih živčanih vlakana (strelice, j); umetci prikazuju umjereni izražaj PGP 9.5 u suprabazalnim keratinocitima (vrhovi strelica) epidermisa (j–l). Imunofluorescencijsko bojenje na PGP 9.5 i DAPI,  $\times 400$  ukupno povećanje. Analiza gustoće PGP 9.5-pozitivnih intraepidermalnih živčanih vlakana (IENFD) (m); postojanje statistički značajnih razlika provjereno je jednosmjernom analizom varijance (engl. *analysis of variance*, ANOVA). Analiza gustoće PGP 9.5-pozitivnih subepidermalnih živčanih vlakana (SENFD) (n); postojanje statistički značajnih razlika provjereno Welch-ovom ANOVA-om. N/mm označava broj živčanih vlakana po mm dermalno-epidermalnog spoja. Grafikonu prikazuju aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama. Značajnost razlika označena je zvjezdicama: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

### 5.9. Imunofluorescencijsko bojenje na CD68

U EC uzorcima nije bilo vidljivo bojenje protutijelom za CD68 u papilarnom i retikularnom dermisu. Višestruka elastična vlakna u dermisu pokazala su autofluorescenciju, što može oponašati signal CD68. Neki makrofazi mogu se vidjeti u dubljim slojevima retikularnog dermisa (nije prikazano) (Slika 13a–c). U usporedbi s EC uzorcima, u EL uzorcima uočeni su CD68 pozitivni makrofazi u površinskom papilarnom sloju i u dubljem dijelu dermisa (Slika 13d–f). U analiziranim GC uzorcima nije bilo CD68 pozitivnih stanica u papilarnom ili površinskom dijelu retikularnog dermisa (Slika 13g–i). U usporedbi s GC uzorcima, makrofazi pozitivni na CD68 bili su prisutni u površinskom papilarnom dermisu, često blizu DEJ-e (Slika 13j–l). Medijan gustoće makrofaga u EL uzorcima bio je 2,54 stanica/mm, što je značajno više u usporedbi s 0,60 stanica/mm u EC uzorcima ( $p = 0,009$ ). Isto je utvrđeno pri usporedbi GL

uzoraka, koji imaju 5,44 stanica/mm, s GC uzorcima koji sadrže medijan od 0,50 stanica/mm ( $p < 0,001$ ). Postojala je statistički značajna razlika u gustoći makrofaga između EL i GL uzoraka ( $p = 0,049$ ); međutim, nije bilo značajne razlike između EC i GC uzoraka (Slika 13m).



**Slika 13.** Izražaj CD68 u uzorcima normalne kože i LS-om zahvaćene kože. Epidermis (e), papilarni dermis (pd) i retikularni dermis (rd) označeni su na slikama DAPI (engl. 4',6'-diamidino-2-phenylindole) bojenja koje prikazuju sve stanične jezgre (b,e,h,k). EC (engl. *extragenital controls*) — normalna ekstragenitalna koža (a–c): nisu prisutne CD68-pozitivne stanice. EL (engl. *extragenital lichen sclerosus*) — ekstragenitalna koža zahvaćena LS-om (d–f): nekoliko makrofaga prikazano je izražajem CD68 (vrhovi strelica, d,f). GC (engl. *genital controls*) — normalna koža vulve (g–i): izražaj CD68 nije opažen u dermalnim stanicama. GL (engl. *genital lichen sclerosus*) — koža vulve zahvaćena LS-om (j–l): CD68-pozitivni makrofazi vidljivi su u dermisu (vrhovi strelica, j,l). Imunofluorescencijsko bojenje na CD68 i DAPI, ×400 ukupno povećanje. Analiza gustoće makrofaga (m); postojanje statistički značajnih razlika provjereno je Kruskal–Wallis-ovim testom. N/mm označava broj makrofaga po mm dermalno-epidermalnog spoja. Grafikoni prikazuju aritmetičke sredine sa standardnim devijacijama. Značajnost razlika označena je zvjezdicama: \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 i \*\*\*\* p < 0,0001.

## 6. RASPRAVA

U našoj studiji istraživali smo obrazac izražaja čimbenika proliferacije, biljega živčanih vlakana i stanice upalnog infiltrata u koži oboljelih od genitalne i ekstragenitalne varijante LS-a usporedno sa zdravom kožom prethodno navedenih lokalizacija, a kako bi ukazali na njihovo međudjelovanje i moguću ulogu neurogene upale u patogenezi LS-a i njegovog vodećeg kliničkog simptoma - svrbeža. Mnoge studije su istraživale inervaciju kože zahvaćene LS-om, ali ne i u kontekstu razlika u inervaciji i neurogenoj upali između ovih varijanti LS-a te između oboljele i zdrave kože.

U ovom istraživanju utvrdili smo promijenjenu raspodjelu izražaja CGRP-a i VR1 u živčanim vlaknima i stanicama ekstragenitalne i vulvarne kože zahvaćene LS-om, kao i razlike u infiltraciji upalnim stanicama (mastocitima i makrofazima) u promatranim tkivima. Prethodno je opisana promijenjena raspodjela CGRP-pozitivnih vlakana u vulvarnim LS uzorcima i VR1 u zdravoj koži te koži koja je pruritična (164, 171). Za druge pruritične dermatoze, poput psorijaze i atopijskog dermatitisa, poznato je da je neurogena upala posredovana CGRP-pozitivnim živčanim vlaknima, VR1 i mastocitima glavni čimbenik njihove patogeneze (190). Uzimajući navedeno u obzir, pretpostavljamo da je neurogena upala jedan od glavnih patogenetskih mehanizama LS-a.

Nije bilo razlike u dobi među promatranim skupinama bolesnika, što znači da je uzorak primjereno odabran i da dob kao takva nije zbunjujući čimbenik. Razliku u vremenu od početka bolesti do prvog dermatološkog pregleda (kada su urađene biopsije), između ekstragenitalnog i genitalnog LS-a, objašnjavamo činjenicom da su se sve pacijentice s genitalnim LS-om najprije javile svom ginekologu, a kasnije su bile upućene dermatologu, dok su bolesnice s ekstragenitalnim LS-om izravno otišle dermatologu. Drugi mogući čimbenik za ovu razliku mogla bi biti nevoljkost žena da traže liječničku pomoć kada su po srijedi vulvovaginalni simptomi (248). Većina naših bolesnica s genitalnim LS-om imala je simptom intenzivnog svrbeža, dok su one s ekstragenitalnim LS-om imale vrlo blag do nikakav svrbež, što je u skladu s prethodno objavljenim podacima (1, 44).

Još uvijek ne postoje histološki dijagnostički kriteriji za različite stadije i podtipove LS-a (22). U našoj smo studiji pronašli smanjenu debljinu epidermisa u uzorcima LS-a u usporedbi s njihovim odgovarajućim kontrolama, pri čemu uzorci genitalnog LS imaju značajno deblji epidermis od kontrola, a što je u skladu s prethodnim studijama (102). Nismo našli značajnu razliku u količini upalnog infiltrata uspoređujući genitalne i ekstragenitalne uzorke LS-a, međutim, raspodjela infiltrata i prisutnost intraepitelnih limfocita koje smo opisali, pokazali su se tipičnim za rane lezije LS-a (108).



Sva živčana vlakna u koži vizualizirana su s PGP 9.5/UCHL 1 biljgom, općenito primjenjivim biljgom živaca i neuroendokrinih stanica u kralješnjaka (194). Slično prethodnim studijama, naša je studija pokazala veću gustoću PGP 9.5 pozitivnih intraepidermalnih živčanih vlakna u tkivima vulvarnog LS-a u usporedbi s kontrolama (171), što je pretpostavljena posljedica kroničnog upalnog autoimunog procesa. Nije bilo razlike u izražaju ovog proteina između genitalnog i ekstragenitalnog LS-a. Međutim, analizirajući samo subepidermalna živčana vlakna, postoji statistički značajno veća gustoća PGP 9.5-pozitivnih vlakana u tkivima vulvarnog LS-a u usporedbi s ekstragenitalnim LS-om i obje kontrole, a to može biti jedan od čimbenika koji doprinose izrazitom svrbežu u genitalnom obliku bolesti.

CGRP je glavni neuropeptid nociceptivnih senzornih C-vlakana i njegova osnovna funkcija je vazodilatacija i aktivacija mastocita (225). Kod pruritičnih dermatosa postoji veći izražaj CGRP-a, budući da svrbež može biti uzrokovan oštećenjem živčanih vlakana (238). U našem istraživanju pronašli smo veći broj CGRP-pozitivnih intraepidermalnih živčanih vlakana u vulvarnom LS-u u usporedbi s njegovim kontrolama i ekstragenitalnim LS-om, dok nije bilo značajnih razlika između ekstragenitalnog LS-a i ekstragenitalnih kontrola. Analiza subepidermalnih CGRP-pozitivnih vlakana otkrila je veću gustoću u vulvarnom, ali ne i ekstragenitalnom LS-u, u usporedbi s njihovim odgovarajućim kontrolama. Ova saznanja moguće su objasnjenje uzroka jakog svrbeža u slučajevima vulvarnog LS-a. Mnoga su istraživanja također pokazala da CGRP regulira različite upalne procese u ljudskoj koži (225). Hiperinervacija epidermisa CGRP-pozitivnim vlaknima do sada je opisana u različitim pruritičnim dermatozama, uključujući LS vulve (171).

Poznato je da se izražaj neselektivnih kationskih kanala koji sudjeluju u nocicepciji i kožnoj neurogenoj upali (VR1 i TRPA1) ne vidi samo u osjetnim živcima kože, već i u mastocitima, dendritičnim stanicama, endotelnim stanicama i keratinocitima (156). Kod drugih pruritičnih dermatosa, kao što su psorijaza i atopijski dermatitis, povećani izražaj VR1 na živčanim vlaknima i naknadno oslobađanje CGRP-a glavni su uzroci začaranog ciklusa lučenja citokina koji izazivaju svrbež (190). Naše istraživanje izražaja VR1 nije pokazalo razlike u raspodjeli VR1 među keratinocitima i mastocitima u ispitivanim skupinama uzoraka. Međutim, naša analiza VR1 u živčanim vlaknima otkrila je izražaj u CGRP-pozitivnim živčanim vlaknima, kako u vulvarnim tako i u ekstragenitalnim uzorcima LS, dok nije bilo izražaja u istim vrstama vlakana u kontrolnim skupinama. Isto je uočeno i za intraepidermalna i za subepidermalna CGRP-pozitivna vlakna. Znajući da se u upalnim stanjima kože povećava broj stanica pozitivnih na VR1 (180), VR1 bi mogao imati ulogu i u patogenezi LS-a (171).

Osim promjena živčanih vlakana, utvrđeno je da mastociti imaju važnu ulogu u patogenezi pruritičnih dermatoza (235). U normalnoj koži broj mastocita najveći je u gornjem dermisu, bez obzira na spol i dob (238). Povećan broj mastocita pronađen je u gornjim dijelovima dermisa kod pruritičnih dermatoza kao što su psorijaza (242) i atopijski dermatitis (249). U našem istraživanju smo primijetili veći broj mastocita u vulvarnim i ekstragenitalnim uzorcima LS u usporedbi s njihovim kontrolama. Međutim, raspodjela mastocita bila je različita između te dvije lokalizacije: u vulvarnom LS-u povećani broj mastocita bio je prvenstveno u površinskim dijelovima dermisa, pa čak i intraepitelno, dok je u ekstragenitalnom LS-u povećanje broja uglavnom bilo na uštrb mastocita u dubljem dermisu. Analiza rezultata bojenja proliferacijskim biljekom Ki-67 otkrila je da mastociti ne proliferiraju, što ukazuje da bi povećanje njihovog broja u uzorcima LS-a moglo biti uzrokovano povećanom migracijom mastocita u oboljelu kožu (250). Različita raspodjela mastocita između dva tipa LS-a mogla bi biti jedno od mogućih objašnjenja za razliku u jačini svrbeža između njih.

Makrofazi su vrsta stanica čiji je broj povećan u upalnom infiltratu u LS-u (251), a obično su prisutni u pojasu upalnih stanica ili raspršeni u regiji sa sklerozom tkiva (233). U našem istraživanju također smo uočili veći broj makrofaga u uzorcima ekstragenitalnog i genitalnog LS-a u usporedbi s kontrolnim uzorcima. Raspodjela makrofaga u našim ekstragenitalnim i genitalnim uzorcima bila je slična onima uočenim u dosadašnjim istraživanjima (233). Makrofazi se uobičajno nalaze u tkivima s kroničnom upalom (252), a njihov podtip M2 može pridonijeti fibrozi tkiva (253). Također se pokazalo da M2 makrofazi doprinose svrbežu putem interleukina 31 (IL-31) u nekim dermatozama (254), ali nismo pronašli nikakva istraživanja koja povezuju svrbež u LS-u s makrofazima. Opisali smo veći broj makrofaga u LS-u vulve, u usporedbi s uzorcima ekstragenitalnog LS-a, što može pridonijeti razlici u jačini svrbeža. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja o makrofazima i IL-31 u LS-u da bi se donijeli smisleni zaključci.

Proliferaciju keratinocita u LS-u već je proučavala skupina autora koji su pokazali da je biljeg proliferacije Ki-67 značajno pojačano reguliran u vulvarnom LS-u u usporedbi s kontrolama i ekstragenitalnom varijantom bolesti (217). Naše istraživanje ukazuje na značajno viši indeks proliferacije, mjeren brojem Ki-67 pozitivnih bazalnih stanica, u vulvarnom i ekstragenitalnom LS-u, u usporedbi s njihovim kontrolama. Međutim, nismo pronašli značajnu razliku između dvije skupine LS uzoraka. Povećana proliferacija keratinocita u LS-u može biti rezultat više čimbenika. Izravan stimulirajući učinak CGRP-a na proliferaciju keratinocita putem aktivacije MAP kinaza (engl. *mitogen-activated protein kinase*) prethodno je opisan (255), a također smo

pokazali povećani broj CGRP-pozitivnih živčanih vlakana u LS-u vulve. Pokazalo se da proliferacija keratinocita može biti potaknuta povećanim brojem mastocita, osobito u blizini dermo-epidermalnog spoja (256), kao što je slučaj u vulvarnom LS-u. Zanimljivo je da je drugo istraživanje pokazalo da bi triptaza mogla imati inhibitorni učinak na proliferaciju keratinocita smanjenjem odgovora na epidermalni čimbenik rasta nakon kostimulacije (257). Dodatno, pokazano je da CGRP može potaknuti proliferaciju epitelnih stanica posredovanu mastocitima putem transformirajućeg čimbenika rasta-beta (258). Ipak, drugi mogući uzrok povećane proliferacije keratinocita mogla bi biti opetovana mehanička iritacija pruritične kože uslijed češanja, što je tipično za vulvarni LS (259-261). Svi gore navedeni poticajni čimbenici proliferacije keratinocita (CGRP, subepidermalni mastociti, mehanička iritacija) bili su značajno viši u vulvarnom u odnosu na ekstragenitalni LS, ali nije bilo značajne razlike u indeksu proliferacije. Ovo se možda može objasniti metodologijom koju smo koristili za mjerenje proliferacije keratinocita u ovoj studiji. Analizirali smo samo keratinocite u bazalnom sloju (247) i doista, nije bilo značajne razlike između skupina uzoraka bolesne kože. Međutim, suprabazalni keratinociti također proliferiraju i čak smo opisali proliferaciju keratinocita u površnijim slojevima epidermisa u LS uzorcima. Budući da je epidermis u vulvarnom LS-u izrazito deblji nego u ekstragenitalnom LS-u, ukupni broj proliferirajućih keratinocita može biti veći u uzorcima vulvarnog LS-a.

Apoptoza keratinocita (karakterizirana nuklearnim kaspaza-3 pozitivitetom) mogla bi biti uzrok stanjenog epidermisa u ekstragenitalnim LS uzorcima. U našem istraživanju pronašli smo smanjenu količinu apoptotičnih stanica u ekstragenitalnim LS uzorcima, u usporedbi s kontrolom, što objašnjavamo pretpostavkom da se proces programirane stanične smrti dogodio u ranijim stadijima bolesti te u fazama kad je epidermis već stanjen, apoptotska aktivnost je oslabljena. Nismo pronašli istraživanja koja su proučavala apoptozu u ekstragenitalnom LS-u. Naprotiv, pronašli smo povećanu apoptotsku aktivnost u genitalnim LS uzorcima u usporedbi s kontrolama, što odgovara pojačanoj upalnoj aktivnosti u genitalnom LS-u. Neka istraživanja (262, 263) su promatrala izražaj čimbenika vezanih uz apoptozu na uzorcima vulvarnog LS-a, no oba rada su bila usredotočena na prijelaz vulvarnog LS-a u karcinom vulve i nijedan od njih nije promatrao izražaj kaspaza.

Neke od patohistoloških razlika između uzoraka LS-a mogle bi biti posljedica razlika u njihovim kliničkim i patogenetskim karakteristikama. Vrijeme od početka bolesti do biopsije bilo je duže za genitalne LS lezije, dajući im više vremena za razvoj kliničke i patohistološke slike. Genitalne LS lezije karakterizirane su jakim svrbežom, za razliku od ekstragenitalnih (1,

44), , te su izloženije mehaničkoj iritaciji uslijed popratnog češanja, što također može pridonijeti razlici u njihovim patohistološkim značajkama (260).

Naša otkrića daju potencijalne ciljeve za istraživanje i razvoj novih protuupalnih i/ili antipruritičnih terapijskih strategija koje ne samo da mogu ublažiti simptome, već i smanjiti ponovnu pojavu i napredovanje bolesti. Trenutno korištena mogućnost prve linije terapije, lokalni glukokortikoidi, pretpostavljeno imaju povoljan učinak na neurogenu upalu snižavanjem izražaja CGRP-a u osjetnim neuronima (264), međutim, druga istraživanja navode da glukokortikoidi mogu imati različite učinke na razine CGRP-a ovisno o tipu stanice (265). Što se tiče VR1, pokazalo se da glukokortikoidi mogu i smanjiti (266) i povećati njegov izražaj (267). Pimekrolimus, lokalni inhibitor kalcineurina, stimulira otpuštanje CGRP-a iz živčanih vlakana i aktivira VR1, s dugoročnim učinkom desenzibilizacije VR1 i ublažavanja svrbeža (268). Dodatno, otkriveno je da su inhibitori kalcineurina neurotrofični i stimuliraju rast CGRP-pozitivnih živčanih vlakana (269). Glukokortikoidi i inhibitori kalcineurina sprječavaju aktivaciju mastocita i smanjuju broj mastocita putem aktivacije apoptoze (270, 271).

Zaključno, pronašli smo razlike u raspodjeli VR1, proliferaciji i apoptozi keratinocita između zdrave kože i kože zahvaćene LS-om. Također smo pronašli razlike u inervaciji, broju mastocita i makrofaga i distribuciji istih, između zdrave i oboljele kože, ali i između vulvarnih i ekstragenitalnih varijanti LS-a. Te bi razlike mogle biti čimbenik koji pridonosi različitoj jačini svrbeža na pojedinim mjestima i ukazuje na to da ekstragenitalni i genitalni LS, koji se smatraju dvjema kliničkim varijantama iste bolesti, imaju u podlozi različite patogenetske promjene.

## 7. ZAKLJUČCI

Primjenom imunofluorescencijskih metoda na histološkim uzorcima bioptata ekstragenitalne i vulvarne kože oboljelih od LS-a, kao i u odgovarajućim kontrolnim uzorcima istraživani su debljina epidermisa, gustoća upalnog infiltrata, gustoća intra- i subepidermalnih živčanih vlakana pozitivnih na CGRP i PGP 9.5, distribucija VR1, gustoća mastocita (triptaza) i makrofaga (CD68) te proliferacija (Ki-67) i apoptoza (aktivirana kaspaza-3) epidermalnih stanica. Prikupljanjem kliničkih parametara (poput stupnja svrbeža po VAS-i) odredili smo razlike u svrbežu i vremenu od početka simptoma do incijalne biopsije među bolesnicama s LS-om. Temeljem analize i usporedbe obojenih rezova te kliničkih parametara navedenih skupina doneseni su sljedeći zaključci:

1. Svrbež je intenzivniji u bolesnica s genitalnim LS-om u odnosu na bolesnice s ekstragenitalnom varijantom. Svrbež nije prisutan u zdravoj koži.
2. U bolesnica s genitalnim LS-om je vrijeme između prve pojave simptoma i prvotne biopsije LS lezije značajno duže u usporedbi s bolesnicama s ekstragenitalnom varijantom zbog kasnijeg javljanja dermatologu obzirom da se bolest u početku smatra ginekološkom. Sam posjet ginekologu je odgođen zbog nevoljkosti žena da potraže pomoć za probleme intimnih područja tijela.
3. Debljina epidermisa kože LS-uzoraka značajno je smanjena u odnosu na odgovarajuće zdrave kontrole. Uzorci vulvarne kože bili su značajno deblji od uzoraka ekstragenitalne kože, kako za zdravu kožu, tako i za kožu zahvaćenu LS-om.
4. Gustoća CGRP pozitivnih intraepidermalnih i subepidermalnih živčanih vlakana je značajno veća u genitalnim LS-uzorcima u usporedbi s njihovim kontrolama, dok nema razlike između ekstragenitalnih uzoraka. Gustoća PGP 9.5 pozitivnih intraepidermalnih živčanih vlakana je značajno niža u LS uzorcima u usporedbi s njihovim kontrolama, dok je gustoća subepidermalnih vlakana značajno viša u genitalnoj LS varijanti u usporedbi sa svim ostalim skupinama.
5. U zdravoj koži VR1 kolokalizira s PGP 9.5 pozitivnim živčanim vlaknima, no ne i s CGRP pozitivnim vlaknima, dok u koži zahvaćenoj LS-om VR1 kolokalizira s CGRP pozitivnim vlaknima, ali nema kolokalizacije s PGP 9-5 pozitivnim vlaknima. Ova razlika u gustoći CGRP i PGP 9.5 pozitivnih vlakana te distribuciji VR1 receptora na njima podupire pretpostavku da neurogena upala (vođena CGRP-om i VR1) pridonosi patogenezi LS-a.

6. Proliferacija epidermalnih stanica značajno je viša u LS uzorcima u usporedbi sa zdravom kožom, i u genitalnim i ekstragenitalnim uzorcima. Apoptoza epidermalnih stanica je značajno niža u ekstragenitalnim LS lezijama u usporedbi s kontrolama, dok je značajno viša u vulvarnim LS lezijama. Povećan izražaj proliferacije i apoptoze ukazuje na agresivniju prirodu genitalnog LS-a što je u skladu s činjenicom da genitalna, ali ne i ekstragenitalna varijanta, može preći u karcinom.

7. Gustoća mastocita je povećana u LS uzorcima u usporedbi s kontrolama, s time da je većina mastocita lokalizirana subepidermalno ili čak intraepidermalno u genitalnim LS uzorcima, dok se u ekstragenitalnima nalaze u dubljem dermisu. Gustoća makrofaga je također veća u LS uzorcima u usporedbi s kontrolama, a naročito u uzorcima genitalnog LS-a. Prisutnost mastocita u epidermisu i povećan broj makrofaga ukazuju na pojačanu neurogenu upalu u genitalnim LS uzorcima, što djelomično objašnjava povećan svrbež toga područja u usporedbi s ekstragenitalnim.

## 8.LITERATURA



1. Fergus KB, Lee AW, Baradaran N, Cohen AJ, Stohr BA, Erickson BA, i sur. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Treatment of Lichen Sclerosus: A Systematic Review. *Urology*. 2020;135:11-9.
2. Singh N, Ghatage P. Etiology, Clinical Features, and Diagnosis of Vulvar Lichen Sclerosus: A Scoping Review. *Obstet Gynecol Int*. 2020;2020:7480754.
3. Lansdorp CA, van den Hondel KE, Korfage IJ, van Gestel MJ, van der Meijden WI. Quality of life in Dutch women with lichen sclerosus. *Br J Dermatol*. 2013;168(4):787-93.
4. Wallace HJ. Lichen sclerosus et atrophicus. *Trans St Johns Hosp Dermatol Soc*. 1971;57(1):9-30.
5. Edmonds EV, Hunt S, Hawkins D, Dinneen M, Francis N, Bunker CB. Clinical parameters in male genital lichen sclerosus: a case series of 329 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2012;26(6):730-7.
6. Kizer WS, Prarie T, Morey AF. Balanitis xerotica obliterans: epidemiologic distribution in an equal access health care system. *South Med J*. 2003;96(1):9-11.
7. Nelson DM, Peterson AC. Lichen sclerosus: epidemiological distribution in an equal access health care system. *J Urol*. 2011;185(2):522-5.
8. Powell J, Wojnarowska F, Winsey S, Marren P, Welsh K. Lichen sclerosus premenarche: autoimmunity and immunogenetics. *Br J Dermatol*. 2000;142(3):481-4.
9. Krapf JM, Mitchell L, Holton MA, Goldstein AT. Vulvar Lichen Sclerosus: Current Perspectives. *Int J Womens Health*. 2020;12:11-20.
10. Tong LX, Sun GS, Teng JM. Pediatric Lichen Sclerosus: A Review of the Epidemiology and Treatment Options. *Pediatr Dermatol*. 2015;32(5):593-9.
11. Ellis E, Fischer G. Prepubertal-Onset Vulvar Lichen Sclerosus: The Importance of Maintenance Therapy in Long-Term Outcomes. *Pediatr Dermatol*. 2015;32(4):461-7.
12. West DS, Papalas JA, Selim MA, Vollmer RT. Dermatopathology of the foreskin: an institutional experience of over 400 cases. *J Cutan Pathol*. 2013;40(1):11-8.
13. Leibovitz A, Kaplun VV, Saposhnicov N, Habet B. Vulvovaginal examinations in elderly nursing home women residents. *Arch Gerontol Geriatr*. 2000;31(1):1-4.
14. Fistarol SK, Itin PH. Diagnosis and treatment of lichen sclerosus: an update. *Am J Clin Dermatol*. 2013;14(1):27-47.
15. Meyrick Thomas RH, Kennedy CT. The development of lichen sclerosus et atrophicus in monozygotic twin girls. *Br J Dermatol*. 1986;114(3):377-9.
16. Sahn EE, Bluestein EL, Oliva S. Familial lichen sclerosus et atrophicus in childhood. *Pediatr Dermatol*. 1994;11(2):160-3.

17. Doulaveri G, Armira K, Kouris A, Karypidis D, Potouridou I. Genital vulvar lichen sclerosis in monozygotic twin women: a case report and review of the literature. *Case Rep Dermatol.* 2013;5(3):321-5.
18. Lis-Swiety A, Mierzwinska K, Wodok-Wieczorek K, Widuchowska M, Brzezinska-Wcislo L. Co-existence of lichen sclerosis and localized scleroderma in female monozygotic twins. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2014;27(6):e133-6.
19. Azurdia RM, Luzzi GA, Byren I, Welsh K, Wojnarowska F, Marren P, i sur. Lichen sclerosis in adult men: a study of HLA associations and susceptibility to autoimmune disease. *Br J Dermatol.* 1999;140(1):79-83.
20. Gao XH, Barnardo MC, Winsey S, Ahmad T, Cook J, Agudelo JD, i sur. The association between HLA DR, DQ antigens, and vulval lichen sclerosis in the UK: HLA DRB112 and its associated DRB112/DQB10301/04/09/010 haplotype confers susceptibility to vulval lichen sclerosis, and HLA DRB10301/04 and its associated DRB10301/04/DQB10201/02/03 haplotype protects from vulval lichen sclerosis. *J Invest Dermatol.* 2005;125(5):895-9.
21. Marren P, Yell J, Charnock FM, Bunce M, Welsh K, Wojnarowska F. The association between lichen sclerosis and antigens of the HLA system. *Br J Dermatol.* 1995;132(2):197-203.
22. Tran DA, Tan X, Macri CJ, Goldstein AT, Fu SW. Lichen Sclerosis: An autoimmunopathogenic and genomic enigma with emerging genetic and immune targets. *Int J Biol Sci.* 2019;15(7):1429-39.
23. Haefner HK, Welch KC, Rolston AM, Koeppe ES, Stoffel EM, Kiel MJ, i sur. Genomic Profiling of Vulvar Lichen Sclerosis Patients Shows Possible Pathogenetic Disease Mechanisms. *J Low Genit Tract Dis.* 2019;23(3):214-9.
24. Kreuter A, Kryvosheyeva Y, Terras S, Moritz R, Mollenhoff K, Altmeyer P, i sur. Association of autoimmune diseases with lichen sclerosis in 532 male and female patients. *Acta Derm Venereol.* 2013;93(2):238-41.
25. Schlosser BJ, Mirowski GW. Lichen sclerosis and lichen planus in women and girls. *Clin Obstet Gynecol.* 2015;58(1):125-42.
26. Garcia-Bravo B, Sanchez-Pedreno P, Rodriguez-Pichardo A, Camacho F. Lichen sclerosis et atrophicus. A study of 76 cases and their relation to diabetes. *J Am Acad Dermatol.* 1988;19(3):482-5.
27. Guarneri F, Giuffrida R, Di Bari F, Cannavo SP, Benvenga S. Thyroid Autoimmunity and Lichen. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017;8:146.

28. Harrington CI, Dunsmore IR. An investigation into the incidence of auto-immune disorders in patients with lichen sclerosus and atrophicus. *The British journal of dermatology Br J Dermatol.* 1981;104(5):563-6.
29. Khan Mohammad Beigi P. The Immunogenetics of Morphea and Lichen Sclerosus. *Adv Exp Med Biol.* 2022;1367:155-72.
30. Walsh ML, Leonard N, Shawki H, Bell HK. Lichen sclerosus and immunobullous disease. *J Low Genit Tract Dis.* 2012;16(4):468-70.
31. Cooper SM, Ali I, Baldo M, Wojnarowska F. The association of lichen sclerosus and erosive lichen planus of the vulva with autoimmune disease: a case-control study. *Arch Dermatol.* 2008;144(11):1432-5.
32. Oyama N, Chan I, Neill SM, Hamada T, South AP, Wessagowit V, i sur. Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosus. *Lancet.* 2003;362(9378):118-23.
33. Godoy CA, Teodoro WR, Velosa AP, Garippo AL, Eher EM, Parra ER, i sur. Unusual remodeling of the hyalinization band in vulval lichen sclerosus by type V collagen and ECM 1 protein. *Clinics (Sao Paulo).* 2015;70(5):356-62.
34. de Oliveira GA, de Almeida MP, Soares FA, de Almeida Filho GL, Takiya CM, Otazu IB, i sur. Metalloproteinases 2 and 9 and their tissue inhibitors 1 and 2 are increased in vulvar lichen sclerosus. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;161(1):96-101.
35. Zhao Y, Zhao S, Li H, Qin X, Wu X. Expression of galectin-7 in vulvar lichen sclerosus and its effect on dermal fibroblasts. *Oncol Lett.* 2018;16(2):2559-64.
36. Hamada T, McLean WH, Ramsay M, Ashton GH, Nanda A, Jenkins T, i sur. Lipoid proteinosis maps to 1q21 and is caused by mutations in the extracellular matrix protein 1 gene (ECM1). *Hum Mol Genet.* 2002;11(7):833-40.
37. He L, Gu W, Wang M, Chang X, Sun X, Zhang Y, i sur. Extracellular matrix protein 1 promotes follicular helper T cell differentiation and antibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(34):8621-6.
38. Li Z, Zhang Y, Liu Z, Wu X, Zheng Y, Tao Z, i sur. ECM1 controls T(H)2 cell egress from lymph nodes through re-expression of S1P(1). *Nat Immunol.* 2011;12(2):178-85.
39. Fisher SA, Tremelling M, Anderson CA, Gwilliam R, Bumpstead S, Prescott NJ, i sur. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet.* 2008;40(6):710-2.
40. Sugimoto N, Oida T, Hirota K, Nakamura K, Nomura T, Uchiyama T, i sur. Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int Immunol.* 2006;18(8):1197-209.

41. Zhang LJ, Sen GL, Ward NL, Johnston A, Chun K, Chen Y, i sur. Antimicrobial Peptide LL37 and MAVS Signaling Drive Interferon-beta Production by Epidermal Keratinocytes during Skin Injury. *Immunity*. 2016;45(1):119-30.
42. Terlou A, Santegoets LA, van der Meijden WI, Heijmans-Antonissen C, Swagemakers SM, van der Spek PJ, i sur. An autoimmune phenotype in vulvar lichen sclerosus and lichen planus: a Th1 response and high levels of microRNA-155. *J Invest Dermatol*. 2012;132(3 Pt 1):658-66.
43. Ren L, Zhao Y, Huo X, Wu X. MiR-155-5p promotes fibroblast cell proliferation and inhibits FOXO signaling pathway in vulvar lichen sclerosus by targeting FOXO3 and CDKN1B. *Gene*. 2018;653:43-50.
44. van der Meijden WI, Boffa MJ, Ter Harmsel B, Kirtschig G, Lewis F, Moyal-Barracco M, i sur. 2021 European guideline for the management of vulval conditions. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2022;36(7):952-72.
45. Soufir N, Queille S, Liboutet M, Thibaudeau O, Bachelier F, Delestaing G, i sur. Inactivation of the CDKN2A and the p53 tumour suppressor genes in external genital carcinomas and their precursors. *Br J Dermatol*. 2007;156(3):448-53.
46. Kazandi M, Sahin C, Terek MC, Cirpan T, Oztekin K. Clinical evaluation of vulvar lichen sclerosus: case series. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2010;31(5):555-8.
47. Kirtschig G. Lichen Sclerosus-Presentation, Diagnosis and Management. *Dtsch Arztebl Int*. 2016;113(19):337-43.
48. Drut RM, Gomez MA, Drut R, Lojo MM. Human papillomavirus is present in some cases of childhood penile lichen sclerosus: an in situ hybridization and SP-PCR study. *Pediatr Dermatol*. 1998;15(2):85-90.
49. Aberer E, Schmidt BL, Breier F, Kinaciyan T, Luger A. Amplification of DNA of *Borrelia burgdorferi* in urine samples of patients with granuloma annulare and lichen sclerosus et atrophicus. *Arch Dermatol*. 1999;135(2):210-2.
50. Ross SA, Sanchez JL, Taboas JO. Spirochetal forms in the dermal lesions of morphea and lichen sclerosus et atrophicus. *Am J Dermatopathol*. 1990;12(4):357-62.
51. Schempp C, Bocklage H, Lange R, Kolmel HW, Orfanos CE, Gollnick H. Further evidence for *Borrelia burgdorferi* infection in morphea and lichen sclerosus et atrophicus confirmed by DNA amplification. *J Invest Dermatol*. 1993;100(5):717-20.
52. Breier F, Khanakah G, Stanek G, Kunz G, Aberer E, Schmidt B, i sur. Isolation and polymerase chain reaction typing of *Borrelia afzelii* from a skin lesion in a seronegative patient

with generalized ulcerating bullous lichen sclerosus et atrophicus. *Br J Dermatol.* 2001;144(2):387-92.

53. Farrell AM, Millard PR, Schomberg KH, Wojnarowska F. An infective aetiology for vulval lichen sclerosus re-addressed. *Clin Exp Dermatol.* 1999;24(6):479-83.

54. Fujiwara H, Fujiwara K, Hashimoto K, Mehregan AH, Schaumburg-Lever G, Lange R, i sur. 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. *Arch Dermatol.* 1997;133(1):41-4.

55. Heymann WR. Coexistent lichen sclerosus et atrophicus and atrophoderma of Pasini and Pierini. *Int J Dermatol.* 1994;33(2):133-4.

56. Funaro D. Lichen sclerosus: a review and practical approach. *Dermatol Ther.* 2004;17(1):28-37.

57. Friedrich EG, Jr., Kalra PS. Serum levels of sex hormones in vulvar lichen sclerosus, and the effect of topical testosterone. *N Engl J Med.* 1984;310(8):488-91.

58. Taylor AH, Guzail M, Al-Azzawi F. Differential expression of oestrogen receptor isoforms and androgen receptor in the normal vulva and vagina compared with vulval lichen sclerosus and chronic vaginitis. *Br J Dermatol.* 2008;158(2):319-28.

59. Lewis FM, Tatnall FM, Velangi SS, Bunker CB, Kumar A, Brackenbury F, i sur. British Association of Dermatologists guidelines for the management of lichen sclerosus, 2018. *Br J Dermatol.* 2018;178(4):839-53.

60. Gunthert AR, Faber M, Knappe G, Hellriegel S, Emons G. Early onset vulvar Lichen Sclerosus in premenopausal women and oral contraceptives. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008;137(1):56-60.

61. Bellei B, Migliano E, Tedesco M, Caputo S, Picardo M. Maximizing non-enzymatic methods for harvesting adipose-derived stem from lipoaspirate: technical considerations and clinical implications for regenerative surgery. *Sci Rep.* 2017;7(1):10015.

62. Casabona F, Priano V, Vallerino V, Cogliandro A, Lavagnino G. New surgical approach to lichen sclerosus of the vulva: the role of adipose-derived mesenchymal cells and platelet-rich plasma in tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 2010;126(4):210e-1e.

63. Giuseppina Onesti M, Carella S, Ceccarelli S, Marchese C, Scuderi N. The Use of Human Adipose-Derived Stem Cells in the Treatment of Physiological and Pathological Vulvar Dystrophies. *Stem Cells Int.* 2016;2016:2561461.

64. Lewis M, Mercurio MG. Genital purpura as the presenting sign of lichen sclerosus. *J Am Acad Dermatol.* 2016;74(5):e97-8.

65. Ridley CM. Genital lichen sclerosus (lichen sclerosus et atrophicus) in childhood and adolescence. *J R Soc Med.* 1993;86(2):69-75.
66. Kossard S, Pang B. Nodular lichen sclerosus. *J Am Acad Dermatol.* 1994;31(5 Pt 1):817-8.
67. Leppard B, Sneddon IB. Milia occurring in lichen sclerosus et atrophicus. *Br J Dermatol.* 1975;92(6):711-4.
68. Ee HL, Tan SH. Reticulate hyperpigmented scleroderma: a new pigmentary manifestation. *Clin Exp Dermatol.* 2005;30(2):131-3.
69. Farris DR, Hardy D, Kagen MH, Don PC, Weinberg JM. Extragenital pigmented lichen sclerosus. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2000;14(4):322-4.
70. Sollena P, Caldarola G, Di Stefani A, Massi G, Peris K. Lichen sclerosus of the glans simulating melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 2017;76(2S1):S49-S51.
71. Carlson JA, Mu XC, Slominski A, Weismann K, Crowson AN, Malfetano J, i sur. Melanocytic proliferations associated with lichen sclerosus. *Arch Dermatol.* 2002;138(1):77-87.
72. Hasegawa M, Ishikawa O, Asano Y, Sato S, Jinnin M, Takehara K, i sur. Diagnostic criteria, severity classification and guidelines of lichen sclerosus et atrophicus. *J Dermatol.* 2018;45(8):891-7.
73. Aynaud O, Piron D, Casanova JM. Incidence of preputial lichen sclerosus in adults: histologic study of circumcision specimens. *J Am Acad Dermatol.* 1999;41(6):923-6.
74. Liatsikos EN, Perimenis P, Dandinis K, Kaladelfou E, Barbaliias G. Lichen sclerosus et atrophicus. Findings after complete circumcision. *Scand J Urol Nephrol.* 1997;31(5):453-6.
75. Pugliese JM, Morey AF, Peterson AC. Lichen sclerosus: review of the literature and current recommendations for management. *J Urol.* 2007;178(6):2268-76.
76. Kirtschig G, Becker K, Gunthert A, Jasaitiene D, Cooper S, Chi CC, i sur. Evidence-based (S3) Guideline on (anogenital) Lichen sclerosus. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2015;29(10):e1-43.
77. Dalziel K, Reynolds AJ, Holt PJ. Lichen sclerosus et atrophicus with ocular and maxillary complications. *Br J Dermatol.* 1987;116(5):735-7.
78. Kaur S, Thami GP, Kanwar AJ, Mohan H. Linear oro-facial lichen sclerosus. *Clin Exp Dermatol.* 2002;27(6):467-70.
79. Walsh SN, Jorizzo JL, Haverstock C, Sanguenza OP. A linear orofacial macule. *Am J Dermatopathol.* 2008;30(2):194-5.

80. Allan A, Andersen W, Rosenbaum M, Bhawan J. Histologic features of lichen sclerosus et atrophicus in a surgical scar. *Am J Dermatopathol*. 1999;21(4):387-91.
81. Elliott R, Davies M, Harker R, Harmse D. An example of photo-aggravated lichen sclerosus. *Int J Dermatol*. 2007;46(3):332-3.
82. Balakirski G, Grothaus J, Altengarten J, Ott H. Paediatric lichen sclerosus: a systematic review of 4516 cases. *Br J Dermatol*. 2020;182(1):231-3.
83. Dinh H, Purcell SM, Chung C, Zaenglein AL. Pediatric Lichen Sclerosus: A Review of the Literature and Management Recommendations. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2016;9(9):49-54.
84. Maronn ML, Esterly NB. Constipation as a feature of anogenital lichen sclerosus in children. *Pediatrics*. 2005;115(2):e230-2.
85. Wang M, Arlen AM, Vash-Margita A. Characteristics Among Premenarchal Girls With Lichen Sclerosus. *J Low Genit Tract Dis*. 2021;25(2):152-7.
86. Di Altobrando A, Patrizi A, Bassi A, Viridi A, Besagni F, Sacchelli L, i sur. Lichen sclerosus with enlarged vessels: A variant of lichen sclerosus in young girls. *Pediatr Dermatol*. 2021;38(1):318-9.
87. Friedland R, Ben-Amitai D, Didkovsky E, Feinmesser M, Zvulunov A. Vascular lesions in genital lichen sclerosus in pediatric patients. *Pediatr Dermatol*. 2020;37(5):849-52.
88. Luzar B, Neil SM, Calonje E. Angiokeratoma-like changes in extragenital and genital lichen sclerosus. *J Cutan Pathol*. 2009;36(5):540-2.
89. Vash-Margita A, Smith YR, Rabah R, Quint EH. Adolescent Vulvar Angiokeratoma Associated with Lichen Sclerosus. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2019;32(4):440-2.
90. Ismail D, Owen CM. Paediatric vulval lichen sclerosus: a retrospective study. *Clin Exp Dermatol*. 2019;44(7):753-8.
91. Kalampalikis A, Ivanidou S, Michala L. Labial fusion in adolescence secondary to lichen sclerosus. *J Obstet Gynaecol*. 2021;41(4):647-50.
92. Handfield-Jones SE, Hinde FR, Kennedy CT. Lichen sclerosus et atrophicus in children misdiagnosed as sexual abuse. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987;294(6584):1404-5.
93. Gargollo PC, Kozakewich HP, Bauer SB, Borer JG, Peters CA, Retik AB, i sur. Balanitis xerotica obliterans in boys. *J Urol*. 2005;174(4 Pt 1):1409-12.
94. Jasaitiene D, Valiukeviciene S, Vaitkiene D, Jievaltas M, Barauskas V, Gudinaviciene I, i sur. Lichen sclerosus et atrophicus in pediatric and adult male patients with congenital and acquired phimosis. *Medicina (Kaunas)*. 2008;44(6):460-6.
95. Li J, Deng C, Peng Q. Underestimation of genital lichen sclerosus incidence in boys with phimosis: results from a systematic review. *Pediatr Surg Int*. 2018;34(11):1245-50.

96. Mattioli G, Repetto P, Carlini C, Granata C, Gambini C, Jasonni V. Lichen sclerosus et atrophicus in children with phimosis and hypospadias. *Pediatr Surg Int*. 2002;18(4):273-5.
97. Kiss A, Kiraly L, Kutasy B, Merksz M. High incidence of balanitis xerotica obliterans in boys with phimosis: prospective 10-year study. *Pediatr Dermatol*. 2005;22(4):305-8.
98. Pradhan A, Patel R, Said AJ, Upadhyaya M. 10 Years' Experience in Balanitis Xerotica Obliterans: A Single-Institution Study. *Eur J Pediatr Surg*. 2019;29(3):302-6.
99. Barton PG, Ford MJ, Beers BB. Penile purpura as a manifestation of lichen sclerosus et atrophicus. *Pediatr Dermatol*. 1993;10(2):129-31.
100. Alharbi A, Khobrani A, Noor A, Alghamdi W, Alotaibi A, Alnuhait M, i sur. Risk of Lichen Sclerosus and Lichen Planus in Patients Receiving Immune Checkpoint Inhibitors. *Int J Environ Res Public Health* . 2022;20(1).
101. English JC, 3rd, King DH, Foley JP. Penile shaft hypopigmentation: lichen sclerosus occurring after the initiation of alprostadil intracavernous injections for erectile dysfunction. *J Am Acad Dermatol*. 1998;39(5 Pt 1):801-3.
102. Scurry J, Whitehead J, Healey M. Histology of lichen sclerosus varies according to site and proximity to carcinoma. *Am J Dermatopathol* . 2001;23(5):413-8.
103. Marren P, Dean D, Charnock M, Wojnarowska F. The basement membrane zone in lichen sclerosus: an immunohistochemical study. *Br J Dermatol*. 1997;136(4):508-14.
104. Farrell AM, Dean D, Millard PR, Charnock FM, Wojnarowska F. Alterations in fibrillin as well as collagens I and III and elastin occur in vulval lichen sclerosus. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2001;15(3):212-7.
105. Abbas O, Chatrath V, Goldberg LJ. Elastophagocytosis in extragenital lichen sclerosus. *J Cutan Pathol*. 2010;37(10):1032-7.
106. Cabaleiro P, Drut RM, Drut R. Lymphohistiocytic and granulomatous phlebitis in penile lichen sclerosus. *Am J Dermatopathol*. 2000;22(4):316-20.
107. Kempf W, Keller K, John H, Dommann-Scherrer C. Benign atypical intravascular CD30+ T-cell proliferation: a recently described reactive lymphoproliferative process and simulator of intravascular lymphoma: report of a case associated with lichen sclerosus and review of the literature. *Am J Clin Pathol*. 2014;142(5):694-9.
108. Regauer S, Liegl B, Reich O. Early vulvar lichen sclerosus: a histopathological challenge. *Histopathology*. 2005;47(4):340-7.
109. La Spina M, Meli MC, De Pasquale R, Perrotta RE, Lanzafame S, Caltabiano R, i sur. Vulvar Melanoma Associated with Lichen Sclerosus in a Child: Case Report and Literature Review. *Pediatr Dermatol*. 2016;33(3):e190-e4.



110. Welsh B, Howard A, Cook K. Vulval itch. *Aust Fam Physician*. 2004;33(7):505-10.
111. Powell J, Wojnarowska F. Childhood vulvar lichen sclerosus: an increasingly common problem. *J Am Acad Dermatol*. 2001;44(5):803-6.
112. Alyami FA, Bateni ZH, Odeh R, Farhat WA, Koyle M. Routine histopathological examination of the foreskin after circumcision for clinically suspected lichen sclerosus in children: Is it a waste of resources? *Can Urol Assoc J*. 2018;12(5):E231-E3.
113. Boksh K, Patwardhan N. Balanitis xerotica obliterans: has its diagnostic accuracy improved with time? *JRSM open*. 2017;8(6):2054270417692731.
114. Celis S, Reed F, Murphy F, Adams S, Gillick J, Abdelhafeez AH, i sur. Balanitis xerotica obliterans in children and adolescents: a literature review and clinical series. *J Pediatr Urol*. 2014;10(1):34-9.
115. Ghidini F, Virgone C, Pulvirenti R, Trovalusci E, Gamba P. Could a careful clinical examination distinguish physiologic phimosis from balanitis xerotica obliterans in children? *Eur J Pediatr*. 2021;180(2):591-5.
116. Garrido-Rios AA, Alvarez-Garrido H, Sanz-Munoz C, Aragoneses-Fraile H, Manchado-Lopez P, Miranda-Romero A. Dermoscopy of extragenital lichen sclerosus. *Arch Dermatol*. 2009;145(12):1468.
117. Jacquemus J, Debarbieux S, Depaepe L, Amini M, Balme B, Thomas L. Reflectance confocal microscopy of extra-genital lichen sclerosus atrophicus. *Skin Res Technol*. 2016;22(2):255-8.
118. Kint A, Geerts ML. Lichen sclerosus et atrophicus: an electron microscopic study. *J Cutan Pathol*. 1975;2(1):30-4.
119. Mann PR, Cowan MA. Ultrastructural changes in four cases of lichen sclerosus et atrophicus. *Br J Dermatol*. 1973;89(3):223-31.
120. Patterson JA, Ackerman AB. Lichen sclerosus et atrophicus is not related to morphea. A clinical and histologic study of 24 patients in whom both conditions were reputed to be present simultaneously. *Am J Dermatopathol*. 1984;6(4):323-35.
121. Tremaine R, Adam JE, Orizaga M. Morphea coexisting with lichen sclerosus et atrophicus. *Int J Dermatol*. 1990;29(7):486-9.
122. Kreuter A, Wischnewski J, Terras S, Altmeyer P, Stucker M, Gambichler T. Coexistence of lichen sclerosus and morphea: a retrospective analysis of 472 patients with localized scleroderma from a German tertiary referral center. *J Am Acad Dermatol*. 2012;67(6):1157-62.

123. Virgili A, Minghetti S, Borghi A, Corazza M. Long-term maintenance therapy for vulvar lichen sclerosus: the results of a randomized study comparing topical vitamin E with an emollient. *Eur J Dermatol.* 2013;23(2):189-94.
124. Chi CC, Kirtschig G, Baldo M, Brackenbury F, Lewis F, Wojnarowska F. Topical interventions for genital lichen sclerosus. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;2011(12):CD008240.
125. Virgili A, Borghi A, Toni G, Minghetti S, Corazza M. First randomized trial on clobetasol propionate and mometasone furoate in the treatment of vulvar lichen sclerosus: results of efficacy and tolerability. *Br J Dermatol.* 2014;171(2):388-96.
126. Bieber AK, Steuer AB, Melnick LE, Wong PW, Pomeranz MK. Autoimmune and dermatologic conditions associated with lichen sclerosus. *J Am Acad Dermatol.* 2021;85(1):228-9.
127. Funaro D, Lovett A, Leroux N, Powell J. A double-blind, randomized prospective study evaluating topical clobetasol propionate 0.05% versus topical tacrolimus 0.1% in patients with vulvar lichen sclerosus. *J Am Acad Dermatol.* 2014;71(1):84-91.
128. Li Y, Xiao Y, Wang H, Li H, Luo X. Low-concentration topical tacrolimus for the treatment of anogenital lichen sclerosus in childhood: maintenance treatment to reduce recurrence. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2013;26(4):239-42.
129. Burrows LJ, Creasey A, Goldstein AT. The treatment of vulvar lichen sclerosus and female sexual dysfunction. *J Sex Med.* 2011;8(1):219-22.
130. Kreuter A, Tigges C, Gaifullina R, Kirschke J, Altmeyer P, Gambichler T. Pulsed high-dose corticosteroids combined with low-dose methotrexate treatment in patients with refractory generalized extragenital lichen sclerosus. *Arch Dermatol.* 2009;145(11):1303-8.
131. Nayeemuddin F, Yates VM. Lichen sclerosus et atrophicus responding to methotrexate. *Clin Exp Dermatol.* 2008;33(5):651-2.
132. Bulbul Baskan E, Turan H, Tunali S, Toker SC, Saricaoglu H. Open-label trial of cyclosporine for vulvar lichen sclerosus. *J Am Acad Dermatol.* 2007;57(2):276-8.
133. Abramov Y, Elchalal U, Abramov D, Goldfarb A, Schenker JG. Surgical treatment of vulvar lichen sclerosus: a review. *Obstet Gynecol Surv.* 1996;51(3):193-9.
134. Jacobe HT, Cayce R, Nguyen J. UVA1 phototherapy is effective in darker skin: a review of 101 patients of Fitzpatrick skin types I-V. *Br J Dermatol.* 2008;159(3):691-6.
135. Kreuter A, Gambichler T, Avermaete A, Happe M, Bacharach-Buhles M, Hoffmann K, i sur. Low-dose ultraviolet A1 phototherapy for extragenital lichen sclerosus: results of a preliminary study. *J Am Acad Dermatol.* 2002;46(2):251-5.

136. Beattie PE, Dawe RS, Ferguson J, Ibbotson SH. UVA1 phototherapy for genital lichen sclerosis. *Clin Exp Dermatol*. 2006;31(3):343-7.
137. Terras S, Gambichler T, Moritz RK, Stucker M, Kreuter A. UV-A1 phototherapy vs clobetasol propionate, 0.05%, in the treatment of vulvar lichen sclerosis: a randomized clinical trial. *JAMA Dermatol*. 2014;150(6):621-7.
138. Berth-Jones J, Graham-Brown RA, Burns DA. Lichen sclerosis. *Arch Dis Child*. 1989;64(8):1204-6.
139. Clark JA, Muller SA. Lichen sclerosis et atrophicus in children. A report of 24 cases. *Arch Dermatol*. 1967;95(5):476-82.
140. Helm KF, Gibson LE, Muller SA. Lichen sclerosis et atrophicus in children and young adults. *Pediatr Dermatol*. 1991;8(2):97-101.
141. Shirer JA, Jr., Ray MC. Familial occurrence of lichen sclerosis et atrophicus. Case reports of a mother and daughter. *Arch Dermatol*. 1987;123(4):485-8.
142. Haefner HK, Aldrich NZ, Dalton VK, Gagne HM, Marcus SB, Patel DA, i sur. The impact of vulvar lichen sclerosis on sexual dysfunction. *J Womens Health (Larchmt)*. 2014;23(9):765-70.
143. Vittrup G, Westmark S, Riis J, Morup L, Heilesen T, Jensen D, i sur. The Impact of Psychosexual Counseling in Women With Lichen Sclerosis: A Randomized Controlled Trial. *J Low Genit Tract Dis*. 2022;26(3):258-64.
144. Halonen P, Jakobsson M, Heikinheimo O, Gissler M, Pukkala E. Incidence of lichen sclerosis and subsequent causes of death: a nationwide Finnish register study. *BJOG*. 2020;127(7):814-9.
145. Lee A, Bradford J, Fischer G. Long-term Management of Adult Vulvar Lichen Sclerosis: A Prospective Cohort Study of 507 Women. *JAMA Dermatol*. 2015;151(10):1061-7.
146. Spekrijse JJ, Streng BMM, Vermeulen RFM, Voss FO, Vermaat H, van Beurden M. The risk of developing squamous cell carcinoma in patients with anogenital lichen sclerosis: A systematic review. *Gynecol Oncol*. 2020;157(3):671-7.
147. Higgins CA, Cruickshank ME. A population-based case-control study of aetiological factors associated with vulval lichen sclerosis. *J Obstet Gynaecol*. 2012;32(3):271-5.
148. Wang S, Liu R, Yu Q, Dong L, Bi Y, Liu G. Metabolic reprogramming of macrophages during infections and cancer. *Cancer Lett*. 2019;452:14-22.
149. Mannweiler S, Sygulla S, Winter E, Regauer S. Two major pathways of penile carcinogenesis: HPV-induced penile cancers overexpress p16ink4a, HPV-negative cancers

associated with dermatoses express p53, but lack p16ink4a overexpression. *J Am Acad Dermatol.* 2013;69(1):73-81.

150. van de Nieuwenhof HP, van Kempen LC, de Hullu JA, Bekkers RL, Bulten J, Melchers WJ, i sur. The etiologic role of HPV in vulvar squamous cell carcinoma fine tuned. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(7):2061-7.

151. Morrel B, van Eersel R, Burger CW, Bramer WM, Ten Kate-Booij MJ, van der Avoort IAM, i sur. The long-term clinical consequences of juvenile vulvar lichen sclerosus: A systematic review. *J Am Acad Dermatol.* 2020;82(2):469-77.

152. Arena S, Russo T, Impellizzeri P, Parisi S, Perrone P, Romeo C. Utility of uroflowmetry during the follow-up of children affected by balanitis xerotica obliterans (BXO). *Arch Ital Urol Androl.* 2018;90(2):123-6.

153. Kumar KS, Morrel B, van Hees CLM, van der Toorn F, van Dorp W, Mendels EJ. Comparison of lichen sclerosus in boys and girls: A systematic literature review of epidemiology, symptoms, genetic background, risk factors, treatment, and prognosis. *Pediatr Dermatol.* 2022;39(3):400-8.

154. Pinto A, McLaren SH, Poppas DP, Magro CM. Genital melanocytic nevus arising in a background of lichen sclerosus in a 7-year-old female: the diagnostic pitfall with malignant melanoma. A literature review. *Am J Dermatopathol.* 2012;34(8):838-43.

155. Roosterman D, Goerge T, Schneider SW, Bunnett NW, Steinhoff M. Neuronal control of skin function: the skin as a neuroimmunoendocrine organ. *Physiol Rev.* 2006;86(4):1309-79.

156. Gouin O, L'Herondelle K, Lebonvallet N, Le Gall-Ianotto C, Sakka M, Buhe V, i sur. TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization. *Protein Cell.* 2017;8(9):644-61.

157. Sanchez-Carpintero I, Espana-Alonso A. [Role of neuropeptides in dermatology]. *Rev Neurol.* 1997;25 Suppl 3:S222-31.

158. Reich A, Szepietowski JC. Clinical Aspects of Itch: Psoriasis. U: Carstens E, Akiyama T, editors. *Itch: Mechanisms and Treatment*, Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2014; str. 33–46.

159. Hilliges M, Wang L, Johansson O. Ultrastructural evidence for nerve fibers within all vital layers of the human epidermis. *J Invest Dermatol.* 1995;104(1):134-7.

160. Asahina A, Hosoi J, Grabbe S, Granstein RD. Modulation of Langerhans cell function by epidermal nerves. *J Allergy Clin Immunol.* 1995;96(6 Pt 2):1178-82.

161. Hosoi J, Murphy GF, Egan CL, Lerner EA, Grabbe S, Asahina A, i sur. Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonin gene-related peptide. *Nature*. 1993;363(6425):159-63.
162. Ji RR, Chamesian A, Zhang YQ. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. *Science*. 2016;354(6312):572-7.
163. Wang T, Ma C. Peripheral Nociceptors as Immune Sensors in the Development of Pain and Itch. *Adv Exp Med Biol*. 2016;904:77-85.
164. Stander S, Moormann C, Schumacher M, Buddenkotte J, Artuc M, Shpacovitch V, i sur. Expression of vanilloid receptor subtype 1 in cutaneous sensory nerve fibers, mast cells, and epithelial cells of appendage structures. *Exp Dermatol*. 2004;13(3):129-39.
165. Johansson O, Wang L, Hilliges M, Liang Y. Intraepidermal nerves in human skin: PGP 9.5 immunohistochemistry with special reference to the nerve density in skin from different body regions. *J Peripher Nerv Syst*. 1999;4(1):43-52.
166. Kawakami T, Ishihara M, Mihara M. Distribution density of intraepidermal nerve fibers in normal human skin. *J Dermatol*. 2001;28(2):63-70.
167. Liu Y, Fan X, Wei Y, Piao Z, Jiang X. Intraepidermal nerve fiber density of healthy human. *Neurol Res*. 2014;36(10):911-4.
168. Koskinen M, Hietaharju A, Kylaniemi M, Peltola J, Rantala I, Udd B, i sur. A quantitative method for the assessment of intraepidermal nerve fibers in small-fiber neuropathy. *J Neurol*. 2005;252(7):789-94.
169. Zeidler C, Yosipovitch G, Stander S. Prurigo Nodularis and Its Management. *Dermatol Clin*. 2018;36(3):189-97.
170. Maddison B, Namazi MR, Samuel LS, Sanchez J, Pichardo R, Stocks J, i sur. Unexpected diminished innervation of epidermis and dermoepidermal junction in lichen amyloidosus. *Br J Dermatol*. 2008;159(2):403-6.
171. Milian-Ciesielska K, Chmura L, Dyduch G, Jagers C, Radwanska E, Adamek D. Intraepidermal nerve fiber density in vulvar lichen sclerosus and normal vulvar tissues. *J Physiol Pharmacol*. 2017;68(3):453-8.
172. Restovic I, Bocina I, Vukojevic K, Kero D, Filipovic N, Raonic J, i sur. Time course and expression pattern of the neuronal markers in the developing human spinal cord. *Int J Dev Neurosci*. 2019;74:1-10.
173. Vukojevic K, Filipovic N, Tica Sedlar I, Restovic I, Bocina I, Pintaric I, i sur. Neuronal differentiation in the developing human spinal ganglia. *Anat Rec (Hoboken)*. 2016;299(8):1060-72.

174. Denda M, Sokabe T, Fukumi-Tominaga T, Tominaga M. Effects of skin surface temperature on epidermal permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol.* 2007;127(3):654-9.
175. Bagood MD, Isseroff RR. TRPV1: Role in Skin and Skin Diseases and Potential Target for Improving Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2021;22(11).
176. Kemeny A, Kodji X, Horvath S, Komlodi R, Szoke E, Sandor Z, i sur. TRPA1 Acts in a Protective Manner in Imiquimod-Induced Psoriasiform Dermatitis in Mice. *J Invest Dermatol.* 2018;138(8):1774-84.
177. Riol-Blanco L, Ordovas-Montanes J, Perro M, Naval E, Thiriot A, Alvarez D, i sur. Nociceptive sensory neurons drive interleukin-23-mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature.* 2014;510(7503):157-61.
178. Zhou Y, Follansbee T, Wu X, Han D, Yu S, Domocos DT, i sur. TRPV1 mediates inflammation and hyperplasia in imiquimod (IMQ)-induced psoriasiform dermatitis (PsD) in mice. *J Dermatol Sci.* 2018;92(3):264-71.
179. Lee SH, Tonello R, Im ST, Jeon H, Park J, Ford Z, i sur. Resolvin D3 controls mouse and human TRPV1-positive neurons and preclinical progression of psoriasis. *Theranostics.* 2020;10(26):12111-26.
180. Ban A, Marincsak R, Biro T, Perkecz A, Gomori E, Sandor K, i sur. Upregulation of transient receptor potential vanilloid type-1 receptor expression in oral lichen planus. *Neuroimmunomodulation.* 2010;17(2):103-8.
181. Sulk M, Seeliger S, Aubert J, Schwab VD, Cevikbas F, Rivier M, i sur. Distribution and expression of non-neuronal transient receptor potential (TRPV) ion channels in rosacea. *J Invest Dermatol.* 2012;132(4):1253-62.
182. Charles A, Pozo-Rosich P. Targeting calcitonin gene-related peptide: a new era in migraine therapy. *Lancet.* 2019;394(10210):1765-74.
183. Iyengar S, Ossipov MH, Johnson KW. The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain.* 2017;158(4):543-59.
184. Hargreaves R, Olesen J. Calcitonin Gene-Related Peptide Modulators - The History and Renaissance of a New Migraine Drug Class. *Headache.* 2019;59(6):951-70.
185. Marti E, Gibson SJ, Polak JM, Facer P, Springall DR, Van Aswegen G, i sur. Ontogeny of peptide- and amine-containing neurones in motor, sensory, and autonomic regions of rat and human spinal cord, dorsal root ganglia, and rat skin. *J Comp Neurol.* 1987;266(3):332-59.
186. Steinhoff M, Stander S, Seeliger S, Ansel JC, Schmelz M, Luger T. Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. *Arch Dermatol.* 2003;139(11):1479-88.

187. Ding W, Stohl LL, Wagner JA, Granstein RD. Calcitonin gene-related peptide biases Langerhans cells toward Th2-type immunity. *J Immunol.* 2008;181(9):6020-6.
188. Rosa AC, Fantozzi R. The role of histamine in neurogenic inflammation. *Br J Pharmacol.* 2013;170(1):38-45.
189. Mollanazar NK, Smith PK, Yosipovitch G. Mediators of Chronic Pruritus in Atopic Dermatitis: Getting the Itch Out? *Clin Rev Allergy Immunol.* 2016;51(3):263-92.
190. Choi JE, Di Nardo A. Skin neurogenic inflammation. *Semin Immunopathol.* 2018;40(3):249-59.
191. Greeno EW, Mantyh P, Vercellotti GM, Moldow CF. Functional neurokinin 1 receptors for substance P are expressed by human vascular endothelium. *J Exp Med.* 1993;177(5):1269-76.
192. O'Halloran DJ, Bloom SR. Calcitonin gene related peptide. *BMJ.* 1991;302(6779):739-40.
193. Liang Y, Jacobi HH, Reimert CM, Haak-Frendscho M, Marcusson JA, Johansson O. CGRP-immunoreactive nerves in prurigo nodularis--an exploration of neurogenic inflammation. *J Cutan Pathol.* 2000;27(7):359-66.
194. Day IN, Thompson RJ. UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein. *Prog Neurobiol.* 2010;90(3):327-62.
195. Nejati R, Kovacic D, Slominski A. Neuro-immune-endocrine functions of the skin: an overview. *Expert Rev Dermatol.* 2013;8(6):581-3.
196. Olerud JE, Chiu DS, Usui ML, Gibran NS, Ansel JC. Protein gene product 9.5 is expressed by fibroblasts in human cutaneous wounds. *J Invest Dermatol.* 1998;111(4):565-72.
197. Foster EL, Simpson EL, Fredrikson LJ, Lee JJ, Lee NA, Fryer AD, et al. Eosinophils increase neuron branching in human and murine skin and in vitro. *PLoS One.* 2011;6(7):e22029.
198. Martini R, Willison H. Neuroinflammation in the peripheral nerve: Cause, modulator, or bystander in peripheral neuropathies? *Glia.* 2016;64(4):475-86.
199. Umehara Y, Kamata Y, Tominaga M, Niyonsaba F, Ogawa H, Takamori K. Antimicrobial peptides human LL-37 and beta-defensin-3 modulate the expression of nerve elongation factors in human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci.* 2017;88(3):365-7.
200. Kupczyk P, Reich A, Gajda M, Holysz M, Wysokinska E, Paprocka M, et al. UCHL1/PGP 9.5 Dynamic in Neuro-Immune-Cutaneous Milieu: Focusing on Axonal Nerve Terminals and Epidermal Keratinocytes in Psoriatic Itch. *Biomed Res Int.* 2018;2018:7489316.

201. Matas A, Filipovic N, Znaor L, Mardesic S, Saraga-Babic M, Vukojevic K. Interplay of proliferation and differentiation factors is revealed in the early human eye development. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2015;253(12):2187-201.
202. Maddison B, Parsons A, Sanguenza O, Sheehan DJ, Yosipovitch G. Retrospective study of intraepidermal nerve fiber distribution in biopsies of patients with nummular eczema. *Am J Dermatopathol*. 2011;33(6):621-3.
203. Bebars SMM, Al-Sharaky DR, Gaber MA, Afify DR. Immunohistochemical Expression of Caspase-3 in Psoriasis. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(7):EC01-EC5.
204. Green DR, Llambi F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(12).
205. Kiraz Y, Adan A, Kartal Yandim M, Baran Y. Major apoptotic mechanisms and genes involved in apoptosis. *Tumour Biol*. 2016;37(7):8471-86.
206. Boric K, Mardesic S, Martinovic Kaliterna D, Radic M, Tadin Hadjina I, Vukojevic K, i sur. Expression of apoptotic and proliferation factors in gastric mucosa of patients with systemic sclerosis correlates with form of the disease. *Sci Rep*. 2019;9(1):18461.
207. Simon D, Lindberg RL, Kozlowski E, Braathen LR, Simon HU. Epidermal caspase-3 cleavage associated with interferon-gamma-expressing lymphocytes in acute atopic dermatitis lesions. *Exp Dermatol*. 2006;15(6):441-6.
208. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, i sur. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*. 1991;138(4):867-73.
209. Citterio HL, Gaillard DA. Expression of transforming growth factor alpha (TGF alpha), epidermal growth factor receptor (EGF-R) and cell proliferation during human palatogenesis: an immunohistochemical study. *Int J Dev Biol*. 1994;38(3):499-505.
210. Okano J, Suzuki S, Shiota K. Involvement of apoptotic cell death and cell cycle perturbation in retinoic acid-induced cleft palate in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;221(1):42-56.
211. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182(3):311-22.
212. Reich A, Szepietowski JC. Vasoactive peptides in the pathogenesis of psoriasis. *G Ital Dermatol Venereol*. 2008;143(5):289-98.
213. Ayasse MT, Buddenkotte J, Alam M, Steinhoff M. Role of neuroimmune circuits and pruritus in psoriasis. *Exp Dermatol*. 2020;29(4):414-26.



214. Ando M, Kawashima T, Kobayashi H, Ohkawara A. Immunohistological detection of proliferating cells in normal and psoriatic epidermis using Ki-67 monoclonal antibody. *J Dermatol Sci.* 1990;1(6):441-6.
215. Doger FK, Dikicioglu E, Ergin F, Unal E, Sendur N, Uslu M. Nature of cell kinetics in psoriatic epidermis. *J Cutan Pathol.* 2007;34(3):257-63.
216. Bovenschen HJ, Seyger MM, Van de Kerkhof PC. Plaque psoriasis vs. atopic dermatitis and lichen planus: a comparison for lesional T-cell subsets, epidermal proliferation and differentiation. *Br J Dermatol.* 2005;153(1):72-8.
217. Gambichler T, Kammann S, Tigges C, Kobus S, Skrygan M, Meier JJ, i sur. Cell cycle regulation and proliferation in lichen sclerosus. *Regul Pept.* 2011;167(2-3):209-14.
218. Levy AC, Moynihan M, Bennett JA, Sullivan T, Stensland K, Browne BM, i sur. Protein Expression Profiles among Lichen Sclerosus Urethral Strictures-Can Urethroplasty Success be Predicted? *J Urol.* 2020;203(4):773-8.
219. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 2013;14(10):986-95.
220. Hume DA. The Many Alternative Faces of Macrophage Activation. *Front Immunol.* 2015;6:370.
221. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-69.
222. Wang SH, Chi CC, Wong YW, Salim A, Manek S, Wojnarowska F. Genital verrucous carcinoma is associated with lichen sclerosus: a retrospective study and review of the literature. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010;24(7):815-9.
223. Parisi L, Gini E, Baci D, Tremolati M, Fanuli M, Bassani B, i sur. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J Immunol Res.* 2018;2018:8917804.
224. Sugaya M, Miyagaki T, Ohmatsu H, Suga H, Kai H, Kamata M, i sur. Association of the numbers of CD163(+) cells in lesional skin and serum levels of soluble CD163 with disease progression of cutaneous T cell lymphoma. *J Dermatol Sci.* 2012;68(1):45-51.
225. Kim YJ, Granstein RD. Roles of calcitonin gene-related peptide in the skin, and other physiological and pathophysiological functions. *Brain Behav Immun Health.* 2021;18:100361.
226. Melgert BN, ten Hacken NH, Rutgers B, Timens W, Postma DS, Hylkema MN. More alternative activation of macrophages in lungs of asthmatic patients. *J Allergy Clin Immunol.* 2011;127(3):831-3.

227. Valledor AF, Comalada M, Santamaria-Babi LF, Lloberas J, Celada A. Macrophage proinflammatory activation and deactivation: a question of balance. *Adv Immunol.* 2010;108:1-20.
228. Kasraie S, Werfel T. Role of macrophages in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:942375.
229. Kiekens RC, Thepen T, Oosting AJ, Bihari IC, Van De Winkel JG, Bruijnzeel-Koomen CA, i sur. Heterogeneity within tissue-specific macrophage and dendritic cell populations during cutaneous inflammation in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2001;145(6):957-65.
230. Minami K, Hiwatashi K, Ueno S, Sakoda M, Iino S, Okumura H, i sur. Prognostic significance of CD68, CD163 and Folate receptor-beta positive macrophages in hepatocellular carcinoma. *Exp Ther Med.* 2018;15(5):4465-76.
231. Kim HJ, Jang J, Lee EH, Jung S, Roh JY, Jung Y. Decreased expression of response gene to complement 32 in psoriasis and its association with reduced M2 macrophage polarization. *J Dermatol.* 2019;46(2):166-8.
232. Marble DJ, Gordon KB, Nickoloff BJ. Targeting TNFalpha rapidly reduces density of dendritic cells and macrophages in psoriatic plaques with restoration of epidermal keratinocyte differentiation. *J Dermatol Sci.* 2007;48(2):87-101.
233. Farrell AM, Marren P, Dean D, Wojnarowska F. Lichen sclerosis: evidence that immunological changes occur at all levels of the skin. *Br J Dermatol.* 1999;140(6):1087-92.
234. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med.* 2000;343(1):37-49.
235. Kolkhir P, Elieh-Ali-Komi D, Metz M, Siebenhaar F, Maurer M. Understanding human mast cells: lesson from therapies for allergic and non-allergic diseases. *Nat Rev Immunol.* 2022;22(5):294-308.
236. Maurer M, Paus R, Czarnetzki BM. Mast cells as modulators of hair follicle cycling. *Exp Dermatol.* 1995;4(4 Pt 2):266-71.
237. Maurer M, Theoharides T, Granstein RD, Bischoff SC, Bienenstock J, Henz B, i sur. What is the physiological function of mast cells? *Exp Dermatol.* 2003;12(6):886-910.
238. Siiskonen H, Harvima I. Mast Cells and Sensory Nerves Contribute to Neurogenic Inflammation and Pruritus in Chronic Skin Inflammation. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:422.
239. Assas BM, Pennock JJ, Miyan JA. Calcitonin gene-related peptide is a key neurotransmitter in the neuro-immune axis. *Front Neurosci.* 2014;8:23.
240. Jarvikallio A, Harvima IT, Naukkarinen A. Mast cells, nerves and neuropeptides in atopic dermatitis and nummular eczema. *Arch Dermatol Res.* 2003;295(1):2-7.

241. Naukkarinen A, Nickoloff BJ, Farber EM. Quantification of cutaneous sensory nerves and their substance P content in psoriasis. *J Invest Dermatol.* 1989;92(1):126-9.
242. Gupta K, Harvima IT. Mast cell-neural interactions contribute to pain and itch. *Immunol Rev.* 2018;282(1):168-87.
243. Song IS, Bunnett NW, Olerud JE, Harten B, Steinhoff M, Brown JR, i sur. Substance P induction of murine keratinocyte PAM 212 interleukin 1 production is mediated by the neurokinin 2 receptor (NK-2R). *Exp Dermatol.* 2000;9(1):42-52.
244. Therkildsen P, Haedersdal M, Lock-Andersen J, de Fine Olivarius F, Poulsen T, Wulf HC. Epidermal thickness measured by light microscopy: a methodological study. *Skin Res Technol.* 1998;4(4):174-9.
245. Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, Kennedy WR, Leger JM, Mellgren SI, i sur. 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 Nerve Society. *Eur J Neurol.* 2010;17(7):903-12, e44-9.
246. Vlckova-Moravcova E, Bednarik J, Dusek L, Toyka KV, Sommer C. Diagnostic validity of epidermal nerve fiber densities in painful sensory neuropathies. *Muscle Nerve.* 2008;37(1):50-60.
247. Coolen NA, Verkerk M, Reijnen L, Vlig M, van den Bogaerdt AJ, Breetveld M, i sur. Culture of keratinocytes for transplantation without the need of feeder layer cells. *Cell Transplant.* 2007;16(6):649-61.
248. Reiter S. Barriers to effective treatment of vaginal atrophy with local estrogen therapy. *Int J Gen Med.* 2013;6:153-8.
249. Ilves T, Harvima IT. Decrease in chymase activity is associated with increase in IL-6 expression in mast cells in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(4):411-6.
250. Kauppila S, Kotila V, Knuuti E, Vare PO, Vittaniemi P, Nissi R. The effect of topical pimecrolimus on inflammatory infiltrate in vulvar lichen sclerosus. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;202(2):181 e1-4.
251. Carlson JA, Ambros R, Malfetano J, Ross J, Grabowski R, Lamb P, i sur. Vulvar lichen sclerosus and squamous cell carcinoma: a cohort, case control, and investigational study with historical perspective; implications for chronic inflammation and sclerosis in the development of neoplasia. *Hum Pathol.* 1998;29(9):932-48.
252. Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int Immunol.* 2018;30(11):511-28.

253. Higashi-Kuwata N, Makino T, Inoue Y, Takeya M, Ihn H. Alternatively activated macrophages (M2 macrophages) in the skin of patient with localized scleroderma. *Exp Dermatol.* 2009;18(8):727-9.
254. Hashimoto T, Satoh T, Yokozeki H. Pruritus in ordinary scabies: IL-31 from macrophages induced by overexpression of thymic stromal lymphopoietin and periostin. *Allergy.* 2019;74(9):1727-37.
255. Yu XJ, Li CY, Xu YH, Chen LM, Zhou CL. Calcitonin gene-related peptide increases proliferation of human HaCaT keratinocytes by activation of MAP kinases. *Cell Biol Int.* 2009;33(11):1144-8.
256. Komi DEA, Khomtchouk K, Santa Maria PL. A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2020;58(3):298-312.
257. Algermissen B, Hermes B, Feldmann-Boeddeker I, Bauer F, Henz BM. Mast cell chymase and tryptase during tissue turnover: analysis on in vitro mitogenesis of fibroblasts and keratinocytes and alterations in cutaneous scars. *Exp Dermatol.* 1999;8(3):193-8.
258. Bulut K, Felderbauer P, Deters S, Hoeck K, Schmidt-Choudhury A, Schmidt WE, i sur. Sensory neuropeptides and epithelial cell restitution: the relevance of SP- and CGRP-stimulated mast cells. *Int J Colorectal Dis.* 2008;23(5):535-41.
259. Perez-Lopez FR, Vieira-Baptista P. Lichen sclerosus in women: a review. *Climacteric.* 2017;20(4):339-47.
260. Potten CS, Barthel D, Li YQ, Ohlrich R, Matthe B, Loeffler M. Proliferation in murine epidermis after minor mechanical stimulation. Part 1. Sustained increase in keratinocyte production and migration. *Cell Prolif.* 2000;33(4):231-46.
261. Takei T, Rivas-Gotz C, Delling CA, Koo JT, Mills I, McCarthy TL, i sur. Effect of strain on human keratinocytes in vitro. *J Cell Physiol.* 1997;173(1):64-72.
262. Ben-Hur H, Ashkenazi M, Huszar M, Gurevich P, Zusman I. Lymphoid elements and apoptosis-related proteins (Fas, Fas ligand, p53 and bcl-2) in lichen sclerosus and carcinoma of the vulva. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2001;22(2):104-9.
263. Klimov EA, Sobolev VV, Batashkov NA, Kokaeva ZG, Tretiakov AV, Nevozinskaya ZA, i sur. Transcriptional Activity of Some Genes Involved in Apoptosis in Patients with Vulvar Lichen Sclerosus. *Bull Exp Biol Med.* 2022;172(6):734-7.
264. Nohr D, Schafer MK, Persson S, Romeo H, Nyberg F, Post C, i sur. Calcitonin gene-related peptide gene expression in collagen-induced arthritis is differentially regulated in

primary afferents and motoneurons: influence of glucocorticoids. *Neuroscience*. 1999;93(2):759-73.

265. Tverberg LA, Russo AF. Cell-specific glucocorticoid repression of calcitonin/calcitonin gene-related peptide transcription. Localization to an 18-base pair basal enhancer element. *J Biol Chem*. 1992;267(25):17567-73.

266. Ahn S, Park J, An I, Jung SJ, Hwang J. Transient receptor potential cation channel V1 (TRPV1) is degraded by starvation- and glucocorticoid-mediated autophagy. *Mol Cells*. 2014;37(3):257-63.

267. Hong S, Zheng G, Wu X, Snider NT, Owyang C, Wiley JW. Corticosterone mediates reciprocal changes in CB 1 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons in the chronically stressed rat. *Gastroenterology*. 2011;140(2):627-37 e4.

268. Xie ZQ, Yang GY, Jiang W, Xu ML. [Antipruritic mechanisms of pimecrolimus cream for facial dermatitis in adult women patients]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*. 2009;31(1):27-30.

269. Hayashi Y, Shumsky JS, Connors T, Otsuka T, Fischer I, Tessler A, i sur. Immunosuppression with either cyclosporine a or FK506 supports survival of transplanted fibroblasts and promotes growth of host axons into the transplant after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2005;22(11):1267-81.

270. Ma Z, Jiao Z. Mast cells as targets of pimecrolimus. *Curr Pharm Des*. 2011;17(34):3823-9.

271. Santoro T, Azevedo CT, PMR ES, Martins MA, Carvalho VF. Glucocorticoids decrease the numbers and activation of mast cells by inducing the transactivation receptors of AGEs. *J Leukoc Biol*. 2019;105(1):131-42.

## 9. SAŽETAK

*Lichen sclerosus* (LS) je progresivna kožna bolest koju karakterizira kronična upala genitalne ili ekstragenitalne kože, a nesrazmjerno češće pogađa žene. Imunohistokemijski smo analizirali raspodjelu živčanih vlakana, vaniloidnih receptora, te biljege stanične proliferacije, apoptoze, mastocita i makrofaga u genitalnim i ekstragenitalnim uzorcima LS-a, kao i u zdravoj koži. Ukupna količina intraepidermalnih živčanih vlakana bila je manja u uzorcima kože bolesnica oboljelih od LS-a u usporedbi sa zdravim kontrolama, dok je ukupna količina subepidermalnih živčanih vlakana i vlakana pozitivnih na peptid povezan s genom kalcitonina (engl. *calcitonin gene-related peptide*, CGRP) bila viša u uzorcima genitalne kože oboljelih od LS-a u usporedbi s uzorcima bolesnica s ekstragenitalnim LS-om i zdravim kontrolama. Proliferacija stanica te gustoća makrofaga i mastocita bila je povećana u uzorcima LS-a u usporedbi sa zdravim kontrolama. Uzorci genitalnog LS-a imali su veću gustoću makrofaga u usporedbi s ekstragenitalnom varijantom. Raspodjela mastocita značajno se razlikovala između genitalnih i ekstragenitalnih uzoraka LS-a, iako nije bilo razlike u ukupnoj gustoći mastocita. Apoptoza epidermalnih stanica bila je najizraženija u uzorcima genitalne kože bolesnica oboljelih od LS-a. Ova bi otkrića mogla objasniti razlike u jačini svrbeža genitalnog i ekstragenitalnog oblika LS-a i pružiti ciljeve za istraživanje novih terapijskih strategija za liječenje LS-a.

## 10. SUMMARY



*Lichen sclerosus* (LS) is a progressive skin disease that is characterized by chronic inflammation of either genital or extragenital skin, and it disproportionately affects women. We analyzed the distribution of nerve fibers, vanilloid receptors, cell proliferation, mast cells and macrophages in genital and extragenital LS samples, as well as in healthy skin, by using immunohistochemistry. The total amount of intraepidermal nerve fibers was lower in LS samples compared to healthy controls, while the total amount of subepidermal nerve fibers and calcitonin gene-related peptide (CGRP) positive fibers was higher in genital LS samples compared to both extragenital LS and healthy controls. Cell proliferation, macrophage and mast cell density were increased in LS samples compared to healthy controls. Genital LS had a higher macrophage density compared to the extragenital variant. Mast cell distribution significantly differed between genital and extragenital LS samples, even though their total mast cell densities were similar. Epidermal cell apoptosis was the most prominent in genital LS samples. These findings could explain the differences between pruritic symptoms of genital and extragenital LS and provide targets for the research of novel therapeutic strategies for LS management.

## 11. ŽIVOTOPIS

## **OSOBNI PODACI:**

Ime i prezime: Dubravka Vuković

Mjesto rođenja: Split, Hrvatska

Datum rođenja: 03.01.1984. god.

Državljanstvo: hrvatsko

Narodnost: Hrvatica

## **OBRAZOVANJE:**

1990. - 1998. Osnovna škola: "Gripe" u Splitu

1998. - 2002. III. Gimnazija Split

2002. - 2008. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2010. Poslijediplomski doktorski studij: "Medicina utemeljena na dokazima",  
Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

2016. Poslijediplomski specijalistički studij: „Dermatovenerologija“, Medicinski  
fakultet Sveučilišta u Zagrebu

2021. Poslijediplomski specijalistički studij: „Pedijatrija“, Medicinski fakultet  
Sveučilišta u Splitu

## **RADNO ISKUSTVO:**

2008. - 2009. liječnik pripravnik u Kliničkom bolničkom centru Split

2010. - 2011. znanstveni novak na Klinici za psihijatriju

2012. - 2017. liječnik na specijalizaciji iz dermatovenerologije, Klinika za  
dermatovenerologiju, KBC Split

2017. - specijalist dermatovenerologije, Klinika za dermatovenerologiju, KBC Split

2022.- specijalist dermatovenerologije s užom specijalizacijom iz pedijatrijske  
dermatovenerologije, Klinika za dermatovenerologiju, KBC Split

2020.- naslovni asistent pri Katedri za dermatovenerologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu

**JEZICI:**

- Hrvatski jezik (materinski jezik)
- Engleski jezik (aktivno korištenje u govoru i pisanju)

**ZNANSTVENI INTERESI:** dermatovenerologija, pedijatrijska dermatovenerologija, patogeneza imunoloških oboljenja u dermatovenerologiji

**TEHNIČKE VJEŠTINE:** dermatoskopija

**POZNAVANJE RAČUNALNIH PROGRAMA:** Microsoft Office paket (Word, Excel, PowerPoint, Outlook), EndNote, Adobe Photoshop, ImageJ

**ČLANSTVO U PROFESIONALNIM ORGANIZACIJAMA:**

- 2009. Hrvatska liječnička komora
- 2012. Hrvatski liječnički zbor
- 2012. Hrvatsko dermatovenerološko društvo
- 2022. Hrvatska udruga Sveučilišnih žena
- 2023. Europsko dermatovenerološko društvo

**IZVORNI ZNANSTVENI I PREGLEDNI RADOVI U INDEKSIRANIM ČASOPISIMA:**

1. Glucina D, Britvic D, Lasic D, Dedic M, Jakelic M, Brajevic-Gizdic I, i sur. The Croatian Version of Diagnostic Interview for Genetic Studies. *Psychiatr Danub.* 2010 Jun;22(2):193–7.
2. Britvic D, Glucina D, Anticevic V, Kekez V, Lapenda B, Dogas V, i sur. Long-Term Improvement in Coping Skills Following Multimodal Treatment in War Veterans with Chronic PTSD. *Int J Group Psychother.* 2012 Jul;62(3):419–35.
3. Lasic D, Ivanisevic R, Uglesic B, Cvitanovic MZ, Glucina D, Hlevnjak I. Valproate-Acid-Induced Cutaneous Leukocytoclastic Vasculitis. *Psychiatr Danub.* 2012 Jun;24(2):215–8.
4. Vanjaka-Rogosic L, Puizina-Ivic N, Miric L, Rogosic V, Kuzmic-Prusac I, Babic MS, i sur. Matrix metalloproteinases and E-cadherin immunoreactivity in different basal cell carcinoma histological types. *Acta Histochem.* 2014;116(5):688–93.
5. Carija A, Puizina-Ivic N, Vukovic D, Kovacevic LM, Capkun V. Single treatment of low-risk basal cell carcinomas with pulsed dye laser-mediated photodynamic therapy (PDL-PDT) compared with photodynamic therapy (PDT): A controlled, investigator-blinded, intra-individual prospective study. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2016 Dec;16:60–5.
6. Kralj Z, Dedic M, Kovacevic A, Malicki M, Dedic J, Pelivan M, i sur. Diagnostic Interview for Genetic Studies: validity and reliability of the Croatian version. *Psychiatr Genet.* 2017 Feb;27(1):17–22.
7. Vuković D, Ogorevc M, Tripković I, Puizina-Ivić N, Saraga-Babić M, Mardešić S. The Distribution of Innervation and Immune Cell Infiltration Is Different in Genital and Extragenital Variants of Lichen Sclerosus. *Biomolecules.* 2022; 12(12):1767. <https://doi.org/10.3390/biom12121767>
8. Tripković, I.; Ogorevc, M.; Vuković, D.; Saraga-Babić, M.; Mardešić, S. Fibrosis-Associated Signaling Molecules Are Differentially Expressed in Palmar Connective Tissues of Patients with Carpal Tunnel Syndrome and Dupuytren's Disease. *Biomedicines* **2022**, *10*, 3214. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10123214>

