



Gdański Uniwersytet Medyczny

Lek. Berenika Olszewska

**Rola IL-31 i STAT w patogenezie CTCL
oraz towarzyszącego świądu.**

ROZPRAWA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Sokołowska -Wojdyło

Gdańsk 2021

Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Dermatologii, Wenerologii i Alergologii
oraz Katedrze i Zakładzie Patomorfologii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Składam serdeczne podziękowania

Mojemu Promotorowi, Pani Prof. dr. hab. med. Małgorzacie Sokołowskiej-Wojdyło za nieustanną motywację, wsparcie merytoryczne, wielką życzliwość oraz nieocenione zaangażowanie w stawianiu moich pierwszych naukowych kroków.

Kierownikowi Katedry i Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed, Panu Profesorowi Romanowi Nowickiemu za stworzenie wyjątkowych możliwości do rozwoju naukowego oraz motywację do pracy.

Zespołowi Katedry i Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii GUMed, w szczególności Pani Dr Jolancie Gleń i Pani Dr Monice Zablotnej za nieocenioną życzliwość, pomoc w realizacji badań oraz wsparcie merytoryczne.

Panu Profesorowi Wojciechowi Biernatowi i Zespołowi Katedry i Zakładu Patomorfologii GUMed, w szczególności Panu Dr Antonowi Żawrockiemu, Pani Dr Joannie Lakomy i Pani Dr Joannie Karczewskiej za ogromną pomoc w realizacji badań i wsparcie merytoryczne.

Panu Profesorowi Jerzemu Jankau i Zespołowi Kliniki Chirurgii Plastycznej GUMed, za życzliwość i wielką pomoc w realizacji badań.

Moim Najbliższym za codzienną motywację, nieustanne wsparcie w realizowaniu życiowych celów oraz niezachwianą wiarę we mnie.

Wszystkim tym, bez pomocy i wsparcia których praca ta nie mogłaby powstać.

Pracę tę dedykuję moim najdroższym Rodzicom

SPIS TREŚCI

WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY	7
WPROWADZENIE	8
CELE PRACY	11
MATERIAŁ I METODYKA BADAŃ	12
OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY	14
WNIOSKI	24
STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU ANGIELSKIM	26
WYKAZ CYTOWANEGO PIŚMIENNICTWA	41
PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD ROZPRAWY	46

WYKAZ ZASTOSOWANYCH SKRÓTÓW

AZS	atopowe zapalenie skóry
β -2-M	<i>beta-2-microglobulin</i> / beta-2-mikroglobulina
CD4	<i>cluster of differentiation 4</i> / antygen różnicowania komórkowego 4
CTCL	<i>Cutaneous T-cell Lymphoma</i> / Chłoniaki pierwotne skóry T-komórkowe
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> / test immunoenzymatyczny
HSCORE	<i>histoscore method</i>
IL-31	<i>interleukin 31</i> / interleukina 31
IL-31RA	<i>receptor IL-31 alpha</i> / receptor IL-31 alfa
JAK/STAT	<i>janus kinases/ signal transducer and activator of transcription proteins</i> kinaza Janusa/ białka przekazujące sygnał i aktywujące transkrypcję
LDH	<i>lactate dehydrogenase</i> / dehydrogenaza mleczanowa
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i> / kinaza białka aktywowanego mitogenem
MF	<i>Mycosis Fungoides</i> / ziarniniak grzybiasty
NRS	<i>numerical rating scale</i> / skala numeryczna
OSMR	<i>oncostatin M receptor</i> /podjednostka beta receptora dla onkostatyny M
PI3K/AKT	<i>phosphoinositide 3-kinase/ protein kinase B</i> 3-kinaza fosfatydyloinozytolu/ kinaza białkowa B
SS	Sézary syndrome/ zespół Sézary'ego
Th1	<i>T helper cells 1</i> / komórki T pomocnicze 1
Th2	<i>T helper cells 2</i> / komórki T pomocnicze 2
VAS	<i>visual analog scale</i> / wizualna skala analogowa

WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

Rozprawa doktorska została opublikowana w recenzowanych czasopismach naukowych w formie trzech spójnych tematycznie prac:

1. Olszewska B, Sokołowska-Wojdyło M, Lakomy J, Nowicki RJ. [The ambiguous pruritogenic role of interleukin-31 in cutaneous T-cell lymphomas in comparison to atopic dermatitis: a review.](#) Postepy Dermatol Alergol. 2020;37:319-325.
DOI: 10.5114/ada.2020.96260

Impact Factor 1,361; Punktacja MNiSW 70; kwartył dermatologia Q2

2. Olszewska B, Żawrocki A, Gleń J, Lakomy J, Karczewska J, Zabłotna M, Malek M, Jankau J, Lange M, Biernat W, Nowicki RJ, Sokołowska-Wojdyło M. [IL-31 is overexpressed in skin and serum in cutaneous T-cell lymphomas but does not correlate to pruritus.](#) Postepy Dermatol Alergol. – zaakceptowany do publikacji
DOI: 10.5114/ada.2020.100664

Impact Factor 1,361; Punktacja MNiSW 70; kwartył dermatologia Q2

3. Olszewska B, Żawrocki A, Lakomy J, Karczewska J, Gleń J, Zabłotna M, Malek M, Jankau J, Lange M, Biernat W, Nowicki RJ, Sokołowska-Wojdyło M. [Mapping signal transducer and activator of transcription \(STAT\) activity in different stages of mycosis fungoides and Sezary syndrome.](#) Int J Dermatol. 2020;59:1106-1112.
DOI: 10.1111/ijd.15036.

Impact Factor 2.067; Punktacja MNiSW 70; kwartył dermatologia Q2

Łączna punktacja cyklu publikacji: Impact Factor: **4.789**; punktacja MNiSW: **210**

STRESZCZENIE PRACY

WPROWADZENIE

Chłoniaki pierwotne skóry T-komórkowe (*Cutaneous T-cell Lymphoma*, CTCL) tworzą niejednorodną grupę złośliwych rozrostów limfoproliferacyjnych różniących się obrazem klinicznym, histopatologicznym oraz rokowaniem [4]. Najczęstsza postać CTCL to ziarniniak grzybiasty (ang. *Mycosis Fungoides*, MF) o przewlekłym, powolnym przebiegu. Z kolei zespół Sézary'ego (ang. *Sézary Syndrome*, SS) jest agresywnym wariantem CTCL, na który składa się triada objawów: erythrodermia, limfadenopatia i odczyn białaczkowy we krwi [4]. Charakterystycznym objawem powyższych chorób jest świąd skóry występujący u 66% do 88% pacjentów, niejednokrotnie poprzedzający wystąpienie zmian skórnych [5,6]. Przewlekły i uporczywy charakter świądu występujący u większości pacjentów z CTCL, który w ograniczonym stopniu reaguje na leki przeciwhistaminowe, nakazuje poszukiwanie innych mediatorów biorących udział w indukcji świądu.

Patogeneza CTCL nadal pozostaje niejasna, przy czym wskazuje się na kluczową rolę czynników genetycznych, immunologicznych i środowiskowych. Chłoniaki skóry T-komórkowe wywodzą się ze skórnych limfocytów T pamięci CD4+CD45RO+ [7]. Podstawową rolę w patogenezie CTCL odgrywają limfocyty T CD4+ oraz produkowane przez nie cytokiny i czynniki wzrostu, które wpływając na keratynocyty oraz komórki dendrytyczne powodują stan zapalny skóry, jednocześnie indukując limfoproliferację [7]. Obecnie podkreśla się istotną rolę komórek mikrośrodowiska skóry w rozwoju i progresji CTCL. Progresji MF towarzyszy charakterystyczna zmiana fenotypu cytokin z Th1 na Th2 determinujących rodzaj odpowiedzi immunologicznej [7]. Przewaga cytokin profilu Th2 nad Th1 w środowisku skóry jest odpowiedzialna za hamowanie odpowiedzi przeciwnowotworowej, proliferację komórek nowotworowych i ich ucieczkę przed hamującym działaniem układu immunologicznego [7]. Wydaje się zatem, że badania nad nowymi cytokinami mogą stanowić istotny wkład w poznanie patogenezy CTCL jak również towarzyszącego im świądu.

Interleukina 31 (IL-31) jest prozapalną cytokiną wytwarzaną głównie przez aktywowane limfocyty T CD4+, działa poprzez receptor alfa IL-31 (IL-31RA) oraz podjednostkę beta receptora dla onkostatyny M (OSMR) na drodze trzech szlaków sygnałowych: MAPK, PI3K/AKT i JAK/STAT [8-10]. IL-31 jest jedną z cytokin odpowiedzialnych za świąd w atopowym zapaleniu skóry (AZS) [11-13]. W przeciwieństwie

do AZS dane z piśmiennictwa dotyczące roli IL-31 w wywoływaniu świądu towarzyszącego chłoniakom skóry, jak i roli w patogenezie choroby są niejednoznaczne. IL-31 wiązana jest również z indukcją procesów zapalnych, przy czym „środowisko” zapalne skóry wywoływane przez przewlekłą stymulację antygenową uważane jest za potencjalny czynnik przyczyniający się do rozwoju i klonalnej proliferacji nowotworowych limfocytów T [7,14]. Wysokie stężenia IL-31 obserwowane w AZS charakteryzującym się przewlekłym stanem zapalnym skóry oraz intensywnym świądem zachęca do poszukiwania potencjalnego związku między IL-31 a rozwojem chłoniaków skóry, jak i udziałem tej cytokiny w wywoływaniu świądu w CTCL.

Obok niewątpliwej roli cytokin coraz większą rolę w patogenezie CTCL przypisuje się zaburzeniom ścieżki sygnałowej Jak/STAT. Białka STAT (ang. *signal transducer and activator of transcription*) to czynniki transkrypcyjne, które w odpowiedzi na pobudzenie błonowych receptorów dla np. cytokin umożliwiają przekazywanie sygnału do odpowiednich obszarów DNA powodując tym samym transkrypcję wybranych genów [15]. Białka STAT regulują ekspresję genów odpowiedzialnych za podstawowe procesy komórkowe w tym przeżycie komórek, odpowiedź immunologiczną, stan zapalny, proliferację, angiogenezę, ale również chemiooporność komórek nowotworowych [15,16]. Wykazano, iż zaburzenia ścieżki sygnałowej STAT przyczyniają się do rozwoju przewlekłych chorób zapalnych oraz nowotworowych [15-17]. Konstytutywną aktywację szlaku sygnałowego białek STAT zaobserwowano również w CTCL [18-21]. Wykazano, że białka STAT pośredniczą w procesach zapalnych, ale również w proliferacji i apoptozie komórek nowotworowych, przyczyniając się do onkogenezy [15,16]. Co więcej, deregulacja sygnalizacji STAT w CTCL wydaje się być odpowiedzialna za zmianę profilu cytokin Th1 na Th2 w mikrośrodowisku skóry [18], które przyczyniają się do tłumienia odpowiedzi przeciwnowotworowej, proliferacji komórek złośliwych i utraty nadzoru immunologicznego. W grupie białek STAT na szczególną uwagę zasługują najszerzej badane w CTCL białka STAT3 oraz STAT5, które powodują zwiększone przeżycie i oporność na apoptozę komórek nowotworowych, tym samym odpowiadają za progresję CTCL [21-23]. Udowodniono konstytutywną aktywację STAT5 we wczesnych stadiach CTCL, która w sposób pośredni powoduje utratę ekspresji STAT4 tym samym zmieniając fenotyp cytokin z Th1 na Th2 [24]. Również białko STAT6 jest szczególnie interesujące ze względu na rolę w różnicowaniu limfocytów T w kierunku limfocytów Th2 [25], które dominują nad limfocytami Th1 w zaawansowanych stadiach CTCL. Tym samym deregulacja STAT6 stanowi kolejny potencjalny czynnik mogący przyczyniać się do progresji CTCL. Niewątpliwym udziałem zaburzonej funkcji szlaku STAT w

patogenezie różnych nowotworów oraz prozapalne właściwości IL-31 i jej rola w wywoływaniu świądu w AZS wskazują na ich potencjalne znaczenie w patogenezie CTCL oraz towarzyszącego tej chorobie świądu.

CELE PRACY

1. Ocena częstości występowania świądu u chorych z CTCL oraz AZS
2. Porównanie poziomu IL-31 w surowicy krwi, ekspresji IL-31 i receptora IL-31 w skórze u chorych z CTCL, AZS i kontrolnej grupie osób zdrowych.
3. Ocena zależności między stężeniem IL-31 w surowicy krwi/ ekspresją IL-31 i receptora IL-31 w skórze, a nasileniem świądu u pacjentów z CTCL.
4. Ocena związku między stężeniem IL-31 w surowicy krwi/ ekspresją IL-31 i receptora IL-31 w skórze, a zaawansowaniem choroby u pacjentów z CTCL.
5. Ocena zależności między ekspresją STAT3, STAT5a, STAT5b, STAT6 w skórze a zaawansowaniem choroby oraz świądem u pacjentów z CTCL.

MATERIAŁ I METODYKA

Badaniem nad IL-31 i receptorem IL-31 objęto 42 chorych na chłoniaki pierwotne skóry T-komórkowe (MF i SS) pozostających pod opieką Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku, uwzględniając przyjęte kryteria włączenia i wyłączenia [2,3]. Z uwagi na uszkodzenie materiału tkankowego (biopaty) podczas badań - grupa pacjentów z CTCL wyniosła ostatecznie 39 osób w badaniu białek STAT. Stadium zaawansowania CTCL zostało ocenione zgodnie z klasyfikacją TNMB według ISCL/EORCT. Grupę kontrolną stanowiło 20 chorych na AZS pozostających pod opieką Kliniki Dermatologii, Wenerologii i Alergologii w Gdańsku oraz 24 zdrowych niespokrewnionych ochotników bez chłoniaków pierwotnych skóry, AZS oraz innych nowotworowych i przewlekłych zapalnych chorób skóry w wywiadzie, hospitalizowanych w Klinice Chirurgii Plastycznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. W grupie osób z CTCL oraz AZS oceniono nasilenie świądu na podstawie skali numerycznej- Numerical Rating Scale (NRS) i skali wzrokowo- analogowej- Visual Analog Scale (VAS).

Pomiaru stężenia IL-31 w surowicy krwi chorych z CTCL, AZS oraz zdrowych ochotników dokonano za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA). Ekspresję IL-31 oraz receptora IL-31 (IL-31RA i OSMR) w skórze zmienionej chorobowo u chorych z CTCL, AZS oraz w skórze niezmienionej osób zdrowych oceniono z zastosowaniem metody immunohistochemicznej. Ekspresję białek STAT3, STAT5a, STAT5b oraz STAT6 w skórze zmienionej chorobowo osób z CTCL oraz w skórze niezmienionej osób zdrowych również oznaczono metodą immunohistochemiczną. Barwienia immunohistochemiczne wykonano na skrawkach tkankowych bloczków parafinowych przy użyciu przeciwciał wykrywających antygeny: IL-31, IL-31RA, OSMR, STAT3, STAT5a, STAT5b, STAT6.

Barwienia immunohistochemiczne 7 przeciwciał przeprowadzono w odrębnych biopsjach skórnych pobranych od pacjentów z CTCL (282 wybarwione skrawki skóry pacjentów CTCL) oraz zdrowych ochotników (168 wybarwionych skrawków skóry zdrowych ochotników), jak również barwienia wykrywające 3 antygeny w biopsjach skórnych uzyskanych od pacjentów z AZS (60 wybarwionych skrawków skóry pacjentów z AZS). W rezultacie analizie poddano 510 wybarwionych skrawków skórnych. Do oceny ekspresji badanych białek posłużono się metodą półilościową (ang. *histoscore method*, *HSCORE*). Barwienia skóry doktorantka wykonała samodzielnie pod nadzorem doświadczonego patologa.

Statystyczne opracowanie wyników przeprowadzono za pomocą programu STATISTICA z użyciem odpowiednich testów w zależności od charakteru rozkładu uzyskanych danych.

Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej uzyskały akceptację Niezależnej Komisji Bioetycznej przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (nr zgody NKBBN/86-218/2018). Wszyscy uczestnicy wyrazili świadomą, pisemną zgodę na udział w badaniu.

Wyniki pracy doktorskiej na kolejnych etapach jej realizacji prezentowano podczas konferencji krajowych i zagranicznych:

- prezentacja pracy pt., „Significance of IL-31 expression in skin and in serum in pathogenesis of CTCLS and in pathomechanism of accompanying pruritus” w formie plakatowej podczas 3rd World Congress of Cutaneous Lymphomas, New York, USA, 26-28.10. 2016

- prezentacja pracy pt., „Significance of IL-31 expression in skin and in serum in pathomechanism of pruritus in CTCLS” w formie plakatowej podczas 9th World Congress on Itch, Wrocław, 15-17.10.2017

OMÓWIENIE PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

Na rozprawę doktorską składają się: artykuł poglądowy stanowiący wprowadzenie do tematyki immunologii i świądu w aspekcie roli IL-31 w chłoniakach pierwotnych skóry z komórek T (CTCL) oraz dwie publikacje oryginalne, w których przedstawiono wyniki badań nad interleukiną-31 (IL-31) i jej receptorem oraz wybranymi białkami transdukcji sygnału (STAT) w CTCL.

W pracy poglądowej pt.: „**The ambiguous pruritogenic role of interleukin-31 in cutaneous T-cell lymphomas in comparison to atopic dermatitis: a review**” opublikowanej w *Advances in Dermatology and Allergology* (Postępowach Dermatologii i Alergologii) w 2020 roku przedstawiono podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat roli IL-31 w świądzie w AZS, przy czym skupiono się na analizie doniesień literaturowych dotyczących roli IL-31 w świądzie towarzyszącym CTCL oraz potencjalnego związku tej cytokiny z patogenezą samej choroby.

CTCL reprezentuje heterogenną grupę złośliwych rozrostów limfoproliferacyjnych wywodzących się z komórek pamięci T CD4+ [4]. Bardzo częstym objawem towarzyszącym CTCL jest świąd skóry, który jest przewlekły i uporczywy. Co więcej, leki przeciwhistaminowe są zwykle mało skuteczne, gdyż histamina w tym wypadku nie jest kluczowym mediatorem świądu [26]. Patogeneza chłoniaków skórnych, jak i towarzyszącego im świądu nadal nie jest w pełni poznana. Wskazuje się na złożoność procesów immunologicznych oraz skomplikowaną sieć wzajemnych oddziaływań komórek mikrośrodowiska skóry, które najpewniej przyczyniają się do proliferacji nowotworowych limfocytów m.in. poprzez utratę nadzoru immunologicznego skóry nad nowotworem [7].

Cytokina IL-31 odkryta w 2006 roku, produkowana między innymi przez limfocyty Th2, ze względu na swoje plejotropowe funkcje stała się obiektem wielu badań [8], szczególnie w chorobach zapalnych z dominującym fenotypem Th2 limfocytów [27]. Pierwsze badania przeprowadzane na myszach transgenicznym stanowiących zwierzęce modele AZS wykazały prozapalne działanie IL-31 oraz jej związek z indukcją świądu [28,29]. Na podstawie licznych analiz ekspresji IL-31 w skórze i surowicy chorych na AZS ustalono istotną rolę tej cytokiny w patomechanizmie świądu w AZS [11-13]. Obiecujące wyniki w AZS stały się podstawą badań nad potencjalną rolą IL-31 w CTCL. Dotychczas ukazało się tylko kilka pozycji literaturowych zawierających wyniki badań nad IL-31 w CTCL [27,30-

34].

W omawianej publikacji zawarto wyniki przeprowadzonego przeglądu systematycznego dostępnej literatury na temat związku IL-31 ze świądem towarzyszącym CTCL oraz z zaawansowaniem choroby. Proces rewizji piśmiennictwa zgodnie z kryteriami PRISMA przedstawiono w formie graficznej za pomocą diagramu (rycina 1) [1]. Z uwagi na podobieństwo AZS oraz CTCL, przejawiające się w obrazie klinicznym i procesach immunologicznych obu chorób oraz udowodnioną rolę IL-31 w świądzie w AZS, w pracy zawarto również analizę literatury dotyczącej AZS. W pierwszym etapie pracy omówiono rolę IL-31 w patomechanizmie świądu posługując się formą graficzną (rycina 2) [1]. Następnie kolejno szczegółowo przedstawiono doniesienia literaturowe na temat dotychczasowych ustaleń dotyczących funkcji IL-31 w AZS i CTCL. Analiza potwierdziła zgodność większości wyników badań wykazujących niewątpliwą rolę IL-31 w patogenezie świądu w AZS. Ponadto zwrócono uwagę na wyniki badań potwierdzające korelację ekspresji IL-31 nie tylko z nasileniem świądu, ale również z nasileniem AZS co sugeruje prozapalną i immunomodulującą rolę IL-31. Analiza piśmiennictwa dotyczącego CTCL wykazała rozbieżności w wynikach dotyczących zarówno związku między IL-31 a świądem jak i zaawansowaniem chłoniaków, przy czym wszystkie doniesienia naukowe zgodnie podają nadekspresję IL-31 w CTCL w porównaniu z poziomem ekspresji w grupie kontrolnej osób zdrowych. Podsumowanie wniosków z badań nad IL-31 w CTCL przedstawiono w formie tabeli (tabela 1) [1]. W ostatnim etapie niniejszej pracy zwrócono uwagę na obiecujące wnioski płynące z przeanalizowanego piśmiennictwa wskazujące na plejotropową aktywność IL-31. Mimo opisywanej nadekspresji IL-31 w CTCL jej potencjalna rola w indukcji świądu bądź stanu zapalnego a tym samym w patogenezie choroby pozostaje niejasna. We wnioskach podkreślono, że IL-31 jest obiecującą cytokiną, szczególnie w dobie leków biologicznych/celowanych stosowanych coraz powszechniej w dermatologii (anty-TNF, anty-IL17, anty-IL12/23 w chorobach zapalnych czy anty-CD20 w chłoniakach B-komórkowych). Niezbędne są dalsze badania, aby w pełni wyjaśnić jej znaczenie.

Wkład doktorantki w powstanie publikacji: tworzenie koncepcji pracy; zbiór i analiza piśmiennictwa; tworzenie rycin oraz redagowanie manuskryptu

Praca oryginalna pt. „**IL-31 is overexpressed in skin and serum in cutaneous T-cell lymphomas but does not correlate to pruritus**”, przyjęta do publikacji w 2020 roku do *Advances in Dermatology and Allergology* (Postępów Dermatologii i Alergologii), przedstawia wyniki analizy stężenia IL-31 w surowicy oraz ekspresji IL-31 i jej receptora (dwie podjednostki IL-31RA oraz OSMR) w skórze osób chorych na chłoniaki pierwotne skóry z komórek T. Podjęto również próbę ustalenia ewentualnego związku między ekspresją wyżej wymienionej cytokiny a nasileniem świądu i stopniem zaawansowania choroby. Ekspresję IL-31 oraz jej receptora u pacjentów z CTCL porównywano z ekspresją w grupach kontrolnych pacjentów z atopowym zapaleniem skóry oraz osobami zdrowymi.

W pierwszym etapie pracy oceniono częstość występowania świądu w badanych grupach. Zaobserwowano, iż więcej pacjentów z AZS odczuwało świąd skóry w porównaniu z chorymi na CTCL. Mediana intensywności odczuwanego świądu u chorych z AZS była istotnie wyższa niż u chorych z CTCL. Ponadto, nasilenie świądu było większe u pacjentów z CTCL w zaawansowanym stadium w porównaniu do pacjentów we wczesnym stadium choroby, przy czym różnica nie była istotna statystycznie. Otrzymane wyniki są zgodne z dostępnymi danymi literaturowymi potwierdzającymi, że świąd jest charakterystyczny zarówno dla CTCL jak i jest jedną z cech definiujących AZS.

W drugim etapie pracy oceniono poziom IL-31 w surowicy w badanych grupach oraz zależności między analizowanymi zmiennymi. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano istotnie wyższe stężenie IL-31 w surowicy krwi osób chorych na CTCL oraz AZS w porównaniu z surowicą krwi osób zdrowych, przy czym stężenie IL-31 w surowicy osób z AZS było istotnie wyższe w porównaniu z poziomem tej cytokiny w CTCL. Powyższe wyniki zilustrowano wykresem (rycina 1) [2] i tabelą (tabela 1) [2] przedstawiającymi wartości stężenia IL-31 w surowicy krwi w badanych grupach. Nie stwierdzono różnic w stężeniach cytokiny w surowicy w grupie osób w zaawansowanym stadium w porównaniu z wczesnym stadium CTCL. Ponadto nie wykazano różnicy w stężeniu IL-31 w surowicy między grupą CTCL ze świądem a grupą bez świądu. Poziom cytokiny we krwi chorych z CTCL nie korelował z nasileniem świądu ocenianym wg skali VAS oraz NRS, podczas gdy poziom IL-31 w surowicy chorych z AZS istotnie dodatnio korelował z nasileniem świądu. Stężenie IL-31 we krwi chorych na CTCL nie korelowało również ze stopniem zaawansowania choroby.

W części „dyskusja” odnoszącej się do przedstawionych badań przeanalizowano dostępne piśmiennictwo w ich kontekście. Dostępne publikacje na temat IL-31 w zdecydowanej większości poświęcone są AZS i bezsprzecznie wskazują na udział cytokiny w patomechanizmie świądu w tej dermatozie. Dane literaturowe odnoszące się do roli IL-31 w

chłoniakach pierwotnych skóry z komórek T są bardzo ograniczone, dostępnych jest zaledwie 6 publikacji podczas gdy tylko jedna analizuje poziom IL-31 i jej receptora w skórze [27,30-34]. Prezentowane wyniki są niezwykle rozbieżne zarówno w kontekście związku IL-31 ze świądem jak i z samą patogenezą choroby. Część prac potwierdza korelację poziomu IL-31 z nasileniem świądu lub wykazuje wyższy poziom w ciężkim nasileniu świądu niż lekkim, należy jednak mieć na uwadze ograniczenia wspomnianych publikacji m.in. nieliczne grupy badane [32-34]. Jednocześnie inne prace negują związek IL-31 ze świądem [27,30]. Wyniki prezentowane w publikacjach nie są też zgodne co do roli IL-31 w patogenezie CTCL. Część prac sugeruje zależność między stadium choroby a poziomem IL-31 [30,31], inne prace zdecydowanie negują taki związek [32-34]. Nie mniej jednak wszystkie dostępne publikacje podkreślają istotnie wyższy poziom IL-31 u chorych na chłoniaki skórne T-komórkowe w porównaniu z grupą kontrolną osób zdrowych.

Niniejsza praca jako pierwsza ocenia stężenie IL-31 w surowicy krwi oraz ekspresję IL-31 i jej receptora w skórze chorych z CTCL w porównaniu do stężenia w surowicy i ekspresji w skórze pacjentów z AZS oraz osób zdrowych. Podjęto próbę porównania ekspresji IL-31 w CTCL oraz AZS z uwagi na udowodnioną rolę tej cytokiny w patogenezie świądu w AZS.

Na podstawie otrzymanych wyników wykluczających korelację stężenia IL-31 w surowicy z zaawansowaniem CTCL przy jednoczesnym znaczącym podwyższeniu stężenia w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych, wysunięto wniosek, że IL-31 odgrywa rolę w patogenezie choroby, przy czym zdaje się nie przyczyniać do progresji CTCL. W publikacji zwrócono również uwagę na brak korelacji stężenia IL-31 w surowicy krwi z nasileniem świądu wg skali NRS i VAS u chorych z CTCL przy jednoczesnym potwierdzeniu korelacji w AZS. W prezentowanej pracy wysunięto wniosek, iż otrzymane wyniki mogłyby potwierdzać hipotezę zaproponowaną przez Nobbe i wsp. o roli IL-31 w indukcji świądu, która jest swoista tylko dla AZS a nie dla wszystkich dermatoz [27]. Zwrócono jednak uwagę na konieczność weryfikacji tych wniosków poprzez przeprowadzenie dalszych badań porównujących stężenia IL-31 w innych dermatozach świądowych oraz na większej grupie badanej.

Z uwagi na podstawową rolę immunohistochemii wycinków skórnych w diagnostyce histopatologicznej chłoniaków skórnych w ostatnim etapie pracy podjęto się oceny ekspresji IL-31 oraz receptora dla IL-31 w tkankach skórnych pobranych od chorych na chłoniaki skórne. Do badania pobrano również wycinki od pacjentów z pozostałych grup: ze zmian skórnych chorych z AZS oraz wycinki skóry zdrowej w grupie kontrolnej. Uzyskane wyniki

przedstawiono w formie tabeli (tabela 1) [2]. Wykazano słabo dodatnią ekspresję IL-31 wraz z receptorem dla IL-31 ograniczoną do naskórka oraz brak ekspresji w skórze właściwej oprócz zabarwienia przydatków skóry w wycinkach pobranych od osób zdrowych. Natomiast ekspresja IL-31 oraz receptora występowała w naskórku i nacieku limfocytarnym skóry właściwej zarówno w CTCL jak i AZS. W publikacji zamieszczono obrazy mikroskopowe prezentujące ekspresję cytokiny i receptora w skórze w badanych grupach pacjentów (rycina 2) [2].

W uzyskanych wynikach wykazano istotnie wyższą ekspresję IL-31 i jej receptora w AZS i CTCL w skórze w porównaniu z grupą kontrolną, co było zgodne z obserwacjami zawartymi we wcześniejszych publikacjach [11,27]. Przeprowadzając dalszą analizę porównawczą między CTCL a AZS stwierdzono wyższą ekspresję IL-31 w naskórku i istotnie wyższą w nacieku limfocytarnym w skórze właściwej w CTCL w porównaniu z AZS. Analiza obecności receptora IL-31RA wykazała jego wyższą ekspresję we fragmentach skóry z AZS niż z CTCL, przy czym różnica w poziomie była istotna tylko w nacieku limfocytarnym skóry właściwej. Analiza ekspresji podjednostki OSMR receptora dla IL-31 w naskórku i skórze właściwej nie wykazała istotnych różnic między CTCL a AZS. Podkreślono, że wyniki są sprzeczne z rezultatami badania przeprowadzonego przez Nobbe i wsp., które wykazało istotnie wyższy poziom ekspresji IL-31 w AZS w porównaniu do innych dermatoz m.in MF, przy czym grupa badana była tu stosunkowo mała (5 osób z MF, 5 osób z AZS) [27].

Analogicznie do wyniku korelacji IL-31 w surowicy z nasileniem świądu nie odnotowano również korelacji między ekspresją ww. cytokiny i receptora w skórze a nasileniem świądu u chorych z CTCL. Na podstawie otrzymanych danych wysunięto wniosek, że IL-31 nie jest główną cytokiną biorącą udział w wywoływaniu świądu w CTCL a raczej może ona działać przez inne mediatory świądu.

W pracy ponadto wykazano odwrotną korelację między ekspresją IL-31 w nacieku limfocytarnym w skórze właściwej a stadium CTCL. Jednocześnie zaobserwowano odwrotną korelację między poziomem IL-31RA w naskórku a stadium CTCL. W pracy omówiono możliwe przyczyny zaobserwowanych korelacji oraz różnic w ekspresji IL-31 i receptora w CTCL opierając się na wynikach badań z dostępnych publikacji. Otrzymane dane mogą wynikać z faktu, iż w zaawansowanych stadiach CTCL dominujący nacieki nowotworowych limfocytów-T w skórze może tłumić funkcjonowanie prawidłowych limfocytów T oraz pozostałych komórek będących źródłem IL-31, co doprowadza do spadku IL-31 i w konsekwencji jej receptora. Z ostrożnością podjęto interpretację otrzymanych wyników

wskazując na skomplikowane relacje między cytokinami, białkami mikrośrodowiska skóry, które warunkowane są nowotworowym charakterem choroby, co stanowi niewątpliwą przyczynę zaobserwowanych różnic w ekspresji IL-31 między CTCL a AZS.

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań, zwłaszcza istotnie wyższej ekspresji IL-31 w skórze i surowicy w CTCL w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych, braku korelacji IL-31 w CTCL a nasileniem świądu i korelacją IL-31 ze stadium choroby, wysunięto wniosek, że IL-31 wydaje się pełnić nadrzędną funkcję w patogenezie choroby a nie odgrywa istotnej roli w indukcji samego świądu w przebiegu CTCL. Zasugerowano również rolę IL-31 w patomechanizmie świądu swoistą dla AZS a nie CTCL. Podkreślono konieczność prowadzenia dalszych badań zmierzających do identyfikacji nowych cytokin oraz występujących między komórkami zależności.

Wkład doktorantki w powstanie publikacji: tworzenie koncepcji pracy oraz opracowanie metodyki; koordynacja projektu; udział w rekrutacji do grup badanych i kontrolnej; zbieranie wywiadu medycznego oraz przeprowadzanie badania fizykalnego; pozyskiwanie materiału badawczego (próbek krwi i pobieranie wycinków skóry); prowadzenie badań laboratoryjnych i zbior danych; stworzenie bazy danych; analiza zebranych danych i przygotowanie rycin; analiza piśmiennictwa; napisanie pierwotnej wersji manuskryptu; udział w redagowaniu pracy zgodnie z zaleceniami recenzentów i redakcji; pełnienie funkcji autora odpowiedzialnego za korespondencję z redakcją.

W pracy oryginalnej pt. „**Mapping signal transducer and activator of transcription (STAT) activity in different stages of mycosis fungoides and Sezary syndrome**” opublikowanej w 2020 roku w czasopiśmie „International Journal of Dermatology”, podjęto próbę analizy ekspresji białek STAT (ang. Signal transducer and activation of transcription) w skórze osób chorych na chłoniaki pierwotne skóry T- komórkowe. Oceniono również związek między ekspresją białek STAT3, STAT5a, STAT5b, STAT6 a czynnikami klinicznymi takim jak zaawansowanie CTCL, nasilenie świądu oraz markerami prognostycznymi takimi jak dehydrogenaza mleczanowa (LDH) i beta-2-mikroglobulina (β -2-M).

W pierwszym etapie pracy celem określenia ekspresji białek STAT ocenie immunohistochemicznej poddano naskórek osób zdrowych oraz naskórek zmieniony chorobowo pobrany od pacjentów z CTCL. Odnotowano aktywność wszystkich badanych białek STAT zarówno w naskórku osób zdrowych jak i pacjentów z CTCL, barwienie

immunohistochemiczne wykazywało odczyn jądrowo- cytoplazmatyczny o różnej sile w zależności od badanego białka. Nie zaobserwowano znaczących różnic w ekspresji białek STAT w naskórku między badanymi grupami i z tego względu odstąpiono od analizy ekspresji w naskórku metodą HSCORE, skupiając się na ocenie aktywności białek w nacieku limfocytarnym w skórze właściwej. Z przeprowadzonej analizy obrazów mikroskopowych w skórze zdrowej wynika, że białka STAT są odpowiedzialne za prawidłowe fizjologiczne funkcjonowanie komórek nabłonkowych, co potwierdzają również inne publikacje [35].

Na podstawie analizy ekspresji omawianych białek STAT w skórze zaobserwowano różnice w nacieku zapalnym w skórze właściwej między grupą chorych na CTCL a grupą kontrolną, która nie wykazywała występowania białek STAT. Analizę ekspresji badanych białek przeprowadzono z podziałem na stopień zaawansowania CTCL według klasyfikacji TNMB (4 stadia) oraz wg podziału na wczesny CTCL i zaawansowany CTCL, wykazując istotne różnice w ekspresji białek STAT w obrębie poszczególnych stadiów choroby. W publikacji zamieszczono obrazy mikroskopowe barwienia immunohistochemicznego prezentujące ekspresję białek STAT w skórze w zależności od zaawansowania CTCL (rycina 1) [3].

Analiza występowania białek STAT w zależności od stadium CTCL wykazała istotne różnice w ekspresji białek w stadium I oraz II, podczas gdy w pozostałych stadiach różnice nie były znaczące. Wykazano istotnie niższy poziom STAT3 w stadium I w porównaniu do pozostałych białek STAT, natomiast w stadium II poziom STAT5a w skórze był zdecydowanie wyższy niż pozostałych białek. Stadia zaawansowane CTCL (III i IV) charakteryzowały się podobną tendencją wyższego poziomu STAT5a, STAT5b oraz STAT6 niż STAT3. Uzyskane wyniki przedstawiono w formie graficznej za pomocą wykresów (rycina 2) [3]. Przeprowadzając dalszą analizę nie wykazano istotnej różnicy w ekspresji STAT3 między stadium zaawansowanym a wczesnym CTCL. W publikacji omówiono dane literaturowe wskazujące na rolę STAT3 w patogenezie CTCL i podkreślające nadekspresję białka w stadiach zaawansowanych choroby [36]. Analizie poddano możliwe przyczyny obserwowanych różnic w stosunku do danych literaturowych, zwracając uwagę na limfocyty zapalne, które obok limfocytów nowotworowych mogą być źródłem stosunkowo wysokiej aktywności STAT3 we wczesnych stadiach CTCL.

Ponadto w badanej grupie CTCL zaobserwowano najwyższą ekspresję STAT5a spośród białek STAT oraz wykazano wyższy poziom STAT5a w stadiach wczesnych niż zaawansowanych, co było zgodne z obserwacjami zawartymi we wcześniejszych publikacjach [19]. Analiza ekspresji białek między stadium wczesnym a zaawansowanym

CTCL wykazała różnicę istotną statystycznie jedynie w poziomie białka STAT5b. W publikacji zwrócono również uwagę na ujemną korelację ekspresji STAT5b i stadium zaawansowania CTCL, co do tej pory nie zostało odnotowane w dostępnych publikacjach. Otrzymane wyniki odniesiono do danych literaturowych wskazując na odmienne, nie w pełni poznane funkcje białek STAT5a i STAT5b [37-39]. Zwrócono również uwagę na brak wcześniejszych badań porównujących aktywność obu tych białek w CTCL. W pracy przytoczono nieliczne pozycje piśmiennictwa dotyczące STAT5b gdzie niedobór białka wiązał się z prezentacją cech, które są charakterystyczne dla zaawansowanych stadiów CTCL [40,41]. Obserwowany spadek ekspresji STAT5b w grupie pacjentów z zaawansowanym CTCL wydaje się potwierdzać powyższą zależność a tym samym potencjalnie może przyczyniać się do progresji choroby. W dyskusji zaznaczono, iż wyniki badania prezentujące nadekspresję STAT5a oraz STAT5b są zgodne z dotychczasowymi doniesieniami o znaczącej roli białka STAT5 w patogenezie CTCL [19,42]. Otrzymane wyniki zwracają również uwagę na istotną rolę w patogenezie choroby, nie tylko nadmiernie wysokiego poziomu białek STAT, ale również ich zmniejszonej lub zahamowanej ekspresji.

W toku dalszej analizy wykazano wysoką ekspresję STAT6 w CTCL, ponadto nie odnotowano istotnych różnic w poziomie STAT6 między wczesnymi a zaawansowanymi przypadkami CTCL. W pracy odniesiono się do danych literaturowych dotyczących szczególnie interesującej roli białka STAT6 w promowaniu fenotypu Th2 [24,25], jednocześnie podkreślono, iż deregulacja tego białka może uczestniczyć w progresji CTCL. Zwrócono również uwagę, że nadekspresja STAT6 we wczesnym stadium mogłaby wiązać się z ryzykiem progresji, jednak potwierdzenie tych wniosków wymagałoby dalszych badań obserwacyjnych.

Następnie przeprowadzono analizę zależności między zajęciem węzłów chłonnych lub krwi obwodowej przez proces chorobowy w CTCL a ekspresją białek STAT. Nie wykazano istotnych różnic w ekspresji STAT między grupą z zajęciem węzłów chłonnych/krwii obwodowej a grupą wolną od tych zmian. Wyniki sugerują, iż pojedyncze, konkretne białko STAT wydaje się nie przyczyniać do zajęcia narządów przez proces chorobowy. Zwrócono uwagę na ograniczenia badania polegające na niewielkiej liczebności grupy z zajęciem narządowym w stosunku do grupy bez zmian narządowych a w związku z tym konieczności ostrożnej interpretacji otrzymanych wyników, przy czym podkreślono zasadność kontynuowania badań na większej i bardziej zróżnicowanej grupie chorych.

Podjęto się również określenia potencjalnego związku ekspresji białek STAT ze świądem oraz markerami prognostycznymi takimi jak LDH oraz β -2-M. Nie odnotowano

zależności między ekspresją badanych białek STAT a występowaniem świądu oraz jego nasileniem. W dyskusji podkreślono, że brak takich korelacji może wynikać z faktu, iż świąd jest efektem skomplikowanych zależności między licznymi mediatorami m.in. cytokinami, przy czym nie jest wynikiem nadekspresji pojedynczego białka STAT. Przytoczono również wyniki badania w AZS wskazującego na wywoływanie świądu poprzez cytokiny działające przy udziale STAT3 [43]. Zwrócono uwagę na fakt, iż deregulacja białek STAT również w CTCL potencjalnie może indukować produkcję mediatorów świądu zależnych od STAT, podkreślono jednak konieczność kontynuacji badań celem potwierdzenia tej hipotezy.

W toku dalszych badań nie wykazano istotnych różnic w ekspresji poszczególnych białek STAT między grupami CTCL z nieprawidłowym LDH oraz grupą z nieprawidłową β -2-M a grupami z prawidłowymi wartościami markerów. Nie odnotowano również korelacji między konkretnymi białkami STAT a badanymi podwyższonymi markerami prognostycznymi. Przeanalizowano również dostępne dane literaturowe podkreślające, że nieprawidłowe wartości LDH oraz β -2-M są uważane za markery agresywnego przebiegu CTCL, ponadto wysokie LDH wiązane jest z zajęciem narządów wewnętrznych i gorszym przeżyciem chorych [44]. Wynik przeprowadzonych badań wskazują na brak zależności między białkami STAT a nieprawidłowymi LDH/ β -2-M, przy czym ujemna korelacja ekspresji STAT5B ze stadium choroby może wskazywać na rolę tego białka jako potencjalnego, niezależnego od LDH i β -2-M markera progresji choroby.

Na podstawie badań wyciągnięto wniosek, że zwiększona ekspresja badanych białek STAT5a, STAT5b, STAT6 oraz STAT3 w skórze chorych na CTCL wskazuje na ich rolę w patogenezie choroby, ale również jest odzwierciedleniem zmieniających się wraz z progresją choroby cytokin oraz czynników wzrostu. W oparciu o przytoczone w pracy dane literaturowe odnoszące się do roli poszczególnych białek STAT zasugerowano również, że spadek bądź brak ekspresji białek STAT może być potencjalnym czynnikiem odgrywającym rolę w zaawansowaniu choroby [18]. W podsumowaniu pracy zwrócono uwagę na możliwą terapeutyczną rolę inhibitorów STAT5a ze względu na największą ekspresję spośród badanych białek STAT w CTCL. Ostatnie badania wskazują na istotną rolę deregulacji białek STAT5 w patogenezie MF poprzez stymulowanie ekspresji onkogennego microRNA miR-155 [18,45]. Badania nad inhibitorem miR-155 (Cobomarsen), obecnie w badaniu klinicznym, wykazały, że hamuje on proliferację komórek i indukuje apoptozę w komórkach MF [45], tym samym potwierdzając potencjał terapeutyczny także inhibitorów STAT5. Podkreślono również, iż leczenie nastawione na przywrócenie funkcji STAT5b w

zaawansowanych stadiach CTCL mogłoby potencjalnie stanowić kolejny wariant terapeutyczny, jednak potwierdzenie tych hipotez wymaga dalszych poszerzonych badań.

Wkład doktorantki w powstanie publikacji: tworzenie koncepcji pracy oraz opracowanie metodologii; koordynacja projektu; udział w rekrutacji do grupy badanej i kontrolnej; zbieranie wywiadu medycznego oraz przeprowadzanie badania fizykalnego; pozyskiwanie materiału badawczego (próbek krwi i pobieranie wycinków skóry); prowadzenie badań laboratoryjnych i zbior danych; stworzenie bazy danych; analiza zebranych danych i przygotowanie rycin; analiza piśmiennictwa; napisanie pierwotnej wersji manuskryptu; udział w redagowaniu pracy zgodnie z zaleceniami recenzentów i redakcji; pełnienie funkcji autora odpowiedzialnego za korespondencję z redakcją.

WNIOSKI

1. Uzyskane wyniki wykazały, że świąd jest cechą towarzyszącą zarówno AZS jak i CTCL, przy czym świąd w AZS charakteryzuje się istotnie większą intensywnością w porównaniu do CTCL. Wydaje się zatem, że świąd nie jest czynnikiem pomocnym w różnicowaniu CTCL i AZS.
2. Zwiększony poziom IL-31 w surowicy oraz zwiększona ekspresja IL-31 i jej receptora w skórze chorych na CTCL oraz AZS w porównaniu do poziomu w surowicy i skórze grupy kontrolnej osób zdrowych wskazuje na zaangażowanie tej cytokiny w patogenezę obu chorób. Przy czym różnice w poziomach IL-31 w surowicy krwi oraz w skórze między AZS a CTCL zdają się być związane z odmiennym charakterem i przebiegiem obu chorób.
3. Brak korelacji między poziomem IL-31 w surowicy oraz ekspresją IL-31 wraz z jej receptorem w skórze a nasileniem świądu u chorych na CTCL sugeruje, iż IL-31 wydaje się nie odgrywać kluczowej roli w patogenezie świądu towarzyszącego CTCL. Istotnie wyższe stężenie IL-31 w surowicy krwi u osób chorych na AZS w stosunku do CTCL oraz wykazany związek z nasileniem świądu wskazuje na rolę IL-31 w patomechanizmie świądu swoistą dla AZS.
4. Brak korelacji poziomu IL-31 w surowicy krwi ze stadium zaawansowania CTCL przy jednoczesnym znaczącym podwyższeniu stężenia w porównaniu do grupy kontrolnej osób zdrowych może wskazywać na rolę tej cytokiny w patogenezie CTCL. Ujemna korelacja między ekspresją IL-31 oraz IL-31 RA w skórze a stadium zaawansowania CTCL zdaje się potwierdzać rolę tej cytokiny jako potencjalnego czynnika indukującego a nie przyczyniającego się do nasilenia choroby. Wydaje się zatem, że cytokina ta może stanowić punkt uchwytu dla nowych leków w terapii CTCL.

5. Zwiększona ekspresja białek STAT3, STAT5a, STAT5b, STAT6 w skórze chorych na CTCL w stosunku do grupy kontrolnej wskazuje, że białka te odgrywają rolę w patogenezie CTCL. Ujemna korelacja ekspresji STAT5b ze stadiem CTCL sugeruje, iż utrata aktywności białek STAT5b stanowi, obok nadekspresji białek STAT szczególnie STAT5a, czynnik biorący udział w patogenezie tego nowotworu. Wydaje się zatem, że białka te mogą stanowić potencjalny punkt uchwytu nowych metod leczenia CTCL.

Brak korelacji ekspresji poszczególnych białek STAT z występowaniem oraz nasileniem świądu towarzyszącego CTCL może wskazywać, iż jednostkowe białko STAT nie pełni kluczowej roli w patogenezie świądu.

STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU ANGIELSKIM

INTRODUCTION

Cutaneous T-cell lymphomas (CTCLs) comprise a heterogeneous group of malignant lymphoproliferative disorders that vary in clinical, histopathological picture and prognosis [4]. The most common subtype of CTCL is Mycosis fungoides (MF) characterized by an indolent, chronic course. On the other hand, Sézary syndrome (SS) is an aggressive variant of CTCL with a classical triad of erythroderma, lymphadenopathy and clonal neoplastic proliferation of T-cells in the blood [4]. Characteristic symptom of those diseases is pruritus that affects 66%- 88% of patients and can precede the onset of skin lesions [5,6]. The chronic and persistent nature of pruritus that affects majority of patients, which response to antihistamine drugs is rather limited, requires search for new mediators inducing pruritus.

The pathogenesis of CTCL also remains unclear, however the role of genetic, immunological and environmental factors is being emphasized. CTCL originate from skin memory T cells CD4 + CD45RO+ [7]. CD4+ T lymphocytes play a fundamental role in pathogenesis of CTCL. Cytokines and growth factors that they express induce keratinocytes and dendritic cells causing skin inflammation, at the same time causing lymphoproliferation [3,4]. Currently the cytokine milieu of the skin is indicated to play crucial role in the development and progression of CTCL. MF progression is accompanied by a shift from a Th1 to Th2 cytokine profile which determines the type of immune response [7]. The predominance of Th2 over Th1 cytokine profile in skin microenvironment seems to be responsible for suppression of anti-tumor response, proliferation of malignant cells and escape from immune surveillance [7]. Therefore, studies on new cytokines might make a significant contribution to understanding the CTCL and pruritus pathogenesis.

Interleukin- 31 (IL-31) is a proinflammatory cytokine preferentially expressed by activated Th2 CD4 + T cells that acts through a heterodimeric receptor composed of IL-31 receptor alpha (IL-31RA) and oncostatin M receptor beta (OSMR beta) by three signaling pathways: MAPK, PI3K / AKT and the JAK / STAT [8-10]. IL-31 is one of the cytokines responsible for pruritus in atopic dermatitis [11-13]. In contrast to AD , research data regarding pruritogenic role of IL-31 and its contribution to CTCL pathogenesis are rather ambiguous. IL-31 is also associated with initiation of the inflammatory process in the skin, while the inflammatory microenvironment of the skin caused by chronic antigen stimulation is considered to contribute to development and clonal proliferation of malignant T- lymphocytes

[7,14]. Overexpression of IL-31 observed in AD which is defined by chronic skin inflammation and severe pruritus encourages to investigate a potential relationship between IL-31 and its involvement in tumor growth but also induction of pruritus in CTCL.

In addition to the role of cytokines in CTCL pathogenesis, JAK/STAT signaling pathways also appear to be of great importance. STAT proteins are nuclear transcription factors responsible for signal transduction, following receptors activation STATs translocate the signal to the nucleus to induce expression of selected genes [15]. STAT proteins control expression of important genes essential for basic physiological functioning of the cells including cell survival, immune response, inflammation, proliferation, angiogenesis and chemotherapy-resistance of cancer cells [15,16]. Deregulation of STAT signaling contribute to the development of chronic inflammatory diseases and cancers [15-17]. Constitutive activation of STAT proteins has been also implicated in CTCL [18-21]. STAT signaling was demonstrated to play a central role in mediating inflammation but also proliferation and apoptosis of cancer cells, therefore contributing to oncogenesis [15,16]. Moreover, deregulation of STAT signaling in CTCL seems to be responsible for transition from Th1 to Th2 cytokine profile in skin microenvironment [18], which contribute to suppression of anti-tumor response, proliferation of malignant cells and escape from immunosurveillance. Among all members of STAT family, STAT 3 and STAT 5 which are extensively investigated as they were demonstrated to be responsible for promoting survival and resistance to apoptosis of malignant cells, therefore contributing to CTCL progression [21-23]. Constitutive activation of STAT5 in early stages of CTCL was demonstrated to indirectly cause a loss of STAT4 expression resulting in transition from Th1 to Th2 cytokine profile [24]. STAT 6 is also particularly interesting due to its role in the differentiation of T lymphocytes towards Th2 phenotype [25], which is predominant over Th1 phenotype in advanced stages of CTCL. Thus, deregulation of STAT6 constitutes another potential factor that might contribute to CTCL progression. The role of STAT signaling deregulation in the pathogenesis of variety of cancers as well as pro-inflammatory and pruritogenic properties of IL-31 in AD indicate their potential role in the pathogenesis of CTCL and in pruritus.

OBJECTIVES OF THE WORK

1. Assessment of pruritus incidence in patients with CTCL and AD
2. Comparison of the serum concentration of IL-31, expression of IL-31 and IL-31 receptor in the skin in patients with CTCL, AD and a control group of healthy participants.
3. Evaluation of the correlation between serum concentration of IL-31/ expression of IL-31 and IL-31 receptor in the skin and the severity of pruritus in patients with CTCL.
4. Evaluation of the correlation between serum concentration of IL-31 / IL-31 and IL-31 receptor expression in the skin and the disease stage in CTCL patients.
5. Evaluation of the correlation between STAT3, STAT5a, STAT5b, and STAT6 expression in the skin and disease severity and pruritus in CTCL patients.

MATERIAL AND METHODOLOGY

The study was conducted on a group of 42 patients diagnosed with CTCL (MF and SS), who are under the care of the Department of Dermatology, Venereology and Allergology in Gdansk, taking into account the inclusion and exclusion criteria. Due to the damage of tissue material (biopsy) during the study – the CTCL study group finally amounted to 39 patients in the STAT protein study. The CTCL stages were evaluated according to TNMB staging system defined by ISCL/EORTC. The control group consisted of 20 patients with AD who are under the care of the Department of Dermatology, Venereology and Allergology in Gdansk and 24 healthy individuals without CTCL, AD, CTCL or other immune and malignant diseases. The severity of pruritus was assessed in CTCL and AD patients according to VAS and NRS.

The serum concentration of IL-31 in CTCL, AD and healthy individuals was measured using immunoenzymatic method (ELISA). The expression of IL-31 and IL-31 receptor (IL-31 RA and OSMR) in the lesional skin samples from CTCL and AD patients but also non-lesional skin samples from healthy individuals was determined by the immunohistochemistry. The expression of STAT 3, STAT 5a, STAT 5b and STAT 6 in the lesional skin samples from CTCL patients and non-lesional skin samples from healthy individuals was also determined by the immunohistochemistry. The immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded skin samples using primary anti-IL-31, anti-IL-31 RA, anti-OSMR, anti-STAT 3, anti-STAT 5a, anti-STAT 5b, anti-STAT 6 antibodies.

Immunohistochemical staining of 7 antibodies was performed in separate skin biopsies from patients with CTCL (282 stained skin sections of CTCL patients) and healthy volunteers (168 stained skin sections of healthy volunteers), as well as stains detecting 3 antigens in skin biopsies obtained from AD patients (60 stained skin sections of AD patients). As a result, 510 stained skin sections were analyzed. We used a semiquantitative method (HSCORE-index) to assess the expression of the studied proteins. The PhD student performed the skin staining herself under the supervision of an experienced pathologist.

The statistical analyses of the results was performed using STATISTICA programme, by means of appropriate tests depending on the character of the distribution of the obtained data.

The studies conducted for the purpose of this PhD dissertation were approved by the Independent Bioethical Committee at the Medical University of Gdańsk (approval no.

NKBBN/86-218/2018). Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

At each stage of the doctoral research, the PhD applicant presented the results during national and international conferences:

- poster presentation entitled „Significance of IL-31 expression in skin and in serum in pathogenesis of CTCLS and in pathomechanism of accompanying pruritus ” during 3rd World Congress of Cutaneous Lymphomas, New York, USA, 26-28.10. 2016
- poster presentation entitled,, Significance of IL-31 expression in skin and in serum in patomechanism of pruritus in CTCLS” during 9th World Congress on Itch, Wrocław, 15-17.10.2017

PRESENTATION OF THE PUBLICATIONS THAT FORM PART OF THE DISSERTATION

The doctoral dissertation consists of: review article that constitute an introduction to the subject of immunology and pruritus in terms of the role of IL-31 in CTCL and two original papers that present results of research on IL-31 and its receptor and selected members of STATs in CTCL.

The review paper entitled **“The ambiguous pruritogenic role of interleukin-31 in cutaneous T-cell lymphomas in comparison to atopic dermatitis: a review”** published in *Advances of Dermatology and Allergology* in 2020 presents a summary of the current state of knowledge about the role of IL-31 in pruritus in AD, focusing on the analysis of literature reports on the role of IL-31 in CTCL-associated pruritus and the potential relationship of this cytokine with the pathogenesis of CTCL.

CTCL represents a heterogeneous group of malignant lymphoproliferative disorders derived from CD4 + memory T cells [4]. A very common symptom associated with CTCL is skin pruritus which is chronic and persistent. Moreover, antihistamine drugs are usually not very effective as histamine in this case seems not to be the key mediator of pruritus [26]. The pathogenesis of cutaneous lymphomas and the accompanying pruritus is still not fully established. The complicated immunological processes and interactions between multiple cells in the skin microenvironment are pointed out to contribute to proliferation of malignant cells due to loss of immune surveillance [7].

IL-31 was discovered in 2006, produced predominantly by Th2 cells. Due to pleiotropic functions it has been extensively studied [8] especially in Th2-weighted inflammation diseases [27]. The first studies which were performed on transgenic mice models of AD showed proinflammatory and pruritogenic role of IL-31 [28,29]. Based on analyses of IL-31 expression in skin and serum in AD patients, its crucial role in pruritus pathogenesis in AD has been established [11-13]. Promising results in AD have become the reason for comprehensive studies on the IL-31 role in CTCL. Only a few papers regarding results of IL-31 studies in CTCL have been published [27,30-34].

This paper provides results of systematic review of the available literature concerning relationship between IL-31 and both pruritus and stage of CTCL. The literature search was performed according to PRISMA guidelines and presented in a diagram (figure 1) [1]. Considering the fact that CTCL and AD share same similarities such as clinical and

immunological characteristics and IL-31 role in AD pruritus is well established, an analysis of publications regarding studies on AD is also included in the paper. In the first phase of the study, the IL-31 role in pruritus pathogenesis was discussed using a figure (figure 2) [1]. The literature reports on findings regarding IL-31 role in AD and CTCL were presented in detail. The analysis of the literature confirmed the consistency of majority of research results indicating crucial role of IL-31 in pruritus pathogenesis in AD. Moreover, several studies demonstrated not only correlation between IL-31 expression and itch intensity but also severity of AD suggesting its proinflammatory and immunomodulatory role. The analysis of the CTCL literature revealed discrepancies in the results regarding the association between IL-31 and both pruritus and CTCL stage. However, at the same time they all report overexpression of IL-31 in CTCL compared to the control group. The conclusions from the CTCL studies are summarized in the table (table 1) [1]. In the last phase of this study, attention was drawn to promising conclusions from the analyzed literature indicating the pleiotropic functions of IL-31. Despite the described overexpression of IL-31 in CTCL, its potential role in the induction of pruritus or inflammation and thus in the pathogenesis of the disease remains unclear. The conclusions emphasized that IL-31 is a promising cytokine, especially in the era of biological / targeted drugs that are used in dermatology (anti-TNF, anti-IL17, anti-IL12 / 23 in inflammatory diseases or anti-CD20 in B-cell lymphomas). Further studies are needed to fully understand significance of IL-31 in CTCL.

Contribution of the PhD applicant towards the publication: creation of the concept of the paper; collection and analysis of the literature, preparation of the figures; drafting of the paper

The original paper entitled “ **IL-31 is overexpressed in skin and serum in cutaneous T-cell lymphomas but does not correlate to pruritus**” accepted for publication in *Advances of Dermatology and Allergology* in 2020, provides an analysis of IL-31 concentration in the serum and the expression of IL-31 and its receptor (two subunits IL-31RA and OSMR) in the skin of CTCL patients. A possible correlation between IL-31 and both pruritus and disease severity has been assessed. The expression of IL-31 and IL-31 receptor in CTCL patients was compared with the control groups: atopic dermatitis and healthy volunteers.

Initially the frequency of pruritus in the study groups was assessed. More patients with AD experienced pruritus than patients with CTCL. The pruritus severity was significantly higher in AD patients than CTCL patients. Pruritus was more severe in advanced than early-

stage CTCL but the difference was not statistically significant. The results are consistent with the literature data confirming that pruritus is representative for both CTCL and AD.

An attempt was made to assess the level of IL-31 in serum in the examined groups and to determine the relationship between the analyzed variables. It was demonstrated that the IL-31 serum level was significantly higher in CTCL and AD patients than in healthy controls. IL-31 serum level was significantly higher in AD patients than in CTCL patients. The results were presented in the figure (figure 1) [2] and the table (table 2) [2]. There were no statistically significant differences in IL-31 serum level between advanced and early stage CTCL. Moreover, no significant differences in IL-31 serum level were found between pruritic and non-pruritic CTCL patients. The IL-31 serum level did not correlate with pruritus intensity according to NRS/VAS in patients with CTCL, while pruritus severity significantly correlated with the IL-31 serum level in AD patients. The IL-31 serum levels also did not correlate with the CTCL stage.

The vast majority of publications regarding studies on IL-31 are devoted to AD and clearly indicate the involvement of this cytokine in the pathomechanism of pruritus in this dermatosis. The data from the literature regarding the role of IL-31 in CTCL are rather scarce, only 6 publications are available while only one analyze IL-31 and its receptor expression in the skin [27,30-34]. Study results are quite incompatible when it comes to relationship between IL-31 and pruritus but also pathogenesis of CTCL. Some studies confirm the correlation of IL-31 levels with the severity of pruritus or show a higher level of IL-31 in severe pruritus than mild pruritus, however the limitations of mentioned publications such as low number of participants should be also considered [32-34]. Other papers deny the association of IL-31 with pruritus [27,30]. The results presented in the publications are also not consistent regarding the role of IL-31 in the pathogenesis of CTCL, some studies suggest the relationship between the stage of the disease and the level of IL-31 [30,31], other papers deny such correlations [32-34]. Nevertheless, all available publications emphasize a significantly higher level of IL-31 in patients with CTCL compared to the control group of healthy individuals.

The results presented in the paper excluded correlation between serum IL-31 level and CTCL stage, at the same time the IL-31 serum concentration in CTCL was significantly higher in comparison to healthy controls. Based on the obtained results, a conclusion has been made that IL-31 plays a role in the pathogenesis of the CTCL but it does not seem to contribute to disease progression. This paper draws particular attention to the lack of correlation between IL-31 serum level and severity of pruritus in CTCL while correlation

between IL-31 serum level and severity of pruritus in AD was positive. Our results might support the Nobbe et al. hypothesis regarding the pruritogenic role of IL-31 which is unique to atopic dermatitis rather than for dermatoses in general [27]. However, it has been stressed that the observation requires further studies, in particular with wider range of pruritic skin diseases and a larger study group.

As a matter of crucial role of immunohistochemistry in the histopathological examination of CTCL, we also evaluated the expression of IL-31 and IL-31 receptor in skin samples obtained from patients with CTCL. Lesional skin samples from AD patients and normal skin samples from healthy control group were also obtained. The results were presented in a table (table 1) [2]. The immunoreactivity of IL-31 and its receptor antibodies demonstrated homogeneous weak positive staining limited to epidermis and lack of staining in dermis except for skin appendages in samples from healthy controls. Whereas, CTCL and AD samples presented positive IL-31, IL-31RA and OSMR staining both in epidermis and in dermal lymphocytic infiltrate. The paper contains microscopic figures presenting the expression of IL-31 cytokine and receptor in the skin in all examined groups of patients (figure 2) [2]. A significantly higher expression of IL-31 and its receptor in AD and CTCL was found compared to the control group, which was consistent with the findings in previous publications [11,27]. Further analysis between CTCL and AD revealed overexpression of IL-31 in epidermis and significantly higher expression in dermal infiltrate in CTCL than AD samples. The analysis of the IL-31RA expression showed higher expression in AD than CTCL skin samples, while the difference was significant only in the dermal lymphocytic infiltrate. The OSMR expression in epidermis and dermis did not show any significant differences between the CTCL and the AD group. It has been stressed that the results are inconsistent with Nobbe et al. observations which demonstrated increased IL-31 immunoreactivity in AD subjects compared to other Th-2 weighted skin diseases including MF, however the study groups were rather small (AD and MF n=5 each) [27].

No correlation was found between expression of IL-31/ IL-31 receptor subunits in skin and severity of pruritus in CTCL patient. It was concluded that IL-31 is not the key cytokine involved in pruritus in CTCL and it is possible that IL-31 could act indirectly by inducing other cells to release secondary itch mediators.

Moreover, we observed negative correlation between CTCL stage and both IL-31 expression in dermal infiltrate and IL-31 RA expression in epidermis. Based on available literature, we discussed possible reasons for observed correlations and differences in IL-31 and receptor expression in CTCL. The dense dermal infiltrate of malignant T cells in

advanced stage CTCL skin might suppress the benign T-cells and bystander cells which are the source of IL-31, resulting in downregulation of IL-31 and consequently its receptor. The results were interpreted with caution, indicating the complicated relationships between cytokines and skin microenvironment proteins conditioned by the neoplastic nature of the disease, which is a probable cause of the observed differences in IL-31 expression between CTCL and AD.

Based on the results, namely significantly higher expression of IL-31 in skin and serum in CTCL compared to the control group, lack of correlation between IL-31 and pruritus severity in CTCL and correlation of IL-31 with the stage of the disease, it was concluded that IL-31 seems to play a superior role in the pathogenesis of the disease rather than in pruritus associated with CTCL. IL-31 has been also suggested to play central role in pruritus patomechanism that is specific to AD rather than CTCL. It was stressed that further studies are needed to identify new cytokines and relationships between cells.

Contribution of the PhD applicant towards the publication: creation of the concept of the paper and preparation of the methodology; coordination of the project; recruitment of the study and the control groups; collecting patients' history and conducting physical examination; collecting samples (blood samples and skin biopsies); participation in laboratory tests and collection of data; creation of a database; analysis of the collected data and preparation of the figures; analysis of the literature; drafting of the paper; participation in editing of the paper according to reviewers and editors recommendations; person responsible for correspondence with the editors.

The original paper entitled “**Mapping signal transducer and activator of transcription (STAT) activity in different stages of mycosis fungoides and Sezary syndrome**” published in 2020 in „International Journal of Dermatology”, provides analysis of the expression of signal transducer and activator of transcription (STAT) proteins in the skin of CTCL patients. Moreover, the relationship between expression of STAT3, STAT5A, STAT5B, STAT6 proteins in CTCL skin and the clinical variables: stage of CTCL, severity of accompanying pruritus and prognostic markers such as LDH and β -2-M was evaluated.

The immunoreactivity of all STAT family proteins was found throughout the epidermis in samples from the healthy individuals and CTCL patients, immunohistochemical staining presented cytoplasmic-nuclear pattern varying in strength depending on the protein. No significant differences were observed in the staining pattern of STAT3, STAT5a, STAT5b

and STAT6 antibodies in the epidermis between health controls and CTCL, therefore, the assessment of expression in the epidermis with HSCORE method was not performed, focusing on the assessment of STAT proteins expression in lymphocytic infiltrate in the dermis. The analysis of microscopic finding in epidermis in healthy control group, indicate that expression of STAT proteins is also responsible for normal physiological functioning of the epidermal cells which is in line with other publications [35].

The analysis of the STAT proteins expression in inflammatory infiltrate in dermis revealed significant differences between CTCL group and control group, which did not express STAT proteins. The analysis of STAT proteins expression in CTCL samples was performed according to TNM classification (4 stages) and division into early stage and advanced stages, showing significant differences in STAT proteins expression within different stages of CTCL. The publication presents a microscopic figures of immunohistochemical staining with STAT proteins in different stages of CTCL (figure 1) [3].

Statistical analysis revealed significant differences in STATs expression in stage I and stage II CTCL, while the rest of CTCL stages did not present significant differences. Significantly lower expression of STAT 3 in comparison to rest of the STAT proteins was observed in I stage, while in II stage STAT 5a expression was significantly higher than the rest of STAT proteins. Advanced stage of CTCL (III and IV) were characterized by a similar trend of STAT5a, STAT 5b and STA6 overexpression in comparison to STAT3. The obtained results were presented in a figure (figure 2) [3].

No significant differences in STAT 3 expression between early and advanced stage of CTCL were observed. The publication discussed literature data indicating a role of STAT3 in the pathogenesis of CTCL and protein overexpression in advanced stages of the disease [36]. Possible causes of the observed differences regarding the literature data were analyzed, emphasizing the role of the inflammatory lymphocytes which next to neoplastic lymphocytes might be the reason for the relatively high STAT3 activity in the early stages of CTCL.

The CTCL study group showed the highest expression of STAT5a among STAT proteins, moreover higher levels of STAT 5a were found in the early than advanced stages, which was consistent with the observations in previous publications [19]. Analysis of protein expression between early and advanced CTCL showed a statistically significant difference only in the STAT5b protein level. We observed a negative correlation between STAT5b expression and CTCL stage, which has not been reported yet. The results were referred to the literature data, indicating different, not fully understood functions of the STAT5a and

STAT5b proteins [37-39]. The paper refers to the reports regarding STAT5b deficiency, which was associated with the presentation of features that are characteristic for advanced stages of CTCL [40,41]. The observed decrease in STAT5b expression in patients with advanced CTCL seems to confirm the relationship and thus contribute to disease progression.

It was emphasized that the study results showing overexpression of STAT5a and STAT5b are consistent with the previous reports on the significant role of STAT5 protein in the pathogenesis of CTCL [19,42]. The obtained results suggest that not only overexpression of STAT proteins of but also downregulation or inhibition of STAT proteins play significant role in CTCL pathogenesis.

Further analysis showed high expression of STAT6 but no significant differences in STAT6 levels were observed between early and advanced CTCL samples. The literature data show particularly interesting role of STAT6 protein in promoting the Th2 phenotype [24,25] as deregulation of this protein may participate in CTCL progression. It was also noted that overexpression of STAT6 in early stage could be associated with a risk of progression, however confirmation of these conclusions require further observational studies.

Correlation between lymph node or peripheral blood involvement in CTCL and the expression of STAT proteins was also performed. There were no significant differences in STAT expression between the group with lymph node/ peripheral blood involvement and the group without involvement. The results suggest that a single, specific STAT protein does not contribute to organ involvement by the disease process. Attention was drawn to the limitations of the study such as small study groups and therefore the need for careful interpretation of the obtained results.

The association of STAT proteins expression with pruritus and prognostic markers (LDH, β -2-M) was also analysed. Pruritus seems to be a result of complex interplay between numerous mediators and it is not induced by overexpression of a single STAT protein. Pruritus induction with cytokines mediated by STAT3 were observed in AD [43]. It seems that deregulation of STAT proteins also in CTCL could potentially induce the production of STAT-dependent pruritus mediators, however further studies are needed to confirm this hypothesis.

No significant differences in the expression of STAT proteins were found between the CTCL groups with abnormal LDH/ β -2-M and the groups with normal marker values. There was also no correlation between STAT proteins and the elevated prognostic markers. Abnormal LDH and β -2-M are considered markers of the aggressive course of CTCL, while high LDH is associated with the involvement of internal organs and worse survival [44]. The

results indicate no relationship between STAT proteins and abnormal prognostic markers, while the negative correlation between STAT5B expression and stage of CTCL suggests a possible function of STAT5B as a marker for the disease aggravation that is independent of LDH and β -2-M.

Based on the research results, it was concluded that the overexpression of STAT5a, STAT5b, STAT6 and STAT3 proteins in the CTCL skin indicate their role in the pathogenesis of the disease but also reflects the changes in expression of cytokines and growth factors as the disease progresses. Concerning the role of individual STAT proteins it was also suggested that the decrease or lack of STAT protein expression might be a potential factor in the aggravation of the disease [18]. In the summary of the work, attention was drawn to the possible therapeutic role of STAT5a inhibitors due to the highest expression among the studied proteins in CTCL samples. Recent studies indicate an important role of STAT5 protein deregulation in the pathogenesis of MF by stimulating the expression of oncogenic microRNA miR-155 [18,45]. Studies on the miR-155 inhibitor (Cobomarsen), now in a clinical trial, have shown that it inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MF cells [45], thus confirming the therapeutic potential of STAT5 inhibitors as well. It was also emphasized that treatment aimed at restoring STAT5B function in advanced stages of CTCL could potentially be another therapeutic option, but confirmation of these hypotheses requires further studies.

Contribution of the PhD applicant towards the publication: creation of the concept of the paper and methodology; coordination of the project; recruitment of the study and control groups; collecting patients' history and conducting physical examination; collecting samples (blood samples and skin biopsies); participation in laboratory tests and collection of data; creation of a database; analysis of the collected data and preparation of the figures; analysis of the literature; drafting of the paper; participation in editing of the paper according to reviewers and editors recommendations; person responsible for correspondence with the editors.

CONCLUSIONS

1. The study results showed that pruritus is a hallmark of both AD and CTCL, while in AD it is characterized by significantly greater intensity compared to CTCL. It appears that pruritus can not be treated as a differentiating factor between CTCL and AD.
2. Elevated serum levels of IL-31 and increased expression of IL-31 and its receptor in the skin of CTCL and AD patients compared to serum and skin levels in healthy volunteers indicate that this cytokine is involved in the pathogenesis of both diseases. The differences in serum and skin IL-31 levels between AD and CTCL appear to be related to the different nature and course of those diseases.
3. Lack of correlation between IL-31 serum level, the expression of IL-31 and its receptor in the skin and the intensity of pruritus in CTCL patients suggests that IL-31 does not seem to play a key role in pathogenesis of pruritus in CTCL. Significantly higher IL-31 serum level in AD compared to CTCL and the correlation with the pruritus severity in AD suggests that IL-31 plays a key role in the pathomechanism of pruritus that is specific for AD.
4. Lack of correlation between IL-31 serum level and the stage of CTCL but at the same time significantly higher serum level compared to the control group of healthy people may indicate the role of IL-31 in CTCL pathogenesis . Negative correlation between expression of IL-31 and IL-31 RA in the skin and the stage of CTCL seems to confirm the role of IL-31 in induction rather than aggravation of this disease. Thus, it seems that IL-31 might be a new target for CTCL treatment.
5. Increased expression of STAT3, STAT5a, STAT5b, and STAT6 proteins in skin of CTCL patients compared to the control group indicates that STAT proteins play a role in CTCL pathogenesis. Negative correlation between STAT5b expression and CTCL stage suggests that the loss of the STAT5b expression is, apart from overexpression of STAT proteins, especially STAT5a, a factor involved in the CTCL pathogenesis. It appears that STAT proteins might be a new target for CTCL treatment.

Lack of correlation between the expression of STAT proteins and pruritus in CTCL may indicate that the individual STAT proteins do not play a key role in the pathogenesis of pruritus.

PIŚMIENNICTWO

1. Olszewska B, Sokołowska-Wojdyło M, Lakomy J, Nowicki RJ. The ambiguous pruritogenic role of interleukin-31 in cutaneous T-cell lymphomas in comparison to atopic dermatitis: a review. *Postepy Dermatol Alergol.* 2020 Jun;37(3):319-325. doi: 10.5114/ada.2020.96260. Epub 2020 Jul 16. PMID: 32792870; PMCID: PMC7394154.
2. Olszewska B, Żawrocki A, Gleń J, Lakomy J, Karczewska J, Zabłotna M, Malek M, Jankau J, Lange M, Biernat W, Nowicki RJ, Sokołowska-Wojdyło M. IL-31 is overexpressed in skin and serum in Cutaneous T-cell Lymphomas but does not correlate to pruritus. *Postepy Dermatol Alergol.* DOI: 10.5114/ada.2020.100664
3. Olszewska B, Żawrocki A, Lakomy J, Karczewska J, Gleń J, Zabłotna M, Malek M, Jankau J, Lange M, Biernat W, Nowicki RJ, Sokołowska-Wojdyło M. Mapping signal transducer and activator of transcription (STAT) activity in different stages of mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Int J Dermatol.* 2020 Sep;59(9):1106-1112. doi: 10.1111/ijd.15036. Epub 2020 Jul 8. PMID: 32643174.
4. Willemze R, Cerroni L, Kempf W, Berti E, Facchetti F, Swerdlow SH, Jaffe ES. The 2018 update of the WHO-EORTC classification for primary cutaneous lymphomas. *Blood.* 2019 Apr 18;133(16):1703-1714. doi: 10.1182/blood-2018-11-881268. Epub 2019 Jan 11. Erratum in: *Blood.* 2019 Sep 26;134(13):1112. PMID: 30635287; PMCID: PMC6473500.
5. Wright A, Wijeratne A, Hung T, Gao W, Whittaker S, Morris S, Scarisbrick J, Beynon T. Prevalence and severity of pruritus and quality of life in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *J Pain Symptom Manage.* 2013 Jan; 45(1):114-9. doi: 10.1016/j.jpainsymman.2012.01.012. Epub 2012 Aug 20. PMID: 22917715.
6. Vij A, Duvic M. Prevalence and severity of pruritus in cutaneous T cell lymphoma. *Int J Dermatol.* 2012 Aug;51(8):930-4. doi: 10.1111/j.1365-4632.2011.05188.x. PMID: 22788808.
7. Krejsgaard T, Lindahl LM, Mongan NP, Wasik MA, Litvinov IV, Iversen L, Langhoff E, Woetmann A, Odum N. Malignant inflammation in cutaneous T-cell lymphoma-a hostile takeover. *Semin Immunopathol.* 2017 Apr;39(3):269-282. doi: 10.1007/s00281-016-0594-9. Epub 2016 Oct 7. PMID: 27717961; PMCID: PMC5368200.
8. Zhang Q, Putheti P, Zhou Q, Liu Q, Gao W. Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008 Oct-Dec;19(5-6):347-56. doi: 10.1016/j.cytogfr.2008.08.003. Epub 2008 Oct 15. PMID: 18926762; PMCID: PMC2659402.
9. Hermanns HM. Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Oct;26(5):545-58. doi: 10.1016/j.cytogfr.2015.07.006. Epub 2015 Jul 3. PMID: 26198770.

10. Cornelissen C, Lüscher-Firzlaff J, Baron JM, Lüscher B. Signaling by IL-31 and functional consequences. *Eur J Cell Biol.* 2012 Jun-Jul;91(6-7):552-66. doi: 10.1016/j.ejcb.2011.07.006. Epub 2011 Oct 5. PMID: 21982586.
11. Sonkoly E, Muller A, Lauerma AI, Pivarcsi A, Soto H, Kemeny L, Alenius H, Dieu-Nosjean MC, Meller S, Rieker J, Steinhoff M, Hoffmann TK, Ruzicka T, Zlotnik A, Homey B. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Feb;117(2):411-7. doi: 10.1016/j.jaci.2005.10.033. PMID: 16461142.
12. Raap U, Wichmann K, Bruder M, Ständer S, Wedi B, Kapp A, Werfel T. Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2008 Aug;122(2):421-3. doi: 10.1016/j.jaci.2008.05.047. PMID: 18678344.
13. Kim S, Kim HJ, Yang HS, Kim E, Huh IS, Yang JM. IL-31 Serum Protein and Tissue mRNA Levels in Patients with Atopic Dermatitis. *Ann Dermatol.* 2011 Nov;23(4):468-73. doi: 10.5021/ad.2011.23.4.468. Epub 2011 Nov 3. PMID: 22148014; PMCID: PMC3229940.
14. Jawed SI, Myskowski PL, Horwitz S, Moskowitz A, Querfeld C. Primary cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides and Sézary syndrome): part I. Diagnosis: clinical and histopathologic features and new molecular and biologic markers. *J Am Acad Dermatol.* 2014 Feb;70(2):205.e1-16; quiz 221-2. doi: 10.1016/j.jaad.2013.07.049. PMID: 24438969.
15. Loh CY, Arya A, Naema AF, Wong WF, Sethi G, Looi CY. Signal Transducer and Activator of Transcription (STATs) Proteins in Cancer and Inflammation: Functions and Therapeutic Implication. *Front Oncol.* 2019 Feb 21;9:48. doi: 10.3389/fonc.2019.00048. PMID: 30847297; PMCID: PMC6393348.
16. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009 Nov;9(11):798-809. doi: 10.1038/nrc2734. PMID: 19851315; PMCID: PMC4856025.
17. Bao L, Zhang H, Chan LS. The involvement of the JAK-STAT signaling pathway in chronic inflammatory skin disease atopic dermatitis. *JAKSTAT.* 2013 Jul 1;2(3):e24137. doi: 10.4161/jkst.24137. Epub 2013 Aug 15. PMID: 24069552; PMCID: PMC3772104.
18. Netchiporouk E, Litvinov IV, Moreau L, Gilbert M, Sasseville D, Duvic M. Deregulation in STAT signaling is important for cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) pathogenesis and cancer progression. *Cell Cycle.* 2014;13(21):3331-5. doi: 10.4161/15384101.2014.965061. PMID: 25485578; PMCID: PMC4612117.
19. Qin JZ, Kamarashev J, Zhang CL, Dummer R, Burg G, Döbbeling U. Constitutive and interleukin-7- and interleukin-15-stimulated DNA binding of STAT and novel factors in cutaneous T cell lymphoma cells. *J Invest Dermatol.* 2001 Sep;117(3):583-9. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01436.x. PMID: 11564163.
20. Sommer VH, Clemmensen OJ, Nielsen O, Wasik M, Lovato P, Brender C, Eriksen KW, Woetmann A, Kaestel CG, Nissen MH, Ropke C, Skov S, Ødum N. In vivo activation of

- STAT3 in cutaneous T-cell lymphoma. Evidence for an antiapoptotic function of STAT3. *Leukemia*. 2004 Jul;18(7):1288-95. doi: 10.1038/sj.leu.2403385. PMID: 15141228.
21. Nielsen M, Kaestel CG, Eriksen KW, Woetmann A, Stokkedal T, Kaltoft K, Geisler C, Röpke C, Odum N. Inhibition of constitutively activated Stat3 correlates with altered Bcl-2/Bax expression and induction of apoptosis in mycosis fungoides tumor cells. *Leukemia*. 1999 May;13(5):735-8. doi: 10.1038/sj.leu.2401415. PMID: 10374878.
 22. Litvinov IV, Pehr K, Sasseville D. Connecting the dots in cutaneous T cell lymphoma (CTCL): STAT5 regulates malignant T cell proliferation via miR-155. *Cell Cycle*. 2013 Jul 15;12(14):2172-3. doi: 10.4161/cc.25550. PMID: 23803726; PMCID: PMC3755065.
 23. Lindahl LM, Fredholm S, Joseph C et al. STAT5 induces miR-21 expression in cutaneous T cell lymphoma. *Oncotarget*. 2016 Jul 19;7(29):45730-45744. doi: 10.18632/oncotarget.10160. PMID: 27329723; PMCID: PMC5216756.
 24. Litvinov IV, Cordeiro B, Fredholm S, Ødum N, Zargham H, Huang Y, Zhou Y, Pehr K, Kupper TS, Woetmann A, Sasseville D. Analysis of STAT4 expression in cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) patients and patient-derived cell lines. *Cell Cycle*. 2014;13(18):2975-82. doi: 10.4161/15384101.2014.947759. PMID: 25486484; PMCID: PMC4614388.
 25. Takeda K, Akira S. STAT family of transcription factors in cytokine-mediated biological responses. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000 Sep;11(3):199-207. doi: 10.1016/s1359-6101(00)00005-8. PMID: 10817963.
 26. Ahern K, Gilmore ES, Poligone B. Pruritus in cutaneous T-cell lymphoma: a review. *J Am Acad Dermatol*. 2012 Oct;67(4):760-8. doi: 10.1016/j.jaad.2011.12.021. Epub 2012 Jan 30. PMID: 22285672; PMCID: PMC3618025.
 27. Nobbe S, Dziunycz P, Mühleisen B, Bilsborough J, Dillon SR, French LE, Hofbauer GF. IL-31 expression by inflammatory cells is preferentially elevated in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol*. 2012 Jan;92(1):24-8. doi: 10.2340/00015555-1191. PMID: 22041865.
 28. Dillon SR, Sprecher C, Hammond A et al. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol*. 2004 Jul;5(7):752-60. doi: 10.1038/ni1084. Epub 2004 Jun 6. Erratum in: *Nat Immunol*. 2005 Jan;6(1):114. PMID: 15184896.
 29. Grimstad O, Sawanobori Y, Vestergaard C, Bilsborough J, Olsen UB, Grønhøj-Larsen C, Matsushima K. Anti-interleukin-31-antibodies ameliorate scratching behaviour in NC/Nga mice: a model of atopic dermatitis. *Exp Dermatol*. 2009 Jan;18(1):35-43. doi: 10.1111/j.1600-0625.2008.00766.x. Epub 2008 Oct 24. PMID: 19054054.
 30. Malek M, Gleń J, Rębała K, Kowalczyk A, Sobjanek M, Nowicki R, Ruckemann-Dziurdzińska K, Sokołowska-Wojdyło M. Il-31 does not correlate to pruritus related to early stage cutaneous T-cell lymphomas but is involved in pathogenesis of the disease. *Acta Derm Venereol*. 2015 Mar;95(3):283-8. doi: 10.2340/00015555-1958. PMID: 25176053.

31. Ohmatsu H, Sugaya M, Suga H, Morimura S, Miyagaki T, Kai H, Kagami S, Fujita H, Asano Y, Tada Y, Kadono T, Sato S. Serum IL-31 levels are increased in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol.* 2012 May;92(3):282-3. doi: 10.2340/00015555-1345. PMID: 22456907.
32. Singer EM, Shin DB, Nattkemper LA, Benoit BM, Klein RS, Didigu CA, Loren AW, Dentchev T, Wysocka M, Yosipovitch G, Rook AH. IL-31 is produced by the malignant T-cell population in cutaneous T-Cell lymphoma and correlates with CTCL pruritus. *J Invest Dermatol.* 2013 Dec;133(12):2783-2785. doi: 10.1038/jid.2013.227. Epub 2013 May 22. PMID: 23698099.
33. Nattkemper LA, Martinez-Escala ME, Gelman AB, Singer EM, Rook AH, Guitart J, Yosipovitch G. Cutaneous T-cell Lymphoma and Pruritus: The Expression of IL-31 and its Receptors in the Skin. *Acta Derm Venereol.* 2016 Nov 2;96(7):894-898. doi: 10.2340/00015555-2417. PMID: 27001482.
34. Möbs M, Gryzik S, Haidar A, Humme D, Beyer M, Vandersee S. Analysis of the IL-31 pathway in Mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Arch Dermatol Res.* 2015 Aug;307(6):479-85. doi: 10.1007/s00403-014-1527-x. Epub 2014 Dec 7. PMID: 25488078.
35. Nishio H, Matsui K, Tsuji H, Tamura A, Suzuki K. Immunolocalisation of the janus kinases (JAK)--signal transducers and activators of transcription (STAT) pathway in human epidermis. *J Anat.* 2001 May;198(Pt 5):581-9. doi: 10.1046/j.1469-7580.2001.19850581.x. PMID: 11430697; PMCID: PMC1468247.
36. Pérez C, Mondéjar R, García-Díaz N et al. Advanced-stage mycosis fungoides: role of the signal transducer and activator of transcription 3, nuclear factor- κ B and nuclear factor of activated T cells pathways. *Br J Dermatol.* 2020 Jan;182(1):147-155. doi: 10.1111/bjd.18098. Epub 2019 Jul 25. PMID: 31049933.
37. Kanai T, Seki S, Jenks JA, Kohli A, Kawli T, Martin DP, Snyder M, Bacchetta R, Nadeau KC. Identification of STAT5A and STAT5B target genes in human T cells. *PLoS One.* 2014 Jan 30;9(1):e86790. doi: 10.1371/journal.pone.0086790. PMID: 24497979; PMCID: PMC3907443.
38. Cui Y, Riedlinger G, Miyoshi K, Tang W, Li C, Deng CX, Robinson GW, Hennighausen L. Inactivation of Stat5 in mouse mammary epithelium during pregnancy reveals distinct functions in cell proliferation, survival, and differentiation. *Mol Cell Biol.* 2004 Sep;24(18):8037-47. doi: 10.1128/MCB.24.18.8037-8047.2004. PMID: 15340066; PMCID: PMC515028.
39. Villarino A, Laurence A, Robinson GW, Bonelli M, Dema B, Afzali B, Shih HY, Sun HW, Brooks SR, Hennighausen L, Kanno Y, O'Shea JJ. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) paralog dose governs T cell effector and regulatory functions. *Elife.* 2016 Mar 21;5:e08384. doi: 10.7554/eLife.08384. PMID: 26999798; PMCID: PMC4856466.

40. Nadeau K, Hwa V, Rosenfeld RG. STAT5b deficiency: an unsuspected cause of growth failure, immunodeficiency, and severe pulmonary disease. *J Pediatr.* 2011 May;158(5):701-8. doi: 10.1016/j.jpeds.2010.12.042. Epub 2011 Mar 17. Erratum in: *J Pediatr.* 2011 Aug;159(2):356. PMID: 21414633.
41. Kanai T, Jenks J, Nadeau KC. The STAT5b Pathway Defect and Autoimmunity. *Front Immunol.* 2012 Aug 14;3:234. doi: 10.3389/fimmu.2012.00234. PMID: 22912632; PMCID: PMC3418548.
42. Zhang Q, Nowak I, Vonderheid EC, Rook AH, Kadin ME, Nowell PC, Shaw LM, Wasik MA. Activation of Jak/STAT proteins involved in signal transduction pathway mediated by receptor for interleukin 2 in malignant T lymphocytes derived from cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma and Sezary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 20;93(17):9148-53. doi: 10.1073/pnas.93.17.9148. PMID: 8799169; PMCID: PMC38610.
43. Lee CH, Hong CH, Yu WT, Chuang HY, Huang SK, Chen GS, Yoshioka T, Sakata M, Liao WT, Ko YC, Yu HS. Mechanistic correlations between two itch biomarkers, cytokine interleukin-31 and neuropeptide β -endorphin, via STAT3/calcium axis in atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 2012 Oct;167(4):794-803. doi: 10.1111/j.1365-2133.2012.11047.x. PMID: 22578170; PMCID: PMC3482403.
44. Scarisbrick JJ, Prince HM, Vermeer MH, Quaglino P et al. Cutaneous Lymphoma International Consortium Study of Outcome in Advanced Stages of Mycosis Fungoides and Sézary Syndrome: Effect of Specific Prognostic Markers on Survival and Development of a Prognostic Model. *J Clin Oncol.* 2015 Nov 10;33(32):3766-73. doi: 10.1200/JCO.2015.61.7142. Epub 2015 Oct 5. PMID: 26438120; PMCID: PMC4979132.
45. Seto AG, Beatty X, Lynch JM, Hermreck M, Tetzlaff M, Duvic M, Jackson AL. Cobomarsen, an oligonucleotide inhibitor of miR-155, co-ordinately regulates multiple survival pathways to reduce cellular proliferation and survival in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2018 Nov;183(3):428-444. doi: 10.1111/bjh.15547. Epub 2018 Aug 20. PMID: 30125933.