



UNIwersytet WARMIŃSKO-MAZURSKI
w Olsztynie
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ LEKARSKI

**Katedra i Klinika Dermatologii, Chorób Przenoszonych Drogą Płciową i
Immunologii Klinicznej**
10-229 Olsztyn, al. Wojska Polskiego 30, tel. 89 678 66 54/ 70 fax 89-678-66-41

Gdynia dnia 2018-05-02

OCENA
pracy na stopień doktora nauk medycznych
Lek. med. Katarzyny Juczyńskiej
pt.: „Ekspresja białek ścieżki sygnałowej JAK/STAT
w wybranych autoimmunologicznych podnaskórkowych
chorobach pęcherzowych”

Do autoimmunologicznych podnaskórkowych chorób pęcherzowych zalicza się pemphigoid pęcherzowy (BP), pemphigoid błon śluzowych, pemphigoid anty p-200, pemphigoid antyepiligrynowy, pemphigoid ciężarnych, LABD, EBA i chorobę Dühringa (DH). Najczęściej spotykanymi wśród pacjentów tej grupy są BP i DH.

W patogenezie tych chorób biorą udział humoralne i komórkowe reakcje immunologiczne. Chociaż stosunkowo dobrze zostały poznane przeciwciała przeciwko poszczególnym antygenom błony podstawnej granicy skórnaskórkowej, co szczególnie jest przydatne w diagnostyce tych chorób oraz reakcje międzykomórkowe, wciąż badane jest znaczenie cytokin w tych reakcjach i szlaki wewnątrzkomórkowe w przekazywaniu sygnałów. Należą do nich szlaki Jak/Stat.

Związanie się każdej cytokiny z receptorem na powierzchni błony komórkowej, prowadzi do uruchomienia wewnątrzkomórkowej kaskady przekazywania sygnałów. W procesach tych uczestniczą szlaki GTPazy, kinazy

MAP, kinaz tyrozynowych Src- i Tec-podobnych, kinazy-3 fosfatydyloinozytolu czy kinazy JAK. Jednak większość receptorów cytokin przekazuje sygnał za pomocą ścieżki sygnałowej JAK/STAT albo poprzez aktywację kaskady kinazy MAP. Do kinaz JAK należą między innymi: JAK1, JAK2, Jak3 i Tyk2, a do białek typu STAT: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b i STAT6.

Kinazy JAK1, JAK2 i Tyk2 ulegają uniwersalnej ekspresji, podczas gdy obecność JAK3 charakterystyczna jest tylko do komórek układu immunologicznego. Wielkość receptorów JAK ma masę ok. 130kDa. Mają C-końcową białkową domenę kinazową, przylegającą domenę kinazo-podobną i pięć dodatkowych domen, odpowiedzialnych za wiązanie białko-białko. Są one charakterystyczne dla każdej z cząsteczek JAK i odpowiadają za zróżnicowaną rolę w odpowiedzi na przyłączenie ligandu. Białka STAT mają masę od 80-110kDa. Każde ma domenę SH2 i SH3. Aktywacja STATów polega na fosforylacji konserwatywnej domeny przy C-końcu białka. Prowadzi to homo- lub heterodimeryzacji białka bez udziału dodatkowych cząsteczek. Białka STAT występują w cytoplazmie w postaci monomerów wielkości 80-110 kDa. Związanie się cytokiny z jej receptorem na powierzchni komórki powoduje auto- lub cross-fosorylację członka rodziny kinaz JAK, związanych z receptorem cytokiny. Aktywne kinazy JAK fosforylują reszty tyrozynowe na części cytoplazmatycznej receptora cytokin. To powoduje przyłączenie się białka STAT i jego fosforylację. Ufosforylowane białka STAT tworzy dimeryna powierzchni cytoplazmy. Następnie dochodzi do ich translokacji do jądra, gdzie biorą udział w regulacji ekspresji genów. Uważa się, że wpływ na ekspresję genów mają tylko homo- i heterodimery STAT w połączeniu z koaktywatorami.

Większość pozycji w dostępnym piśmiennictwie dotyczy badań tego szlaku w takich chorobach jak łuszczyca, trądzik pospolity, reumatoidalne zapalenie stawów, zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa, choroba Leśniowskiego-Crohna czy wrzodziejące zapalenie jelita grubego. Szereg badań zostało poświęconych również kwestii zaburzeń przekazywania JAK/STAT w komórkach nowotworowych. Podkreśla się zwłaszcza rolę białek STAT3 i

STAT5 w proliferacji komórkowej, angiogenezie i apoptozie zarówno w guzach litych, jak i chorobach limfoproliferacyjnych. Powstają nawet leki, które modułują te szlaki w niektórych chorobach.

Aktywacja ścieżki sygnałowej JAK/STAT następuje poprzez przyłączenie ligandu do jego nieaktywnego receptora. Jak omówiono powyżej, poszczególne ligandy mogą aktywować odpowiadające im białka JAK. Przyłączenie to prowadzi do zmian w konformacji cytoplazmatycznej części receptora, inicjując w ten sposób aktywację powiązanych z receptorem białek JAK. Związane z receptorami białka JAK ulegają aktywacji kiedy dwa z nich znajdują się w wystarczającej bliskości, aby umożliwić wzajemną fosforylację. Następnie białka JAK fosforylują reszty tyrozynowe w obrębie receptora dla ligandu, tworząc w ten sposób miejsca dokujące dla białek STAT i innych cząsteczek sygnałowych. Po przyłączeniu do receptora, białka STAT również podlegają procesowi fosforylacji przez białka JAK. Aktywowane w ten sposób białka oddzielają się od receptora i podlegają dimeryzacji (lub tetrameryzacji), a następnie są transportowane do jądra komórkowego, gdzie rozpoznają i przyłączają się do określonych sekwencji w obrębie DNA i modułują transkrypcję genów. W prawidłowo funkcjonujących komórkach, białka STAT ulegają następnie defosforylacji przez fosfatazę tyrozynową i jako wolne monomery są gotowe do kolejnej rundy stymulacji.

Brak jest jednak doniesień na temat dotyczący udziału białek ścieżki sygnałowej JAK/STAT w patogenezie pemphigoidu pęcherzowego i opryszczkowego zapalenia skóry, chorób o podobnej lokalizacji tworzenia pęcherzy podnaskórkowych, jednak całkowicie odmiennych mechanizmach powstawania

Dlatego też opracowanie przez lek. med. Katarzynę Juczyńską pod opieką promotora dr hab. med. Agnieszki Żebrowskiej, głównego polskiego eksperta od opryszczkowego zapalenia skóry i innych autoimmunologicznych dermatoz z kręgu chorób pęcherzowych, tematu dotyczącego ekspresji białek ścieżki sygnałowej JAK/STAT w DH i BP uważam za bardzo przydatne,

uzasadnione i celowe. Gratuluję pomysłu tematu i projektu badań przy braku tego typu opracowań w literaturze światowej.

Rozprawa doktorska ma typowy układ dla tego typu opracowań – zawiera 115 stron maszynopisu, 12 tabel i 22 ryciny. We wstępie pracy Autorka szczegółowo omawia zagadnienia związane ze szlakiem JAK/STAT, oraz patogenezę pemfigoidu pęcherzowego i opryszczkowego zapalenia skóry.

Założenia pracy wyczerpująco wyjaśniają jakie przesłanki skłoniły Doktorantkę do tych badań, a cel swoich badań Autorka ujęła w jasno sprecyzowanych czterech punktach: określenie ekspresji wybranych białek ścieżki sygnałowej JAK/STAT w skórze osób chorych na pemfigoid pęcherzowy i chorobę Duhringa.

1. Ocena obecności wybranych białek w skórze zmienionej chorobowo, jak i skórze pozornie niezmienionej.
2. Określenie ekspresji wybranych białek ścieżki sygnałowej JAK/STAT w skórze osób zdrowych.
3. Określenie roli wybranych białek ścieżki JAK/STAT w różnicowaniu profilu cytokinowego i nacieku zapalnego w wybranych chorobach.
4. Wskazanie białek ścieżki JAK/STAT mogących stanowić marker aktywnej fazy choroby w wybranych autoimmunologicznych chorobach skóry.

Kolejny rozdział, materiał i metody, został opracowany w sposób czytelny. Autorka objęła badaniami grupę 51 osób, w tym: 20 chorych na BP (12 kobiet i 8 mężczyzn, w wieku od 59 do 89 lat, średnio – 72,51) oraz 21 osób z DH (14 kobiet i 7 mężczyzn, w wieku od 19 do 62 lat, średnio – 42,46), w aktywnym okresie choroby, przed włączeniem leczenia (zarówno miejscowego, jak i ogólnego). Grupę porównawczą stanowiło 10 zdrowych, niespokrewnionych osób (5 kobiet i 5 mężczyzn, w wieku od 48-78 lat, średnio – 63,3). Na wykonanie wszystkich badań uzyskano zgodę Komisji Bioetyki Uniwersytetu Medycznego w Łodzi (nr zgody RNN/132/07/KB) Rozpoznanie pemfigoidu i opryszczkowego zapalenia skóry było postawione na podstawie wywiadu,

objawów klinicznych oraz badań immunofluorescencyjnych bezpośredniego i pośredniego.

Barwienia immunohistochemiczne wykorzystano do oceny ekspresji białek JAK3, STAT2, STAT4 i STAT6 zarówno w zmianach skórnych, jak i w okolicy zmian oraz porównano z próbkami zdrowej skóry. Ekspresja była oceniona półilościowo przez dwóch niezależnych badaczy. Metodę Western blot wykorzystano do oceny ekspresji JAK1, JAK2, STAT1, STAT3, STAT5 w zmianach skórnych pacjentów BP i DH i porównano z grupą kontrolną. Przeciwciała przeciw STAT5 reagowały zarówno ze STAT5a jak i STAT5b. Uzyskane wyniki zostały wyrażone jako % gęstości optycznej powyżej tła. Wszystkie wartości zostały przedstawione w formie średniej \pm odchylenie standardowe. Rozkład danych i jednorodność wariancji były testowane przy wykorzystaniu ANOVA (WB), testu t-Studenta (immunohistochemia), a w uzasadnionych przypadkach użyto testu U Manna-Whitneya. Poziom istotności przyjęto dla $p < 0.05$.

Uzyskane wyniki poddane analizie statystycznej zostały szczegółowo udokumentowane w postaci tabel i rycin oraz czytelnie opisane. Ekspresja JAK1 była oceniona jako jedna z najwyższych u pacjentów z DH (140.27 ± 0.15), BP (141.10 ± 1.50) i w grupie kontrolnej (141.10 ± 0.51). Aczkolwiek nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic pomiędzy ekspresją białka w grupie kontrolnej i grupie DH ($p > 0.05$) oraz pomiędzy grupą kontrolną i pacjentami BP. Nie stwierdzono również istotnych statystycznie różnic pomiędzy pacjentami z BP a DH. Stwierdzono istotnie wyższą ekspresję JAK2 w zmianach chorobowych pacjentów z BP (133.48 ± 0.84) w porównaniu ze zmianami chorobowymi DH (130.21 ± 0.96 ; $p < 0.05$) i grupą kontrolną (130.42 ± 1.65 ; $p < 0.05$). Nie było istotnej statystycznie różnicy ($p > 0.05$) pomiędzy ekspresją JAK2 w zmianach DH i zdrową skórą. Ekspresja STAT1 została oceniona jako wyższa w zmianach chorobowych BP (145.83 ± 0.25) i DH (143.85 ± 3.09) w porównaniu z grupą kontrolną (136.28 ± 2.84 ; $p < 0.05$). Nie stwierdzono istotnie statystycznej różnicy pomiędzy ekspresją STAT1 w zmianach chorobowych DH i BP. Ekspresja STAT3 była wyższa w zmianach BP (138.39 ± 0.84) i DH (141.2 ± 0.05) w

porównaniu do skóry zdrowej (121.63 ± 1.75 ; $p < 0.05$). Stwierdzono również istotną statystycznie różnicę pomiędzy ekspresją STAT3 w zmianach DH a BP, na korzyść zmian DH. Ekspresja STAT5 była istotnie wyższa w zmianach BP (131.37 ± 2.55) i DH ($129,34 \pm 1.37$) w porównaniu z grupą kontrolną (123.48 ± 1.13 ; $p < 0.05$). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy ekspresją STAT5 w zmianach DH i BP. W wycinkach skóry zdrowej stwierdzono ekspresję JAK3 w obrębie naskórka, z najsilniejszym wybarwieniem przez przeciwciała anti-JAK3 warstwy rogowej.

Immunoreaktywność przeciwciał przeciw STAT2, STAT4 i STAT6 była bardziej zaznaczona w ziarnistej warstwie naskórka. W warstwie rogowej nie stwierdzono wybarwienia przeciwciał przeciw STAT2, STAT4, STAT6. Ekspresja JAK3 była wyższa w zmianach skórnych BP (18.19 ± 5.58) i zmianach DH (18.89 ± 4.67) w porównaniu z grupą kontrolną (10.73 ± 3.36 ; $p < 0.05$). Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą kontrolną a skórą z okolic zmian BP (12.54 ± 2.99 ; $p > 0.05$) i okolic zmian chorobowych DH (14.38 ± 3.61 ; $p > 0.05$). Ekspresja STAT2 była wyższa w zmianach chorobowych w BP (17.32 ± 2.69) i w zmianach DH (17.15 ± 2.81) w porównaniu z grupą kontrolną (11.06 ± 5.34 ; $p < 0.05$). Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy ekspresją STAT2 w grupie kontrolnej i skórze okolicy zmian BP (14.01 ± 2.38 ; $p > 0.05$), ale stwierdzono istotną statystycznie różnicę pomiędzy ekspresją STAT2 w grupie kontrolnej i skórze okolic zmian DH (15.79 ± 2.06 ; $p < 0.05$). Ekspresja STAT4 była wyższa z zmianach chorobowych DH (29.08 ± 4.38) i w zmianach chorobowych BP (25.13 ± 3.56) w porównaniu z grupą kontrolną (18.59 ± 3.01 ; $p < 0.05$). Stwierdzono również statystycznie istotną różnicę pomiędzy ekspresją STAT4 w grupie kontrolnej i skórze okolic zmian DH (24.10 ± 3.40 ; $p < 0.05$), lecz nie stwierdzono znaczącej różnicy pomiędzy ekspresją STAT4 w zdrowej skórze i skórze okolic zmian BP (21.05 ± 2.91). Średnia ekspresja STAT6 w zmianach skórnych BP (26.09 ± 4.45) i zmianach DH (27.85 ± 4.68) była wyższa w porównaniu z ekspresją białek w zdrowej skórze (11.56 ± 2.84 ; $p < 0.05$). Stwierdzono również istotne statystycznie różnice pomiędzy ekspresją STAT6 w grupie kontrolnej i skórze okolic zmian

BP (17.46 ± 2.41 ; $p < 0.05$), podobnie jak pomiędzy skórą zdrową i skórą okolic zmian DH (18.21 ± 3.49 ; $p < 0.05$). Na podkreślenie zasługuje dokumentacja fotograficzna, która w przekonujący sposób ilustruje opisane wyniki.

W dyskusji Doktorantka omawia wyniki swoich badań, próbując wyjaśnić wnioski wynikające z badań własnych przy pomocy podobnych badań w innych dermatozach oraz wpływem poszczególnych typów STAT na produkcję cytokin prozapalnych. W piśmiennictwie światowym nie ma jeszcze doniesień dotyczących badania szlaku sygnałowego JAK/STAT w tych dwóch dermatozach pęcherzowych, jest to praca nie tylko oryginalna, ale również nowatorska.

Autorka wnikliwie i krytycznie odnosi się do uzyskanych wyników, ostrożnie interpretuje uzyskane wyniki w odniesieniu do patogenezы, a szczególnie poszczególnych rodzajów białek JAK i STAT.

Pracę kończy 6 wniosków, logicznie wynikających z wyników przeprowadzonych badań, stanowiących odpowiedź na podjęte w celu pracy problemy i sugerujące możliwość wykorzystania tych badań do celów klinicznych. Wszystkie wnioski mają olbrzymie znaczenie, dlatego pozwolę sobie na ich powtórzenie:

1. Wykazana immunоекспресја białek ścieżki JAK/STAT w zdrowym naskórku sugeruje, że pewien konstytutywny poziom aktywności białek JAK/STAT jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania tej tkanki. Zróznicowana lokalizacja białek obejmująca poszczególne warstwy naskórka sugeruje funkcjonalną różnorodność białek JAK/STAT.

2. Na podstawie analizы uzyskanych wyników badań wykazano wzmożoną aktywację białek ścieżki sygnałowej JAK/STAT w zmianach chorobowych w pemfigoidzie pęcherzowym i w opryszczkowatym zapaleniu skóry, co świadczy o ich udziale w patogenezы obu jednostek chorobowych.

3. Brak istotnych różnic w ekspresji białka JAK1 pomiędzy grupą kontrolną a zmianami chorobowymi BP i DH sugeruje, że białko to nie

przyczynia się do patogenezy obu chorób pęcherzowych. Wolałbym i tak bym sugerował „nie ma większego znaczenia w patogenezie obu chorób pęcherzowych”

4. Różnice pomiędzy ekspresją białek JAK/STAT w zmianach chorobowych w pemfigoidzie w stosunku do zmian w opryszczkowatym zapaleniu skóry (JAK2 wyższa ekspresja w BP; STAT3, STAT4 wyższa ekspresja w DH) mogą mieć związek z innym charakterem nacieków zapalnych w obu chorobach: eozynofilowo-neutrofilowym w BP i neutrofilowym w DH.

5. Większa aktywacja białek ścieżki JAK/STAT w zmianach chorobowych w obu dermatozach niż w otoczeniu zmian z obecnymi tylko złogami immunoglobulin, świadczy o udziale białek ścieżki JAK/STAT w powstawaniu zmian zapalnych.

6. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że ścieżka JAK/STAT może być punktem uchwytu dla leków anty-JAK i anty-STAT w pemfigoidzie i opryszczkowatym zapaleniu skóry.

Cytowane piśmiennictwo, głównie w języku angielskim, liczy 274 odpowiednio i właściwie dobrane pozycje, w zdecydowanej większości z ostatnich kilku lat, co świadczy o nowoczesności podjętego zagadnienia i jego aktualności. Doktoranta wykazała się dobrą umiejętnością korzystania z bogatej literatury przedmiotu, zreżymie cytując właściwe pozycje piśmiennictwa, a dane z piśmiennictwa autorka wykorzystała umiejętnie zarówno we wstępie jak i w dyskusji. Nie mam najmniejszych zastrzeżeń merytorycznych, dotyczących doboru metod badawczych ani interpretacji wyników.

Z racji obowiązku recenzenta muszę stwierdzić, że Doktorantka nadużywa przyimka „iż”. Zupełnie zapomniała o przyimku „że”. „Iż” jest synonimem wspaniałego spójnika „że”. Znacząco dokładniej to samo, ale poza znaczeniem wszystko ma od „że” gorsze. „Iż” jest pretensjonalne, książkowe i nadęte. Rzadko, bardzo rzadko spotyka się je w kontekście, który sprawia, że „iż” brzmi normalnie. Przyimek „iż” jest podrzędny w stosunku do „że”, szczególnie należało użyć go na stronie 55 w drugiej części zdania: „Warto

podkreślić jednakże, „że” szereg danych wskazuje, „iż przekazanie sygnału zależnego od IFN- α”. Być może niepotrzebnie przyczepiam się do błędów językowych w polskiej wersji, bo jak się domyślam praca będzie publikowana w języku angielskim w wysoko impaktowanym czasopiśmie i wtedy nie ma znaczenia, czy został użyty przyimek „że” czy „iż”.

Ogólnie oceniam rozprawę doktorską lek. Katarzyny Juczyńskiej bardzo wysoko. Sposób opracowania pracy, wykonanie badań, dyskusja i opracowane wnioski świadczą o umiejętności prawidłowego zaplanowania badań i ich samodzielnego wykonania. Praca stanowi bardzo wartościowe studium patogenezy dwóch zupełnie innych autoimmunologicznych podnaskórkowych chorób pęcherzowych. Zastosowane metody badawcze świadczą o umiejętnym zaplanowaniu i rozwiązaniu problemu oraz o wszechstronnym przygotowaniu klinicznym Doktorantki. Dzięki wnikliwym badaniom Autorki została pogłębiona wiedza na temat roli ścieżki sygnałowej JAK/STAT w patogenezie BP i DH, chorób, w których zupełnie inne przeciwciała odgrywają zasadniczą rolę, jak również inne są nacieki komórek zapalnych, a mianowicie w BP dominują eozynofile, a w DH polimorfonukleary obojętnochłonne.

Przedstawiona do recenzji praca lekarza Katarzyny Juczyńskiej p.t. **„Ekspresja białek ścieżki sygnałowej JAK/STAT w wybranych autoimmunologicznych podnaskórkowych chorobach pęcherzowych”** spełnia ustawowe warunki określone dla rozpraw doktorskich.

W związku z powyższym mam zaszczyt przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego Łódzkiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o przyjęcie ocenianej pracy na stopień doktora nauk medycznych i dopuszczenie lek. Katarzynę Juczyńską do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie pozwolę sobie zwrócić uwagę, że ze względu na nowatorstwo tematyki i technik badawczych praca ta zasługuje na wyróżnienie i nagrodę, co uzasadniłem w powyższej recenzji.

KIEROWNIK
Katedry i Kliniki Dermatologii,
Chorób Przenoszonych Drogą Płciową
i Immunologii Klinicznej

prof. dr hab. n. med. Waldemar Placek

