

lek. med. Kamila Ociepa

Ocena ekspresji wybranych białek ścieżki JAK/STAT w dermatozach o podłożu autoimmunologicznym z zajęciem błony śluzowej jamy ustnej.

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych.

Katedra i Klinika Dermatologii i Wenerologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Promotor: dr hab. n. med. Agnieszka Żebrowska.

Łódź 2018

5. Streszczenie

Diagnostyka różnicowa chorób błony śluzowej jamy ustnej stanowi znaczący problem praktyki klinicznej, wynikający zarówno z szerokiego spektrum stanów patologicznych o zróżnicowanej etiologii, jak i braku cech charakterystycznych obrazów poszczególnych jednostek chorobowych. Praca dotyczy chorób o podłożu immunologicznym: pęcherzyca zwykła (pemphigus vulgaris, PV), pemfigoid pęcherzowy (bullous pemphigoid, BP, liszaj płaski jamy ustnej (czerwony Wilsona, lichen planus, LP), oraz przewlekłe wrzodziejące zapalenie błony śluzowej jamy ustnej (Chronic Ulcerative Stomatitis, CUS) o podobnym obrazie klinicznym obejmującym występowanie zmian pęcherzowych i pęcherzykowych oraz nadżerek w jamie ustnej.

Ścieżka sygnałowa JAK/STAT jest układem białek wewnątrzkomórkowych wykorzystywanych przez wiele cytokin i czynników wzrostu w celu ekspresji genów odpowiedzialnych za proces aktywacji, proliferacji i różnicowania komórek. Jest to podstawowy układ przekaźnikowy w populacji krążących monocytów i limfocytów angażujący wiele cytokin oraz ich receptorów. Prowadzone obecnie badania nad znaczeniem zaburzeń funkcjonowania ścieżki JAK/STAT ukazują jej znaczącą rolę w patogenezie chorób o podłożu autoimmunologicznym. Wydaje się zasadne podejrzenie że, może ona pełnić istotną rolę w patogenezie PV, BP, LP i CUS. Poznanie i zrozumienie istoty ścieżki JAK/STAT w mechanizmie prowadzącym do rozwoju chorób o podłożu autoimmunologicznym dałoby nowe możliwości diagnostyczne i terapeutyczne.

Celem badania jest:

1. Określenie ekspresji wybranych białek ścieżki sygnałowej JAK/STAT: JAK3, STAT2, STAT4, STAT6 w nabłonku błony śluzowej jamy ustnej osób chorych na pęcherzycę zwykłą, pemfigoid pęcherzowy, liszaj płaski oraz przewlekłe wrzodziejące zapalenie jamy ustnej.
2. Określenie ekspresji wybranych białek ścieżki sygnałowej JAK/STAT: JAK3, STAT2, STAT4, STAT6 w nabłonku błony śluzowej jamy ustnej 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 wybranych autoimmunologicznych chorób błony śluzowej w ich aktywnej fazie.

Do badania zakwalifikowano 67 chorych: 8 z PV, 11 z BP, 38 z LP, 5 z CUS. Grupę porównawczą stanowiło 5 osób bez zmian patologicznych na błonach śluzowych, które miały pobieraną śluzówkę w trakcie innych procedur stomatologicznych.

Rozpoznanie pęcherzycy zwykłej, pemfigoidu pęcherzowego, liszaja płaskiego nadżerkowego oraz CUS ustalono na podstawie wywiadu chorobowego, obrazu klinicznego oraz badań histopatologicznych i immunologicznych (DIF oraz IIF).

Do oceny ekspresji badanych białek wykorzystano oznaczenia immunohistochemiczne. Ekspresję oceniono półilościowo przez dwóch niezależnych badaczy.

Uzyskane wartości przedstawiono w formie średniej \pm odchylenie standardowe. Rozkład danych był testowany przy wykorzystaniu testu t-Studenta oraz w stosownych przypadkach użyto testu Mann-Whitney U. Wyniki uznano za znaczące statystycznie, jeśli $P < 0,05$.

Immunoreaktywność JAK3 oraz przeciwciał STAT4 została wykryta w paru komórkach w nabłonku błony śluzowej jamy ustnej w grupie kontrolnej. Immunoreaktywność STAT2 i przeciwciał STAT6 została wykryta w formie ogniskowej w nabłonku. Intensywność immunoekspresji STAT2 i STAT6 w prawidłowej błonie śluzowej jamy ustnej była średnia do umiarkowanej. Ekspresja JAK3, STAT2, STAT4 oraz STAT6 była cytoplazmatyczna i błonowa.

W badaniu ekspresji STAT2 w pęcherzycy nie stwierdziliśmy statystycznie istotnej różnicy ($p=0,58$) w porównaniu do grupy kontrolnej. W pemfigoidzie w porównaniu do grupy kontrolnej wynik również nie był statystycznie istotny ($p=0,38$).

W badaniu ekspresji STAT2 u pacjentów z CUS w porównaniu z grupą kontrolną różnica była istotna statystycznie ($p < 0,04$). Badanie ekspresji STAT-2 w grupie z liszajem płaskim w porównaniu do grupy kontrolnej dało również wynik istotny statystycznie ($P=0,02$) w porównaniu do grupy kontrolnej.

W badaniu ekspresji STAT4 w pęcherzycy w porównaniu do grupy kontrolnej otrzymaliśmy wynik znamieny statystycznie ($p=0,006$). W pemfigoidzie ekspresja STAT4 w porównaniu do grupy kontrolnej również jest statystycznie istotna ($p=0,001$).

Ekspresja STAT4 u pacjentów z CUS była porównywalna do ekspresji tego białka w grupie kontrolnej ($p < 0.06$). Ekspresja STAT4 u pacjentów z liszajem płaskim również była porównywalna z ekspresją w grupie kontrolnej ($p = 0,02$).

W badaniu ekspresji STAT6 u chorych na PV w porównaniu do grupy kontrolnej otrzymano wynik znamieny statystycznie ($p = 0,04$). W pemfigoidzie ekspresja STAT6 w porównaniu do grupy kontrolnej również była znamienna ($p = 0,02$). W badaniu ekspresji STAT6 u pacjentów z CUS nie odnotowano istotnej statystycznie różnicy ($p < 0.49$) w porównaniu z grupą kontrolną. W badaniu ekspresji STAT6 w grupie z liszajem płaskim otrzymano wzmożoną ekspresję w porównaniu do grupy kontrolnej ($p = 0,05$).

W badaniu ekspresji JAK3 w pęcherzycy w porównaniu do grupy kontrolnej wykazano istotną statystycznie różnicę ($p < 0,02$). W pemfigoidzie ekspresja JAK3 w porównaniu do grupy kontrolnej również jest statystycznie istotna ($p < 0,007$). W badaniu ekspresji JAK3 u pacjentów z CUS oraz liszajem płaskim w porównaniu z grupą kontrolną otrzymano również statystycznie istotną różnicę, odpowiednio: $p < 0.03$ oraz $p < 0,04$.

Przedstawione wyniki pozwoliły sformułować następujące wnioski:

1. Wykazana ekspresja wybranych białek ścieżki JAK/STAT w zdrowym nabłonku pozwala przypuszczać, iż pewien konstytutywny poziom aktywności białek JAK3, STAT2, STAT3 i STAT6 jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania nabłonka.
2. Na podstawie analizy uzyskanych wyników badań wykazano wzmożoną aktywację białek ścieżki sygnałowej JAK/STAT w zmianach chorobowych w pemfigoidzie pęcherzowym, pęcherzycy zwykłej, liszaju płaskim i przewlekłym wrzodziejącym zapaleniu błony śluzowej jamy ustnej, co świadczy o jej udziale w patogenezie wybranych jednostek chorobowych.
3. Różnice pomiędzy ekspresją białek STAT w zmianach chorobowych w pemfigoidzie i w pęcherzycy zwykłej (brak wzmożonej ekspresji STAT2) a CUS i LP (brak wzmożonej ekspresji STAT4) mogą mieć związek z inną patogenezą tych chorób i odmiennym mechanizmem tworzenia się nacieków zapalnych.
4. Uzyskane wyniki pozwalają przypuszczać, że ścieżka JAK/STAT może być punktem uchwytu dla leków stosowanych w opisanych jednostkach chorobowych.

5. Streszczenie w języku angielskim

The differential diagnostics of oral mucosa diseases poses a considerable challenge in clinical practice, which is due both to the wide spectrum of pathological conditions of diverse aetiology and the absence of features specific to different nosological entities. The study concerns autoimmune diseases: pemphigus vulgaris (PV), bullous pemphigoid (BP) lichen planus (LP) and chronic ulcerative stomatitis (CUS) with a similar clinical characteristics including the occurrence of bullous lesions and erosions in the oral cavity. The JAK / STAT signaling pathway is a system of intracellular proteins used by many cytokines and growth factors to express genes responsible for the process of cell activation, proliferation and differentiation. It is a basic relay system in the population of circulating monocytes and lymphocytes involving many cytokines and their receptors. There have been numerous inflammatory and autoimmune diseases identified where the JAK/STAT signaling is disrupted. Understanding the essence of the JAK/STAT signaling pathway in the mechanism leading to the development of autoimmune diseases would give new diagnostic and therapeutic possibilities.

The aim of this study was:

1. Determination of the expression of selected JAK/STAT: JAK3, STAT2, STAT4, STAT6 signaling pathways in the oral mucosa of patients with PV, BP, LP and CUS.
2. Determination of expression of selected JAK/STAT: JAK3, STAT2, STAT4, STAT6 signaling pathways in the healthy oral mucosa.
3. Determination of the role of selected JAK/STAT signaling pathway proteins in the differentiation of cytokine profile and inflammatory mass in selected diseases.
4. Indication of JAK/STAT signaling pathway proteins that may constitute a marker of selected autoimmune mucosal diseases in their active phase.

The research group consisted of 67 patients: 8 with PV, 11 with BP, 38 with LP and 5 with CUS. The control group comprised 5 healthy volunteers.

Diagnosis of PV, BP, LP and CUS was established based on medical history, clinical picture and, immunofluorescence findings (Direct Immunofluorescence test and Indirect Immunofluorescence test).

Immunohistochemical determinations were used to evaluate the expression of the examined proteins in lesional epithelium. The expression was evaluated semiquantitatively by

two independent researchers. The obtained values are presented in the form of mean \pm standard deviation. The data distribution was tested using the Student's t test and the Mann-Whitney U test was used where appropriate. The results were considered statistically significant if $P < 0.05$.

The immunoreactivity of JAK3 and STAT4 antibodies was detected in several cells in the oral mucosa in the control group. The immunoreactivity of STAT2 and STAT6 antibodies was detected in the epithelial focal form. The intensity of STAT2 and STAT6 immunoreactivity in the normal oral mucosa was moderate. Expression of JAK3, STAT2, STAT4 and STAT6 was cytoplasmic and membranous.

In the STAT2 expression in pemphigus, we did not find a statistically significant difference ($p = 0.58$) compared to the control group. In pemphigoid the result was also not statistically significant ($p = 0.38$) as compared to the control group. Expression of STAT2 protein was significantly higher in CUS patients ($p < 0.04$) and LP patients ($p < 0.02$) as compared to the control group. Expression of STAT4 protein was significantly higher in PV patients ($p = 0.006$) and BP patients ($p = 0.001$) as compared to the control group. There was no statistical difference in expression of STAT4 in CUS ($p < 0.06$) patients and LP ($p = 0.02$) patients as compared to the control group. Expression of STAT6 protein was significantly higher in PV patients ($p = 0.04$), BP patients ($p = 0.02$) and LP patients ($p = 0.05$) as compared to the control group. There was no statistical difference in expression of STAT6 in CUS patients ($p < 0.49$) as compared to the control group. Expression of JAK3 protein was higher in PV patients ($p < 0.02$), BP patients ($p < 0.007$), LP patients ($p < 0.04$) and CUS patients ($p < 0.03$) as compared to the control group.

On the basis of achieved results the conclusions were drawn as follows:

1. Expression of JAK/STAT proteins in healthy epithelium suggests, that some constitutive level of JAK/STAT activity is essential to normal function of the epithelium.
2. Achieved results revealed increased activation of JAK/STAT signaling pathway proteins in PV, BP, LP and CUS epithelial lesions, what indicates participation of the pathway in pathogenesis of these diseases.
3. Differences between the expression of STAT proteins in pathological changes in pemphigoid and pemphigus disease (no increased STAT2 expression) and CUS and LP (lack of increased STAT4 expression) may be related to a different pathogenesis of these diseases and a different mechanism of inflammatory infiltration.

4. Achieved results allow to assume that JAK/STAT signaling pathway might be a target for anti-JAK and anti-STAT drugs in the described disease entities.