

Ekspresja kinazy Jak3 i aktywacja białka Stat3 u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów i spondyloartropatie zapalne

Jak3 expression and Stat3 activity in patients with rheumatoid arthritis and spondyloarthritis

Joanna Krywejko^{1,2}, Dagmara Pokorna-Kałowak¹, Anna Czarny³, Ewa Zaczyńska³,
Magdalena Szmyrka-Kaczmarek², Piotr Wiland², Andrzej Steciwko¹

¹Katedra i Zakład Medycyny Rodzinnej Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,
kierownik Katedry i Zakładu prof. dr hab. med. Andrzej Steciwko

²Katedra i Klinika Reumatologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej im. Piastów Śląskich we Wrocławiu,
kierownik Katedry i Zakładu dr hab. med., prof. AM Piotr Wiland

³Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

Słowa kluczowe: reumatoidalne zapalenie stawów, spondyloartropatie zapalne, układ Jak/Stat, Jak3, Stat3.

Key words: rheumatoid arthritis, spondyloarthritis, Jak/Stat, Jak3 kinase, Stat3.

Streszczenie

Wstęp: Układ przekaźnikowy Jak/Stat (kinaza tyrozynowa Janus/sygnal transdukcji i aktywacji transkrypcji) jest wykorzystywany przez wiele cytokin, czynników wzrostu i hormonów regulujących mechanizmy transkrypcji genów oraz aktywacji, proliferacji, różnicowania i apoptozy komórek. Wyniki dotychczasowych badań wskazują, że kinaza Jak3 odgrywa istotną rolę w patogenezie reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS).

Cel pracy: Ocena ekspresji Jak3 oraz aktywacji Stat3 w leukocytach krwi obwodowej (LKO) i komórkach płynu stawowego (KPS) u chorych na RZS i spondyloartropatie zapalne (SpaZ) oraz analiza związku badanych parametrów ze wskaźnikami aktywności choroby używanymi w praktyce klinicznej. Ponadto analizie poddano zależności między ekspresją Jak3 a aktywacją Stat3.

Materiał i metody: Do badania zakwalifikowano 19 chorych na RZS oraz 22 chorych na SpaZ (zesztywniające zapalenie stawów, łuszczykowe zapalenie stawów, spondyloartropatia niezróżnicowana). Grupę kontrolną stanowiły 23 zdrowe osoby. W badanych grupach w LKO metodą immunocytochemiczną oznaczono ekspresję kinazy Jak3 i aktywację białka Stat3. Tą samą metodą oznaczono ekspresję Jak3 i aktywację Stat3 u 11 chorych na RZS i u 12 chorych na SpaZ w KPS. U chorych zostały oznaczone wartości parametrów stanu zapalnego oraz wskaźników aktywności choroby DAS28 i BASDAI. Wykonano rentgenogramy stawów zajętych procesem chorobowym.

Summary

Introduction: The Jak/Stat pathway (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) is used by many cytokines, hormones and growth factors involved in cellular mechanisms of gene expression, cellular activation, proliferation, differentiation and apoptosis. Data suggest that Jak/Stat activity is significant in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA).

Objectives: The objective was to evaluate the expression of Jak3 and the activity of Stat3 in synovial fluid cells (SFCs) and blood leucocytes (BLs) in patients with RA and spondyloarthritis (Spa) and compare it with parameters of disease activity used in clinical practice. Moreover, the relations between Jak3 expression and Stat3 activity were evaluated.

Material and methods: Nineteen patients with RA and twenty two patients with Spa (ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and undifferentiated spondyloarthritis) were involved in the study. Healthy individuals ($n = 23$) were recruited as a control group. In all groups the expression of Jak3 and the activity of Stat3 were measured using the immunocytochemic method in BLs. In 11 RA patients and in 12 Spa patients an expression of Jak3 and an activity of Stat3 were measured in SFCs. In patients laboratory parameters describing the activity of illness were measured. The X-ray pictures of the joints were also taken.

Results: In RA and Spa group, the expression of Jak3 and the activity of Stat3 were higher comparing to healthy subjects.

Adres do korespondencji:

dr med. Joanna Krywejko, ul. Gliniana 59/8, 50-525 Wrocław, tel. 604 19 53 54, e-mail: jkryw@poczta.fm

Praca wpłynęła: 12.07.2010 r.

Wyniki: Ekspresja Jak3 oraz aktywacja Stat3 były znacząco wyższe u chorych na RZS i SpaZ w porównaniu z grupą kontrolną. Wartości te były wyższe w KPS niż w LKO. U chorych na RZS zaobserwowano dodatnią korelację między aktywnością Stat3 w KPS a wartością CRP. Nie wykazano korelacji między ekspresją Jak3 a aktywnością Stat3.

Wnioski: Funkcja Jak3 i Stat3 jest związana z procesem immunologicznym w przebiegu RZS i SpaZ. Wydaje się, że zablokowanie ich funkcji może stanowić cel terapeutyczny w obydwu grupach chorych.

The expression of Jak3 and Stat3 activity were higher in SFCs than BLs. A positive correlation between SFCs Stat3 activity and CRP concentration was observed. There were no correlations between Jak3 expression and Stat3 activity.

Conclusions: The function of Jak3 and Stat3 is related to the immunologic process during the course a RA and Spa. It seems that blocking this function can be a therapeutic pathway in both groups of patients.

Wstęp

Wewnątrzkomórkowy układ przekaźnikowy Jak/Stat (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) jest układem białek wykorzystywanych przez wiele cytokin, czynników wzrostu i hormonów do ekspresji genów, przez które dokonuje się proces aktywacji, proliferacji, różnicowania i apoptozy komórek. Receptory błonowe tych związków (receptory typu I/II) nie mają aktywności enzymatycznej, lecz współdziałają z rodziną białek cytoplazmatycznych mających właściwości kinaz. Połączenie liganda z receptorem błonowym aktywuje związaną z nim kinazę tyrozynową, która ulega autofosforylacji, a następnie fosforyluje zwrótnie cytoplazmatyczne domeny receptora. Do aktywnych domen receptora przyłączają się białka Stat, które po procesie dimeryzacji zostają odłączone

od receptora i przemieszczone do jądra komórkowego, gdzie – wiążąc się z DNA odpowiedniego miejsca genu promotorowego – aktywują proces transkrypcji genów [1].

Kinaza tyrozynowa Jak3 należy do grupy enzymów wewnątrzkomórkowych, pozbawionych funkcji receptorowych, w skład której wchodzi Jak1, Jak2, Jak3, Tyk2. Białka te są aktywowane przez wiele cytokin i czynników wzrostu za pośrednictwem różnych receptorów. Kinaza Jak3 jest aktywowana za pośrednictwem receptora transbłonowego γc tylko przez IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 i IL-21 [2–4]. Cytokiny te łączą się także z innymi receptorami, natomiast pobudzają kinazę Jak3 tylko za pośrednictwem łańcucha γ . Efekt działania poszczególnych cytokin wiążących się z receptorem γc przedstawiono w tabeli I. Gen kinazy Jak3 został zlokalizowany w miejscu p13.2 chromosomu 19 [1].

Tabela I. Efekt działania interleukin wiążących się z receptorem γc
Table I. The effect of cytokines which signaling requires γc receptor

Cytokina	Efekt działania
IL-2	klonalny rozrost limfocytów T aktywacja cytotoksycznych limfocytów T i komórek NK różnicowanie komórek Th regulacja tolerancji i rozwoju regulatorowych limfocytów T
IL-4	zwiększenie różnicowania komórek Th2 antagonizm różnicowania komórek Th1 i aktywacji makrofagów regulacja funkcji komórek B i przełączania produkcji klas immunoglobulin wraz z IL-21 stymulacja mastocytów
IL-7	rozwój limfocytów T i B homeostaza limfocytów obwodowych wytwarzanie komórek pamięci – limfocytów CD8
IL-9	hiperplazja komórek kubkowych i produkcja śluzu
IL-15	rozwój, różnicowanie, przeżycie i aktywacja komórek NK homeostaza obwodowych limfocytów T wytwarzanie komórek pamięci – limfocytów CD8
IL-21	regulacja funkcji komórek B i przełączania produkcji klas immunoglobulin wraz z IL-4 prolifерacja i aktywacja komórek NK

Jak3 ulega ekspresji konstytutywnej na wysokim poziomie w komórkach NK oraz w tymocytach, natomiast ekspresji indukcyjnej może ulegać w limfocytach B, limfocytach T i komórkach szpiku kostnego [5, 6]. Badania przeprowadzone u chorych na artropatie zapalne wykazały zwiększoną ekspresję kinazy Jak3 w synowocytach, fibroblastach błony maziowej, komórkach CD45+, CD68+ oraz w komórkach dendrytycznych tych chorych w porównaniu z osobami zdrowymi [7–9].

U myszy utrata funkcji poszczególnych kinaz tyrozynowych skutkuje powstaniem ciężkich uszkodzeń organizmu i często jest letalna. Delecja genu kinazy tyrozynowej Jak3 nie jest natomiast letalna i skutkuje powstaniem ciężkiego wrodzonego zespołu niedoboru odporności (*severe combined immunodeficiency* – SCID), dziedziczonego autosomalnie dominująco. Powstaje fenotyp T–B+NK–. Myszy o fenotypie Jak3^{–/–} wykazują głębokie niedobory komórek progenitorowych grasicy i mniejszą zdolność odtwarzania komórek T oraz istotnie zmniejszoną liczbę obwodowych limfocytów CD8+ i komórek NK [10, 11]. Podobny fenotyp SCID, ale dziedziczony w sposób sprzężony z chromosomem X, powstaje wtedy, gdy dochodzi do delecji genu receptora γc . W obydwu przypadkach z powodu braku regulującej funkcji komórek T następuje upośledzenie aktywacji komórek B i zaburzenie produkcji przeciwciał, co przejawia się hipogammaglobulinemią i zaburzeniem wytwarzania przeciwciał w odpowiedzi na immunizację. Wynika z tego, że Jak3 odgrywa niezbędną rolę dla zależnego od receptora γc rozwoju limfocytów B i T i zapobiegania γc -zależnej apoptozy tymocytów [12, 13].

Kontrola limfopozy przez Jak3 zachodzi przez wybiórczą modyfikację ekspresji proapoptycznego białka Bax i antyapoptycznego białka Bcl-2. Tymocyty oraz obwodowe limfocyty T modeli zwierzęcych pozbawionych genu Jak3 wykazują dużą ekspresję Bax i zredukowane poziomy Bcl-2 w stosunku do osobników dzikich, co oznacza dużą podatność tych komórek na apoptozę. U tych osobników dochodzi do zaniku obwodowych limfocytów T i nieprawidłowego stosunku pomiędzy komórkami CD4+ i CD8+ [14].

Wyniki badań stały się podstawą do postawienia tezy, że zahamowanie aktywności kinazy Jak3 pozwoli na ograniczenie procesu zapalnego przez modyfikację funkcji komórek zapalnych. Zastosowanie specyficznego inhibitora Jak3 (CP-690,550) u szczurów, u których wywołano zapalenie stawów indukowane kolagenem (CIA) oraz adiuwantowe zapalenie stawów (AA), doprowadziło do zmniejszenia objawów klinicznych choroby oraz zmian strukturalnych tkanek objętych procesem zapalnym [15].

Dotychczasowe badania na modelach zwierzęcych doprowadziły do zainicjowania badań klinicznych z użyciem inhibitora Jak3 (CP-690550) u chorych na RZS

i pacjentów po przeszczepie nerki, których wyniki są bardzo obiecujące [16, 17].

Obecnie znanych jest 7 naturalnie występujących białek rodziny Stat, tj. Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b, Stat6, spośród których najpowszechniejsze jest Stat3. Jest ono aktywowane przez cytokiny, czynniki wzrostu, onkogeny i interferony [18]. Wykazano jego istotną rolę w procesach embriogenezy [19], regulacji wzrostu i apoptozy [20], regeneracji nabłonków i w procesach gojenia się ran [19], w tym przede wszystkim w reorganizacji cytoszkieletu i migracji komórek [21], w modulacji procesów immunologicznych i inwolucji gruczołu piersiowego [20].

Stat3 jest uwalnianie w sposób konstytutywny w komórkach nowotworowych, co wykazano w różnych typach nowotworów [22]. Jego udział w onkogenezie wyraża się zwiększoną ekspresją antyapoptotycznej rodziny białek Bcl, protoonkogenów myc i pim-1 oraz hamowaniem ekspresji białka Fas, co prowadzi do transformacji komórkowej [23].

Zaobserwowano, że mutacja receptora IL-6, powodująca nadreaktywność czynnika Stat3, warunkuje rozwój zapalenia stawów, a zablokowanie receptora dla IL-6 hamuje ten proces [24]. Wiodąca rola Stat3 w patogenezie zapalenia stawów polega na jego działaniu antyapoptotycznym i stymulującym wzrost synowocytów. Mechanizm tego działania polega na podtrzymaniu ekspresji onkogeny myc i supresji apoptotycznego sygnału modulowanego przez naskórkowy czynnik wzrostu (*epidermal growth factor* – EGF) i inne czynniki [25]. W następstwie tego synowocyty wykazują patologiczny fenotyp, charakteryzujący się wzmożoną proliferacją, opornością na apoptozę i inwazyjnością w stosunku do sąsiednich tkanek oraz ekspresją EGF i płytkopochodnego czynnika wzrostu (*platelet-derived growth factor* – PDGF).

Stat3 przypisywana jest zdolność stymulacji limfocytów T i produkcji przeciwciał, co jest jednym z kluczowych czynników w patogenezie autoimmunologicznego zapalenia stawów [20]. Powoduje też zahamowanie apoptozy oraz nasilenie proliferacji limfocytów T, a modyfikując funkcję komórek progenitorowych szpiku kostnego, hamuje granulopoezę [26]. Wykazano również, że pośrednictwo Stat3 w działaniu IL-6 jest niezbędne do zmniejszenia ekspresji transkrypcyjnego białka Foxp3 przez tę cytokinę [27]. To sugerowałoby, że poprzez hamowanie ekspresji białka Foxp3 i związaną z tym supresję limfocytów Treg Stat3 może wzmacniać procesy immunologiczne i odgrywać rolę prozapalną.

Celem badania była analiza ekspresji kinazy tyrozynowej Jak3 i aktywacji Stat3 w komórkach płynu stawowego i leukocytach krwi obwodowej (LKO) u chorych na reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) i spondyloartropatie zapalne (SpaZ) oraz poszukiwanie korelacji bada-

Tabela II. Rodzaj farmakoterapii stosowanej u pacjentów z RZS i SpaZ

Table II. Drugs USED in RA and Spa patients

Rodzaj leczenia	Liczba osób stosujących dany rodzaj terapii RZS	Liczba osób stosujących dany rodzaj terapii SpaZ
LMPCh (2 leki)	3 (0)*	1 (1)*
LMPCh (2 leki) + GKS	7 (2)*	2 (0)*
LMPCh (2 leki) + NLPZ	2 (0)*	6 (1)*
LMPCh (2 leki) + GKS + NLPZ	2 (1)*	1 (0)*
NLPZ	5	11
bez terapii	0	1

LMPCh – leki modyfikujące przebieg choroby, GKS – glikokortykosteroidy, NLPZ – niesteroidowe leki przeciwzapalne

*W nawiasach podano liczbę osób stosujących dwa LMPCh w danej podgrupie.

nych parametrów z aktywnością choroby, wskaźnikami procesu zapalnego oraz z zaawansowaniem choroby. Istotne było określenie, czy istnieją znaczące różnice w ekspresji Jak3 i aktywacji Stat3 pomiędzy grupą chorych na RZS a SpaZ.

Materiał i metody

Badaniem objęto grupę 41 chorych (25 kobiet i 16 mężczyzn), wśród których znajdowali się chorzy na RZS ($n = 19$), spełniający kryteria ARA (*American Rheumatism Association*) z 1997 r. (15 kobiet, 79%), oraz chorzy na SpaZ ($n = 22$), spełniający kryteria ESSG (*The European Spondyloarthropathy Study Group*) z 1991 r. (10 kobiet, 45%). Średni wiek chorych wynosił 48,6 roku (19–81 lat). Grupa chorych na SpaZ wykazywała zróżnicowanie pod względem rozpoznania – na spondyloartropatię niezróżnicowaną (SpaN) chorowało 9 osób, na tłuszczowce zapalenie stawów (tZS) – 7 osób, a zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa (ZZSK) rozpoznano u 6 osób.

Kryterium wykluczającym podczas kwalifikacji do badania było stosowanie ówczesnie lub uprzednio leków biologicznych, współistnienie ostrego lub przewlekłego procesu zapalnego innego niż zapalenie stawów i choroba nowotworowa stwierdzana obecnie lub w przeszłości. Grupę kontrolną stanowiły 23 zdrowe osoby, odpowiednio dobrane pod względem płci i wieku. Wszyscy uczestnicy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu.

W całej grupie chorych średni wiek wystąpienia pierwszych objawów choroby wynosił 41,2 ($\pm 16,38$) roku, średni czas trwania choroby – 82,16 ($\pm 84,87$) miesiąca (6,9 roku), a średni wiek chorych w chwili badania – 48,6 ($\pm 16,7$) roku. W grupie chorych na RZS średnia wieku wynosiła 58,5

($\pm 12,05$) roku, średni wiek wystąpienia objawów – 50,5 ($\pm 14,69$) roku, a średni czas trwania choroby – 7,6 ($\pm 6,34$) roku. Średni wiek chorych na SpaZ wynosił 40 ($\pm 15,53$) lat, średni wiek wystąpienia objawów to 33,2 ($\pm 13,45$) roku, średni czas trwania choroby – 6,31 ($\pm 7,91$) roku.

U wszystkich chorych stosowano standardową farmakoterapię. Aż 56% chorych przyjmowało niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ), a 29% osób było leczonych glikokortykosteroidami (GKS). Spośród leków modyfikujących przebieg choroby (LMPCh) chorzy stosowali metotreksat (14 osób), sulfasalazynę (9 osób), cyklosporynę A (3 osoby), leflunomid (2 osoby) i azatioprynę (1 osoba). Rodzaj farmakoterapii stosowanej przez chorych przedstawiono w tabeli II.

Ocena kliniczna chorych

U chorych zakwalifikowanych do badania oceniano kliniczną i laboratoryjną aktywność choroby. Oceny klinicznej dokonano na podstawie wywiadu lekarskiego, badania fizykalnego, liczby bolesnych i obrzękniętych stawów, oceny aktywności choroby wg chorego na 100-milimetrowej wizualnej skali analogowej (VAS), ogólnej oceny sprawności fizycznej chorego (u 10 chorych na RZS i SpaZ bez zajęcia stawów kręgosłupa do oceny tej zastosowano standardowy *Kwestionariusz oceny stanu zdrowia* – HAQ, a u chorych na SpaZ z zajęciem stawów szkieletu osiowego – wskaźnik sprawności funkcjonalnej Bath – BASFI). W obu grupach chorych oznaczano szybkość opadania krwinek (OB), stężenie białka C-reaktywnego (CRP) oraz wykonano morfologię krwi obwodowej.

Grupę chorych na RZS i SpaZ scharakteryzowano pod względem aktywności choroby, którą oceniono na podstawie wskaźników DAS28 i BASDAI. Grupę chorych na RZS podzielono na trzy podgrupy wg aktywności choroby, którą ustalono na podstawie wskaźnika DAS28: grupa A z małą aktywnością choroby ($DAS28 \leq 3,2$) – 4 osoby (21%), grupa B ze średnią aktywnością choroby ($3,2 < DAS28 \leq 5,1$) – 7 osób (37%), grupa C z dużą aktywnością choroby ($DAS28 > 5,1$) – 8 osób (42%). Grupę chorych na SpaZ podzielono na trzy podgrupy wg aktywności choroby, którą ustalono na podstawie wskaźników DAS28 i BASDAI. W grupie chorych na SpaZ wskaźnik DAS28 oznaczono u pacjentów z zajęciem tylko stawów obwodowych, a wskaźnik BASDAI – u chorych z zajęciem stawów szkieletu osiowego. I tak: grupa D z małą aktywnością choroby ($BASDAI \leq 3$, $DAS28$ jw.) – 5 osób (23%), grupa E ze średnią aktywnością choroby ($3 < BASDAI \leq 4$, $DAS28$ jw.) – 8 osób (36%), grupa F z dużą aktywnością choroby ($BASDAI > 4$, $DAS28$ jw.). Podstawową charakterystykę badanych grup pod względem aktywności choroby i sprawności chorych na podstawie odpowiednich wskaźników przedstawiono w tabeli III.

Tabela III. Aktywność choroby w grupie pacjentów z RZS i SpaZ
Table III. Activity of arthritis in RA and Spa patients

	Badany parametr	N	Średnia	Mediana	Min.	Maks.	SD
RZS	DAS28	19	4,53	5,04	1,74	6,4	1,46
	HAQ	19	1,23	1,30	0,00	2,375	0,738
SpaZ	BASDAI	12	4,90	5,00	2,40	7,90	2,10
	BASFI	12	4,20	3,60	1,60	9,60	2,40
	DAS28	10	3,80	3,50	2,70	6,10	0,99
	HAQ	10	0,7	0,6	0,1	2,0	0,54

N – liczebność grupy, min. – wartość minimalna, maks. – wartość maksymalna, SD – odchylenie standardowe

W celu oceny zaawansowania choroby wykonano rentgenogramy zajętych procesem chorobowym stawów w projekcji przednio-tylnej. Zaawansowanie zmian w stawach obwodowych było oceniane wg skali Steinbrockera, a zaawansowanie zmian w stawach krzyżowo-biodrowych na podstawie czterostopniowej, powszechnie używanej skali. W przypadku chorych na SpaZ, u których stwierdzono zajęcie stawów obwodowych i szkieletu osiowego, stopień zaawansowania choroby oceniano osobno w tych obszarach i choremu ostatecznie przypisywano wyższy stopień zaawansowania choroby, wynikający z tych dwóch klasyfikacji. Najliczniejszą grupę stanowili chorzy, u których stwierdzono mały (pierwszy i drugi) stopień zaawansowania choroby (ryc. 1).

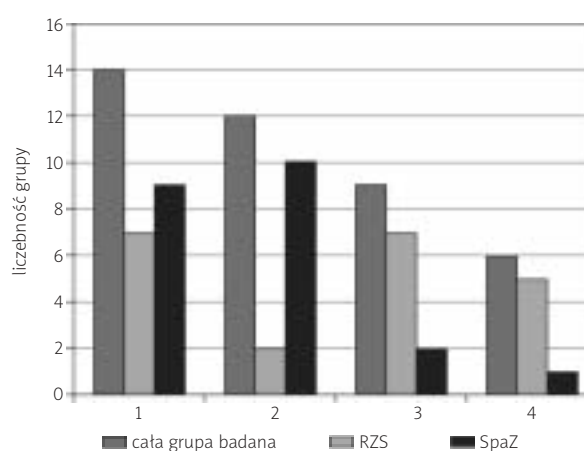
Metody badania ekspresji kinazy Jak3 i aktywacji czynnika transkrypcyjnego Stat3

U wszystkich chorych i u osób z grupy kontrolnej wykonano oznaczenia ekspresji kinazy Jak3 i czynnika transkrypcyjnego Stat3 w LKO. Ponadto u 24 chorych (11 chorych na RZS) oznaczono te parametry także w KPS.

Do oznaczenia ekspresji kinazy Jak3 i aktywacji białka Stat3 wykorzystano metody immunocytochemiczne. Ekspresję kinazy Jak3 oznaczono przy użyciu gotowych zestawów firmy Santa Cruz Biotechnology (USA), a aktywację czynnika Stat3 oznaczano za pomocą przeciwciał pierwszorzędowych firmy Chemicon International Inc. (USA) i zestawu DakoCytomation EnVision + System-HRP (DAB) firmy Dako Denmark A/S (Dania). Stosowano standardowe procedury dla każdej metody.

Ekspresję kinazy tyrozynowej Jak3 wyrażano przez odsetek komórek z zabarwioną cytoplazmą utrwalonych na szkiełkach (średnia z trzech preparatów).

Zakładając, że obecność białka Stat w obrębie jądra komórkowego jest tożsama z obecnością aktywnej formy tego białka, oceniano odsetek komórek z zabarwionym jądrem (średnia z trzech preparatów).



Ryc. 1. Stopień zaawansowania choroby.

Fig. 1. The degrees of the progress of arthritis.

Badania ekspresji Jak3 oraz aktywacji Stat3 przeprowadzono w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Metody statystyczne

Do analizy uzyskanych danych użyto standardowych metod statystycznych. Dla wszystkich zmiennych mierzalnych wyznaczono charakterystyki opisowe: średnią arytmetyczną, medianę, wartość minimalną i maksymalną, odchylenie standardowe i wariancję. Jako poziom istotności we wszystkich testach przyjęto $p = 0,05$.

Do testowania zgodności cech mierzalnych z rozkładem normalnym zastosowano test Shapiro-Wilka. Do porównywania dwóch grup użyto testu *t*-Studenta, w przypadku cech pochodzących z rozkładu normalnego i o jednorodnych wariancjach. Jednorodność wariancji sprawdzana była testem Bartletta. W przypadku gdy przynajmniej jeden z tych warunków nie został spełniony (cecha miała rozkład różny od normalnego lub wariancje w porównywanych grupach były niejednorodne), porów-

nania rozkładów cechy w tych dwóch populacjach dokonano nieparametrycznym testem U Manna-Whitneya. Test Kruskala-Wallisa stosowano do porównywania cechy w więcej niż dwóch populacjach. Przy badaniu związku między cechami mierzalnymi wykorzystano współczynniki korelacji. Dla par cech o rozkładach normalnych obliczono współczynniki korelacji Pearsona; dla par cech o rozkładach różnych od normalnego obliczono współczynniki korelacji rang Spearmana. Gdy korelacja Pearsona była istotna statystycznie ($p < 0,05$), wyznaczano funkcję liniową regresji. Do analizy statystycznej zastosowano program Statistica.

Tabela IV. Wyniki badań laboratoryjnych w grupie pacjentów z RZS i SpaZ

Table IV. Laboratory results in RA and Spa patients

Badany parametr (średnia ± SD)	Cała grupa	RZS	SpaZ
OB [mm/h]	27,8 ±19,9	32,6 ±22,5	23,7 ±17
CRP [mg/dl]	24,9 ±33,6	27,3 ±35,6	22,9 ±32,5
WBC [tys./μl]	7,6 ±2,8	8,1 ±2,9	7,2 ±2,7
RBC [mln/μl]	4,4 ±0,6	4,3 ±0,4	4,4 ±0,78
Hb [g/dl]	12,8 ±1,5	12,7 ±1,58	12,8 ±1,5
Ht [%]	38,8 ±6,8	37,3 ±8,8	40,1 ±4,3
MCV [fl]	88,9 ±6,3	91 ±4,9	87,2 ±6,9
PLT [kom./μl]	291731,7 ±94392,5	292157,9 ±73041,3	291363,6 ±111346,9
cytoza płynu stawowego [kom./μl]	9363 ±12471	8886 ±8850	9800 ±15473

Tabela V. Ekspresja Jak3 i aktywacja Stat3 w leukocytach krwi obwodowej (LKO) w badanych grupach

Table V. Expression of Jak3 and activation of Stat3 in BLs in all groups

Badany parametr (średnia ± SD)	Cała grupa	RZS	SpaZ	Grupa kontrolna
ekspresja Jak3 w LKO	25 ±15	24,8 ±16,6	25,18 ±13,9	1,17 ±0,9
aktywacja Stat3 w LKO	30,2 ±8,7	29,1 ±8,8	31,1 ±8,8	13,91 ±9,2

Wyniki

Parametry laboratoryjne

U wszystkich chorych wykonano oznaczenia podstawowych wskaźników stanu zapalnego – morfologii krwi obwodowej, OB i CRP. U 23 chorych wykonano punkcję stawu i oznaczono liczbę komórek płynu stawowego. Wyniki tych badań przedstawiono w tabeli IV.

Badane grupy różniły się istotnie statystycznie pod względem wieku chorych (58,5 roku vs 40 lat), wieku wystąpienia objawów choroby (50,5 vs 32,2 roku), stopnia zaawansowania choroby (2,6 vs 1,8), liczby obrzękniętych stawów (5,6 vs 2,7) i MCV (91,0 vs 87,2 fl) ($p < 0,05$).

Ekspresja Jak3 i aktywacja Stat3

Stwierdzono istotnie bardziej nasiloną ekspresję kinazy Jak3 i aktywację czynnika Stat3 w LKO w całej grupie badanej, w grupie chorych na RZS i grupie chorych na SpaZ w porównaniu z grupą kontrolną (test *t*-Studenta; $p < 0,05$) (tab. V). Różnice w wartościach badanych parametrów pomiędzy grupą chorych na RZS i SpaZ nie były istotne statystycznie (test *t*-Studenta; Jak3: $p = 0,93$; Stat3: $p = 0,46$).

Obserwowano istotnie większą ekspresję kinazy Jak3 w KPS w porównaniu z ekspresją w LKO, co wykazano w całej grupie badanej, u mężczyzn w tej grupie oraz u chorych na SpaZ. W przypadku Stat3 wykazano istotnie wyższą aktywację tego białka w KPS niż w LKO w całej grupie badanej i we wszystkich badanych podgrupach (tab. VI).

W żadnej z badanych grup nie obserwowano korelacji między stopniem ekspresji Jak3 a aktywacji Stat3.

W całej grupie badanej wykazano ujemne korelacje między ekspresją kinazy Jak3 w KPS a wartością HAQ i liczbą bolesnych stawów (współczynnik Spearmana – *s*; odpowiednio –0,44 i –0,43). W grupie wszystkich badanych kobiet wykazano ujemną korelację między ekspresją Jak3 w KPS a wartością HAQ ($s = -0,62$). W grupie mężczyzn stwierdzono ujemną korelację między ekspresją Jak3 w LKO (współczynnik Pearsona – *r*; $r = -0,56$) a wartością HAQ oraz dodatnią korelację między aktywacją Stat3 w KPS a wartością HAQ ($s = 0,72$).

W grupie chorych na RZS wykazane zależności między badanymi cechami dotyczyły tylko białka Stat3. Wykazano dodatnią korelację między aktywnością Stat3 w LKO a wiekiem chorych ($r = 0,63$) i wiekiem wystąpienia objawów ($r = 0,55$), ujemną korelację między aktywacją tego białka w LKO a liczbą obrzękniętych stawów ($s = -0,60$) oraz ujemną korelację między aktywacją Stat3 w KPS a czasem trwania choroby ($r = -0,69$) i dodatnią korelację między aktywacją Stat3 w KPS a stężeniem CRP ($r = 0,62$).

Tabela VI. Ekspresja Jak3 i aktywacja Stat3 w leukocytach krwi obwodowej (LKO) i komórkach płynu stawowego (KPS)**Table VI.** Expression of Jak3 and activation of Stat3 in BLs and SFCs

Badany parametr	LKO (średnia)	$p < 0,05$	KPS (średnia)
ekspresja Jak3 – cała grupa	25,00	+	39,7
ekspresja Jak3 – mężczyźni cała grupa	23,4	+	42,8
ekspresja Jak3 – kobiety cała grupa	26,0	–	37,1
ekspresja Jak3 – RZS	24,8	–	33,7
ekspresja Jak3 – SpaZ	25,2	+	44,8
aktywacja Stat3 – cała grupa	30,2	+	45,4
aktywacja Stat3 – mężczyźni cała grupa	29,6	+	41,4
aktywacja Stat3 – kobiety cała grupa	30,6	+	48,7
aktywacja Stat3 – RZS	29,1	+	45,3
aktywacja Stat3 – SpaZ	31,1	+	45,5

W grupie chorych na SpaZ wykazano ujemną korelację między wartością VAS a ekspresją kinazy Jak3 w KPS ($r = -0,72$).

Omówienie

Dotychczasowe doniesienia dotyczące aktywacji układu Jak/Stat w zapalnych chorobach stawów ograniczają się do badań komórek błony maziowej. Niewiele publikacji dotyczy funkcjonowania tego układu przekaźnikowego w komórkach krwi obwodowej i płynu stawowego, a niejednokrotnie brak w tych badaniach odniesienia do klinicznych wykładników aktywności choroby. Ocena taka wydaje się możliwa w sposób pośredni przy uwzględnieniu faktu, iż RZS i SpaZ są schorzeniami o charakterze układowym, w których zmiany stawowe są jednym z przejawów choroby.

Wiele opracowań na temat roli kinazy tyrozynowej Jak3 dotyczy chorych na RZS i w tej grupie chorych prowadzone są badania nad możliwością praktycznego wykorzystania inhibitorów układu Jak/Stat. Obecnie u chorych na RZS przeprowadzane są badania kliniczne substancji wybiórczo blokujących aktywność kinazy Jak3 oraz powstają kolejne selektywne inhibitory tego białka [17].

Nieliczne doniesienia dotyczą natomiast funkcji układu Jak/Stat w patogenezie spondyloartropatii zapalnych. Walker i wsp. oceniali zróżnicowanie ekspresji układu Jak/Stat u chorych na RZS, SpaZ i chorobę zwyrodnieniową stawów (ChZS) [7]. Do grupy chorych na SpaZ zakwalifikowano pięciu pacjentów chorych na SpaN, czterech chorych na ŁZS i jednego chorego z ZZSK. Chorzy byli leczeni LMPCh, NLPZ oraz GKS i allopurino-

lem. Grupę kontrolną stanowiły osoby zdrowe. Badanie ekspresji kinazy tyrozynowej Jak3 (oraz Stat1, Stat4, Stat6) przeprowadzono na komórkach błony maziowej pobranych drogą mikrobiopsji i oceniono metodą immunohistochemiczną. Stwierdzono istotnie większą ekspresję Jak3 w komórkach błony maziowej chorych na RZS i SpaZ w porównaniu z osobami zdrowymi. Także ekspresja Jak3 w tych komórkach była większa u chorych na ChZS niż w grupie kontrolnej, lecz mniejsza niż u chorych na RZS i SpaZ. Nie wykazano istotnej różnicy pomiędzy ekspresją Jak3 u chorych na RZS i SpaZ. Nie obserwowano też związku pomiędzy ekspresją kinazy Jak3 a wiekiem chorych, czasem trwania choroby, stężeniem CRP i stosowanym leczeniem. Ekspresja Jak3 była również duża w komórkach CD45+ i CD68+ [7]. W badaniu dotyczącym ekspresji Jak3 w komórkach dendrytycznych błony maziowej chorych na RZS także nie obserwowano związku pomiędzy ekspresją kinazy Jak3 a wiekiem chorych, czasem trwania choroby, stężeniem CRP i stosowanym leczeniem [9].

W innym badaniu Walker i wsp. metodą immunohistochemiczną oceniali wpływ terapii LMPCh na aktywację układu Jak/Stat w komórkach błony maziowej u chorych na RZS. Do badania zakwalifikowano 16 pacjentów, u których na podstawie wskaźnika DAS28 stwierdzono dużą aktywność choroby. U tych chorych oceniono ekspresję Jak3 przed rozpoczęciem terapii LMPCh i po 6-miesięcznym leczeniu. Jedenaście osób spełniało kryteria odpowiedzi na zastosowane leczenie (wg DAS28 i wg ACR). Ekspresję kinazy obserwowano w komórkach dendrytycznych CD1+, makrofagach CD68+ i limfocy-

tach T. W wyniku skutecznej terapii LMPCh u chorych nie doszło do znacznego zmniejszenia ekspresji kinazy Jak3 w komórkach błony maziowej, a do zaniku komórek dendrytycznych wykazujących ekspresję kinazy Jak3, co wskazywałoby na znaczący udział tych komórek w patogenezie RZS. U pięciu pacjentów, u których nie uzyskano dobrego wyniku terapeutycznego, nie obserwowano także znaczących zmian ekspresji Jak3 w komórkach błony maziowej i w komórkach dendrytycznych [8].

Wyniki niniejszej pracy przedstawiały się w sposób analogiczny, choć metody badań ekspresji Jak3 nieco się różniły. Podstawową różnicę stanowił materiał badawczy – Walker i wsp. wykorzystywali do badania komórki błony maziowej. Autorzy przedstawionego badania założyli, że jeżeli białka układu Jak/Stat będą aktywne w komórkach infiltrujących błonę maziową, to będą one także aktywne w komórkach płynu stawowego i krwi obwodowej. Założenie to oparto na powszechnie znanym zjawisku migracji leukocytów z krwi obwodowej do tkanek i odwrotnie oraz na ogólnoustrojowym charakterze choroby. W obydwu badaniach do oznaczenia ekspresji kinazy Jak3 oraz aktywności białek Stat zastosowano metodę immunohistochemiczną. W przedstawianym badaniu nie oznaczano typu komórek, w których obserwowano podwyższoną ekspresję kinazy Jak3.

W omawianym badaniu wykazano istotnie większą ekspresję kinazy Jak3 w LKO zarówno u chorych na RZS, jak i na SpaZ, w porównaniu z grupą kontrolną. Nie wykazano istotnych różnic wartości badanego parametru pomiędzy grupą chorych na RZS i SpaZ. Wydaje się więc, że pomimo różnic w manifestacji klinicznej tych chorób, w ich patogenezę w podobnym stopniu zaangażowane są te same szlaki transmisyjne, co stwarza szansę na zastosowanie inhibitorów Jak3 w leczeniu zarówno w RZS, jak i SpaZ.

W obu grupach chorych nie wykazano związku pomiędzy ekspresją Jak3 a czasem trwania choroby, wiekiem chorego, wartościami parametrów stanu zapalnego (m.in. CRP), wskaźnikami DAS28 i BASDAI. Nie wykazano także związku pomiędzy stopniem zaawansowania choroby a ekspresją Jak3 w KPS i LKO. Te wyniki, pomimo różnicy w użytym do badań materiale biologicznym, są zgodne z przedstawianymi w literaturze [7–9].

Nie wykazano korelacji pomiędzy ekspresją Jak3 a aktywacją Stat3 zarówno w KPS, jak i w LKO. Może to być związane z szerokim profilem cytokin aktywujących białka Stat, które w swoim szlaku transmisji sygnału wykorzystują także inne kinazy niż Jak3 [1].

Wykazano natomiast ujemną korelację pomiędzy ekspresją Jak3 w płynie stawowym a wartością HAQ i liczbą bolesnych stawów, dotyczącą całej grupy oraz grupy kobiet. Wykazano też ujemną korelację między ekspresją Jak3 w LKO a wartością HAQ u mężczyzn

(w całej grupie badanej) oraz ujemną korelację pomiędzy ekspresją Jak3 w KPS u mężczyzn chorych na SpaZ a wskaźnikiem VAS. Być może na takie wyniki miały wpływ leki inne niż LMPCh stosowane przez chorych zakwalifikowanych do badania (np. GKS i NLPZ), których zwiększone dawki choroby przyjmują w czasie wzrostu aktywności choroby i które mają działanie przeciwbólowe, zwiększając tym samym sprawność chorych i jednocześnie nie wpływając na ekspresję kinazy Jak3. Większość chorych zakwalifikowanych do badania stosowała LMPCh, NLPZ i GKS, natomiast w badaniu Walker i wsp. [8] chory stosowali tylko LMPCh, które nie wywierają bezpośredniego działania przeciwbólowego.

Wyniki prezentowanego badania wykazały różnice w stopniu ekspresji Jak3 pomiędzy KPS a LKO w poszczególnych grupach chorych. Obserwowano zwiększoną ekspresję Jak3 w KPS w porównaniu z ekspresją tego enzymu w LKO. Obserwacja ta dotyczyła całej grupy badanej, mężczyzn w tej grupie oraz chorych na SpaZ. Zwiększona ekspresja Jak3 w KPS może wynikać z większej intensywności procesu zapalnego w obrębie struktur stawu w porównaniu z toczącymi się w pozostałych układach organizmu. Pozostaje jednak pytanie, dlaczego taka obserwacja nie dotyczy chorych kobiet oraz chorych na RZS. Badane podgrupy chorych (RZS i SpaZ) różniły się istotnie statystycznie m.in. pod względem wieku chorych, wieku wystąpienia pierwszych objawów choroby i stopnia zaawansowania choroby (średnie tych wartości były statystycznie większe w grupie chorych na RZS). Być może czynniki te miały pewien wpływ na obserwowane wyniki. Na prezentowane różnice w ekspresji Jak3 u chorych w przeprowadzonym badaniu mogła mieć wpływ płęć chorych, ponieważ nie obserwowano różnicy w ekspresji Jak3 pomiędzy LKO a KPS w grupie chorych kobiet i chorych na RZS, w której była znacząca przewaga kobiet (15 kobiet, 4 mężczyzn). Ponadto grupa chorych na RZS różniła się pod względem stosowanego leczenia od grupy chorych na SpaZ – 14 chorych na RZS stosowało LMPCh, a 5 osób z tej grupy zażywało tylko NLPZ. W grupie chorych na SpaZ ponad 12 osób stosowało tylko NLPZ, a pozostałych 10 chorych zażywało LMPCh. Fakt ten mógł wpłynąć na obserwowaną różnicę w ekspresji Jak3 pomiędzy LKO a KPS. W dotychczas opublikowanym piśmiennictwie nie przedstawiono badań, które porównywałyby ekspresję Jak3 pomiędzy KPS a LKO, w związku z czym istnieje duża, obiektywna trudność w ustosunkowaniu się do otrzymanych wyników.

Pierwszymi badaczami, którzy wykazali rolę prozapalną Stat3 w patogenezie autoimmunologicznego zapalenia stawów, byli Wang i wsp. Poddawali oni działaniu zapalnego płynu stawowego komórki jednokomórkowe krwi obwodowej osób chorych na RZS i SpaZ. Celem

badania było stworzenie warunków podobnych do tych, w jakich znajdują się komórki jednojądrowe napływające z krwi obwodowej do zmienionego zapalnie stawu. Autorzy zaobserwowali hamowanie aktywacji Stat1, ale nie Stat3, w monocytach pod wpływem płynu stawowego, a ponadto wykazali obecność aktywnego Stat3 w komórkach izolowanych z płynu stawowego [28].

Rola Stat3 w RZS była badana również przez zespół Shouda, który oceniał aktywność Stat3 i SOCS3/CIS3 (naturalnych inhibitorów Stat3) w błonie maziowej chorych na RZS i ChZS, wykorzystując do tych badań również mysie modele zapalenia stawów – AIA i CIA. Aktywację Stat3 oceniano metodą immunohistochemiczną. Wykazano zwiększoną aktywację Stat3 i SOCS3 (wyrażoną poprzez CIS3 mRNA) w komórkach chorych na RZS w porównaniu z chorymi na ChZS. Po wykonaniu około-stawowej iniekcji adenowirusa wykazującego dużą ekspresję CIS3 zwierzętom chorym na AIA i CIA uzyskano znaczne zmniejszenie obrzęków stawów, ich deformacji i ankylozy, co potwierdzałoby bezpośrednio, prozapalne działanie Stat3 u chorych na RZS, do czego przychylają się inni badacze [29].

Krause i wsp. analizowali rolę Stat3 w funkcjonowaniu synowocytów u chorych na RZS. Do badanych kultur synowocytów transferowano sekwencję mutantu genu kodującego Stat3 o fenotypie Stat3^{-/-}, nazywanego Stat3-YF, który wykazywał nadekspresję Stat3^{-/-}, blokując przy tym ekspresję prawidłowego, komórkowego genu Stat3 oraz zależnych od niego protoonkogenów soCS3 i myc. W wyniku tego obserwowano zahamowanie wzrostu i spontaniczną apoptozę ponad 90% synowocytów. Doszło też do zmiany odpowiedzi komórkowej na EGF – zamiast stymulowania wzrostu komórek, obserwowano ich śmierć, w wyniku przejęcia dominującej roli przez proapoptotyczny sygnał Stat1 w komórkach z zahamowaną czynnością Stat3. Potwierdzeniem tego było zaobserwowane zmniejszenie śmiertelności synowocytów indukowanych przez EGF w liniach komórkowych, w których wprowadzono zarówno mutanty Stat3-YF, jak i Stat1-YF [25].

W prezentowanym badaniu aktywację Stat3 oceniono metodą immunocytochemiczną, podobnie jak w badaniu Shouda i wsp. [24]. Wykazano wyższy stopień aktywacji Stat3 w LKO w grupie badanej w porównaniu z grupą kontrolną. Zaobserwowano też wyższą aktywację Stat3 w KPS w porównaniu z jego aktywacją w LKO. Obserwacje te dotyczyły zarówno całej grupy badanej, jak i osobno chorych na RZS i SpaZ. Takie wyniki wskazują na znaczącą rolę Stat3 w patogenezie nie tylko RZS, ale także SpaZ. W badaniu tym nie wykazano zależności pomiędzy stopniem aktywacji Stat3 w KPS i LKO a aktywnością choroby mierzoną przy użyciu DAS28 i BASDAI. Obserwowano natomiast dodatnią korelację u wszystkich mężczyzn w grupie badanej między akty-

wacją Stat3 i HAQ. Fakt, że nie odnotowano takiej zależności u mężczyzn w poszczególnych grupach chorych, wynika być może z małej liczby mężczyzn (w porównaniu z całą grupą), szczególnie w grupie chorych na RZS. Brak takiej zależności u kobiet może natomiast wynikać z wpływu hormonów płciowych na aktywność Stat3 i z pewnością wymaga dalszej obserwacji.

Obserwowano także ujemną korelację między aktywacją Stat3 w komórkach płynu stawowego a czasem trwania choroby u osób z RZS. Być może wyjaśnienie tego zjawiska leży w zróżnicowaniu cytokinowym początkowej i przewlekłej fazy choroby, jakie zachodzi w przebiegu artropatii zapalnych, co może znajdować odzwierciedlenie w aktywności niektórych białek Stat. Tezę tę potwierdziły badania Ulfgrén i wsp., które wykazały, że u chorych na wczesne RZS synteza TNF- α , IL-1 α i IL-1 β w komórkach błony maziowej była znacznie większa niż u chorych z późną postacią RZS [30]. Ponadto początkowy okres choroby charakteryzuje się najczęściej jej dużą aktywnością, która zostaje przynajmniej częściowo stłumiona przez zastosowanie LMPCh oraz leków przeciwzapalnych, czemu może towarzyszyć zmniejszenie aktywacji Stat3.

W żadnej z badanych grup chorych nie obserwowano zależności między aktywacją Stat3 a stopniem zaawansowania choroby. Wykazano natomiast dodatnią korelację między aktywacją Stat3 w KPS a stężeniem CRP u chorych na RZS. Może to mieć związek ze zwiększonym stężeniem IL-6, aktywującej Stat3, i w mniejszym stopniu Stat1, które jest obserwowane w przebiegu RZS. Interleukina 6 za pośrednictwem Stat aktywuje geny kodujące białka ostrej fazy, białka związane z metabolizmem kostnym, regulatory apoptozy (bclx), czynniki transkrypcyjne i wiele innych [1]. Wyniki te potwierdzałyby więc znaczący prozapalny charakter białka Stat3, szczególnie w RZS. Stwierdzono jednak występowanie ujemnej korelacji między stopniem aktywacji tego białka w LKO chorych na RZS a liczbą obrzękniętych stawów ($s = -0,60$), co zaprzeczałoby prozapalnej funkcji Stat3 i co z pewnością wymaga przeprowadzenia dalszych badań nad funkcją Stat3 w patogenezie tej choroby.

Wnioski

Na podstawie analizy otrzymanych wyników można sformułować następujące wnioski:

1. Kinaza tyrozynowa Jak3 oraz czynnik transkrypcyjny Stat3 są związane z toczącym się procesem immunologicznym w przebiegu RZS i SpaZ – ich ekspresja i aktywacja jest wyższa u chorych w porównaniu z osobami zdrowymi.
2. Czynnik Stat3 prawdopodobnie wykazuje działanie prozapalne – jego aktywacja jest dodatnio skorelowa-

na ze stężeniem białka CRP, chociaż wykazuje ujemną korelację z liczbą obrzękniętych stawów.

3. Nie ma bezpośredniego związku pomiędzy ekspresją kinazy Jak3 a aktywacją czynnika Stat3, co prawdopodobnie jest związane z wpływem innych czynników modulujących aktywność tych białek.
4. Z uwagi na brak różnic w ekspresji kinazy Jak3 w LKO pomiędzy chorymi na RZS i SpaZ i na wyższy stopień ekspresji Jak3 w KPS niż w LKO u chorych na SpaZ oraz biorąc pod uwagę wyniki badań klinicznych z inhibitorem Jak3 u chorych na RZS, istnieją przesłanki co do podobnej skuteczności tej substancji również u chorych na SpaZ.

Piśmiennictwo

1. Rich RR. Clinical immunology: Principles and practice, 3rd Edition. Mosby Elsevier 2008.
2. Noguchi M, Yi H, Rosenblatt HM, et al. Interleukin-2 receptor gamma chain mutation results in X-linked severe combined immunodeficiency in humans. *Cell* 1993; 73: 147-157.
3. Asao H, Okuyama C, Kumaki S, et al. Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex. *J Immunol* 2001; 167: 1-5.
4. Pellegrini S, Dusanter-Fourt I. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem* 1997; 248: 615-633.
5. Gurniak CB, Berg LJ. Murine JAK3 is preferentially expressed in hematopoietic tissues and lymphocyte precursor cells. *Blood* 1996; 87: 3151-3160.
6. Tortolani PJ, Lal BK, Riva A, et al. Regulation of JAK3 expression and activation in human B cells and B cell malignancies. *J Immunol* 1995; 155: 5220-5226.
7. Walker JG, Ahern MJ, Coleman M, et al. Expression of Jak3, STAT1, STAT4 and STAT6 in inflammatory arthritis: unique Jak3 and STAT4 expression in dendritic cells in seropositive rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 149-156.
8. Walker JG, Ahern MJ, Coleman M, et al. Changes in synovial tissue Jak-STAT expression in rheumatoid arthritis in response to successful DMARD treatment. *Ann Rheum Dis* 2006; 65: 1558-1564.
9. Walker JG, Ahern MJ, Coleman M, et al. Characterisation of a dendritic cell subset in synovial tissue which strongly expresses Jak/STAT transcription factors from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 992-999.
10. Macchi P, Villa A, Giliani S, et al. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature* 1995; 377: 65-68.
11. Russell SM, Tayebi N, Nakajima H, et al. Mutation of Jak3 in a patient with SCID: essential role of Jak3 in lymphoid development. *Science* 1995; 270: 797-800.
12. Cao X, Shores EW, Hu-Li J, et al. Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. *Immunity* 1995; 2: 223-238.
13. Suzuki K, Nakajima H, Saito Y, et al. Janus kinase 3 (Jak3) is essential for common cytokine receptor gamma chain (gamma(c))-dependent signaling: comparative analysis of gamma(c), Jak3, and gamma(c) and Jak3 double-deficient mice. *Int Immunol* 2000; 12: 123-132.
14. Wen R, Wang D, McKay C, et al. Jak3 selectively regulates bax and Bcl-2 expression to promote T-cell development. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 678-689.
15. Milici A, Kudlacz E, Audoly L, et al. Cartilage preservation by inhibition of Janus kinase 3 in two rodent models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008; 10: R14.
16. Kanik K, Fleischmann R, Cutolo M, et al. Phase 2b dose ranging monotherapy study of the oral jak inhibitor CP-690,550 (CP) or adalimumab (ADA) vs placebo (PBO) in patients (PTS) with active rheumatoid arthritis (RA) with an inadequate response to DMARDS. *Ann Rheum Dis* 2009; 68 (Suppl 3): abstract 123.
17. Pesu M, Laurence A, Kishore N, et al. Therapeutic targeting of Janus kinases. *Immunol Rev* 2008; 223: 132-142.
18. Levy DE, Lee CK. What does Stat3 do? *J Clin Invest* 2002; 109: 1143-1148.
19. Akira S. Functional roles of STAT family proteins: lessons from knockout mice. *Stem Cells* 1999; 17: 138-146.
20. Akira S. Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 2000; 19: 2607-2611.
21. Debidda M, Wang L, Zang H, et al. A role of STAT3 in Rho GTPase-regulated cell migration and proliferation. *J Biol Chem* 2005; 280: 17275-17285.
22. Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 2002; 109: 1139-1142.
23. Ivanov VN, Bhoumik A, Krasilnikov M, et al. Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription. *Mol Cell* 2001; 7: 517-528.
24. Shouda T, Yoshida T, Hanada T, et al. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001; 108: 1781-1788.
25. Krause A, Scaletta N, Ji JD, Ivashkiv LB. Rheumatoid arthritis synoviocyte survival is dependent on Stat3. *J Immunol* 2002; 169: 6610-6616.
26. Lee CK, Raz R, Gimeno R, et al. STAT3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity* 2002; 17: 63-72.
27. Yao Z, Kanno Y, Kerény M, et al. Nonredundant roles for STAT5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* 2007; 109: 4368-4375.
28. Wang F, Sengupta TK, Zhong Z, Ivashkiv LB. Regulation of the balance of cytokine production and the signal transducer and activator of transcription (STAT) transcription factor activity by cytokines and inflammatory synovial fluids. *J Exp Med* 1995; 182: 1825-1831.
29. Ernst M, Inglese M, Waring P, et al. Defective gp130-mediated signal transducer and activator of transcription (STAT) signaling results in degenerative joint disease, gastrointestinal ulceration, and failure of uterine implantation. *J Exp Med* 2001; 194: 189-203.
30. Ulfgren AK, Gröndal L, Lindblad S, et al. Interindividual and intra-articular variation of proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis: potential implications for treatment. *Ann Rheum Dis* 2000; 59: 439-447.