

Received: 2006.04.03
Accepted: 2006.06.21
Published: 2006.07.24

Glikozaminoglikany w patogenezie i diagnostyce oftalmopatii Gravesa

Glycosaminoglycans in the pathogenesis and diagnostics of Graves's ophthalmopathy

Jacek Daroszewski¹, Jacek Rybka², Andrzej Gamian²

¹ Katedra Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami Akademii Medycznej we Wrocławiu

² Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych, Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN, im. L. Hirsfelda

Streszczenie

Oftalmopatia jest pozataarczycowym, swoistym narządowo objawem choroby Gravesa charakteryzującym się zapalnym naciekiem tkanek oczodołu. U kilku procent pacjentów ma przebieg ciężki, prowadząc do poważnych powikłań okulistycznych i zawsze powodując pogorszenie komfortu życia. Znaczny postęp w poznaniu patogenyzy GO dokonany w ostatnich latach nie znajduje bezpośredniego odbicia w zwiększeniu skuteczności leczenia pozostającego jednym z najtrudniejszych problemów endokrynologii klinicznej. Ważnym zagadnieniem w postępowaniu leczniczym u chorych z GO jest kwalifikacja do leczenia immunosupresyjnego w oparciu o ocenę aktywności procesu chorobowego.

Glikozaminoglikany są liniowymi, nierozgałęzionymi heteropolisacharydami zbudowanymi z powtarzających się disacharydowych sekwencji. Glikozaminoglikany stanowią ważne składniki tkanki łącznej i odgrywają zasadniczą rolę w jej organizacji i funkcjach; wykazano również ich udział w zapoczątkowaniu i regulacji procesów immunologicznych.

Przedstawiono ogólną charakterystykę GAG: ich strukturę i metabolizm, ze szczególnym naciskiem na rolę w patogenezie GO oraz swoistość narządową tkanek oczodołu. Podsumowano również dotychczasowe doniesienia dotyczące GAG a mogące mieć znacznie kliniczne w decyzjach terapeutycznych u chorych z GO.

Słowa kluczowe:

choroba Gravesa • oftalmopatia • glikozaminoglikany

Summary

Graves's ophthalmopathy is an extrathyroidal tissue-specific symptom of Graves's disease characterized by inflammatory infiltration of orbital tissues. In several percent of patients the course of disease is severe, leading to serious ocular complications and affecting quality of life. Progress made in understanding the pathogenesis of GO has not been followed by better outcome of treatment and it is still one of the most complex problems of clinical endocrinology. In this respect, qualification for immunosuppressive treatment based on an assessment of the disease activity is a matter of great importance. Glycosaminoglycans are linear, unbranched heteropolysaccharides built of repeating disaccharide sequences. These compounds are essential for the organization and function of connective tissue. Moreover, they also take part in the initiation and regulation of immune reactions. In this paper, glycosaminoglycans are described with regard to their structure, metabolism, and function, with special emphasis on the tissue specificity of the orbit. Data concerning GAG useful in the management of patients with GO are highlighted.

Key words:

Graves's disease • glycosaminoglycans • ophthalmopathy

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9492.pdf

Word count: 4343

Tables: –

Figures: –

References: 75

Adres autora: dr Jacek Daroszewski, Katedra Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami Akademii Medycznej we Wrocławiu, Wybrzeże L. Pasteura 4, 50-367 Wrocław; e-mail: daro48@o2.pl

WSTĘP

Choroba Gravesa jest częstym swoistym narządowo schorzeniem o podłożu autoimmunologicznym (zapadalność około 100/100 000/rok), przebiegającym zwykle z nadczynnością tarczycy [73]. Oftalmopatia towarzysząca tej chorobie (Graves' ophthalmopathy – GO), zwana także oftalmopatią endokrynną, jest najczęściej występującym objawem pozataarczycowym stwierdzanym u 30–60% chorych [2]. W większości przypadków choroba przebiega łagodnie z dolegliwościami okulistycznymi w postaci podrażnienia, poszerzenia szpary powiekowej lub nieznacznych obrzęków powiek, jednak u 5–10% chorych przebieg GO jest ciężki, mogący doprowadzić do trwałego uszkodzenia wzroku [2,6,45,49]. GO cechuje się naciekiem zapalnym powiek i spojówek, uszkodzeniem mięśni gałkoruchowych z upośledzeniem ich ruchomości, wypchnięciem gałek ocznych poza kostne brzozy oczodołu, uszkodzeniem rogówki i nerwu wzrokowego.

Cechą tkanki łącznej oczodołu mającą wpływ na obraz kliniczny oftalmopatii jest gromadzenie znacznych ilości glikozaminoglikanów (GAG) zmieniających strukturę tkanki łącznej, a także biorących czynny udział w procesie autoimmunologicznym [49].

Mimo znaczącego postępu w zrozumieniu patogenetycznego schorzenia, GO pozostaje jednym z najtrudniejszych i najbardziej kontrowersyjnych problemów endokrynologii klinicznej. Sposób leczenia GO jest zależny od fazy procesu chorobowego, której ocena opiera się na kryteriach klinicznych, badaniach radiologicznych, izotopowych i laboratoryjnych. Jednak dotychczas nie ustalono „złotego standardu” diagnostycznego, którego zastosowanie przyniosłoby poprawę w niezadowolających obecnie wynikach leczenia ciężkich zmian ocznych. Znaczenie jakie GAG odgrywają w patomechanizmie GO zwróciło uwagę na przydatność oznaczenia ich frakcji w diagnostyce i monitorowaniu leczenia.

PATOGENEZA GO

GO jest autoimmunologicznym zapaleniem tkanek oczodołu. W badaniu makroskopowym tkanki oczodołu w aktywnej fazie ciężkiej GO dominuje obrzęk, powiększenie wymiarów mięśni okoruchowych ze wzrostem objętości oczodołowej tkanki łącznej i tłuszczowej. Mikroskopowo stwierdzane są głównie dwa zjawiska patologiczne: nadmierne ilości GAG oraz silne nacieczenie tkanki łącznej i mięśni zewnętrznych oka dużą ilością makrofagów, limfocytów T i mniejsze ilości limfocytów B. Proces zapalny zapoczątkowany jest przez limfocyty T, które w odpowiedzi na nieznaną dotąd antygen z udziałem cząstek adhe-

zyjnych ulegają rekrutacji. Komórki T wydzielają cytokiny prozapalne stymulujące proliferację komórek, syntezę GAG w fibroblastach oraz nasilające różnicowanie i wzrost adipocytów. Ponadto wiele z powyższych czynników na drodze auto- i parakrynną wywiera wpływ na ekspresję cząstek immunomodulujących na fibroblastach i adipocytach [2,7,16,49].

Zasadniczą cechą procesów tkanki łącznej oczodołu mającą wpływ na obraz kliniczny oftalmopatii jest gromadzenie znacznych ilości GAG [67]. Olbrzymia hydrofilność tych związków prowadzi do zwiększenia objętości tkanek oczodołu, wzrost ciśnienia przestrzeni pozagałkowej i jest odpowiedzialna za wypchnięcie gałki ocznej poza kostne brzozy oczodołu oraz pozostałe objawy kliniczne.

Głównym miejscem wytwarzania i uwalniania GAG są fibroblasty. Komórki te w warunkach *in vitro* mają zdolność wytwarzania znacznych ilości siarczanu heparanu, siarczanu chondroityny, siarczanu dermatyny i kwasu hialuronowego (HA) [59]. Poza istotną rolę mechaniczną GAG pełnią także swoje funkcje fizjologiczne, które mogą mieć znaczenie w rozwoju GO. Informacje dotyczące tego zagadnienia zostaną przedstawione w dalszych częściach pracy.

FAZY ORBITOPATII

Koncepcja określenia aktywności choroby pochodzi z obserwacji naturalnego przebiegu oftalmopatii u chorych niepoddanych leczeniu. Na podstawie 30-miesięcznej obserwacji 12 chorych i pomiarów wytrzeszczu oraz funkcji mięśni gałkoruchowych Rundle wyodrębnił fazę aktywną cechującą się narastaniem objawów z okresami remisji, okres utrzymywania się objawów klinicznych w ich maksymalnym nasileniu oraz fazę ustępowania i stabilizacji zmian ocznych. U części chorych nawet w końcowej, stabilnej fazie, mimo pewnej remisji mogą nadal utrzymywać się ciężkie objawy oczne [51,74].

Z obserwacji tych wynika, że należy rozróżniać pojęcie aktywności procesu od jego nasilenia. Przebieg choroby jest bardzo indywidualny i trudny do przewidzenia, nie ma bowiem metod pozwalających na określenie jak długo będą trwały poszczególne okresy choroby u konkretnego pacjenta, w tym także jak długo będzie utrzymywać się faza narastania objawów i ich maksymalnego nasilenia. Ten okres może trwać od kilku miesięcy do ponad 5 lat [7]. Jeszcze mniej wiadomo o czynnikach wpływających na zakończenie procesów fazy aktywnej i przejściu choroby w fazę stabilną. Ten sam stopień nasilenia objawów można obserwować w okresie aktywnym jak i w okresie remisji. U części chorych nawet w końcowej, stabilnej fazie, mimo pewnej remisji mogą nadal utrzymywać

się ciężkie objawy GO prowadzące do ograniczenia funkcji i zmniejszenia jakości życia [52,74]. Z obserwacji tych wynika, że należy odróżniać pojęcie aktywności procesu od jego nasilenia.

Określenie fazy choroby w jakiej znajduje się pacjent jest niezwykle istotne w podjęciu decyzji o sposobie leczenia. Leczenie immunosupresyjne lub przeciwzapalne będzie skuteczne jedynie w fazie aktywnej zmniejszając proliferację limfocytów, fibroblastów i adipocytów, obniżając wytwarzanie GAG i zmniejszając obrzęk tkanek.

Podjęcie leczenia zachowawcze nie można się jednak spodziewać poprawy w końcowej fazie choroby, gdy dominują procesy włóknienia. Pacjent będący w tej fazie choroby powinien być poddany leczeniu chirurgicznemu. Należy brać pod uwagę to, iż niezależnie od przyjętego modelu leczenia immunosupresyjnego (glikokortykoidy podawane doustnie lub dożylnie, radioterapia oczodołów w trakcie lub po leczeniu glikokortykoidami) znacząca poprawa stwierdzana jest jedynie u około 70% pacjentów, u których zastosowane leczenie oparto jedynie o ocenę nasilenia objawów [19,37]. Pozostali chorzy są narażeni na objawy niepożądane lub powikłania leczenia nie uzyskując poprawy. Dlatego podjęcie decyzji o sposobie leczenia powinno być oparte nie tylko o określenie zaawansowania objawów, lecz także o ocenę fazy choroby. Można przypuszczać, że jeśli do postępowania zachowawczego zakwalifikowani zostaną jedynie chorzy w fazie ostrej, zwiększy się procent chorych, u których to leczenie jest skuteczne.

Współczesne podejście do postępowania leczniczego u pacjentów z GO w oparciu o ocenę fazy choroby leczenia wymaga znalezienia wiarygodnego i przydatnego w praktyce wskaźnika aktywności procesu zapalnego toczącego się w tkankach oczodołu. Ocena fazy ostrej GO może się opierać na parametrach klinicznych, badaniach obrazowych, oraz na wynikach badań laboratoryjnych.

Pewna weryfikacja wartości badania mającego zróżnicować fazy zapalenia wymagałaby szczegółowego badania histopatologicznego tkanek oczodołu, którego wykonanie nie jest jednak możliwe w trakcie leczenia. Dlatego za pośrednią miarę wartości metody oceny fazy aktywnej GO przyjmuje się możliwość prognozowania skuteczności lub nieskuteczności leczenia immunosupresyjnego.

Spośród metod biochemicznych obiecującym parametrem jest pomiar wydalania GAG w moczu oraz ich oznaczenie w surowicy [24,29]. Szerokie rozpowszechnienie tej grupy związków w organizmie powoduje konieczność uwzględnienia towarzyszących chorób wpływających na metabolizm GAG oraz poszukiwanie takiej ich frakcji, która byłaby swoista dla GO.

STRUKTURA GLIKOZAMINOGLIKANÓW

Glikozaminoglikany są to liniowe, nierozgałęzione heteropolisacharydy zbudowane z powtarzających się disacharydowych sekwencji. Podjednostki te w zależności od klasy glikanu, składają się z reszty N-acetylowanej heksozaminy (D-galaktozaminy lub D-glukozaminy) albo N-siarczanowanej D-glukozaminy oraz z reszty kwasu heksuronowego (D-glukuronowego lub L-iduronowego) albo galakto-

zy. W niektórych glikozaminoglikanach wykazano także obecność reszt L-fukozy, D-mannozy, D-ksylozy i kwasu N-acetyloneuraminowego. Obecność znacznej liczby reszt siarczanowych i karboksylowych w disacharydowych podjednostkach, budujących szkielet polisacharydowy GAG, nadaje łańcuchom glikozaminoglikanów charakter polianionów. Kwas hialuronowy wykazuje minimalną gęstość ładunku ujemnego, zawiera bowiem tylko jedną grupę karboksylową w pojedynczym disacharydzie. Maksymalna wartość ładunku ujemnego ma heparyna zawierająca trzy grupy siarczanowe oraz jedną grupę karboksylową w każdej z podjednostek [22].

Biorąc pod uwagę chemiczną budowę łańcuchów glikanowych można wyróżnić cztery następujące grupy GAG: glikozaminoglikany heparynowe (siarczany heparanu - HS0 oraz heparyna - H), glikozaminoglikany keratanowe (siarczany keratanu - KS), glikozaminoglikany chondroitynodermatanowe (siarczany dermatanu - DS, chondroitynodermatan - Ch-4-S, chondroityn-6-siarczany - Ch-6-S i chondroityna - Ch) oraz kwas hialuronowy (HA) [22].

Wszystkie GAG, poza kwasem hialuronowym, zawierają grupy siarczanowe oraz występują w połączeniu z białkami tworząc związki nazywane proteoglikanami (PG). Kwas hialuronowy (HA), w odróżnieniu od innych typów GAG, nie tworzy połączeń kowalencyjnych z białkami, lecz oddziałuje niekowalencyjnie z wieloma różnymi cząsteczkami w przestrzeni zewnątrzkomórkowej [33].

Wysoki ładunek ujemny netto cząsteczek GAG wpływa na ich stopień hydratacji i co za tym idzie – objętość. Jedna cząsteczka kwasu hialuronowego o masie 10^6 Da ma wymiar poprzeczny 4,000 Å i objętość $330\,000 \times 10^{-19}$ ml – 75 000 razy większa od tej, jaką zajmuje cząsteczka kolagenu o tej samej masie cząsteczkowej [1,49,60].

PROTEOGLIKANY

Proteoglikany są zbudowane z białkowego rdzenia, z którym jest związany jeden lub więcej łańcuchów GAG, jednego lub różnych typów. Łańcuchy glikanowe są połączone z białkiem rdzeniowym za pośrednictwem oligosacharydowego regionu łączącego przez wiązania kowalencyjne O- lub N-glikozydowe [33]. Proteoglikany mogą zawierać nawet do 100 i więcej łańcuchów glikozaminoglikanów, a ilość cukrów przypadająca na łańcuch polipeptydowy może sięgać aż 95% całkowitej masy proteoglikanu [3].

W proteoglikanach zarówno łańcuchy białkowe jak i glikozaminoglikany cechuje duża heterogenność, spowodowana głównie różną liczbą łańcuchów glikanowych tego samego rodzaju, przyłączonych do jednego typu białka rdzeniowego lub różną długością łańcuchów glikanowych tego samego rodzaju, przyłączonych do jednego typu białka rdzeniowego oraz możliwością występowania jednego typu białka rdzeniowego w połączeniach z łańcuchami GAG, należącymi do różnych klas.

BIOSYNTEZA GAG

Glikozaminoglikany są syntetyzowane jako proteoglikany w różnych typach komórek tkanki łącznej np. w fibroblastach czy chondrocytach. Proces biosyntezy proteoglika-

nów rozpoczyna się od powstania białek rdzeniowych na rybosomach. Następnie, już w aparacie Golgiego zachodzi synteza O-glikozydowo łączonych oligosacharydów oraz łańcuchów GAG. Synteza łańcuchów GAG rozpoczyna się od rozpoznania odpowiednich reszt aminokwasowych białka rdzeniowego i przeniesienia na nie pojedynczo, przez określone glikozylotransferazy, reszt cukrowych tzw. regionu łączącego. W procesie tym uczestniczy kilka enzymów. Następnie, do końca nieredukującego ostatniej reszty cukrowej regionu łączącego zostają naprzemiennie przyłączone reszty odpowiedniej N-acetyloheksosaminy oraz kwasu glukuronowego (lub galaktozy), co daje w rezultacie łańcuch glikozaminoglikanowy. Donorami reszt cukrowych, uczestniczących zarówno w syntezie regionu łączącego jak i w elongacji łańcucha glikanowego są odpowiednio UDP-pochodne [72]. Czynniki regulujące aktywność enzymów biorących udział w powyższym procesie nie zostały jeszcze dokładnie poznane. Przypuszcza się, że rodzaj syntetyzowanych GAG jest zdeterminowany strukturą białka rdzeniowego; obecność znacznej liczby hydrofobowych reszt aminokwasowych wydaje się faworyzować tworzenie łańcuchów heparanosiarczanowych [33]. W ostatnim etapie biosyntezy powstałe łańcuchy glikanowe podlegają procesowi modyfikacji zachodzącym w cysternach aparatu Golgiego i przebiegającym nieco odmiennie w zależności od klasy GAG. Proces ten obejmuje epimeryzację niektórych reszt kwasu glukuronowego do kwasu iduronowego oraz siarczanowanie reszt cukrowych. Modyfikacje te są przyczyną znacznej heterogenności w obrębie każdego typu GAG. W łańcuchach heparyny i siarczanu heparanu ten proces poprzedza N-deacetylacja i N-siarczanowanie niektórych reszt glukozyaminy [34]. Nieznane są czynniki kontrolujące ilość oraz usytuowanie reszt siarczanowych, jak również procesy epimeryzacji kwasu glukuronowego. Nieco odmiennie przebiega synteza kwasu hialuronowego, który jest wytwarzany w błonie komórkowej przez naprzemiennie przyłączanie reszt N-acetylglukozyaminy i kwasu glukuronowego. Powstały hialuronian nie podlega już dalszym modyfikacjom [22]. Kompletne polimery glikozaminoglikanów są uwalniane w wyniku proteolitycznej degradacji rdzenia białkowego PG.

KATABOLIZM GAG

Częściowa degradacja proteoglikanów może zachodzić w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Dokładna natura tego procesu nie jest do końca poznana, wiadomo jednak, że uczestniczą w nim dwa systemy enzymów: endoglikozydazy oraz enzymy proteolityczne [22]. Enzymy należące do pierwszego z nich atakują część cukrową kompleksu, powodując uwolnienie łańcuchów glikozaminoglikanów. Enzymy należące do drugiego systemu, trawią rdzeń białkowy proteoglikanów. Produktami tego trawienia są kompleksy, które składają się z fragmentów rdzenia białkowego o różnej wielkości połączonego z kilkoma łańcuchami GAG [48].

Całkowita degradacja proteoglikanów zachodzi wyłącznie wewnątrzkomórkowo – w przedziale lizosomalnym i jest poprzedzona endocytozą cząsteczek GAG. Stwierdzono istnienie dwóch szlaków degradacyjnych, na które mogą być kierowane proteoglikany chondroityno-dermatanowe oraz heparanosiarczanowe [33,72]. W pierwszym z nich wchłonięte związki są bezpośrednio transportowane do lizoso-

mów, w których ulegają całkowitemu rozpadowi. W drugim szlaku degradacji proteoglikany podlegają najpierw proteolizie i ograniczonej degradacji łańcuchów cukrowych w tzw. przedziale przedlizosomalnym. Powstałe produkty pośrednie są gromadzone w komórkach i dopiero po kilku godzinach ulegają całkowitemu i szybkiemu rozkładowi w lizosomach. Znaczenie drugiego szlaku nie zostało jeszcze całkowicie poznane. Powyższe szlaki degradacyjne zbiegają się w lizosomach, gdzie proteoglikany lub ich fragmenty ulegają całkowitej hydrolizie. Rozpad łańcuchów glikanowych katalizują endoglikozydazy, następnie egzoglikozydazy: β -glukuronidaza i α -L-iduronidaza – odszczepiające końcowe reszty kwasowe, α -N-acetylglukozyaminidaza i β -N-acetylheksosaminidaza – odszczepiające końcowe reszty heksozamin oraz β -galaktozydaza – odrywająca końcowe reszty galaktozy w degradowanych łańcuchach keratanosiarczanowych. W dalszej kolejności rozpad katalizowany jest przez sulfatazy, a wśród nich enzymy hydrolizujące estry siarczanowe w obrębie reszt kwasów heksuronowych i heksozamin. Egzoglikozydazy i sulfatazy działają w ściśle określonym porządku, zależnym od rodzaju degradowanego łańcucha, a sekwencja zdarzeń powtarza się, aż do rozpadu całego łańcucha glikanowego. Defekty genetyczne powodujące niedobór lub brak w organizmie jednego z enzymów szlaku metabolicznego GAG ujawniają się w postaci chorób, najczęściej o ciężkim przebiegu [33,48].

Do najważniejszych czynników regulujących metabolizm glikozaminoglikanów należą hormony (somatotropina, insulina, hormony steroidowe, czynniki wzrostowe), stężenie tlenu w komórce, skład macierzy zewnątrzkomórkowej, witamina A, C oraz D [31].

FUNKCJE GLIKOZAMINOGLIKANÓW

Glikozaminoglikany stanowią ważne składniki tkanki łącznej i odgrywają podstawową rolę w podtrzymywaniu i łączeniu komórek w tkanki, tkanek w organy oraz dalszą organizację w poszczególne części ciała. Makrocząsteczki te są bardzo ważne w fizjologii i patologii pojedynczych komórek i tkanek. Ponieważ wszystkie składniki pokarmowe oraz wszystkie metabolity są transportowane przez substancję podstawową, zmiany składu chemicznego oraz właściwości fizykochemicznych GAG w substancji podstawowej tkanki łącznej wpływają na procesy fizjologiczne i patologiczne w otaczających komórkach i tkankach [22].

Funkcje GAG i proteoglikanów są związane z ich wielkością oraz strukturą i bezpośrednio lub pośrednio zależą od polianionowego charakteru tych cząsteczek. Polianionowy charakter GAG wydaje się najistotniejszą z tych cech z punktu widzenia ich funkcji w zachowaniu strukturalnej integralności substancji międzykomórkowej tkanki oraz nadaniu jej pożądaných cech: sprężystości i elastyczności. Wynikiem polianionowego charakteru GAG jest również ich udział w wewnątrzkomórkowych procesach transportowych oraz ich powinowactwie do kationów. Konsekwencją tego ostatniego jest możliwość transportowania kationów i odkładania ich w tkankach. Obecność polianionowych proteoglikanów na powierzchni błon komórkowych leży z kolei u podstaw interakcji typu komórka-komórka oraz komórka-substrat, warunkując procesy adhezji i migracji komórek [34].

ODMIENNOŚĆ CZYNNOŚCIOWA FIBROBLASTÓW OCZODOŁOWYCH

W przeszłości fibroblasty traktowane były jako bierny uczestnik procesów fizjologicznych z funkcją ograniczoną jedynie do wytwarzania macierzy pozakomórkowej i kolagenu. Obecnie wiadomo, że uczestniczą także w złożonym procesie reakcji immunologicznych będąc źródłem czynników wzrostu, cytokin zapalnych i cząstek chemotaktycznych. Wiele danych wskazuje na niejednorodność populacji fibroblastów i mogącą z tego wynikać ich swoistość tkankową w ich morfologii i funkcji [18,41]. Także fibroblasty pochodzące z oczodołów różnią się od fibroblastów innych tkanek [6,32,56,58,59].

Fibroblasty oczodołów rozwijają się z ektodermy nerwowej, co może być przyczyną, iż wykazują różnice w stosunku do komórek pochodzących z innych regionów anatomicznych zarówno pod względem morfologii jak i ekspresji receptorów powierzchniowych, gangliozydów, cytokin zapalnych oraz CD 40 (cząstki należącej do rodziny receptorów TNF- α) [4,55,58,61].

W odróżnieniu od innych fibroblastów w warunkach *in vitro* mają one zdolność różnicowania do adipocytów, co może być związane z wysoką ekspresją PPAR- γ [62]. Zwiększenie objętości ciała tłuszczowego oczodołu jest jednym z głównych elementów patologii u części pacjentów z GO. Różnicowaniu się fibroblastów do adipocytów w oczodole towarzyszy zwiększona ekspresja receptora TSH [70], będącego obecnie głównym kandydatem do uznania za hipotetyczny wspólny antygen tarczycy i oczodołu odpowiedzialnego za tkankowo swoisty proces autoimmunologiczny. Choć frakcja fibroblastów mogących ulegać różnicowaniu do adipocytów jest stosunkowo niewielka i wynosi 5–20% z ogólnej populacji, szczególnie ważne poznanie czynników odpowiedzialnych za ten proces może mieć wpływ na postępowanie terapeutyczne u pacjentów z GO [65,71].

Wykazane odmienności czynnościowe fibroblastów oczodołowych mogą nie tylko wyjaśnić przyczynę szczególnej lokalizacji procesu autoimmunologicznego w tkankach oczodołu, lecz także mogą być przydatne w znalezieniu tkankowo swoistego wskaźnika aktywności GO.

CZYNNOŚCIOWA ROLA GAG W GO

Najwyraźniej zaznaczony wpływ działania cytokin prozapalnych na syntezę GAG przez fibroblasty oczodołu obserwowany jest w wytwarzaniu HA. W hodowli fibroblastów oczodołowych w wyniku stymulacji INF-gamma gromadzenie HA wzrasta o 50%, czego nie obserwuje się w przypadku fibroblastów skórnych [59]. Leukoregulina powoduje wzrost wytwarzania HA *de novo* ponad 15-krotnie. Stymulacja ta jest hamowana deksametazonem, natomiast nie wykazano hamującego działania inhibitorów prostaglandyn [63].

Choć wiele następstw nadmiernego gromadzenia HA w zakresie oczodołu w GO wynika z jego wpływu na zwiększenie objętości tkanek oczodołowych, rola HA w tym procesie nie ogranicza się tylko do czynnika mechanicznego, lecz ma związek z jego oddziaływaniem na przebieg procesu immunologicznego [49].

HA o małej masie cząsteczkowej ma wpływ na ekspresję genów komórek ekspozowanych na kompleksy węglowodanowe [43]. Szczególna zdolność HA do indukcji genów prozapalnych komórek immunokompetentnych może prowadzić do nasilenia odpowiedzi zapalnej [26].

Oddziaływanie HA na komórki docelowe zachodzi głównie za pośrednictwem błonowego receptora CD 44, przekazującego sygnał za pośrednictwem kaskady kinazowej [64]. Wzrost stężenia rozpuszczalnej postaci CD44 został stwierdzony w przebiegu chorób nowotworowych, zaś jego niski poziom w zespołach niedoborów immunologicznych. Oddziaływając poprzez CD 44 HA wpływa na różne funkcje komórki i przestrzeni pozakomórkowej o potencjalnym znaczeniu w patogenezie GO, takich jak mnożenie się komórek, migracja i oddziaływanie adhezyjne między składnikami tkanki łącznej i komórkami immunokompetentnymi. Dużą immunoreaktywność CD 44 stwierdzono w fibroblastach, składnikach macierzy pozakomórkowej oraz w komórkach jednojądrzastych pobranych z oczodołów pacjentów z GO. Nie znaleziono natomiast istotnych ilości CD 44 w próbkach tkanek oczodołowych pobranych od osób zdrowych [25].

Innym, mniej poznanym receptorem HA o potencjalnym znaczeniu jest RHAMM (Receptor for Hyaluronan Mediated Motility) wykazujący wysokie powinowactwo do HA [23]. Za pośrednictwem RHAMM kwas hialuronowy pobudza przemieszczanie się komórek, które podlega sygnałowi za pośrednictwem kinazy tyrozynowej.

W ostatnich latach opisano nową grupę receptorów TLRs (Toll-like receptors) należących do rodziny receptorów IL-1. Biorą one udział w aktywowaniu takich komórek immunokompetentnych jak makrofagi i komórki dendrytyczne [36,47,53,54,66]. Stwierdzono, że produkty degradacji HA są ligandami TLR-4 i za pośrednictwem tego receptora mają zdolność aktywowania komórek dendrytycznych [17].

Trzeba zaznaczyć, że badania nad oddziaływaniem biologicznym HA uwzględniające jego masę cząsteczkową, stopień polimeryzacji i ekspresję receptorów skupiają się głównie na procesach nowotworzenia, nie były natomiast skierowane na wyjaśnienie udziału HA w patogenezie GO.

Funkcją GAG, która może być istotna w patogenezie GO jest tworzenie kompleksów z cząstkami, które są potencjalnymi wspólnymi antygenami tarczycy i tkanek oczodołu. W tkankach oczodołów osób zdrowych oraz pacjentów z ciężką GO wyizolowano tyreoglobulinę (Tg), będącą białkiem swoistym tarczycy. Występowała ona zarówno w kompleksach z siarczanem chondroityny B i chondroityny C oraz z HA [38,42]. Zdolność tworzenia połączeń Tg z GAG wskazuje na potencjalny mechanizm gromadzenia tego swoistego dla tarczycy białka w przestrzeni oczodołowej, co mogłoby prowadzić do zainicjowania, lub – co bardziej prawdopodobne – do nasilenia procesu zapalnego.

GLIKOZAMINOGLIKANY W MOCZU

Mechanizm przedostawania się GAG do moczu nie został jednoznacznie wyjaśniony. GAG występujące we krwi –

będące produktami degradacji PG tkanki łącznej bądź komórek krwi – cechują się dużą masą cząsteczkową i wyższym stopniem usiarczanowania. Podczas wydzielania tych związków z tkanki łącznej do krwiobiegu oraz do moczu, w lizosomach wątroby ulegają one depolimeryzacji, desulfatacji bądź obydwu procesom jednocześnie [31]. Spośród 250 mg GAG katabolizowanych w ciągu dnia przez zdrową dorosłą osobę, jedynie 5–10 mg trafia do moczu, natomiast pozostała część ulega degradacji w organizmie [72].

Wydzielanie nerkowe odbywa się prawdopodobnie za pomocą filtracji kłębuszkowej, nie udowodniono jak dotąd ostatecznie ich reabsorpcji czy sekrecji kanalikowej [31]. W ten sposób do moczu są wydzielane w postaci wolnych łańcuchów GAG, uwalnianych przez białka wiążące, nie zaś całych proteoglikanów. Część proteoglikanów może zostać zdegradowanych do samych oligosacharydów, łańcuchy GAG w moczu mogą zawierać także część sekwencji wiążącej je z białkami wiążącymi w proteoglikanach lub nawet część białka wiążącego [48].

Występowanie w moczu niezdepolimeryzowanych GAG o dużej masie cząsteczkowej, może wskazywać na uszkodzenia i zaburzenia struktur, w budowie których uczestniczą. Wysokocząsteczkowe GAG mogą pochodzić również z ograniczonej degradacji proteoglikanów – substancji międzykomórkowej tkanki łącznej, budującej ściany dróg moczowych [31,72].

W porównaniu do GAG tkankowych, których masy cząsteczkowe wynoszą 13–30 kDa, GAG znajdujące się w moczu są znacznie mniejsze: frakcje siarczanu chondroityny 8–13 kDa, siarczanu dermatanu 16 kDa, frakcje siarczanu heparanu od 8 do około 30 kDa, kwas hialuronowy oraz chondroityna – 8 kDa. Wśród frakcji siarczanu heparanu największe molekuly (27–30 kDa) mają największą zawartość siarki. Stanowią one $\frac{1}{3}$ całkowitej zawartości siarczanu heparanu oraz mają bardzo zbliżony ciężar cząsteczkowy do siarczanu heparanu izolowanego z tkanki (24–29 kDa) [48].

Na ilość GAG wydalanych z moczem mają wpływ czynniki fizjologiczne i środowiskowe. Zwiększa się ono wraz ze zwiększeniem objętości tkanki łącznej i jest większe u osób o wysokim wzroście i u mężczyzn [48]. Spośród hormonów istotny wpływ na zwiększenie wydalania GAG ma hormon wzrostu [10]. Także estrogeny nasilają syntezę GAG, a progesteron ma zwiększać ich wydalanie [31]. Obserwowany jest rytm dobowy i sezonowy wydalania. Stopień ekskrecji jest o 10–15% większy w dzień niż w nocy. Jego maksymalne wartości obserwuje się wiosną i latem, co jest związane ze stymulacją metabolizmu kości, nasiloną syntezą witaminy D i przemianami PG. Na syntezę i wydalanie GAG ma wpływ także sposób odżywiania [72]. Nie jest jednak pewne, czy powyższe czynniki powinny być brane pod uwagę podczas klinicznej interpretacji wyników.

Dzięki znacznym różnicom między wydzielaniem GAG w ciągu dnia oraz w nocy wyniki otrzymane z próbek rannych są wyższe o 20–30% w stosunku do zbiórki 24-godzinnej [31]. Z tego powodu określenie ich dobowego wydzielania na podstawie badań moczu oddanego rano nie jest wystarczająco precyzyjne. Z tego powodu w ba-

daniach powinno się stosować pomiary w moczu zebranym w ciągu doby.

U dzieci wydalanie GAG z moczem jest największe podczas największego wytwarzania chrząstki kostnej i zaczyna spadać pod koniec wieku dojrzewania. W następnych okresach życia następuje dalszy spadek ich poziomu do wartości $13,4 \pm 5,3 \mu\text{mol}/24\text{h}$. Według danych literaturowych całkowita ilość prawidłowo wydzielonych GAG jest bardzo zmienna i waha się od 12 do $39 \mu\text{mol}/24\text{h}$ u dorosłych oraz od 10 do $48 \mu\text{mol}/24\text{h}$ u dzieci [72]. Dane literaturowe dotyczące wartości oznaczonych GAG w moczu różnią się znacząco. Jest to spowodowane prawdopodobnie stosowaniem różnych metod analitycznych, sposobem oraz czasem zbiórki materiału i wreszcie sposobem wyrażania wyników [9]. Zawartość poszczególnych klas GAG w moczu to około: chondroityno-4-siarczany 31%, chondroityno-6-siarczany 34%, chondroityna 25%, siarczany heparanu 8%, siarczany dermatanu 1%, siarczany keratanu 1%, kwas hialuronowy 1%, siarczany chondroityny (CS) mogą stanowić zatem aż 50–80% całkowitej ilości GAG u dorosłych i nawet 92% u dzieci [31].

OZNACZANIE GAG W MOCZU CHORYCH Z GO

Gromadzenie silnie hydrofilnych GAG w przestrzeni pozagąłkowej jest charakterystyczną cechą aktywniej fazy oftalmopatii. Dlatego też zainteresowanie pomiarem GAG, jako metodą przydatną w diagnostyce i monitorowaniu leczenia pacjentów z GO rozpoczęło się w latach 60. ub.w. i utrzymuje się do chwili obecnej [46,75].

Klasyczna metoda oznaczania glikozaminoglikanów całkowitych polega na ich izolacji z materiału badanego (mocz, surowica) poprzez strącanie z roztworu – najczęściej chlorkiem cetylopirydynowym lub bromkiem cetyltrimetyloamonowym – i następnie oznaczenie całkowitej ilości kwasów uronowych kolorymetryczną metodą z użyciem karbazolu [5,20] lub błękitu dimetylometylenowego [15].

Metodą pozwalającą na oznaczenie poszczególnych klas GAG w próbce była opisana w [27] technika HPLC disacharydów otrzymanych poprzez trawienie enzymatyczne GAG izolowanych z moczu. Inni autorzy izolowali wysokocząsteczkowe GAG z frakcji moczu za pomocą chromatografii sitowej; następnie analizowali je poprzez natywną elektroforezę w żelu agarowym z barwieniem błękitem toluidynowym i densytometrię [39].

Do oznaczania poszczególnych klas GAG używa się metod immunoenzymatycznych z użyciem swoistych przeciwciał, natomiast oddziaływanie kwasu hialuronowego z białkiem HABP (hyaluronid acid binding protein) wykorzystano do konstrukcji testów do specyficznego oznaczania HA [40,49].

Początkowe prace Kahalego i innych autorów oparte na reakcji z karbazolem po precypitacji GAG, oraz badania naszego zespołu potwierdziły wartość oznaczania wydalania GAG z moczem w ocenie fazy ostrej GO [11,12,14,28,29].

Istotne obniżenie (około 60%) wydalania GAG w moczu stwierdzono także u 9 pacjentów z ciężką oftalmopatią,

poddanych leczniczej plazmaferezie i następnie leczeniu immunosupresyjnemu [21]. Zaobserwowano także, że nawrotowi objawów ocznych towarzyszy wzrost ilości GAG wydalanych z moczem [69]. Seryjny pomiar GAG w moczu u 14 pacjentów z oftalmopatią przed i po leczeniu steroidami wykazał zmniejszenie wydalania GAG o połowę po zakończeniu leczenia, które korelowało z ustępowaniem objawów ocznych. Czulość pomiaru GAG w rozpoznaniu fazy aktywnej określono na 89%, a swoistość badania w określeniu fazy stabilnej na 85% [30]. Podobne zmniejszenie wydalanego GAG zaobserwowano u chorych z GO poddanych tygodniowej terapii okreotydem. Było ono przypisywane zmniejszeniu poziomu cytokin prozapalnych [8,35].

W grupie 56 pacjentów z EO w okresie zaostrzenia objawów obserwowaliśmy znamienny wzrost wydalania dobowego GAG z moczem w porównaniu z okresem remisji. Z kolei wydalanie w okresie remisji nie różniło się statystycznie od grupy kontrolnej złożonej z pacjentów z chorobą Gravesa bez klinicznie istotnych objawów GO [14]. Zmniejszenie wydalania GAG w następstwie leczenia glikosteroidami wykazaliśmy także w innej grupie 78 chorych z GO. Oceniona retrospektywnie zdolność przewidywania powodzenia leczenia steroidami wynosiła 94%, a niepowodzenia w leczeniu 81% [11,12].

Czynnikiem ograniczającym zastosowanie pomiaru wydalania GAG w praktyce klinicznej jest konieczność wykonania dobowej zbiórki moczu przez pacjenta i wynikające z tego błędy i niedogodności oraz pracochłonność izolacji GAG z moczu i następnie oznaczania ilości kwasów uronowych. Ponadto reakcji z karbazolem – poza GAG – mogą podlegać także inne związki zawierające glukuroniany, co może prowadzić do obniżenia swoistości pomiarów [68] i oprócz różnic metodologicznych powodować rozbieżności wyników skutkujące różnicami w ocenie stadium oftalmopatii [50].

GAG W TKANKACH OCZODOŁU I W SUROWICY

Odpowiedzi na pytanie o frakcję GAG charakterystyczną dla ostrej fazy GO i przydatną w oznaczeniach diagnostycznych mogłyby dostarczyć badania tkanek pobranych z oczodołów. W związku z trudnościami w uzyskaniu materiału tkankowego, szczególnie od pacjentów w określonej fazie procesu zapalnego, badania zawartości frakcji GAG w tkankach oczodołowych są nieliczne a ich wyniki rozbieżne.

Analiza biochemiczna tkanek pobranych z przestrzeni pozagąłkowej wykazała, że głównymi frakcjami GAG są HA (51%) oraz siarczan dermatanu (30%) natomiast siarczany chondroityny, siarczan heparanu i siarczan heparyny są gromadzone w mniejszych ilościach [57]. Proporcje zawartości różnych frakcji GAG są zależne od wieku: zawartość siarczanu dermatanu wykazuje stały wzrost z wie-

kiem, natomiast wyższe wartości HA były obserwowane w wieku młodszym [44].

Bardziej precyzyjne informacje na temat składu GAG w tkankach oczodołu uzyskano stosując enzymatyczną ilościową i jakościową analizę składu mieszaniny GAG izolowanych z tkanek. GAG izolowany chlorkiem cetylopirydynowym poddawano selektywnemu trawieniu liazami chondroityny i hialuronianu. Otrzymane disacharydy analizowano techniką HPLC i porównywano ze standardami, co pozwoliło określić zarówno skład poszczególnych frakcji GAG, jak i stopień ich podstawienia grupami siarczanowymi. Wyniki wskazują na wzrost stężenia siarczanu chondroityny oraz kwasu hialuronowego u pacjentów w porównaniu z grupą kontrolną, podczas gdy stężenie siarczanu dermatanu nie zmieniło się w znaczący sposób. Wzrósł również stopień podstawienia chondroityny i dermatanu resztami siarczanowymi, co niewątpliwie ma wpływ na wzrost zdolności wiązania wody przez te glikozaminoglikany i co za tym idzie przyczynia się do wzrostu ciśnienia w przestrzeni pozagąłkowej [24].

Pomiar stężenia GAG w surowicy u 37 chorych z GO, z których 23 było w fazie aktywnej wykazał ich istotnie wyższe stężenia u chorych przed rozpoczęciem leczenia steroidami. Po zastosowaniu leczenia immunosupresyjnego stężenia GAG nie różniły się od wartości stwierdzanych w grupie kontrolnej. Obniżenie stężenia GAG w surowicy odpowiadało poprawie klinicznej. Nie stwierdzono, by wiek, płeć lub stan funkcjonalny tarczycy wpływał na wynik pomiaru GAG [30].

W badaniu obejmującym 127 pacjentów w różnych fazach GO stwierdzono, że badanie wydalania GAG w moczu z ilościowym oznaczeniem siarczanów chondroityny i heparanu oraz stężenia kwasu hialuronowego w surowicy pozwoliły z dużym stopniem czułości i swoistości rozróżnić fazę aktywną GO od fazy stabilnej [39].

W badaniach przeprowadzanych przez nasz zespół ustaliliśmy, że spośród badanych klas GAG największym zmianom – w zależności od fazy choroby – ulega poziom kwasu hialuronowego w moczu. Badania przeprowadzone w grupie 55 pacjentów z GO wykazują, że również pomiar stężenia kwasu hialuronowego w surowicy pozwala na prognozowanie skuteczności leczenia glikokortykoidami [13].

Określenie frakcji GAG swoistej dla fazy ostrej powinno doprowadzić do uproszczenia metod jej oznaczania w moczu i surowicy, bez żmudnych etapów obróbki laboratoryjnej, a przez to do obniżenia kosztów i ułatwienia zastosowania badania w praktyce klinicznej. Wiarygodna, szybka metoda oznaczania poziomu tego biochemicznego markera fazy ostrej w surowicy znamionujących fazę ostrą oftalmopatii Gravesa przyczyni się niezmiernie do poprawy klinicznej oceny stanu pacjenta i co za tym idzie skuteczności leczenia.

PIŚMIENICTWO

- [1] Bahn R.S.: Clinical review 157: Pathophysiology of Graves' ophthalmopathy: the cycle of disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003; 88, 1939–1946
- [2] Bahn R.S., Heufelder A.E.: Pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *N. Engl. J. Med.*, 1993; 329, 1468–1475
- [3] Barry F.: Proteoglycans: structure and function. *Biochem. Soc. Trans.*, 1990; 18, 197–198
- [4] Berenson C.S., Smith T.J.: Human orbital fibroblasts in culture express ganglioside profiles distinct from those in dermal fibroblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995; 80, 2668–2674
- [5] Bitter T., Muir H.M.: A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 1962; 4, 330–334
- [6] Borrello M.A., Phipps R.P.: Differential Thy-1 expression by splenic fibroblasts defines functionally distinct subsets. *Cell Immunol.*, 1996; 173, 198–206
- [7] Burch H.B., Wartofsky L.: Graves' ophthalmopathy: current concepts regarding pathogenesis and management. *Endocr. Rev.*, 1993; 14, 747–793
- [8] Chang T.C., Yao W.C., Chang C.C.: Octreotide and urinary glycosaminoglycan in Graves' disease. *BMJ*, 1992; 304, 1444
- [9] Doroszewski J.: Metody oceny aktywności oftalmopatii endokrynnej. *Terapia*, 2001; 2, 30–32
- [10] Doroszewski J., Bolanowski M., Gamian A., Rybka J., Spring A.: The use of glycosaminoglycan excretion measurements in the assessment of the organic complications in acromegaly. *Pol. J. Endocrinol.*, 2001; 52, 347–352
- [11] Doroszewski J., Pelczar E., Bolanowski M., Gamian A., Rybka J.: Glycosaminoglycans urine excretion as a predictor of therapeutic outcome in Graves' ophthalmopathy patients. Abstract Book 11th International Congress of Endocrinology, Sydney, 29.10.–02.11.2000, 2000
- [12] Doroszewski J., Pelczar E., Bolanowski M., Gamian A., Rybka J.: Glycosaminoglycans excretion and serum IL-6 levels in the endocrine ophthalmopathy patients treated with pentoxifylline and methylprednisolone. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 2004; 13, 35–39
- [13] Doroszewski J., Pelczar E., Bolanowski M., Rybka J., Gamian A.: Serum hyaluronic acid as a predictor of the outcome of the treatment of Graves' ophthalmopathy. Proceedings of European Congress of Endocrinology, Goeteborg, 2005; P2–124
- [14] Doroszewski J., Pelczar E., Grabiński M., Gamian A., Rybka J.: Glycosaminoglycans urine excretion as a marker of the acute phase of Graves' ophthalmopathy. *J. Endocrinol. Invest.*, 1997; 20(Supl.5): 94
- [15] de Jong J.G., Wevers R.A., Laarakkers C., Poorthuis B.J.: Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clin. Chem.*, 1989; 35, 1472–1477
- [16] Feldon S.E., Park D.J., O'Loughlin C.W., Nguyen V.T., Landskroner-Eiger S., Chang D., Thatcher T.H., Phipps R.P.: Autologous T-lymphocytes stimulate proliferation of orbital fibroblasts derived from patients with Graves' ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2005; 46, 3913–3921
- [17] Fieber C., Baumann P., Vallon R., Termeer C., Simon J.C., Hofmann M., Angel P., Herrlich P., Sleeman J.P.: Hyaluronan-oligosaccharide-induced transcription of metalloproteases. *J. Cell Sci.*, 2004; 117, 359–367
- [18] Fries K.M., Blieden T., Looney R.J., Sempowski G.D., Silvera M.R., Willis R.A., Phipps R.P.: Evidence of fibroblast heterogeneity and the role of fibroblast subpopulations in fibrosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1994; 72, 283–292
- [19] Gayno J.P., Strauch G.: Cyclosporine and Graves' ophthalmopathy. *Horm. Res.*, 1987; 26, 190–197
- [20] Glatz C.E., Massaro T.A.: Influence of glycosaminoglycan content on mass transfer behavior of porcine artery wall. Part 2. Differences in mass transfer rates related to variations in glycosaminoglycan content. *Atherosclerosis*, 1976; 25, 165–173
- [21] Glinioer D., Etienne-Decerf J., Schrooyen M., Sand G., Hoyoux P., Mahieu P., Winand R.: Beneficial effects of intensive plasma exchange followed by immunosuppressive therapy in severe Graves' ophthalmopathy. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, 1986; 111, 30–38
- [22] Głowacki A., Koźma E. M., Olczyk K., Kucharz E.J.: Glikozaminoglikany – struktura i funkcja. *Post. Biochem.*, 1995; 41, 139–148
- [23] Hall C.L., Wang C., Lange L.A., Turley E.A.: Hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM promote focal adhesion turnover and transient tyrosine kinase activity. *J. Cell Biol.*, 1994; 126, 575–588
- [24] Hansen C., Rouhi R., Forster G., Kahaly G.J.: Increased sulfatation of orbital glycosaminoglycans in Graves' ophthalmopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999; 84, 1409–1413
- [25] Heufelder A.E., Bahn R.S., Boergen K.P., Scriba P.C.: Detection, localization and modulation of hyaluronic acid/CD44 receptor expression in patients with endocrine orbitopathy. *Med. Klin. (Munich)*, 1993; 88, 181–184, 277
- [26] Kaback L.A., Smith T.J.: Expression of hyaluronan synthase messenger ribonucleic acids and their induction by interleukin-1beta in human orbital fibroblasts: potential insight into the molecular pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999; 84, 4079–4084
- [27] Kahaly G., Forster G., Hansen C.: Glycosaminoglycans in thyroid eye disease. *Thyroid*, 1998; 8, 429–432
- [28] Kahaly G., Hansen C., Stover C., Kuhlemann K., Beyer J., Otto E.: Glycosaminoglycans and Endocrine Orbitopathy. *Exp. Clin. Endocrinol.*, 1994; 102, 151–161
- [29] Kahaly G., Schuler M., Sewell A.C., Bernhard G., Beyer J., Krause U.: Urinary glycosaminoglycans in Graves' ophthalmopathy. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 1990; 33, 35–44
- [30] Kahaly G., Stover C., Otto E., Beyer J., Schuler M.: Glycosaminoglycans in thyroid-associated ophthalmopathy. *Autoimmunity*, 1992; 13, 81–88
- [31] Kaznowska-Bystryk I., Chlebus D.: Wydalanie glikozaminoglikanów (GAG) z moczem – znaczenie diagnostyczne. *Diagn. Lab.*, 2000; 36, 93–101
- [32] Koumas L., King A.E., Critchley H.O., Kelly R.W., Phipps R.P.: Fibroblast heterogeneity: existence of functionally distinct Thy 1(+) and Thy 1(–) human female reproductive tract fibroblasts. *Am. J. Pathol.*, 2001; 159, 925–935
- [33] Koźma E.M., Głowacki A., Olczyk K., Jaźwiec M.: Proteoglikany – struktura i funkcja. *Post. Biochem.*, 1997; 43, 158–172
- [34] Kula B., Jurczak T., Przeniosło L., Pawłowska-Góral K., Szade A., Wardas M.: Glikozaminoglikany (GAG) – właściwości, występowanie i funkcja. *Ann. Acad. Med. Siles.*, 1995; 273–281
- [35] Kung A.W., Michon J., Tai K.S., Chan F.L.: The effect of somatostatin versus corticosteroid in the treatment of Graves' ophthalmopathy. *Thyroid*, 1996; 6, 381–384
- [36] Lien E., Means T.K., Heine H., Yoshimura A., Kusumoto S., Fukase K., Fenton M.J., Oikawa M., Qureshi N., Monks B., Finberg R.W., Ingalls R.R., Golenbock D.T.: Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide. *J. Clin. Invest.*, 2000; 105, 497–504
- [37] Marcocci C., Bartalena L., Bogazzi F., Bruno-Bossio G., Lepri A., Pinchera A.: Orbital radiotherapy combined with high dose systemic glucocorticoids for Graves' ophthalmopathy is more effective than radiotherapy alone: results of a prospective randomized study. *J. Endocrinol. Invest.*, 1991; 14, 853–860
- [38] Marino M., Lisi S., Pinchera A., Marcocci C., Menconi F., Morabito E., Macchia M., Sellari-Franceschini S., McCluskey R.T., Chiovato L.: Glycosaminoglycans provide a binding site for thyroglobulin in orbital tissues of patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid*, 2003; 13, 851–859
- [39] Martins J.R., Furlanetto R.P., Oliveira L.M., Mendes A., Passerotti C.C., Chiamolera M.I., Rocha A.J., Manso P.G., Nader H.B., Dietrich C.P., Maciel R.M.: Comparison of practical methods for urinary glycosaminoglycans and serum hyaluronan with clinical activity scores in patients with Graves' ophthalmopathy. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2004; 60, 726–733
- [40] Martins J.R., Passerotti C.C., Maciel R.M., Sampaio L.O., Dietrich C.P., Nader H.B.: Practical determination of hyaluronan by a new non-competitive fluorescence-based assay on serum of normal and cirrhotic patients. *Anal. Biochem.*, 2003; 319, 65–72
- [41] Muller G.A., Strutz F.M.: Renal fibroblast heterogeneity. *Kidney Int. Suppl.*, 1995; 50, S33–S36
- [42] Mullin B.R., Levinson R.E., Friedman A., Henson D.E., Winand R.J., Kohn L.D.: Delayed hypersensitivity in Graves' disease and exophthalmos: identification of thyroglobulin in normal human orbital muscle. *Endocrinology*, 1977; 100, 351–366

- [43] Noble P.W., McKee C.M., Cowman M., Shin H.S.: Hyaluronan fragments activate an NF-kappa B/I-kappa B alpha autoregulatory loop in murine macrophages. *J. Exp. Med.*, 1996; 183, 2373–2378
- [44] O'Brien J.M.: Infections, inflammations, and immune-mediated orbital disease. *Curr. Opin. Ophthalmol.*, 1995; 6, 59–69
- [45] Perros P., Kendall-Taylor P.: Thyroid-associated ophthalmopathy: pathogenesis and clinical management. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.*, 1995; 9, 115–135
- [46] Pilarska K., Kulig G., Krzystolik Z.: Ocena wydalania z moczem glikozoaminoglikanów (GAG) w trakcie leczenia postępującej ophthalmopatii obrzękowo-naciekowej w przebiegu choroby Gravesa i Basedowa. *Pol. Arch. Med. Wewn.*, 2001; 105, 139–144
- [47] Poltorak A., He X., Smirnova I., Liu M.Y., Van Huffel C., Du X., Birdwell D., Alejos E., Silva M., Galanos C., Freudenberg M., Ricciardi-Castagnoli P., Layton B., Beutler B.: Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 1998; 282, 2085–2088
- [48] Poulsen J.H.: Urine and tissue glycosaminoglycans and their interrelations. *Dan. Med. Bull.*, 1986; 33, 75–96
- [49] Prabhakar B.S., Bahn R.S., Smith T.J.: Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. *Endocr. Rev.*, 2003; 24, 802–835
- [50] Priestley G.C., Aldridge R.D., Hurel S.: Urinary glycosaminoglycans excretion in Graves' disease. *Acta Derm. Venereol.*, 1996; 76, 368–370
- [51] Prummel M.F., Mourits M.P., Berghout A., Krenning E.P., van der Gaag R., Koornneef L., Wiersinga W.M.: Prednisone and cyclosporine in the treatment of severe Graves' ophthalmopathy. *N. Engl. J. Med.*, 1989; 321, 1353–1359
- [52] Prummel M.F., Wiersinga W.M., Mourits M. P.: Assessment of disease activity of Graves' ophthalmopathy. In: *Recent developments in Graves' ophthalmopathy*. Kluwer Academic Publ. 2000; 59–80
- [53] Rescigno M., Granucci F., Citterio S., Foti M., Ricciardi-Castagnoli P.: Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol. Today*, 1999; 20, 200–203
- [54] Rock F.L., Hardiman G., Timans J.C., Kastelein R.A., Bazan J.F.: A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95, 588–593
- [55] Sciahy D., Brazer W., Center D.M., Cruikshank W.W., Smith T.J.: Cultured human fibroblasts express constitutive IL-16 mRNA: cytokine induction of active IL-16 protein synthesis through a caspase-3-dependent mechanism. *J. Immunol.*, 2000; 164, 3806–3814
- [56] Sempowski G.D., Beckmann M.P., Derdak S., Phipps R.P.: Subsets of murine lung fibroblasts express membrane-bound and soluble IL-4 receptors. Role of IL-4 in enhancing fibroblast proliferation and collagen synthesis. *J. Immunol.*, 1994; 152, 3606–3614
- [57] Singh A.P., Nikiforuk M.: Studies in relation to endocrine exophthalmos: the biochemical composition of human retrobulbar connective tissue. *Experientia*, 1976; 32, 395–396
- [58] Smith R.S., Smith T.J., Blieden T.M., Phipps R.P.: Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am. J. Pathol.*, 1997; 151, 317–322
- [59] Smith T.J., Bahn R.S., Gorman C.A.: Hormonal regulation of hyaluronate synthesis in cultured human fibroblasts: evidence for differences between retroocular and dermal fibroblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1989; 69, 1019–1023
- [60] Smith T.J., Bahn R.S., Gorman C.A.: Connective tissue, glycosaminoglycans, and diseases of the thyroid. *Endocr. Rev.*, 1989; 10, 366–391
- [61] Smith T.J., Kottke R.J., Lum H., Andersen T.T.: Human orbital fibroblasts in culture bind and respond to endothelin. *Am. J. Physiol.*, 1993; 265, C138–C142
- [62] Smith T.J., Koumas L., Gagnon A., Bell A., Sempowski G.D., Phipps R.P., Sorisky A.: Orbital fibroblast heterogeneity may determine the clinical presentation of thyroid-associated ophthalmopathy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002; 87, 385–392
- [63] Smith T.J., Wang H.S., Evans C.H.: Leukoregulin is a potent inducer of hyaluronan synthesis in cultured human orbital fibroblasts. *Am. J. Physiol.*, 1995; 268, C382–C388
- [64] Stamenkovic I., Clark E.A., Seed B.: A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor induced by cytokines in carcinomas. *EMBO J.*, 1989; 8, 1403–1410
- [65] Starkey K., Heufelder A., Baker G., Joba W., Evans M., Davies S., Ludgate M.: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in thyroid eye disease: contraindication for thiazolidinedione use? *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003; 88, 55–59
- [66] Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Takeda K., Akira S.: Differential roles of TLR2 TLR4 in recognition of gram-negative gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 1999; 11, 443–451
- [67] Tallstedt L., Norberg R.: Immunohistochemical staining of normal Graves' extraocular muscle. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1988; 29, 175–184
- [68] Taylor K.A., Buchanan-Smith J.G.: A colorimetric method for the quantitation of uronic acids a specific assay for galacturonic acid. *Anal. Biochem.*, 1992; 201, 190–196
- [69] Ursu H., Dumitrescu, C., Bartoc R., Dumitriu L.: Determination of urinary mucopolysaccharides in Graves' disease. *Endocrinologie*, 1984; 22, 277–282
- [70] Valyasevi R.W., Erickson D.Z., Harteneck D.A., Dutton C.M., Heufelder A.E., Jyonouchi S.C., Bahn R.S.: Differentiation of human orbital preadipocyte fibroblasts induces expression of functional thyrotropin receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999; 84, 2557–2562
- [71] Valyasevi R.W., Harteneck D.A., Dutton C.M., Bahn R.S.: Stimulation of adipogenesis, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma), thyrotropin receptor by PPARgamma agonist in human orbital preadipocyte fibroblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002; 87, 2352–2358
- [72] Varma R. Varma R.S.: *Mucopolysaccharides – Glycosaminoglycans – of Body Fluids in Health Disease*. 1983
- [73] Weetman A.P.: Autoimmune thyroid disease. *Autoimmunity*, 2004; 37, 337–340
- [74] Wiersinga W.M.: Immunosuppression in endocrine ophthalmopathy: why when? *Dev. Ophthalmol.*, 1993; 25, 120–130
- [75] Winand R.J.: Increased urinary excretion of acidic mucopolysaccharides in exophthalmos. *J. Clin. Incest.*, 1968; 47, 2563–2568