

Zakład Endokrynologii Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk

lek. med. Tomasz Bednarczuk

**INTERAKCJE LIMFOCYTÓW Z BIAŁKAMI MACIERZY
POZAKOMÓRKOWEJ U PACJENTÓW Z OFTALMOPATIĄ
ZWIĄZANĄ Z CHOROBYMI AUTOIMMUNOLOGICZNYMI
TARCZYCY.**

Praca doktorska



KS 184 (dublet)
H3082

Promotor: prof. dr hab. med. Janusz Nauman

Zakład Endokrynologii Instytutu Centrum Medycyny Doświadczalnej
i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk

Warszawa, 1998

Wydawnictwo Rodzicom, ul. Włocławska 10, 80-001 Włocławek, tel. 24 64 64 64, fax 24 64 64 65, e-mail: rodzicom@rcin.org.pl
Rodzicom

SPIS TREŚCI

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

STRESZCZENIE 1

I. WSTĘP 3

- I.1. Patogeneza oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy 3
 - I.1.1. Zmiany histopatologiczne w tkankach zagałkowych 3
 - I.1.2. Badania immunohistochemiczne 4
 - I.1.3. Badania *in vitro* 5
 - I.1.4. Badania odpowiedzi komórkowej 6
 - I.1.5. Badania odpowiedzi humoralnej 9
 - I.1.6. Receptor dla tyreotropiny jako pierwotny autoantygen w oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy 11
 - I.1.7. Podsumowanie 12
- I.2. Wędrowka autoreaktywnych limfocytów do tkanek zagałkowych w oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy 14
 - I.2.1. Cząsteczki adhezyjne 14
 - I.2.2. Białka macierzy pozakomórkowej 16
 - I.2.3. Etapy przechodzenia autoreaktywnych limfocytów z krwi do tkanek zagałkowych 16

II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY 19

III. MATERIAŁY I METODY 21

- III.1. Grupy badane 21
- III.2. Antygeny 22
- III.3. Hodowle pierwotne i linie komórkowe 23
 - III.3.1. Jednojądrowe komórki krwi obwodowej 23
 - III.3.2. Limfocyty T z krwi obwodowej 23
 - III.3.3. Limfocyty T naciekające tkankę łączną okołogałkową 23
 - III.3.4. Linia komórkowa raka gruczołowego płuc (A-549) 24
- III.4. Analiza cytofluorometryczna 24
- III.5. Test proliferacji jednojądrowych komórek krwi obwodowej 25
- III.6. Badanie pobudzenia proliferacji limfocytów T, zależnej od cząsteczki CD3, przez białka macierzy pozakomórkowej 26
- III.7. Test immunoenzymatyczny typu ELISA 28
- III.8. Badanie specyficzności przeciwciał klasy IgG, IgA i IgM przeciw białkom macierzy pozakomórkowej 29
- III.9. Elektroforeza strawionych kolagenów I i V oraz immunoblotting 30
- III.10. Test hamowania przylegania komórek raka gruczołowego płuc do kolagenu I 31
- III.11. Analiza statystyczna 32

IV. WYNIKI 33

- IV.1. Interakcje limfocytów T z białkami macierzy pozakomórkowej u chorych z oftalmopatią związaną z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy 33
 - IV.1.1. Proliferacja jednojądrowych komórek krwi obwodowej po stymulacji białkami macierzy pozakomórkowej 33
 - IV.1.2. Proliferacja jednojądrowych komórek krwi obwodowej po stymulacji bydłęcym i ludzkim kolagenem typu I 36
 - IV.1.3. Proliferacja linii limfocytów T po stymulacji białkami macierzy pozakomórkowej 36
 - IV.1.4. Pobudzenie proliferacji limfocytów T, zależnej od cząsteczki CD3, przez białka macierzy pozakomórkowej 37
 - IV.1.5. Pobudzenie proliferacji linii limfocytów T z krwi obwodowej i tkanek zagąłkowych, zależnej od cząsteczki CD3, przez białka macierzy pozakomórkowej u wybranych chorych z aktywną oftalmopatią 38
 - IV.1.6. Subpopulacje limfocytów T we krwi obwodowej u pacjentów z oftalmopatią w okresie aktywnym choroby oraz u zdrowych osobników 40
- IV.2. Odpowiedź typu humoralnego przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej u chorych z oftalmopatią związaną z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy 40
 - IV.2.1. Przeciwciała klasy IgG, IgA i IgM przeciwko natywnym białkom macierzy pozakomórkowej 41
 - IV.2.2. Specyficzność przeciwciał przeciwko natywnym białkom macierzy pozakomórkowej 47
 - IV.2.3. Klasy przeciwciał reagujących z kolagenem I i V 47
 - IV.2.4. Przeciwciała reagujące z zdenaturowanym kolagenem I i V 48
 - IV.2.5. Wpływ przeciwciał przeciwko kolagenowi I na przyleganie komórek raka gruczołowego płuc do kolagenu I 51

V. DYSKUSJA 54

- V.1. Badanie interakcji limfocytów T z białkami macierzy pozakomórkowej u chorych z oftalmopatią związaną z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy 54
 - V.1.1. Interakcje obwodowych limfocytów T z białkami macierzy pozakomórkowej 54
 - V.1.2. Interakcje limfocytów T z tkanek zagąłkowych z białkami macierzy pozakomórkowej 57
- V.2. Badanie odpowiedzi humoralnej przeciw białkom macierzy pozakomórkowej u chorych z oftalmopatią związaną z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy 59
 - V.2.1. Autoprzeciwciała klasy IgG, IgA i IgM przeciwko natywnym białkom macierzy pozakomórkowej 59
 - V.2.2. Specyficzność przeciwciał przeciwko natywnym białkom macierzy pozakomórkowej 61
 - V.2.3. Przeciwciała przeciwko zdenaturowanemu kolagenowi I i V 61
 - V.2.4. Funkcja przeciwciał przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej 62

VI. PODSUMOWANIE I WNIOSKI 66

VII. PIŚMIENNICTWO 68

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW*

| | |
|---------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AITD- | (ang. autoimmune thyroid disease)- autoimmunologiczna choroba tarczycy. |
| CD- | (ang. cluster of differentiation)- kompleks różnicowania (tym symbolem i odpowiednią cyfrą oznaczone są struktury powierzchniowe leukocytów). |
| ECM- | (ang. extracellular matrix) macierz pozakomórkowa. |
| ELAM- | (ang. endothelial-leukocyte adhesion molecule)- cząsteczka adhezji leukocytów do śródbłonna. |
| ELISA- | (ang. enzyme immunosorbent assay)- test immunoenzymatyczny |
| GD- | (ang. Graves' Disease)- choroba Gravesa-Basedowa. |
| HLA- | (ang. human leukocyte antigen)- układ zgodności tkankowej. |
| HT- | (ang. Hashimoto's thyroiditis)- choroba Hashimoto. |
| ICAM- | (ang. intercellular adhesion molecule)- cząsteczka adhezji międzykomórkowej. |
| IFN- | interferon. |
| Ig- | immunoglobuliny. |
| IgA- | przeciwciało klasy IgA. |
| IgG- | przeciwciało klasy IgG. |
| IgM- | przeciwciało klasy IgM. |
| IL- | interleukina. |
| kDa- | kilodalton. |
| LFA- | (ang. lymphocyte function-associated antigen)- antygen związany z czynnością limfocytów. |
| PBL- | (ang. peripheral blood lymphocytes)- limfocyty krwi obwodowej. |
| RBT- | (ang. retrobulbar T cells)- limfocyty z tkanek pozagałkowych |
| RZS- | reumatoidalne zapalenie stawów |
| SLE- | (ang. systemic lupus erythematosus)- układowy toczeń rumieniowaty |
| TAO- | (ang. thyroid associated ophthalmopathy)- oftalmopatia związana z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy. |
| TGF- | (ang. transforming growth factor) transformujący czynnik wzrostu. |
| TNF- | (ang. tumor necrosis factor) czynnik martwicy nowotworu. |
| TSH- | (ang. thyroid stimulating hormone) hormon tyreotropowy. |
| VCAM- | (ang. vascular cell adhesion molecule) cząsteczka adhezji komórkowej naczyń. |
| VLA- | (ang. very late antigen)- antygen bardzo późny |

* W niniejszej pracy użyto skrótów zgodnie z zaleceniami opublikowanymi w Acta Biochim Polon 1988;35:225-266 oraz Acta Biochim Polon 1989; 36: 159-175.

STRESZCZENIE

Oftalmopatia związana z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (powszechnie uznany skrót z języka angielskiego: TAO- thyroid associated ophthalmopathy) jest chorobą autoimmunologiczną mięśni ocznych i tkanki łącznej okołogałkowej. Pomimo intensywnych badań charakter autoantygenów, stanowiących cel autoagresji, pozostaje niewyjaśniony.

Zmiany histopatologiczne w oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy wskazują, że zapalenie toczy się w tkance łącznej mięśni ocznych i tkance łącznej okołogałkowej. Badania przeprowadzone w ostatnich latach wskazują, że białka tkanki łącznej mogą być autoantygenami w chorobach zapalnych. Ponadto białka macierzy pozakomórkowej mogą pełnić funkcję regulatora odpowiedzi immunologicznej, ponieważ biorą udział m. in. w aktywacji limfocytów T.

Celem prezentowanej pracy było zbadanie odpowiedzi komórkowej i humoralnej przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej u chorych z oftalmopatią związaną z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy. Do badań użyto białka, które występują najczęściej w tkance łącznej właściwej lub błonie podstawnej: kolagenów typu I, III, IV, V, fibronektyny i lamininy.

Używając testu proliferacji stwierdzono, że limfocyty T z krwi obwodowej oraz limfocyty T naciekające tkanki pozagałkowe chorych z "aktywną" oftalmopatią były stymulowane przez kolagen typ I. Stymulacja limfocytów była zależna od współpracy z komórkami prezentującymi antygen. Badania te wskazują, że kolagen I może być jednym (prawdopodobnie z wtórnych) autoantygenów stymulujących limfocyty T.

Ponadto białka macierzy pozakomórkowej (kolagen typ I, IV, fibronektyna i laminina) przekazywały limfocytom T, wyizolowanym z tkanek pozagałkowych chorych z aktywną oftalmopatią, dodatkowe sygnały pobudzające proliferację. Dodatkowa stymulacja zachodziła prawdopodobnie przy pomocy receptorów dla białek macierzy pozakomórkowej z grupy $\beta 1$ integrzyn. Powyższe wyniki wskazują, że ekspresja (lub funkcja) integrzyn była zwiększona na limfocytach naciekających tkanki pozagałkowe. Interakcje limfocytów z białkami macierzy pozakomórkowej mogą wzmacniać odpowiedź komórkową przeciwko antygenom oczodołowym.

Odpowiedź limfocytów B przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej oceniano badając przeciwciała w surowicy chorych. Używając testu ELISA stwierdzono, że surowice 50% pacjentów z oftalmopatią zawierały autoprzeciwciała do jednego lub więcej białek tkanki łącznej. W innych badanych grupach, odsetek ten był znamienne niższy i wynosił dla pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa-27%, chorobą Hashimoto-28%, nieautoimmunologicznymi chorobami tarczycy- 8% i dla zdrowych dawców 9%. U pacjentów z oftalmopatią stwierdzono znamienne podwyższone stężenie przeciwciał przeciwko natywnemu kolagenowi I, III, V i lamininie. Aby sprawdzić specyficzność przeciwciał wykonano test absorpcji. U większości chorych z oftalmopatią stwierdzono istnienie specyficznych przeciwciał przeciwko kolagenowi I, V i lamininie. Przeciwciała reagujące z natywnym kolagenem I i V należały głównie do klasy IgG. W surowicy chorych z oftalmopatią znajdują się również przeciwciała klasy IgG reagujące ze zdenaturowanym kolagenem typu I i V. Badanie metodą immunoblottingu nie przyniosło identyfikacji specyficznych epitopów dla oftalmopatii na cząsteczkach kolagenu I lub V. Badanie odpowiedzi humoralnej wskazuje, że w surowicy chorych z oftalmopatią znajdują się specyficzne przeciwciała, które mają zdolność do wiązania się z białkami macierzy pozakomórkowej *in vivo*, niezależnie od stopnia ich denaturacji.

Rola przeciwciał przeciwko białkom tkanki łącznej w patogenezie oftalmopatii jest nieznana. Z zamiarem oceny możliwej fizjologicznej funkcji przeciwciał przeciwko kolagenowi I, badano ich zdolność do zahamowania adhezji komórek raka gruczołowego płuc do kolagenu I. Surowice chorych nie miały wpływu na interakcje komórek z kolagenem I, co sugeruje, że stężenie przeciwciał było zbyt niskie do wywołania efektu biologicznego *in vitro*. Niskie miano przeciwciał w surowicy, nie wyklucza ich patogennej roli. Przeciwciała przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej mogą brać udział w podtrzymywaniu zapalenia, np. poprzez aktywację dopełniacza.

Wyniki przedstawionej pracy wskazują po raz pierwszy na udział białek macierzy pozakomórkowej w patogenezie oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy. Białka tkanki łącznej mogą być autoantygenem, wywołującym odpowiedź immunologiczną typu komórkowego i humoralnego. Ponadto białka macierzy pozakomórkowej mogą przekazywać autoreaktywnym limfocytom dodatkowe sygnały stymulujące, wzmagając ich odpowiedź przeciwko antygenom oczodołowym.

I. WSTĘP

Oftalmopatia związana z chorobami autoimmunologicznymi tarczycy (uznany powszechnie skrót z języka angielskiego: TAO- thyroid-associated ophthalmopathy) jest schorzeniem zapalnym tkanek oczodołu, towarzyszącym głównie chorobie Gravesa- Basedowa (w 90% przypadków), rzadziej chorobie Hashimoto (5%), lub też występującym przy braku klinicznych objawów współistniejącej choroby tarczycy (5%). Oftalmopatia jest bardzo niejednorodnym zespołem chorobowym, a jej przebieg jest trudny do przewidzenia. Cechy oftalmopatii w postaci utajonej można stwierdzić za pomocą czułych metod diagnostycznych- jak: tomografia komputerowa lub rezonans magnetyczny- u prawie wszystkich pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa [172]. Objawy kliniczne są jednakże u większości chorych niezbyt nasilone i polegają głównie na poszerzeniu szpary ocznej [24]. Tylko u 10-25% chorych objawy oczne są uciążliwe i długotrwałe. Obraz oftalmopatii u tych pacjentów może składać się w różnym stopniu z zapalenia powiek, wytrzeszczu lub zaburzeń ruchomości gałek ocznych. W bardzo ciężkich przypadkach oftalmopatia może doprowadzić do utraty wzroku. Oftalmopatia jest także dużym problemem terapeutycznym. Chorzy z ciężką oftalmopatią wymagają najczęściej leczenia immunosupresyjnego kortykosteroidami, radioterapii i / albo operacji dekompresji oczodołu [134,181]. Wyniki tego leczenia są często niezadowolające i po ustąpieniu aktywnego okresu choroby pacjenci wymagają leczenia chirurgicznego mającego na celu korekcję ustawienia gałek ocznych lub usunięcie wytrzeszczu.

Intensywne badania prowadzone na przestrzeni ostatnich dziesięciu lat pozwoliły lepiej zrozumieć patogenezę oftalmopatii [prace przeglądowe: 13,23,64,173]. TAO jest obecnie uważana za chorobę autoimmunologiczną mięśni ocznych i tkanki łącznej okołogałkowej, jednakże charakter antygenów oczodołowych stanowiących cel autoagresji pozostaje dotychczas niewyjaśniony.

1.1. Patogeneza oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.

1.1.1. Zmiany histopatologiczne w tkankach pozagałkowych.

Badania histopatologiczne wskazują, że miejscem toczącego się zapalenia w oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (skrót z ang. TAO-

thyroid-associated ophthalmopathy) jest tkanka łączna okołogałkowa oraz tkanka łączna włóknista mięśni ocznych: omięsna (perimysium) oraz śródmięsna (endomysium) [77,169,174]. Główne zmiany stwierdzane w mięśniach polegają na nacieczeniu przez komórki jednojądrowe, rozplemie fibroblastów, akumulacji glikoproteoglikanów, obrzęku, a w późniejszych stadiach choroby - na włóknieniu mięśni. Podobne zmiany obserwuje się w tkance łącznej okołogałkowej.

Nacieki komórek jednojądrowych składa się głównie z limfocytów T, a w mniejszym odsetku z makrofagów czy komórek plazmatycznych wydzielających przeciwciała [169,174]. Nacieki zapalny umiejscowiony jest zwykle okołonaczyniowo. Limfocyty T (zarówno CD4⁺ jak i CD8⁺) należą głównie do komórek pamięci (CD45RO⁺). W aktywnym okresie choroby komórki jednojądrowe, naciekające tkanki pozagałkowe, posiadają silną ekspresję cząsteczek adhezyjnych z grupy β 2 integrzyn [130].

W mięśniach ocznych oraz tkance łącznej okołogałkowej stwierdza się proliferację fibroblastów i nagromadzenie w macierzy pozakomórkowej proteoglikanów (połączenie glikozaminoglikanów z białkami). Proteoglikany posiadają zdolność do wiązania dużej ilości wody, co przy ich nadmiarze doprowadza do obrzęku. W końcowej fazie choroby stwierdza się włóknienie mięśni i tkanki łącznej okołogałkowej [77].

I.1.2. Badania immunohistochemiczne.

W badaniach immunohistochemicznych tkanek pozagałkowych pochodzących od chorych z oftalmopatią stwierdzono ekspresję cząsteczek immunomodulujących, takich jak: białka szoku termicznego, cząsteczki adhezyjne oraz cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej klasy II. Występowanie tych immunomodulujących cząsteczek bywa często stwierdzane w chorobach autoimmunologicznych, jednak ich rola w patogenezie zapalenia nie jest w pełni wyjaśniona.

Fizjologicznie cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej klasy II (skrót z ang. HLA- human leukocyte antigens) znajdują się na powierzchni makrofagów, limfocytów B i aktywowanych limfocytów T. W miejscu zapalenia, cząsteczki HLA klasy II mogą być również prezentowane przez inne komórki. W biopsjach tkanek pozagałkowych pochodzących od pacjentów z ciężką oftalmopatią ekspresję HLA-DR stwierdzono na fibroblastach, włóknach mięśniowych oraz komórkach tłuszczowych okołogałkowej tkanki łącznej [71,72,80]. Funkcja cząsteczek HLA klasy II na komórkach,

które w warunkach fizjologicznych nie należą do komórek prezentujących antygen, jest niejasna. Prezentacja antygeny przez te komórki może doprowadzić do czynnościowej inaktywacji autoreaktywnych limfocytów.

Białka szoku termicznego (skrót z ang. HSP- heat shock protein) pełnią w warunkach fizjologicznych wiele ważnych funkcji (m.in. regulują transport białek przez błony komórkowe). Ich ekspresja wzrasta w reakcji na wszelkiego rodzaju czynniki uszkodzające i toksyczne. Białko HSP-70 stwierdzono na powierzchni włókienek mięśniowych w okresie aktywnej TAO [71,72]. Z uwagi na wysoką immunogenność i na homologię białek szoku termicznego bakterii i ludzi, są one podejrzewane o powodowanie rozwoju zapalenia autoimmunologicznego [84]. Ostatnio pojawiły się jednak prace sugerujące, że odpowiedź przeciwko białkom szoku termicznego może pełnić funkcje supresorowe w zapaleniach [34].

Cząsteczki adhezyjne pełnią ważną rolę w zasiedlaniu leukocytów i ich aktywacji. W tkankach pozagątkowych chorych z ciężką oftalmopatią występowanie cząsteczek adhezji międzykomórkowej-1 (skrót z ang. ICAM- intercellular adhesion molecule) i antygeny związanego z czynnością limfocytów-3 (skrót z ang. LFA- lymphocyte function-associated antigen) stwierdzono na powierzchni komórek śródbłonna, fibroblastach, włókienkach mięśniowych i komórkach tłuszczowych [61,71,80]. Na komórkach śródbłonna stwierdzono ponadto cząsteczkę adhezji leukocytów do śródbłonna-1 (skrót z ang. ELAM-1- endothelial-leukocyte adhesion molecule) oraz cząsteczkę adhezji komórkowej naczyń-1 (skrót z ang. VCAM-1- vascular cell adhesion molecule) [61,130]. W okresie stabilnym choroby, ekspresja białek adhezyjnych na komórkach uległa zmniejszeniu.

1.1.3. Badania *in vitro*.

Zmiany w składzie macierzy pozakomórkowej (powszechnie uznany skrót z ang. ECM- extracellular matrix) w tkankach pozagątkowych, takie jak: nagromadzenie proteoglikanów i włókien kolagenowych są wynikiem nadmiernej stymulacji fibroblastów. Fibroblasty pochodzące z tkanek oczodołowych różnią się morfologicznie i czynnościowo od fibroblastów z innych narządów, co może tłumaczyć lokalizację zapalenia w oczodole [16,152,154].

Badania *in vitro* wskazują, że cytokiny wydzielane przez leukocyty, takie jak: interferon γ (skrót z ang. IFN- γ - interferon γ), interleukina 1α (skrót z ang. IL- 1α - interleukin 1α), transformujący czynnik wzrostu- β (skrót z ang. TGF- β - transforming growth factor- β) i leukoregulina są odpowiedzialne za sekrecję glikozaminoglikanów przez oczodołowe fibroblasty [91,153,155]. IFN- γ i leukoregulina nie miały wpływu na wydzielania glikozaminoglikanów przez skórne fibroblasty. Glikokortykoidy hamowały proliferację fibroblastów i wydzielanie glikozaminoglikanów, które były stymulowane przez cytokiny [63].

Cytokiny miały również wpływ na ekspresję czynników immunomodulacyjnych na błonie komórkowej fibroblastów. Ekspresja cząsteczki adhezji międzykomórkowej 1 (ICAM-1) została stwierdzona na fibroblastach oczodołowych po stymulacji przeciwciałami z surowicy chorego z oftalmopatią, lub po stymulacji IFN- γ , IL- 1α , czynnikiem martwicy nowotworu- α (skrót z ang. TNF- α - tumour necrosis factor- α) [58]. Również ekspresja białka szoku termicznego-70 mogła być wywołana na fibroblastach po stymulacji różnymi cytokinami [57,59]. Interferon- γ stymulował ekspresję cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej- HLA-DR na powierzchni hodowanych fibroblastów oraz komórek mięśniowych [56,68]. Ekspresja powierzchniowych cząstek immunomodulujących mogła być zahamowana przez glikokortykoidy lub przez nikotynamid [74].

1.1.4. Badania odpowiedzi komórkowej.

Limfocyty T pełnią prawdopodobnie kluczową rolę w patogenezie oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (skrót z ang. TAO- thyroid-associated ophthalmopathy). Używając scyntygrafii analogiem somatostatyny, w tkankach pozagłkowych chorych z TAO można stwierdzić aktywowane limfocyty. Po skutecznym leczeniu immunosupresyjnym ilość aktywowanych limfocytów uległa zmniejszeniu [118]. Niestety, informacje o funkcji limfocytów T są ograniczone [praca przeglądowa- 176]. Początkowe badania odpowiedzi komórkowej opierały się na komórkach jednojądrowych z krwi obwodowej. Badania te budzą szereg zastrzeżeń, gdyż nie wiadomo czy krążące limfocyty odzwierciedlają subpopulacje limfocytów z tkanek pozagłkowych. Ostatnie badania koncentrują się więc na liniach limfocytów T z tkanek okołogałkowych. Badania te

mogą być obciążone błędami, gdyż hodowla limfocytów *in vitro* może w znaczący sposób zmienić ich właściwości.

W początkowych badaniach stwierdzono za pomocą testu zahamowania migracji, że obwodowe limfocyty są wrażliwe na stymulację preparatami tkanek oczodołu [104,124]. W dalszych badaniach wykorzystywano test proliferacji obwodowych komórek jednojądrowych. Białka błonowe mięśni ocznych i szkieletowych stymulowały obwodowe leukocyty do proliferacji [175]. Poziom stymulacji nie korelował z ciężkością oftalmopatii. Dalsze frakcjonowanie antygenów mięśniowych ujawniło niską odpowiedź przeciwko wielu antygenom [4,87]. Testy z białkami rekombinowanymi, również nie wyjaśniły, które antygeny oczodołowe stymulują limfocyty [4,87].

Ostatnie badania koncentrowały się na próbach poznania funkcji limfocytów naciekających tkanki pozagałkowe. W pierwszym badaniu, klony limfocytów z tkanki łącznej okołogałkowej składały się w równych proporcjach z komórek CD4⁺ i CD8⁺ [31]. Klony limfocytów posiadały funkcje cytotoksyczne i wydzyalały cytokiny wspomagające odpowiedź typu komórkowego (inteleukinę-2, interferon- γ).

W badaniach prowadzonych przez Grubeck-Loebenstein i współpracowników stwierdzono, że linie limfocytów z tkanki łącznej okołogałkowej składały się głównie z komórek CD8⁺CD45RO⁺ i wydzyalały cytokiny, które mogły wspomagać odpowiedź typu komórkowego (IFN- γ) oraz humoralnego (IL-4, IL-10) [52]. Limfocyty odpowiedziały proliferacją na stymulację autologicznymi fibroblastami z tkanek oczodołowych, w sposób zależny od cząsteczki układu zgodności tkankowej klasy I. Limfocyty nie były stymulowane ani autologicznymi komórkami jednojądrowymi z krwi obwodowej, frakcjami błon mięśni ocznych, allogenicznymi komórkami, ani też białkami prątku gruźlicy bydłowej. W dalszym badaniu tej samej grupy stwierdzono, że inkubacja aktywowanych limfocytów z fibroblastami zmniejszyła liczbę receptora CD95 (Apo-1, Fas) na limfocytach, chroniąc je przed apoptozą [116]. Badania te sugerują, że fibroblasty na swojej powierzchni mogą prezentować autoantygen i posiadają wiele czynników immunoregulujących, które mogą aktywować limfocyty oraz chronić je przed apoptozą.

Foester i wsp. przeprowadzili badania na 18-tu liniach limfocytów T, wyizolowanych z tkanki łącznej okołogałkowej [38,128]. Większość linii składało się z komórek CD4⁺. W liniach limfocytów stwierdzono informacyjny kwas rybonukleinowy dla IL-2 (w 17 liniach), IFN- γ (n=10), TGF- β (n=15), IL-4 (n=12), IL-5 (n=17), IL-6 (n=13), IL-10 (n=4), TNF- α (n=10). Większość linii limfocytów reagowała z jedną lub z wieloma

frakcjami antygenów błonowych, uzyskanych z tkanki łącznej okołogałkowej lub mięśni ocznych. Tylko dwie linie proliferowały po stymulacji antygenami tarczycowymi: receptorem dla tyreotropiny lub peroksydazą tarczycową.

Jedna praca skoncentrowała się na liniach limfocytów T wyizolowanych z mięśni ocznych [129]. Linie limfocytów należały głównie do komórek CD4⁺CD45RO⁺. Również w tym badaniu stwierdzono, że limfocyty wydzielały po stymulacji szereg cytokin: IL-2 (wszystkie linie), IL-4 (60% linii), IFN- γ (wszystkie linie), IL-10 (wszystkie linie), TNF- α (56% linii), TGF- β 1 (wszystkie linie). Jedna z dwóch badanych linii proliferowała po stymulacji białkami błonowymi tarczycy oraz receptorem dla tyreotropiny, z czego można by wnioskować, że limfocyty naciekające tkanki oczodołu mogą również rozpoznawać antygeny tarczycowe.

W ostatnich latach przeprowadzono wiele badań nad ekspresją genów dla receptorów limfocyty T w chorobach autoimmunologicznych człowieka i w zwierzęcych modelach chorób autoimmunologicznych. W badaniach nad patogenezą TAO stwierdzono, że receptory limfocytów naciekających tkanki oczodołowe były zbudowane z łańcuchów α/β , a nie γ/δ . W tkankach oczodołowych pochodzących od chorych z aktywną oftalmopatią, stwierdzono ograniczoną ekspresję genów dla części zmiennych łańcuchów α i β receptora [65]. We krwi obwodowej i w tkankach chorych ze stabilną, wieloletnią oftalmopatią, stwierdzono niską ekspresję większości genów dla części zmiennych receptora limfocyty T. Wyniki tych badań sugerują, że w okresie aktywnym choroby ograniczona liczba klonów limfocytów T nacieka tkanki oczodołu i jest pobudzona przez specyficzne antygeny. W trakcie rozwoju choroby odpowiedź komórkowa staje się poliklonalna, skierowana przeciwko wielu antygenom.

Przeprowadzono również badania nad ekspresją genów dla receptorów limfocytów T, naciekających gruczoł tarczycowy, tkanki pozagałkowe i skórę goleni pochodzących od tych samych pacjentów [67]. U chorych tych stwierdzono ograniczoną ekspresję genów dla receptora limfocyty T. Badania te sugerują, że w tarczycy i tkankach pozataarczycowych mogą istnieć wspólne antygeny, które stymulują ograniczoną ilość klonów limfocytów T. Antygeny te nie zostały dotychczas poznane.

1.1.5. Badania odpowiedzi humoralnej.

Problem przeciwko jakim antygenom skierowana jest odpowiedź typu humoralnego w oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (TAO), pozostaje również nierozwiązany. W surowicach pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa (GD) ze zmianami ocznymi lub bez, stwierdza się obecność autoprzeciwciał skierowanych przeciwko antygenom oczodołowym oraz obecność autoprzeciwciał niespecyficznym narządowo [89,102]. Nie wiadomo, czy przeciwciała te biorą udział w rozwoju zmian zapalnych, czy też ich występowanie jest zjawiskiem patogenicznie nieistotnym. Nie wiadomo również, czy odpowiedź humoralna jest zjawiskiem pierwotnym, czy wtórnym wobec toczącego się zapalenia.

Najdokładniej zostały dotychczas zbadane przeciwciała skierowane przeciwko antygenom błonowym mięśni ocznych [prace przeglądowe: 54,88]. Przeciwciała klasy IgG i IgA reagujące z antygenami mięśniowymi wykryto, używając m. in. następujących metod: ELISA, immunoblotting, immunohistochemia, pośrednia immunofluorescencja oraz test cytotoksyczności zależnej od przeciwciał [35,68,113,117,125,136,179].

Z elektroforetycznie rozdzielonych białek błonowych mięśni ocznych, najbardziej specyficznym dla oftalmopatii był antygen o masie cząsteczkowej 64 kDa [17,90]. W jednym z badań, około 75 % chorych z TAO w okresie aktywnym choroby posiadało w surowicy przeciwciała klasy IgG przeciwko białku 64 kDa [146]. Ostatnio poznano strukturę pierwszorzędową tego białka, które okazało się częścią enzymu dehydrogenazy kwasu bursztynowego, zlokalizowanego w błonie mitochondrium [92]. Przeciwciała przeciwko dehydrogenazie bursztynianowej stwierdzono u 67% chorych z aktywną oftalmopatią, u 30% chorych ze stabilną oftalmopatią lub chorobą Gravesa-Basedowa bez klinicznych cech oftalmopatii i u 7% zdrowej kontroli. Rola przeciwciał przeciwko enzymom mitochondrialnym pozostaje nieznana, ale miano przeciwciał może okazać się dobrym markerem choroby mięśni ocznych [55].

W surowicach chorych stwierdza się również przeciwciała klasy IgG reagujące z antygenami mięśniowymi o masie cząsteczkowej 55 i 95 kDa [54]. Wstępne wyniki sugerują, że antygen o masie cząsteczkowej 55 kDa jest białkiem wiążącym wapń, znajdującym się w siateczce śródplazmatycznej mięśni poprzecznie prążkowanych. Antygen o masie cząsteczkowej 95 kDa nie został dotychczas scharakteryzowany.

Wielu badaczy nie znalazło danych na potwierdzenie tezy, że przeciwciała przeciwko antygenom mięśniowym występują znamienne częściej u chorych z oftalmopatią niż w innych grupach [1,2,86,147,177]. W badaniu prowadzonym przez Kendler i wsp. stwierdzono, że przeciwciała te występują tylko u 30% chorych z TAO. W tym samym odsetku występowały przeciwciała u pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa bez klinicznych zmian ocznych [86]. Przeciwciała przeciwko antygenom błonowym mięśni ocznych mogły być absorbowane białkami tarczycy, mięśni szkieletowych, wątroby lub mózgu, co mogło wskazywać na ich niespecyficzność narządową. Wysunięto hipotezę, że przeciwciała przeciwko białku o masie cząsteczkowej 64 kDa mogą być przeciwciałami naturalnymi, których stężenie uległo zwiększeniu w trakcie choroby autoimmunologicznej.

Przeciwciała przeciwko komórkom i białkom tkanki łącznej nie były dotychczas dokładnie badane. W biopsjach tkanki łącznej pozagałkowej metodą immunofluorescencji stwierdzono konglomeraty przeciwciał klasy IgG (w 67% przypadków), IgA (44%), IgM (11%) oraz składnik dopełniacza C3c (44%) [3]. W badaniach immunohistochemicznych stwierdzono przeciwciała klasy IgG lub IgA, reagujące z antygenami w tkance śródmięśnej. Używając testu pośredniej immunofluorescencji u ok. 10% chorych z oftalmopatią oraz 16% chorych z chorobą Gravesa-Basedowa stwierdzono występowanie przeciwciał klasy IgG reagujących z nieznanymi antygenami tkanki łącznej mięśni ocznych.

W surowicach chorych z oftalmopatią stwierdzono za pomocą testu typu ELISA, znamienne większe stężenie przeciwciał klasy IgG przeciwko fibroblastom [8,133]. W dalszych badaniach, używając techniki immunoblottingu stwierdzono, że 50% surowic chorych z TAO reagowało z białkiem błonowym fibroblastów o masie cząsteczkowej 23 kDa [9]. Inni badacze nie potrafili jednak powtórzyć tych wyników [5,131,161]. Ostatnio stwierdzono, że w surowicach chorych z oftalmopatią znajdują się przeciwciała klasy IgA reagujące z białkiem błonowym fibroblastów ocznych o masie cząsteczkowej 66 kDa [5].

Trudnym problemem do rozwiązania jest ocena patogennej roli przeciwciał przeciwko antygenom oczodołowym [praca przeglądowa: 126]. Wiele danych klinicznych sugeruje, że odpowiedź typu humoralnego odgrywa ważną rolę w patogenezie oftalmopatii m. in fakt istnienia wytrzeszczu u noworodków od matek z aktywną oftalmopatią, który ustępuje zgodnie z okresem półtrwania przeciwciał klasy IgG.

Dotychczas istnieje niewiele testów *in vitro*, które pozwoliłyby ocenić funkcję przeciwciał. Test cytotoksyczności zależnej od przeciwciał z hodowanymi mioblastami pochodzącymi z mięśni ocznych dał wynik pozytywny u 50-60% chorych z oftalmopatią.

Procent cytolizy korelował z parametrami klinicznymi oftalmopatii, m. in. z ciśnieniem śródgałkowym. Przeciwciała cytotoksyczne reagowały przeciwko komórkom mięśniowym i komórkom tarczycy, co może tłumaczyć związek choroby tarczycy i oftalmopatii [69]. Autoprzeciwciała miały również wpływ na funkcję fibroblastów oczodołowych: stymulowały syntezę kolagenu I, wzmacniały ekspresję białka szoku termicznego-72 oraz cząsteczek adhezyjnych [57,58,142].

1.1.6 Receptor dla tyreotropiny jako pierwotny autoantygen w oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.

Szczególny związek oftalmopatii z chorobami autoimmunologicznymi tarczycy może być wytłumaczony występowaniem wspólnego antygeny znajdującego się w tarczycy i w tkankach pozagałkowych. Wiele badań sugeruje, że wspólnym antygenem może być receptor dla tyreotropiny (skrót z ang. TSH- thyroid stimulating hormone). Obecność receptora dla TSH w tkankach oczodołowych oraz hodowanych fibroblastach oczodołowych sugerują badania immunohistochemiczne oraz badania za pomocą reakcji odwrotnej transkryptazy i reakcji łańcuchowej polimerazy (RT-PCR- reverse transcriptase - polymerase chain reaction) [36,62,158]. Dodatkowo stwierdzono, że fibroblasty z tkanki łącznej okołogałkowej posiadają zdolność do różnicowania się w komórki tłuszczowe. W trakcie różnicowania może dochodzić do wzmożonej ekspresji receptora dla TSH [157].

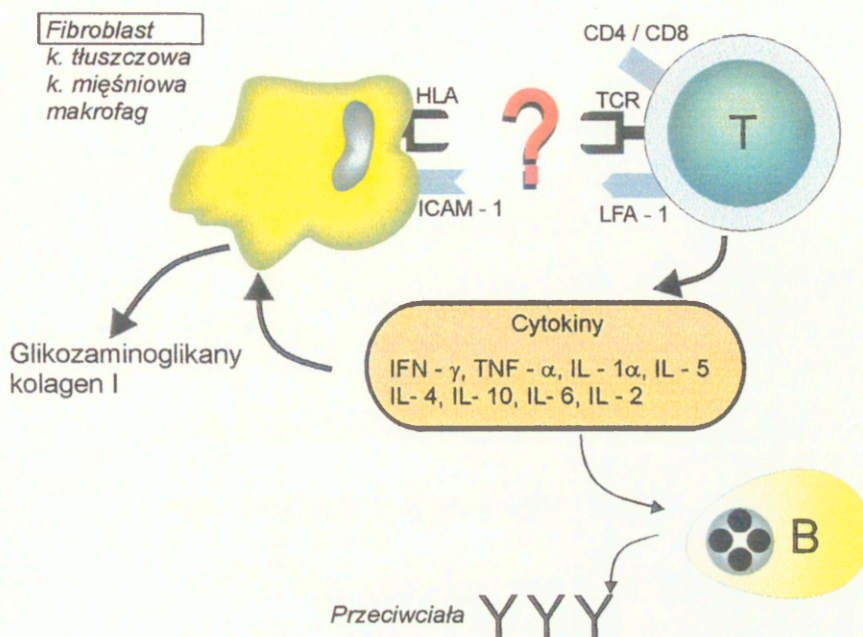
Wpływ przeciwciał przeciwko receptorowi dla TSH na patogenezę oftalmopatii pozostaje niejasny. Większość chorych z oftalmopatią, nawet bez klinicznych objawów choroby tarczycy, posiada przeciwciała stymulujące lub blokujące tarczycę [85,145]. W wielu badaniach nie stwierdzono jednak bezpośredniej korelacji pomiędzy mianem przeciwciał przeciwko receptorowi dla TSH, a ciężkością oftalmopatii [23].

Badania odpowiedzi komórkowej sugerują, że w tkankach pozagałkowych znajdują się klony limfocytów wrażliwe na receptor dla tyreotropiny [38,129]. Badania na zwierzętach doświadczalnych również wskazują, że pierwotnym antygenem może być receptor dla TSH. Ostatnio opracowano model zwierzęcy oftalmopatii, immunizując myszy za pomocą receptora dla TSH [100]. Badania na tym modelu oftalmopatii pozwolą prawdopodobnie na dalsze wniknięcie w patomechanizm tej jednostki chorobowej.

1.1.7. Podsumowanie.

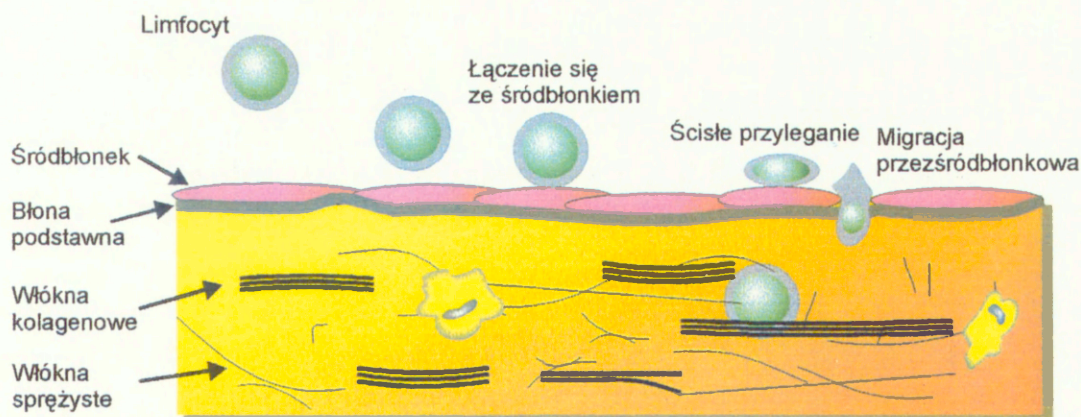
Uproszczony schemat patogenezy oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (TAO) przedstawiono na ryc. 1. Komórki prezentujące antygen stymulują do proliferacji autoreaktywne klony pomocniczych limfocytów T. Charakter antygenów oczodołowych pozostaje dotychczas niewyjaśniony. Fibroblasty, znajdujące się w mięśniach ocznych oraz tkance łącznej okołogałkowej, mogą okazać się głównym celem autoagresji, ponieważ mogą one prezentować możliwy pierwotny antygen: receptor dla tyreotropiny [prace przeglądowe: 10,64]. Autoantygeny mogą się również znajdować na powierzchni włókien mięśniowych lub komórek tłuszczowych [prace przeglądowe: 88,173]. Pobudzone limfocyty wydzielają do środowiska różne cytokiny. Dotychczas nie udało się wyjaśnić, czy naciekające limfocyty biorą udział pierwotnie w odpowiedzi typu komórkowego czy humoralnego. Prawdopodobnie oba typy odpowiedzi immunologicznej są konieczne dla pełnego rozwinięcia zapalenia. Wydzielane przez leukocyty cytokiny stymulują fibroblasty do sekrecji glikozaminoglikanów oraz stymulują ekspresję wielu czynników immunomodulacyjnych (cząsteczki układu zgodności tkankowej klasy II, cząsteczki adhezyjne, białka szoku termicznego) na powierzchni komórek tkanki łącznej, tkanki tłuszczowej i włókienek mięśniowych. Nagromadzenie w macierzy pozakomórkowej proteoglikanów (połączenie glikozaminoglikanów z białkami) doprowadza do obrzęku, co powoduje powiększenie mięśni ocznych i tkanki łącznej okołogałkowej. Utrudniony odpływ krwi przez powiększone mięśnie prowadzi do zastoju [75]. Warunki niedotlenienia mogą dodatkowo pobudzać fibroblasty do wydzielania glikozaminoglikanów [112].

W większości przypadków zapalenie w oczodole ulega samoistnej remisji [132]. W trakcie ustępowania zapalenia dochodzi do włóknienia mięśni ocznych i tkanki łącznej okołogałkowej.



RYCINA 1. Hipotetyczny schemat patogenezy oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (TAO).

Naciekające tkanki pozagałkowe limfocyty T są stymulowane antygenami oczodołowymi, które nie zostały dotychczas poznane. Celem autoagresji mogą być fibroblasty, komórki tkanki tłuszczowej, komórki mięśniowe. Aktywowane limfocyty wydzielają cytokiny, które mogą wspomagać odpowiedź typu komórkowego i humoralnego. Interferon γ (IFN_γ), czynnik martwicy nowotworu- α ($TNF-\alpha$), interleukina- 1α ($IL-1\alpha$) pobudzają fibroblasty do wydzielania glikozaminoglikanów, które są przyczyną obrzęku tkanek pozagałkowych. Limfocyty B i różnicujące się z nich plazmocyty wydzielają przeciwciała skierowane przeciwko antygenom mięśni ocznych i tkanki łącznej okołogałkowej; jednak ich rola pozostaje niejasna. W trakcie gojenia, oczodołowe fibroblasty wydzielają kolagen I, co doprowadza do wytworzenia blizn w tkankach oczodołowych. HLA- cząsteczka głównego układu zgodności tkankowej; ICAM- cząsteczka adhezji międzykomórkowej; TCR- receptor limfocyty T; LFA-1- antygen związany z czynnością limfocytów. Schemat jest wzorowany na ryc. Heufeldera AE [64].



RYCINA 2. Wędrowka limfocytów z naczyń krwionośnych do miejsca zapalenia.

Pierwszy etap polega na łączeniu się limfocyty z komórką śródbłonka i powolnego "toczenia" wzdłuż naczyń. Po aktywacji limfocyty chemokinami, dochodzi do jego ścisłego przylegania do komórek śródbłonka, a następnie do migracji przezśródbłonkowej. W trakcie tej migracji dochodzi do interakcji leukocytów z białkami macierzy pozakomórkowej w błonie podstawnej oraz tkance łącznej. Schemat jest wzorowany na ryc. Springera A. [160].

1.2. Wędrowka autoreaktywnych limfocytów do tkanek pozagałkowych w oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.

Migracja autoreaktywnych limfocytów do mięśni ocznych i tkanki łącznej okołogałkowej wymaga wpięrow interakcji z komórkami śródbłónka, a następnie interakcji z białkami macierzy pozakomórkowej (skrót z ang. ECM- extracellular matrix) w błonie podstawnej oraz w przestrzeni międzykomórkowej (ryc. 2). W tej wędrowce bierze udział szereg receptorów zasiedlania na leukocytach i adresyn na komórkach śródbłónka [praca przeglądowa: 160].

1.2.1. Cząsteczki adhezyjne¹.

Cząsteczki adhezyjne nie są tylko receptorami odpowiedzialnymi za wzajemną adhezję komórek oraz za adhezję komórek do białek macierzy pozakomórkowej. Przekazują one również komórkom szereg sygnałów, które regulują m. in. organizację cytoszkieletu, transport wewnątrzkomórkowy jonów, metabolizm lipidów, aktywację wielu genów [prace przeglądowe:53,78,110]. Ze względu na budowę cząsteczki adhezyjne można podzielić na: cząsteczki immunoglobulinowe, selektyny i integryny.

Do najlepiej poznanych cząsteczek immunoglobulinowych należą: cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1 (skrót z ang. ICAM-1- intercellular adhesion molecule; CD54) i cząsteczka adhezji komórkowej naczyń-1 (skrót z ang. VCAM-1- vascular cell adhesion molecule; CD106). Cząsteczka ICAM-1 występuje na komórkach śródbłónka, aktywowanych leukocytach, szeregu komórek somatycznych i bierze udział w migracji limfocytów oraz prezentacji antygenów limfocytom T. Cząsteczka VCAM-1 jest ważną adresyną naczyniową, która łączy się z integryną $\alpha 4\beta 1$, uczestnicząc w migracji leukocytów przez śródbłonek. Cytokiny wydzielane w trakcie rozwijającej się lokalnie reakcji immunologicznej powodują wzrost ekspresji tych cząsteczek adhezyjnych na komórkach śródbłónka.

Selektyny tworzą grupę cząsteczek adhezyjnych biorących udział w interakcji leukocytów z płytkami i śródbłonkiem naczyń. Selektyny wiążą się z oligosacharydami glikolipidów lub glikoprotein. Do selektyn zalicza się: selektynę L (leukocytarna; CD62L),

¹ Nazewnictwo cząsteczek adhezyjnych nie jest ujednolicone. W nawiasach podano wszystkie nazwy spotykane w piśmiennictwie.

selektynę E (śródbłonkowa; CD62E; cząsteczka adhezji leukocytów do śródbłonka-1), selektynę P (płytkowa; CD62P). Selektyna L występuje na limfocytach dziewiczych. Cząsteczka adhezji leukocytów do śródbłonka-1 (skrót z ang. ELAM-1- endothelial-leukocyte adhesion molecule) pojawia się przejściowo, w dwie do ośmiu 2-8 godzin po stymulacji cytokinami.

Integryny składają się z dwóch, niezwiązanych kowalencyjnie łańcuchów α i β . Integryny mające różne łańcuchy α i identyczne łańcuchy β tworzą podrodzinę. Obecnie wyizolowano 12 różnych łańcuchów α i 8 różnych łańcuchów β .

Do najlepiej poznanych należy podrodzina $\beta 1$ integryn, określana również jako bardzo późne antygeny (skrót z ang. VLA- very late antigen), gdyż dwie pierwsze integryny z tej podrodziny: $\alpha 1\beta 1$ i $\alpha 2\beta 1$ - pojawiają się na limfocytach późno (nawet po tygodniach) po stymulacji antygenem. Integryny $\beta 1$ są głównymi receptorami dla białek macierzy pozakomórkowej oraz biorą również udział w interakcjach pomiędzy komórkami. Integryny występują na powierzchni komórek w formie nieaktywnej (lub mało aktywnej). Dopiero po aktywacji komórek, konformacja receptora ulega zmianie i zwiększa się jego efektywność do wiązania z ligandem.

Wiele integryn $\beta 1$ wykazuje powinowactwo do fibronektyny lub lamininy, ale tylko dwie integryny- $\alpha 1\beta 1$ (VLA-1; CD49a/CD29) i $\alpha 2\beta 1$ (VLA-2; CD49b/CD29)- można uznać jako główne receptory dla kolagenów. Ligandy dla $\alpha 3\beta 1$ (VLA-3; CD49c/CD29) nie są dokładnie zdefiniowane; przypuszcza się że są nimi kolagen, fibronektyna i laminina. Integryna $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4; CD49d/CD29) łączy się z fibronektyną oraz z cząsteczką adhezji komórkowej naczyń-1 (VCAM-1). Integryna $\alpha 5\beta 1$ (VLA-5; CD49e/CD29) łączy się natomiast z fibronektyną, a integryna $\alpha 6\beta 1$ (VLA-6; CD49f/CD29) jest uznana za typowy receptor dla lamininy.

Głównym przedstawicielem podrodziny $\beta 2$ integryn jest antygen związany z czynnością limfocytów-1 (LFA-1- lymphocyte function-associated antigen; $\alpha L\beta 2$; CD11a/CD18). Cząsteczka LFA-1 występuje na limfocytach B, limfocytach T, monocytach i granulocytach, a jej ekspresja wzrasta w wyniku pobudzenia antygenem. Ligandem dla LFA-1 jest między innymi cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1 (ICAM-1), występująca na komórkach śródbłonka i na komórkach prezentujących antygen. Nieprawidłowa ekspresja lub funkcja integryn $\beta 2$ doprowadza do zespołu niedoboru przylegania leukocytów (skrót z ang.

LAD- leukocyte adhesion deficiency) [93]. Chorzy z tym niedoborem immunologicznym cierpią na nawracające zapalenia bakteryjne i grzybicze.

1.2.2. Białka macierzy pozakomórkowej.

W trakcie wędrówki do miejsca zapalenia leukocyty stykają się z białkami macierzy pozakomórkowej (skrót z ang. ECM- extracellular matrix). Badania prowadzone w ostatnich latach wskazują że białka ECM nie są jedynie strukturami podporowymi tkanek, lecz wywierają znamienny wpływ na takie podstawowe dla komórki czynności, jak wzrost, dojrzewanie i apoptoza [53]. Pełnią one również ważne funkcje immunomodulacyjne, m. in. regulują przyleganie i migrację leukocytów, przekazują im dodatkowe sygnały pobudzające oraz prezentują cytokiny [44,149].

Głównymi białkami tkanek łącznych są kolageny. Kolageny utworzone są z cząstek tropokolagenu, w którego skład wchodzi trzy łańcuchy polipeptydowe α , tworzące potrójną helisę [praca przeglądowa: 135]. Łańcuchy tropokolagenu są często zbudowane z powtarzających się sekwencji: hydroksyprolina-glicyna- prolina. Co najmniej 19 białek należy do rodziny kolagenów i dodatkowe 10 białek posiada struktury podobne do kolagenów. Grupa kolagenów tworzących włókna (I, II, III, V, XI) jest najliczniejszą grupą białek w macierzy pozakomórkowej. Wśród nich kolagen typ V występuje w mniejszej ilości i uczestniczy w tworzeniu sieci włókien [37]. Kolagen typ II i XI występują głównie w chrząstce szklistej. Kolagen typ IV nie wytwarza włókienek i występuje w postaci agregatów tetramerów, które są główną strukturą błony podstawnej. W skład błony podstawnej wchodzi również glikoproteina laminina. Fibronektyna jest wielofunkcyjną glikoproteina, która występuje na powierzchni komórek, w osoczu i w przestrzeniach międzykomórkowych wielu tkanek [139].

1.2.3. Etapy przechodzenia autoreaktywnych limfocytów z krwi do tkanek pozagałkowych.

Zjawisko przylegania limfocytów do komórek śródbłonna zależy od ekspresji odpowiednich receptorów i ich ligandów na obu typach komórek. W trakcie rozwoju zapalenia dochodzi do uwolnienia wielu cytokin. Takie cytokiny jak: interleukina 1α (IL- 1α), czynnik martwicy nowotworu- α (TNF- α) i interferon- γ (IFN- γ)- mogą zwiększyć ekspresję adresyn naczyniowych. Występowanie wszystkich trzech cytokin zostało

stwierdzone w biopsjach tkanki łącznej okołogąłkowej chorych z aktywną oftalmopatią [60]. W biopsjach mięśni ocznych i tkanki łącznej okołogąłkowej stwierdzono również na komórkach śródbłonna wzmożoną ekspresję cząsteczki adhezji międzykomórkowej-1 (ICAM-1), cząsteczki adhezji komórkowej naczyń-1 (VCAM-1) oraz cząsteczki adhezji leukocytów do śródbłonna-1 (ELAM-1) [61,66,130].

Limfocyty pamięci wykazują zdolność do zasiedlania się w miejscach zadziałania antygeny, ponieważ charakteryzują się wzmożoną ekspresją wielu cząsteczek adhezyjnych [149]. W oftalmopatii, podobnie jak w innych chorobach autoimmunologicznych, naciekające limfocyty T należały głównie do komórek pamięci. W biopsjach mięśni ocznych chorych z aktywną oftalmopatią stwierdzono na leukocytach wzmożoną ekspresję cząsteczek adhezyjnych z grupy $\beta 2$ integryn, m. in. antygeny związanego z czynnością limfocytów-1 (LFA-1) [130].

W początkowej fazie limfocyt przyłącza się do komórek śródbłonna i następuje jego "toczenie", tzn. wolniejszy przepływ przy śródbłonku. Receptorami odpowiedzialnymi za "toczenie" limfocytów są selektyny, chociaż obecnie uważa się również, że integryna $\alpha 4\beta 1$ bierze udział w łączeniu i toczeniu limfocytów [96]. W trakcie "toczenia" leukocyty ulegają aktywacji. Ważną rolę w aktywacji pełnią chemokiny, wydzielane przez makrofagi, komórki śródbłonna oraz fibroblasty. Chemokiny są prezentowane naciekającym limfocytom przez proteoglikany obecne na powierzchni śródbłonna lub w przestrzeni międzykomórkowej [praca przeglądowa:101]. Aktywowane leukocyty zmieniają konformację receptorów, zwiększając ich powinowactwo do ligandów. Ścisłe przyleganie limfocytów do śródbłonna dokonuje się za pomocą interakcji LFA-1/ICAM-1, $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1 oraz niezależnie od integryn za pomocą CD44/kwas hialuronowy [160].

W następnym etapie dochodzi do migracji limfocytów między komórkami śródbłonna przez błonę podstawną do tkanki łącznej właściwej. Proces ten nie polega jedynie na biernej wędrówce, ponieważ komórki wchodzi w interakcje ze składnikami macierzy pozakomórkowej (ECM) przede wszystkim za pośrednictwem integryn z grupy $\beta 1$. Po przyłączeniu do białek ECM limfocyt ulega dalszej aktywacji i wydziela różne mediatory reakcji zapalnej. Do ważnych mediatorów, wydzielanych przez aktywowane leukocyty należą enzymy trawiące macierz międzykomórkową (skrót z ang. MMP- matrix degrading metalloproteinases) [47,138]. Aktywowane limfocyty po pobudzeniu integryn $\beta 1$, wydzielają enzymy trawiące macierz pozakomórkową 2 i 9, które rozkładają kolagen I oraz IV,

ułatwiają migrację tych komórek przez błonę podstawną i tkankę łączną właściwą. Aktywowane makrofagi mogą wydzielać enzymy trawiące kolagen I, II, III, IV oraz lamininę. Autoreaktywne limfocyty wędrują dalej w kierunku wzrastającego stężenia czynników chemotaktycznych, do miejsca toczącego się zapalenia.

II. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY.

Zmiany histopatologiczne w oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy wskazują, że zapalenie toczy się w tkance łącznej mięśni ocznych i tkance łącznej okołogałkowej. Macierz pozakomórkowa (ECM) w tkankach objętych zapaleniem ulega znacznym zmianom. Z jednej strony aktywowane fibroblasty wydzielają glikozaminoglikany oraz prokolagen I. Wydzielane zewnątrzkomórkowo proteazy prokolagenu, przekształcają prokolagen I w tropokolagen, który stanowi główny składnik włókna kolagenowego. Z drugiej strony fibroblasty i naciekające leukocyty wydzielają proteiny trawiące macierz pozakomórkową [148].

Podczas modyfikacji białek macierzy pozakomórkowej (w trakcie wytwarzania *de novo* lub trawienia enzymami trawiącymi macierz pozakomórkową) limfocytom mogą być prezentowane dotychczas "ukryte" determinanty antygenowe. Tak więc zmienione w trakcie zapalenia białka macierzy pozakomórkowej mogą okazać się jednym z wtórnych autoantygenów stymulujących naciekające limfocyty.

Odpowiedź komórkowa i humoralna przeciwko białkom ECM stwierdzono w wielu chorobach tkanki łącznej. Kolagen typ II jest uznany za wtórny autoantygen w reumatoidalnym zapaleniu stawów. Kolagen typ IV jest autoantygenem w zespole Goodpastura, a odpowiedź przeciwko kolagenowi typu VII bierze udział w patogenezie epidermolysis bullosa acquisita. Nie badano dotychczas czy białka ECM są celem odpowiedzi komórkowej lub humoralnej w oftalmopatii.

W chorobach autoimmunologicznych bardzo ważne jest oprócz poszukiwania antygenów, poznanie mechanizmów regulujących czynność autoreaktywnych limfocytów. W trakcie wędrówki do miejsca zapalenia leukocyty stykają się z wieloma białkami tkanki łącznej. Przechodząc przez błonę podstawną naczyń limfocyty kontaktują się z takimi białkami jak kolagen IV i laminina. W trakcie dalszej wędrówki limfocyty stykają się m. in. z kolagenem I, III, V, fibronektyną. Obecnie uważa się, że zaburzone interakcje pomiędzy limfocytami a białkami macierzy pozakomórkowej mogą pełnić ważną rolę w immunopatologii wielu chorób, takich jak łuszczyca, ziarniniak Wegenera, zapalenie reumatoidalne stawów, toczeń rumieniowaty, wirusowe zapalenia wątroby i choroby nowotworowe [25,46,48-51,123; praca przeglądowa:50]. Wpływ białek macierzy

pozakomórkowej na czynność limfocytów naciekających tkanki pozagałkowe w oftalmopatii nie został dotychczas badany.

Struktura macierzy pozakomórkowej tkanki łącznej mięśni ocznych oraz tkanki łącznej okołogałkowej nie jest dokładnie poznana. Z tego względu do badań nad odpowiedzią immunologiczną przeciwko składnikom tkanki łącznej w oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy użyto białek, które występują najczęściej w tkankach łącznych. Dostępne w handlu białka macierzy wykorzystywano uprzednio do badania odpowiedzi komórkowej i humoralnej w wielu chorobach.

Ogółem podjęte badania powinny ustalić: (i) czy białka macierzy pozakomórkowej mogą być autoantygenem w oftalmopatii; (ii) czy interakcje limfocytów T z białkami ECM mogą stanowić dodatkowy sygnał pobudzający dla naciekających tkanki zagałkowe limfocytów.

Celem proponowanej pracy jest :

1. Badanie interakcji limfocytów T z białkami macierzy pozakomórkowej u chorych z oftalmopatią związaną z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.
 - A. Badanie odpowiedzi proliferacyjnej obwodowych komórek jednojądrowych na stymulację białkami macierzy pozakomórkowej.
 - B. Badanie odpowiedzi proliferacyjnej linii limfocytów T z tkanek pozagałkowych na stymulację białkami macierzy pozakomórkowej.
 - C. Badanie dodatkowej stymulacji linii limfocytów T z krwi obwodowej i z tkanek pozagałkowych przez białka macierzy pozakomórkowej.
2. Badanie odpowiedzi humoralnej przeciw białkom macierzy pozakomórkowej u chorych z oftalmopatią związaną z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.
 - A. Badanie stężenia przeciwciał klasy IgG, IgA i IgM przeciwko natywnym i zdenaturowanym białkom macierzy pozakomórkowej.
 - B. Ocena specyficzności przeciwciał przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej.
 - C. Identyfikacja epitopów na zdenaturowanych białkach macierzy pozakomórkowej.
 - D. Badanie fizjologicznej funkcji przeciwciał przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej *in vitro*.

III. MATERIAŁY I METODY

III.1. Grupy badane.

Badaniem zostały objęte następujące grupy pacjentów i zdrowych ochotników:

- (i) 102 pacjentów z oftalmopatią związaną z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (skrót z ang. TAO- thyroid-associated ophthalmopathy) (80 kobiet, 22 mężczyzn) w wieku od 17 do 74 lat (średnia wieku-40);
- (ii) 70 pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa (skrót z ang. GD- Graves' disease) bez klinicznych cech oftalmopatii (58 kobiet, 12 mężczyzn) w wieku od 16 do 71 lat (średnia wieku- 39);
- (iii) 53 pacjentów z chorobą Hashimoto (skrót z ang. HT- Hashimoto's thyroiditis) bez klinicznych cech oftalmopatii (48 kobiet, 5 mężczyzn) w wieku od 18 do 72 lat (średnia wieku- 41);
- (iv) 37 pacjentów z nieautoimmunologicznymi chorobami tarczycy (35 kobiet, 2 mężczyzn) w wieku od 17 do 70 lat (średnia wieku- 45);
- (v) 82 zdrowych ochotników (62 kobiet, 20 mężczyzn) w wieku od 18 do 60 lat (średnia wieku- 38).

U wszystkich chorych z oftalmopatią rozpoznano chorobę Gravesa-Basedowa. Zmiany oczne były klasyfikowane według zaleceń Komitetu Międzynarodowych Towarzystw Tyreologicznych [26]. Grupa TAO obejmowała chorych ze wszystkimi stopniami nasilenia oftalmopatii (od I do VI). Aktywność oftalmopatii oceniano na podstawie kryteriów klinicznych [26]. U 52 pacjentów oftalmopatia była w aktywnym okresie choroby, a u 50 pacjentów w okresie stabilnym. Czas trwania oftalmopatii wynosił od 3 miesięcy do 30 lat. Pacjenci z oftalmopatią, którzy poddani byli zabiegowi dekompresji oczodołu (n=3) byli leczeni immunosupresyjnie kortykosteroidami na miesiąc przed operacją.

Rozpoznanie choroby Gravesa-Basedowa było oparte na objawach klinicznych (objawy nadczynności tarczycy, wole mięsiste lub "naczyniowe") oraz na wynikach badań dodatkowych (obniżone stężenie hormonu tyreotropowego, podwyższone stężenie wolnej frakcji tyroksyny i trijodotyroniny, typowy obraz scyntygrafii lub ultrasonografii tarczycy, oraz na obecności przeciwciał przeciwko receptorowi dla tyreotropiny).

Rozpoznanie choroby Hashimoto zostało postawione na podstawie typowego obrazu klinicznego (małe spoiste wole), objawów niedoczynności tarczycy potwierdzonej badaniami hormonalnymi oraz znamiennego (powyżej 100 jednostek międzynarodowych) podwyższonego stężenia przeciwciał przeciwko peroksydazie tarczycowej albo tyreoglobulinie. U żadnego z badanych z chorobą Gravesa-Basedowa lub chorobą Hashimoto nie współistniały choroby autoimmunologiczne tkanki łącznej.

W grupie badanych z nieautoimmunologicznymi chorobami tarczycy znajdowali się pacjenci z rakiem tarczycy (n=17), gruczolakiem tarczycy (n=10), wolem wieloguzkowym nietoksycznym (n=5), podoстрыm zapaleniem tarczycy (n=5). Rozpoznanie były postawione na podstawie objawów klinicznych, wyników biopsji cienkoigłowych oraz badań histo-patologicznych.

Grupa zdrowych dawców została wybrana z personelu szpitali i laboratoriów, po wykluczeniu choroby tarczycy, oftalmopatii, innych chorób autoimmunologicznych i reumatycznych. Wywiad rodzinny dawców z grupy kontrolnej był również negatywny w kierunku wymienionych chorób.

III.2. Antygeny.

Do badań użyto następujących białek macierzy pozakomórkowej: kolagenu typu I ze skóry bydłowej, kolagenów typu I, III, IV, V z łożyska ludzkiego, lamininy z mięsaka Engelbreth-Holm-Swarm oraz fibronektyny z surowicy bydłowej. Wymienione antygeny były dostępne komercyjnie (Sigma-Chemical Co.) i zostały wykorzystane w poprzednich badaniach nad odpowiedzią komórkową i humoralną przeciwko białkom tkanki łącznej [6,7,29,33,41,46,48,123,137,149,140,166]. Czystość preparatów została potwierdzona za pomocą barwienia białek błękitem Comassie'go po ich rozdzieleniu elektroforetycznym na żelu poliakrylamidowym. Kolagen I i V denaturowano gotując białka przez 5 min przed użyciem [137].

III.3. Hodowle pierwotne i linie komórkowe.

III.3.1. Jednojądrowe komórki krwi obwodowej.

Jednojądrowe komórki krwi obwodowej uzyskiwano drogą wirowania rozcieńczonej krwi obwodowej, nałożonej na gradient ficollu (Ficoll-Paque, Pharmacia Biotech AB) [20]. Żywotność komórek oceniana testem z błękitem trypanu przekraczała 95%.

III.3.2. Limfocyty T z krwi obwodowej.

Limfocyty T wstępnie oczyszczano z krwi obwodowej za pomocą kolumny z watą nylonową (Polysciences, Inc.), wykorzystując fakt, że monocyty i limfocyty B mają wyraźniej zaznaczoną tendencję do przylegania do waty nylonowej niż limfocyty T [79]. Zawiesinę jednojądrowych komórek krwi obwodowej w pożywce RPMI-1640 z dodatkiem 10% inaktywowanej, bydlęcej surowicy płodowej nakładano na sterylną kolumnę z watą nylonową, po uprzednim jej zrównoważeniu pożywką hodowlaną w 37°C. Po 45 min inkubacji w 37°C komórki nie przylegające do kolumny wyplukiwano ostrożnie ciepłą pożywką hodowlaną. Po przejściu przez kolumnę liczba limfocytów B w zawieszynie wynosiła mniej niż 1%, co oceniono za pomocą cytofluorometrii. Następnie monocyty usuwano za pomocą metody przylegania do plastiku (40 min w szalce hodowlanej, w 37°C) oraz przez inkubację w roztworze estru metylo-L-leucyny (5 mM) w RPMI-1640, przez 40 min, w temperaturze pokojowej [170]. Całkowite usunięcie monocytów stwierdzano na podstawie braku proliferacji limfocytów po stymulacji przeciwciałem monoklonalnym OKT-3 [107,170].

III.3.3. Limfocyty T naciekające tkankę łączną okołogałkową.

Limfocyty naciekające tkanki pozagałkowe wyizolowano z tkanki łącznej okołogałkowej pochodzącej od pacjentów z aktywną oftalmopatią, którzy poddani byli operacji dekompresji oczodołu. Linie limfocytów uzyskano zgodnie z metodą opracowaną przez Grubeck-Loebenstein i wsp. [52].

Tkanę łączną okołogałkowa wypłukano trzykrotnie w buforze PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄; pH 7.4) i pocięto na drobne kawałki (około 2 mm). Kawałki tkanki łącznej umieszczono w 24-studzienkowej płytce do hodowli komórkowych w pożywce RPMI-1640 wzbogaconej 10% inaktywowaną surowicą ludzką grupy AB, L-glutaminą (2 mM), penicyliną (100 U/ml), streptomycyną (100 µg/ml) oraz interleukiną 2 (IL-2, 50 U/ml) (wszystkie odczynniki pochodziły z Gibco, BRL). Po 8-miu dniach hodowli w wilgotnej atmosferze 5% CO₂ i 95% powietrza, w 37°C, tkanki usunięto ze studzienek. Komórki jednojądrowe były następnie pobudzane IL-2 (50 U/ml) oraz przeciwciałem monoklonalnym przeciwko cząsteczce CD3 (OKT-3 -Ortho Pharm.), które jak się uważa- pobudza wzrost limfocytów nie zmieniając ich specyficzności [98]. Przeciwciało OKT-3 dodawano do hodowli wraz z autologicznymi jednojądrowymi komórkami krwi obwodowej, napromienionymi dawką 4000 Rad, uniemożliwiając przez to ich proliferację. Interleukina 2 była dodawana do hodowli co 3 dni. W sumie otrzymano 5 linii limfocytów T naciekających tkanki łączne okołogałkowe pochodzące od 3 pacjentów. Linie limfocytów trzymano w hodowli od 17-30 dni. Wszystkie doświadczenia z wykorzystaniem linii limfocytów wykonywano po 10 dniach od ostatniego podania IL-2.

III.3.4. Linia komórkowa raka gruczołowego płuc (A-549).

Linia komórkowa raka gruczołowego płuc (A-549) została uzyskana od American Cell Type Collection (Rockville, MD) i hodowana w pożywce D-MEM/F-12, z dodatkiem 10% inaktywowanej bydlęcej surowicy płodowej, L-glutaminy (2 mM), penicyliny (100 U/ml) oraz streptomycyny (100 µg/ml). Pożywkę zmieniano 3 razy w tygodniu i komórki pasażowano jeden raz w tygodniu w stosunku 1:5 używając roztworu 0.05% trypsyny i 0.02% EDTA w PBS [39].

III.4. Analiza cytofluorometryczna.

Antygeny powierzchniowe komórek badano metodą cytometrii przepływowej. Wyizolowane komórki (10⁵ komórek na test) płukano dwukrotnie w zimnym, nie zawierającym jonów magnezu i wapnia PBS, wirując każdorazowo przez 10 min. (150 g). Następnie komórki inkubowano z przeciwciałem pierwszorzędowym, rozcieńczonym w PBS z dodatkiem 10% surowicy ludzkiej grupy AB (objętość roztworu- 50 µl), w 4°C, przez 30

min. Do badań użyto mysich przeciwciał monoklonalnych rozpoznające następujące antygeny powierzchniowe: CD4, CD8, CD45RO, CD25 (receptor dla IL-2), CD29 (łańcuch $\beta 1$ integryn) CD49a (łańcuch $\alpha 1$ integryn), CD49b (łańcuch $\alpha 2$ integryn), CD49c (łańcuch $\alpha 3$ integryn), CD49d (łańcuch $\alpha 4$ integryn) (Dako A/S). W celu oceny niespecyficznego wiązania przeciwciał w każdym teście stosowano kontrolne przeciwciała mysie klasy IgG, nie reagujące z antygenami komórek ludzkich. Po przepłukaniu zimnym PBS, do komórek dodano królicze przeciwciało przeciwko mysim immunoglobulinom IgG, znakowane izorodankiem fluoresceiny (rozpuszczone w PBS z dodatkiem 10% surowicy ludzkiej grupy AB w stosunku 1:100). Po 30 min inkubacji w 4°C, komórki przepłukano w PBS a fluorescencja komórek była mierzona przy pomocy cytometrii przepływowej (FACSort flow cytometer; Becton-Dickinson). Wyniki analizowano za pomocą programu Consort 30 i przedstawiono jako procent komórek posiadających dany antygen.

III.5. Test proliferacji jednojądrowych komórek krwi obwodowej.

Do badań użyto następujących antygenów: kolagenu typu I ze skóry bydłowej, kolagenu typu IV z łożyska ludzkiego, lamininy oraz fibronektyny. Płytki 96 studzienkowe do hodowli komórkowych (Corning Costar Co.), o płaskim dnie były opłaszczane antygenem o stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$, w PBS, przez noc, w 4°C. Następnie płytki wypłukano trzykrotnie w PBS. Przyleganie białek do płytek zostało potwierdzone metodą ELISA, używając przeciwciał monoklonalnych przeciwko poszczególnym antygenom.

Komórki jednojądrowe liczone w kamerze Buerkera. Komórki jednojądrowe krwi obwodowej lub hodowle limfocytów T były hodowane w opłaszczonych płytkach w ilości 10^4 lub 5×10^4 komórek na studzienkę, w pożywce RPMI-1640 wzbogaconej 10% inaktywowaną bydłą surowicą płodową, 2mM L-glutaminą oraz antybiotykami, w objętości 200 μl . Wszystkie hodowle prowadzono w triplikatach. Fitohemaglutynina (Sigma; 5 $\mu\text{g/ml}$) była używana jako kontrola wskazująca, że limfocyty posiadają zdolność do proliferacji. Płytki inkubowano w temp. 37°C, w atmosferze 5% CO_2 i 95% powietrza przez 5 dni. Okres hodowli ustalono na podstawie wstępnych doświadczeń. Na 16 godzin przed zakończeniem hodowli, do studzienek dodawano po 0.2 μCi metyl- ^3H -tymidyny (akt. wł. 25 Ci/mmol; Amersham Int.). Następnie komórki przenoszono na papier filtracyjny przy użyciu półautomatycznego harwestera (PHD Cell Harvester, Cambridge Technology Inc.). Po

wysuszeniu, do papieru filtracyjnego dodawano płyn scyntylicyjny. Wbudowany do komórek tryt mierzono w liczniku scyntylicyjnym, a wyniki przedstawiano jako średnią liczbę impulsów na minutę (ang. cpm- count per minute) lub jako współczynnik stymulacji (ang. SI - stimulation index) obliczany jako:

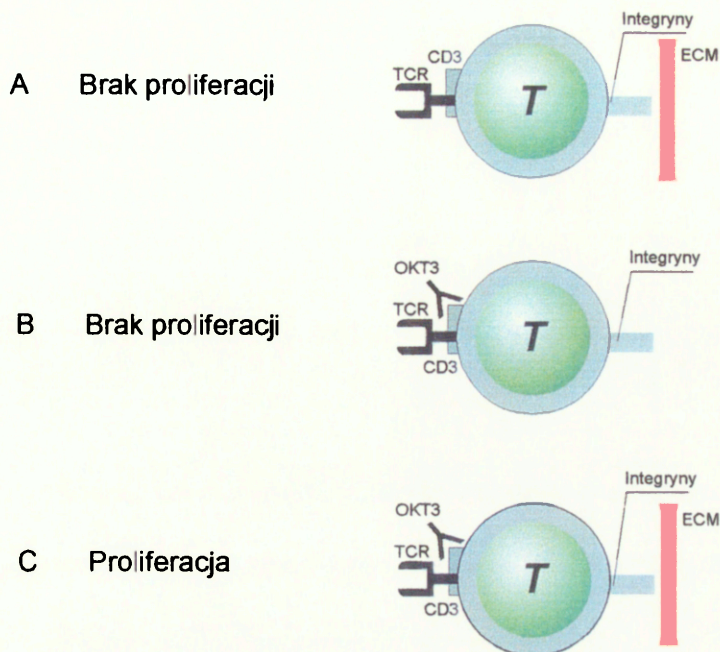
$$SI = \frac{\text{średnia liczba impulsów w hodowlach z antygenem}}{\text{średnia liczba impulsów w hodowlach bez antygeny}}$$

Jeżeli współczynnik stymulacji był większy od 2, to odpowiedź przeciw danemu antygenowi uznawano za znamienne.

III.6. Badanie pobudzenia do proliferacji limfocytów T, zależnej od cząsteczki CD3, przez białka macierzy pozakomórkowej.

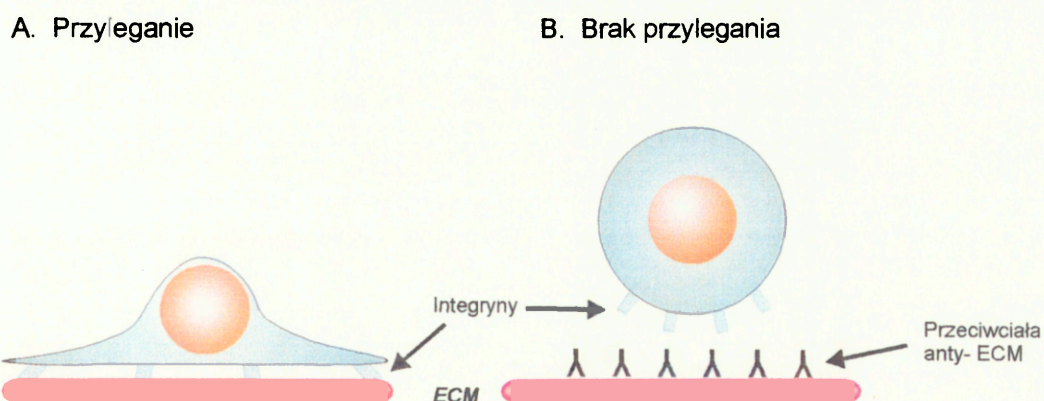
Badanie pobudzenia proliferacji limfocytów T, zależnej od cząsteczki CD3, przez białka macierzy pozakomórkowej (ECM) przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Shimizu i współpracowników [149,150]. Test jest oparty na obserwacji, że przy braku komórek prezentujących antygen, aktywacja kompleksu receptor limfocyta T / cząsteczka CD3, przy użyciu przeciwciała monoklonalnego OKT-3, nie prowadzi do proliferacji. Pobudzenie wyłącznie receptora dla białek ECM z grupy $\beta 1$ integryn, również nie doprowadza do proliferacji limfocytów. Jeżeli jednak receptor limfocyta T zostanie aktywowany wspólnie z integryną $\beta 1$, komórka będzie miała zdolność do podziałów. Jest to więc czuły test na obecność i czynność receptorów dla białek macierzy pozakomórkowej (ryc. 3).

Płytki 96-studzienkowe, o płaskim dnie (Corning), były opłaszczane przeciwciałem monoklonalnym OKT-3, o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$ w PBS, przez noc, w 4°C. Przeciwciała, które nie przyczepiły się do płytek, wypłukano i płytki inkubowano w roztworze białek macierzy pozakomórkowej, o stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$, w PBS, przez 4-5 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie płytki wypłukano trzykrotnie w PBS.



RYCINA 3. Badanie pobudzenia proliferacji limfocytów T, zależnej od cząsteczki CD3, przez białka macierzy pozakomórkowej (ECM).

A. Inkubacja limfocytów T z białkami macierzy pozakomórkowej (ECM) nie prowadzi do proliferacji leukocytów. **B.** Aktywacja limfocytów przeciwciałem skierowanym przeciwko cząsteczce CD3 receptora limfocytu T (TCR) nie prowadzi do proliferacji. **C.** Inkubacja aktywowanych limfocytów T z białkami ECM doprowadza do proliferacji, jeżeli leukocyt posiada specyficzny receptor dla białka tkanki łącznej z grupy $\beta 1$ integryn. Schemat własny.



RYCINA 4. Badanie wpływu przeciwciał przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej (ECM) na przyleganie komórek.

A. Komórki przylegają do białek ECM za pomocą integryn. **B.** Preinkubacja białek ECM z przeciwciałami może zablokować przyleganie komórek do białek ECM. Schemat własny.

Linie limfocytów T z krwi obwodowej lub z tkanki łącznej okołogłkowej były hodowane w ilości 5×10^4 /studzienkę, w pożywce RPMI-1640, wzbogaconej 10% bydlęcą surowicą płodową, 2mM L-glutaminą i antybiotykami, w objętości 200 μ l. Optymalnym czasem hodowli dla uzyskania proliferacji przy użyciu przeciwciał OKT-3 są 4 dni [46,48]. Na 16 godzin przed zakończeniem hodowli, do studzienek dodawano po 0.2 μ Ci metyl- 3 H-tymidyny. Po zakończeniu hodowli, osad komórkowy przenoszono na papier filtracyjny przy użyciu półautomatycznego harwestera. Radioaktywność mierzono w liczniku scyntylicyjnym, a wyniki przedstawiano jako średnia liczba impulsów na minutę (cpm) i jako stosunek:

$$\frac{\text{średnia liczba impulsów w hodowlach z OKT-3 oraz białkiem ECM}}{\text{średnia liczba impulsów w hodowlach z OKT-3}}$$

Pobudzenie aktywowanych limfocytów przez białka macierzy pozakomórkowej uznano za znamienne, jeżeli stosunek OKT-3 + ECM/OKT3 był większy niż 2.

III.7. Test immunoenzymatyczny typu ELISA

Do badań użyto następujących antygenów: natywnych kolagenów typu I, III, IV, V z łożyska ludzkiego, fibronektyny, lamininy oraz zdenaturowanych kolagenów typu I, V. Studzienki płytki do ELISA (Immulon IV, Dynatech Labs.) zostały opłaszczone antygenem o stężeniu 4 μ g/ml, w 0.05 M buforze węglanowym (pH 9.6), w objętości 50 μ l, przez noc w temp. 4°C. Płytki przemyto trzykrotnie w PBS, zawierającym 0.06% Tween-20 oraz 1% albuminy z surowicy bydlęcej. Tego samego roztworu używano do dalszych płukań oraz do rozcieńczania przeciwciał lub surowic. Nieopłaszczony miejsca na płytkach zostały zablokowane przy pomocy roztworu 2% albuminy w PBS, przez 1 h w temp. pokojowej. Następnie surowice rozcieńczone 1:50 (objętość 50 μ l) inkubowano na płytkach przez 2 h w temp. pokojowej. Po trzykrotnym wypłukaniu płytek, drugorzędowe przeciwciała rozcieńczone 1:2000 inkubowano na płytkach przez 1 godzinę w temp. pokojowej. Jako przeciwciał drugorzędowych użyto sprzężonych z fosfatazą zasadową przeciwciał kozich klasy IgG reagujących z ludzkimi immunoglobulinami klasy IgG, IgA i IgM lub z poszczególnymi klasami przeciwciał (Sigma). Po wypłukaniu płytek, reakcja barwna po podaniu substratu dla fosfatazy zasadowej (1 mg/ml fosforan dwusodowy p-

nitrofenylu w 1 M buforze dietanoloaminy, pH 9.8) została oceniona w czytniku płytek ELISA, przy długości fali 405 nm, po 30 min inkubacji.

We wszystkich testach były użyte następujące kontrole: (1) surowica ludzka zawierająca przeciwciała przeciw badanemu antygenowi (pozytywna kontrola), (2) surowica ludzka nie zawierająca przeciwciał przeciw antygenowi (ujemna kontrola), (3) mysie przeciwciała monoklonalne przeciw antygenowi (dodatnia kontrola), (4) zablokowane studzienki albuminą bez antygeny inkubowano z surowicą (kontrola niespecyficznego wiązania przeciwciała pierwszorzędowego), (5) studzienki z antygenem inkubowano bez surowicy (kontrola niespecyficznego wiązania drugorzędowego przeciwciała), (6) studzienki zablokowane albuminą inkubowano bez surowicy i drugorzędowego przeciwciała (kontrola substratu).

Wyniki obliczono dla każdej surowicy odejmując średnią gęstość optyczną (ang. OD- optical density) uzyskaną w studzienkach opłaszczonych jedynie albuminą, od średniej gęstości optycznej uzyskanej w studzienkach opłaszczonych antygenem. Stężenie przeciwciał w surowicy było uznane za znamienne podwyższone, jeżeli OD przekraczało średnią plus 2 odchylenia standardowe wartości uzyskanych od zdrowych ochotników. Zmienność międzypłytkowa nie przekraczała 15%, a zmienność wewnątrzpłytkowa nie przekraczała 9%.

III.8. Badanie specyficzności przeciwciał klasy IgG, IgA i IgM przeciw białkom macierzy pozakomórkowej.

Specyficzność przeciwciał przeciwko natywnym kolagenom typu I, III, IV, V i lamininie oceniano metodą preabsorbpcji [103,133]. Badaniem objęto surowice pacjentów posiadające wysokie stężenie przeciwciał klasy IgG, IgA i IgM przeciw badanym antygenom. Płytki do ELISA zostały opłaszczone albuminą lub poszczególnymi antygenami jak opisano w paragrafie III.7. Po zablokowaniu albuminą nieopłaszczonych miejsc, surowice rozcieńczone 1:125 w PBS z dodatkiem 0.06% Tween-20, 1% albuminy (objętość 50 μ l) inkubowano w studzienkach przez noc, w 4°C. Następnie surowice przeniesiono na płytkę opłaszczoną jednym antygenem i test ELISA kontynuowano jak opisano w paragrafie III.7.

Wyniki zostały wyrażone, jako procent redukcji gęstości optycznej w porównaniu do oryginału (surowice absorbowane jedynie albuminą). Absorpcja powyżej 50% została uznana jako znamienne.

III.9. Elektroforeza strawionych kolagenów I i V oraz immunoblotting.

Kolagen I i V zostały strawione chemicznie stosując cyjanobromek (CNBr) w kwasie mrówkowym, zgodnie z metodą opisaną przez Millera [114,115].

Elektroforezę w żelu poliakrylamidowym w obecności siarczanu sodowego dodecylu przeprowadzono wg. metody Laemliego używając 10% żelu rozdzielającego i 4 % żelu zagęszczającego [94]. Antygeny w ilości 60 µg białka na żel, zostały rozpuszczone bezpośrednio w buforze, zawierającym 2% SDS, 5% 2-merkaptoetanol, 10% glicerol, 0.06 M tris, pH 6.8. Po gotowaniu przez 5 min, próbki zostały nałożone na żel. Na każdym żelu prowadzono też elektroforezę standardów białkowych o określonym ciężarze cząsteczkowym. Elektroforezę prowadzono przez 1.5 h przy napięciu 110 V. Następnie białka przenoszono elektrotransferem przez 3 h, przy natężeniu 350 mA, na błony z nitrocelulozy, zgodnie z metodą opisaną przez Towbin i wsp., w buforze zawierającym 0.02 M Tris, 0.02 M glicyny, 20% metanolu, pH 8.3 [171]. Zarówno elektroforezę, jak i immunoblotting wykonano w aparacie mini-PROTEAN II firmy Bio-Rad. Po transferze błonę pocięto na paski. Przeniesienie białek na błony nitrocelulozy zostało potwierdzone barwieniem czernią amidową. Błony zawierające peptydy były blokowane w roztworze 5% sproszkowanego mleka (Bio-Rad) w buforze TBS (0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.4) w temp. 4°C przez noc. Tego samego roztworu używano do płukań i do rozcieńczania przeciwciał. Następnie paski inkubowano z badanymi surowicami, rozcieńczonymi 1:500, przez 2 h, w temp. pokojowej. Po pięciokrotnym wypłukaniu, paski przez 2 godziny inkubowano w roztworze przeciwciał kozich klasy IgG przeciwko ludzkim immunoglobulinom klasy IgG, sprzężonych z fosfatazą zasadową (rozcieńczenie 1:2000). Próbki wywoływano przy pomocy roztworu 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosforanu toluidyny i błękitu nitrozotetraoilowego (w buforze zawierającym 0.05 M Tris, 0.05 M MgCl₂, 0.1 M NaCl; pH 9.5) przez 30 sekund, po czym paski płukano w nadmiarze wody destylowanej i suszone.

W teście używano następujące kontrole: (1) kozie przeciwciała poliklonalne przeciwko kolagenom I i V (Chemicon Int. Inc.); (2) paski inkubowano bez surowicy

(kontrola niespecyficznego wiązania drugorzędowego przeciwciała). Wyniki immunoblotingu były oceniane niezależnie przez dwóch badaczy nie znających pochodzenia surowic. Wyniki określano jako ujemne lub dodatnie.

III.10. Test hamowania przylegania komórek raka gruczołowego płuc do kolagenu I.

Badanie przylegania komórek do kolagenu zostało przeprowadzone zgodnie z wcześniej opisanymi metodami (ryc. 4) [41,48,149,150]. Płytki do ELISA, 96 studzienkowe z płaskim dnem zostały opłaszczone kolagenem I, o stężeniu 4 $\mu\text{g/ml}$, w PBS, przez noc w temp 4°C i zablokowane 1% roztworem bydlęcej albuminy w PBS przez 1 h w temp. pokojowej. Następnie płytki inkubowano przez noc, w temp 4°C, z wybranymi surowicami zdrowych dawców (n=4), surowicami pacjentów z TAO posiadającymi przeciwciała przeciw kolgenowi I (n=6), surowicami pacjentów z TAO nie posiadającymi przeciwciał przeciwko kolagenom (n=4). W badaniu używano surowic nierozcieńczonych i rozcieńczonych w stosunku 1:2, 1:10, 1:50, 1:250 w PBS z 1% albuminą. Kozie przeciwciała poliklonalne przeciwko kolagenowi I (Chemicon) były użyte jako dodatnia kontrola.

Po wypłukaniu płytek buforem PBS, komórki (6×10^4 /studzienkę) w pożywce RPMI-1640, z dodatkiem 1% albuminy, 10nM Hepes, dodano do studzienek i inkubowano przez 30 min., w temp. 37°C. Po przepłukaniu płytek trzykrotnie w ciepłym RPMI-1640, komórki, które przyległy, utrwalono w roztworze 1% glutardehydu w PBS (przez 10 min) i zabarwiono 0.1% wodnym roztworem fioletu krystalicznego (przez 25 min). Po przepłukaniu płytek w nadmiarze wody, studzienki płytki inkubowano z 50 μl 0.5% roztworu Triton X-100 (Sigma) przez 4 h. Następnie absorpcja była mierzona w czytniku do płytek ELISA przy długości fali 600 nm.

Wyniki obliczano odejmując średnią gęstość optyczną ze studzienek opłaszczonych albuminą zamiast kolagenem (niespecyficzne przyleganie komórek do studzienek plastikowych). Istniała liniowa zależność pomiędzy liczbą komórek w studzience i gęstością optyczną (OD) w zakresie od 2.5×10^3 do 4×10^4 (OD od 0.12 do 1.98). Wszystkie eksperymenty przeprowadzono w triplikatach.

III.11. Analiza statystyczna wyników.

Do oceny statystycznej wyników badań zastosowano nieparametryczny niesparowany test-U Manna-Whitneya oraz test Chi-Square z poprawką Yatesa. Zależność pomiędzy poziomem przeciwciał a klinicznymi parametrami oftalmopatii oceniano za pomocą współczynnika korelacji Spearmana. Poziom istotności ustalono na $p < 0.05$. Wyniki przedstawiono podając średnią i odchylenie standardowe.

IV. WYNIKI

IV.1. Interakcje limfocytów T z białkami macierzy pozakomórkowej u chorych z oftalmopatią związaną z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.

Odpowiedź typu komórkowego przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej badano u pacjentów z “aktywną” oftalmopatią (TAO-a; n=23), “stabilną” oftalmopatią (TAO-s; n=15), chorobami autoimmunologicznymi tarczycy bez klinicznych cech oftalmopatii (powszechnie uznany skrót z ang. AITD- autoimmune thyroid disease; n=15) oraz zdrowych ochotników (n=21). Z uwagi na małą liczbę badanych, pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa (GD; n=7) i chorobą Hashimoto (HT; n=8) bez klinicznych cech oftalmopatii zaliczono do jednej grupy chorób autoimmunologicznych tarczycy.

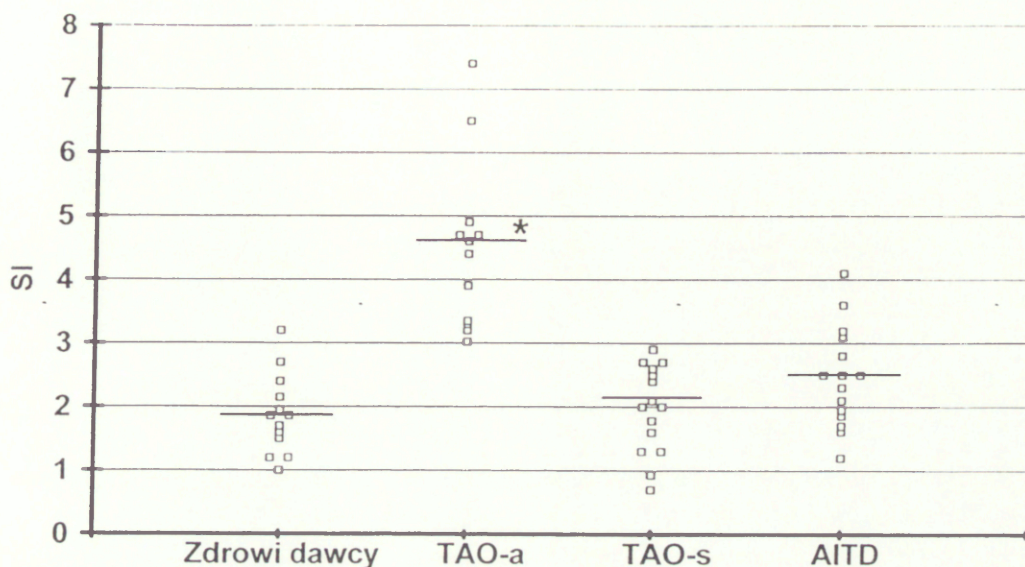
IV.1.1 Proliferacja jednojądrowych komórek krwi obwodowej po stymulacji białkami macierzy pozakomórkowej.

Wbudowanie [³H]tymidyny w hodowlach komórek jednojądrowych bez antygeny nie różniło się statystycznie (test-U Manna-Whitneya; p>0.05) we wszystkich badanych grupach (średnia ± odchylenie standardowe cpm; zdrowi dawcy: 250 ± 101; TAO-a: 235 ± 95; TAO-s: 266 ± 105; AITD: 219 ± 95). Fitohemaglutynina stymulowała proliferację limfocytów u wszystkich badanych osób. Nie stwierdzono statystycznie znamienych różnic pomiędzy odpowiedzią obwodowych leukocytów na niespecyficzną stymulację fitohematoglutyniną w grupie chorych z aktywną oftalmopatią (32872 ± 9765), stabilną oftalmopatią (32997 ± 10091), autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (30160 ± 10599) i zdrowych dawców (32872 ± 9765).

Wyniki testu proliferacji obwodowych komórek jednojądrowych są przedstawione na ryc.5. Obwodowe komórki jednojądrowe od pacjentów z aktywną oftalmopatią (TAO-a) były pobudzone bydłęcym kolagenem I i średni współczynnik stymulacji (4.5 ± 1.3) był znamienne większy (p<0.005) niż u pacjentów ze stabilną oftalmopatią (2.05 ± 0.68), chorobami autoimmunologicznymi tarczycy bez klinicznych objawów oftalmopatii (2.49 ± 0.8) oraz od zdrowych dawców (1.88±0.62). W grupie TAO-a, odpowiedź przeciwko kolagenowi I nie korelowała znamienne (współczynnik korelacji rang Spearmana; p>0.05) z odpowiedzią przeciwko innym antygenom.

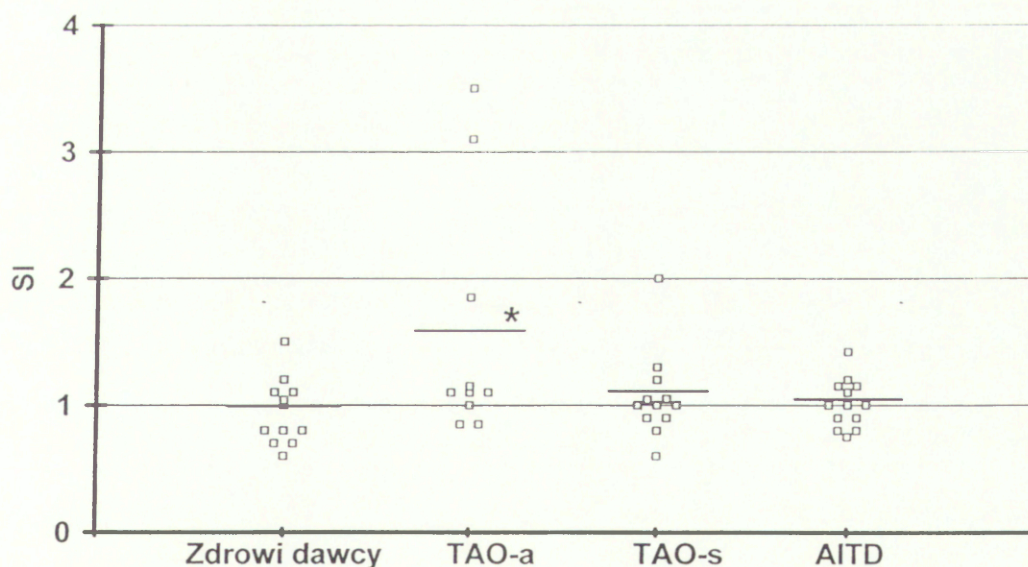
A.

Kolagen typ I



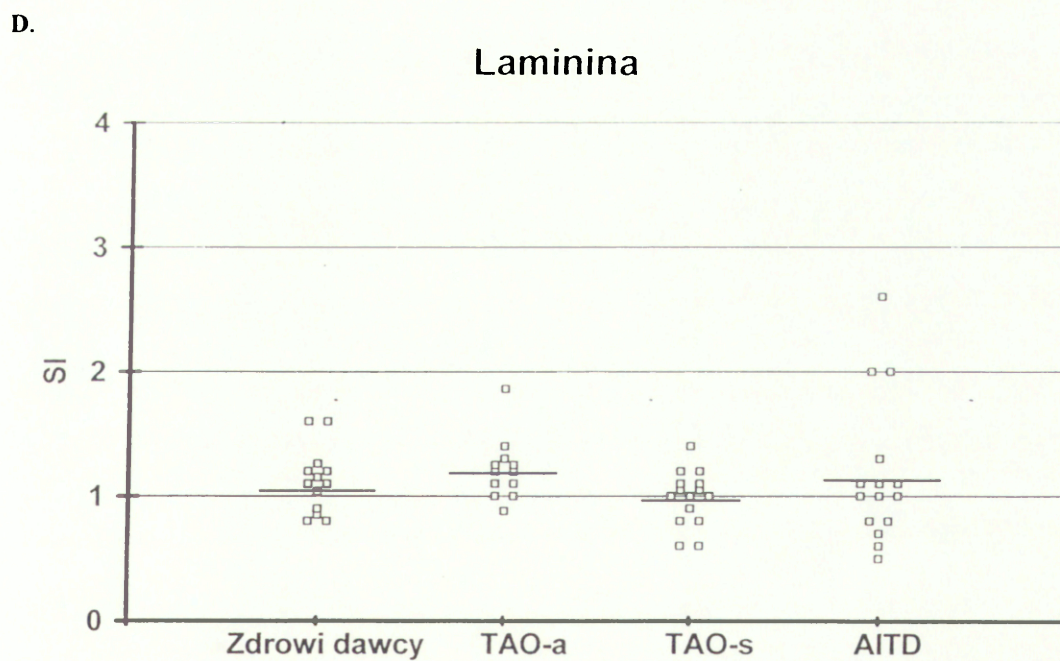
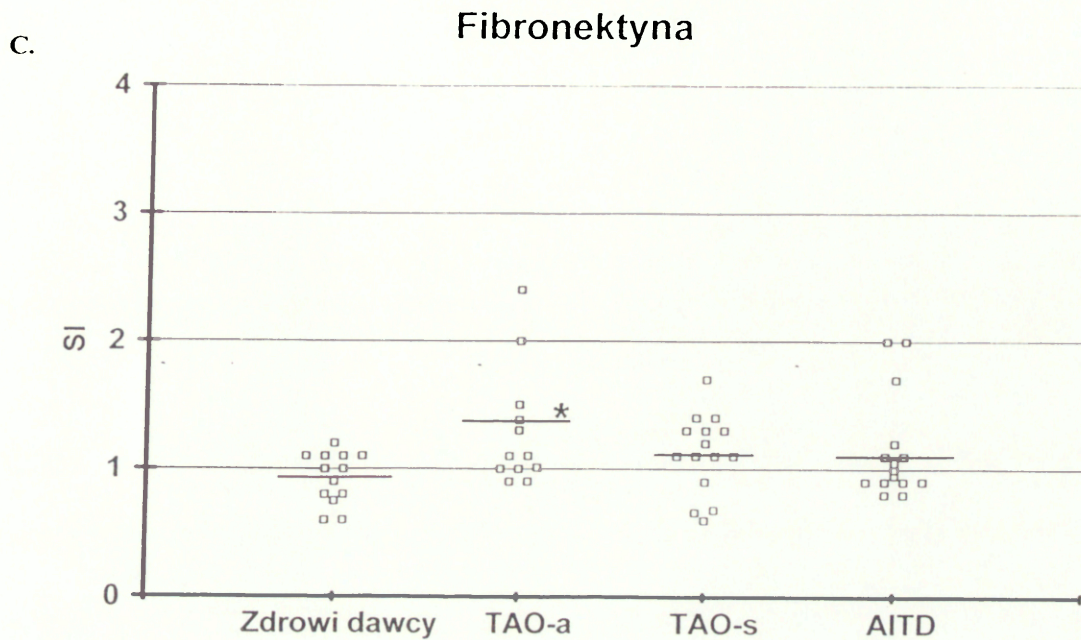
B.

Kolagen typ IV



RYCINA 5. Stymulacja: jednojądrowych komórek krwi obwodowej przez kolagen (A), kolagen IV (B), fibronektynę (C) i lamininę (D).

Grupy badane: pacjenci z aktywną oftalmopatią (TAO-a; n=12), stabilną oftalmopatią (TAO-s; n=15), autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (AITD; n=15) oraz zdrowi dawcy (n=19). Wyniki są przedstawione jako współczynniki stymulacji (SI). Poziomymi liniami zaznaczono średnie. *-p<0.05 versus zdrowi dawcy.



RYCINA 5. c.d. Stymulacja jednojądrowych komórek krwi obwodowej przez kolagen I(A),

kolagen IV (B), fibronektynę (C) i lamininę (D).

Grupy badane: pacjenci z aktywną oftalmopatią (TAO-a; n=12), stabilną oftalmopatią (TAO-s; n=15), autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (AITD; n=15) oraz zdrowi dawcy (n=19). Wyniki są przedstawione jako współczynniki stymulacji (SI). Poziomymi liniami zaznaczono średnie. *-p<0.05 versus zdrowi dawcy.

Odpowiedź komórek jednojądrowych przeciwko kolagenowi IV była znamienne większa w grupie chorych z aktywną oftalmopatią, niż w grupie zdrowych dawców (1.62 ± 1.0 vs. 0.93 ± 0.27 ; $p < 0.05$), ale nie była znamienne większa od odpowiedzi chorych ze stabilną oftalmopatią (1.07 ± 0.36), czy autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (1.0 ± 0.19). Należy jednak zauważyć, że test z kolagenem IV był dodatni (współczynnik stymulacji > 2) tylko u 2-óch pacjentów z TAO-a.

Również średni współczynnik stymulacji przeciw fibronektynie był znamienne większy w grupie aktywnej oftalmopatii, niż w grupie zdrowej kontroli (1.3 ± 0.47 vs. 0.92 ± 0.19 ; $p < 0.05$). Jednakże tylko limfocyty od 1-go pacjenta odpowiedziały znamienne na stymulację fibronektyną.

Odpowiedź przeciw lamininie była podobna we wszystkich badanych grupach (zdrowi dawcy: 1.04 ± 0.28 ; TAO-a: 1.21 ± 0.25 ; TAO-s: 0.97 ± 0.22 ; AITD: 1.16 ± 0.59 ; $p > 0.05$).

IV.1.2. Proliferacja jednojądrowych komórek krwi obwodowej po stymulacji bydlęcym i ludzkim kolagenem typu I.

Proliferację jednojądrowych komórek krwi obwodowej w odpowiedzi na bydlęcy lub ludzki kolagen I porównano u sześciu osób (4-ech zdrowych dawców, 2-óch pacjentów z AITD). Wyniki stymulacji przez bydlęcy i ludzki kolagen I były podobne (w grupie zdrowych dawców średni współczynnik stymulacji przeciwko bydlęcemu kolagenowi I wynosił 1.88 ± 0.62 , a przeciwko ludzkiemu kolagenowi I- 1.60 ± 0.66). Stwierdzono również istnienie znamiennej korelacji pomiędzy odpowiedzią na obydwa antygeny ($r=0.927$, $p < 0.01$).

IV.1.3. Proliferacja linii limfocytów T po stymulacji białkami macierzy pozakomórkowej.

Przy braku komórek prezentujących antygen, hodowle limfocytów T wyizolowane z krwi obwodowej pacjentów z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy lub aktywną oftalmopatią nie odpowiedziały proliferacją na stymulację białkami macierzy pozakomórkowej (tabela 1). Dwie linie limfocytów T z tkanki łącznej okołogałkowej (skrót z ang. RBT - retrobulbar T cells) również nie proliferowały w obecności białek tkanki łącznej. Linia limfocytów RBT-7 odpowiedziała znamienne (współczynnik stymulacji > 2) na

stymulację kolagenem I, gdy hodowano ją wspólnie z komórkami prezentującymi antygen (za które posłużyły napromienione, autologiczne, obwodowe komórki jednojądrowe).

TABELA 1. Proliferacja linii limfocytów T z krwi obwodowej lub tkanki łącznej okołogałkowej w odpowiedzi na stymulację kolagenem I, IV, fibronektyną i lamininą.

| Komórki | Rozpoznanie | Tłó | CI | CIV | FN | LM |
|-----------------|-------------|---------|-------------------|------------------|------------------|-----------------|
| PBL-1 | AITD | 140±4.3 | 215±37 (1.5) | 160±28 (1.1) | 174±42 (1.2) | 130±32 (0.9) |
| PBL-2 | TAO-a | 85±18 | 155±15 (1.8) | 88±5.6 (1.0) | 101±3.5 (1.2) | 82±8.7 (0.9) |
| RBT-1A | TAO-a | 167±33 | 216±41 (1.3) | 182±10 (1.1) | 225±41 (1.3) | 190±22 (1.1) |
| RBT-1B | TAO-a | 173±26 | 221±37 (1.3) | 495±87 (2.9) | 226±42 (1.3) | 277±88 (1.6) |
| RBT-7 + PBMC | TAO-a | 747±144 | 2096±338 (2.8) | 958±155 (1.3) | 490±30 (0.7) | nie wykonano |

Wyniki są przedstawione jako średnia + SD liczba impulsów na minutę w hodowlach bez antygeny (tłó) oraz z antygenem. Wartości w nawiasie przedstawiają współczynniki stymulacji. PBL- limfocyty T krwi obwodowej (skrót z ang. peripheral blood lymphocytes), RBT- limfocyty naciekające tkanki okołogałkowe (skrót z ang. retrobulbar T cells); Linia limfocytów RBT-7 była hodowana wspólnie z napromienionymi (dawka- 4000 Rad), autologicznymi jednojądrowymi komórkami krwi obwodowej (ang. PBMC- peripheral blood mononuclear cells). CI- kolagen I, CIV- kolagen IV, FN- fibronektyna, LM- laminina, AITD- autoimmunologiczna choroba tarczycy, TAO- oftalmopatia związana z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.

IV.1.4. Pobudzenie proliferacji limfocytów T, zależnej od cząsteczki CD3, przez białka macierzy pozakomórkowej.

We wszystkich badanych liniach, aktywacja kompleksu receptor limfocyty T/cząsteczka CD3 przez przeciwciało OKT3 nie prowadziła do znamiennej proliferacji limfocytów (współczynnik stymulacji < 2). Wyniki badań nad dodatkowym pobudzeniem limfocytów przez kolagen I, kolagen IV, fibronektynę i lamininę w sposób zależny od cząsteczki CD3, zostały przedstawione w tabeli 2. Aktywowane limfocyty T z krwi obwodowej pacjentów z aktywną oftalmopatią oraz zdrowych dawców, były znamienne stymulowane do proliferacji jedynie przez fibronektynę (stosunek OKT3+ECM/OKT3 >2). Z drugiej strony linia limfocytów pozagałkowych RBT-1B (która składała się w 14% z

komórek CD4⁺ i 80% z komórek CD8⁺) była silnie stymulowana przez wszystkie badane białka tkanki łącznej.

TABELA 2. Pobudzenie proliferacji limfocytów T, zależnej od CD3, przez kolageny I, IV, fibronektynę i lamininę.

| Komórki | Rozpoznanie | OKT3 | OKT3+ | OKT3+ | OKT3+ | OKT3+ |
|---------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| | | | CI | CIV | FN | LM |
| PBL-N1 | zdrowy | 1031±130 | 1230±257 | 1104±229 | 5827±131 | 1777±145 |
| | dawca | | (1.2) | (1.1) | (5.6) | (1.7) |
| PBL-N2 | zdrowy | 1247±232 | 2141±203 | 493±31 | 9183±379 | 1532±208 |
| | dawca | | (1.7) | (0.4) | (7.4) | (1.2) |
| PBL-A1 | AITD | 192±36 | 312±43 | 187±30 | 616±104 | 144±13 |
| | | | (1.6) | (1.0) | (3.2) | (0.8) |
| PBL-T2 | TAO-a | 128±10 | 206±15 | 96±2.3 | 730±81 | 98±16 |
| | | | (1.6) | (0.8) | (5.7) | (0.7) |
| RBT-1B | TAO-a | 792±71 | 3795±32 | 3386±17 | 4430±28 | 3669±99 |
| | | | (4.8) | (4.3) | (5.6) | (4.6) |

Wyniki są przedstawione jako średnia + odchylenie standardowe liczba impulsów na minutę. Wartości w nawiasie przedstawiają stosunek: OKT3+ECM/OKT3. OKT3- przeciwciała monoklonalne pobudzające cząsteczkę CD3 receptora limfocyta T. PBL- limfocyty T krwi obwodowej (ang. peripheral blood lymphocytes), RBT- limfocyty naciekające tkanki zagałkowe (ang. retrobulbar T cells); CI- kolagen I, CIV- kolagen IV, FN- fibronektyna, LM- laminina, AITD- autoimmunologiczna choroba tarczycy, TAO- oftalmopatia związana z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.

IV.1.5. Pobudzenie proliferacji linii limfocytów T z krwi obwodowej i tkanek pozagałkowych, zależnej od CD3, przez białka macierzy pozakomórkowej u wybranych pacjentów z aktywną oftalmopatią.

Wyniki linii limfocytów z tkanek zagałkowych przedstawione w tabeli 2 należy interpretować ostrożnie, gdyż hodowanie limfocytów w środowisku interleukiny 2 i OKT3 mogło zmienić liczbę oraz funkcję integrzyn. W celu oceny wpływu warunków hodowli na wynik testu proliferacji, u dwóch pacjentów prowadzono jednocześnie hodowlę linii limfocytów z krwi obwodowej i tkanek zagałkowych w tych samych warunkach, przez taki sam okres.

Po zakończeniu hodowli, skład subpopulacji limfocytów różnił się w liniach limfocytów z krwi obwodowej lub tkanki zagałkowej. W linii limfocytów z krwi obwodowej

od pacjenta TAO-K1, liczba komórek CD4⁺ wynosiła 34%, a CD8⁺ - 59.5%. W linii limfocytów zagałkowych od tego samego chorego, liczba komórek CD4⁺ wynosiła 74%, a CD8⁺ 19.6%. Podobnie w linii limfocytów zagałkowych od pacjenta TAO-7 dominowały komórki CD4⁺ (CD4⁺-73%; CD8⁺-18%) zaś w obwodowe limfocyty T składały się głównie z komórek CD8⁺ (CD4⁺-19%; CD8⁺-73%).

Wyniki testu pobudzenia proliferacji aktywowanych limfocytów przez białka macierzy pozakomórkowej są przedstawione w tabeli 3. W linii limfocytów z krwi obwodowej pobranej od pacjenta z aktywną oftalmopatią- TAO-K1, wynik testu był dodatni (stosunek OKT3+ECM/OKT3 >2) jedynie po stymulacji fibronektyną. Zwraca uwagę fakt, że wszystkie badane białka tkanki łącznej znamienne stymulowały linię zagałkowych limfocytów od tego samego pacjenta. Linia limfocytów z krwi obwodowej PBL-7 była znamienne stymulowana przez kolageny I, IV, fibronektynę, jednakże współczynniki pobudzenia były zawsze niższe od linii limfocytów zagałkowych.

TABELA 3. Pobudzenie proliferacji linii limfocytów T z krwi obwodowej i tkanek pozagałkowych, zależnej od CD3, przez kolageny I, IV, fibronektynę i lamininę u pacjentów z oftalmopatią.

| Pacjent | Komórki | OKT3 | OKT3+ | OKT3+ | OKT3+ | OKT3+ |
|---------|---------|----------|------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| | | | CI | CIV | FN | LM |
| TAO-K1 | PBL | 56.4±5.6 | 107±9.8 (1.9) | 63.5±4.2 (1.1) | 165±24 (2.9) | 108±13 (1.9) |
| | RBT | 57.6±9.1 | 300±37 (5.3) | 183±41 (3.2) | 362±5.6 (6.3) | 294±31 (5.1) |
| TAO-7 | PBL | 280±28 | 661±9.5 (2.3) | 695±104 (2.5) | 4587±397 (16) | 205±29 (0.7) |
| | RBT | 169±26 | 586±79 (3.5) | 1435±242 (8.5) | 4220±129 (25) | 191±23 (1.1) |

Wyniki są przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe impulsów na minutę. Wartości w nawiasie przedstawiają stosunek OKT3+ECM/OKT3. OKT3- przeciwciała monoklonalne pobudzające cząsteczkę CD3 receptora limfocyty T. PBL- limfocyty T krwi obwodowej (ang. peripheral blood lymphocytes), RBT- limfocyty naciekające tkanki okołogałkowe (ang. retrobulbar T cells); CI- kolagen I, CIV- kolagen IV, FN- fibronektyna, LM- laminina, TAO- oftalmopatia związana z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.

IV.1.6. Subpopulacje limfocytów T we krwi obwodowej u pacjentów z oftalmopatią w okresie aktywnym choroby oraz u zdrowych osobników.

Analiza antygenów powierzchniowych na limfocytach krwi obwodowej pobranej od pacjentów z aktywną oftalmopatią (TAO-a; n=7) oraz od zdrowych dawców (n=6), dobranych pod względem płci i wieku jest przedstawiona w tabeli 4.

U pacjentów z TAO-a, procent komórek CD8⁺ był znamienne (p<0.01) niższy niż u zdrowych dawców. Doprowadziło to do znamienego podwyższenia stosunku CD4⁺/CD8⁺ (2.4 ± 0.7 vs. 1.5 ± 0.4; p<0.05). Liczba komórek posiadających receptor dla IL-2 (CD25⁺), który jest markerem wczesnej aktywacji limfocytów, była podobna w obu grupach. Liczba limfocytów posiadających marker komórek pamięci (CD45RO⁺) oraz ilość komórek posiadających łańcuch β1 integryny (CD29⁺) była mniejsza u chorych z oftalmopatią, w porównaniu do zdrowej kontroli, jednak różnice nie były znamienne statystycznie.

TABELA 4. Ekspresja antygenów powierzchniowych na limfocytach T krwi obwodowej u pacjentów z “aktywną” oftalmopatią (n=7) oraz u zdrowych dawców (n=6).

| Grupy badane | CD8 | CD4 | CD45RO | CD25 | CD29 |
|--------------|--------------|------------|-------------|------------|-------------|
| Zdrowi dawcy | 26.2 ± 3.8 | 38.0 ± 6.1 | 38.7 ± 8.2 | 10.8 ± 4.0 | 50.3 ± 11.8 |
| TAO-a | 17.8 ± 1.94* | 43.3 ± 9.3 | 26.6 ± 13.5 | 11.6 ± 3.9 | 38.4 ± 15.6 |

Wyniki są przedstawione jako średnia ± odchylenie standardowe procentu komórek posiadających dany antygen. TAO-oftalmopatia związana z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy. *p<0.01 TAO-a vs. zdrowi dawcy (test-U Manna-Whitneya).

IV.2. Odpowiedź typu humoralnego przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej.

Odpowiedź typu humoralnego badano u chorych z oftalmopatią związaną z chorobami autoimmunologicznymi tarczycy (TAO; n=66), u chorych z chorobą Gravesa-Basedowa bez klinicznych cech oftalmopatii (GD; n=63), u chorych z chorobą Hashimoto bez klinicznych cech oftalmopatii (HT; n=45), u chorych z nieautoimmunologicznymi chorobami tarczycy (n=37) oraz u zdrowych dawców (n=63). W przeciwieństwie do badań

nad odpowiedzią komórkową, pacjentów z oftalmopatią w okresie aktywnym i okresie stabilnym choroby zaliczono do jednej grupy, ponieważ w żadnym z wykonanych testów nie stwierdzono statystycznie znamiennej różnicy pomiędzy TAO-a i TAO-s.

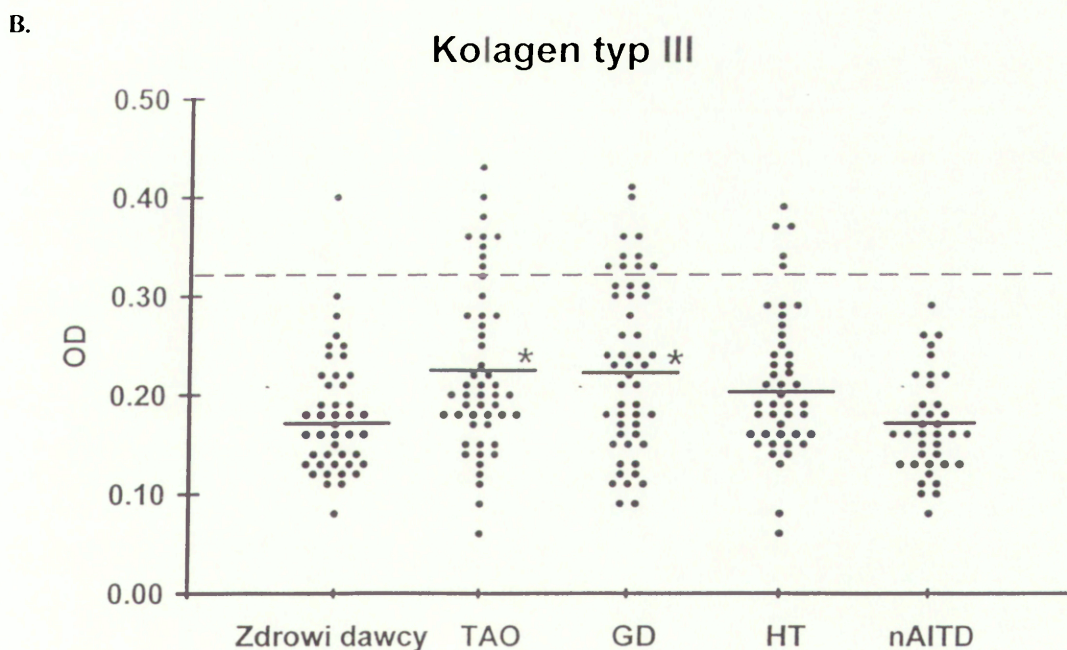
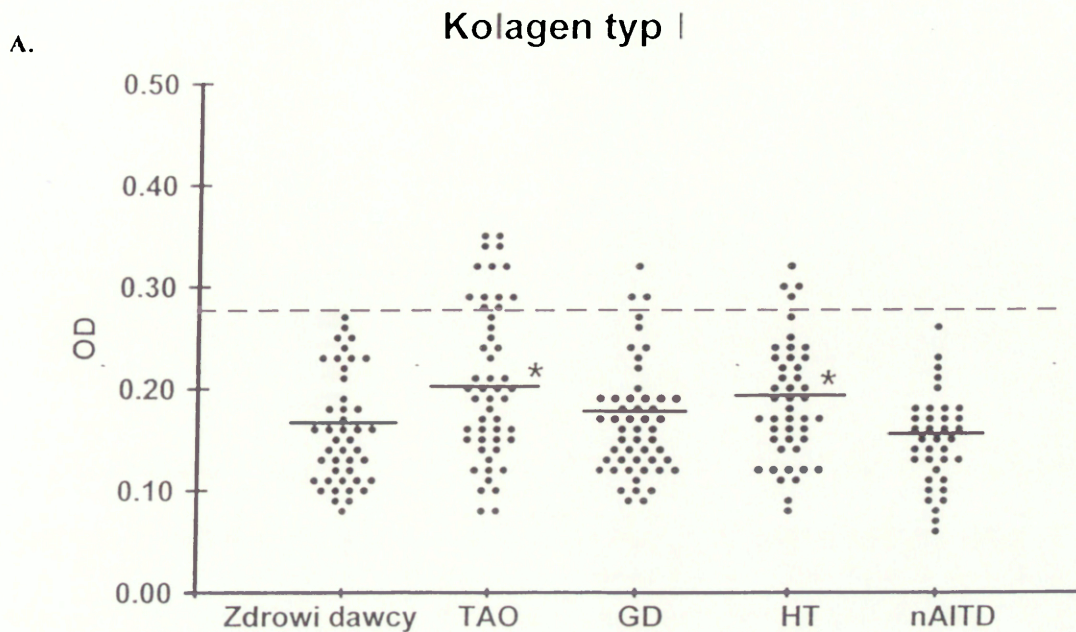
IV.2.1. Przeciwciała klasy IgG, IgA i IgM przeciwko natywnym białkom macierzy pozakomórkowej.

W surowicach 50% (25 z 50 badanych) pacjentów z oftalmopatią (TAO) stwierdzono autoprzeciwciała do jednego lub więcej białek tkanki łącznej. W innych badanych grupach, ten odsetek był znamiennej niższy (test chi kwadrat; $p < 0.05$) i wynosił dla pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa (GD)-27% (14/51), choroba Hashimoto (HT)-28% (13/45), nieautoimmunologicznymi chorobami tarczycy- 8% (3/37) i dla zdrowych dawców 9% (4/44). U pacjentów z oftalmopatią przeciwciała reagowały najczęściej z kolagenem I, III, V i lamininą (tabela 5). W 13 z 25 surowic od chorych z TAO stwierdzono reaktywność przeciwko dwóm lub więcej antygenom (7 chorych posiadało przeciwciała przeciwko 2 antygenom, 4 chorych przeciwko 3 antygenom, 2 chorych przeciwko 4 antygenom). Surowice pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa reagowały najczęściej z kolagenem III. We wszystkich badanych grupach, reaktywność przeciwko kolagenowi IV i fibronektynie była rzadko stwierdzana.

TABELA 5. Występowanie przeciwciał klasy IgG, IgA i IgM przeciw natywnym kolagenom I, III, IV, V, lamininie i fibronektynie.

| Grupy badane | CI | CIII | CIV | CV | LM | FN |
|---------------------|----|------|-----|----|----|----|
| Zdrowi dawcy (n=49) | 0 | 2 | 2 | 4 | 2 | 0 |
| TAO (n=50) | 26 | 20 | 2 | 22 | 22 | 0 |
| GD (n=51) | 6 | 20 | 0 | 10 | 8 | 6 |
| HT (n=45) | 9 | 11 | 0 | 13 | 11 | 0 |
| nAITD (n=37) | 0 | 0 | 0 | 3 | 8 | 0 |

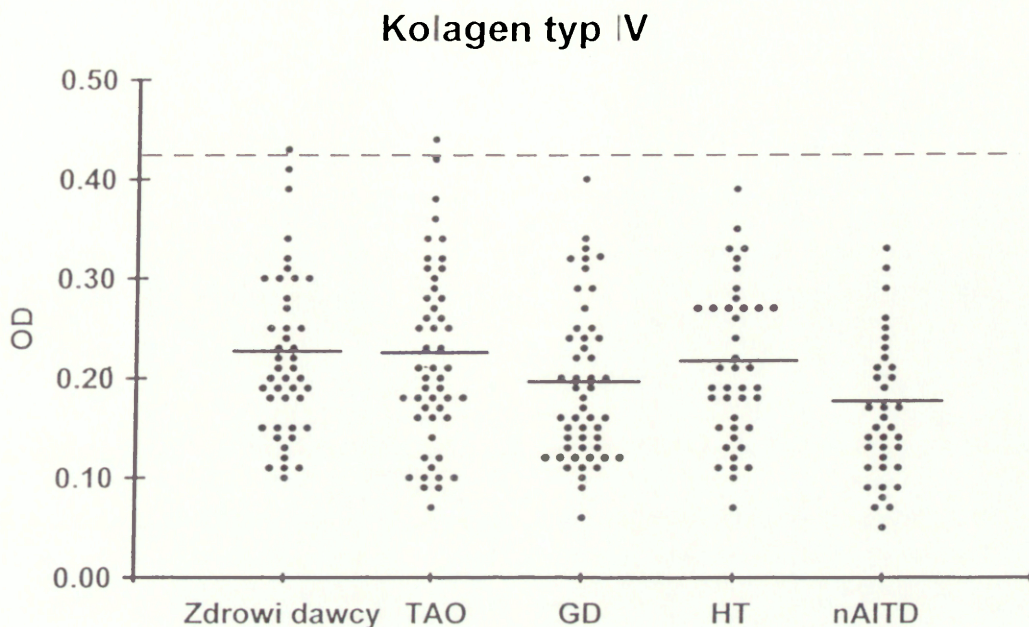
Wyniki są przedstawione jako procent surowic pacjentów, które posiadały znamiennej podwyższone stężenie przeciwciał. C- kolagen (ang. collagen), FN- fibronektyna (ang. fibronectin), LM- laminina (ang. laminin), TAO- oftalmopatia związana z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (ang. thyroid-associated ophthalmopathy), GD- choroba Gravesa-Basedowa (ang. Graves' disease), HT- zapalenie tarczycy typu Hashimoto (ang. Hashimoto's thyroiditis), nAITD- nieautoimmunologiczne choroby tarczycy (ang. non-autoimmune thyroid disease), n- liczba dawców z każdej grupy.



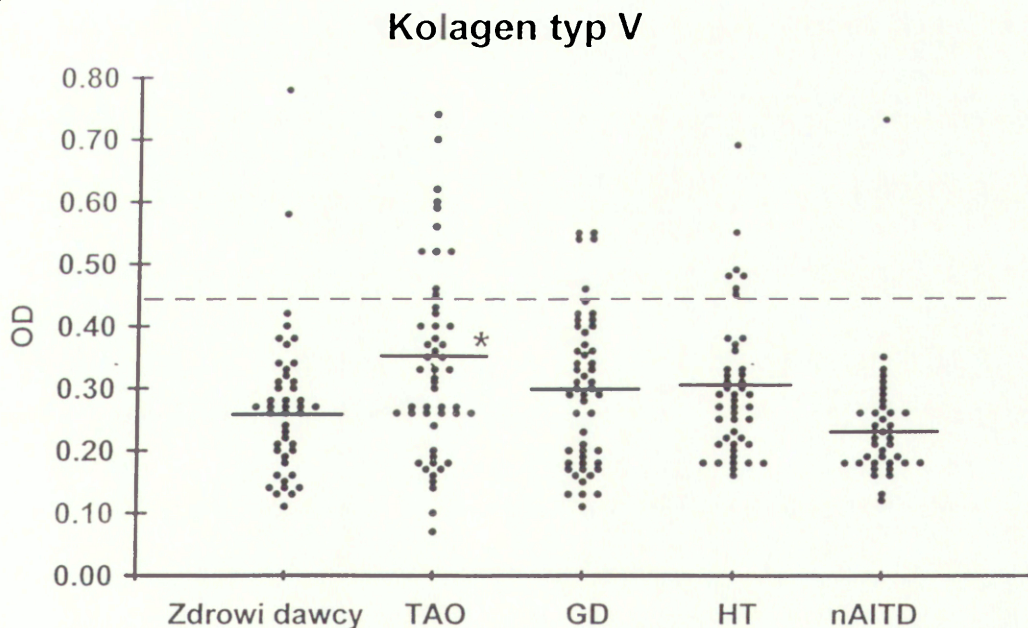
RYCINA 6. Poziom przeciwciał klasy IgG, IgA i IgM przeciw: natywnym kolagenom typu I, III, IV, V, fibronektynie i amininie.

Grupy badane: pacjenci z oftalmopatią (TAO; n=50), chorobą Gravesa Basedowa (GD; n=51), zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (HT; n=45), nieautoimmunologicznymi chorobami tarczycy (nAITD; n=37) oraz zdrowi dawcy (n=49). Wyniki są przedstawione jako gęstość optyczna (OD, przy długości fali 405 nm). * - $p < 0.05$ versus zdrowi dawcy. Linie poziome w każdej grupie oznaczają średnią. Linia przerywaną zaznaczono średnią + 2 odchylenia standardowe z wartości OD grupy zdrowych dawców.

c.



d.

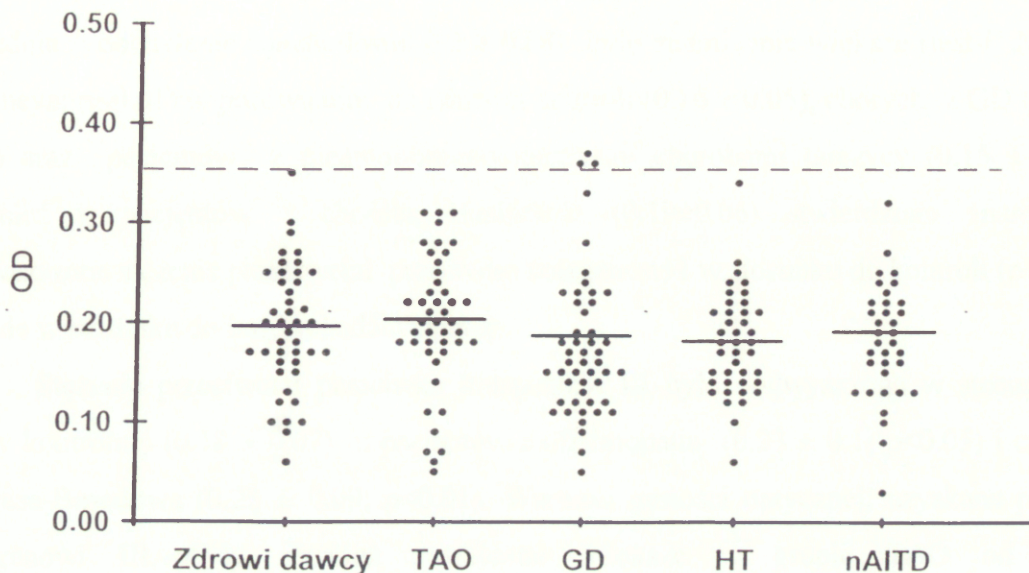


RYCINA 6. c.d. Poziom przeciwciał klasy IgG, IgA i IgM przeciw: natywnym kolagenom typu I, III, IV, V, fibronektynie i amininie.

Grupy badane: pacjenci z oftalmopatią (TAO; n=50), chorobą Gravesa Basedowa (GD; n=51), zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (HT; n=45), nieautoimmunologicznymi chorobami tarczycy (nAITD; n=37) oraz zdrowi dawcy (n=49). Wyniki są przedstawione jako gęstość optyczna (OD, przy długości fali 405 nm). * - $p < 0.05$ versus zdrowi dawcy. Linie poziome w każdej grupie oznaczają średnią. Linia przerywaną zaznaczono średnią + 2 odchylenia standardowe z wartości OD grupy zdrowych dawców.

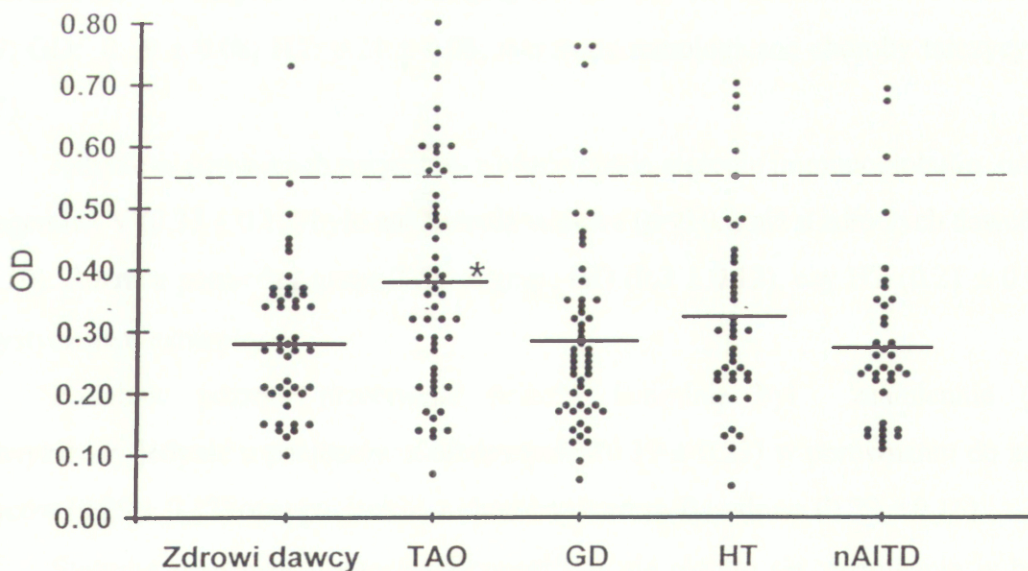
E.

Fibronektyna



F.

Laminina



RYCINA. 6. c.d. Poziom przeciwciał klasy IgG, IgA i IgM przeciw: natywnym kolagenom typu I, III, IV, V, fibronektynie i lamininie.

Grupy badane: pacjenci z oftalmopatią (TAO; n=50), chorobą Gravesa Basedowa (GD; n=51), zapaleniem tarczycy typu Hashimoto (HT; n=45), nieautoimmunologicznymi chorobami tarczycy (nAITD; n=37) oraz zdrowi dawcy (n=49). Wyniki są przedstawione jako gęstość optyczna (OD, przy długości fali 405 nm). * - $p < 0.05$ versus zdrowi dawcy. Linie poziome w każdej grupie oznaczają średnią. Linia przerywaną zaznaczono średnią + 2 odchylenia standardowe z wartości OD grupy zdrowych dawców.

Poziom przeciwciał przeciw natywnym białkom macierzy pozakomórkowej jest przedstawiony na ryc. 6. W grupie TAO średnie stężenie przeciwciał przeciwko kolagenowi I (średnia \pm odchylenie standardowe; 0.2 ± 0.08) było znamienne większe (test-U Manna-Whitneya; $p < 0.01$) w porównaniu do zdrowej kontroli (0.16 ± 0.05), chorych z GD (0.17 ± 0.05) oraz pacjentów z nieautoimmunologicznymi chorobami tarczycy (0.15 ± 0.04). Również u pacjentów z chorobą Hashimoto (0.19 ± 0.06) stwierdzono znamienne podwyższone stężenie przeciwciał przeciwko kolagenowi I w stosunku do kontroli ($p < 0.05$), ale nie w stosunku do innych badanych grup.

Stężenie przeciwciał przeciwko kolagenowi III było podwyższone w stosunku do grupy kontrolnej (0.18 ± 0.07) u pacjentów z oftalmopatią (0.23 ± 0.1 ; $p < 0.05$) i chorobą Gravesa-Basedowa (0.23 ± 0.09 ; $p < 0.01$). Wartości gęstości optycznej, uzyskane przeciw kolagenowi III, były również znamienne większe w grupie TAO od grupy nieautoimmunologicznych chorób tarczycy (0.17 ± 0.05), ale nie od pacjentów z chorobą Hashimoto (0.21 ± 0.07).

Różnice w stężeniu przeciwciał przeciwko kolagenowi IV były statystycznie nieznamienne we wszystkich badanych grupach (zdrowi dawcy: 0.22 ± 0.09 ; TAO: 0.22 ± 0.09 ; GD: 0.19 ± 0.08 ; HT: 0.21 ± 0.08 ; nieautoimmunologiczne choroby tarczycy: 0.16 ± 0.07).

Jedynie w surowicach pacjentów z oftalmopatią stężenie immunoglobulin przeciwko kolagenowi V (0.33 ± 0.15) było znamienne większe ($p < 0.05$) niż u zdrowych dawców (0.27 ± 0.10). Różnice pomiędzy grupą TAO a grupą GD (0.3 ± 0.12), czy HT (0.21 ± 0.08) były statystycznie nieznamienne.

Podobnie poziom przeciwciał przeciw lamininie był znamienne ($p < 0.05$) podwyższony jedynie u pacjentów z oftalmopatią (0.39 ± 0.23) w porównaniu do zdrowych dawców (0.29 ± 0.13) oraz pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa (0.29 ± 0.16).

Stężenie przeciwciał przeciw fibronektynie nie różniło się znamienne w badanych grupach (zdrowi dawcy: 0.19 ± 0.07 ; TAO: 0.20 ± 0.07 ; GD: 0.18 ± 0.07 ; HT: 0.17 ± 0.06 ; nieautoimmunologiczne choroby tarczycy: 0.18 ± 0.06).

Stężenie przeciwciał przeciwko poszczególnym białkom macierzy pozakomórkowej nie różniło się statystycznie u pacjentów z aktywną i stabilną oftalmopatią. Nie stwierdzono również istnienia korelacji pomiędzy poziomem przeciwciał a ciężkością oftalmopatii.

TABELA 6. Absorpcja surowic chorych z oftalmopatią, które posiadały dużą reaktywność przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej, na kolagenach typu I, III, IV, V i lamininie.

| Antygen | Pacjenci | Surowice absorbowano za pomocą | | | | | lamininy |
|-------------|----------|--------------------------------|------------|--------------|-------------|------------|-----------|
| | | albuminy | kolagenu I | kolagenu III | kolagenu IV | kolagenu V | |
| kolagen I | TAO-1 | 0.16 | 0.07 (56) | 0.13 (19) | 0.16 (0) | 0.11 (31) | |
| | TAO-2 | 0.20 | 0.10 (50) | 0.16 (20) | 0.17 (15) | 0.15 (25) | |
| | TAO-3 | 0.17 | 0.12 (29) | 0.14 (18) | 0.14 (18) | 0.16 (6) | |
| | TAO-4 | 0.20 | 0.10 (50) | 0.13 (35) | 0.14 (30) | 0.12 (40) | |
| kolagen III | TAO-1 | 0.18 | 0.17 (6) | 0.10 (44) | 0.11 (39) | 0.14 (22) | |
| | TAO-2 | 0.20 | 0.14 (30) | 0.12 (40) | 0.16 (20) | 0.15 (25) | |
| | TAO-5 | 0.22 | 0.16 (27) | 0.12 (45) | 0.17 (23) | 0.18 (18) | |
| | TAO-6 | 0.25 | 0.21 (16) | 0.20 (20) | 0.22 (12) | 0.21 (16) | |
| kolagen V | TAO-1 | 0.22 | 0.20 (9) | 0.22 (0) | 0.20 (9) | 0.09 (59) | |
| | TAO-2 | 0.20 | 0.17 (15) | 0.19 (5) | 0.19 (5) | 0.10 (50) | |
| | TAO-3 | 0.20 | 0.16 (20) | 0.17 (15) | 0.16 (20) | 0.09 (55) | |
| | TAO-5 | 0.27 | 0.22 (19) | 0.22 (19) | 0.19 (30) | 0.10 (59) | |
| laminina | TAO-1 | 0.24 | 0.18 (25) | 0.17 (29) | 0.19 (21) | | 0.14 (42) |
| | TAO-3 | 0.25 | 0.19 (24) | 0.20 (20) | 0.21 (16) | | 0.11 (56) |
| | TAO-4 | 0.21 | 0.16 (24) | 0.15 (29) | 0.18 (14) | | 0.10 (52) |
| | TAO-5 | 0.35 | 0.25 (29) | 0.22 (37) | 0.20 (43) | | 0.17 (51) |

Wyniki są przedstawione jako gęstość optyczna (przy długości fali 405 nm). Wartości w nawiasach przedstawiają procent zmniejszenia gęstości optycznej w porównaniu do oryginału (tzn. absorbowanego jedynie albuminą). Zmniejszenie gęstości optycznej o 50% uznano za znamienne. TAO- oftalmopatia związana z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.

IV.2.2. Specyficzność przeciwciał przeciwko natywnym białkom macierzy pozakomórkowej.

Specyficzność przeciwciał przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej u pacjentów z oftalmopatią została przedstawiona w tabeli 6. Do badań absorpcji wybrano surowice, które posiadały wysoką reaktywność przeciwko dwóm lub więcej antygenom. Absorpcja surowic na kolagenie I zmniejszyła znamienne (>50%) reaktywność przeciw kolagenowi I w 3 z 4 badanych surowic. Należy jednak zauważyć, że zmniejszenie wiązania (>20%) do kolagenu I zaobserwowano również po absorpcji na innych kolagenach. Podobnie przeciwciała przeciw lamininie mogły być specyficznie usunięte przez absorpcję na lamininie w 3 z 4 badanych surowic. Preinkubacja surowic z kolagenem V znamienne zmniejszyła reaktywność przeciw kolagenowi V. Reaktywność przeciwko kolagenowi III mogła być zmniejszona przez preinkubację ze wszystkimi kolagenami, ale nigdy nie przekraczała 50%.

IV.2.3. Klasy przeciwciał reagujących z kolagenem I i V.

Klasy przeciwciał reagujących z natywnym kolagenem I i V badano w losowo wybranych surowicach pacjentów z oftalmopatią (n=16), chorobą Gravesa-Basedowa (n=12) i zdrowych dawców (n=14). Przedstawione w tabeli 7 wyniki wskazują, że jedynie stężenie przeciwciał klasy IgG przeciwko kolagenom było znamienne większe w grupie TAO w porównaniu do pozostałych badanych grup. Poziomy przeciwciał klasy IgM i IgA nie różniły się statystycznie w badanych grupach.

TABELA 7. Klasy przeciwciał przeciw kolagenowi I i V u pacjentów z oftalmopatią (n=16), chorobą Gravesa-Basedowa (n=12) i zdrowych dawców (n=14).

| | Grupy badane | Klasy przeciwciał | | |
|-----------|--------------|-------------------|-------------|-------------|
| | | IgG | IgA | IgM |
| Kolagen I | zdrowi dawcy | 0.08 ± 0.02 | 0.04 ± 0.02 | 0.15 ± 0.10 |
| | TAO | 0.12 ± 0.04* | 0.04 ± 0.02 | 0.15 ± 0.08 |
| | GD | 0.07 ± 0.05 | 0.03 ± 0.02 | 0.10 ± 0.05 |
| Kolagen V | zdrowi dawcy | 0.13 ± 0.17 | 0.02 ± 0.02 | 0.28 ± 0.16 |
| | TAO | 0.45 ± 0.52* | 0.03 ± 0.02 | 0.29 ± 0.15 |
| | GD | 0.16 ± 0.33 | 0.01 ± 0.02 | 0.22 ± 0.14 |

Wyniki są przedstawione jako gęstość optyczna (przy długości fali 405 nm). Wartości ± oznaczają średnią i odchylenie standardowe. TAO- oftalmopatia związana z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy, GD- choroba Gravesa-Basedowa. * p<0.05 TAO vs. zdrowi dawcy oraz GD (test-U Manna-Whitneya).

IV.2.4. Przeciwciała reagujące z zdenaturowanym kolagenem I i V.

Poziom przeciwciał klasy IgG przeciwko zdenaturowanemu kolagenowi I i V mierzono w losowo wybranych surowicach pacjentów z oftalmopatią (n=16), chorobą Gravesa-Basedowa (n=12) i zdrowej kontroli (n=14), używając testu typu ELISA (tabela 8). Zwraca uwagę, że we wszystkich badanych grupach stężenie przeciwciał przeciwko zdenaturowanemu kolagenowi I było znamienne większe w porównaniu z natywnym kolagenem. Stężenie przeciwciał przeciwko zdenaturowanemu kolagenowi I nie różniło się statystycznie między poszczególnymi grupami.

Natomiast we wszystkich grupach stężenie przeciwciał przeciwko zdenaturowanemu kolagenowi V uległo zmniejszeniu w porównaniu do natywnego kolagenu, ale tylko w grupie TAO różnica osiągnęła statystyczną znamienność. Stężenie przeciwciał przeciwko zdenaturowanemu kolagenowi V było również znamienne większe u chorych z oftalmopatią w porównaniu do pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa i zdrowych dawców (p<0.05).

TABELA 8. Przeciwciała klasy IgG przeciwko natywnemu i zdenaturowanemu kolagenowi I i V u pacjentów z oftalmopatią, chorobą Gravesa-Basedowa i zdrowych dawców.

| Grupy badane | Kolagen I | | Kolagen V | |
|--------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | natywny | zdenaturowany | natywny | zdenaturowany |
| zdrowi dawcy | 0.08 ± 0.02 | 0.35±0.11** | 0.13 ± 0.17 | 0.06±0.05 |
| TAO | 0.12 ± 0.04 | 0.39±0.16 ** | 0.45 ± 0.52 | 0.17±0.22* |
| GD | 0.07± 0.05 | 0.30±0.09** | 0.16 ± 0.33 | 0.06±0.07 |

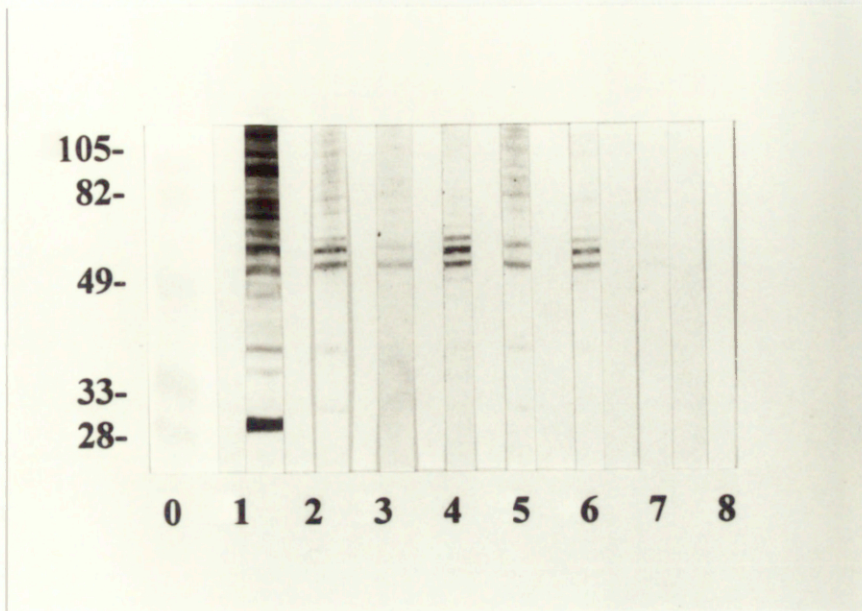
Wyniki są przedstawione jako gęstość optyczna (przy długości 405 nm). Wartości ± oznaczają średnią i odchylenie standardowe; TAO- oftalmopatia związana z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy, GD- choroba Gravesa-Basedowa. *- p<0.05, **p<0.0001 kolagen natywny vs. zdenaturowany.

W celu poznania epitopów występujących na zdenaturowanych białkach macierzy pozakomórkowej wykonano immunoblotting rozdzielonych elektroforetycznie kolagenów I i V (po ich strawieniu za pomocą cyjanku bromku). Badaniem objęto surowice pacjentów z oftalmopatią (TAO; n=10), chorobą Gravesa-Basedowa (GD; n=7) i zdrowej kontroli (n=8). Do badań zostały wybrane surowice, które zawierały przeciwciała przeciwko kolagenom I lub V.

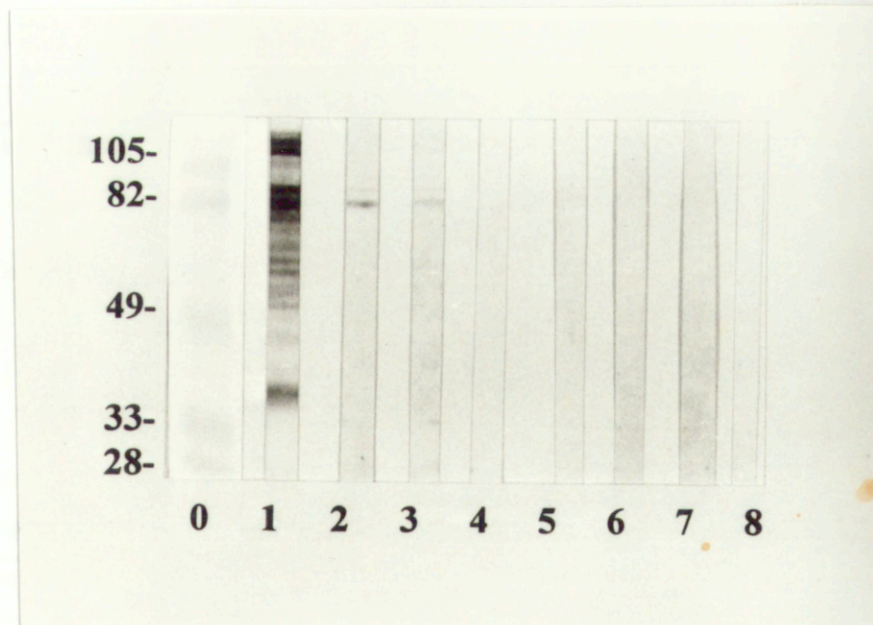
Surowice od 9 z 10 badanych chorych z oftalmopatią, 6 z 7 chorych z chorobą Gravesa-Basedowa, 4 z 8 zdrowych dawców reagowały z strawionym kolagenem I. Różnice pomiędzy grupami były nieznaczne statystycznie (test chi-kwadrat; p>0.05). Wszystkie surowice reagowały z podobnym zestawem białek, których masa cząsteczkowa wynosiła od 38 do 110 kDa.

Jedynie 2 z 10 badanych surowic chorych z oftalmopatią reagowały ze strawionym kolagenem V (masa cząsteczkowa około 82 kDa). Nie obserwowano wiązania przeciwciał klasy IgG ze zdenaturowanym kolagenem V w grupie GD i zdrowych dawców. Wybrane wyniki immunoblottingu przedstawiono na ryc. 7.

A.



B.



RYCINA 7. Immunoblotting strawionych bromkiem cyjanku (CNBr) kolagenów typu I (A) i V (B) z surowicami chorych z oftalmopatią, chorobą Gravesa-Basedowa lub zdrowych dawców.

Pasek 0-wzorzec ciężarów cząsteczkowych białek (kDa); Pasek 1- kozie przeciwciała poliklonalne przeciwko kolagenowi I lub V, Paski 2,3- surowice pacjentów z oftalmopatią, Paski 4,5- surowice pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa, Paski 6,7- surowice zdrowych ochotników, Pasek 8 inkubowano z buforem TBS zamiast z surowicą (ujemna kontrola).

IV.2.5. Wpływ przeciwciał przeciwko kolagenowi I na przyleganie komórek raka gruczołowego płuc do kolagenu I.

Komórki raka gruczołowego płuc (A549) były uprzednio wykorzystane w badaniach przylegania komórek do kolagenu I (119). Za pomocą cytofluorometrii przepływowej, na powierzchni komórek A549 stwierdzono następujące receptory dla kolagenu I: integrynę $\alpha 1\beta 1$ (7.5% komórek) oraz integrynę $\alpha 2\beta 1$ (18.2 % komórek), ale nie integrynę $\alpha 3\beta 1$.

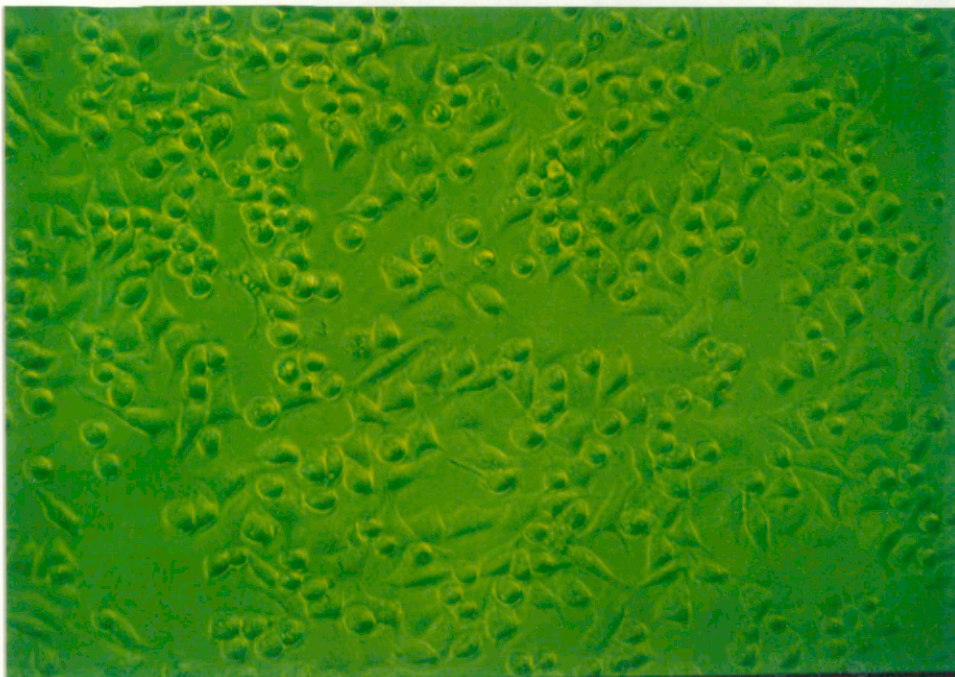
Surowice posiadające wysokie stężenie przeciwciał przeciwko kolagenowi I lub surowice nie posiadające przeciwciał przeciw kolagenom nie hamowały przylegania komórek A549 do kolagenu I. Jedynie kozie przeciwciało poliklonalne przeciwko kolagenowi I rozcieńczone 1:10, znamienne (>50%) hamowało przyleganie komórek. Kozie przeciwciało poliklonalne przeciwko kolagenowi V nie miało wpływu na interakcje komórek A549 z kolagenem I. Wyniki wybranych doświadczeń przedstawiono w tabeli 9 oraz na ryc. 8.

TABELA 9. Wpływ przeciwciał przeciwko kolagenowi I na przyleganie komórek raka gruczołowego płuc (A549) do kolagenu I.

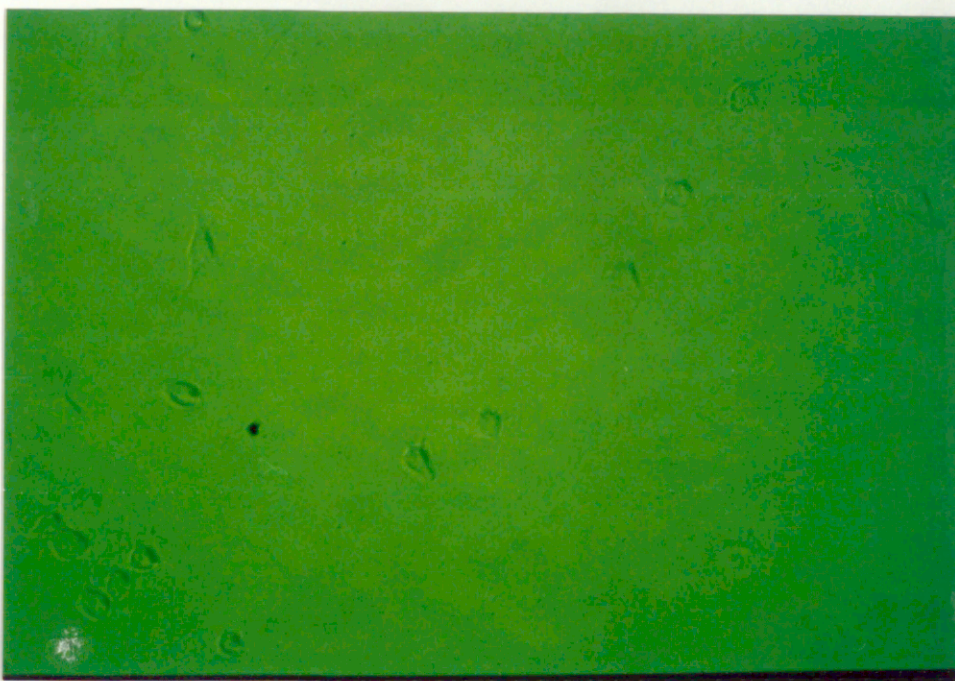
| surowice | przyleganie komórek w obecności surowic | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | nie-rozcieńczone | rozcieńczone 1:2 | rozcieńczone 1:10 | rozcieńczone 1:50 | rozcieńczone 1:250 |
| zdrowy dawca | 0.88 | 0.89 | 0.83 | 0.87 | 0.80 |
| TAO 1 | 0.88 | 0.83 | 0.84 | 0.86 | 0.88 |
| TAO 2 | 0.77 | 0.77 | 0.66 | 0.73 | 0.77 |
| TAO 3 | 0.75 | 0.79 | 0.73 | 0.71 | 0.77 |
| przeciwciała anty-kolagen I | nie wykonano | nie wykonano | 0.20 | 0.61 | 0.83 |

Wyniki są przedstawione jako gęstość optyczna, przy długości fali 600 nm. TAO- oftalmopatia związana z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy, TAO 1,2- surowice chorych z oftalmopatią, z wysoką reaktywnością przeciwko kolagenowi I; TAO 3- surowica chorego z oftalmopatią nie posiadająca przeciwciał anty-kolagen i: surowica od zdrowego dawcy nie posiadała przeciwciał anty-kolagen I. Gęstość optyczna w studzienkach komórek hodowanych z kolagenem I bez przeciwciał wynosiła 0.86.

A.



B.



RYCINA 8. Wpływ przeciwciał przeciwko kolagenowi I na przyleganie komórek raka gruczołowego płuc (A549) do kolagenu I.

A. Przyleganie komórek A549 do studzienek opłaszczonych kolagenem I. **B.** Przyleganie komórek A549 do studzienek opłaszczonych kolagenem I po preinkubacji z kozimi przeciwciałami poliklonalnymi przeciw kolagenowi I. **C.** Przyleganie komórek A549 do studzienek opłaszczonych kolagenem I po preinkubacji z surowicą chorego z oftalmopatią, która zawierała wysokie stężenie przeciwciał przeciw kolagenowi I. Zdjęcia z mikroskopu fazowo-kontrastowego w powiększeniu 200 x.

C.



RYCINA 8. c.d. Wpływ przeciwciał przeciwko kolagenowi I na przyleganie komórek raka gruczołowego płuc (A549) do kolagenu I.

A. Przyleganie komórek A549 do studzienek opłaszczonych kolagenem I. B. Przyleganie komórek A549 do studzienek opłaszczonych kolagenem I po preinkubacji z kozimi przeciwciałami poliklonalnymi przeciw kolagenowi I. C. Przyleganie komórek A549 do studzienek opłaszczonych kolagenem I po preinkubacji z surowicą chorego z oftalmopatią, która zawierała wysokie stężenie przeciwciał przeciw kolagenowi I. Zdjęcia z mikroskopu fazowo-kontrastowego w powiększeniu 200 x.

V. DYSKUSJA

Wyniki niniejszej pracy wskazują na wpływ białek macierzy pozakomórkowej w patogenezie oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy. Badania odpowiedzi immunologicznej typu komórkowego i humoralnego wskazują, że składniki tkanki łącznej mogą być autoantygenami w oftalmopatii [12]. Interakcje limfocytów T pomocniczych z kolagenem I mogą wywołać proliferację limfocytów i rozpoczęcie odpowiedzi typu komórkowego [14]. Pobudzone limfocyty T pomocnicze mogą również wspomagać odpowiedź typu humoralnego i produkcję przez limfocyty B specyficznych przeciwciał przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej [15]. Ponadto białka macierzy pozakomórkowej mogą przekazywać dodatkowe sygnały pobudzające limfocytom T naciekających tkanki pozagałkowe, wzmagając ich odpowiedź przeciwko antygenom oczodołowym [14].

V.1. Badanie interakcji limfocytów T z białkami macierzy pozakomórkowej u chorych z oftalmopatią związaną z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.

V.1.1. Interakcje obwodowych limfocytów T z białkami macierzy pozakomórkowej.

Badanie interakcji obwodowych limfocytów T z białkami macierzy pozakomórkowej rozpoczęto od wykonania testu proliferacji komórek jednojądrowych krwi obwodowej po stymulacji antygenem, który jest uznanym testem badania odpowiedzi typu komórkowego *in vitro*. W teście tym stwierdzono, że obwodowe limfocyty T od chorych z aktywną oftalmopatią były silnie stymulowane przez kolagen I. Inne badane białka tkanki łącznej: kolagen IV, fibronektyna, laminina- stymulowały znamienne proliferację tylko u nielicznych pacjentów z oftalmopatią lub autoimmunologicznymi chorobami, ale nie u zdrowych dawców. Wstępne wyniki nie sugerowały stymulacji obwodowych limfocytów T przez kolagen typ III lub V (wyniki nie zostały przedstawione). Odpowiedź przeciwko kolagenowi I u chorych z oftalmopatią była zależna od aktywności choroby i nie była zależna od stanu zaawansowania choroby, stanu tyreometabolicznego, wieku ani płci.

Do testu proliferacji użyto kolagenu I ze skóry bydlęcej. Podejrzanie, że stymulacja limfocytów T była wynikiem odpowiedzi przeciwko obcemu gatunkowo białku wydaje się mało prawdopodobne, ponieważ struktury pierwszorzędowe bydlęcego i ludzkiego

kolagenu I są do siebie bardzo zbliżone. Znane sekwencje aminokwasów w łańcuchu $\alpha 1$ bydłowego kolagenu I są w 97% identyczne oraz w 99% podobne do ludzkiego kolagenu I. Sekwencje aminokwasów łańcucha $\alpha 2$ bydłowego kolagenu I są w 92% identyczne i w 95% podobne do ludzkiego kolagenu I. Ponadto odpowiedź obwodowych komórek jednojądrowych przeciwko ludzkiemu kolagenowi I znamienne korelowała z odpowiedzią przeciwko bydłowemu kolagenowi I.

Dokładny mechanizm stymulacji limfocytów T przez kolagen I nie był jasny [14]. Hodowle limfocytów T nie proliferowały znamienne w odpowiedzi na białka macierzy pozakomórkowej, przy braku monocytów i limfocytów B. Wyniki te wskazują, że współpraca limfocytów T i komórek prezentujących antygen była konieczna do wywołania proliferacji. Istnieją jednak dwie możliwości stymulacji obwodowych limfocytów T przez kolagen I, które zostały przedstawione schematycznie na ryc.9. Receptor limfocyta T rozpoznaje na ogół antygeny związane z cząsteczkami układu zgodności tkankowej, znajdujące się w błonie komórek prezentujących antygen. Monocyty lub limfocyty B mogły więc prezentować peptyd kolagenu I jako antygen obwodowym limfocytom T. Z drugiej strony, limfocyty T mogły również proliferować, bez specyficznej aktywacji receptora limfocytów T, ponieważ leukocyty mogą być stymulowane przez białka ECM głównie poprzez receptory z grupy $\beta 1$ integryn [29,165,166]. Po stymulacji receptorów dla kolagenu zarówno monocyty jak i limfocyty mogły być pobudzone do wydzielania mitogennych cytokin. W celu wyjaśnienia mechanizmu stymulacji obwodowych limfocytów T przez składniki tkanki łącznej zbadano ekspresję oraz funkcję $\beta 1$ integryn na obwodowych limfocytach T.

Ekspresję receptorów dla białek macierzy pozakomórkowej badano metodą cytofluorometrii. We krwi obwodowej stwierdzono, że procent limfocytów posiadających antygeny charakteryzujące m. in. komórki pamięci: $CD45RO^+$ oraz $CD29^+$ (łańcuch $\beta 1$ integryn) był mniejszy u chorych z aktywną oftalmopatią w porównaniu do zdrowej kontroli, jednak różnica ta nie osiągnęła znamienności statystycznej [159]. Ponadto u chorych z aktywną oftalmopatią zwracał uwagę znamienne niższy procent limfocytów $CD8^+$. Zmiany w stosunku $CD4^+/CD8^+$ były uprzednio opisywane u chorych z nadczynnością tarczycy w przebiegu choroby Gravesa-Basedowa [43,99].

Podobne zmiany w subpopulacjach obwodowych limfocytów opisywano u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS), u których stwierdzono mniejszy odsetek limfocytów $CD29^+$ w porównaniu do zdrowej kontroli [166]. Mniejszą ilość limfocytów

CD4⁺CD29⁺ we krwi obwodowej obserwowano również u chorych mieszaną chorobą kolagenową [11]. Powyższe wyniki można tłumaczyć migracją limfocytów pamięci z naczyń krwionośnych do miejsca zapalenia. Zmniejszenie ilości komórek CD29⁺ nie jest jednak zjawiskiem charakterystycznym dla wszystkich chorób autoimmunologicznych. U chorych z toczeniem rumieniowatym, z towarzyszącym zapaleniem naczyń, dochodzi do selektywnego wzrostu limfocytów posiadających integrynę $\alpha 4\beta 1$ [168]. W twardzinie układowej, stwierdzono wzmożoną ekspresję integryn $\beta 1$ na limfocytach CD4⁺ i CD8⁺ [82].

W celu oceny funkcji integryn $\beta 1$, wykonano test pobudzenia proliferacji limfocytów T, zależnej od cząsteczki CD3, przez białka macierzy pozakomórkowej. Hodowle limfocytów T z krwi obwodowej od zdrowych dawców lub chorych z oftalmopatią, były dodatkowo stymulowane tylko przez fibronektynę, co sugerowało, że obwodowe limfocyty posiadały na swojej powierzchni receptory dla tej glikoproteiny. Brak dodatkowej stymulacji przez kolagen I sugeruje, że limfocyty T nie posiadały wzmożonej ekspresji czynnościowych receptorów dla kolagenu. Wyniki te zgodne są z obserwacjami innych badaczy, stwierdzającymi, iż na obwodowych, niepobudzonych limfocytach T znajdują się głównie integryny $\alpha 4\beta 1$ i $\alpha 5\beta 1$ [107,149,150]. Natomiast Morimoto i wsp. oraz Górski i wsp. stwierdzili, że obwodowe limfocyty T, pochodzące od zdrowych dawców lub chorych, mogą być również stymulowane przez kolageny I, IV w sposób zależny od integryny $\alpha 3\beta 1$ lub cząsteczki 1F7 [29,46,48,123]. Te sprzeczne wyniki można tłumaczyć różnicami w metodach, używanych do badania dodatkowej stymulacji (inne warunki hodowli oraz różne linie limfocytów).

Powyższe wyniki wskazują, że odpowiedź obwodowych limfocytów T przeciwko kolagenowi I u chorych z aktywną oftalmopatią była zależna od specyficznej aktywacji receptora limfocytów T. Badania odpowiedzi komórkowej u chorych z autoimmunologicznymi chorobami tkanki łącznej również wskazują, że białka macierzy pozakomórkowej mogą być autoantygenami. U chorych z twardziną układową stwierdzono odpowiedź typu komórkowego przeciwko elastynie oraz składnikom błony podstawnej: lamininie i kolagenie IV [30,76]. Klony limfocytów reagujące przeciwko łańcuchowi $\alpha 3$ kolagenu IV stwierdzono również u chorych z zespołem Goodpastura [32,111]. Używając testu chemotaksji u chorych z RZS stwierdzono, że komórki jednojądrowe odpowiadają na stymulację kolagenem I, II i III [83,162]. Odpowiedź przeciwko kolagenom nie była jednak

specyficzna dla chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów, gdyż obserwowano ją również u chorych z dną. Snowden i wsp. stwierdzili, że odpowiedź komórek jednojądrowych krwi obwodowej przeciwko kolagenowi typu II występowała u 50% chorych z RZS, którzy posiadali przeciwciała przeciwko kolagenowi II, a tylko u 5.3% chorych, którzy nie posiadali tych przeciwciał [156]. W badaniu tym, aż u 35.7% zdrowych dawców występowała odpowiedź przeciwko kolagenowi II, co sugeruje, że delecja autoreaktywnych klonów limfocytów w grasicy nie była kompletna.

V.1.2. Interakcje limfocytów T z tkanek pozagałkowych z białkami macierzy pozakomórkowej.

Aby sprawdzić, czy białka tkanki łącznej mogą być autoantygenem w miejscu zapalenia, badano odpowiedź proliferacyjną linii limfocytów T z tkanek pozagałkowych na stymulację białkami macierzy pozakomórkowej. Linie limfocytów pozagałkowych, podobnie jak linie limfocytów z krwi obwodowej, nie proliferowały po stymulacji białkami ECM przy braku komórek prezentujących antygen. Jeżeli jednak linię limfocytów pozagałkowych hodowano wspólnie z naświetlonymi obwodowymi komórkami jednojądrowymi, które służyły jako komórki prezentujące antygen, obserwowano proliferację limfocytów T po stymulacji kolagenem I, a nie kolagenem IV lub lamininą.

Badania nad patogenezą reumatoidalnego zapalenia stawów (RZS) również sugerują, że naciekające limfocyty mogą być specyficznie stymulowane przez składniki tkanki łącznej. Badając 149 linii limfocytów T, wyizolowanych z płynu stawowego chorego z RZS, stwierdzono istnienie autoreaktywnych linii przeciwko kolagenowi I (15 linii), kolagenowi II (10 linii), kolagenowi IV (7 linii), kolagenowi V (4 linie), proteoglikanom z chrząstki (4 linie) [109].

W przeciwieństwie do obwodowych limfocytów T, linie limfocytów wyizolowane z tkanek pozagałkowych były silnie kostymulowane przez wszystkie badane białka macierzy pozakomórkowej (ECM). Tylko jedna linia limfocytów (linia RBT-7) nie podlegała stymulacji przez lamininę. Badania dodatkowej stymulacji sugerują wzmożoną ekspresję (lub funkcję) receptorów dla białek tkanki łącznej na limfocytach naciekających tkanki zapalne w oftalmopatii [14]. Badania na liniach limfocytów T z tkanki pozagałkowej są w zgodzie z obserwacjami, że naciekające tkanki limfocyty pamięci posiadają wzmożoną ekspresję cząsteczek adhezyjnych z grupy $\beta 1$ integrzyn [149].

Podobne wyniki uzyskano również w innych chorobach autoimmunologicznych. Wzmożona ekspresja integryny: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, została opisana na limfocytach T naciekających tarczycę u chorych z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy [105,106]. Na limfocytach wyizolowanych z płynu stawowego chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów stwierdzono wzmożoną ekspresję integryny: $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ w porównaniu z limfocytami z krwi obwodowej [42,167].

W odróżnieniu od wyżej wymienionych prac, mała ilość limfocytów dostępna z biopsji tkanki pozagałkowej uniemożliwiała wykonanie badań bezpośrednio po operacji. Aby otrzymać odpowiednią do badań liczbę limfocytów, trzeba było je hodować przy użyciu przeciwciała stymulującego cząsteczkę CD3 receptora limfocyty T (OKT-3) oraz interleukiny-2. Czynniki te mogły wpływać na ekspresję i czynność integryny $\beta 1$. U dwóch chorych porównano więc wpływ warunków hodowli na wynik testu proliferacji linii limfocytów z krwi obwodowej oraz z tkanki pozagałkowej. W liniach limfocytów T z krwi obwodowej obserwowano dodatkową stymulację przez białka macierzy pozakomórkowej, ale ich odpowiedź była zawsze mniejsza w porównaniu z limfocytami z tkanek pozagałkowych. Należy również zauważyć, że podobna stymulacja jak przy użyciu OKT-3 i interleukiny-2 może również zachodzić *in vivo* w miejscu zapalenia. Receptory limfocytów T, naciekających tkanki pozagałkowe są stymulowane przez autoantygeny oczodołowe. Pobudzone limfocyty proliferują i wydzielają cytokiny, które mogą wspomagać zarówno odpowiedź typu humoralnego, jak i komórkowego. W tkankach pozagałkowych pochodzących od chorych z aktywną oftalmopatią, używając reakcji odwrotnej transkryptazy i łańcuchowej reakcji polimerazy, stwierdzono informacyjny RNA dla szeregu cytokin, także dla IL-2 [73,108].

Poznanie dokładnie autoantygenów w tkankach oczodołowych może w przyszłości stworzyć nowe metody terapii. Potencjalne autoantygeny mogą być użyte m. in. w terapii tolerancji pokarmowej, szczepionkach lub terapii zmodyfikowanymi peptydami [95]. Poznanie interakcji komórek z białkami macierzy poza komórkowej oraz z komórkami śródbłonna może również stworzyć nowe metody immunoterapii [22,127]. Badania na zwierzętach doświadczalnych wskazują, że przeciwciała blokujące integrynę $\alpha 4\beta 1$ zmniejszały nacieki limfocytny w miejscu zapalenia i opóźniały rozwój choroby autoimmunologicznej [97]. Prawdopodobnie przeciwciała przeciwko integrynom $\beta 1$ i $\beta 2$ będą niedługo wchodziły w fazę prób klinicznych.

V.2. Badanie odpowiedzi humoralnej przeciw białkom macierzy pozakomórkowej u chorych z oftalmopatią związaną z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.

V.2.1. Autoprzeciwciała klasy IgG, IgA i IgM przeciwko natywnym białkom macierzy pozakomórkowej.

Poziom przeciwciał klasy IgG, IgA i IgM przeciwko natywnym kolagenom I, III, IV, V, fibronektynie i lamininie mierzono za pomocą testu immunoenzymatycznego typu ELISA (skrót z ang. enzyme immunosorbent assay). ELISA jest jednym z prostszych i najczęściej używanych testów stosowanych dla oceny przeciwciał. Należy jednak pamiętać, że podczas wiązania białka ze studzienką plastikową może dojść do zmiany konformacji i zmiany determinantów antygenowych białek.

Połowa chorych z oftalmopatią związaną z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (TAO) posiadała w surowicy przeciwciała przeciwko jednemu lub wielu białkom tkanki łącznej. W innych badanych grupach odsetek ten był znamienne niższy i wynosił dla pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa (GD)-27%, pacjentów z chorobą Hashimoto (HT) - 28%, pacjentów z nieautoimmunologicznymi chorobami tarczycy- 8% i dla zdrowych dawców- 9%. Używając testu immunofluorescencji pośredniej, Kiljański i wsp. stwierdzili obecność przeciwciał klasy IgG przeciwko składnikom tkanki łącznej tylko u 10% chorych z oftalmopatią i 16% chorych z chorobą Gravesa-Basedowa [89]. Łacka i wsp. stwierdzili obecność przeciwciał przeciwko włóknom retikuliny (składającym się z kolagenu III) u 11% chorych z chorobą Gravesa-Basedowa i 3% chorych z chorobą Hashimoto [102]. Prawdopodobną przyczyną tych różnic była wyższa czułość testu typu ELISA w porównaniu z testem immunofluorescencji.

U chorych z oftalmopatią, stężenie przeciwciał przeciwko kolagenowi I, III, V i lamininie było znamienne większe niż w grupie kontrolnej. U chorych z chorobą Gravesa-Basedowa jedynie stężenie przeciwciał przeciwko kolagenowi III było znamienne większe, a u chorych z chorobą Hashimoto przeciwciała przeciwko kolagenowi I były znamienne podwyższone. We wszystkich badanych grupach nie obserwowano zwiększonej reaktywności przeciwko fibronektynie i kolagenowi IV. Przeciwciała przeciwko kolagenowi I i V należały głównie do klasy IgG. Trudno wytłumaczyć, dlaczego u chorych z oftalmopatią nie stwierdzono przeciwciał klasy IgA reagujących w białkami macierzy

pozakomórkowej, choć w badaniu immunohistochemicznym stwierdzono ich obecność *in situ* [140]. Jest jednak możliwe, że przeciwciała klasy IgA reagują z innymi składnikami tkanki łącznej, niż badane kolageny.

Przeciwciała przeciwko białkom tkanki łącznej nie są specyficzne dla oftalmopatii, gdyż ich obecność stwierdzono w wielu chorobach autoimmunologicznych oraz nieautoimmunologicznych. Do badań nad odpowiedzią humoralną przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej używano antygenów różnego pochodzenia, różnych metod oraz w niejednolity sposób oceniano poziom "normy". Bardzo trudno więc porównywać częstość występowania przeciwciał przeciwko poszczególnym antygenom w różnych chorobach i można wyciągać jedynie ogólne wnioski. W wielu badaniach stwierdzono, że w surowicach chorych z autoimmunologicznymi chorobami tkanki łącznej znajdują się przeciwciała reagujące do pewnego stopnia z wieloma antygenami macierzy pozakomórkowej. U chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS), średnie stężenie przeciwciał przeciwko natywnym oraz zdenaturowanym kolagenom I, II, III, IV i V było znamienne większe w porównaniu z grupą kontrolną [164]. W płynie stawowym chorych z RZS wykryto obecność zarówno przeciwciał przeciwko kolagenowi II, jak i klonów limfocytów B wydzielających przeciwciała przeciwko kolagenowi II [44]. W trakcie wieloletniej obserwacji poszczególnych chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów, stwierdzono że przeciwciała przeciwko różnym kolagenom (badano kolagen I, II, IX, XI) powstawały selektywnie w trakcie rozwoju choroby, a nie była to uogólniona odpowiedź na składniki tkanki łącznej [121,143]. U chorych z twardziną układową, przeciwciała przeciwko kolagenowi I czy V były stwierdzane w ok. 30% przypadków, a przeciwciała przeciwko składnikom błony podstawnej w ok. 50% przypadków [40,103]. Miano przeciwciał przeciwko kolagenowi IV i komórkom nabłonka było również znamienne zwiększone u chorych uogólnionym zapaleniem naczyń [33]. U chorych z toczniem rumieniowatym, używając testu radioimmunologicznego stwierdzono, że u większości chorych miano przeciwciał przeciwko kolagenowi I, II, III, IV i V było znamienne podwyższone. Poziom przeciwciał przeciwko fibronektynie był podwyższony u chorych z toczniem rumieniowatym, zwłaszcza z zajęciem mięśni szkieletowych. Fakt, że u niektórych kobiet po wszczępieniu protez silikonowych z kolagenem II obserwowano objawy ogólne z wytworzeniem przeciwciał przeciwko kolagenom, świadczy o tym, że białka tkanki łącznej mogą być immunogenne [18]. U chorych z autoimmunologicznymi chorobami tkanki łącznej, przeciwciała przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej

należały głównie do przeciwciał klasy IgG wiążących dopełniacz (głównie IgG1 i IgG3), chociaż w niektórych badaniach stwierdzono podwyższone stężenie przeciwciał klasy IgA oraz IgM [27,28,122].

V.2.2. Specyficzność przeciwciał przeciwko natywnym białkom macierzy pozakomórkowej.

W większości surowic od chorych z oftalmopatią, znajdowały się przeciwciała reagujące z dwoma lub więcej antygenami. Wyniki te mogły być tłumaczone istnieniem jednej grupy przeciwciał reagującej krzyżowo z wieloma białkami macierzy pozakomórkowej. Przeciwciała przeciwko poszczególnym antygenom mogły też powstawać specyficznie dla danego antygeny. Aby sprawdzić specyficzność przeciwciał wykonano test absorpcji. U większości chorych z oftalmopatią stwierdzono istnienie specyficznych przeciwciał przeciwko kolagenowi I, V i lamininie. Reaktywność przeciwko kolagenowi III nie była specyficzna u badanych chorych. Przeciwciała specyficznie rozpoznające determinanty antygenowe na natywnych kolagenach stwierdzono również u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów oraz twardziną układową [103,133].

V.2.3. Przeciwciała przeciwko zdenaturowanemu kolagenowi I i V.

Badania histopatologiczne tkanek chorych z oftalmopatią nie wskazują na zapalenie naczyń. Z tego powodu dalsze badania skoncentrowały się na dwóch białkach: kolagenie I i V. Aby ocenić, czy w surowicy chorych z oftalmopatią występują przeciwciała reagujące ze zdenaturowanymi kolagenami, wykonano najpierw test ELISA. Wszystkie badane grupy posiadały znamienne większe stężenie przeciwciał przeciwko zdenaturowanemu kolagenowi I, w porównaniu z kolagenem natywnym. Wyniki te sugerują, że przeciwciała przeciwko zdenaturowanemu kolagenowi I są szeroko rozpowszechnione wśród chorych jak i zdrowych osobników. Podobne wyniki uzyskano w badaniach u chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów oraz twardziną układową [21,137].

W przeciwieństwie do kolagenu I, reaktywność przeciwko kolagenowi V uległa zmniejszeniu we wszystkich badanych grupach, co sugeruje, że przeciwciała przeciwko kolagenowi V rozpoznają głównie epitopy na strukturze trzeciorzędowej i czwartorzędowej kolagenów. Stężenie przeciwciał przeciwko zdenaturowanemu kolagenowi V było nadal

znamiennie większe w grupie chorych z oftalmopatią w porównaniu z grupą pacjentów z chorobą Gravesa-Basedowa i zdrowych dawców.

W celu poszukiwania epitopów liniowych, z którymi reagują przeciwciała chorych z oftalmopatią, wykonano immunoblotting ze strawionymi cyjankiem bromku (CNBr) kolagenami I i V. We wszystkich badanych grupach stwierdzono przeciwciała klasy IgG reagujące ze strawionym kolagenem I. Badanie immunoblottingu nie przyniosło identyfikacji specyficznych epitopów dla oftalmopatii, gdyż wszystkie grupy reagowały z podobnym zestawem peptydów. Podobną poliklonalną odpowiedź przeciwko kolagenowi I, po strawieniu cyjankiem bromku, obserwowano w surowicach chorych z twardziną układową.

Tylko dwie z dziesięciu surowic chorych z TAO reagowały ze kolagenem V, strawionym cyjankiem bromku. W surowicach chorych z chorobą Gravesa-Basedowa i zdrowej kontroli nie obserwowano reaktywności przeciwko zdenaturowanemu kolagenowi V. Wyniki immunoblottingu potwierdzają, że przeciwciała przeciwko kolagenowi V reagują z "jawnymi" epitopami znajdującymi się na natywnych białkach. Fakt ten można tłumaczyć niewrażliwością kolagenu V na działanie kolagenaz [37]. Być może w trakcie zapalenia nie dochodzi do powstania peptydów kolagenu V i ujawnienia "ukrytych epitopów".

V.2.4. Funkcja przeciwciał przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej.

Znaczenie przeciwciał przeciwko białkom tkanki łącznej w patogenezie oftalmopatii jest niejasne. Przeciwciała przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej powstają prawdopodobnie wtórnie do toczącego się zapalenia w tkance łącznej w mięśniach ocznych i tkance łącznej pozagałkowej. Istnieje jednak możliwość, że przeciwciała te powstają w wyniku niespecyficznej, poliklonalnej stymulacji limfocytów B. Następujące argumenty przeczą tej możliwości: (i) u chorych z TAO, odpowiedź była skierowana selektywnie przeciwko niektórym białkom macierzy pozakomórkowej, a nie przeciwko wszystkim badanym antygenom; (ii) u chorych z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy, bez klinicznych objawów oftalmopatii, nie stwierdzono znamiennej odpowiedzi na wszystkie antygeny z którymi reagowały surowice chorych z oftalmopatią.

Należy podkreślić, że stwierdzenie obecności w surowicy przeciwciał nie musi oznaczać, że przeciwciała pełnią ważną rolę w patogenezie choroby. Obecność przeciwciał przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej u zdrowych osobników (choć w mniejszym stężeniu) może przeczyć jakiegokolwiek ich funkcji. Nie stwierdzono również korelacji

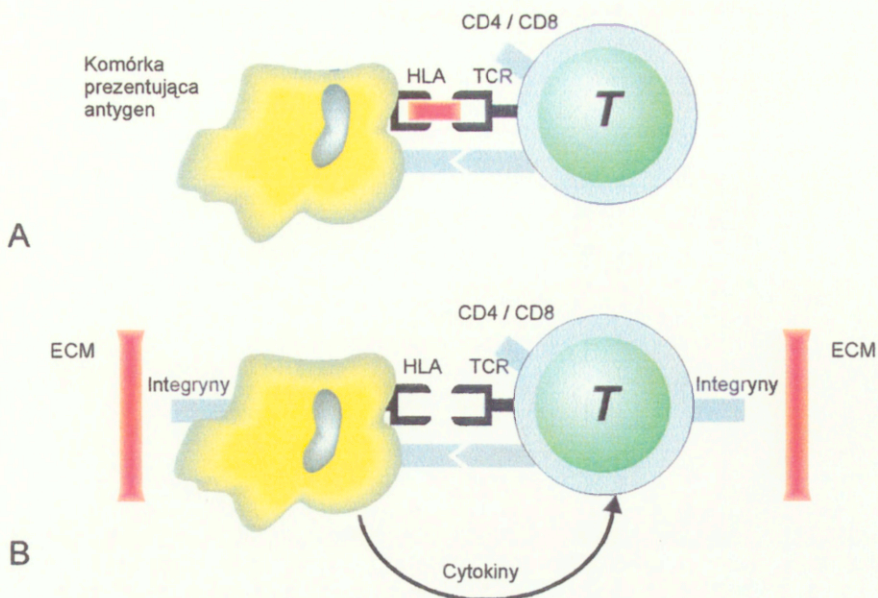
pomiędzy stężeniem przeciwciał przeciwko składnikom tkanki łącznej a parametrami klinicznymi opłatompatii, gdyż objawy kliniczne nie odzwierciedlają w pełni zasięgu zapalenia autoimmunologicznego. Stężenie przeciwciał powinno być korelowane z wynikami takich badań, jak rezonans magnetyczny oczodołu, scyntygrafia analogiem somatostatyny lub stężeniem glikozaminoglikanów w moczu [70,81,177].

Poznanie funkcji przeciwciał przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej było celem wielu badań w chorobach autoimmunologicznych tkanki łącznej [praca przeglądowa-122]. U chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów (RZS) nie stwierdzono korelacji pomiędzy mianem przeciwciał anti-kolagenowych a parametrami klinicznymi, jeżeli badano je jednokrotnie w trakcie choroby. Jeżeli badano szereg surowic od poszczególnych pacjentów w trakcie choroby, stwierdzono związek pomiędzy przeciwciałami przeciwko kolagenowi II a stężeniem białka C-reaktywnego (który dobrze odzwierciedla ciężkość choroby) [121]. Ostatnio stwierdzono również, że spadek w mianie przeciwciał anti-kolagen II może być wskaźnikiem dobrej odpowiedzi na leczenie terapią tolerancji pokarmowej kolagenem II, u chorych z RZS [45]. W Zespole Goodpastura podejmuje się próby specyficznego usuwania z surowicy przeciwciał przeciwko kolagenowi IV, w przeciwieństwie do konwencjonalnej plazmaferezy [19].

Dalszych dowodów na to, że przeciwciała przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej mogą pełnić ważną rolę w patogenezie chorób autoimmunologicznych, dostarczyły badania na zwierzętach doświadczalnych. Immunizacja kolagenem II wrażliwych szczepów myszy, szczurów oraz małp doprowadza do powstania zespołu podobnego do reumatoidalnego zapalenia stawów [141,151,163]. Zapalenie stawów można przenieść na zdrowe zwierzęta za pomocą przeciwciał klasy IgG. Podanie myszom przeciwciał przeciwko składnikom błony podstawnej (kolagen IV lub laminina) wywołuje zespół przypominający zespół Goodpastura [180].

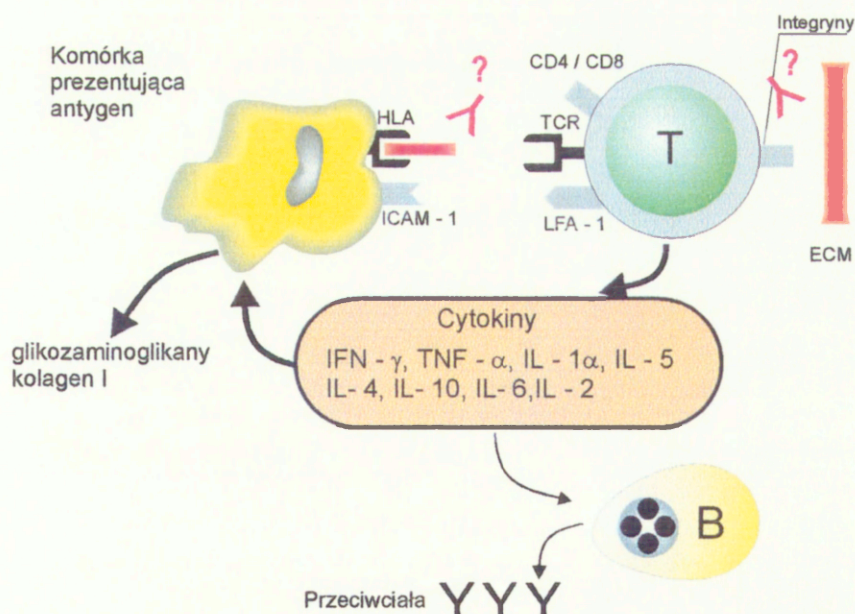
Badania *in vitro* sugerowały, że przeciwciała przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej mogą mieć wpływ na ich interakcje z komórkami. Surowice chorych z toczeniem rumieniowatym hamowały przyleganie komórek tarczycy do fibronektyny [6]. Podobnie surowice z wysokim mianem przeciwciał przeciwko lamininie hamowały adhezję komórek białaczki monocytarnej (U-937) do lamininy [41]. Z zamiarem oceny możliwej fizjologicznej funkcji przeciwciał przeciwko kolagenowi I badano ich zdolność do zahamowania adhezji komórek raka gruczołowego płuc (A549) do kolagenu I. Surowice chorych z oftalmopatią nie wpływały na interakcje komórek A549 z kolagenem I, co

sugeruje, że stężenie przeciwciał było zbyt niskie, aby wywołać efekt biologiczny *in vitro*. Wyniki tych badań nie wykluczają jednak roli tych przeciwciał w patogenezie oftalmopatii. Przeciwciała przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej (nawet przy niskim mianie) mogą podtrzymywać zapalenie w tkance łącznej, np. poprzez aktywację układu dopełniacza [27,28,122]. Dla poznania znaczenia odpowiedzi humoralnej przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej w patogenezie oftalmopatii konieczne są dalsze badania oceniające podklasy przeciwciał oraz zmiany w ich stężeniu w trakcie przebiegu choroby.



RYCINA 9. Możliwe mechanizmy stymulacji limfocytów T przez kolagen I.

A. Receptor limfocyta T (TCR) może być stymulowany przez peptyd kolagenu I, który jest związany z cząsteczką głównego układu zgodności tkankowej (HLA) znajdującej się na błonie komórki prezentującej antygen. **B.** Zarówno limfocyt T jak i komórki prezentujące antygen (monocyty, limfocyty B) mogą być stymulowane przez kolagen I, jeżeli posiadają one na swojej powierzchni receptory dla kolagenu z grupy $\beta 1$ integryn. Pobudzone leukocyty mogą wydzielać szereg mitogennych cytokin. Limfocyt T może otrzymać jeszcze dodatkowe sygnały stymulujące od aktywowanych leukocytów za pośrednictwem m. in. cząsteczek adhezyjnych. Schemat własny.



RYCINA 10. Udział białek macierzy pozakomórkowej (ECM) w patogenezie oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy.

Kolagenu typ I może być jednym z wtórnych autoantygenów stymulujących naciekające tkanki pozagławkowe limfocyty T. Odpowiedź limfocytów T przeciwko antygenom oczodołowym może być dodatkowo wzmacniana przez aktywację integryn przez białka ECM. Limfocyty B i różnicujące się z nich plazmocyty wydzielają specyficzne przeciwciała przeciwko białkom tkanki łącznej. Wpływ tych przeciwciał na interakcje leukocytów z białkami macierzy pozakomórkowej oraz na odpowiedź limfocytów T przeciwko kolagenowi I pozostaje niewyjaśniony. Schemat jest wzorowany na ryc. Heufeldera AE [64].

VI. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Limfocyty z krwi obwodowej oraz limfocyty naciekające tkanki pozagątkowe chorych z "aktywną" oftalmopatią były stymulowane przez kolagen typ I. Stymulacja limfocytów była zależna od interakcji z komórkami prezentującymi antygen, a nie od ekspresji receptorów dla kolagenu I na leukocytach.

2. Białka macierzy pozakomórkowej (kolagen typ I, IV, fibronektyna i laminina) przekazywały limfocytom T z tkanek pozagątkowych pochodzących od chorych z oftalmopatią, dodatkowe sygnały pobudzające proliferację.

3. W surowicy chorych z oftalmopatią stwierdza się znamienne podwyższone stężenie przeciwciał przeciwko natywnemu kolagenowi I, III, V i lamininie. U większości chorych przeciwciała przeciwko kolagenowi I, V i lamininie były specyficzne. Przeciwciała reagujące z kolagenem I lub V należały głównie do klasy IgG.

4. W surowicy chorych z oftalmopatią znajdują się przeciwciała reagujące ze zdenaturowanym kolagenem typu I i V. Badanie metodą immunoblottingu nie przyniosło identyfikacji epitopów specyficznych dla oftalmopatii na cząstce kolagenu I. Jedynie 2 z 10 surowic chorych z oftalmopatią reagowały ze strawionym kolagenem V, sugerując że przeciwciała przeciwko kolagenowi V rozpoznają głównie epitopy na natywnych białkach.

5. Przeciwciała przeciwko kolagenowi I, w surowicy chorych z oftalmopatią, nie hamowały przylegania komórek raka gruczołowego płuca do kolagenu I, co sugeruje że stężenie przeciwciał było zbyt niskie do wywołania efektu biologicznego *in vitro*.

Wyniki przedstawionej pracy wskazują na udział białek macierzy pozakomórkowej w patogenezie oftalmopatii związanej z autoimmunologicznymi chorobami tarczycy (ryc. 10). Kolagen I może być jednym z wtórnych autoantygenów rozpoznawanych przez naciekające tkanki pozagątkowe limfocyty. Białka tkanki łącznej mogą również przekazywać autoreaktywnym limfocytom dodatkowe sygnały stymulujące, wzmagając ich odpowiedź przeciwko antygenom oczodołowym. Specyficzna odpowiedź typu humoralnego przeciwko kolagenowi I, V i lamininie

również wskazuje, że białka macierzy pozakomórkowej mogą być autoantygenami w oftalmopatii. Przeciwciała przeciwko białkom tkanki łącznej mają zdolność do wiązania *in vivo* w miejscu zapalenia, bez względu na stopień ich denaturacji. Dokładna rola tych przeciwciał pozostaje niewyjaśniona. Pomimo niskiego miana, przeciwciała przeciwko białkom macierzy pozakomórkowej mogą wpływać na rozwój i podtrzymywanie zapalenia w tkance łącznej mięśni ocznych i tkance łącznej okołogalkowej, np. poprzez aktywację dopełniacza.

VII. PIŚMIENNICTWO

1. Adler G. Muscle antigens recognized with autoantibodies in patients with Graves' ophthalmopathy. *Endokryn Pol* 1992; 43 (Suppl 1): 1-61
2. Ahmann A, Baker JR, Weetman AP, Wartofsky L, Nutman TB, Burman KD. Antibodies to porcine eye muscle in patients with Graves' ophthalmopathy: Identification of serum immunoglobulins directed against unique determinants by immunoblotting and enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64: 454-460
3. Antonelli A, Palla R, Casarosa L, Fallahi P, Bashieri L. IgG, IgA and C3 deposits in the extra-thyroidal manifestations of autoimmune Graves' disease: their in vitro solubilisation by intravenous immunoglobulin. *Clin Exp Rheum* 1996; 14: S31-S35
4. Arnold K, Tandon N, Macintosh RS, R, Ludgate M, Weetman AP. T cell responses to orbital antigens in thyroid-associated ophthalmopathy. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 329-334
5. Arnold K, Metcalfe R, Weetman AP. Immunoglobulin A class fibroblast antibodies in patients with Graves' disease and pretibial myxedema. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 3430-3437
6. Atta MS, Powell RJ, Todd I. The influence of anti-fibronectin antibodies on interactions involving extracellular matrix components and cells: a possible pathogenic mechanism. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 26-30
7. Atta MS, Lim KL, Ala'Aldeen DA, Powell RJ, Todd I. Investigation of the prevalence and clinical association of antibodies to human fibronectin in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 117-124
8. Bahn RS, Gorman CA, Woloschak GE, David CS, Johnson PM, Johnson CM. Human retroocular fibroblasts in vitro: a model for the study of Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 65: 665-670
9. Bahn RS, Gorman CA, Johnson CM, Smith TJ. Presence of antibodies in the sera of patients with Graves' disease recognizing a 23 kilodalton fibroblast protein. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 622-628
10. Bahn RS. The fibroblast is the target cell in the connective tissue manifestations of Graves' disease. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 106: 213-218
11. Becker H, Langrock A, Federlin K. Imbalance of CD4+ lymphocyte subsets in patients with mixed connective tissue disease. *Clin Exp Immunol* 1992; 88: 91-95
12. Bednarczuk T, Stolarski C, Ing E, Kennerdell J, Nebes V, Wall JR. Antibody and T lymphocyte reactivity against extracellular matrix proteins in patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid* 1996; 6(Suppl 1): S-67 (doniesienie zjazdowe)
13. Bednarczuk T, Kennerdell JS, Wall JR. Thyroid-Associated Ophthalmopathy-Pathophysiology and Etiology. In: Falk SA (ed) *Thyroid Disease - Endocrinology, Surgery, Nuclear Medicine and Radiotherapy*. Raven Press, New York, 1997, p 341-358.
14. Bednarczuk T, Kiljański J, Mrowiec T, Slon M, Ing E, Stolarski C, Kennerdell JS, Górski A, Nauman J, Wall JR. T cell interactions with extracellular matrix proteins in patients with thyroid-associated

- ophthalmopathy. *Autoimmunity* 1998; 27: 221-230
15. Bednarczuk T, Pawlik E, Stolarski C, Słoń M, Rowiński M, Kubota S, Hiromastu Y, Bartoszewicz Z, Wall JR, Nauman J. Autoantibodies reactive with extracellular matrix (ECM) proteins in patients with thyroid-associated ophthalmopathy (TAO). *Thyroid* 1998; 8: 457 (doniesienie zjazdowe)
 16. Berenson CS, Smith TJ. Human orbital fibroblasts in culture express ganglioside profiles distinct from those in dermal fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2668-2674
 17. Bernard NF, Chung F, Teboul N, Zhang Z-G, Salvi M, Wall JR. Isotype and immunoglobulin subclass distribution of eye muscle membrane reactive antibodies in the serum of patients with thyroid-associated ophthalmopathy as detected in Western blotting. *Autoimmunity* 1990;10: 57-63
 18. Bonnet C, Charriere G, Vaquier J, Bertin P, Vergne P, Treves R. Bovine collagen induces systemic symptoms: antibody formation against bovine and human collagen. *J Rheumatol* 1996; 23: 545-547
 19. Boutaud AA, Kalluri R, Kahsai TZ, Noelken ME, Hudson BG. Goodpature syndrome: selective removal of anti-alpha 3 (IV) collagen autoantibodies. A potential therapeutic alternative to plasmapheresis. *Exp Nephrology* 1996; 4: 205-212.
 20. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21: 77-89
 21. Buckee C, Morgan K, Ayad S, Collins I, Clague RB, Lennox Holt PJ. Diversity of antibodies to type II collagen in patients with rheumatoid arthritis: detection by binding to α -chain and to cyanogen bromide peptides. *Br J Rheumatol* 1990; 29: 254-258
 22. Buckley CD. Science, medicine, and the future: treatment of rheumatoid arthritis. *Br Med J* 1997; 315: 236-238
 23. Burch HB, Wartofsky L. Graves' ophthalmopathy: current concepts regarding pathogenesis and management. *Endocr Rev* 1993; 14: 747-793
 24. Char DH. The ophthalmology of Graves' Disease. *Med Clin North Am* 1991; 75: 97-119
 25. Coito AJ, de Sousa M, Kupiec-Weglinski J.W. The role of cellular and extracellular matrix adhesion proteins in organ transplantation. *Cell Adhesion Commun* 1994; 2: 249-255
 26. Committees of Regional Thyroid Association classification of eye changes of Graves' disease. *Thyroid* 1992; 2: 235-236
 27. Cook AD, Rowley MJ, Stockman A, Muirden KD, Mackay IR. Specificity of antibodies to type II collagen in early rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1994; 21: 1186-1191
 28. Cook AD, Mackay IR, Cicuttini, Rowley MJ. IgG subclasses to type II collagen in rheumatoid arthritis differ from those in systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases. *J Rheumatol* 1997; 24: 2090-2096
 29. Dang NH, Torimoto Y, Sclossman SF, Morimoto C. Human CD4 helper T cell activation: functional involvement of two distinct collagen receptors, 1F7 and VLA integrin family. *J Exp Med* 1990; 172: 649-652
 30. Daskalova M, Taskov H, Dimitrova E, Baydanoff S. Humoral and cellular response to elastin in patients with systemic sclerosis. *Autoimmunity* 1997; 25: 233-241
 31. De Carli M, D'Elios MM, Mariotti S, Marcocci C, Pinchera A, Ricci M, Romagnani S, del Prete G.

- Cytolytic T cells with Th1-like cytokine profile predominate in retroorbital lymphocytic infiltrates of Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 1120-1124
32. Derry CJ, Ross CN, Lombardi G, Mason PD, Rees AJ, Lechler RI, Pusey CD. Analysis of T cell responses to the autoantigen in Goodpasture's disease. *Clin Exp Immunol* 1995; 100: 262-268
 33. Direskeneli H, D'Cruz D, Khamashta MA, Hughes GRV. Autoantibodies against endothelial cells, extracellular matrix and human collagen type IV in patients with systemic vasculitis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 70: 206-210
 34. Eden W, van der Zee R, Paul A, Prakken BJ, Wendling U, Anderton SM, Wauben MHM. Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases. *Immunol Today* 1998; 19: 303-307
 35. Faryna M, Nauman J, Gardas A. Measurement of autoantibodies against human eye muscle membranes in Graves' ophthalmopathy. *Br Med J* 1985; 59: 104-116
 36. Feliciello A, Porcellini A, Ciullo I, Bonavolonta G, Avedimento EV, Fenzi G: Expression of thyrotropin-receptor mRNA in healthy and Graves' disease retro-orbital tissue. *Lancet* 1993; 342: 337-338
 37. Fichard A, Kleman JP, Ruggiero F. Another look at collagen V and XI molecules. *Matrix Biology* 1995; 14: 515-531
 38. Foerster G, Otto E, Hansen C, Ochs K, Kahaly G. Analysis of orbital T cells in thyroid-associated ophthalmopathy. *Clin Exp Immunol* 1998; 112: 427-434.
 39. Freshney RI. Maintenance of the culture: cell lines. In: Freshney RI (ed). *Culture of animal cells. A manual of basic techniques*. 1995. Willey-Liss p149-157
 40. Gabrielli A, Candela M, Ricciatti AM, Caniglia ML, Wieslander J. Antibodies to mouse laminin in patients with systemic sclerosis (scleroderma) recognize galactosyl (α 1-3)-galactose epitopes. *Clin Exp Immunol* 1991; 86: 367-373
 41. Garcia-Lerma JG, Moneo I, Ortiz de Landazuri M, Sequi Navarro J. Comparison of the anti-laminin antibody response in patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and parasitic diseases (Filiaris). *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 76: 19-31
 42. Garcia-Vicuna R, Humbris A, Postigo AA, Lopez-Elizaurdila C, de Landazuri MO, Sanchez-Madrid F. VLA family in rheumatoid arthritis: evidence for in vivo regulated adhesion of synovial fluid T cells to fibronectin through VLA-5 integrin. *Clin Exp Immunol* 1992; 88: 435-441
 43. Gessl A, Wilfing A, Agis H, Steiner G, Czernin S, Boltz-Nitulescu G, Vierhapper H, Waldhausl W. Activated naive CD4⁺ peripheral blood T cells in autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 1995; 5: 117-123
 44. Gilat D, Cahalon L, Hershkoviz R, Lider O. Interplay of T cells and cytokines in the context of enzymatically modified extracellular matrix. *Immunol Today* 1996; 17: 16-20
 45. Gimsa U, Sieper J, Braun J, Mitchison NA. Type II collagen serology: a guide to clinical responsiveness to oral tolerance? *Rheumatol Int* 1997; 16: 237-240
 46. Gliński W, Stepień-Sopniewska B, Majewski S, Głinska-Ferenz, Górski A. Alterations of T cell: extracellular matrix proteins interactions in psoriasis. *Immunol Lett* 1993; 35: 153-158

47. Goetz EJ, Banda MJ, Leppert D. Matrix metalloproteinases in immunity. *J Immunol* 1996; 156: 1-4
48. Górski A, Piekarczyk J, Skurzak H, Nowaczyk M, Dybowska B, Stepień-Sopniewska B, Korczak-Kowalska G, Pazdur J, Filipowicz-Sosnowska A. Abnormalities in T cell interactions with extracellular matrix proteins in a patient with Wegener's granulomatosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1993; 69: 149-154
49. Górski A, Castronovo V, Stepień-Sopniewska B, Grieb P., Mrowiec T, Korczak-Kowalska G, Wierzbička P., Matysiak K, Dybowska B. Depressed immune surveillance against cancer: role of deficient T cell: extracellular matrix interactions. *Cell Adhesion Commun* 1994; 2: 225-233
50. Górski A, Kupiec-Weglinski J.W. Extracellular matrix proteins, regulators of T cell functions in healthy and diseased individuals. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995; 2: 646-651.
51. Górski A, Stepień-Sopniewska B, Paczek L, Korczak-Kowalska G, Mrowiec T. T cell interactions with extracellular matrix proteins in renal allograft rejection. *Transplant Proc* 1996; 28: 3292
52. Grubeck-Loebenstein B, Trieb K, Sztankay A, Holter W, Anderi H, Wick G. Retrobulbar T cells from patients with Graves' ophthalmopathy are CD8+ and specifically recognize autologous fibroblasts. *J Clin Invest* 1994; 93: 2738-2743
53. Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 1996; 84: 345-357
54. Gunji K, Kubota S, Swanson J, Kiljański J, Bednarczuk T, Wengrowicz S, Salvi M, Wall JR. Role of the eye muscles in thyroid eye disease: identification of the principal autoantigens. *Thyroid* 1998; 8: 553-556
55. Gunji K, Skolnick C, Bednarczuk T, Benes S, Ackrell BA, Cochran B, Kennerdell JS, Wall JR. Eye muscle antibodies in patients with ocular myasthenia gravis: possible mechanism for eye muscle inflammation in acetylcholine-receptor antibody negative patients. *Clin Immunol Immunopath* 1998; 87: 276-281
56. Heufelder AE, Smith TJ, Gorman CA, Bahn RS. Increased induction of HLA-DR by interferon gamma in cultured fibroblasts derived from patients with Graves' ophthalmopathy and pretibial dermatopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 73: 307-313
57. Heufelder AE, Wenzel BE, Bahn RS. Cell surface localization of a 72 kilodalton heat shock protein in retroocular fibroblasts from patients with Graves' Ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 732-736
58. Heufelder AE, Bahn RS. Graves' immunoglobulins and cytokines stimulate the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cultured orbital fibroblasts. *Eur J Clin Invest* 1992; 22: 529-537
59. Heufelder AE, Goellner JR, Wenzel BE, Bahn RS. Immunohistochemical detection and localization of a 72-kilodalton heat shock protein in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 724-731
60. Heufelder AE, Bahn R. Detection and localization of cytokine immunoreactivity in retro-ocular connective tissue in Graves' Ophthalmopathy. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 10-17
61. Heufelder AE, Bahn RS. Elevated expression in situ of selectin and immunoglobulin superfamily type

- adhesion molecules in retroocular connective tissues from patients with Graves' ophthalmopathy. *Clin Exp Immunol* 1993; 91: 381-389
62. Heufelder AE, Dutton CM, Sarkar G, Donovan KA, Bahn RS. Detection of TSH receptor RNA in cultured fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy and pretibial dermopathy. *Thyroid* 1993; 3: 297-300
 63. Heufelder AE, Bahn RS. Modulation of Graves' orbital fibroblasts proliferation by cytokines and glucocorticoid receptor agonists. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 120-127
 64. Heufelder A.E. Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy: Recent controversies and progress. *Eur J Endocrinol* 1995; 132: 532-541
 65. Heufelder AE, Herterich S, Ernst G, Bahn RS, Scriba PC. Analysis of retroorbital T-cell antigen receptor variable region gene usage in patients with Graves' ophthalmopathy. *Eur J Endocrinol* 1995; 132: 266-277
 66. Heufelder AE, Scriba PC. Characterization of receptors on cultured microvascular endothelial cells derived from the retroorbital connective tissue of patients with Graves' ophthalmopathy. *Eur J Endocrinol* 1996; 134: 51-60
 67. Heufelder AE, Wenzel BE, Scriba PC. Antigen receptor variable region repertoires expressed by T cells infiltrating thyroid, retroorbital and pretibial tissue in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3733-3739
 68. Hiromatsu Y, Fukazawa H, How J, Wall JR. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against human eye muscle cells and orbital fibroblasts in Graves' ophthalmopathy - roles of Class II MHC antigen expression and interferon- γ action on effector and target cells. *Clin Exp Immunol* 1987; 70: 593-603
 69. Hiromatsu Y, Fukazawa H, Guinard F, Salvi M, How J, Wall JR. A thyroid cytotoxic antibody that cross-reacts with an eye muscle cell surface antigen may be the cause of thyroid associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 565-570
 70. Hiromatsu Y, Kojima K, Ishisaka K, Tanaka K, Sato M, Nonaka K, Nishimura H, Nishida H. Role of magnetic resonance imaging in thyroid-associated ophthalmopathy: it's predictive value for therapeutic outcome of immunosuppressive therapy. *Thyroid* 1992; 2: 299-305
 71. Hiromatsu Y, Tanaka K, Ishisaka N, Kamachi J, Kuroki T, Hoshino T, Inoue Y, Wall JR, Nonaka K. Human histocompatibility leukocyte antigen-DR and heat shock protein-70 expression in eye muscle tissue in thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 685-691
 72. Hiromatsu Y. In situ studies of orbital tissue from patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *Orbit* 1996; 15: 147-158
 73. Hiromatsu Y, Yang D, Bednarczuk T, Miyake I, Koga M, Nonaka K, Inoue Y. Analysis of cytokine gene expression in eye muscle and orbital fat tissue from patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid* 1998; 8: 460 (doniesienie zjazdowe)
 74. Hiromatsu Y, Yang D, Miyake I, Koga M, Kameo J, Sato M, Inoue Y, Nonaka K. Nicotinamide decreases cytokine induced activation of orbital fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 121-124.

75. Hudson HL, Levin L, Feldon SE. Graves' exophthalmos unrelated to extraocular muscle enlargement. Superior rectus muscle inflammation may induce venous obstruction. *Ophthalmology* 1991; 98: 1485-1499
76. Huffstutter JE, DeLustro FA, LeRoy EC. Cellular immunity to collagen and laminin in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 775-780
77. Hufnagel TJ, Hickey WF, Cobbs NH, Jakobiec FA, Iwamo T, Eagle RC. Immunohistochemical and ultrastructural studies on the external orbital tissues of a patient with Graves' disease. *Ophthalmology* 1984; 91: 1411-1419
78. Hynes RO. Integrins. versatility, modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25
79. Julius MH, Simpson E, Herzenberg LA. A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur J Immunol* 1973; 3: 645-649
80. Kahaly G, Hansen C, Felke B, Dienes HP. Immunohistochemical staining of retrobulbar adipose tissue in Graves' ophthalmopathy. *Clin Immunol Immunopath* 1994; 73: 53-62
81. Kahaly G, Foerster G, Hansen C. Glycosaminoglycans in Thyroid Eye Disease. *Thyroid* 1998; 8: 429-432
82. Kahan A, Picard F, Menkes CJ, Amor B. Abnormalities of lymphocyte subsets in systemic sclerosis demonstrated with anti-CD45RA and anti-CD29 monoclonal antibodies. *Ann Rheum Dis* 1991; 50: 354-358
83. Kammer GM, Trentham DE. HLA-DR4 is not a requisite for autoimmunity to collagen in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 489-494
84. Kaufmann SHE. Heat shock proteins and immune response. *Immunol Today* 1990; 11: 129-136
85. Kazuo K, Fujikado T, Ohmi G, Hosohata J, Tano Y. Value of thyroid stimulating antibody in the diagnosis of thyroid associated ophthalmopathy of euthyroid patients. *Br J Ophthalmol* 1997; 81: 1080-1083
86. Kandler DL, Rootman J, Huber GK, Davies TF. A 64 kDa membrane antigen is a recurrent epitope for natural autoantibodies in patients with Graves' thyroid and ophthalmic diseases. *Clin Endocrinol* 1991; 35: 539-547
87. Kiljański J, Stolarski C, Barsouk A, Nebes V, Wall JR. Failure to demonstrate cell mediated immunity to orbital tissue antigens and epitope fragments of a 64 kDa protein in the majority of patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *J Endocr Invest* 1996; 19: 284-292
88. Kiljański J, Nebes V, Wall JR. The ocular muscle cell is a target of the immune system in endocrine ophthalmopathy. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 106: 204-212
89. Kiljański J, Peele K, Stachura I, Pickeral J, Stolarski C, Kennerdell JS, Wall JR. Antibodies against striated muscle, connective tissue and nuclear antigens in patients with thyroid-associated ophthalmopathy: Should Graves' disease be considered a collagen disorder? *J Endocrinol Invest* 1997; 20: 585-591
90. Kodama K, Sikorska H, Bandy-Dafoe P, Bayly R, Wall JR. Demonstration of a circulating autoantibody against a soluble eye muscle antigen in Graves' ophthalmopathy. *Lancet* 1982; 2(8312): 1353-1356

91. Korducki JM, Loftus SJ, Bahn RS. Stimulation of glycosaminoglycans production in cultured human retroocular fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33: 2037-2042
92. Kubota S, Gunji K, Ackrell AC, Cochran B, Stolarski C, Wengrowicz S, Kennerdell JS, Hiromatsu Y, Wall J. The 64-kilodalton eye muscle protein is the flavoprotein subunit of mitochondrial succinate dehydrogenase: the corresponding serum antibodies are good markers of an immune mediated damage to the eye muscle in patients with Graves' hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 443-447
93. Kuijpers TW, Van Lier RA, Hamann D, de Boer M, Thung LY, Weening RS, Verhoeven AJ, Roos D. Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. *J Clin Invest* 1997; 100: 1725-1733
94. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-684
95. Lee S, Scherberg N, DeGroot LJ. Induction of oral tolerance in human autoimmune thyroid. *Thyroid* 1998; 8: 229-234
96. Ley K, Tedder TF. Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selektin mediated attachment and rolling. *J Immunol* 1995; 155: 525-528
97. Lobb RR, Hemler ME. The pathophysiologic role of $\alpha 4$ integrins in vivo. *J Clin Invest* 1994; 94: 1722-1728
98. Londei M, Grubeck-Loebenstein B, de Berardinis P, Greenall C, Feldmann M. Efficient propagation and cloning of human T cells in the absence of antigen by means of OKT3, interleukin 2 and antigen presenting cells. *Scand J Immunol* 1988; 27: 35-46
99. Ludgate ME, McGregor AM, Weetman AP, Ratanachaiyavong S, Lazarus JH, Hall R, Middleton GW. Analysis of T cell subsets in Graves' disease: alterations associated with carbimazole. *Br Med J* 1984; 288: 526-530
100. Ludgate M, Crisp M, Lane C, Costagliola S, Vassart G, Weetman A, Daunerie C, Many MC. The thyrotropin receptor in thyroid eye disease. *Thyroid* 1998; 5: 411-413.
101. Luster AD. Mechanism of diseases: chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-445
102. Łącka K, Jarczewska K, Gembicki M. Occurrence of various autoantibodies in autoimmune diseases. *Pol Tyg Lek* 1989; 44: 751-753
103. Mackel AM, DeLustro F, Harper F, LeRoy EC. Antibodies to collagen in scleroderma. *Arthritis Rheum* 1982; 25: 522-531
104. Mahieu P, Winand R. Demonstration of delayed hypersensitivity of retrobulbar and thyroid tissues in human exophthalmos. *J Clin Endocrinol Metab* 1972; 34: 1090-1092
105. Marazuela M, Postigo AA, Acevedo A, Diaz-Gonzales F, Sanchez-Madrid F, de Landazuri M. Adhesion molecules from the LFA-1/ICAM1-3 and VLA-4/VCAM-1 pathways on T lymphocytes and vascular endothelium in Graves' and Hashimoto's thyroid glands. *Eur J Immunol* 1994; 23: 2483-2490
106. Marazuela M, De Landazuri MO, Larranaga E, Sanchez-Madrid F. Upregulated beta1-integrin

- expression in autoimmune thyroid disorders. *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 107-115
107. Matsuyama T, Yamada A, Kay J, Yamada KM, Akiyama SK, Schlossman SF, Morimoto C. Activation of CD4 cells by fibronectin and anti-CD3 antibody. A synergistic effect mediated by the VLA-5 fibronectin receptor complex. *J Exp Med* 1989; 170: 1133-1148
108. McLachlan SM, Prummel MF, Rapoport B. Cell-mediated or humoral immunity in Graves' ophthalmopathy? Profiles of T-cell cytokines amplified by polymerase chain reaction from orbital tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 1070-1074
109. Melchers I, Joos-Rudiger J, Peter HH. Reactivity patterns of synovial T-cell lines derived from a patient with rheumatoid arthritis. Reactions with defined antigens and auto-antigens suggest the existence of multireactive T-cell clones. *Scand J Immunol* 1997; 46: 187-194
110. Meredith JE, Winitz S, Lewis JM, Hess S, Ren XD, Renshaw MW, Schwartz MA. The regulation of growth and intracellular signaling by integrins. *Endocr Rev* 1996; 17: 207-220
111. Merke F, Kalluri R, Marx M, Enders U, Stevanovic S, Giegerich G, Neilson EG, Rammensee HG, Hudson BG, Weber M. Autoreactive T-cells in Goodpasture's syndrome recognize the N-terminal NC1 domain on alpha 3 type IV collagen. *Kidney Int* 1996; 49: 1127-1133
112. Metcalfe RA, Weetman AP. Stimulation of extraocular muscle fibroblasts by cytokines and hypoxia: possible role in thyroid-associated ophthalmopathy. *Clin Endocr* 1994; 40: 67-72
113. Miller A, Sikorska H, Salvi M, Wall JR. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of autoantibodies against eye muscle membrane antigens in Graves' ophthalmopathy. *Acta Endocrinol* 1986; 113: 514-522
114. Miller EJ. Isolation and characterization of a collagen from a chick cartilage containing three identical alpha-chains *Biochemistry* 1971; 10: 1652-1655
115. Miller EJ, Rhodes RK. Preparation and characterization of the different types of collagen. In Cunningham L, Frederiksen D (eds). *Methods in Enzymology*. Vol 82. New York: Academic Press, 1982; 33-65
116. Mohacs A, Trieb K, Anderl H, Grubeck-Loebenstein B. Retrobulbar fibroblasts from patients with Graves' ophthalmopathy induce down-regulation of APO-1 in T lymphocytes and protect T cells from apoptosis during coculture. *Int Arch Allergy Immunol* 1996; 109: 327-333
117. Molnar I, Kaczur V, Boros A, Krajczar G, Balzacs C. IgA autoantibodies against human eye muscle antigen detected by western blotting and immunohistochemical methods in Graves' disease. *J Endocrinol Invest* 1995; 18: 408-414
118. Moncayo R, Baldiserra I, Decristoforo C, Kendler D, Donnemiller E. Evaluation of immunological mechanism mediating thyroid-associated ophthalmopathy by radionuclide imaging using somatostatin analog ¹¹¹In-octreotide. *Thyroid* 1997; 7: 805-806
119. Mooradian DL, McCarthy JB, Komanduri KV, Furcht LT. Effects of transforming growth factor- β 1 on human pulmonary adenocarcinoma cell adhesion, motility and invasion in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 523-527
120. Moreland LW, Gay RE, Gay S. Collagen autoantibodies in patients with vasculitis and systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 1991; 60: 412-418

121. Morgan K, Clague RB, Collins I, Ayad S, Phinn SD, Lennox A, Holt PJ. A longitudinal study of anti-collagen antibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 139-145
122. Morgan K 1990 What do anti-collagen antibodies mean? *Ann Rheum Dis* 49: 62-65.
123. Mrowiec T, Cianciara J, Stanczak W, Stepien-Sopniewska B, Górski A. Enhanced signaling by collagen type I in T cell responses in chronic hepatitis and cirrhosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 1994; 7: 133-137
124. Munro RE, Lamki L, Row VV, Volpe R. Cell-mediated immunity in the exophthalmos of Graves' disease as demonstrated by the migration inhibition factor (MIF) test. *J Clin Endocrinol Metab* 1973; 37: 286-292
125. Nauman J, Adler G, Faryna M, Targonska M. Eye muscle membranes antibodies. *Acta Endocrinol* 1989; 12: 90-98
126. Nauman J. Biological activity of Antibodies circulating in endocrine ophthalmopathy. In Kahaly G.(ed): *Endocrine Ophthalmopathy. Molecular, Immunological and Clinical Aspects. Dev Ophthalmol.* Basel, Karger, 1993; 25: 29-37
127. Oppenheimer-Marks N, Lipsky PE. Adhesion molecules as targets for the treatment for autoimmune diseases. *Clin Immun Immunopathol* 1996; 79: 203-210
128. Otto EA, Ochs K, Hansen C, Wall JR, Kahaly GJ. Orbital tissue-derived T lymphocytes from patients with Graves' ophthalmopathy recognize autologous orbital antigens. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3045-3050
129. Pappa A, Calder V, Ajjan R, Fells P, Ludgate M, Weetman AP, Lightman S. Analysis of extraocular muscle-infiltrating T cells in thyroid associated ophthalmopathy (TAO). *Clin Exp Immunol* 1997; 109: 362-369
130. Pappa A, Calder V, Fells P, Lightman S. Adhesion molecule expression in vivo on extraocular muscles (EOM) in thyroid-associated ophthalmopathy (TAO). *Clin Exp Immunol* 1997; 108: 309-313
131. Perros P, Kendall-Taylor P. Antibodies to orbital tissues in thyroid-associated ophthalmopathy. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1992; 126: 137-42
132. Perros P, Crombie AL, Kendall-Taylor P. Natural history of thyroid associated ophthalmopathy. *Clin Endocrinol* 1995; 42: 45-50
133. Petty RE, Hunt DWC, Rosenberg AM. Antibodies to type IV collagen in rheumatic diseases. *J Rheumatol* 1986; 13: 246-253
134. Pilarska K, Czekalski S, Syrenicz A, Andrzejewska W, Ciechanowicz A, Krzystolik Z, Przerwa D. The analysis of early and late results of progressive Graves-Basedow ophthalmopathy treatment with different methods. *Pol Tyg Lek* 1992; 47: 1000-1003
135. Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Ann Rev Biochem* 1995; 64: 403-434
136. Raikow RR, Dalbow MH, Kennerdell JS, Compher K, Machen L, Hiller W, Blendermann D. Immunohistochemical evidence for IgE involvement in Graves' orbitopathy. *Ophthalmology* 1990; 97: 629-635
137. Riente L, Marchini B, Dolcher MP, Puccetti A, Bombardieri S, Migliorini P. Anti-collagen antibodies

- in systemic sclerosis and primary Raynaud's phenomenon. *Clin Exp Immunol* 1995; 102: 354-359
138. Romanic AM, Madri JA. The induction of 72-kD gelatinase in T cells upon adhesion to endothelial cells is VCAM-1 dependent. *J Cell Biol* 1994; 125: 1165-1178
139. Rosaliti E. Fibronectin and its receptors. *Ann Rev Biochem* 1988; 57: 375-413
140. Rosen C, Raikow RB, Burde RM, Kennerdell JS, Mosseri M, Scalise D. Immunohistochemical evidence for IgA1 involvement in Graves' ophthalmopathy. *Ophthalmology* 1992; 99: 146-151
141. Rosloniec EF, Brand DD, Myers LK, Esaki Y, Whittington KB, Zaller DM, Woods A, Stuart JM, Kang AH. Induction of autoimmune arthritis in HLA-DR4 (DRB1*0401) transgenic mice by immunization with human and bovine type II collagen. *J Immunol* 1998; 160: 2573-2578
142. Rotella CM, Zonefrati R, Toccafondi R, Valente WA, Kohn LD. Ability of monoclonal antibodies to the thyrotropin receptor to increase collagen synthesis in human fibroblasts: an assay which appears to measure exophthalmogenic immunoglobulins in Graves' sera. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 357-367
143. Rowley MJ, Mackay IR, Brand CA, Bateman JF, Chan D. Epitope specificity of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int* 1992; 12: 65-69
144. Rudolphi U, Rzepka R, Batsford S, Kaufmann SH, von der Mark K, Peter HH, Melchers I. The B cell repertoire of patients with rheumatoid arthritis. Increased frequencies of IgG⁺ and IgA⁺ B cells specific for mycobacterial heat-shock protein 60 or human type II collagen in synovial fluid and tissue. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1409-1419
145. Salvi M, Zhang ZG, Haegert D, Woo M, Liberman A, Cadarso L, Wall JR. Patients with endocrine ophthalmopathy not associated with overt thyroid disease have multiple thyroid immunological abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 89-94
146. Salvi M, Bernard N, Miller A, Zhang ZG, Gardini E, Wall JR. Prevalence of antibodies reactive with a 64 kDa eye muscle membrane antigen in thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid* 1991; 1: 207-213
147. Schifferdecker E, Ketzler-Sasse U, Boehm BO, Ronsheimer HB, Seherbaum WA, Schoffling K. Re-evaluation of eye muscle autoantibody determination in Graves' ophthalmopathy: failure to detect a specific antigen by use of enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immunofluorescence and immunoblotting techniques. *Acta Endocrinol* 1989; 121: 643-650
148. Seibold M, Ernst G, Schworm HD, Heufelder AE. Expression and regulation of matrix metalloproteinase-2 in thyroid and retroorbital tissues of patients with Graves' disease and ophthalmopathy. *J Endocrinol Invest* 1996; 19: 82 (doniesienie zjazdowe)
149. Shimizu Y, van Seventer GA, Horgan KJ, Shaw S. Regulated expression and binding of three VLA (β1) integrin receptors on T cells. *Nature* 1990; 345: 250-253
150. Shimizu Y, van Seventer GA, Horgan RJ, Shaw S. Costimulation of proliferative responses of resting CD4⁺ T cells by the interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin. *J Immunol* 1990; 145: 59-67
151. Shimozoru Y, Yamane S, Fujimoto K, Terao K, Honjo S, Nagai Y, Sawitzke AD, Terato K. Collagen-induced arthritis in nonhuman primates: multiple epitopes of type II collagen can induce autoimmune-

- mediated arthritis in outbred cynomolgus monkeys. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 507-514
152. Smith TJ, Bahn RS, Gorman CA. 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
153. Smith TJ, Bahn RS, Gorman CA, Cheavens M. Stimulation of glycosaminoglycans by interferon gamma in cultured human retroocular fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1991; 72: 1169-1171
154. Smith TJ, Sempowski GD, Wang HS, Del Vecchio PJ, Lippe SD, Phipps RP. Evidence for cellular heterogeneity in primary cultures of human orbital fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80: 2620-2625
155. Smith TJ, Wang H-S, Evans CH. Leukoregulin is a potent inducer of hyaluronan synthesis in cultured human orbital fibroblasts. *Am J Physiol* 1995; 268: C382-C388
156. Snowden N, Reynolds J, Morgan K, Holt L. T cell responses to human type II collagen in patients with rheumatoid arthritis and healthy controls. *Arthritis Rheum* 1997; 40: 1210-1218
157. Sorisky A, Pardasani D, Gagnon A, Smith TJ. Evidence for adipocyte differentiation in human orbital fibroblasts in primary culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3428-3431
158. Spitzweg C, Joba W, Hunt N, Heufelder AE. Analysis of human thyrotropin receptor gene expression and immunoreactivity in human orbital tissue. *Eur J Endocrinol* 1997; 136: 599-607
159. Sprent J, Tough DF. Lymphocyte life-span and memory. *Science* 1994; 265: 1395-1400
160. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-314
161. Stover C, Otto E, Beyer J, Kahaly G. Humoral immunity and retrobulbar fibroblasts in endocrine ophthalmopathy. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1992; 126: 394-398
162. Stuart JM, Postlethwaite AE, Townes AS, Kang AH. Cell-mediated immunity to collagen and collagen α chains in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases. *Am J Med* 1980; 69: 13-18
163. Stuart JM, Dixon FJ. Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *J Exp Med* 1983; 158: 378-392
164. Stuart JM, Huffstutter EH, Townes AS, Kang AH. Incidence and specificity of antibodies to type I, II, III, IV and V collagen in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases as measured by ^{125}I -radioimmunoassay. *Arthritis Rheum* 1983; 26: 832-840
165. Sturmhofer K, Brando C, Martinon F, Shevach EM, Coligan JE. Antigen-independent, integrin-mediated T cell activation. *J Immunol* 1995; 154: 2104-2111
166. Takahashi K, Nakamura T, Adachi H, Yagita H, Okumura K. Antigen-independent T cell activation mediated by very late activation antigen-like extracellular matrix receptor. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1559-1562
167. Takahashi H, Soderstrom K, Nilsson E, Kiessling R, Pataroyo M. Integrins and other adhesion molecules on lymphocytes from synovial fluid and peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. *Eur J Immunol* 1992; 22: 2879-2885
168. Takeuchi T, Amano K, Sekine H, Koide J, Abe T. Upregulated expression and function of integrin adhesive receptors in systemic lupus erythematosus patients with vasculitis.

- J Clin Invest 1993; 92: 3008-3016
169. Tallstedt L, Norberg R. Immunohistochemical staining of normal and Graves' extraocular muscle. Invest Ophthalmol Vis Sci 1988; 29: 175-184
170. Thiele DL, Kurosaka M, Lipsky PE. Phenotype of the accessory cell necessary for mitogen-stimulated T and B cell responses in human peripheral blood: delineation by its sensitivity to the lysosomotropic agent, L-leucine methyl ester. J Immunol 1983; 131: 2282-2290
171. Towbin H, Stalhelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979; 76: 4350-4354
172. Villadolid MC, Yokoyama N, Izumi M, Nishikawa T, Kimura H, Ashizawa K, Kiriya T, Uetani M, Nagataki S. Untreated Graves' disease patients without clinical ophthalmopathy demonstrate a high frequency of extraocular muscle (EOM) enlargement by magnetic resonance. J Clin Endocr Metab 1995; 80: 2830-2833
173. Wall JR, Boucher BA, Salvi M, Zhang ZG, Kennerdell J, Tyutyunikov A, Genovese C. Pathogenesis of thyroid associated ophthalmopathy: an autoimmune disorder of the eye muscle associated with Graves' hyperthyroidism and Hashimoto's thyroiditis. Clin Immunol Immunopath 1993; 68:1-8
174. Weetman AP, Cohen S, Gatter KC, Fells P, Shine B. Immunohistochemical analysis of the retrobulbar tissues in Graves' ophthalmopathy. Clin Exp Immunol 1989; 75: 222-227
175. Weetman AP, Fells P, Shine B. T and B cell reactivity to extraocular and skeletal muscle in Graves' ophthalmopathy. 1989; 73: 323-327
176. Weetman AP. The role of T lymphocyte in thyroid-associated ophthalmopathy. Autoimmunity 1992; 13: 69-73
177. Weightman D, Kendall-Taylor P. Cross reaction of eye muscle antibodies with thyroid tissue in thyroid associated ophthalmopathy. J Endocrinol 1989; 122: 201-206
178. Wiersinga WM, Gerding MN, Prummel MF, Krenning EP. Octreotide scintigraphy in thyroidal and orbital Graves' disease. Thyroid 1998; 8: 433-436
179. Wu YI, Clarke EM, Shepherd P. Prevalence and significance of antibodies reactive with eye muscle membrane antigens in sera from patients with Graves' ophthalmopathy and other thyroid and nonthyroid diseases. Thyroid 1998; 8: 167-174
180. Yaar M, Foidart JM, Brown KS, Rennard SI, Martin BR, Liotta L. The Goodpasture-like syndrome in mice induced by intravenous injections of anti-type IV collagen and anti-laminin antibody. Am J Pathol 1982; 107: 79-91
181. Zgliczyński S, Jastrzębska H, Górowski T, Janik J, Kuś J, Hliniak A, Karczmarzyk R, Kukolowicz P. Results of 3-stage treatment: (i) corticotherapy, (ii) linear acceleration and (iii) orbital decompression in 206 patients with malignant Graves' ophthalmopathy. Endokryn Pol 1992; 43: 274-286