

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Papp Fruzsina Réka

**Az orbita fibroblasztok hialuronsav termelésére ható
tényezők vizsgálata endocrin orbitopathiában**

DEBRECENI EGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**Az orbita fibroblasztok hialuronsav termelésére ható
tényezők vizsgálata endocrin orbitopathiában**

Papp Fruzsina Réka

Témavezető: Prof. Dr. Nagy V. Endre



DEBRECENI EGYETEM

EGÉSZSÉGTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2025

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke.....	4
2. Bevezetés.....	6
3. Irodalmi áttekintés.....	7
3.1. Az endocrin orbitopathia epidemiológiája.....	7
3.2. Az endocrin orbitopathia klinikai képe, stádiumbeosztása és diagnosztikája.....	7
3.3. Az endocrin orbitopathia kezelése.....	11
3.4. Az endocrin orbitopathia pathogenesis.....	14
3.4.1. Az orbita fibroblasztok aktivációja.....	14
3.4.2. A miofibroblaszt irányú differenciálódás.....	18
3.4.3. A TGF- β jelátvitel miofibroblaszt differenciálódásban betöltött szerepe.....	21
3.4.4. A hialuronsav szerepe az endocrin orbitopathia pathogenesisében.....	24
4. Célkitűzések.....	27
5. Módszerek.....	28
5.1. Primer fibroblaszt kultúrák létrehozása.....	28
5.2. Kezelések.....	30
5.3. Sejtprolifерáció vizsgálat.....	30
5.4. Metabolikus aktivitás vizsgálat.....	31
5.5. HA koncentráció meghatározás.....	31
5.6. Glükózaminoglikán (GAG) izolálás.....	31
5.7. Hialuronsav gél-elektroforézis.....	32
5.8. Polimeráz láncreakció (PCR).....	32
5.9. Statisztikai elemzés.....	34
6. Eredmények.....	35
6.1. A miofibroblaszt differenciálódás hialuronsav anyagcserére gyakorolt hatása.....	35
6.2. A glükokortikoidok hatása a sejtprolifерációra és a hialuronsav-metabolizmusra.....	43
7. Megbeszélés.....	51
8. Új megállapítások.....	57
9. Összefoglalás.....	58
10. Summary.....	59
11. Irodalomjegyzék.....	60
13. Keywords.....	75
14. Köszönetnyilvánítás.....	76

1. Rövidítések jegyzéke

AMH – anti-Müller hormon
AMPK – adenzin-monofoszfát-aktivált protein kináz
APC – antigén-prezentáló sejt
BMP – bone morphogenetic protein
BrdU – 5-bromo-2'-dezoxiuridin
CAS – klinikai aktivitás pontszám
CD90 – thymocita differenciálódási antigén 90
CEMIP – sejt-migrációt indukáló fehérje
CTGF – kötőszöveti növekedési faktor
DMSO – dimetil-szulfoxid
DON – dysthyroid opticus neuropátia
DTPA– dietilén-triamin-pentaecetsav
ECM – extracelluláris mátrix
EDA-FN – extra domén A fibronektin
EGFR – epidermális növekedési faktor receptor
EOP – endocrin orbitopathia
EUGOGO – European Group of Graves' Orbitopathy
FBS – magzati borjú szérum
FZD – Frizzled receptor
G6PD – glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
GAG – glükozaminoglikán
GAPDH – gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz
GlcA – D-glükoronsav
GlcNac – N-acetil glükózamin
HA – hialuronsav
HARE – hiauronsav endocitózis receptor
HAS – hiauronsav szintáz
HYAL –hialuronidáz
IFN- γ – interferon- γ
IGF-1R – inzulin-szerű növekedési faktor-1 receptor
IL-1 – interleukin-1

IL-2 – interleukin-2
IL-6 – interleukin-6
IL-8 – interleukin-8
IL-15 – interleukin-15
IL-17 – interleukin-17
LAP – latencia asszociált peptid
LLC – nagy látens komplex
LRP5 – alacsony sűrűségű lipoprotein-receptorhoz kapcsolódó fehérje 5
LRP6 – alacsony sűrűségű lipoprotein-receptorhoz kapcsolódó fehérje 6
LTBP – látens TGF- β - kötő fehérje
LYEV-1 – nyirokrendszeri endothelialis hialuronsav receptor
MCP-1 – monocita kemoattraktáns protein-1
PCR – polimeráz láncreakció
PDGF – vérlemezke eredetű növekedési faktor BB
PG – proszttaglandin
PPAR γ – peroxiszóma-proliferátor aktivált receptor gamma
RHAMM – hialuronsav által közvetített motilitás receptor
ROS – reaktív oxigén gyök
SLC – kis látens komplex
TGF- β – transzformáló növekedési faktor- β
TGF- β RI: transzformáló növekedési faktor- β receptor I
TGF- β RII: transzformáló növekedési faktor- β receptor II
Th1 – T-helper 1 limfocita
Th2 – T-helper 2 limfocita
Thy1 – thymocyta differenciálódási antigén 1
TLR-4 – toll like receptor-4
TMEM2 – transzmembrán protein-2
TNF- α – tumor nekrozis faktor- α
TPO – pajzsmirigy peroxidáz
TRAb – TSH receptor antitest
TSH – pajzsmirigy stimuláló hormon
TSHR – pajzsmirigy stimuláló hormon receptor
UDP – uridin-difoszfát-glükóz
UDP - GlcNac – uridin-difoszfát-N-acetil-glükózamin

2. Bevezetés

Az endocrin orbitopathia (EOP) az orbita komponenseit – elsősorban a kötőszövetet és a külső szemizmokat – érintő autoimmun gyulladás. Fő klinikai jellemzői a szemizmok megvastagodása és ödémássá válása mellett az orbita szövetek térfogat-növekedése miatt fellépő szemtünetek. Az autoimmun folyamat elsődleges célpontjai az orbitában található fibroblasztok. Az orbita és pajzsmirigy autoimmunitás közötti pathogenetikai kapcsolat a pajzsmirigy stimuláló hormon receptor (TSHR) ellenes autoantitestek jelenlétének tulajdonítható, hiszen a TSHR a pajzsmirigy follikuláris sejtjein és az orbitában található fibroblasztok felszínén egyaránt expresszálódik. A receptor autoantitestekkel történő stimulációja olyan jelátviteli folyamatokat indít el, melyek következtében a fibroblaszt sejtek proliferációja és gyulladásos citokin termelése fokozódik, míg az orbitát infiltráló immunsejtek által termelt faktorok a gyulladásos állapot fenntartása mellett, további fibroblaszt aktivációt váltanak ki.

Az aktivált orbita fibroblasztok (OF) miofibroblaszt irányú differenciálódáson mehetnek keresztül, melynek során amellet, hogy az aktin citoszkeleton átrendeződése révén kontraktilisebbé válnak, az extracelluláris mátrix (ECM) termelésük is megváltozik. A fibroblasztokat körülvevő ECM egyik fő komponense a hialuronsav (HA), melyről ismert, hogy nagy vízmegkötő képessége révén hozzájárul az ödéma kialakulásához, jelentősen súlyosbítva ezzel az orbita folyamatot.

A transzformáló növekedési faktor β (TGF- β) a miofibroblaszt fenotípus irányába történő differenciálódás kulcsfontosságú regulátora és egyben az ECM átrendeződés egyik ismert szabályozója is. A TGF- β által indukált miofibroblaszt differenciálódás hialuronsav-anyagcserére gyakorolt hatása és annak szerepe az EOP lefolyásában még nem tisztázott.

A betegség hátterében álló autoimmun gyulladás kezelése céljából a glükokortikoidokat (GC) évtizedek óta alkalmazzák első vonalbeli szerként. Így fontosnak tartottuk annak megismerését is, hogy ezek a gyógyszerek milyen hatást gyakorolnak a különböző eredetű fibroblasztok proliferációjára és HA anyagcseréjére.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Az endocrin orbitopathia epidemiológiája

Az EOP az orbita komponenseinek autoimmun gyulladása, mely elsősorban a kötőszövetet és a külső szemizmokat érinti¹. Az esetek közel 90%-ában hyperthyreosishoz társultan alakul ki, de ritka esetben euthyreoid állapotban vagy hypothyreoid autoimmun thyreoiditis mellett is előfordulhat. A Graves-Basedow kórban szenvedő betegek 20-30%-ában jelenik meg extrathyreoidealis szövödményként². Az endokrin orbitopathia – a Graves-Basedow kórhoz hasonlóan – nők esetén gyakrabban fordul elő, de férfiaknál nagyobb valószínűséggel jelentkezhet súlyosabb formában. Éves, életkorra korrigált incidenciája nők esetén 16/100 000, míg 100 000 férfira vetítve 2,9, becsült prevalenciája 0,25%. Életkor szerinti eloszlása a két nem esetén eltérő, nőknél 40-44 éves kor, illetve 60-64 éves kor között, a férfiak esetében pedig 45-49 és 65-69 éves kor között alakul ki leggyakrabban.³ Az EOP előfordulásával kapcsolatban megfigyelt életkori és nemi különbségek okai azonban továbbra is tisztázatlanok.

Az EOP kialakulását különböző környezeti tényezők is befolyásolják, ideértve a dohányzást, a bél mikrobiom összetételének változásait^{4,5}, a magas szérum koleszterinszintet, valamint a D-vitamin- és szelénhiányt⁶. Mind között kiemelt szerepet játszik a dohányzás⁷, mely azáltal, hogy hozzájárulhat a szemüregi hypoxia kialakulásához, a szabad gyökök által kiváltott retroorbitalis fibroblaszt proliferáció fokozódáshoz⁸, jelentősen növelheti az EOP kockázatát. Emellett genetikai tényezők, például a peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor gamma (PPAR γ), a PAI-1 és a pajzsmirigy-stimuláló hormon receptor (TSHR) génjeiben előforduló egyedi nukleotid-polimorfizmusok is befolyásolhatják az EOP kialakulásának valószínűségét.⁹⁻¹¹

3.2. Az endocrin orbitopathia klinikai képe, stádiumbeosztása és diagnosztikája

Az EOP tünetei változatosak lehetnek. Az egyik legkorábban és leggyakrabban előforduló panasz a retrobulbaris nyomó fájdalom, emellé azonban számos egyéb tünet is társulhat, beleértve az exophthalmust, mely az EOP legjellegzetesebb tünete, a kettőslátást, a felső szemhéj retrakcióját, a szemhéj és a kötőhártya vörösségét, az expozíciós keratopathiát, a szaruhártyafekélyeket, valamint súlyos esetben a dysthyroid opticus neuropátiát (DON),

amely az látóideg kompressziójának következménye.¹² Az EOP súlyossága enyhe, középsúlyos, súlyos vagy látást veszélyeztető lehet.¹³ A látásvesztéssel fenyegető forma az esetek 3–5%-ában fordul elő,¹⁴ azonban enyhébb lefolyás esetén is jelentősen ronthatja a betegek életminőségét.¹⁵

Jellegzetes tüneteinek megjelenése főként az orbita szövetek autoimmun gyulladásából és szerkezetének átrendeződéséből fakad, ami érintheti túlnyomórészt a kötőszövetet (I. típusú betegség) vagy a külső szemizmokat (II. típusú betegség), leggyakrabban mindkettőt.¹⁶ A betegség különböző fenotípusainak kialakulását befolyásoló tényezők nagyrészt ismeretlenek, ugyanakkor feltételezhető, hogy a dohányzás növeli az I. típusú betegség kialakulásának kockázatát.¹⁷

Az European Group of Graves Orbitopathy (EUGOGO) kritériumrendszere a betegeket súlyosság szerinti alcsoportokba sorolja¹⁸. Enyhe EOP esetén a betegek életminőségét az EOP csekély mértékben befolyásolja, és nem indokolt az immunszuppresszió vagy műtéti kezelés. Az alábbiak közül általában egy vagy több tünet jelentkezik náluk: 2 mm-nél kisebb felső szemhéj retrakció, enyhe szemhéj és/vagy kötőhártya érintettség, a populációs átlagot legfeljebb 2 mm-rel meghaladó exophthalmus. Kettőslátás nem alakul ki, vagy csak naponta néhány órán át jelentkezik, és a szaruhártya érintettség lokális eljárásokkal, szemcseppel, szemkenőccsel kezelhető. Közepesen súlyos és súlyos EOP esetén nem áll fenn látáskárosodás veszélye, viszont a betegség olyan mértékben befolyásolja a betegek életminőségét, hogy a szükséges kezelés (immunszuppresszió, szemészeti műtét) kockázata vállalható. Ebben a súlyossági csoportban a felsorolt tünetek – 2 mm-nél nagyobb felső szemhéj retrakció; közepes vagy súlyos szemhéj és/vagy kötőhártya érintettség; populációs átlagot 3 mm-rel meghaladó exophthalmus; átmeneti vagy tartós kettőslátás – közül legalább egy jelen van. Látásvesztéssel fenyegető, súlyos EOP esetén opticus neuropathia vagy szaruhártyafekély áll fenn.

A betegek vizsgálatokor az orbiták állapota részletesen az ATA (Amerikai Pajzsmirigy Társaság) tünet-és súlyossági klasszifikációja¹⁹ alapján jellemezhető (1. táblázat). Az aktuálisan meghatározott ATA-státusz jól tükrözi a betegség súlyosságát és lehetőséget nyújt a változások követésére.²⁰

Az EOP tüneteinek ATA szerinti klasszifikációja		
Szám	Tünet	Leírás
0	Nincs	Panasz, tünet nincs
1	Enyhe	Hyperthyreosisos szemtünetek: Graefe-tünet, tág szemrés, exophthalmus $\leq 2\text{mm}$
2	Lágyszövet-eltérés	Conjunctiva hyperaemia, szemhéjoedema, carunculaduzzanat 0-nincs, a-kisfokú, b-közepes, c-súlyos
3	Exophthalmus	Ha a Hertel-érték a normál felső határát 3mm-el meghaladja 0-nincs, a-3-4mm, b-5-7mm, c-ha $\geq 8\text{mm}$
4	Szemizmok	A külső szemizmok érintettsége általában kettőslátással 0- nincs, a- csak szélső tekintési helyzetben, b- a bulbus mozgása korlátozott, c- fixált bulbus
5	Corneaérintettség	0-nincsen, a-pontozott, b-fekély, c-homály, perforatio
6	Visusromlás	0-nincs, a- látótérdefektus, V 0.4-1.0, b- V0.1-0.3, c- V \leq 0.1

1. táblázat: Szemtünetek klasszifikációja endocrin orbitopathiában az Amerikai Pajzsmirigy Társaság ajánlása szerint.

Az orbita komponensek és a szemizmok érintettségének megítéléséhez legalább egyszer célszerű MR-vizsgálat elvégzése. Az immunfolyamat aktivitásának jellemzésére három módszer, az MR-vizsgálat, nukleáris képalkotás és a klinikai aktivitási pontszám (CAS) alkalmas (2. táblázat).

A klinikai aktivitási pontszám meghatározása		
1	Fájdalmas nyomó érzés a szemben, vagy szem mögött, az elmúlt 4 hétben	Fájdalom
2	Fájdalom szélső tekintési irányokban az elmúlt 4 hétben	
3	Szemhéjbőrpír	Vörösség
4	Conjunctiva hyperaemia (legalább egy kvadráns)	
5	Szemhéjak oedemája	Duzzanat
6	Chemosis	
7	Caruncula duzzanat	
8	Hertel-oldalkülönbség, ≥ 2 mm, vagy Hertel-növekedés ≥ 2 mm az elmúlt 3 hónapban	
9	Szemmozgás beszűkülése $\geq 5^\circ$ az elmúlt 3 hónapban	Funkció károsodás
10	Visus csökkenése $\geq 0,1$ az elmúlt három hónapon belül	

2. táblázat: A klinikai aktivitási pontszám meghatározása

A klinikai aktivitási pontszám (CAS) a legjobban validált értékelési rendszer a GO aktivitásának felmérésére.¹⁸ Legfőbb korlátja bináris jellege. Felvétele során szemenként meghatározzuk, hogy a pontrendszer tíz eleme közül mennyi teljesül, majd ezeket összeadva határozható meg a CAS értéke. Amennyiben az 4 vagy annál nagyobb, az immunológiailag aktív betegségre utal.

Az EOP diagnosztikájában kulcsfontosságú a klinikai tünetek felismerése, melyek már korai stádiumban is jelentkezhetnek. Az endokrin orbitopathia gyanúja esetén a betegség immunológiai aktivitását is mindenképpen vizsgálni kell, hiszen a beteg panaszai és a klinikai tünetek nem minden esetben tükrözik a folyamat aktivitását. Az EOP diagnosztikájában a

CAS meghatározása¹⁸ az aktivitás objektív mérésére szolgál, míg a NOSPECS rendszer a betegség súlyosságát hivatott felmérni.²¹ A betűszó az alábbi kategóriákat jelöli: N: No signs or symptoms (Nincsenek jelek vagy tünetek), O: Only signs, no symptoms (Csak jelek, tünetek nélkül, például felső szemhéj retrakció), S: Soft tissue involvement (Lágy szöveti érintettség, például kötőhártya duzzanat vagy bőrpír), P: Proptosis (Szemkidülledés, az orbitális térfogat növekedése miatt), E: Extraocular muscle involvement (A szemmozgató izmok érintettsége, például kettőslátás), C: Corneal involvement (Szaruhártya károsodás, például expozíciós keratopathia), S: Sight loss (Látásvesztés, általában optikus neuropathia következtében).

A más orbita folyamatoktól való elkülönítésben szerepe van egyéb képalkotó vizsgálatoknak is (ultrahang, komputertomográfia). Ezek a módszerek azonban nem nyújtanak részletes információt a szemizmok és a retrobulbáris szövetek állapotáról, így a betegség súlyosságának megítélésére vagy követésre nem alkalmasak.²² MR vizsgálat során a képi információ és az izmokban mért T2 relaxációs idő, valamint a zsírelnyomások, ún. STIR felvételek a betegség súlyosságáról és aktivitásáról, míg a somatostatin analóggal vagy dietilén-triamin-pentaecetsavval (DTPA) végzett SPECT/CT vizsgálatok a folyamat aktivitásáról tájékoztatnak.²³

Fontos diagnosztikai módszer továbbá a TRAb szintjének és a pajzsmirigy funkcionális állapotának meghatározása.²⁴ Az emelkedett szabad T4 és csökkent TSH szintek mellett a TRAb pozitivitás jellemző.²⁴

3.3. Az endocrin orbitopathia kezelése

Az EOP kezelése jelenleg két hasonló tartalmú nemzetközi ajánlás, az European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) és az európai és az amerikai pajzsmirigy társaság közös ajánlása alapján történik, amelyben a megelőző évek publikációit alapul véve fogalmazták meg a jelenleg is érvényben lévő terápiai irányelveket.¹⁸

Az EOP kezelése, különösen a súlyosabb esetekben, megköveteli, hogy a betegek olyan központokba kerüljenek, ahol a belgyógyász-endokrinológus, a szemész, valamint szükség szerint a sugárterápiás szakember és sebész együtt kezelhesse a beteget. Összehangolt munkájuk biztosítja a megfelelő ellátást.

Enyhébb esetekben szelén rendszeres szedése, a beteg állapotának folyamatos nyomon követése mellett, kedvező hatást gyakorolhat a betegség lefolyására.^{25,26} Emellett kiemelten

fontos felhívni a figyelmet a dohányzás abbahagyására, hiszen az nemcsak az EOP kialakulásának kockázatát és a súlyosabb formák megjelenését fokozza, hanem jelentősen csökkenti a kezelés hatékonyságát is.^{27,28} Kiegészítő kezelésként, a lokális szemészeti készítmények, műkönyv, és a cornea kiszáradását gátló szemzselé segítik a cornea védelmét.^{29,30} A prosztaglandin-analóg tartalmú szemcseppek csökkenthetik a megnövekedett szemnyomást.³¹

Kezelés során a pajzsmirigyműködést az euthyreoid tartományba kell beállítani, hiszen a hyperthyreosis mellett a kezelés során kialakuló átmeneti, iatrogen hypothyreosis is kedvezőtlen a betegség szempontjából. A hypothyreosis elkerülésére célszerű a blokkolás-visszapótlás kezelési módot alkalmazni, melynek során a thyreostatikus hatású gyógyszer biztosan hatásoa adagja mellé thyroxint adagolunk a betegnek. A tünetek szempontjából az alacsony-normál TSH értékek a legkedvezőbbek.

A pajzsmirigy túlműködés kezelésére pajzsmirigy műtét is választható. A hyperthyreosis műtéti kezelése után – mely EOP-ban near total, vagy total thyreoidectomy – korai thyroxin-pótlás szükséges a hormonháztartás fenntartása érdekében. Középsúlyos vagy súlyos EOP és magas TRAb szint esetén a műtéti kezelés részesítendő előnyben.^{32,32} A pajzsmirigy eltávolítás önmagában is javulást eredményezhet az EOP lefolyásában,³³ feltehetően az orbitában és a pajzsmirigyben is jelen levő TSH receptor autoimmunitást fenntartó mennyiségének csökkentése útján.

A hyperthyreosis radioaktív jód izotóppal történő kezelése a pajzsmirigy follikuláris sejteinek apoptózisa által csökkenti a pajzsmirigyhormonok szintézisét.³⁴ Ezt a kezelést azoknál a betegeknél részesítik előnyben, akiknél a hagyományos thyreostaticus gyógyszerekkel (propylthiouracil, methimazol, carbimazol) végzett kezelés után továbbra is magas a TSH receptor elleni antitest (TRAb) szintje, vagy akiknél gyógyszeres kezeléssel nem lehetséges tartós euthyreoid állapotot elérni. A radioaktív jód kezelés kontraindikált aktív, középsúlyos és súlyos EOP esetében, különösen emelkedett TRAb szint mellett. Ismert, hogy a radiojód a betegek körülbelül egyharmadánál a már meglévő tünetek súlyosbodásához vezet, és a magas kockázatú csoportokban akár EOP-ot is kiválthat. Az EOP inaktív fázisában végzett radiojód kezelés esetén preventív orális kortikoszteroid kezelés ajánlott az orbitát értintő kedvezőtlen hatások megelőzésére.¹⁸

Az életminőséget jelentősen befolyásoló orbitopathia, illetve középsúlyos és súlyos, immunológiailag aktív EOP-ban immunszuppresszív kezelés szükséges. Az elsővonalbeli terápia intravénás kortikoszteroidok alkalmazása. A kezelési séma jellemzően 4,5 g kumulatív dózisú methylprednisolone intravénásan (hetente egyszer 500 mg hat héten át, majd

ugyanennyi ideig hetente egyszer 250 mg).¹⁸ Az immunszuppresszív kezelés szempontjából rendkívül fontos a korai felismerés és a betegség aktivitásának felmérése, mert ez a kezelés az immunfolyamat aktivitásának maximumán a leghatásosabb, amely akár hetekkel vagy hónapokkal megelőzheti az EOP súlyos tüneteinek kialakulását.³⁵

Ha a kortikoszteroid kezelés nem elegendő vagy ellenjavallt, retrobulbaris irradiáció (orbitánként 20 Gy kumulatív dózis, 10 alkalommal 2 Gy adása mindkét orbitára) is hatásos az EOP kezelésében,³⁴ míg egyes kutatások szerint az intravénás kortikoszteroidok retrobulbáris irradiációval való kombinációja még hatékonyabbnak bizonyult.³⁶

Korábban a glükokortikoidok hatékonyságát jellemzően immunszuppresszív hatásukkal hozták összefüggésbe,^{18,37,38} hiszen a limfociták szöveti infiltrációjának gátlásán keresztül csökkentik a kialakult gyulladást. Más sejttípusokban azonban kimutatták, hogy a glükokortikoidok képesek gátolni a HA termelést is.³⁹⁻⁴¹ A glükokortikoidok HA metabolizmust befolyásoló hatását orbita fibroblasztok esetén korábban még nem vizsgálták.

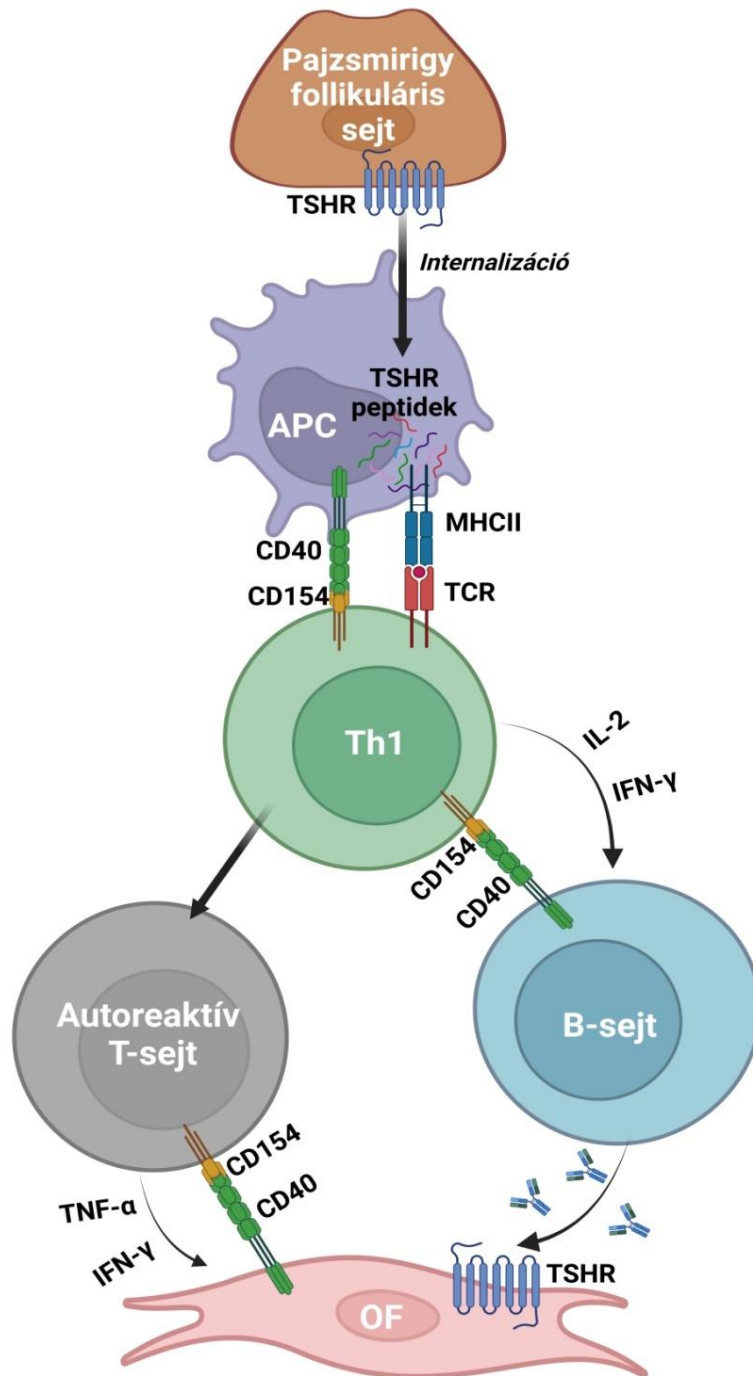
Súlyos, látást veszélyeztető EOP és a nervus opticus kompressziója esetén rövid ideig alkalmazott nagy dózisú intravénás kortikoszteroid kezelés szükséges. Amennyiben két héten belül nem tapasztalható javulás, vagy a terápia ellenére a visus tovább romlik, sürgősségi orbita dekompressziós műtét elvégzése indokolt, amely az orbita lateralis, medialis vagy mindkét csontos falának eltávolításával történik.¹⁸

3.4. Az endocrin orbitopathia pathogenesisise

3.4.1. Az orbita fibroblasztok aktivációja

Az EOP pathogenesisében, az autoimmun folyamat elsődleges célpontjai az orbitában található fibroblasztok.⁴² A pajzsmirigy és az orbiták ellen irányuló autoimmunitás közötti pathogenetikai kapocsért felelős autoantigén a pajzsmirigy stimuláló hormon receptor (TSHR), mely a pajzsmirigy folliculáris sejtjein és az orbitában található fibroblasztok felszínén egyaránt expresszálódik. A TSHR-t az antigén-prezentáló sejtek internalizálják és lebontják, majd a TSHR peptideket fő hisztokompatibilitási komplex II (MHCII) kapcsoltan prezentálják a helper T-sejtek számára, melyek aktivációt követően, a CD154–CD40 kapcsolaton keresztül kölcsönhatásba lépnek az autoreaktív B-sejtekkel, és a B-sejtek TSHR ellenes antitesteket termelő plazmasejteké történő differenciálódását serkentik, vagy autoreaktív T-sejteként kemotaktikus faktorok hatására eljuthatnak az orbita szövetekbe. Mivel az orbita fibroblasztok is expresszálják CD40 fehérjét, képesek kölcsönhatásba lépni a CD40 ligandot (CD154) hordozó CD4⁺ T-sejtekkel.⁴³ A plazmasejtek által termelt autoantitestek pedig az orbita eredetű fibroblasztok felszínén expresszálódó TSHR-hoz kötődve a fibroblaszt sejtek aktivációját okozzák (1. ábra).

A TSHR-ra gyakorolt hatásuk alapján háromféle autoantitestet különböztetünk meg: stimuláló, blokkoló és TSHR-kötő antitesteket (utóbbiak biológiai aktivitás szempontjából semlegesek). A Graves-kóros betegekben a stimuláló TSHR ellenes autoantitestek (TRAb) jelenléte dominál, és egyben ezek felelősek a hyperthyreosis kialakulásáért.



1. ábra. Az orbita fibroblasztok aktivációja EOP-ban

TSHR: pajzsmirigy stimuláló hormon receptor; APC: antigén-prezentáló sejt; Th1: helper T-sejt; MHCII: fő hisztokompatibilitási komplex II; TCR: T-sejt receptor; CD40: cluster determinant 40; CD154: cluster determinant 154; TNF- α : tumor nekrozis faktor- α ; IFN- γ : interferon- γ ; OF: orbita fibroblaszt

A TRAb szintjét kritikus tényezőnek tartják az EOP pathogenesis szempontjából, mivel a TRAb szint korrelál a TED klinikai súlyosságával, így gyakran magas TRAb titer figyelhető meg a súlyos EOP-ban szenvedő betegeknél.⁴⁴ A Graves-Basedow kórban szenvedő betegeknél a TRAb pozitivitás mellett, nem túl magas titerben, de gyakori a thyreoglobulin és a thyreoidea peroxidáz ellenes antitestek jelenléte is.⁴⁵ Emellett igazolták, hogy az inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF1) receptor (IGF1R) fizikai és funkcionális komplexet képes alkotni a TSH receptorral,⁴⁶ és a két receptor egyidejű aktiválása szinergikus módon fokozza a DNS szintézist és a sejtek proliferációját.^{47,48}

A TSHR autoantitestekkel való stimulálása a PKA/CREB, mTOR, AKT és nukleáris faktor kappa B (NF- κ B) jelátviteli útvonalak ativálása révén⁴⁹⁻⁵¹ fokozza az orbita fibroblasztok proliferációját és gyulladós mediátorok, például IL-6 és IL-8 termelését⁵²⁻⁵⁴, míg az IGF1R egy receptor tirozin kináz, amely aktiválja a PI3K/AKT, Ras/Raf/MEK és IRS jelátviteli utakat.⁵⁵⁻⁵⁷ Habár több tanulmányban leírták az IGF1 receptor ellenes antitestek jelenlétét, valamint az IGF1R és TSHR ko-lokalizációját orbita fibroblasztokon, ezek szerepe az endokrin orbitopathia pathogenesisében még nem teljesen tisztázott.⁵⁸⁻⁶¹ Ismert, hogy az IGF1R kapcsolt Ras/Raf/MEK és PI3K/AKT jelátviteli utak fokozhatják a proliferációt, a gyulladást, az adipogenezist, a hegszövet képződést, valamint a sejtek túlélését, az IGF1R/TSHR jelátvitel pedig a glükozaminoglikánok termelését is képes fokozni.^{59,62,63}

Míg a TSHR és IGF1R stimulálása olyan jelátviteli folyamatokat indít el, melyek növelik a sejtek proliferációját és gyulladós citokin termelését, addig az orbitát infiltráló immunsejtek (CD4+ és CD8+ T-limfociták, monociták, makrofágok, B- limfociták, plazmasejtek és hízósejtek) által termelt faktorok a gyulladós állapot fenntartása mellett, szintén hozzájárulnak a fibroblasztok aktiválásához.

Az immunsejtek és orbita fibroblasztok által egyaránt termelt IL-6, receptorához kötődve aktiválja a JAK/STAT3 és PI3K/AKT jelátviteli útvonalakat^{64,65} és ezáltal serkenti a sejtek proliferációját, differenciálódását és gyulladós citokin termelését.⁶⁶ Emellett, az aktivált makrofágok és más immunsejtek által termelt IL-1 β a JNK, p38 és AP-1 útvonalakon keresztül^{67,68} tovább fokozza az orbita fibroblasztok proliferációját és HA termelését. A dendritikus sejtek, monociták és makrofágok által termelt IL-15 az autoimmun folyamat fenntartásában játszik szerepet a B- és T-limfociták aktivációja és proliferációjuk serkentése révén, míg az IL-17 a Th17 sejtek által termelt gyulladós citokin, amely azáltal, hogy kemokinek termelését váltja ki, elősegíti az immunsejtek infiltrációját az orbitába.^{69,70} Továbbá, az adipogenezis indukálása,⁷¹ a gyulladós citokin termelés serkentése, immunsejtek toborzása⁹ és az extracelluláris mátrix termelés fokozása útján⁷² a T-limfociták,

makrofágok és aktivált hízósejtek által termelt 15d-prostaglandin (PG) J2, PGE2 és PGD2 szintén hozzájárul az orbita szövetek térfogatnövekedéséhez.

A tumor nekrozis faktor α (TNF α) kulcsfontosságú proinflammatorikus citokin, amely gyulladáshoz vezető molekulák, köztük más citokinek és sejtadhéziós molekulák (ICAM, VCAM) expresszióját váltja ki, valamint fontos szerepet játszik a gyulladáshoz vezető állapot fenntartása és az immunsejtek toborzása mellett a sejtproliferáció, differenciáció és apoptózis szabályozásában. A TNF- α serkenti a ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim aktivitását, amely elősegíti a prostaglandinok termelését. A TNF- α kötődése a sejt felszíni receptoraihoz (TNFR1 és TNFR2) aktiválja a NF- κ B jelátviteli útvonalat, amely szerepet játszik a gyulladáshoz vezető mediátorok, például az interleukin-8 (IL-8), monocita kemoattraktáns protein-1 (MCP-1) és vérlemezke-eredetű növekedési faktor BB (PDGF-BB) expressziójának szabályozásában.^{73,74}

Az orbita fibroblasztok maguk is aktív szerepet töltenek be az autoimmun gyulladás fenntartásában. Azáltal, hogy CD40-et expresszálnak – mely kostimuláló fehérje többek közt a makrofágok, limfociták és thyreocyták felszínén is megtalálható⁷⁵ – a CD40 liganddal (CD154) rendelkező CD4+ T sejtek képesek a CD40–CD154 kapcsolat kialakításán keresztül közvetlenül aktiválni az orbita fibroblasztokat. Ennek következtében a fibroblasztok proliferációja,⁴³ interleukin-1 (IL-1) és interleukin-6 (IL6) termelése fokozódik, továbbá az aktivált T-limfocitáktól származó interferon- γ (IFN- γ), valamint a fibroblasztok és makrofágok által szekretált IL-1 fokozza a HA és a PGE2 szintézisét, míg az interleukin-2 (IL-2) a sejtmediált immunválaszban játszik fontos szerepet.⁷⁶⁻⁷⁹

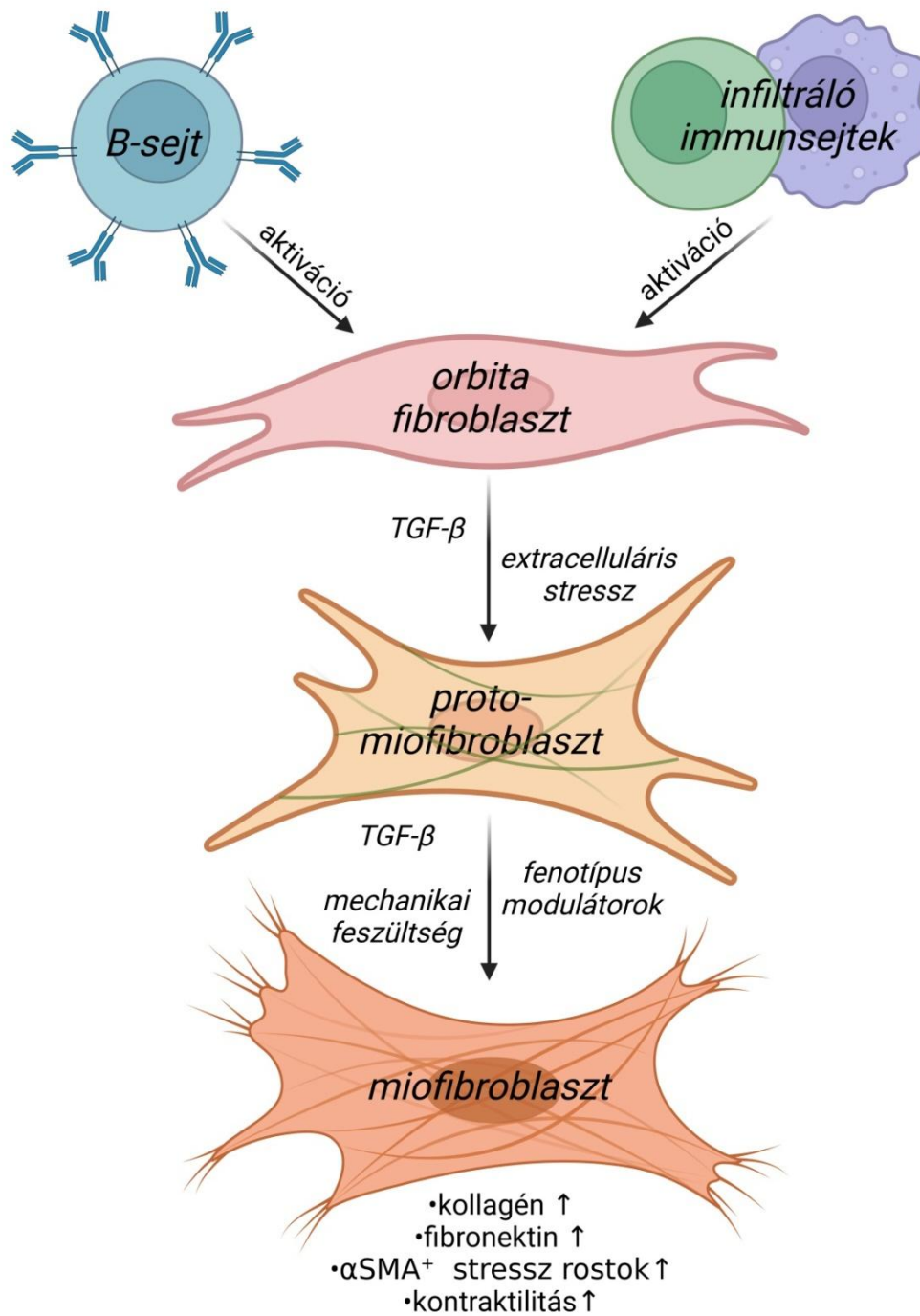
Az orbita fibroblasztokat a CD90 glikoprotein (Thy1) expressziója alapján Thy1- és Thy1+ altípusra oszthatjuk.⁸⁰ A Thy1- OF sejtek, avagy preadipociták közös jellemzője, hogy képesek adipogenezis irányába differenciálódni. Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy a peroxiszóma-proliferátor aktivált receptor gamma (PPAR γ) agonisták fokozzák az adipogenezist és a TSHR expresszióját, valamint gátolják a glükózaminoglikán szintézist és csökkentik az autoimmun gyulladást.^{81,82} A prostaglandinok, valamint az IL-1 β , IL-6 szintén adipogén hatásúak. Míg a Th1 limfociták által szekretált TNF- α és IFN- γ gátolják az adipogenezist,⁸⁰ ezzel szemben a Thy1+ orbita fibroblasztok TGF- β hatására miofibroblaszt irányú transzdifferenciálódáson mehetnek keresztül, mely kulcsszerepet játszik az ECM komponensek felhalmozódásában. Ismert, hogy a Thy1+ fibroblasztok antiadipogén faktorok termelésével gátolják az adipocita differenciálódást, befolyásolva a Thy1- és Thy1+ OF arányának egyensúlyát.⁸⁰ EOP-ban az orbita fibroblasztok fokozott proliferációja, ECM termelése, és adipocitává vagy miofibroblasztokká történő differenciálódása határozza meg az orbita szöveinek térfogat-növekedését.^{82,83}

3.4.2. A miofibroblaszt irányú differenciálódás

A miofibroblasztok kontraktilis, α -simaizom aktin (α -SMA) pozitív sejtek, amelyek fontos szerepet töltenek be számos fiziológias folyamat szabályozásában, köztük a sebgyógyulás folyamatában, azonban tartós jelenlétük és aktivációjuk a szövetekben fibrózis kialakulásához vezet. A miofibroblasztokat eredetük szerint csontvelői eredetű és nem csontvelői eredetű sejtekre oszthatjuk. A csontvelői eredetű sejtek a keringő mesenchymalis őssejtek közül vagy csontvelői eredetű, CD34+ fibrocitákból származnak,⁸⁴⁻⁸⁶ míg a nem csontvelői eredetű miofibroblasztok többek közt fibroblaszt, epithel, endothel, mioepithel, simaizom és zsírsejtekből, pericitákból vagy daganatos hámsejtekből egyaránt képződhetnek.^{84,85,87}

Ahhoz, hogy a fibroblaszt sejtek miofibroblaszttá differenciálódjanak, lokálisan három fő kritériumnak kell teljesülnie: (i) biológiailag aktív TGF- β 1 jelenléte, (ii) extracelluláris stressz, amely az ECM mechanikai tulajdonságainak változásából és az extra domén A fibronectin (EDA-FN)/integrin kölcsönhatásokból ered, és (iii) bizonyos fenotípus modulátorok pl. EDA-FN és HA termelődése. Azt az átmeneti állapotot, amikor az aktivált fibroblasztok proliferációja, migrációja, ECM termelése és citokin termelése fokozódik, de α -SMA pozitivitás még nem figyelhető meg proto-miofibroblaszt állapotnak nevezzük.^{88,89} Annak ellenére, hogy a szakirodalomban kevés információ áll rendelkezésre az ezen állapotban lévő sejtek azonosításával kapcsolatban, a proto-miofibroblasztoknak már több kulcsfontosságú jellemzőjét leírták.^{88,89} Ezek egyike az aktin citoszkeleton átrendeződése, melynek során a főként membránhoz kötött G-aktin monomer polimerizálódik és citoplazmatikus F-aktin stresszfilamentumokká alakul.⁹⁰ Az F-aktin stresszrostok képződése lehetővé teszi a környező sejtekhez és az ECM komponensekhez való kapcsolódást, kadherin alapú adhézió, valamint integrin-tartalmú membránkomplexek segítségével.^{91,92} A kadherineknél kalciumion-függő sejt felszíni adhéziós molekulák, amelyek alapvető szerepet játszanak a sejtek közötti kapcsolatok kialakításában és fenntartásában. Az F-aktin és a kadherineknél közötti kapcsolatot az úgynevezett katenin családba tartozó fehérjék (pl. α -katenin, β -katenin) közvetítik. A kateninek a kadherin citoplazmatikus részéhez kötődnek, és összekapcsolják azt az aktin citoszkeletonnal.⁹¹⁻⁹³ Az integrin transzmembrán receptorok kulcsfontosságú szerepet játszanak a sejtek és az ECM közötti kapcsolatok kialakításában. Heterodimer fehérjék, amelyek egy alfa és egy béta alegységből állnak, ezek különböző kombinációi teszik lehetővé az integrinek sokféleségét és azt, hogy különböző ECM komponensekhez kapcsolódjanak, például az α 5 β 1 integrin a fibronectinhez kötődik, míg az α 2 β 1 integrin főként a kollagénhez

kapcsolódik. Ez a kapcsolat kétirányú kommunikációt tesz lehetővé a sejt és a körülötte lévő ECM között.^{91,92,94} A fent ismertetett folyamatok mellett az érett miofibroblasztokat már nagyobb kontraktilitás, valamint fokozott α -SMA, fibronectin és kollagén expresszió jellemzi (2. ábra).⁸⁹



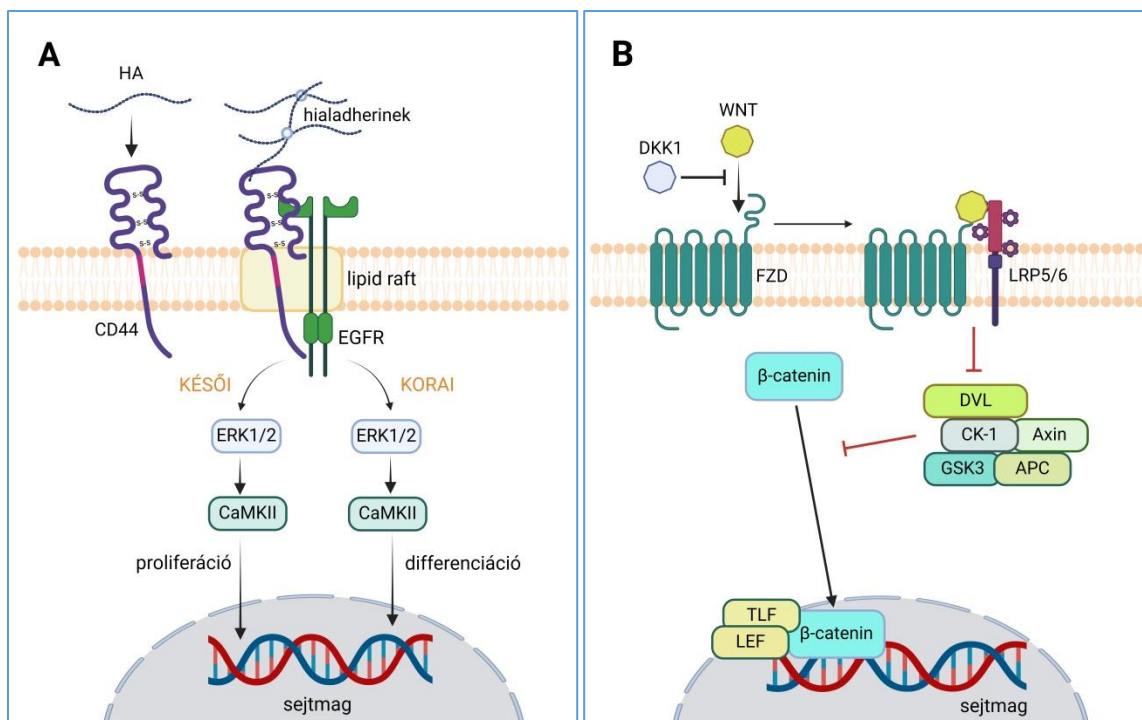
2. ábra. Az orbital fibroblasztok miofibroblaszt irányú differenciálódása

A miofibroblaszt fenotípus kialakítását három ismert jelátviteli útvonal befolyásolhatja: a TGF- β 1/Smad, a HA/CD44/EGFR, és a Wnt/ β -katenin útvonal.

TGF- β 1/Smad közvetített miofibroblaszt differenciálódás során a TGF- β felszabadul a LAP komplexből, és a TGF β RII dimerekhez kötődik, lehetővé téve a TGF β RI-vel való kapcsolódását és az útvonal aktiválódását. Ezt követően a Smad2 és Smad3 foszforilálódik, és Smad4-el komplexet képezve a sejtmagba transzlokálódik, ahol képes kötődni a célgének promóter régiójában található specifikus DNS-szekvenciákhoz, ezáltal elősegítve a pro-fibrotikus gének transzkripcióját.^{95,96}

A képződő HA hyaladherineken keresztüli kölcsönhatása a sejtfelszíni cluster determinant 44 (CD44) receptorral számos élettani és patológiai folyamatban játszik szerepet, beleértve a sejtek proliferációját és differenciálódását.⁹⁷ Az interakció következtében a CD44, mely egy transzmembrán receptor, a lipid raftokba transzlokálódik majd aktiválja az EGFR ko-receptort és bifázikus jelátviteli folyamatokat indít el az ERK1/2 és CaMKII útvonalakon. A korai jelátviteli folyamatok a differenciálódással kapcsolatos gének kifejeződését, míg a késői jelátviteli események a proliferációt szabályozó gének expresszióját serkentik (3.A ábra).⁹⁷ A HA/CD44/EGFR jelátvitelt a HA szintézis fokozásán keresztül a TGF- β 1 is befolyásolja.⁹⁸

A Wnt ligand Dickkopf-related protein 1 (DKK1) hiányában egyidejűleg kötődik a Frizzled receptor extracelluláris doménjéhez és a kis sűrűségű lipoprotein-receptorhoz kapcsolódó fehérje 5 és -6 (LRP5 és LRP6) koreceptorhoz. Amikor a Wnt ligand megkötődik, a Frizzled receptor és az LRP5/6 koreceptor egy komplexet alkotnak. A Wnt ligand közvetett módon foszforilálja az LRP5/6-ot azáltal, hogy olyan jelátviteli folyamatot indít el, amely aktiválja a Dishevelled (DVL) fehérjét, valamint toborozza és aktiválja a CK1 γ és GSK-3 β kinázokat.⁹⁹ A DKK1 a Wnt jelátviteli útvonal gátló molekulája, mely elsősorban a LRP5/6 koreceptorokkal lép kölcsönhatásba, megakadályozva ezzel a Wnt fehérjék (Wnt1, Wnt3a és Wnt5a) kötődését. A Wnt/FZD/LRP jelátviteli útvonal a dishevelled (DVL) által közvetített β -katenin gátló komplex (CK-1/Axin/APC/GSK-3) gátlása révén, elősegíti a β -katenin felhalmozódását és annak transzlokációját a sejtmagba, ahol a TLF és LEF ko-transzkripció faktorokhoz kapcsolódva, pro-fibrotikus gének expresszióját indukálja (3.B ábra).^{100,101} Továbbá kimutatták, hogy a TGF- β 1 a DKK1 gátlásán keresztül képes aktiválni a Wnt jelátviteli útvonalat, ezzel is elősegítve a miofibroblaszt-differenciálódást.^{102,103}



3. ábra. A HA/CD44/EGFR, és a Wnt/β-katenin jelátviteli útvonalak

A – HA/CD44/EGFR útvonal; B – Wnt/β-katenin útvonal

CD44: a HA fő sejt felszíni receptora; EGFR: pidermális növekedési faktor receptor ; ERK1/2: tracelluláris szignálregulált kináz-1 és -2 ; CaMKII: k alcium-kalmodulin-függő kináz II ; DKK1: Dickkopf-1 Wnt-inhibitor fehérje; WNT: Wnt fehérje ; LRP5/6: kis sűrűségű lipoprotein-receptorhoz kapcsolódó fehérje 5 és -6 ; DVL: dishevelled; CK-1: kasein kináz-1; Axin: axin scaffold fehérje; GSK3: glikogén-szintáz-kináz 3; APC: APC tumor-szupresszor fehérje; TLF: T-cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor; LEF: Lymphoid Enhancer Factor.

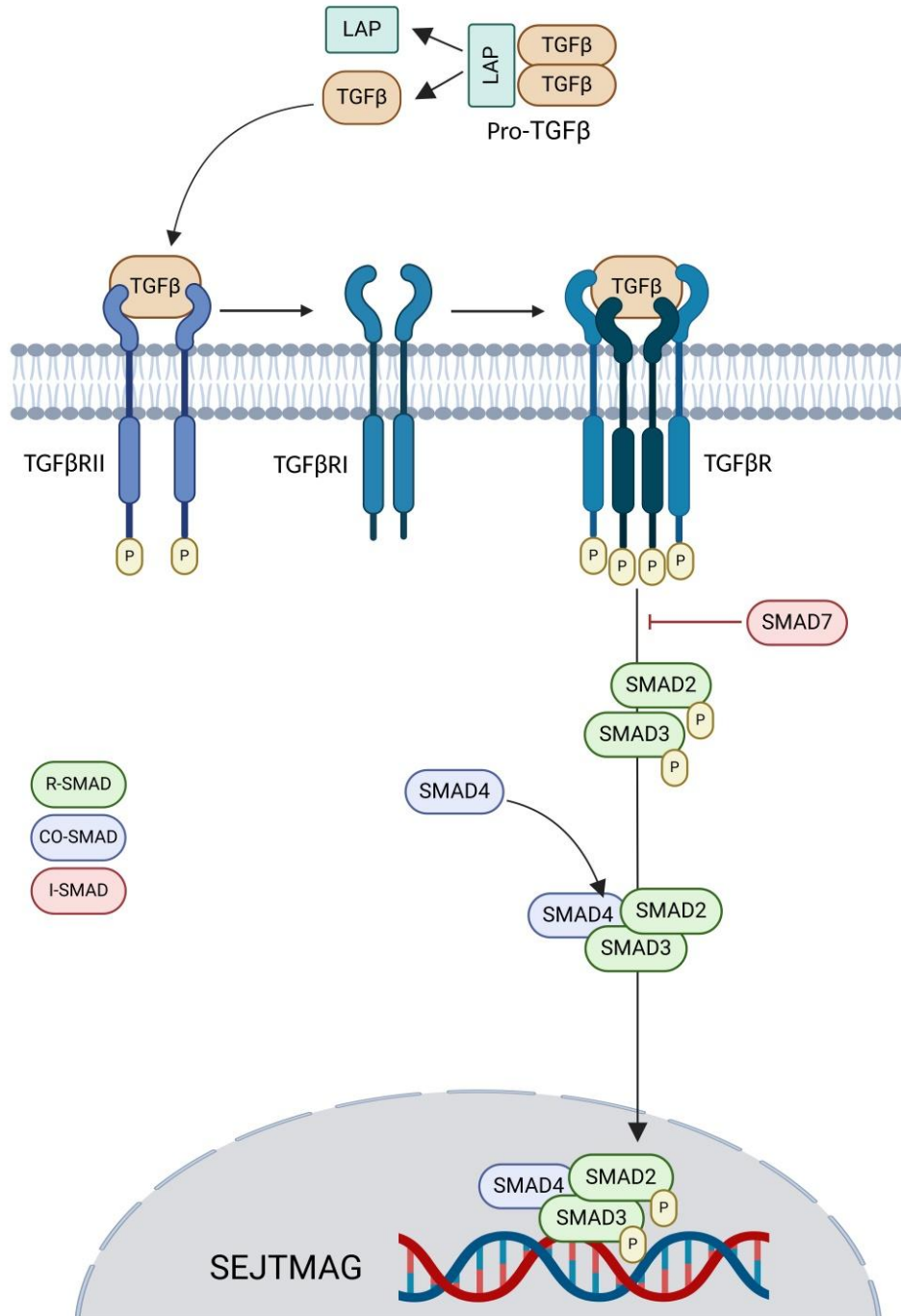
3.4.3. A TGF-β jelátvitel miofibroblaszt differenciálódásban betöltött szerepe

A TGF-β egy 25 kDa méretű polipeptid homodimer, mely a sejtproliferáció, differenciálódás, motilitás, apoptózis és ECM termelés szabályozásában egyaránt fontos szerepet játszik.¹⁰⁴ Három fő isoformája ismert (TGF-β1, TGF-β2 és TGF-β3), melyek közül a TGF-β1 domináns isoforma, de a TGF-β szuperfamilia tagjai közé tartozik továbbá a bone morphogenetic proteins (BMP) és a anti-Müller hormon (AMH) is.¹⁰⁵

A TGF-β prekurzor formájában keletkezik, mely a TGF-β homodimer mellett egy propeptid szakaszt is tartalmaz. Szintézist követően a TGF-β homodimer interakcióba lép egy peptiddel (LAP - Latency Associated Peptide) létrehozva a kis látens komplexet (SLC), amely a sejt belsejében marad a nagy látens komplex (LLC) létrejöttéig, melynek során egy másik fehérje, a látens TGF-β- kötő fehérje (LTBP) hozzá kapcsolódik, majd a komplex

transzlokálódik az extracelluláris térbe.¹⁰⁶ A TGF- β a látens komplexben inaktív formában van jelen, aktiválása általában különböző enzimek és mechanikai hatások által történik.^{106,107} A proteázok és metalloproteázok a LAP proteolízise révén képesek felszabadítani a TGF- β -t a látens komplexből. A savas környezet denaturálhatja a LAP fehérjét, így okozva TGF- β aktivációt. A reaktív oxigén gyökök (ROS) szintén befolyásolják a LAP szerkezetét. A thrombospondin-1 (TSP-1) és az α V integrinek közvetlenül aktiválják a latens TGF- β -t azáltal, hogy interakcióba lépnek a TGF- β komplexszel. A LAP komplexből felszabaduló TGF- β ligandok először a TGF- β RII-höz kötődnek be, mely TGF- β RI-hez (Alk5, activin-like kinase receptor 5) kapcsolódik, és azt foszforilálva létrehozza a funkcionális receptort, amely 2 TGF- β RI-t és 2 TGF- β RII-t tartalmazó heterotetramer. A TGF- β RIII, más néven bétaglikán koreceptorként funkcionál, mely képes nagy affinitással kötni a TGF- β izoformákat és prezentálni azokat a TGF- β RII számára.

A fibroblaszt sejtek miofibroblaszt irányba történő differenciálódásában a TGF- β SMAD-függő útvonala játszik kulcsszerepet.^{95,96} A TGF- β receptor aktiválását követően, a receptor által katalizált foszforilációs folyamat következik, melynek során az R-SMAD-ok (receptor által aktivált SMAD fehérjék), a SMAD2 és SMAD3 foszforilálódnak, majd az R-SMAD-ok oligomert képezzenek a SMAD4 (Co-SMAD), fehérjével. A SMAD-komplex a sejtmagba transzlokálódik, ahol a célgének promóter régiójában található specifikus DNS-szekvenciákhoz kötődve szabályozza a pro-fibrotikus gének, így a kollagén, a fibronectin és az α -SMA transzkripcióját. Az I-SMAD-ok, mint a SMAD7 képesek megakadályozni a R-SMAD-ok és az aktív receptor közötti kölcsönhatást, csökkenteni a receptorok mennyiségét a sejtfelszínen, illetve transzkripciós represszorként is működhetnek a sejtmagban¹⁰⁸ (4. ábra).



4. ábra. A TGF-β SMAD-függő jelátvittele

TGF-β: transzformáló növekedési faktor-β; LAP: latencia-asszociált peptid; TGF-β RI: transzformáló növekedési faktor-β receptor I; TGF-β RII: transzformáló növekedési faktor-β receptor II; R-SMAD: receptor által aktivált SMAD; CO-SMAD: kooperatív SMAD; I-SMAD: inhibitor SMAD

3.4.4. A hialuronsav szerepe az endocrin orbitopathia pathogenesisében

A HA szulfátcsoportot nem tartalmazó, ismétlődő diszacharid alegységekből álló lineáris glükózaminoglikán (GAG), az ECM egyik fő komponense.^{109,110} Hígroszkópos biopolimer, melynek túlermelődése, nagy vízmegkötő képessége miatt, jelentősen hozzájárul a szöveti ödéma kialakulásához, kedvezőtlenül befolyásolva a betegség lefolyását. Továbbá feltételezhető, hogy a HA felhalmozódása közvetett módon a fibroblasztok miofibroblasztá történő differenciálódását is serkentheti, hiszen a sejtek körüli ECM mechanikai tulajdonságainak változása a TGF- β látens komplexből való felszabadulását okozhatja.¹¹¹⁻¹¹³

A HA bioszintézisét három transzmembrán glikoziltranszferáz izoenzim, a hialuronsav szintáz 1, 2 és 3 (HAS1, HAS2 és HAS3) végzi, melyek UDP-glükuronsavból és UDP-N-acetil glükózaminból építik fel a HA láncot.¹⁰⁹ E két cukor-nukleotid (UDP-GlcUA és UDP-GlcNAc) mennyisége képes szabályozni a szintázok génexpresszióját. Míg a HAS1 széles mérettartományban hoz létre HA láncokat (2×10^5 - 2×10^6 Da), a HAS2 nagy polimereket ($> 2 \times 10^6$ Da), a HAS3 pedig rövidebb láncokat ($< 3 \times 10^5$) szintetizál.¹¹⁴ A HA láncok, szintézist követően, a szintázokon keresztül sejtfelszínhez horgonyozva vagy sejtfelszíni receptorhoz kötve a pericelluláris térben maradnak, amíg a hialuronidáz aktivitás és egyéb tényezők, például képződő reaktív oxigén gyökök (ROS) hatására fel nem szabadulnak a kötésből.¹¹⁵

A lebontást végző hialuronidázok hat alcsoportba sorolhatók. Emlősökben a lizoszómákban található HYAL1 és a plazmamembránhoz kapcsolódó HYAL2 felelős a HA degradációért. A HYAL2 a hosszú láncú HA-t bontja fel kisebb, 10-20 kDa-os oligoszacharidokra. Ezek a HA egységek a sejtfelszíni HA receptorokhoz kötődve endocitózissal bejutnak a sejtbe, ahol a HYAL1 tovább bontja azokat.¹¹⁶ A közelmúltban emellett két új, a HA lebontásában szerepet játszó fehérjét is azonosítottak, a sejt-migrációt indukáló fehérjét (cell migration-inducing and hyaluronan-binding protein, CEMIP) régebbi nevén KIAA1199, valamint a transzmembrán protein-2-t (TMEM2). A CEMIP klatrin-mediált endocitózis révén kiemelt szerepet játszik a HA depolimerizációjában dermális- és szinoviális fibroblasztokban, míg a TMEM2 a CEMIP gátlásán keresztül szabályozza a HA termelést¹¹⁷ (5. ábra).



5. ábra. A hialuronsav metabolizmus egyensúlya

HAS1: hialuronsav szintáz-1; HAS2 hialuronsav szintáz-2; HAS3: hialuronsav szintáz-3; TMEM2: transzmembrán protein-2; HYAL1: hialuronidáz-1; HYAL2: hialuronidáz-2; CEMIP: sejt-migrációt indukáló fehérje

A HA nem csupán szerkezeti elemként funkcionál, hanem az ECM egyéb molekuláival, továbbá autokrin módon ugyanazon a sejtfelszínen lévő HA receptorokkal, míg parakrin módon a szomszédos sejtek HA receptoraival interakcióba lépve a sejt-ECM és sejt-sejt közötti kölcsönhatásokban is szerepet játszik.¹¹⁸

A HA kötő sejtfelszíni receptorok közül a CD44 a legjelentősebb. A CD44 receptor a hialuronsavval interakcióba lépve számos élettani és patológiai folyamatban játszik szerepet, többek közt a pericelluláris mátrix retenciójában, a sejt-mátrix szignalizációban, a sejtek migrációjában, a sejt-sejt adhézió kialakításában, a receptor mediált internalizációban és a HA lebontásában. A CD44 mellett egyéb receptorok, mint például a HA-mediált motilitás receptor (RHAMM), nyirokrendszeri endothelialis hialuronsav receptor (LYEV-1), hialuronsav endocytosis receptor (HARE) és a „toll-like” receptor-4 (TLR-4) szintén képesek kölcsönhatást kialakítani a hialuronsavval. A HA és a HA-kötő fehérjék, az aggregátum és a vezikulák közötti kölcsönhatások a sejtek közötti kommunikációban és a szövetek mechanikai tulajdonságainak szabályozásában játszanak szerepet.^{110,119}

A vérlemezke-eredetű növekedési faktorok (PDGF) családját öt izoforma alkotja, amelyek a PDGF-A, -B, -C és -D láncokból álló homo- vagy heterodimerek. Az EOP kapcsán bizonyított, hogy a makrofágok, monociták és hízósejtek által termelt PDGF-AA, PDGF-AB és PDGF-BB serkenti az orbita fibroblasztok proliferációját, citokin- és extracelluláris mátrix

termelését^{120,121} Hatásukat a PDGF receptor- β -n (PDGFR- β), valamint az α/β heterodimer PDGF receptorokon keresztül fejtik ki.¹²² A három PDGF izoforma közül a PDGF-BB képes a leghatékonyabban aktiválni az orbita fibroblasztokat, serkentve azok proliferációját, HA és IL-6 termelését, míg a PDGF-AA a legkevésbé hatékony az irodalmi adatok szerint. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az orbita szövetek térfogatnövekedésében főként a PDGF-B láncot tartalmazó PDGF izoformák játszanak döntő szerepet.¹²⁰

4. Célkitűzések

Munkánk során tisztázni szeretnénk, hogy azok a tényezők, melyek jelen vannak az EOP lefolyása során az orbitában, és szerepük lehet a fibroblasztok HA anyagcseréjének alakításában, hogyan befolyásolják az orbita fibroblasztok HA termelését. Ezzel kapcsolatos adatot az irodalomban korábban nem találtunk.

Az EOP elsővonalbeli hatékony kezelésekként alkalmazott glükokortikoidok közvetlen kötőszöveti mátrix hatását feltételeztük, mely – a jól ismert immunmoduláns hatás mellett – fontos lehet az EOP pathogenesisének befolyásolásában. Ezért vizsgáltuk a TGF- β 1 által indukált miofibroblaszt differenciálódást, valamint az EOP kezelésében használt glükokortikoidok hatását az orbita eredetű fibroblasztok HA termelésére, a HA metabolizmus enzimeinek expressziójára és a fibroblaszt proliferációra. A glükokortikoidok hatását PDGF-BB kezelés mellett, és bőr eredetű fibroblasztokkal összehasonlítva is terveztük vizsgálni.

5. Módszerek

5.1. Primer fibroblaszt kultúrák létrehozása

Vizsgálataink során a Debreceni Egyetem Klinikai Központ Szemészeti Klinikáján és Sebészeti Klinikáján megjelenő betegek eltávolításra került szövetmintáit használtuk fel, miután a megfelelő tájékoztatást követően beleegyező nyilatkozatot írtak alá. Vizsgálatainkat a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága és az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (ID: 5913/2012/EKU (84/13)).

Az EOP-ban szenvedő betegek (n=7) dekompresziós műtéte során eltávolított orbita kötőszövetből és nem-EOP betegek (n=8) egyéb indikációval végzett - nem pajzsmirigy betegséghez kapcsolódó – szemműtéből származó kötőszövetmintákból primer orbita fibroblaszt kultúrákat hoztunk létre. A bőrfibroblaszt kultúrákat (n=4) hasi sérvműtét során eltávolított bőrszövetekből hoztuk létre. Az egyes vizsgálatokban nem használtunk fel minden létrehozott fibroblaszt kultúrát. A betegek demográfiai adatait az 3. táblázatban foglaltuk össze.

Az EOP-ban szenvedő betegek esetén a betegség folyamán minden beteg kapott tireosztatisz gyógszert, és legalább egy alkalommal 12 hetes intravénás glükokortikoid kezelésben részesült. A műtéig minden esetben legalább egy év telt el a kortikoszteroid kezelést és az irradiációt követően. Az EOP diagnózisának felállításától eltelt idő mediánja 4 év volt (minimum: 1, maximum: 9 év). Az EOP betegek a műtét előtti utolsó két hónapban már csak β -blokkolót, diuretikumot, illetve tiroxin pótlást kaptak. A műtét időpontjában a betegek alacsony normál vagy szupprimált TSH-val, valamint a referenciaértékeken belüli, magas normál pajzsmirigyhormonszintekkel rendelkeztek. A dekompresziós műtét minden esetben az EOP inaktív fázisában zajlott (CAS \leq 3 a 10 tételes skálán).

3. táblázat A felhasznált primer fibroblaszt kultúrák

Eredet	A donor		Közlemény
	neme	életkora	
EOP orbita kötőszövet	nő	37	2
		42	2
		44	1,2
		57	1
		63	1
	férfi	49	2
		59	1
kontroll orbita kötőszövet	nő	66	1
		82	1
	férfi	38	1
		46	2
		52	1
		66	2
		69	1,2
71	2		
hasi bőrszövet	nő	63	2
	férfi	20	2
		52	2
		78	2

1: Papp et al.¹²³

2: Galgoczi et al.¹²⁴

Az orbita- és bőrfibroblaszt kultúrákat Bahn és munkatársai által leírt protokoll alapján hoztuk létre.¹²⁵ A sterilen eltávolított szövetmintákat 2x2 mm-es darabokra vágtuk, majd négy alkalommal antibiotikum (penicillin/streptomycin) tartalmú foszfát pufferben (PBS) mostuk, végül az apró szövetdarabokat tenyésztőedénybe helyeztük és 20% (V/V) hőinaktivált magzati borjúsérummal (FBS-sel), stabil glutaminnal és penicillin-streptomycin oldattal kiegészített M199 tápfolyadékban (Biosera, Nuaille, Franciaország) tartottuk fenn őket, 37°C-on, 5 % CO₂ mellett. A tápfolyadékot 3-4 naponta cseréltük. Kettő-négy hét elteltével (a tenyészet proliferációs rátájának függvényében) a szövetdarabokat eltávolítottuk, és a

továbbiakban 10 % FBS, penicillin/streptomycin és stabil-glutamin tartalmú M199 tápfolyadékot használtunk a sejtek fenntartásához.

A konfluencia elérését követően a fibroblasztokat TrypLE Express reagenssel (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kezelve T75-ös flaskába passzáltuk át. Mivel vizsgálatainkat primer sejt kultúrákon végeztük, alacsony, 2-6 közötti passzázs számú tenyészeteket használtunk. A sejtek felszaporítását követően, azokat ismételtén TrypLE Express-el kezeltük, majd centrifugálás után (1000 g) a pelletet fagyasztó keverékben szuszpendáltuk és a kísérletek elvégzéséig folyékony nitrogénben tároltuk.

5.2. Kezelések

A kísérletekhez a fibroblasztokat $1,56 \times 10^4$ sejt/cm² sűrűséggel 24- vagy 96-lyukú sejttenyésztő lemezre szélesztettük. A miofibroblaszt irányú differenciálódás HA anyagcserére gyakorolt hatásainak vizsgálata során a kezelésekhez 5 ng/ml TGF- β 1 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) tartalmú 10% (V/V) FBS-sel és stabil glutaminnal kiegészített DMEM High Glucose tápfolyadékot használtunk, és a sejteket további 24 illetve 72 órán keresztül inkubáltuk. A glükokortikoidok hatásának vizsgálata érdekében kezelést végeztünk hidrokortizon, prednizolon, metilprednizolon, illetve dexametazon (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) adásával (0,0001–1,0 μ M tartományban a koncentrációfüggés vizsgálata céljából, majd a továbbiakban 1 μ M koncentrációban, 24 órán át), 10 ng/ml PDGF-BB (R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) mellett, valamint annak hiányában 10% (V/V) FBS-sel és stabil glutaminnal kiegészített M199 tápfolyadékban kontroll és EOP orbita fibroblasztokon és bőrfibroblaszt (BF) kultúrákon. Minden kísérletet legalább három alkalommal, legalább három párhuzamos mintán végeztünk el.

5.3. Sejtproliferáció vizsgálat

A sejtek proliferációs rátáját ELISA BrdU (kolorimetriás) kit segítségével mértük. A vizsgálatot a gyártó (Roche, F. Hoffmann-La Roche Ltd, Bazel, Svájc) utasításai szerint végeztük, 96-lyukú plate-ben. A sejt kultúrákhoz a kezelések utolsó 2 órájában 5-bróm-2'-dezoxiuridin (BrdU) oldatot adtunk 37°C-on, 5 % CO₂ mellett. A tápfolyadék eltávolítása után a sejteket 30 percig fixáltuk. A fixáló oldat eltávolítását követően, peroxidáz-konjugált anti-BrdU antitestet adtunk a sejtekhez 90 percre, szobahőmérsékleten. Végül hozzá adtuk a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin szubsztrátot, majd tíz perc inkubálás után 2 N H₂SO₄ oldattal

leállítottuk a reakciót. Ezt követően Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) készülékkel mértük az abszorbanciát 450 nm-en (referencia hullámhossz: 620 nm). A mért optikai denzitás (OD) arányos a beépült BrdU mennyiségével, így a sejtproliferáció mértékével is.

5.4. Metabolikus aktivitás vizsgálat

Kezelést követően a 96 lyukú plate-be szélesztett sejtekhez 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium bromid (MTT) oldatot (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) adtunk (0,5 mg/mL végkoncentrációban) és inkubáltuk 4 órán át 37°C-on. A sejtek metabolikus aktivitásukkal arányos mértékben képesek az MTT reagenst, mely egy sárga színű tetrazolium só, formazán származékká alakítani. Ezt követően a felülúszókat óvatosan eltávolítottuk, és a sejtekhez 100 µL/well dimetil-szulfoxidot (DMSO) (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) adtunk, majd spektrofotometriásan elemeztük. A festék abszorbanciáját 595 nm-en mértük, háttérkorrekcióval 660 nm-en, Synergy H1 Microplate Reader (Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA, USA) segítségével. Az OD a sejtek metabolikus aktivitását tükrözi, és közvetetten arányos az életképes sejtek számával.

5.5. HA koncentráció meghatározás

A 96-lyukú plateken végzett kezeléseket követően a felülúszókat összegyűjtöttük és DuoSet Hyaluronan Kit (R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) segítségével, a gyártó által csatolt útmutató alapján meghatároztuk a tápfolyadékba termelt HA mennyiségét. A sejtekhez kötött pericelluláris HA mennyiségének meghatározásához a sejteket kétszer PBS-el mostuk, majd 0,05 % (w/v) trypsin–EDTA oldattal kezeltük 37°C-on 20 percig. Ezután a reakciót FBS (10% V/V végkoncentráció) hozzáadásával állítottuk le. A sejtuszpenziót centrifugáltuk (1000 g, 5 perc), és a pericelluláris HA méréshez az így nyert felülúszót használtuk.

Az abszorbanciát mindkét esetben 450 nm-en (referencia hullámhossz: 620 nm) Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Detektorral mértük. A HA mennyiségét ng/ml tápfolyadék vagy ng/well értékben fejeztük ki.

5.6. Glükózaminoglikán (GAG) izolálás

A felülúszókat összegyűjtöttük és -20°C-on tároltuk a GAG izolálásáig. A fehérje emésztéséhez 1 ml felülúszóhoz 110 µl 1 mg/mL Proteinase K-t (Merck KGaA, Darmstadt,

Németország) adtunk 20 mM Tris pufferben (Merck KGaA, Darmstadt, Németország), amely 1% SDS-t tartalmazott, majd 60°C-on 4 órán át inkubáltuk. A GAG kicsapásához 4 ml előhűtött (-20°C) 96%-os etanolt (VWR International, Avantor, Radnor, PA, USA) használtunk, és -20°C-on egy éjszakán át inkubáltuk. Másnap a mintákat 14000 g-n 10 percig centrifugáltuk. Az üledéket előhűtött 75%-os etanollal mostuk, majd ismét 14000 g-n 10 percig centrifugáltuk. A levegőn szárított pelleteket Tris/borát/EDTA (TBE) pufferben (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) gyűjtöttük össze, majd 100°C-on 3 percig inkubáltuk, végül hűtőszekrényben tároltuk egy éjszakán át.

5.7. Hialuronsav gél-elektroforézis

A HA molekulásúly szerinti elválasztásához Cowman és munkacsoportja által beállított elektroforézis módszert alkalmaztuk.^{126,127} A vizsgálat során standardként különböző ismert molekulatömegű HA (R&D Systems, Bio-Techne, Minneapolis, MN, USA) vizes oldatait használtunk. Az izolált GAG mintákat és standardokat brómfenolkék tartalmú pufferrel (0,02% brómfenolkék 2 M szacharózzal TBE-ben (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)) kevertük össze, és 1,5%-os agaróz gélben (Bioline, Meridian Bioscience Inc. Cincinnati, OH, USA) futtattuk TBE pufferben 0,5 órán át állandó 20 V-on, majd 3,5 órán át állandó 40 V-on. Közvetlenül a futtatás után a gélt 1 órán át 30%-os etanolba helyeztük. A gélt egy éjszakán át Stains All (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) festékben festettük. A gélt ezt követően 30 percig 10%-os etanolban inkubáltuk sötétben, majd a színtelenítéshez desztillált vízbe helyeztük. A lila háttér eltávolításához a gélt a munkaasztalon hagytuk. Ezután a gélt beszkeneltük, és a kapott képeket az Image Studio Digit Ver. 5.2 (LI-COR Biotechnology – GmbH, Bad Homburg, Németország) programmal elemeztük.

5.8. Polimeráz láncreakció (PCR)

A 24, illetve 72 órás kezeléseket követően a 24 lyukú plate-en szélesztett sejtekről a felülúszót eltávolítottuk, és a sejteket TRI reagensben (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) lizáltuk, majd az RNS izolálásig a mintákat -20°C-on tároltuk. A kiolvasztott mintákat homogenizáltuk, és 100 µl kloroformot (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) adtunk hozzá. A kloroformmal extraháltuk a szuszpenzióban lévő teljes RNS-t. Centrifugáltuk 15 percig 16 000 g-n. A felső vizes fázist új DNáz és RNáz mentes csőbe pipettáztuk az átmeneti fázis érintése nélkül. 375 µl szobahőmérsékletű 100 %-os izopropanolt (VWR International, Avantor, Radnor, PA, USA) adtunk hozzá a vizes fázisban

található RNS precipitációjához, majd ismét centrifugáltuk 16 000 g-n 10 percig. Ezután a felülészó eltávolítása, majd a pellet mosása következett 1 ml hideg 75 %-os etanollal. Befejező lépésként centrifugálást végeztünk 12 000 g-n, 10 percen keresztül. A felülészó eltávolítása után az izolált RNS-t nukleáz-mentes vízben (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oldottuk, és koncentrációját Synergy H1 Microplate Reader segítségével mértük, majd -20°C -on tároltuk az reverz transzkripció kivitelezéséig. A tisztított RNS mintákat High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) felhasználásával cDNS-sé írtuk át a gyártó leírásában foglaltak szerint.

Végül TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használatával detektáltuk a 4. táblázatban felsorolt gének mRNS expresszióját. Az RT-PCR reakciót a CFX Opus 96 Real-time PCR rendszeren (Bio-Rad Hercules, CA, USA) végeztük. A génexpressziós szintek kvantifikálásához a ΔCT módszert használtuk, a célgén expresszióját a glicerin-aldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) háztartási gén mRNS szintjéhez viszonyítva normalizáltuk.

4. Táblázat

Fehérje	Gén	Taqman Assay ID
Alfa-simaizom aktin	<i>ACTA2</i>	Hs00426835_g1
Sejt-migrációt indukáló fehérje	<i>CEMIP</i>	Hs01552114_m1
Fibronectin	<i>FN</i>	Hs01549976_m1
Glicerin-aldehid 3-foszfát dehidrogenáz	<i>GAPDH</i>	Hs02786624_g1 Hs02758991_g1
Hiauronsav szintáz 1	<i>HAS1</i>	Hs04398914_m1 Hs00987418_m1
Hiauronsav szintáz 2	<i>HAS2</i>	Hs00193435_m1
Hiauronsav szintáz 3	<i>HAS3</i>	Hs01030577_m1 Hs00193436_m1
Hialuronidáz 1	<i>HYAL1</i>	Hs00201046_m1
Hialuronidáz 2	<i>HYAL2</i>	Hs01117343_g1
Transzmembrán protein-2	<i>TMEM2</i>	Hs00910521_m1
Egyes típusú kollagén alfa lánc	<i>COL1A1</i>	Hs00164004_m1

5.9. Statisztikai elemzés

A vizsgálatok során nyert adatok statisztikai elemzését a Graphpad Prism 10 (GraphPad, Boston, MA, USA) vagy a STATISTICA 14.0 szoftver (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA) segítségével elemeztük. A kapott eredményeken ismételt méréses varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk Tukey vagy Dunnett post hoc teszttel, ahol az alkalmazott kezelés mint belső tényező, a fibroblasztok származási helye (kontroll, EOP és bőr) mint köztes tényező szerepelt.

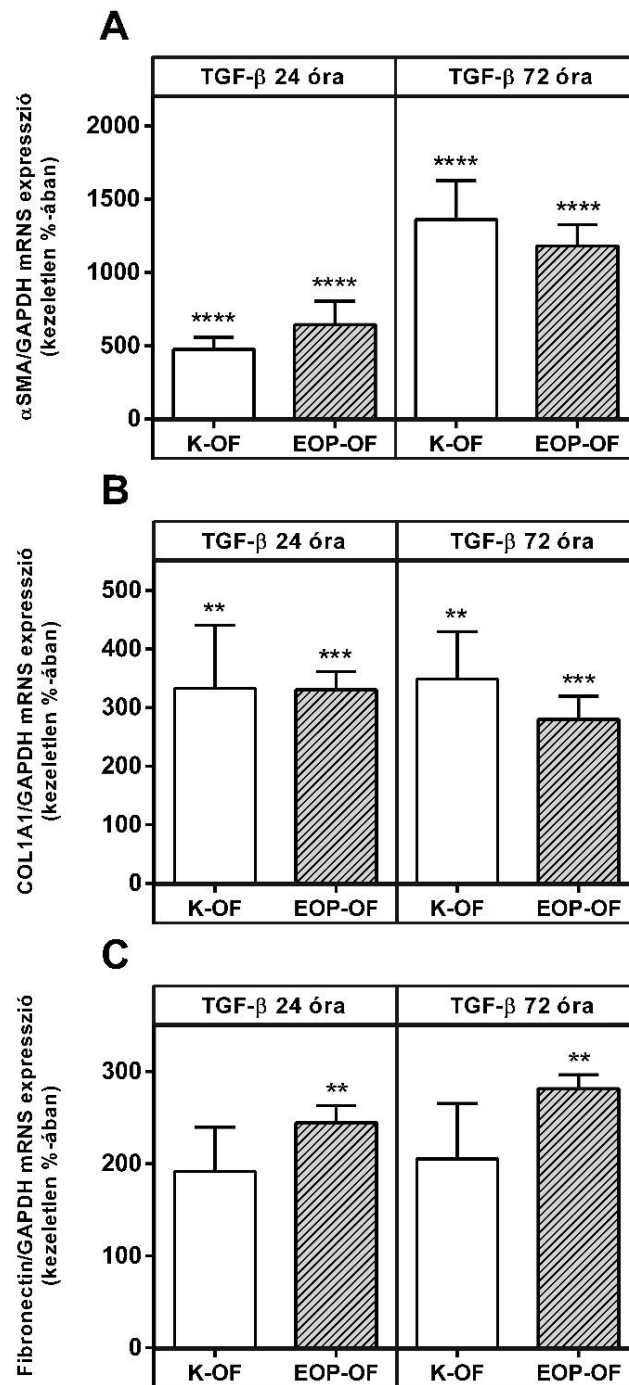
Az adatokat minden esetben átlag \pm standard hiba (SEM) formájában ábrázoltuk. A statisztikai próbák eredményét $P < 0,05$ esetben tekintettük szignifikánsnak

6. Eredmények

6.1. A miofibroblaszt differenciálódás hialuronsav anyagcserére gyakorolt hatása

Az alfa-simaizom aktin (α SMA), egyes típusú kollagén alfa lánca (COL1A1), és fibronectin mRNS expressziójának emelkedése igazolta, hogy az orbita fibroblaszt sejtek miofibroblaszt irányú transzdifferenciálódáson mentek keresztül TGF- β stimuláció hatására (6. ábra). Az α SMA mRNS expressziója kezeletlen OF kultúrák esetén a vizsgálat ideje alatt nem változott, míg a TGF- β kezelés hatására fokozódott mind 24 és 72 óra elteltével (6.A ábra). A kezeletlen (azonos ideig fenntartott, TGF- β kezelésben nem részesült) EOP-OF kultúrák COL1A1 expressziója az idő előrehaladtával 2,78-szorosára emelkedett ($p < 0,01$), de TGF- β stimulációt követően tovább nőtt mindkét vizsgált időpontban. A K-OF kultúrák COL1A1 expressziója az idővel nem, de TGF- β kezelés hatására szintén emelkedett (6.B ábra). A fibronectin expressziója bár a K-OF esetén is emelkedő tendenciát mutatott, csak az EOP-OF kultúrákban fokozódott TGF- β hatására mindkét időpontban. Szintje kezelés hiányában az idő előrehaladtával nem változott (6.C ábra).

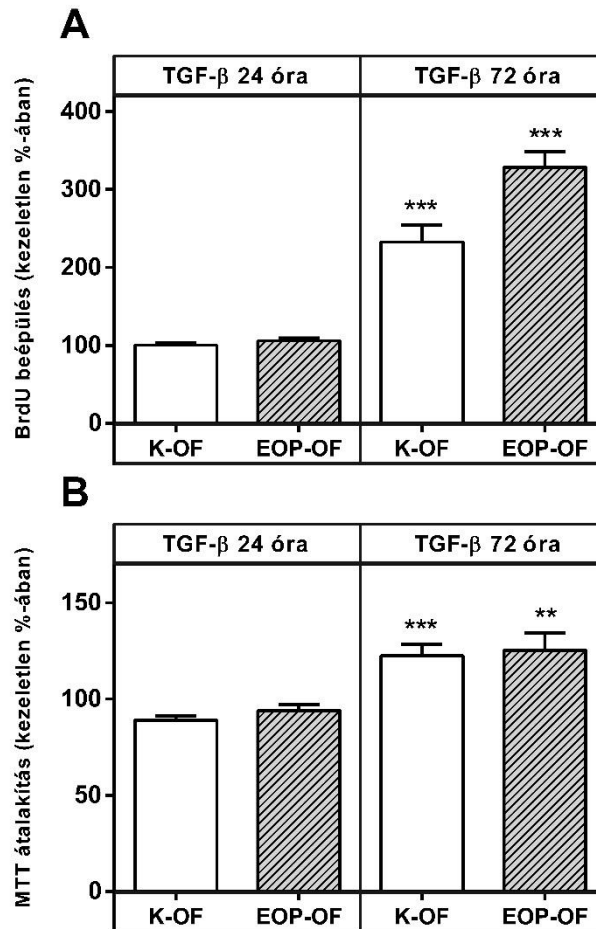
A TGF- β kezelés nem befolyásolta a sejtek proliferációját az első 24 órában. Azonban 72 óra elteltével, annak ellenére, hogy az EOP kultúrák proliferációja 87,1%-al ($p < 0,0001$), a K-OF kultúrák proliferációja pedig 79,7%-al ($p < 0,0001$) csökkent, a TGF- β -val kezelt kultúrák proliferációs rátája magasabb szinten maradt a kezeletlen sejtekéhez viszonyítva (7.A ábra). Az orbita fibroblasztok metabolikus aktivitása nem változott a TGF- β kezelés első 24 órájában, azonban 72 óra elteltével mérsékelt növekedés volt megfigyelhető (7.B ábra), amely feltehetően összefüggésben áll a a TGF- β -val kezelt kultúrák proliferációs rátájával.



6. ábra. A TGF- β által indukált miofibroblaszt irányú transzdifferentiálódás igazolása

(K-OF, n=4; EOP-OF, n=4)

A - α simaizom aktin (α SMA); B - I-es típusú kollagén alfa 1 lánc (COL1A1); C - fibronectin. Az adatokat az $\bar{x} \pm$ a standard hiba (SEM) formában ábrázoltuk. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; az azonos ideig fenntartott kezeletlen tenyészetek értékeihez viszonyítva



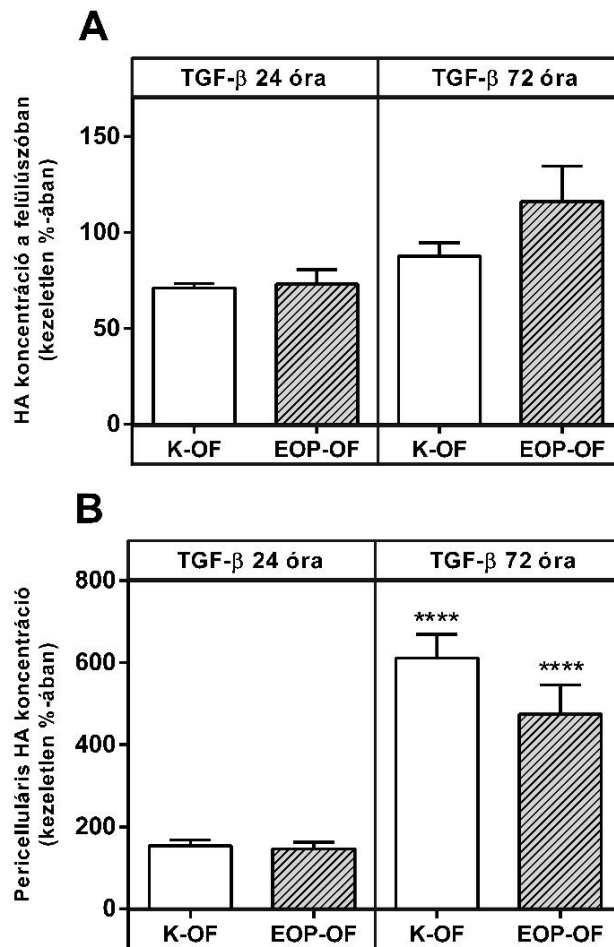
7. ábra. TGF-β kezelés hatása az orbita fibroblasztok (K-OF, n=5; EOP-OF, n=4) proliferációs rátájára és metabolikus aktivitására 24 és 72 órát követően.

A – Sejtproliferáció vizsgálat; B – Metabolikus aktivitás vizsgálat.

Az eredményeket átlag ± standard hiba (SEM) formában ábrázoltuk.

p < 0,01; *p < 0,001; az azonos ideig fenntartott kezeletlen tenyészetek értékeihez viszonyítva

A miofibroblasztokat vizsgálva megfigyeltük, hogy míg a felülúszóba termelt HA mennyisége nem változott a kezeletlen sejtekhez viszonyítva (8.A ábra), a pericelluláris HA mennyisége K- OF vonalak esetén 6,1-szeresére, az EOP OF sejtek 4,7-szeresére emelkedett 72 órás TGF-β kezelést követően (8.B ábra).



8. ábra. 24 és 72 órás TGF- β kezelés hatása az orbita fibroblasztok (K-OF, n=4; EOP-OF, n=4) hialuronsav termelésére

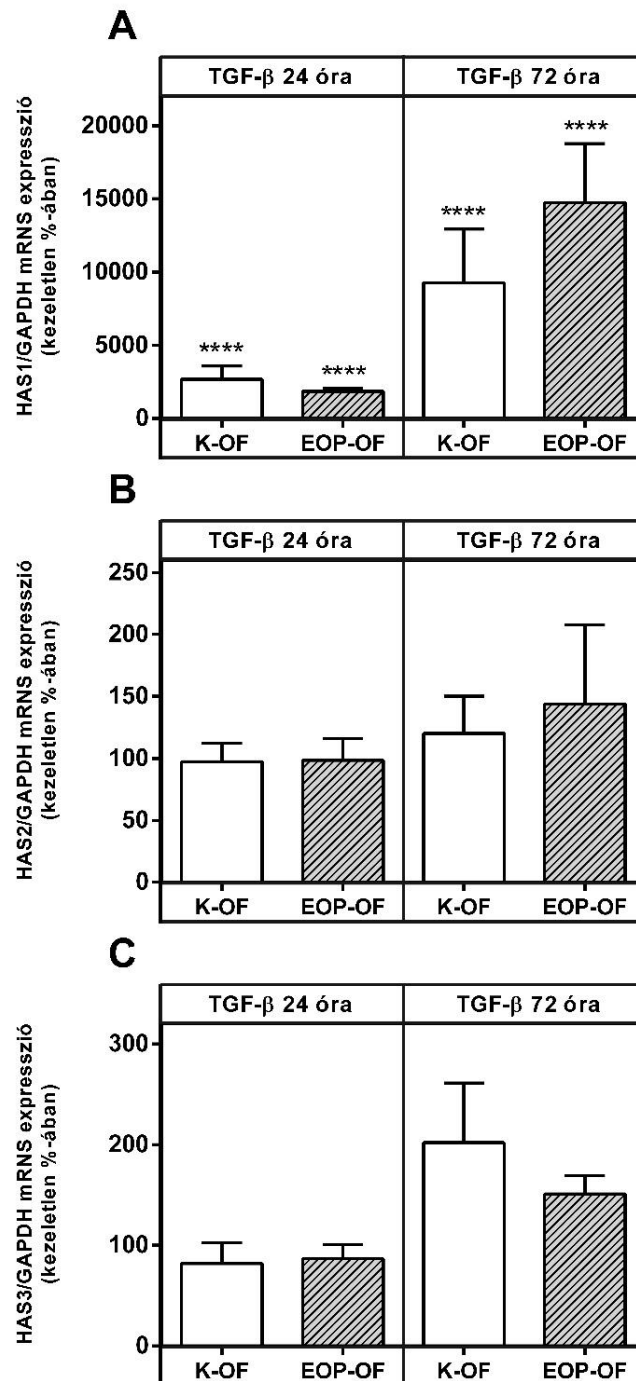
A – a felülúszóba termelt HA koncentrációja; B – a sejtekhez kötött pericelluláris HA mennyisége. Az eredményeket átlag \pm standard hiba (SEM) formában ábrázoltuk.

****p < 0,0001; az azonos ideig fenntartott kezeletlen tenyészetek értékeihez viszonyítva

A TGF- β 1 a sejtek eredetétől függetlenül a HAS1 expresszióra fokozó hatást gyakorolt mindkét vizsgált időpontban (8.A ábra), míg a HAS2 és HAS3 mRNS szintjét nem befolyásolta (9.B és 9.C ábra).

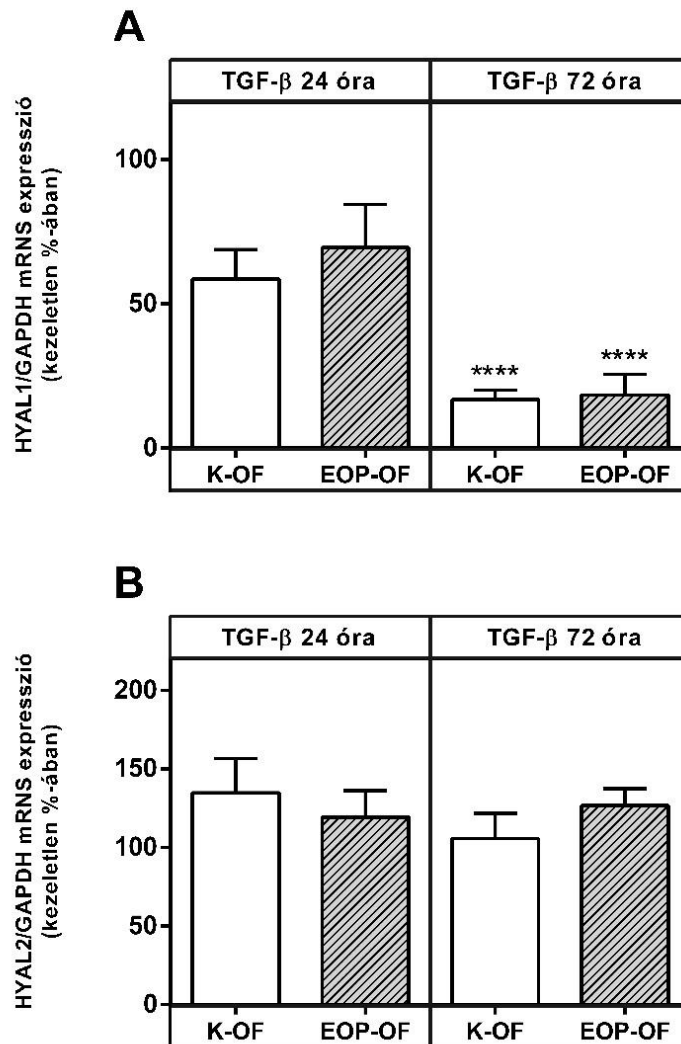
A HYAL1 expressziója az idő előrehaladtával emelkedett (K- OF: 2,93-szoros emelkedés, p=0,0005, EOP- OF: 3,17-szeres emelkedés, p=0,014), azonban ez a növekedés teljes mértékben megszűnt a TGF- β indukált miofibroblaszt irányú transzdzifferenciálódás következtében (10.A ábra). A TGF- β kezelés nem befolyásolta a sejtek HYAL2 mRNS expresszióját (10.B ábra).

A hialuronsav katabolizmust a CEMIP gátlásán keresztül szabályozó TMEM2 expressziója 72 órás TGF- β 1 kezelés hatására emelkedett (11.A ábra), míg a CEMIP expressziója csökkent (11.B ábra).



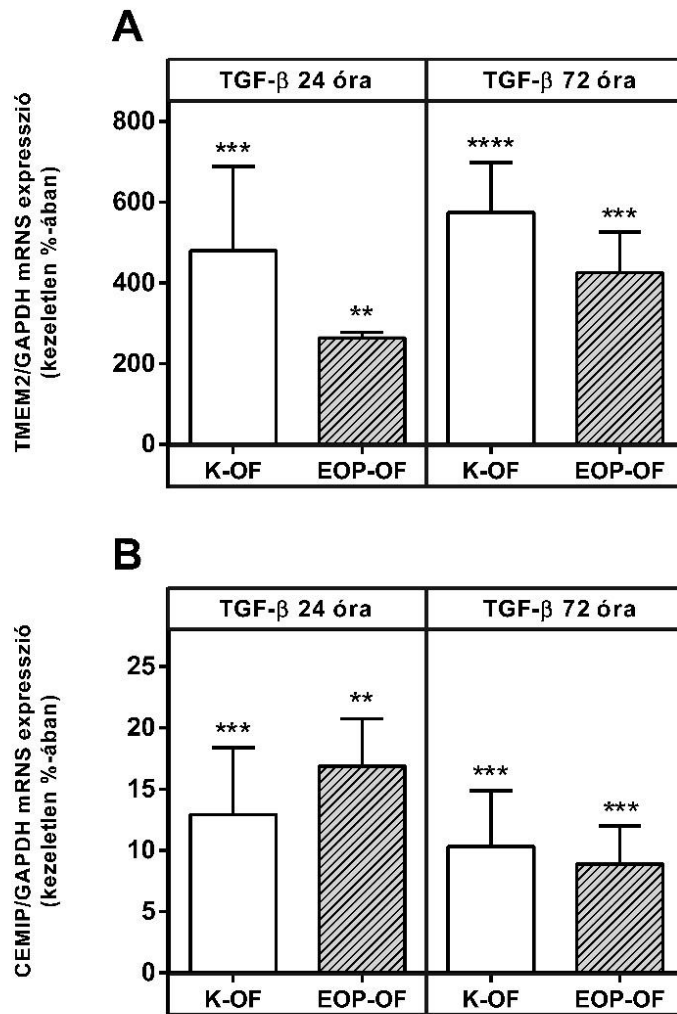
9.ábra. A hialuronsav szintázok mRNA expressziója 24 és 72 órás TGF- β kezelést követően

(K-OF, n=4; EOP-OF, n=4). A - HAS1, B - HAS2, C - HAS3. Az eredményeket átlag ± standard hiba (SEM) formában ábrázoltuk. ****p < 0,0001; az azonos ideig fenntartott kezeletlen tenyészetek értékeihez viszonyítva



10. ábra. A 24 és 72 órás TGF-β kezelés hatása a hialuronidázok mRNS expressziójára (K-OF, n=4; EOP-OF, n=4)

A - HYAL1, B - HYAL2. Az eredményeket átlag ± standard hiba (SEM) formában ábrázoltuk. ****p < 0,0001; az azonos ideig fenntartott kezeletlen tenyészetek értékeihez viszonyítva

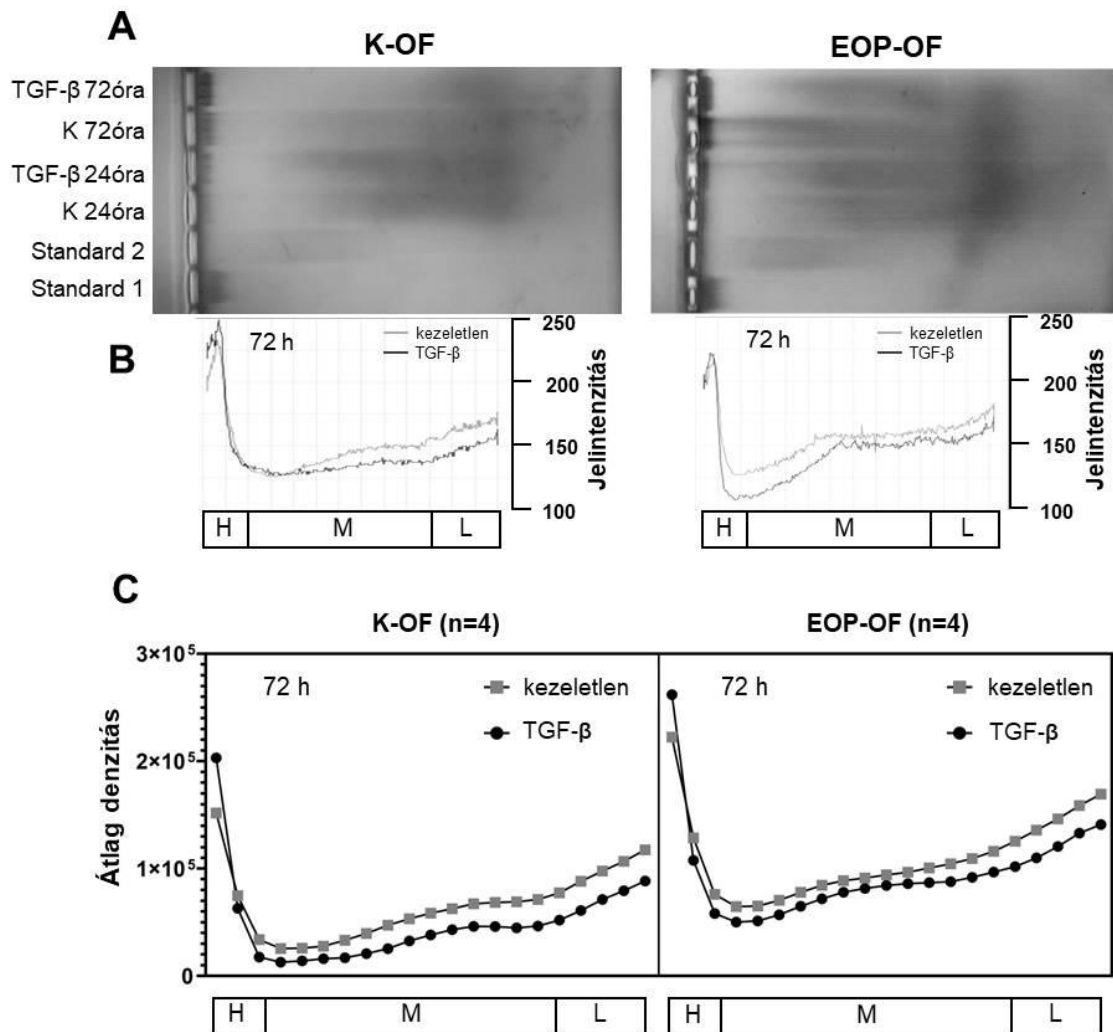


11. ábra. A transzmembrán protein 2 (TMEM2) és a sejtmigrációt indukáló fehérje (CEMIP) mRNS expressziójának változása TGF-β kezelést követően (K-O, n=4; EOP-O, n=4)

A – TMEM2, B – CEMIP. Az eredményeket átlag ± standard hiba (SEM) formában ábráztuk.

p < 0,01; *p < 0,001; ****p < 0,0001; az azonos ideig fenntartott kezeletlen tenyészetek értékeihez viszonyítva

A felülúszóban megjelenő HA frakciók molekulásúly szerinti eloszlását gélelektroforézis segítségével vizsgáltuk. Megfigyeltük, hogy a nagy molekulatömegű HA (HMW-HA) aránya a TGF-β által indukált transzdifferentiálódás következtében fokozódott (12. ábra).



12. Ábra

A hialuronsav molekulaméret szerinti eloszlásának elemzése gél-elektroforézis módszerrel

A – Reprezentatív gél-elektroforézis egy EOP-OF és egy K-OF tenyészet kondicionált médiumából; B – Az A panelen bemutatott géleken szereplő 72 órás minták denzitometriás profiljai; C – Összegzett denzitometriás eredmények a K-OF (n=4) és EOP-OF (n=4) tenyészetek AUC értékei alapján. K-OF: nem EOP betegek orbita fibroblasztjainak kondicionált médiuma, EOP-OF: EOP betegek orbita fibroblasztjainak kondicionált médiuma, H: nagy molekulatömegű (HMW) tartomány, M: közepes molekulatömegű (MMW) tartomány, L: alacsony és ultra alacsony molekulatömegű (LMW és ULMW) tartomány. Standard1: HMW-HA és LMW-HA keveréke, Standard2: MMW-HA és ULMW-HA keveréke.

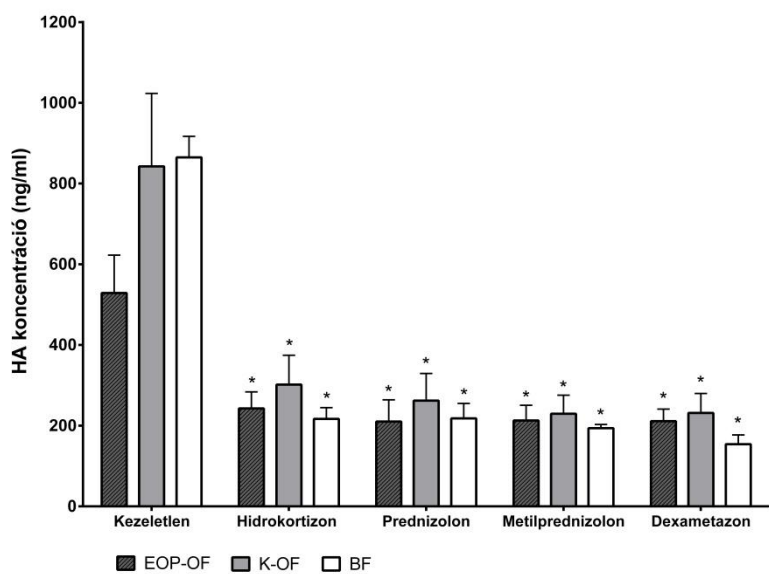
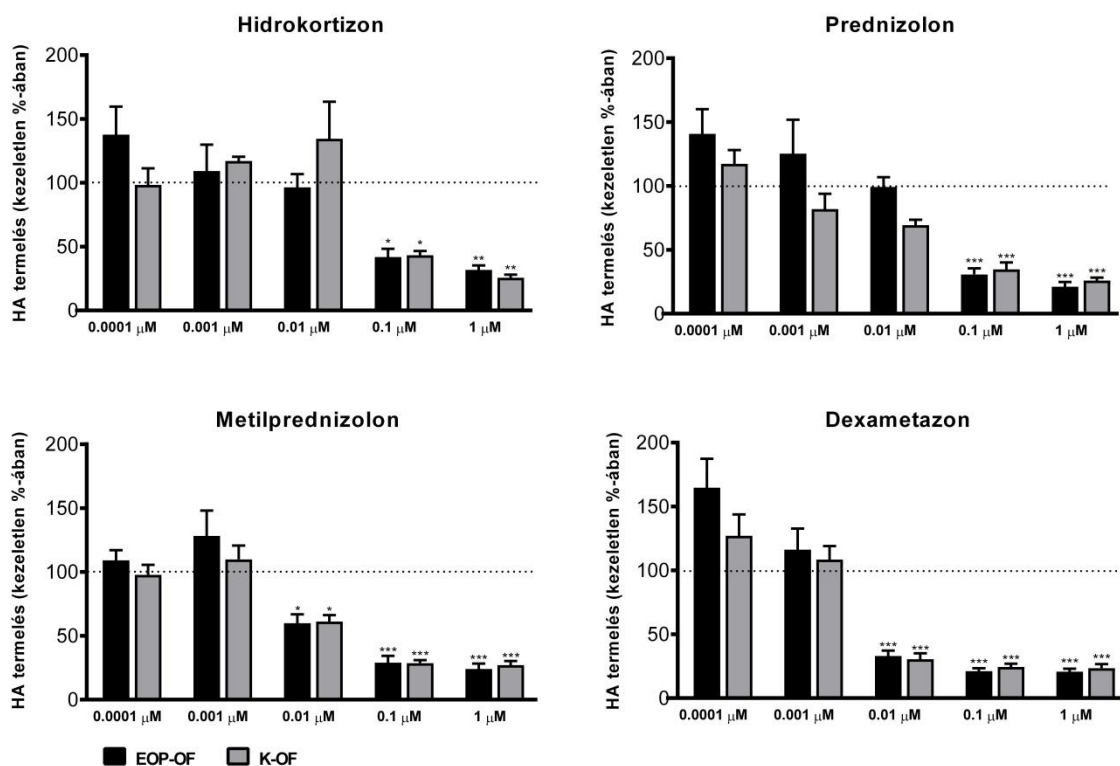
6.2. A glükokortikoidok hatása a sejtproliferációra és a hialuronsav-metabolizmusra

Céljaink közé tartozott annak vizsgálata is, hogy az EOP kezelésében használt glükokortikoidok, hogyan befolyásolják a különböző eredetű fibroblasztok (K-OF, n=4; EOP-OF, n=4; BF, n=4) proliferációs rátáját, HA termelését, valamint a HA-szintázok és hialuronidázok mRNS-expresszióját önállóan alkalmazva, illetve PDGF-BB stimulációt követően.

Vizsgálatot végeztünk annak érdekében, hogy azonosíthassuk a HA termelést maximálisan gátló legkisebb hatékony glükokortikoid-koncentrációkat 0,0001–1,0 μM tartományban (13.A ábra). Az K-OF és EOP-OF kultúrák alap HA termelése nem különbözött egymástól ($p = 0,168$). A metilprednizolon és a dexametazon már 0,01 μM koncentrációban is jelentősen csökkentette a HA termelést, míg a prednizolon és a hidrokortizon gátló hatása csak 0,1 μM koncentrációnál érvényesült. Mivel 1,0 μM volt az a koncentráció, amelynél már minden vizsgált glükokortikoid maximális gátló hatást fejtett ki a HA termelésre, a további kísérleteink során ezt a koncentrációt alkalmaztuk.

Az orbita fibroblasztok (K-OF és EOP-OF) és a bőrfibroblasztok (BF) alap HA szintje nem különbözött ($p = 0,974$). Míg az alkalmazott glükokortikoid kezelések mindegyike jelentősen csökkentette a felülúszóban mért HA mennyiségét ($p < 0,0001$) eredettől függetlenül (13.B ábra).

A



13. ábra. Glükokortikoid kezelések hialuronsav termelésre gyakorolt hatása

A- Glükokortikoidok dóziszfüggő hatása 0,0001–1,0 μM koncentrációs tartományban; B- Glükokortikoid kezelések (1 μM) hatása a felülészóban mért HA mennyiségére. K-OF: nem EOP betegekből származó orbita fibroblasztok, EOP-OF: EOP-ban szenvedő páciensektől származó orbita fibroblasztok, BF: bőr eredetű fibroblasztok.

A 100%-ot jelölő szaggatott vonal a kezeletlen tenyészetek HA koncentrációját jelöli. Az adatokat $\text{átlag} \pm \text{SEM}$ formában ábrázoltuk. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$; az azonos ideig fenntartott kezeletlen tenyészetek értékeihez viszonyítva

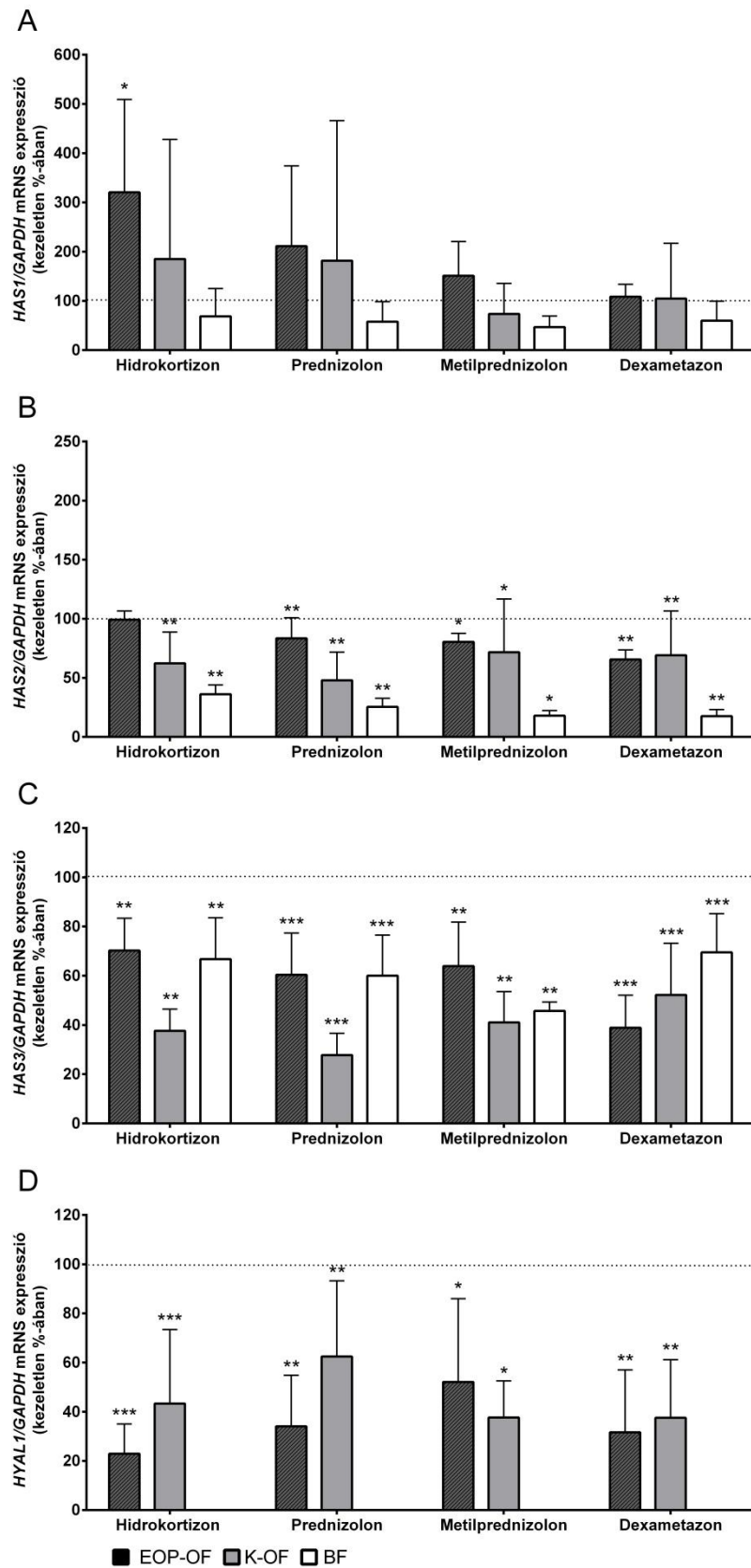
A fibroblasztok HAS1 expresszióját a sejtek eredete nem befolyásolta. A vizsgált glükokortikoidok közül a hidrokortizon ($1 \mu\text{M}$) emelte az EOP-OF HAS1 expresszióját ($p = 0,026$), míg a prednizolon, metilprednizolon és dexametazon kezelések egyik esetben sem befolyásolták azt (14.A ábra).

A HAS2 alap expressziója bőrfibroblasztokban magasabb volt, mint az orbita eredetű fibroblasztokban ($p = 0,005$). Az alkalmazott kezelések csökkentették a HAS2 mRNS szintjét minden vizsgált fibroblaszt kultúra esetén, kivéve a hidrokortizont, mely az EOP orbita fibroblasztok esetében nem befolyásolta azt ($p = 0,134$) (14.B ábra).

A glükokortikoid kezelések mindegyike hatékonyan csökkentette a HAS3 expressziót (HC: $p < 0,0005$, P: $p < 0,0001$, MP: $p < 0,0005$, DEX: $p < 0,0001$). A bőr és az orbita eredetű fibroblasztok HAS3 expressziója között nem volt szignifikáns eltérés ($p = 0,473$) (14.C ábra).

A BF kultúrák HYAL1 mRNS expressziója túl alacsonynak bizonyult ahhoz, hogy pontosan meghatározhatjuk annak alap- és kezelést követő szintjeit, így azokat nem tüntettük fel az ábrán. Orbita fibroblasztok esetén az EOP és K-OF sejtek alap HYAL1 expressziójában nem mutatkozott különbség ($p = 0,956$). A vizsgált glükokortikoidok mindegyike csökkentő hatást gyakorolt a HYAL1 expressziós szintekre az orbita fibroblasztok esetén (HC $p < 0,0007$, P $p < 0,0062$, MP $p < 0,05$, DEX $p < 0,002$) (14.D ábra).

A K-OF, EOP-OF és BF kultúrák alap HYAL2 expressziója között nem volt eltérés. A különböző eredetű fibroblasztok HYAL2 mRNS szintjét egyik vizsgált glükokortikoid sem befolyásolta.

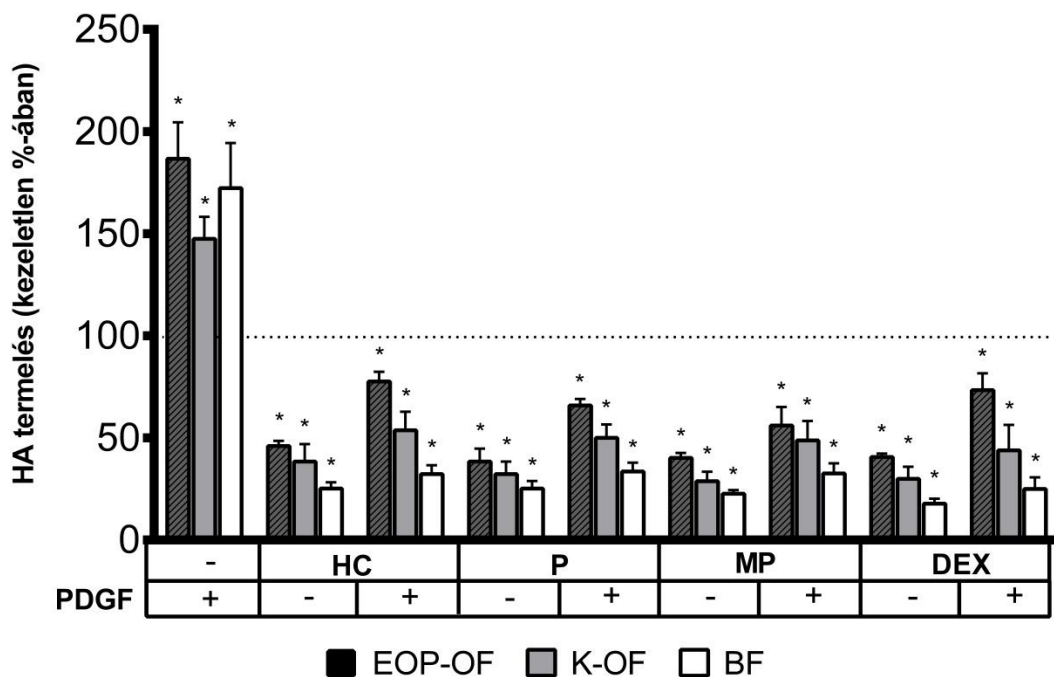


14. ábra. Glükokortikoidok hatása a vizsgált fibroblaszt sejtek HAS1 (A), HAS2 (B), HAS3 (C), és HYAL1 (D) mRNA expressziójára

A 100%-ot jelölő szaggatott vonal az kezeletlen vonalak mRNS expresszióját jelöli. K-OF: nem EOP betegekből származó orbita fibroblasztok, EOP-OF: az EOP-ban szenvedő páciensektől származó orbita fibroblasztok, DF: bőr eredetű fibroblasztok.

Az adatokat átlag ± SEM formában ábrázoltuk. * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$; az azonos ideig fenntartott kezeletlen tényezetek értékeihez viszonyítva

PDGF-BB kezelés hatására minden sejtkultúra HA termelése fokozódott ($p < 0,0001$), míg minden glükokortikoid kezelés képes volt a PDGF-BB stimuláló hatása mellett is a sejtek alap HA termelése alá csökkenteni a HA koncentrációt a felülúszóban ($p < 0,0001$). A megfigyelt hatás függött a sejtek eredetétől, a bőrfibroblasztok esetében volt a legintenzívebb (15. ábra).



15. ábra Glükokortikoid kezelések (1 μM) hatása a vizsgált fibroblaszt sejtek felülúszóban mért HA mennyiségére PDGF-BB (10 ng/ml) stimuláció jelenlétében és annak hiányában

K-OF— nem EOP betegekből származó orbita fibroblasztok; EOP-OF— az EOP-ban szenvedő páciensektől származó orbita fibroblasztok; BF—bőrfibroblasztok, PDGF—vérlemezske eredetű növekedési faktor BB, HC—hidrokortizon, P—prednizolon, MP—metilprednizolon, DEX—dexametazon. A 100%-ot jelölő szaggatott vonal az kezeletlen vonalak mRNS expresszióját jelöli. Az adatokat átlag ± SEM formában ábrázoltuk.

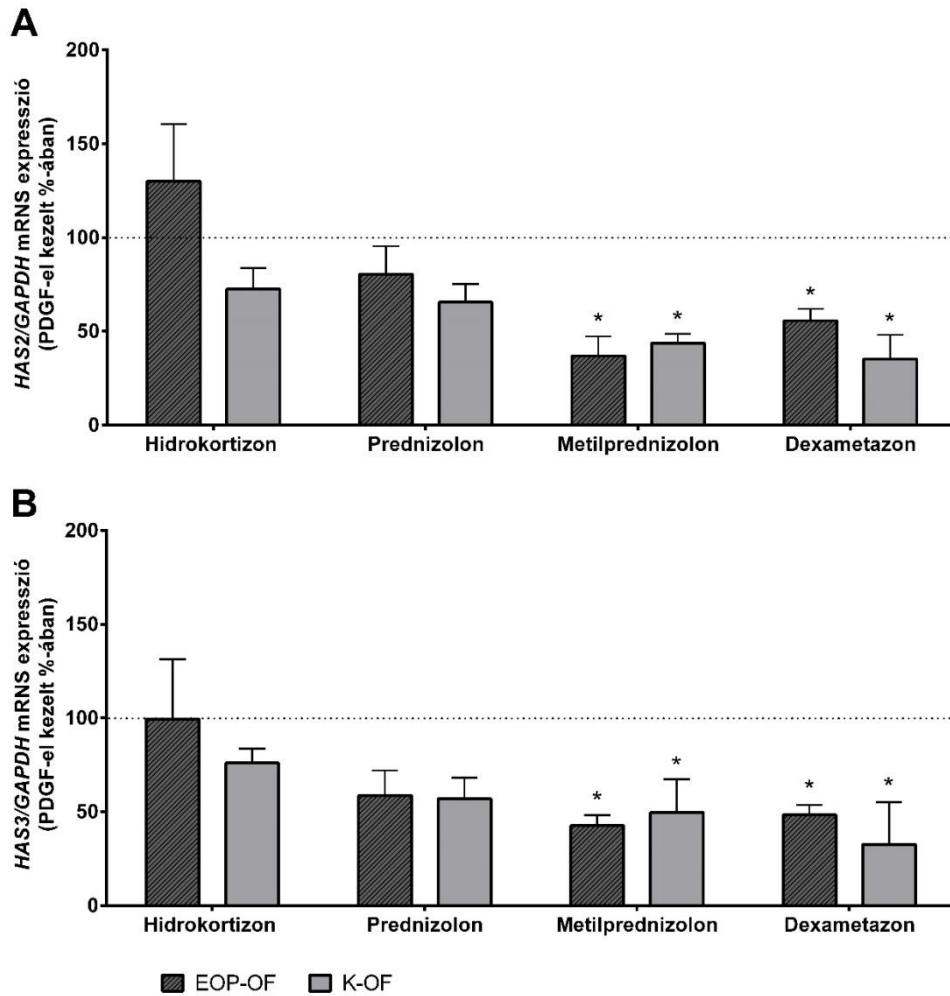
* $p < 0,0001$; az azonos ideig fenntartott kezeletlen tényezetek értékeihez viszonyítva

A PDGF-BB kezelés (10 ng/ml, 24 óra) hatására minden csoportban szignifikánsan emelkedett a sejtek HAS1 expressziója, azonban orbita fibroblasztok esetén ezt a hatást egyetlen alkalmazott glükokortikoid sem volt képes gátolni (EOP-OF: $p = 0,300$, K-OF: $p = 0,391$).

A PDGF-BB kezelés fokozta a HAS2 expressziót EOP és K-OF kultúrákban egyaránt. A PDGF-BB által indukált HAS2 expresszió növekedést azonban csak a metilprednizolon ($p < 0,001$) és a dexametazon ($p < 0,002$) volt képes csökkenteni, a hidrokortizon ($p = 0,997$) és a prednizolon ($p = 0,151$) nem befolyásolta azt (16.A ábra). Bőrfibroblasztokban a PDGF-BB a HAS2 expressziót nem befolyásolta ($p = 0,772$).

A PDGF-BB fokozta a HAS3 mRNS expresszióját orbita fibroblasztokban ($p = 0,049$) az eredetüktől függetlenül ($p = 0,723$). A PDGF-BB által indukált HAS3 expresszió növekedését csupán két vizsgált glükokortikoid, a metilprednizolon ($p = 0,035$) és a dexametazon ($p = 0,029$) volt képes csökkenteni. A PDGF-BB nem befolyásolta a bőr fibroblasztok HAS3 expresszióját ($p = 0,535$) (16.B ábra).

PDGF-BB kezelés következtében az EOP-OF ($p < 0,003$) és K-OF kultúrák ($p = 0,207$) HYAL1 mRNS expressziója egyaránt csökkent, és ezt a hatást egyik glükokortikoid sem befolyásolta. Emellett a PDGF-BB kezelés, sem önállóan, sem pedig glükokortikoidokkal kombinálva, nem befolyásolta a HYAL2 expressziót.

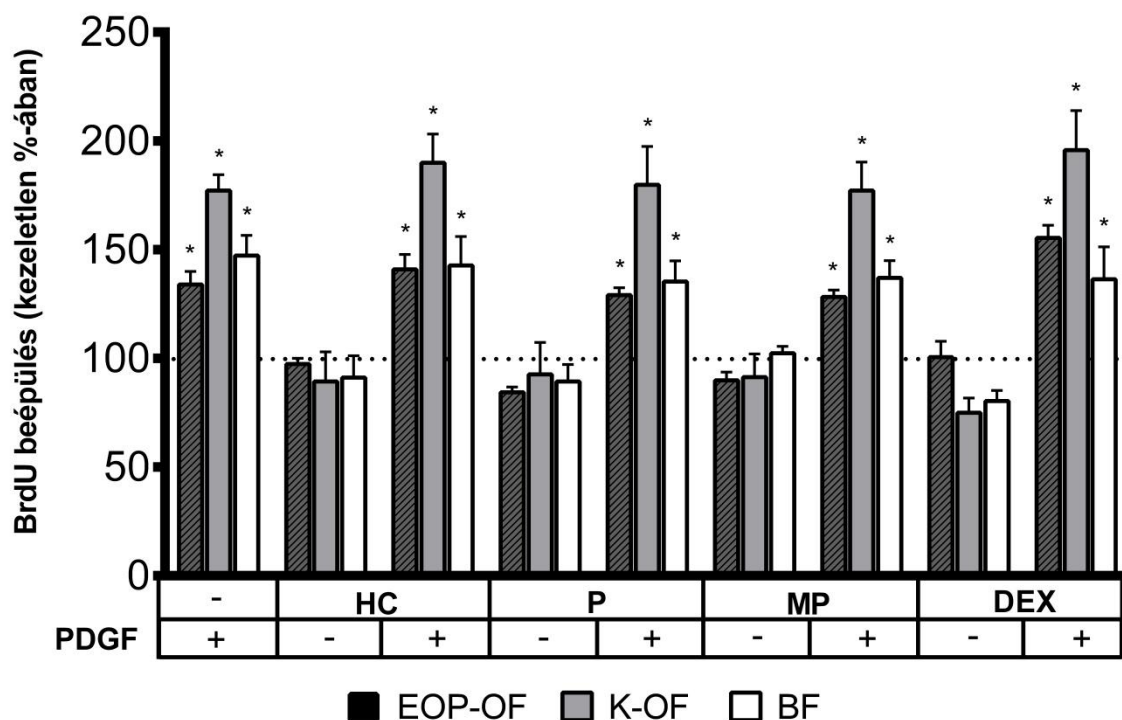


16. ábra

Glükokortikoidok (1 μ M) hatása a HAS2 (A) és HAS3 (B) expresszióra PDGF-BB kezelés mellett

A pontozott vonal a PDGF-BB kezelt sejtvonalak mRNS expresszióját jelzi. Az adatokat átlag \pm SEM formában ábrázoltuk. * $p < 0,05$; az azonos ideig fenntartott kezeletlen tenyészetek értékeihez viszonyítva

A sejtek proliferációs rátája minden esetben emelkedett PDGF-BB stimuláció hatására eredettől függetlenül ($p < 0,0001$). A PDGF-BB kezelés proliferációra kifejtett hatását egyik vizsgált glükokortikoid sem volt képes gátolni az alkalmazott 1 μ M koncentrációban (17. ábra).



17. ábra. Glükokortikoid kezelések (1 μ M) hatása a vizsgált fibroblaszt sejtvonalak proliferációs rátájára PDGF-BB (10 ng/ml) stimuláció jelenlétében és annak hiányában

A pontozott vonal a kezeletlen sejtek proliferációs rátáját jelöli. Az adatokat átlag \pm SEM formában ábrázoltuk. K-OF— nem EOP betegekből származó orbita fibroblasztok; EOP-OF— az EOP-ban szenvedő páciensektől származó orbita fibroblasztok; BF— bőrfibroblasztok, PDGF— vérlemezke eredetű növekedési faktor BB, HC—hidrokortizon, P—prednizolon, MP—metilprednizolon, DEX—dexametazon, BrdU – 5-bromo-2'-deoxiuridin* $p < 0,0001$; az azonos ideig fenntartott kezeletlen tenyészetek értékeihez viszonyítva

7. Megbeszélés

Az EOP aktív szakaszában az autoimmun folyamat elsődleges célsejtjei a fibroblasztok.^{42,43,128,129} Aktiválódásuk következtében HA termelésük fokozódik, amivel jelentősen hozzájárulnak a tüneteket okozó volumen expansio, ödéma kialakulásához. Az EOP pathogenesisének felderítését célzó *in vitro* kísérletek során gyakran vizsgálják az orbita fibroblasztok HA szintézisét, mégis kevés adat áll rendelkezésre a HA anyagcserében szerepet játszó enzimek expressziójának változásáról a betegség lefolyása során.

A betegség előrehaladtával az aktivált orbita fibroblasztok miofibroblaszt irányú differenciálódáson mehetnek keresztül.^{130,131} A kísérleteink során használt TGF- β , egy multifunkcionális citokin, amely amellet, hogy ismert a sejtnövekedés, motilitás, mátrix átrendeződés és a pericelluláris proteolitikus aktivitás szabályozásában betöltött szerepe, a miofibroblaszt fenotípus irányába történő differenciálódás indukálásában és a fenotípus fenntartásában is kulcsfontosságú.^{98,132} Korábbi vizsgálatok során jelentős TGF- β expressziót mutattak ki súlyos EOP-ban szenvedő betegek orbita kötőszövetében, amely korrelált a betegek klinikai aktivitási pontszámával,¹³³ tehát feltételezhetjük, hogy a miofibroblaszt irányú differenciálódás a betegség aktív szakaszában elindul. Az EOP pathogenesis során a miofibroblasztok fontos szerepet játszhatnak az orbita szövetek átrendeződésében,¹²⁸ azonban bizonyos tulajdonságaik, beleértve a HA metabolizmusukat, még nem teljesen tisztázottak.

Vizsgálataink során, a miofibroblaszt markerekként használt α SMA, COL1A1 és a fibronektin mRNS expressziójának növekedése alátámasztotta, hogy a transzdifferenciálódás a miofibroblaszt fenotípus irányában valóban bekövetkezett a TGF- β stimuláció hatására orbita fibroblasztokban, ahogy ezt már mások is megerősítették.^{134,135} Az α SMA fokozódó expressziója felelős a miofibroblasztok kontraktilis fenotípusáért, és képes a mechanoszenzitív Hippo jelátviteli útvonal modulálására a Yes-asszociált fehérje (YAP) és a PDZ-kötő motívummal rendelkező transzkripciós koaktivátor (TAZ) aktiválásával, a YAP/TAZ pedig képes szabályozni az α SMA expresszióját.¹³⁶ A YAP és TAZ mechanotranszdukciós fehérjék kölcsönhatásba léphetnek a Smad transzkripciós faktorokkal, melyek a TGF- β jelátviteli útvonal klasszikus mediátorai. A TGF- β a SMAD függő, kanonikus jelátviteli útvonal révén fokozza a YAP/TAZ nukleáris transzlokációját és célgénjeik expresszióját a fibroblasztokban. Ezzel szemben a YAP knockdown, vagy hatékony YAP gátlóval végzett kezelés gátolja a TGF- β által indukált Smad2/3 nukleáris transzlokációját és transzkripciós aktivitását, így közvetett módon a fibrotikus markerek,

köztük az α SMA expressziója is csökken.^{134,137} A Hippo és a TGF- β jelátviteli útvonalak közötti kapcsolatot orbita fibroblasztokban is igazolták.¹³⁴

Bár az α SMA-t gyakran a miofibroblasztok kulcsmarkerének tekintik, a műanyag felületen tenyésztett különböző eredetű mesenchymalis stroma sejtek is rendelkeznek alap α SMA expresszióval, amelyet a TGF- β tovább fokozhat.¹³⁶ Ezt a jelenséget K-OF és EOP-OF sejt kultúrák esetén egyaránt megfigyeltük.

A COL1A1, az I. típusú kollagén fő alkotóeleme, mely nagy mennyiségben van jelen az extracelluláris mátrixban. A vizsgált orbita eredetű fibroblasztokban magas COL1A1 expressziót találtunk, amely az EOP-OF esetén idővel is emelkedett, és a TGF- β hatására mind az EOP és a K-OF kultúrákban tovább nőtt. A TGF- β kezelés által indukált miofibroblaszt irányú differenciálódás során a sejtek COL1A1 termelése fokozódik, mely mellett, hogy hozzájárul az ECM átrendeződéséhez, segíti a miofibroblaszt fenotípus fenntartását is.¹³⁸ Továbbá, a COL1A1 expressziója és a YAP/TAZ aktivitása között is közvetlen kölcsönhatás feltételezhető, hiszen a YAP gén csendesítése siRNS technológiával, a TGF- β /Smad által indukált pro-fibrotikus gének, például a COL1A1 expresszióját is gátolja.¹³⁷

A fibronectin egy multifunkcionális ECM fehérje. Kötődése az integrin receptorokhoz serkenti a sejtek proliferációját és migrációját, valamint részt vesz a sejtek különböző funkcióinak szabályozásában. Ezenkívül a fibronectin stabilizálja az ECM szerkezetét és elősegíti más ECM fehérjék, például kollagének beépülését,¹³⁹ valamint a szöveti átrendeződés során kostimulátorként is funkcionálhat az orbitát infiltráló immunsejtek számára.¹⁴⁰ Kísérleteink során egyedül az EOP-OF kultúrák fibronectin expressziója emelkedett 72 órás TGF- β kezelést követően, a K-OF esetén nem találtunk szignifikáns változást. A megfigyelt különbség utalhat a fibronectin jelentőségére az EOP lefolyása során.

Korábban megfigyeltük, hogy 72 óra elteltével az orbita fibroblasztok alap proliferációs rátája csökkent a konfluens kultúrákban, ami a kontakt gátlás, mint negatív regulátor jelenlétére utal.¹⁴¹ A megfigyelt csökkenés mértéke minden esetben kisebb volt TGF- β kezelt sejtek esetén. Ezzel összhangban a 72 órás TGF- β kezelést követően a sejtek metabolikus aktivitása is növekedett, ami lehet a magasabb proliferációs ráta következménye.

A TGF- β hatása különböző sejt típusok proliferációjára változó lehet, a sejtek állapotától és szöveti környezettől függően.¹⁴² A TGF- β gátolhatja a hasnyálmirigy béta-sejtjeinek proliferációját és a hematopoetikus őssejtekre is hatással van, ahol a sejtek fejlődési állapotától függően serkentheti vagy gátolhatja a proliferációt.¹⁴³ A daganatos sejtek proliferációját is befolyásolja: korai szakaszban daganatellenes, míg később pro-onkogén

szerepet játszhat, elősegítve a sejtek invázióját és a daganatos szövetek angiogenezisét.¹⁴⁴ Meran és munkatársai eredményei alapján,¹¹² mely szerint a sejtek HA termelő képessége befolyásolja a TGF- β proliferációra gyakorolt hatását, feltételezzük, hogy az orbita fibroblastok jelentős HA termelése hozzájárul ahhoz, hogy ebben a sejt típusban a TGF- β emeli a proliferációs rátát.

Kimutattuk, hogy a sejtekhez kötött pericelluláris HA mennyisége fokozódott a TGF- β kezeléssel indukált miofibroblaszt irányú differenciálódás következtében, míg a tápfolyadékba termelt HA esetén igazoltuk, hogy nőtt a HMW-HA aránya a HA koncentráció változása nélkül.

A TGF- β a HAS-1 expresszióra fokozó hatást gyakorolt mindkét vizsgált időpontban, míg a HAS2 és HAS3 tekintetében nem tapasztaltunk emelkedést. Habár kutatócsoportunk korábbi eredményeivel összhangban kimutattuk, hogy orbita fibroblasztokban a HAS2 a domináns szintáz,¹⁴¹ eredményeink alapján úgy véljük, hogy a miofibroblaszt transz-differenciálódás során, annak ellenére, hogy alap enzimaktivitása alacsonyabb, mint a többi szintázé, a HAS1 expressziójának fokozódása jelentős szerepet játszik a pericelluláris HA koncentrációjának emelkedésében.

További megfigyelésünk, hogy TGF- β kezelés következtében, a HYAL1 és CEMIP expressziós szintje csökkent, ami szintén hozzájárulhat a pericelluláris HA koncentráció emelkedéséhez és egyúttal magyarázatot adhat a HMW-HA arányának növekedésére, az MMW-HA és LMW-HA mennyiségének csökkenése mellett. Ezzel szemben a TMEM2 expressziója 72 órás TGF- β 1 kezelés hatására jelentősen emelkedett.

Míg korábban, egérmodellen végzett vizsgálatok alapján úgy vélték, hogy a TMEM2 katalitikus hialuronidáz funkcióval rendelkezik,¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ friss irodalmi adatok támasztják alá, hogy a humán TMEM2 (hTMEM2) éppen ellenkezőleg, valójában a HA felhalmozódását segíti elő a CEMIP expressziójának gátlása révén.^{117,149} Ugyan az egér (mTMEM2) és hTMEM2 fehérjeszerkezete nagyfokú homológiát mutat,¹⁵⁰ Sato és munkatársai egér és humán TMEM2 hibrid konstrukciók vizsgálatával igazolták, hogy míg az mTMEM2 hialuronidázként csökkenti a HA felhalmozódását, annak humán megfelelője ellentétes hatást vált ki.¹¹⁷ Habár az EOP egérmodelljében a TMEM2 expressziójának fokozása csökkentette a gyulladást, valamint az adipogenezis és a fibrózis mértékét,¹⁵¹ az egér és humán eredetű TMEM2 enzimaktivitásának eltérése miatt, további vizsgálatokra van szükség a hTMEM2 EOP pathogenesisében betöltött szerepének tisztázása érdekében.

Az orbita fibroblasztok, függetlenül attól, hogy EOP vagy nem EOP betegektől származtak, hasonlóan reagálnak a TGF- β kezelésre a HA metabolizmusuk és proliferációs

rátájuk és a vizsgált mRNS expressziók tekintetében, illetve egyaránt hasonlóan reagáltak az alkalmazott kezelésekre. A miofibroblaszt markerek közül az α SMA és a COL1A1 hasonló ütemben emelkedtek a sejtek eredetétől függetlenül, míg a TGF- β kezelést követő fibronectin expresszió növekedése csak az EOP-OF kultúrákra volt jellemző.

A kapott eredmények tükrében megállapíthatjuk, hogy miofibroblaszt irányú differenciálódás során, a HAS1 és TMEM2 fokozott expressziója és két specifikus hialuronidáz (HYAL1 és CEMIP) mRNS szintjének csökkenése állhat a pericelluláris HA felhalmozódás és HMW-HA frakció növekedésének hátterében. A pericelluláris térben felhalmozódó HA, nagy vízmegkötő képessége miatt, hozzájárul az orbita szövetek térfogatnövekedéséhez, illetve ödémássá válásához, és egyúttal fokozhatja a fibroblasztok proliferációját, valamint a leukociták infiltrációját, ezzel rontva az EOP lefolyását.¹⁵² Megfigyeléseink alapján úgy véljük, hogy a hialuronidázok potenciális célpontok lehetnek az EOP kezelésében.

Az EOP kezelése során jelenleg az autoimmun gyulladás csökkentése révén ható terápiát, ezen belül is első vonalbeli szerként glükokortikoidokat alkalmaznak.¹⁸ Ismert, hogy a glükokortikoidok képesek gátolni a T-sejteket aktiváló citokineket és adhéziós molekulákat, valamint csökkenteni az immunsejtek proliferációját és infiltrációját.¹⁵³ Igazolást nyert továbbá az is, hogy a glükokortikoidok képesek gátolni a HA termelést többféle sejttypusban, például a hidrokortizon (HC) bőrfibroblasztokban,³⁹ illetve a dexametazon (DEX) bőr és orbita fibroblasztokban,^{154,155} szinoviocita sejt kultúrákban, valamint az ízületi folyadékból izolált leukocitákban,⁴⁰ pajzsmirigysejtekben és pajzsmirigy eredetű fibroblasztokban egyaránt.⁴¹

Kísérleteink során minden, 24 órán át alkalmazott glükokortikoid kezelés (hidrokortizon, prednizolon, metilprednizolon és dexametazon) jelentősen csökkentette a vizsgált fibroblaszt kultúrák HA termelését, elsősorban a HAS2 és HAS3 expressziójának csökkentése révén.

Kevés adat állt rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a glükokortikoidok miként hatnak a hialuronidázok expressziójára. Gebhardt és munkatársai kimutatták, hogy dexametazon (DEX) kezelést követően a bőrfibroblasztok HA termelése csökken, a HYAL1 és HYAL2 mRNS szintje és enzimaktivitása változatlan marad.¹⁵⁴ Mások egér makrofágokban csökkenést találtak a HYAL1 expressziójában dexametazon kezelést követően.¹⁵⁶ Ezeket az eredményeket támasztják alá jelen megfigyeléseink is, miszerint a glükokortikoidok csökkentik a HYAL1 expresszióját. Feltételezésünk szerint, a glükokortikoid kezelést követően megfigyelt csökkent HA termelés elsősorban a HAS2 és

HAS3 expressziójában bekövetkező változások következménye, az összefolyamatot a HYAL1 általi HA lebontás mértékének csökkenése valószínűleg kevésbé befolyásolja. Azonban a HA lebontását szabályozó enzimek pontos szerepe, valamint a HA fragmentációjának hatása az EOP patogenezisében továbbra sem teljesen tisztázott.

A PDGF-BB, mely ismert a hialuronsav szintézist serkentő hatásáról,^{157,158} minden vizsgált esetben fokozta a HA termelést és a sejtek proliferációját. Kísérleteink során egyik glükokortikoid kezelés sem befolyásolta az orbita eredetű fibroblasztok proliferációs rátáját, továbbá a PDGF-BB okozta proliferáció fokozódásra sem voltak hatással. Ez alapján feltételezzük, hogy a glükokortikoidok hatásában nem játszik szerepet az orbita fibroblasztok proliferációjának befolyásolása. Munkánk során kimutattuk, hogy minden alkalmazott glükokortikoid képes volt csökkenteni a fibroblasztok HA termelését önmagában adva és PDGF-BB jelenlétében egyaránt.

A glükokortikoidok többféle módon befolyásolhatják a PDGF-BB stimuláló hatását. Ismert, hogy *in vivo* a glükokortikoidok immunszuppresszív ágensekként működve gátolják a T-sejtek aktivációját és szövetekbe való infiltrációját.^{154,159} Az NF- κ B kulcsfontosságú transzkripciós faktor a gyulladásos mediátorok szintézisében és szabályozásában. Az aktivált glükokortikoidreceptor-komplex képes közvetlenül kölcsönhatásba lépni az NF- κ B p65 alegységével, gátolva annak DNS-hez való kötődését, ezáltal blokkolva a gyulladásos gének átírását,^{153,156,159} így a glükokortikoidok közvetlenül csökkentik a gyulladást és a PDGF-BB expresszióját,^{158,160} ami magyarázatként szolgálhat arra, hogy miként csökkenthetik a glükokortikoidok a PDGF-BB által stimulált HA termelést.¹⁶¹ Emellett a glükokortikoidok kedvező hatást fejtenek ki a sejtek energiaegyensúlyának fenntartásában kulcsszerepet játszó adenzin-monofoszfát-aktivált protein kináz (AMPK) foszforilációja révén is. Habár a HAS enzimek közvetlenül nem igényelnek ATP-t a működésükhöz, az általuk használt prekursorok szintéziséhez az ATP elengedhetetlen. Az AMPK aktivációja közvetett módon gátolja a HA szintézist azáltal, hogy korlátozza a szükséges prekursorok, az UDP-N-acetil-glükózamin (UDP-GlcNAc) és az UDP-glükuronsav (UDP-GlcUA) hozzáférhetőségét.¹⁶²⁻¹⁶⁴

Korábbi eredményekkel összhangban^{141,155} megállapítottuk, hogy az orbita fibroblasztok és a bőrfibroblasztok eltérő HAS mRNS expressziós mintázatot mutatnak, de emellett a PDGF-BB kezelésre adott válaszukban is különböznek. A PDGF-BB kezelés EOP és K-OF sejtekben egyaránt fokozta a HAS2 és HAS3 expressziót, míg bőrfibroblasztokban a PDGF-BB HAS2 és HAS3 expresszióra gyakorolt hatása elhanyagolható volt. Az alkalmazott glükokortikoidok jelentős mértékben csökkentették a HAS2 mRNS szintjét, minden vizsgált fibroblasztkulturára esetén, kivéve a hidrokortizont, mely az EOP orbita fibroblasztok HAS2

expresszióját nem befolyásolta. A PDGF-BB által indukált HAS2 expresszió növekedést azonban csak a metilprednizolon és a dexametazon volt képes gátolni. A glükokortikoid kezelések mindegyike hatékonyan csökkentette a HAS3 expressziót. Li és munkatársai megfigyelték, hogy a HYAL1 expressziója 4 órával a PDGF-BB kezelés után megnövekedett, azonban a 24 órás eredményeik már megegyeznek a mi megfigyeléseinkkel: a HYAL1 expresszió csökkent, míg a HYAL2 változatlan maradt.¹⁶⁵

Arra a következtetésre jutottunk, hogy a glükokortikoidok hatása az EOP kezelésében túlmutat az immunfolyamatok modulálásán. A HA kóros felhalmozódása – mely elsősorban az orbita fibroblaszt aktiváció és a miofibroblaszt irányú differenciálódás következménye – nagyban hozzájárul az ödéma kialakulásához és a jellegzetes szemtünetek megjelenéséhez.¹⁵⁴ Azáltal, hogy a glükokortikoidok képesek csökkenteni a HA termelést a szintáz enzimek gátlásán keresztül, további kedvező hatást gyakorolhatnak az EOP lefolyására, javítva a betegek életminőségét.

Vizsgálataink egyik fő korlátja, hogy mind a miofibroblaszt irányú differenciálódás, mind a HA anyagszere változása csak egyike az EOP lefolyása során bekövetkező komplex változásoknak; a betegség pathogenesisében betöltött szerepüket csak a többi komponenstől elkülönítve tudtuk vizsgálni. Másrészt műtétek során eltávolított szövetpreparátumokból létrehozott primer sejtkultúrákat vizsgáltunk, így az egyéni különbségek hatással lehettek az enzimek mRNS-expressziós szintjeire és befolyásolhatták a kezelésekre adott választ. A glükokortikoid kezeléseknél alkalmazott 24 órás inkubációs idő a transzkripciós szinten megjelenő rövid távú változások megfigyelését nem tette lehetővé. Irodalmi adatok állnak rendelkezésre arra vonatkozóan, hogy a HAS enzimek aktuális expressziós szintje nem mindig tükrözi pontosan a HA termelést,¹⁶⁶ ami magyarázatot adhat néhány esetben a HA termelés és a HAS expresszió közötti látszólagos ellentmondásra.

8. Új megállapítások

1. Az orbita fibroblasztok miofibroblaszt irányú differenciálódása során a sejtek HA turnover csökken, elsősorban egyes hialuronidázok (HYAL1 és CEMIP) expressziójának csökkenése következtében, ami az emelkedő HAS1 expresszióval együtt a sejtekhez kötött pericelluláris HA mennyiségét növeli, a tápfolyadékba termelt HA esetén pedig a HMW-HA irányába tolja a HA molekulatömeg szerinti megoszlását.
2. Az orbita fibroblasztok HA termelése szerepet játszhat abban, hogy e sejttípus esetén a TGF- β kezelés a proliferáció fokozásával jár.
3. Az EOP kezelése során alkalmazott glükokortikoidok a bőrfibroblasztokban megfigyelthez hasonlóan csökkentik az orbita fibroblasztok HA termelését, még PDGF-BB-vel történt stimulációt követően is, melynek hátterében a HAS2 és HAS3 expresszióra gyakorolt gátló hatásuk áll.
4. A glükokortikoidok nem befolyásolják az orbita fibroblasztok proliferációját, és nem képesek a PDGF-BB proliferációt fokozó hatásának mérséklésére sem.

9. Összefoglalás

Az endocrin orbitopathia (EOP) pathogenesisében az orbita fibroblasztok (OF) miofibroblasztá történő differenciálódása kiemelt szerepet játszik, amelynek kulcsfontosságú regulátora a TGF- β 1. A miofibroblasztokat fokozott extracelluláris mátrix (ECM) termelés jellemzi, melynek egyik fő komponense, a hialuronsav (HA) nagy vízmegkötő képessége miatt, jelentősen hozzájárul a szöveti ödéma kialakulásához, rontva az EOP lefolyását. Vizsgáltuk a miofibroblaszt irányú differenciálódás hatását az orbita fibroblasztok HA metabolizmusára, valamint az EOP kezelésében használt glükokortikoidok (GC) hatását a fibroblasztok proliferációjára és HA anyagcseréjére.

Igazoltuk, hogy az OF sejtek TGF- β 1 általi stimulációt követően miofibroblaszt irányú transzdifferenciálódáson mentek keresztül. Habár hetvenkét óra elteltével mind az EOP, mind a K-OF kutúrák proliferációs rátája csökkent, ez a változás TGF- β 1 kezelés esetén jelentősen kisebb mértékű volt. Megfigyeltük, hogy a sejtekhez kötött pericelluláris HA fokozódott, míg a tápfolyadékba termelt HA mennyisége nem változott a kezeletlen sejtekhez viszonyítva. A TGF- β 1 a hialuronsav-szintáz-1 (HAS-1) expresszióra fokozó hatást gyakorolt mindkét vizsgált időpontban. Az 1-es típusú hialuronidáz (HYAL1) és a sejt migrációt indukáló fehérje (CEMIP) expressziója egyaránt csökkent a differenciálódást követően. Ezzel szemben a transzmembrán protein 2 (TMEM2) expressziója 72 órás TGF- β 1 kezelés hatására jelentősen emelkedett. Kimutattuk továbbá, hogy a nagy molekulatömegű HA (HMW-HA) aránya a TGF- β által indukált transzdifferenciálódást követően nőtt.

A glükokortikoidok egyike sem befolyásolta a fibroblasztok proliferációját, továbbá a PDGF-BB okozta proliferáció fokozódásra sem voltak hatással. A hidrokortizon növelte a HAS1 expressziót, míg mindegyik glükokortikoid csökkentette a PDGF-BB kezelt sejtek HAS2 és HAS3 mRNS expresszióját. A HYAL1 expresszió minden esetben csökkent a glükokortikoid kezelés hatására, míg a HYAL2 expresszióját egyik kezelés sem befolyásolta. A glükokortikoidok származási helytől függően különböző mértékben csökkentették a fibroblasztok HA termelését önmagában adva és PDGF-BB kezelést követően egyaránt, a csökkentő hatás bőrfibroblasztok esetén kifejezettebb volt. Csupán a metilprednizolon és a dexametazon csökkentette a PDGF-BB által indukált HAS2 és HAS3 expresszió fokozódást, míg egyik glükokortikoid sem befolyásolta a PDGF-BB-stimulált HAS1 expressziót. A PDGF-BB kezelés HYAL1 csökkentő hatását egyetlen alkalmazott glükokortikoid sem volt képes gátolni. Eredményeink alapján a HA az EOP pathogenesisének egyik központi szereplője, mely a betegség kezelésének új célpontja lehet.

10. Summary

The differentiation of orbital fibroblasts (OF) into myofibroblasts, primarily driven by TGF- β 1, is a key factor in the pathogenesis of Graves' orbitopathy (GO). Myofibroblasts are characterized by enhanced production of extracellular matrix (ECM), with hyaluronan (HA) as one of its major components. Due to its high water-binding capacity, HA significantly contributes to tissue edema, thereby exacerbating the progression of EOP. We investigated the impact of myofibroblast differentiation on the HA metabolism of OFs, as well as the effect of glucocorticoids (GC), commonly used as first line treatment in EOP, on fibroblast proliferation and HA metabolism.

We verified that, following TGF- β 1 stimulation, OFs underwent myofibroblast transdifferentiation. Although the proliferation rates of both EOP and K-OF cultures decreased after seventy-two hours, this decrease was significantly less pronounced in the TGF- β 1-treated cells, compared to the untreated cells. The HA content of the pericellular coat increased, while the amount of HA in the supernatant remained unchanged compared to untreated cells. TGF- β 1 enhanced hyaluronan synthase 1 (HAS1) expression at both time points examined, whereas hyaluronidase 1 (HYAL1) and cell migration-inducing protein (CEMIP) expressions were reduced following differentiation. In contrast, transmembrane protein 2 (TMEM2) expression was significantly elevated after 72 hours of TGF- β 1 treatment. Additionally, we found that the proportion of high molecular weight HA (HMW-HA) increased following TGF- β -induced transdifferentiation.

None of the GCs affected fibroblast proliferation, nor did they alter the PDGF-BB-induced increase in proliferation. Hydrocortisone elevated HAS1 expression, while all GCs reduced HAS2 and HAS3 mRNA expression in the PDGF-BB treated cell lines. HYAL1 expression consistently decreased in response to GC treatment, while HYAL2 expression remained unaffected. GCs reduced HA production in all types of fibroblasts, even in the presence of PDGF-BB, with a more pronounced effect in dermal fibroblasts. Only methylprednisolone and dexamethasone did significantly reduce the PDGF-BB-induced increase in HAS2 and HAS3 expressions, while none of the glucocorticoids affected PDGF-BB-stimulated HAS1 expression. Furthermore, none of the GCs was able to inhibit the reduction in HYAL1 expression induced by PDGF-BB treatment. HA is major contributor to disease pathogenesis and is a potential therapeutic target in GO.

11. Irodalomjegyzék

1. Burch HB, Perros P, Bednarczuk T, et al. Management of thyroid eye disease: a Consensus Statement by the American Thyroid Association and the European Thyroid Association. *Eur Thyroid J* 2022;11(6), doi:10.1530/ETJ-22-0189
2. Lanzolla G, Marinò M, Menconi F. Graves disease: latest understanding of pathogenesis and treatment options. *Nat Rev Endocrinol* 2024;20(11):647-660, doi:10.1038/s41574-024-01016-5
3. Ben Simon GJ, Katz G, Zloto O, et al. Age differences in clinical manifestation and prognosis of thyroid eye disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015;253(12):2301-8, doi:10.1007/s00417-015-3156-2
4. Biscarini F, Masetti G, Muller I, et al. Gut Microbiome Associated With Graves Disease and Graves Orbitopathy: The INDIGO Multicenter European Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2023;108(8):2065-2077, doi:10.1210/clinem/dgad030
5. Masetti G, Ludgate M. Microbiome and Graves' Orbitopathy. *Eur Thyroid J* 2020;9(Suppl 1):78-85, doi:10.1159/000512255
6. Heisel CJ, Riddering AL, Andrews CA, et al. Serum Vitamin D Deficiency Is an Independent Risk Factor for Thyroid Eye Disease. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 2020;36(1):17-20, doi:10.1097/IOP.0000000000001437
7. Hegediüs L, Brix TH, Vestergaard P. Relationship between cigarette smoking and Graves' ophthalmopathy. *J Endocrinol Invest* 2004;27(3):265-71, doi:10.1007/BF03345276
8. Burch HB, Barnes S, Nagy EV, et al. Immunodetection of manganese superoxide dismutase in cultured human retroocular fibroblasts using sera directed against the thyrotropin receptor. *J Endocrinol Invest* 1998;21(1):48-55, doi:10.1007/BF03347286
9. Alevizaki M, Mantzou E, Cimponeriu A, et al. The Pro 12 Ala PPAR gamma gene polymorphism: possible modifier of the activity and severity of thyroid-associated orbitopathy (TAO). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;70(3):464-8, doi:10.1111/j.1365-2265.2008.03343.x
10. Katko M, Galgoczi E, Erdei A, et al. The 4G/5G Polymorphism of Plasminogen Activator Inhibitor Type 1 is a Predictor of Moderate-to-Severe Thyroid Eye Disease. *J Inflamm Res* 2021;14(1883-1890), doi:10.2147/JIR.S307046
11. Jurecka-Lubieniecka B, Ploski R, Kula D, et al. Association between polymorphisms in the TSHR gene and Graves' orbitopathy. *PLoS One* 2014;9(7):e102653, doi:10.1371/journal.pone.0102653

12. Szelog J, Swanson H, Sniegowski MC, et al. Thyroid Eye Disease. *Mo Med* 2022;119(4):343-350
13. Bartalena L, Kahaly GJ, Baldeschi L, et al. The 2021 European Group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) clinical practice guidelines for the medical management of Graves' orbitopathy. *Eur J Endocrinol* 2021;185(4):G43-g67, doi:10.1530/eje-21-0479
14. Tramunt B, Imbert P, Grunenwald S, et al. Sight-threatening Graves' orbitopathy: Twenty years' experience of a multidisciplinary thyroid-eye outpatient clinic. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2019;90(1):208-213, doi:10.1111/cen.13880
15. Estcourt S, Quinn AG, Vaidya B. Quality of life in thyroid eye disease: impact of quality of care. *Eur J Endocrinol* 2011;164(5):649-55, doi:10.1530/EJE-11-0055
16. Barrio-Barrio J, Sabater AL, Bonet-Farriol E, et al. Graves' Ophthalmopathy: VISA versus EUGOGO Classification, Assessment, and Management. *J Ophthalmol* 2015;2015(249125), doi:10.1155/2015/249125
17. Szucs-Farkas Z, Toth J, Kollar J, et al. Volume changes in intra- and extraorbital compartments in patients with Graves' ophthalmopathy: effect of smoking. *Thyroid* 2005;15(2):146-51, doi:10.1089/thy.2005.15.146
18. Bartalena L, Kahaly GJ, Baldeschi L, et al. The 2021 European Group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) clinical practice guidelines for the medical management of Graves' orbitopathy. *Eur J Endocrinol* 2021;185(4):G43-G67, doi:10.1530/EJE-21-0479
19. Werner SC. Modification of the classification of the eye changes of Graves' disease: recommendations of the Ad Hoc Committee of the American Thyroid Association. *J Clin Endocrinol Metab* 1977;44(1):203-4, doi:10.1210/jcem-44-1-203
20. Dolman PJ. Grading Severity and Activity in Thyroid Eye Disease. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg* 2018;34(4S Suppl 1):S34-S40, doi:10.1097/IOP.0000000000001150
21. Eckstein AK, Plicht M, Lax H, et al. Clinical results of anti-inflammatory therapy in Graves' ophthalmopathy and association with thyroidal autoantibodies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61(5):612-8, doi:10.1111/j.1365-2265.2004.02143.x
22. Nagy EV, Toth J, Kaldi I, et al. Graves' ophthalmopathy: eye muscle involvement in patients with diplopia. *Eur J Endocrinol* 2000;142(6):591-7, doi:10.1530/eje.0.1420591
23. Galuska L, Barna SK, Varga J, et al. The role of 99mTc-DTPA retrobulbar SPECT in staging and follow-up of Graves' orbitopathy. *Nucl Med Rev Cent East Eur* 2018;21(1):54-58, doi:10.5603/NMR.a2018.0005
24. Bartalena L, Tanda ML. Clinical practice. Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med* 2009;360(10):994-1001, doi:10.1056/NEJMcp0806317

25. Marcocci C, Kahaly GJ, Krassas GE, et al. Selenium and the course of mild Graves' orbitopathy. *N Engl J Med* 2011;364(20):1920-31, doi:10.1056/NEJMoa1012985
26. Lanzolla G, Marinò M, Marcocci C. Selenium in the Treatment of Graves' Hyperthyroidism and Eye Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2020;11(608428, doi:10.3389/fendo.2020.608428
27. O'Dell JM, Mussatto CC, Chu RL, et al. Effects of Smoking on Outcomes of Thyroid Eye Disease Treated with Teprotumumab: A Retrospective Cohort Study. *Kans J Med* 2023;16(62-64, doi:10.17161/kjm.vol16.18940
28. Thornton J, Kelly SP, Harrison RA, et al. Cigarette smoking and thyroid eye disease: a systematic review. *Eye (Lond)* 2007;21(9):1135-45, doi:10.1038/sj.eye.6702603
29. Vogel R, Crockett RS, Oden N, et al. Demonstration of efficacy in the treatment of dry eye disease with 0.18% sodium hyaluronate ophthalmic solution (vismed, rejena). *Am J Ophthalmol* 2010;149(4):594-601, doi:10.1016/j.ajo.2009.09.023
30. Baudouin C, Aragona P, Messmer EM, et al. Role of hyperosmolarity in the pathogenesis and management of dry eye disease: proceedings of the OCEAN group meeting. *Ocul Surf* 2013;11(4):246-58, doi:10.1016/j.jtos.2013.07.003
31. Gumińska M, Goś R, Śmigielski J, et al. Topical Treatment of Elevated Intraocular Pressure in Patients with Graves' Orbitopathy. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17(24), doi:10.3390/ijerph17249331
32. Kotwal A, Stan M. Current and Future Treatments for Graves' Disease and Graves' Ophthalmopathy. *Horm Metab Res* 2018;50(12):871-886, doi:10.1055/a-0739-8134
33. Meyer Zu Horste M, Pateronis K, Walz MK, et al. The Effect of Early Thyroidectomy on the Course of Active Graves' Orbitopathy (GO): A Retrospective Case Study. *Horm Metab Res* 2016;48(7):433-9, doi:10.1055/s-0042-108855
34. Bartalena L, Marcocci C, Tanda ML, et al. Orbital radiotherapy for Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 2002;12(3):245-50, doi:10.1089/105072502753600223
35. Wiersinga WM. Advances in medical therapy of thyroid-associated ophthalmopathy. *Orbit* 1996;15(177-186
36. Marcocci C, Bartalena L, Bogazzi F, et al. Orbital radiotherapy combined with high dose systemic glucocorticoids for Graves' ophthalmopathy is more effective than radiotherapy alone: results of a prospective randomized study. *J Endocrinol Invest* 1991;14(10):853-60, doi:10.1007/BF03347943
37. Londzin-Olesik M, Kos-Kudla B, Karpe J, et al. The Effect of Immunosuppression on Selected Antioxidant Parameters in Patients with Graves' Disease with Active Thyroid-

Associated Orbitopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2021;129(10):762-769, doi:10.1055/a-1274-0998

38. Sackstein R. Effects of methylprednisolone administration on lymphocyte LECAM-1, CD44, and LFA-1 expression. Implications for steroid-induced lymphopenia. *Ann N Y Acad Sci* 1993;696(417-9, doi:10.1111/j.1749-6632.1993.tb17183.x
39. Deshpande M, Papp S, Schaffer L, et al. Hydrocortisone and triiodothyronine regulate hyaluronate synthesis in a tissue-engineered human dermal equivalent through independent pathways. *J Biosci Bioeng* 2015;119(2):226-36, doi:10.1016/j.jbiosc.2014.08.001
40. Stuhlmeier KM, Pollaschek C. Differential effect of transforming growth factor beta (TGF-beta) on the genes encoding hyaluronan synthases and utilization of the p38 MAPK pathway in TGF-beta-induced hyaluronan synthase 1 activation. In: *J Biol Chem*. United States; 2004; pp. 8753-60.
41. Gianoukakis AG, Jennings TA, King CS, et al. Hyaluronan accumulation in thyroid tissue: evidence for contributions from epithelial cells and fibroblasts. *Endocrinology* 2007;148(1):54-62, doi:10.1210/en.2006-0736
42. Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ. Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. *Endocr Rev* 2003;24(6):802-35, doi:10.1210/er.2002-0020
43. Feldon SE, Park DJ, O'Loughlin CW, et al. Autologous T-lymphocytes stimulate proliferation of orbital fibroblasts derived from patients with Graves' ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46(11):3913-21, doi:10.1167/iovs.05-0605
44. Lee MH, Chin YH, Ng CH, et al. Risk Factors of Thyroid Eye Disease. *Endocr Pract* 2021;27(3):245-253, doi:10.1016/j.eprac.2020.11.011
45. Girnita L, Smith TJ, Janssen JAMJ. It Takes Two to Tango: IGF-I and TSH Receptors in Thyroid Eye Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2022;107(Suppl_1):S1-S12, doi:10.1210/clinem/dgac045
46. Tsui S, Naik V, Hoa N, et al. Evidence for an association between thyroid-stimulating hormone and insulin-like growth factor 1 receptors: a tale of two antigens implicated in Graves' disease. *J Immunol* 2008;181(6):4397-405, doi:10.4049/jimmunol.181.6.4397
47. Brenner-Gati L, Berg KA, Gershengorn MC. Thyroid-stimulating hormone and insulin-like growth factor-1 synergize to elevate 1,2-diacylglycerol in rat thyroid cells. Stimulation of DNA synthesis via interaction between lipid and adenylyl cyclase signal transduction systems. *J Clin Invest* 1988;82(3):1144-8, doi:10.1172/JCI113672
48. Rodriguez-Arno J, Miell JP, Ross RJ. Influence of thyroid hormones on the GH-IGF-I axis. *Trends Endocrinol Metab* 1993;4(5):169-73, doi:10.1016/1043-2760(93)90107-p

49. Fernando R, Atkins SJ, Smith TJ. Intersection of Chemokine and TSH Receptor Pathways in Human Fibrocytes: Emergence of CXCL-12/CXCR4 Cross Talk Potentially Relevant to Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *Endocrinology* 2016;157(10):3779-3787, doi:10.1210/en.2016-1382
50. Kuriyan AE, Phipps RP, Feldon SE. The eye and thyroid disease. *Curr Opin Ophthalmol* 2008;19(6):499-506, doi:10.1097/ICU.0b013e3283131557
51. Morshed SA, Ma R, Latif R, et al. How one TSH receptor antibody induces thyrocyte proliferation while another induces apoptosis. *J Autoimmun* 2013;47(17-24, doi:10.1016/j.jaut.2013.07.009
52. Kumar S, Coenen M, Iyer S, et al. Forkhead Transcription Factor FOXO1 Is Regulated by Both a Stimulatory Thyrotropin Receptor Antibody and Insulin-Like Growth Factor-1 in Orbital Fibroblasts from Patients with Graves' Ophthalmopathy. *Thyroid* 2015;25(10):1145-50, doi:10.1089/thy.2015.0254
53. Morshed SA, Davies TF. Graves' Disease Mechanisms: The Role of Stimulating, Blocking, and Cleavage Region TSH Receptor Antibodies. *Horm Metab Res* 2015;47(10):727-34, doi:10.1055/s-0035-1559633
54. Woeller CF, Roztocil E, Hammond C, et al. TSHR Signaling Stimulates Proliferation Through PI3K/Akt and Induction of miR-146a and miR-155 in Thyroid Eye Disease Orbital Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2019;60(13):4336-4345, doi:10.1167/iovs.19-27865
55. Cao D, Lei Y, Ye Z, et al. Blockade of IGF/IGF-1R signaling axis with soluble IGF-1R mutants suppresses the cell proliferation and tumor growth of human osteosarcoma. *Am J Cancer Res* 2020;10(10):3248-3266
56. Krieger CC, Morgan SJ, Neumann S, et al. Thyroid Stimulating Hormone (TSH)/Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1) Receptor Cross-talk in Human Cells. *Curr Opin Endocr Metab Res* 2018;2(29-33, doi:10.1016/j.coemr.2018.01.007
57. Mohyi M, Smith TJ. IGF1 receptor and thyroid-associated ophthalmopathy. *J Mol Endocrinol* 2018;61(1):T29-T43, doi:10.1530/JME-17-0276
58. Krieger CC, Neumann S, Gershengorn MC. Is There Evidence for IGF1R-Stimulating Abs in Graves' Orbitopathy Pathogenesis? *Int J Mol Sci* 2020;21(18), doi:10.3390/ijms21186561
59. Krieger CC, Perry JD, Morgan SJ, et al. TSH/IGF-1 Receptor Cross-Talk Rapidly Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases in Multiple Cell Types. *Endocrinology* 2017;158(10):3676-3683, doi:10.1210/en.2017-00528

60. Smith TJ, Janssen JAMJ. Insulin-like Growth Factor-I Receptor and Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *Endocr Rev* 2019;40(1):236-267, doi:10.1210/er.2018-00066
61. Varewijck AJ, Boelen A, Lamberts SW, et al. Circulating IgGs may modulate IGF-I receptor stimulating activity in a subset of patients with Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(2):769-76, doi:10.1210/jc.2012-2270
62. Görtz GE, Moshkelgosha S, Jesenek C, et al. Pathogenic Phenotype of Adipogenesis and Hyaluronan in Orbital Fibroblasts From Female Graves' Orbitopathy Mouse Model. *Endocrinology* 2016;157(10):3771-3778, doi:10.1210/en.2016-1304
63. Ma R, Li Q, Wang Z, et al. Modulation of hyaluronan polymer size regulates proliferation of perimysial fibroblasts in thyroid eye disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;496(4):1376-1381, doi:10.1016/j.bbrc.2018.02.037
64. Emori T, Kasahara M, Sugahara S, et al. Role of JAK-STAT signaling in the pathogenic behavior of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis: Effect of the novel JAK inhibitor peficitinib. *Eur J Pharmacol* 2020;882(173238), doi:10.1016/j.ejphar.2020.173238
65. Nishikai-Yan Shen T, Kanazawa S, Kado M, et al. Interleukin-6 stimulates Akt and p38 MAPK phosphorylation and fibroblast migration in non-diabetic but not diabetic mice. *PLoS One* 2017;12(5):e0178232, doi:10.1371/journal.pone.0178232
66. Hwang CJ, Afifiyan N, Sand D, et al. Orbital fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy overexpress CD40: CD154 hyperinduces IL-6, IL-8, and MCP-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(5):2262-8, doi:10.1167/iovs.08-2328
67. Chung SA, Jeon BK, Choi YH, et al. Pirfenidone attenuates the IL-1 β -induced hyaluronic acid increase in orbital fibroblasts from patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(4):2276-83, doi:10.1167/iovs.13-13759
68. Xi X, McMillan DH, Lehmann GM, et al. Ocular fibroblast diversity: implications for inflammation and ocular wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(7):4859-65, doi:10.1167/iovs.10-7066
69. Chen Q. The expression of interleukin-15 and interleukin-17 in tears and orbital tissues of Graves ophthalmopathy patients. *J Cell Biochem* 2019;120(4):6299-6303, doi:10.1002/jcb.27916
70. Fang S, Huang Y, Zhong S, et al. IL-17A Promotes RANTES Expression, But Not IL-16, in Orbital Fibroblasts Via CD40-CD40L Combination in Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(14):6123-6133, doi:10.1167/iovs.16-20199

71. Adamidou F, Anagnostis P, Boboridis K, et al. Enduring remission of active and sight-threatening Graves' orbitopathy with rituximab: report of two cases. *Endocr J* 2018;65(9):963-967, doi:10.1507/endocrj.EJ18-0074
72. Allen RC, Bradley EA, Fante RG, et al. A Perspective on the Current Role of Teprotumumab in Treatment of Thyroid Eye Disease. *Ophthalmology* 2021;128(8):1125-1128, doi:10.1016/j.ophtha.2021.03.006
73. Lee JS, Chae MK, Kikkawa DO, et al. Glycogen Synthase Kinase-3 β Mediates Proinflammatory Cytokine Secretion and Adipogenesis in Orbital Fibroblasts from Patients with Graves' Orbitopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2020;61(8):51, doi:10.1167/iovs.61.8.51
74. Hayden MS, Ghosh S. Regulation of NF- κ B by TNF family cytokines. *Semin Immunol* 2014;26(3):253-66, doi:10.1016/j.smim.2014.05.004
75. Grewal IS, Flavell RA. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev* 1996;153(85-106), doi:10.1111/j.1600-065x.1996.tb00921.x
76. Sempowski GD, Rozenblit J, Smith TJ, et al. Human orbital fibroblasts are activated through CD40 to induce proinflammatory cytokine production. *Am J Physiol* 1998;274(3):C707-14, doi:10.1152/ajpcell.1998.274.3.C707
77. Korducki JM, Loftus SJ, Bahn RS. Stimulation of glycosaminoglycan production in cultured human retroocular fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33(6):2037-42
78. Smith TJ, Wang HS, Evans CH. Leukoregulin is a potent inducer of hyaluronan synthesis in cultured human orbital fibroblasts. *Am J Physiol* 1995;268(2 Pt 1):C382-8, doi:10.1152/ajpcell.1995.268.2.C382
79. Wang HS, Cao HJ, Winn VD, et al. Leukoregulin induction of prostaglandin-endoperoxide H synthase-2 in human orbital fibroblasts. An in vitro model for connective tissue inflammation. *J Biol Chem* 1996;271(37):22718-28
80. Łacheta D, Miśkiewicz P, Głuszko A, et al. Immunological Aspects of Graves' Ophthalmopathy. *Biomed Res Int* 2019;2019(7453260), doi:10.1155/2019/7453260
81. Valyasevi RW, Harteneck DA, Dutton CM, et al. Stimulation of adipogenesis, peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma), and thyrotropin receptor by PPARgamma agonist in human orbital preadipocyte fibroblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(5):2352-8, doi:10.1210/jcem.87.5.8472
82. Starkey KJ, Janezic A, Jones G, et al. Adipose thyrotrophin receptor expression is elevated in Graves' and thyroid eye diseases ex vivo and indicates adipogenesis in progress in vivo. *J Mol Endocrinol* 2003;30(3):369-80, doi:10.1677/jme.0.0300369

83. Dik WA, Virakul S, van Steensel L. Current perspectives on the role of orbital fibroblasts in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *Exp Eye Res* 2016;142(83-91, doi:10.1016/j.exer.2015.02.007
84. De Wever O, Demetter P, Mareel M, et al. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. *Int J Cancer* 2008;123(10):2229-38, doi:10.1002/ijc.23925
85. Eyden B, Banerjee SS, Shenjere P, et al. The myofibroblast and its tumours. *J Clin Pathol* 2009;62(3):236-49, doi:10.1136/jcp.2008.061630
86. Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, et al. Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005;289(1):G2-7, doi:10.1152/ajpgi.00075.2005
87. Schuster R, Rockel JS, Kapoor M, et al. The inflammatory speech of fibroblasts. *Immunol Rev* 2021;302(1):126-146, doi:10.1111/imr.12971
88. Tai Y, Woods EL, Dally J, et al. Myofibroblasts: Function, Formation, and Scope of Molecular Therapies for Skin Fibrosis. *Biomolecules* 2021;11(8), doi:10.3390/biom11081095
89. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3(5):349-63, doi:10.1038/nrm809
90. Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, et al. Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity. *Mol Biol Cell* 2001;12(9):2730-41, doi:10.1091/mbc.12.9.2730
91. Hinz B, Pittet P, Smith-Clerc J, et al. Myofibroblast development is characterized by specific cell-cell adherens junctions. *Mol Biol Cell* 2004;15(9):4310-20, doi:10.1091/mbc.e04-05-0386
92. Duscher D, Maan ZN, Wong VW, et al. Mechanotransduction and fibrosis. *J Biomech* 2014;47(9):1997-2005, doi:10.1016/j.jbiomech.2014.03.031
93. Lodyga M, Cambridge E, Karvonen HM, et al. Cadherin-11-mediated adhesion of macrophages to myofibroblasts establishes a profibrotic niche of active TGF- β . *Sci Signal* 2019;12(564), doi:10.1126/scisignal.aao3469
94. Henderson NC, Arnold TD, Katamura Y, et al. Targeting of α v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat Med* 2013;19(12):1617-24, doi:10.1038/nm.3282
95. Evans RA, Tian YC, Steadman R, et al. TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins. *Exp Cell Res* 2003;282(2):90-100, doi:10.1016/s0014-4827(02)00015-0

96. Ren LL, Li XJ, Duan TT, et al. Transforming growth factor- β signaling: From tissue fibrosis to therapeutic opportunities. *Chem Biol Interact* 2023;369(110289, doi:10.1016/j.cbi.2022.110289
97. Midgley AC, Oltean S, Hascall V, et al. Nuclear hyaluronidase 2 drives alternative splicing of. *Sci Signal* 2017;10(506), doi:10.1126/scisignal.aao1822
98. Webber J, Jenkins RH, Meran S, et al. Modulation of TGFbeta1-dependent myofibroblast differentiation by hyaluronan. *Am J Pathol* 2009;175(1):148-60, doi:10.2353/ajpath.2009.080837
99. MacDonald BT, He X. Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/ β -catenin signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4(12), doi:10.1101/cshperspect.a007880
100. Tepekoy F, Akkoyunlu G, Demir R. The role of Wnt signaling members in the uterus and embryo during pre-implantation and implantation. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(3):337-46, doi:10.1007/s10815-014-0409-7
101. Hamburg-Shields E, DiNuoscio GJ, Mullin NK, et al. Sustained β -catenin activity in dermal fibroblasts promotes fibrosis by up-regulating expression of extracellular matrix protein-coding genes. *J Pathol* 2015;235(5):686-97, doi:10.1002/path.4481
102. Akhmetshina A, Palumbo K, Dees C, et al. Activation of canonical Wnt signalling is required for TGF- β -mediated fibrosis. *Nat Commun* 2012;3(735), doi:10.1038/ncomms1734
103. Sun Q, Guo S, Wang CC, et al. Cross-talk between TGF- β /Smad pathway and Wnt/ β -catenin pathway in pathological scar formation. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(6):7631-9
104. Yue J, Mulder KM. Transforming growth factor-beta signal transduction in epithelial cells. *Pharmacol Ther* 2001;91(1):1-34, doi:10.1016/s0163-7258(01)00143-7
105. Lichtman MK, Otero-Vinas M, Falanga V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. *Wound Repair Regen* 2016;24(2):215-22, doi:10.1111/wrr.12398
106. Shi M, Zhu J, Wang R, et al. Latent TGF- β structure and activation. *Nature* 2011;474(7351):343-9, doi:10.1038/nature10152
107. Annes JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGFbeta activation. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 2):217-24, doi:10.1242/jcs.00229
108. Moustakas A, Heldin CH. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* 2009;136(22):3699-714, doi:10.1242/dev.030338
109. Hargittai I, Hargittai M. Molecular structure of hyaluronan: an introduction. *Structural Chemistry* 2008;19(5):697-717, doi:10.1007/s11224-008-9370-3

110. Tammi MI, Day AJ, Turley EA. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J Biol Chem* 2002;277(7):4581-4, doi:10.1074/jbc.R100037200
111. Hinz B. The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: Tale of a strained relationship. *Matrix Biol* 2015;47(54-65), doi:10.1016/j.matbio.2015.05.006
112. Meran S, Thomas DW, Stephens P, et al. Hyaluronan facilitates transforming growth factor-beta1-mediated fibroblast proliferation. *J Biol Chem* 2008;283(10):6530-45, doi:10.1074/jbc.M704819200
113. Evanko SP, Potter-Perigo S, Petty LJ, et al. Hyaluronan Controls the Deposition of Fibronectin and Collagen and Modulates TGF- β 1 Induction of Lung Myofibroblasts. *Matrix Biol* 2015;42(74-92), doi:10.1016/j.matbio.2014.12.001
114. Cyphert JM, Trempus CS, Garantziotis S. Size Matters: Molecular Weight Specificity of Hyaluronan Effects in Cell Biology. *Int J Cell Biol* 2015;2015(563818), doi:10.1155/2015/563818
115. Menzel EJ, Farr C. Hyaluronidase and its substrate hyaluronan: biochemistry, biological activities and therapeutic uses. *Cancer Lett* 1998;131(1):3-11, doi:10.1016/s0304-3835(98)00195-5
116. Ghosh S, Hoselton SA, Dorsam GP, et al. Hyaluronan fragments as mediators of inflammation in allergic pulmonary disease. *Immunobiology* 2015;220(5):575-88, doi:10.1016/j.imbio.2014.12.005
117. Sato S, Miyazaki M, Fukuda S, et al. Human TMEM2 is not a catalytic hyaluronidase, but a regulator of hyaluronan metabolism via HYBID (KIAA1199/CEMIP) and HAS2 expression. *J Biol Chem* 2023;299(6):104826, doi:10.1016/j.jbc.2023.104826
118. Smith TJ. Insights into the role of fibroblasts in human autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* 2005;141(3):388-97, doi:10.1111/j.1365-2249.2005.02824.x
119. Heldin P, Lin CY, Kollipoulos C, et al. Regulation of hyaluronan biosynthesis and clinical impact of excessive hyaluronan production. *Matrix Biol* 2019;78-79(100-117), doi:10.1016/j.matbio.2018.01.017
120. van Steensel L, Hooijkaas H, Paridaens D, et al. PDGF enhances orbital fibroblast responses to TSHR stimulating autoantibodies in Graves' ophthalmopathy patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(6):E944-53, doi:10.1210/jc.2012-1020
121. van Steensel L, Paridaens D, van Meurs M, et al. Orbit-infiltrating mast cells, monocytes, and macrophages produce PDGF isoforms that orchestrate orbital fibroblast activation in Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(3):E400-8, doi:10.1210/jc.2011-2697

122. Bonner JC. Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15(4):255-73, doi:10.1016/j.cytogfr.2004.03.006
123. Papp FR, Katko M, Csiki R, et al. Characteristics of Hyaluronan Metabolism During Myofibroblast Differentiation in Orbital Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2024;65(13):13, doi:10.1167/iovs.65.13.13
124. Galgoczi E, Katko M, Papp FR, et al. Glucocorticoids Directly Affect Hyaluronan Production of Orbital Fibroblasts; A Potential Pleiotropic Effect in Graves' Orbitopathy. *Molecules* 2022;28(1), doi:10.3390/molecules28010015
125. Bahn RS, Gorman CA, Woloschak GE, et al. Human retroocular fibroblasts in vitro: a model for the study of Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65(4):665-70, doi:10.1210/jcem-65-4-665
126. Cowman MK, Chen CC, Pandya M, et al. Improved agarose gel electrophoresis method and molecular mass calculation for high molecular mass hyaluronan. *Anal Biochem* 2011;417(1):50-6, doi:10.1016/j.ab.2011.05.023
127. Cowman MK. Methods for Hyaluronan Molecular Mass Determination by Agarose Gel Electrophoresis. *Methods Mol Biol* 2019;1952(91-102), doi:10.1007/978-1-4939-9133-4_8
128. Lee JY, Lee CY, Hwang I, et al. Malignancy risk stratification of thyroid nodules according to echotexture and degree of hypoechogenicity: a retrospective multicenter validation study. *Sci Rep* 2022;12(1):16587, doi:10.1038/s41598-022-21204-5
129. Grubeck-Loebenstein B, Trieb K, Sztankay A, et al. Retrobulbar T cells from patients with Graves' ophthalmopathy are CD8+ and specifically recognize autologous fibroblasts. *J Clin Invest* 1994;93(6):2738-43, doi:10.1172/JCI117289
130. Lehmann GM, Woeller CF, Pollock SJ, et al. Novel anti-adipogenic activity produced by human fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010;299(3):C672-81, doi:10.1152/ajpcell.00451.2009
131. Koumas L, Smith TJ, Feldon S, et al. Thy-1 expression in human fibroblast subsets defines myofibroblastic or lipofibroblastic phenotypes. *Am J Pathol* 2003;163(4):1291-300, doi:10.1016/S0002-9440(10)63488-8
132. Midgley AC, Rogers M, Hallett MB, et al. Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1)-stimulated fibroblast to myofibroblast differentiation is mediated by hyaluronan (HA)-facilitated epidermal growth factor receptor (EGFR) and CD44 co-localization in lipid rafts. *J Biol Chem* 2013;288(21):14824-38, doi:10.1074/jbc.M113.451336

133. Pawlowski P, Reszec J, Eckstein A, et al. Markers of inflammation and fibrosis in the orbital fat/connective tissue of patients with Graves' orbitopathy: clinical implications. *Mediators Inflamm* 2014;2014(412158), doi:10.1155/2014/412158
134. Ko J, Kim YJ, Choi SH, et al. Yes-Associated Protein Mediates the Transition from Inflammation to Fibrosis in Graves' Orbitopathy. *Thyroid* 2023;33(12):1465-1475, doi:10.1089/thy.2023.0309
135. Yang S, Wang X, Xiao W, et al. Dihydroartemisinin Exerts Antifibrotic and Anti-Inflammatory Effects in Graves' Ophthalmopathy by Targeting Orbital Fibroblasts. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13(891922), doi:10.3389/fendo.2022.891922
136. Talele NP, Fradette J, Davies JE, et al. Expression of α -Smooth Muscle Actin Determines the Fate of Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports* 2015;4(6):1016-30, doi:10.1016/j.stemcr.2015.05.004
137. Szeto SG, Narimatsu M, Lu M, et al. YAP/TAZ Are Mechanoregulators of TGF-. *J Am Soc Nephrol* 2016;27(10):3117-3128, doi:10.1681/ASN.2015050499
138. Younesi FS, Miller AE, Barker TH, et al. Fibroblast and myofibroblast activation in normal tissue repair and fibrosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2024, doi:10.1038/s41580-024-00716-0
139. Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010;26(397-419), doi:10.1146/annurev-cellbio-100109-104020
140. Bednarczuk T, Kiljanski J, Mrowiec T, et al. T cell interactions with extracellular matrix proteins in patients with thyroid-associated ophthalmopathy. *Autoimmunity* 1998;27(4):221-30, doi:10.3109/08916939808993834
141. Galgoczi E, Jeney F, Gazdag A, et al. Cell density-dependent stimulation of PAI-1 and hyaluronan synthesis by TGF- β in orbital fibroblasts. *J Endocrinol* 2016;229(2):187-96, doi:10.1530/JOE-15-0524
142. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016;8(5), doi:10.1101/cshperspect.a021873
143. Blank U, Karlsson S. TGF- β signaling in the control of hematopoietic stem cells. *Blood* 2015;125(23):3542-50, doi:10.1182/blood-2014-12-618090
144. Baba AB, Rah B, Bhat GR, et al. Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) Signaling in Cancer-A Betrayal Within. *Front Pharmacol* 2022;13(791272), doi:10.3389/fphar.2022.791272

145. Tobisawa Y, Fujita N, Yamamoto H, et al. The cell surface hyaluronidase TMEM2 is essential for systemic hyaluronan catabolism and turnover. *J Biol Chem* 2021;297(5):101281, doi:10.1016/j.jbc.2021.101281
146. Inubushi T, Nakanishi Y, Abe M, et al. The cell surface hyaluronidase TMEM2 plays an essential role in mouse neural crest cell development and survival. *PLoS Genet* 2022;18(7):e1009765, doi:10.1371/journal.pgen.1009765
147. Schinzel RT, Higuchi-Sanabria R, Shalem O, et al. The Hyaluronidase, TMEM2, Promotes ER Homeostasis and Longevity Independent of the UPR. *Cell* 2019;179(6):1306-1318.e18, doi:10.1016/j.cell.2019.10.018
148. Irie F, Tobisawa Y, Murao A, et al. The cell surface hyaluronidase TMEM2 regulates cell adhesion and migration via degradation of hyaluronan at focal adhesion sites. *J Biol Chem* 2021;296(100481), doi:10.1016/j.jbc.2021.100481
149. Yoshino Y, Goto M, Hara H, et al. The role and regulation of TMEM2 (transmembrane protein 2) in HYBID (hyaluronan (HA)-binding protein involved in HA depolymerization/ KIAA1199/CEMIP)-mediated HA depolymerization in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;505(1):74-80, doi:10.1016/j.bbrc.2018.09.097
150. Yamamoto H, Tobisawa Y, Inubushi T, et al. A mammalian homolog of the zebrafish transmembrane protein 2 (TMEM2) is the long-sought-after cell-surface hyaluronidase. *J Biol Chem* 2017;292(18):7304-7313, doi:10.1074/jbc.M116.770149
151. Li H, Min J, Yang Y, et al. TMEM2 inhibits the development of Graves' orbitopathy through the JAK-STAT signaling pathway. *J Biol Chem* 2024;300(2):105607, doi:10.1016/j.jbc.2023.105607
152. Gupta V, Hammond CL, Roztocil E, et al. Thinking inside the box: Current insights into targeting orbital tissue remodeling and inflammation in thyroid eye disease. *Surv Ophthalmol* 2022;67(3):858-874, doi:10.1016/j.survophthal.2021.08.010
153. Längericht J, Krämer I, Kahaly GJ. Glucocorticoids in Graves' orbitopathy: mechanisms of action and clinical application. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2020;11(2042018820958335), doi:10.1177/2042018820958335
154. Gebhardt C, Averbeck M, Diedenhofen N, et al. Dermal hyaluronan is rapidly reduced by topical treatment with glucocorticoids. *J Invest Dermatol* 2010;130(1):141-9, doi:10.1038/jid.2009.210

155. 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(5):1019-23, doi:10.1210/jcem-69-5-1019
156. Puissant E, Gilis F, Dogné S, et al. Subcellular trafficking and activity of Hyal-1 and its processed forms in murine macrophages. *Traffic* 2014;15(5):500-15, doi:10.1111/tra.12162
157. Virakul S, Heutz JW, Dalm VA, et al. Basic FGF and PDGF-BB synergistically stimulate hyaluronan and IL-6 production by orbital fibroblasts. *Mol Cell Endocrinol* 2016;433(94-104), doi:10.1016/j.mce.2016.05.023
158. DeGrendele HC, Estess P, Siegelman MH. Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 1997;278(5338):672-5, doi:10.1126/science.278.5338.672
159. Papakonstantinou E, Klagas I, Karakioulakis G, et al. Steroids and β 2-agonists regulate hyaluronan metabolism in asthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012;47(6):759-67, doi:10.1165/rcmb.2012-0101OC
160. Peng Y, Lv S, Li Y, et al. Glucocorticoids Disrupt Skeletal Angiogenesis Through Transrepression of NF- κ B-Mediated Preosteoclast *Pdgfb* Transcription in Young Mice. *J Bone Miner Res* 2020;35(6):1188-1202, doi:10.1002/jbmr.3987
161. van Steensel L, Paridaens D, Dingjan GM, et al. Platelet-derived growth factor-BB: a stimulus for cytokine production by orbital fibroblasts in Graves' ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(2):1002-7, doi:10.1167/iovs.09-4338
162. Viola M, Karousou E, D'Angelo ML, et al. Regulated Hyaluronan Synthesis by Vascular Cells. *Int J Cell Biol* 2015;2015(208303), doi:10.1155/2015/208303
163. Vigetti D, Karousou E, Viola M, et al. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta* 2014;1840(8):2452-9, doi:10.1016/j.bbagen.2014.02.001
164. Puthanveetil P, Rodrigues B. Glucocorticoid excess induces accumulation of cardiac glycogen and triglyceride: suggested role for AMPK. *Curr Pharm Des* 2013;19(27):4818-30, doi:10.2174/13816128113199990340
165. Li L, Asteriou T, Bernert B, et al. Growth factor regulation of hyaluronan synthesis and degradation in human dermal fibroblasts: importance of hyaluronan for the mitogenic response of PDGF-BB. *Biochem J* 2007;404(2):327-36, doi:10.1042/BJ20061757
166. Itano N, Kimata K. Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB Life* 2002;54(4):195-9, doi:10.1080/15216540214929

12. Targyszavak

endocrin orbitopathia, orbita fibroblaszt, miofibroblaszt differenciálódás, extracelluláris mátrix, pericelluláris, hialuronsav, hialuronsav szintáz, hialuronidáz, proliferáció, TGF- β , PDGF-BB, glükokortikoidok

13. Keywords

endocrine orbitopathy, orbital fibroblast, fibroblast to myofibroblast transition, extracellular matrix, pericellular, hyaluronan, hyaluronan synthase, hyaluronidase, proliferation, TGF- β , PDGF-BB, glucocorticoids

14. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni hálámat témavezetőmnek, Dr. Nagy V. Endre professzornak, aki irányította munkámat az elmúlt évek során, és lehetővé tette, hogy az általa vezetett endokrin kutatócsoportban dolgozzak.

Köszönetemet szeretném kifejezni a Belgyógyászati Intézet igazgatójának, Prof. Dr. Balla Józsefnek, amiért lehetőséget biztosított arra, hogy az Intézet keretein belül végezhessem kutatómunkámat.

Hálával tartozom Dr. Katkó Mónikának a kísérletek részleteinek tervezése és a mérések során, valamint a tudományos publikációk összeállításában nyújtott értékes segítségéért.

Ugyancsak szeretném megköszönni a Belgyógyászati Intézet Endokrinológia-Anyagcsere Kutatólaboratórium valamennyi munkatársainak segítségét és támogatását.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Steiber Zitának, Dr. Ujhelyi Bernadettnek és Dr. Győry Ferencnek, akik kutatásomhoz a sejtvonalak létrehozásához szükséges szövetmintákat biztosították.

Végül, de nem utolsósorban, köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak, akik az évek során mellettem álltak.



Nyilvántartási szám: DEENK/564/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Papp Fruzsina Réka

Doktori Iskola: Egészségtudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Papp, F. R.**, Katkó, M., Csiki, R., Galgóczi, E., Molnár, Z., Erdei, A., Bodor, M., Steiber, Z., Ujhelyi, B., Nagy, E. V.: Characteristics of Hyaluronan Metabolism During Myofibroblast Differentiation in Orbital Fibroblasts.
Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 65 (13), 1-12, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.65.13.13>
IF: 5 (2023)
2. Galgóczi, E., Katkó, M., **Papp, F. R.**, Csiki, R., Csiha, S., Erdei, A., Bodor, M., Ujhelyi, B., Steiber, Z., Győry, F., Nagy, E. V.: Glucocorticoids Directly Affect Hyaluronan Production of Orbital Fibroblasts: a Potential Pleiotropic Effect in Graves' Orbitopathy.
Molecules. 28 (1), 1-12, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28010015>
IF: 4.6

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 9,6

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,6**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2024.11.12.

