

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Aranyosi János

A retrobulbaris kötőszövet proliferációjának okai és következményei endokrin orbitopathiában

DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A retrobulbaris kötőszövet proliferációjának okai és következményei endokrin orbitopathiában

Dr. Aranyosi János

Témavezető:

Dr. Ujhelyi Bernadett



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2023

Tartalomjegyzék:

1. Bevezetés	7
2. Irodalmi áttekintés	8
2.1. Az endokrin orbitopathia epidemiológiája	8
2.2. Az endokrin orbitopathia ethiopathogenezeise	8
2.3. Az endokrin orbitopathia klinikai képe, kórlefolyása	10
2.4. A betegség stádiumbeosztása	12
2.5. Képzővizsgálatok az EOP aktivitásának megítélésében	13
2.6. Az endokrin orbitopathia terápiája	14
2.7. A dohányzás káros hatásai endokrin orbitopathiában	16
2.8. A dohányzás újabb fajtái	17
2.9. A terhesség és a Graves basedow kór kapcsolata, terhesség során kialakuló endokrin orbitopathia.....	18
3. Célkitűzés	18
3.1 A dohányzás újabb típusai hatásának vizsgálata endokrin orbitopathiában.....	18
3.2 Terhesség hatása az endokrin orbitopathia kialakulására.....	18
4. Betegadatok és Módszerek.....	19
4.1. A dohányzás újabb típusai hatásának vizsgálata endokrin orbitopathiában.....	19
4.1.1. Betegadatok.....	19
4.1.2. Sejtkultúrák	19
4.1.3. Dohányfüstelegyek	20
4.1.4. Real-Time Cell Electronic Sensing (RT-CES) technika.....	21
4.1.5. Metabolikus aktivitás mérése.....	22
4.1.6. A hialuronsav szintjének meghatározása	22
4.1.7. Statisztikai elemzés	22
4.2. Betegadatok – Terhesség hatása az endokrin orbitopathia kialakulására.....	23
4.2.1. A tanulmányozott beteg klinikai jellemzői	23
4.2.2. Laboratóriumi vizsgálatok:	23
4.2.3. Szemészeti vizsgálatok	24
4.2.4. Perinatológiai vizsgálatok	25
5. Eredmények.....	26
5.1. A dohányzás újabb típusai hatásának vizsgálata endokrin orbitopathiában.....	26
5.1.1. Magasabb (50%) koncentrációjú CIG füstelegyek hatása az orbita fibroblastokra ...	26
5.1.2 Alacsony koncentrációjú (1%) füstelegyek hatása az orbita fibroblastokra	32

5.2. A terhesség hatása az endokrin orbitopathia kialakulására	35
6. Megbeszélés	38
6.1. A dohányzás újabb típusai hatásának vizsgálata endokrin orbitopathiában.....	38
6.2. Terhesség hatása az endokrin orbitopathia kialakulására	41
7. Új eredmények	44
7.1. Új eredmények – A dohányzás újabb típusai hatásának vizsgálata endokrin orbitopathiában	44
7.2. Új eredmények - Terhesség hatása az endokrin orbitopathia kialakulására	45
8. Összefoglalás.....	45
9. Summary	46
10. Irodalomjegyzék	47
10.1. Az értekezés által idézett közlemények.....	47
10.2. A jelölt saját közleményeinek listája	54
11. Tárgyszavak	54
12. Köszönetnyilvánítás	54
13. Függelék	54

Rövidítések jegyzéke:

CAS - Clinical Activity Score

CI – cell index / sejt index

CIG - hagyományos cigaretta

DON - dysthyroid opticus neuropathia

ECIG - elektromos cigaretta

ECM – extracelluláris matrix

EOP – endokrin orbitopathia

EUGOGO - European Group on Graves' orbitopathy

FBS - fetal bovine serum / magzati szarvasmarha szérum

FE - füstelegy

GAG - glükózaminoglikán

GD – Graves-Basedow-kór

HA – hyaluronan / hialuronsav

HT - Hashimoto thyreoiditis

HTP - heated tobacco product / hevített dohánytermék

IF- γ - interferon- γ

IGF-1R – Insulin-like growth factor 1 receptor / Inzulinszerű növekedési faktor receptor

IL-1 - interleukin 1

IL-6 - interleukin 6

OF – orbita fibroblastok

PAH - policiklikus aromás szénhidrogének

PGE2 - prostaglandin E2

RT-CES - Real-Time Cell Electronic Sensing / valós idejű sejt impedancia meghatározás

T3 - trijód-thyronin

T4 – thyroxin

TNF- α – Tumor necrosis factor α / Tumornekrózis-faktor-alfa

TRAb – TSH receptor antibody / TSH receptor antitest

TSH – thyreoidea stimuláló hormon

TSHR - thyreoidea stimuláló hormon receptor

1. Bevezetés

Az endokrin orbitopathia (EOP) az autoimmun pajzsmirigybetegségekhez leggyakrabban társuló szemészeti kórkép. Az EOP ethiopathogenezeise jelenleg még nem teljesen tisztázott, a pontos mechanizmus intenzív kutatások tárgyát képezi. Nők körében ötször gyakrabban fordul elő, a fogamzóképes korosztályú hölgyeket nagyobb eséllyel érinti. Terhességben a fiziológiás immunszuppresszió hatására az autoimmun kórképek aktivitása legtöbbször csökken. Ritkán, az esetek kevesebb, mint egy százalékában, az EOP fellángolhat a várandósság során is. Az EOP egyik legjelentősebb befolyásolható rizikófaktora a dohányzás, mely a betegség súlyosságát és a terápia hatékonyságát is nagymértékben rontja. Napjainkban a hagyományos cigaretták (CIG) mellett elterjedőben vannak az alternatív dohányzási formák, úgymint a hevített dohánytermékek (HTP), vagy az e-cigaretták (ECIG). Ezen termékek szerepe a betegség pathogenezeise szempontjából jelenleg még nem ismert. Klinikai tapasztalataink azt mutatják, hogy a dohányzásról lemondani képtelen páciensek körében a hagyományos cigarettáról a dohányzás HTP formájára történő váltás kis mértékben a klinikai tünetek javulását eredményezte. Kutatásunkban a fenti jelenséget szeretnénk volna in vitro körülmények között megvizsgálni.

Célunk EOP beteg és egészséges orbitákból eltávolított szövetből nyert primer fibroblast sejtkultúrák vizsgálata volt a különböző dohánytermékekből származó füst extraktumok hozzáadása mellett egy új módszerrel, a Real Time Cell Electronic Sensing (RT-CES) technikával. Kutatásunkban szeretnénk felállítani egy hasznos modellt az orbita fibroblastok in vitro körülmények közötti vizsgálatára.

A dohányfüstelegyek hatásának vizsgálatánál korábbi orbita műtét során nyert primer sejtkultúrák in vitro monolayerét valós idejű, elektromos változás mérésén alapuló impedancia meghatározással (RT-CES) vizsgáltuk. A sejtek metabolikus aktivitását MTT teszttel, hialuronsav (HA) termelését ELISA segítségével vizsgáltuk. A dohányfüstelegyeket egy 50%-os, valamint egy 1%-os koncentrációban adtuk a fibroblastokhoz.

Annak ellenére, hogy az autoimmun kórképek többsége terhesség során enyhülést mutat, az EOP a várandósság során is kialakulhat, és egyes esetekben eléri a súlyos, látásromlással fenyegető mértéket. Esetismertetésünkben bemutatunk egy 19 éves, dohányos nőbeteg harmadik terhessége során újonnan kialakult EOP betegségét. A szemtünetek kialakulásában

az autoimmun folyamat mellett szerepet játszhatnak a terhesség során jelentkező egyéb folyamatok is, azonban a dohányzás szerepe itt is kiemelendő.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Az endokrin orbitopathia epidemiológiája

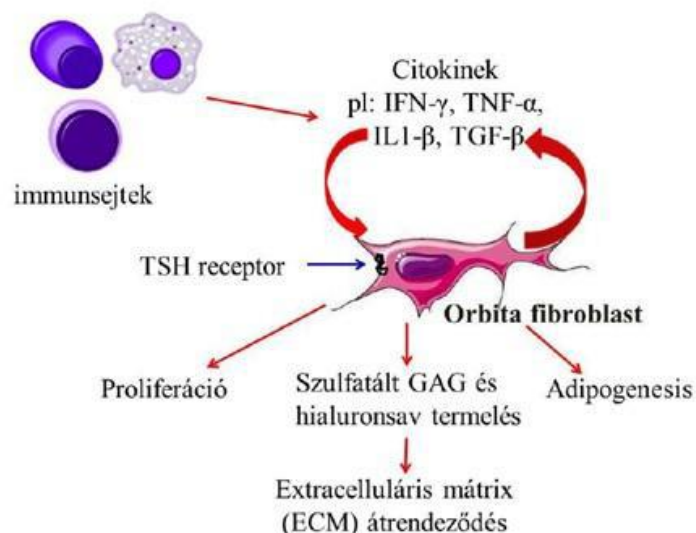
Az endokrin orbitopathia autoimmun pajzsmirigybetegekhez társuló kórkép, leggyakrabban Graves-Basedow-kórban (GD) fordul elő, azonban Hashimoto thyreoiditis (HT) esetén is megjelenhet. A Graves-Basedow-kór körülbelül a populáció 2 százalékát érinti (1). 100.000 főre vetítve a kórállapot éves incidenciája nők esetén 16, férfiaknál pedig 3 (2). A GD nőkben gyakrabban jelentkezhet, további kockázatot jelent a kialakulás szempontjából a pozitív családi anamnézis, a jelen lévő más autoimmun betegség és a dohányzás is (3). Életkor szerinti előfordulása a nemek esetén bimodális eloszlású, nők esetében 40-44 éves kor között, valamint 60-64 éves kor között, férfiaknál pedig 45-49 és 65-69 éves kor között a legjellemzőbb (4). A betegség leggyakoribb extrathyreoidális megjelenési formája az endokrin orbitopathia (EOP), amely Chin és munkatársai közlése szerint a betegek közel 40 százalékát is érintheti (5). Kiemelendő, hogy a dohányzás többszörösére növeli az EOP kialakulásának az esélyét emellett, hogy a betegek a kortikoszteroid, valamint az irradiációs kezelésre is kevésbé reagálnak, mint nem dohányzó társaik (6).

2.2. Az endokrin orbitopathia ethiopathogenezeise

A betegség hátterében lejátszódó pontos mechanizmus jelenleg is kutatások tárgyát képezi. A GD-t olyan autoantitestek okozzák, melyek a pajzsmirigy follicularis endothelialis sejtjein lévő thyrothropin receptorokhoz kötődve fokozzák a pajzsmirigy hormonok termelését (7). Az EOP ethiopathogenezisét tekintve autoimmun retrobulbáris kötőszöveti gyulladásról beszélhetünk. A folyamatot sejtes infiltráció kíséri, ahol megjelennek a T-lymphocyták, B-lymphocyták és a macrophagok is (8). A retrobulbáris térben lezajló folyamatban az orbita fibroblastoknak kiemelt szerep jut. Ezt alátámasztja Otto és munkatársai megfigyelése, in vitro körülmények között EOP páciensek orbitájából származó T-lymphocyták proliferálni kezdtek, amikor saját orbitából származó fehérjéket adtak hozzájuk (9). A lymphocyta infiltráció, valamint a cytokin felszabadulás által kiváltott fibroblast aktiváció a retrobulbáris kötőszöveti tér átalakulásához vezet. Az orbita fibroblastok (OF) cytokin-függő aktivációja fokozza a gyulladós folyamatokat és hozzájárul az orbita kötőszöveti átalakulásához. Az aktivált OF-ok fontos

szerepet töltenek be az extracelluláris matrix (ECM) elemeinek megváltozott szintézisében és lebontásában, ezáltal az EOP pathogenezisében (10). Az ECM legfőbb glükózaminoglikánja (GAG) a hialuronsav (HA), amely egy nagy molekulásúlyú poliszacharid. Alapvető fontosságú a sejt-sejt, valamint a sejt-ECM kapcsolatok kialakításában. Három izoenzim által szintetizálódik a plazmamembránban, ezek a hialuronsav-szintáz 1,2 és 3 (11). A HA a szintetizálást követően mintegy köpenyként rögzül a sejtek felszínén. Egy részük levágásra kerül a hialuronidáz enzimek által és az ECM-be épül. A fenti folyamatban létrejött változások kihatással lehetnek a HA környező szövetekben betöltött szerepére (12).

EOP betegekben az orbita fibroblastok a különböző citokinek hatására, melyek közül kiemelt szereppel bír az IL-1 és IL-6, prostaglandin E2 (PGE2), GAG termeléssel és nagy mennyiségű HA termeléssel válaszolnak (13). A felhalmozódó HA hidrofíl jellegének köszönhetően tovább gyorsítja az orbita kötőszövet expanszióját (14). Az OF-ok felszínén találhatók továbbá PGE2 receptorok is, melyekre ligandjuk bekötődése többféle hatást válthat ki a sejteken. Ezen hatásra a sejtek hosszú citoplasma-nyúlványokat alakítanak ki (15), vagy növelik a ciklikus adenosin-monofoszfát termelést, ami ugyancsak a fibroblastok morfológiai változásához vezet (16). Ezek mellett hatással van a T- lymphocyták differenciálódására (17), a B-lymphocyták működésére (18) és a hízósejtek degranulációjára is (19), melyek mind fontos szereppel bírnak az EOP pathogenezisében. Néhány OF képes érett adipocytává differenciálódni, ezen sejtek képesek több thyrothropin receptor expresszáására (20, 21). A retrobulbáris kötőszövet gyarapodása együttesen köszönhető a hydrált hialuronsavnak és a de novo adipogenezisnek (22). A lymphocyták és a HA közötti interakció fontos szerepet tölt be a leukocytá infiltráció során a gyulladt szövetekben (23).



1. ábra Az endokrin orbitopathia pathogeneze (Forrás: Galgóczi Erika)

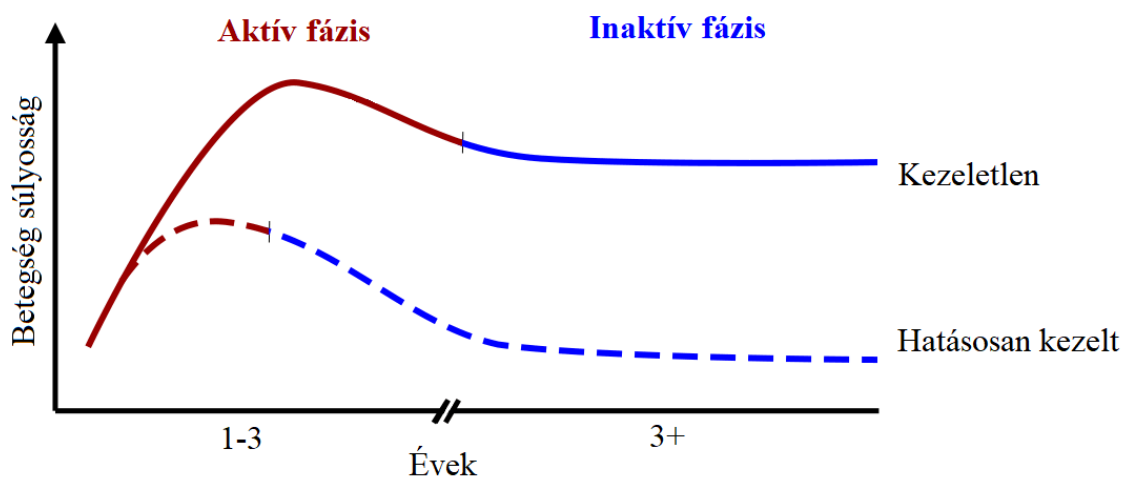
Az OF-ok EOP betegekben felszínükön képesek CD40 expresszióra is, amely egy lymphocyták, macrophágok és thyrocyták felszínén is megtalálható kostimulátorikus fehérje (24). Azon CD4⁺ T-sejtek, amelyek rendelkeznek a CD40-liganddal, közvetlenül képesek aktiválni az OF-okat, fibroblast proliferációt indukálva ezzel (25), mely hatására nagy mennyiségben termelődik IL-1 és IL-6 (26). Az IL-1, amely az OF-k és macrophágok terméke, valamint az interferon- γ (IF- γ), melyet az aktivált T-sejtek termelnek képesek növelni az OF-k hialuronsav és PGE2 termelését (27, 28). GD betegekből nyert IgG, IF- γ és IL-1 képesek stimulálni adhéziós molekulák termelését fibroblastokban, így segítve a célsejtek és gyulladásos sejtek közötti közvetlen kapcsolat kialakulását. A fentiekben leírt fibroblast aktiváció és proliferáció vezet a fokozott GAG, ezen belül az emelkedett HA termeléshez. Az így felhalmozódó hidrofíli tulajdonságú HA vízmegkötő képességének köszönhetően bekövetkezik az orbita kötőszövet expanziója (14). A megnövekedett volumen és a következményes oedema vezet az EOP jellegzetes klinikai képének kialakulásához.

2.3. Az endokrin orbitopathia klinikai képe, kórlefolyása

Az EOP klinikai megjelenését tekintve jellemző az exophthalmus, a gyulladt, oedemás szemhéjak és a szemhéjak retrakciója. Az autoimmun gyulladás a szemizmok- és az orbita kötőszöveti állományának megnövekedését okozza (8, 14). A szemizmok funkciózavara kettőslátáshoz vezethet. A nem megfelelő szemhéjzáródás miatt a könnyfilm elégtelenné válhat, minden esetben száraz szem betegséget, súlyosabb esetben szaruhártyafekélyt okozva.

A legsúlyosabb forma a dysthyroid opticus neuropathia (DON), amely a látásélesség fokozatos romlásával és tartós látásvesztéssel fenyeget (29).

Az EOP lefolyását tekintve immunológiailag aktív és inaktív szakaszra osztható (2. ábra). A kötőszövetben lejátszódó autoimmun folyamat jelenti a betegség kezdetét, ekkor klinikai tünetek még csak ritkán fordulnak elő. A betegség kezdetét követően körülbelül 6-24 hónap múlva jelentkezhetnek a klinikai tünetek, melyek ilyenkor a legsúlyosabbak. Ezután egy 1-3 évig tartó plató fázis következik (30). Az EOP aktív szakát követően, autoimmun betegségeknél ritkának számító módon az immunaktivitás mintegy önmagát korlátozva megszűnik, és elkezdődik a kötőszövetes átalakulással járó fibrotizáló, vagy inaktív szak (31). Ilyenkor már a következményes szöveti hegesedés dominál és az autoimmun folyamat a háttérbe szorul.



2. ábra Rundle-görbe (30)

Legfőbb tünetei a szemszárazság, a fokozott könnyezés, fényérzékenység, kettőslátás, valamint jelentkezhet szemek mögötti nyomásérzés is. A klinikai képre jellemzők a felső szemhéj retractiója, a conjunctiva és periorbitális szövetek erythemája és az exophthalmus. A betegek körülbelül 3-5%-át érinti a súlyos lefolyású EOP, amely jelentős fájdalommal, gyulladással, látást veszélyeztető cornea fekélyel, esetenként kompressziós opticus neuropathiával járhat (32). Emellett GD-ben gyakori a szubklinikus szemérintettség, a betegek közel 70%-ában is jelen lehet MR és CT felvételen kimutatható szemizommegnagyobbodás (33).



3. ábra Exophthalmus, az endokrin orbitopathia jellegzetes klinikai tünete (Forrás: DE ÁOK Szemészeti Tanszék saját anyagából)

Fontos, hogy páciensek vizsgálata és a kórkép klinikai értékelése olyan centrumokban történjen, ahol a témában jártas endokrinológus, szemész, sebész, sugárterapeuta és nukleáris medicina szakember, azaz minden a betegség diagnosztikájában és terápiában résztvevő társszakma képviselői is jelen vannak (34).

2.4. A betegség stádiumbeosztása

A diagnosztika során két fő szempontot kell figyelembe venni: a betegség súlyosságát, vagyis a diszfunkció mértékét, valamint a betegség aktivitását, azaz a gyulladás mértékének megítélését. Ez a kettő akár egyszerre is tetőzhet, azonban legtöbbször a gyulladás hamarabb jelentkezik, mint a klinikai tünetek (35).

A Clinical Activity Score (CAS) a betegség aktivitásának meghatározására használt klinikai pontrendszer. Az alábbi tünetek meglétére 1-1 pontot kap a páciens: spontán retrobulbáris fájdalom, fájdalom bizonyos irányba tekintéskor, szemhéjak vörössége, conjunctiva vörössége, szemhéjak duzzanata, caruncula duzzanata, chemosis. Ha a beteget 3 hónapon belül már vizsgálták, a pontozás kiegészíthető a következő feltételekkel is: csökkent vízus, romló kettőslátás, és fokozódott exophthalmus az előző vizsgálat óta. Az EOP aktívnak tekintendő ha a beteg az első vizsgálat esetén 3 vagy több pontot ér el a 7 pontos skálán, ismétlő vizsgálat esetén ehhez pedig 4 vagy több pont elérése szükséges a 10 pontos skálán.

A súlyosság megítélésére két pontrendszer is elterjedt. Az European Group on Graves orbitopathy (EUGOGO) osztályozás, valamint a NOSPECS.

Az EUGOGO osztályozást a Graves-Basedow-kórral foglalkozó európai munkacsoport hozta létre (34). Itt a következő három csoportba sorolják a betegeket: enyhe (Mild), mérsékelttől súlyos fokú (Moderate-to-severe), és vaksággal fenyegető (Sight-threatening). Enyhének mondhatók az EOP tünetei, ha csak csekély hatással vannak a betegek hétköznapi életére és nem indokolnak immunszuppresszív kezelést. Jellemzői lehetnek: kevesebb mint 2 mm-es szemhéj retractio, enyhe lágyszövet érintettség, kevesebb mint 3 mm-es exophthalmus, intermittáló vagy hiányzó kettőslátás, cornea érintettség hiánya és a nervus opticus normál státusza. A fentiek közül egy vagy több tünet jelenléte jellemző ebben a stádiumban. Mérsékelttől súlyos fokú EOP csoportba sorolandók azok a betegek, akiknek a mindennapokban már nehézségeket okoznak panaszaik és indokolt lehet az immunszuppresszív terápia vagy a sebészi kezelés. Kettő, vagy több is jellemző lehet az alábbiak közül: 2 mm-t meghaladó szemhéj retractio, mérsékelt vagy súlyos lágyszövet érintettség, 3 mm-t meghaladó exophthalmus, gyakori kettőslátás, enyhe cornea érintettség és a nervus opticus normál státusza. Vaksággal fenyegető EOP, ahol megjelennek a cornea fekélyek és/vagy a dysthyroid opticus neuropathia (DON), ami látásromlással vagy a színlátás intenzitásában vagy minőségében fellépő zavarokkal jelentkezik.

A NOSPECS egy betűszó, amely a vizsgált kritériumok kezdőbetűiből tevődik össze. *No signs or symptoms* - nincsenek klinikai jelek, sem tünetek. *Only signs, no symptoms* - csak klinikai jelek tünetek nélkül. *Soft tissue involvement* – lágyszövet érintettség. *Proptosis* – exophthalmus. *Extraocular muscle involvement* – külső szemizom érintettség. *Corneal involvement* – cornea érintettség. *Sight loss* – látásvesztés (36). Európában az EUGOGO osztályozás az elterjedtebb.

2.5. Képalkotó vizsgálatok az EOP aktivitásának megítélésében

Az EOP megítélésére képalkotó eljárások közül az orbita mágneses rezonancia (MR) vizsgálata terjedt el leginkább. Amennyiben a betegség aktív, a szemizmokon mért T2 relaxációs idő megnyúlik, az immunszuppresszív kezelés hatékonysága esetén ugyanez a paraméter pedig megrövidül (37). Így az izmokban zajló gyulladás megítélhető, az izmok térfogatának változása mérhetővé válik (38). Meg kell azonban említeni, hogy az MR nem magát a gyulladást, hanem a következményes oedémát mutatja ki (39). A retrobulbáris zsírszövetről, mely az autoimmun folyamat valódi színtere nem szolgáltat kellő mértékű információt. Mindezek mellett az MR vizsgálat további előnye, hogy az orbita anatómiai viszonyairól pontos képet ad, így például dekompresziós műtétek tervezésénél elvégzése feltétlenül indokolt (40).

Az izotópdiagnosztikai technikák közül elsőként az ^{111}In -octreotide scintigraphia alkalmazhatóságáról számoltak be (41). A módszer elve, hogy a gyulladás helyére vándorló lymphocyták szomatosztatin receptorához kötődő radiofarmakon miatt a gyulladás helyszínén izotópdúsulás jön létre, amely detektálható. Előnye, hogy pontosan meg tudja jelölni a gyulladt szöveteket és magáról az autoimmun folyamat meglétéről vagy hiányáról ad információt. Az Octreoscan nevű eljárás hátrányai közé sorolandó, hogy a magas költségei miatt széles körben nem terjedt el (42), valamint hogy a leképezett területről nem szolgáltat anatómiai képet és a pácienseknek sugárterhelést jelenthet (40).

A $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA (dietilén triamin pentaacetát) SPECT EOP-ban történő alkalmazhatósága mára munkacsoportunk rutin eljárásává vált. A $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA komplex egy 492 Da súlyú molekula, mely méretéből adódóan a keringésbe juttatva extravasalodik a megnövekedett kapilláris permeabilitással rendelkező szakaszon, míg a normál kapilláris szerkezet esetén a lumenen belül marad (43). Ahol gyulladás zajlik a szervezetben, mindig számolni kell a kapilláris permeabilitás fokozódásával. Az érpályából így kijutó radiofarmakon az intersticiális folyadék polypeptidjeihez kötődve megjelöli az aktív gyulladás helyét és az így létrejött dúsulás SPECT módszerrel detektálható. Az Octreoscan és DTPA SPECT vizsgálatot összehasonlítva a mérési eredmények egymással összhangban vannak, azonban a SPECT lényegesen költséghatékonyabb módszer (44).

2.6. Az endokrin orbitopathia terápiája

A 2008-ban megjelent és 2021-ben módosított EUGOGO irányelveiben a korábbi évek publikációit felhasználva dolgozták ki a jelenleg is érvényes és alkalmazandó terápiás elveket (34, 45). A betegség kezelése során, főként a súlyos eseteknél rendkívül fontos, hogy a pácienseket az EOP kezelésére specializálódott centrumokban lássuk el, ahol az endokrinológus, a szemész, a sugárterápiás szakember, valamint a pajzsmirigysebész együttműködve tud dolgozni. Kiemelten fontos az euthyreoid állapot helyreállítása, hiszen mind a hyperthyreosis, mind a hypothyreosis ronthat az EOP súlyosságán. A pajzsmirigy műtéti eltávolítása gyakran önmagában is jelentős javulást eredményez (34). Meglévő EOP esetén a radiojód kezelés ellenjavallt, mivel a betegek körülbelül 15%-ánál a szemetünetek romlását okozza, illetve újkeletű EOP-ot is indukálhat. A veszélyeztetett csoportba tartozó pácienseket, akiknek magas TRAb szintje van, valamint a dohányosokat a radiojód kezelés után preventív céllal 1-3 hónapig orális kortikoszteroid kezelésben kell részesíteni (8, 46, 47).

Fontos hangsúlyozni, hogy a dohányzás elhagyása önmagában is jelentős javuláshoz vezethet EOP betegeknél, illetve a megfelelő kezelés szempontjából is elengedhetetlen. Az elszívott cigaretták számával arányosan nő az EOP kialakulásának esélye, dohányosokban a betegség súlyosabb formában fejlődik ki és az alkalmazott kezelésre is kevésbé reagálnak, mint a nem dohányzó társaik (34, 48, 49).

Az aktív EOP általánosan elfogadott kezelése a kortikoszteroid terápia, valamint a retrobulbáris irradiáció. Ha a betegség enyhe lefolyást mutat, nincs szükség immunszuppresszív kezelésre, viszont a páciensek szoros kontrollja javasolt. A középsúlyos és súlyos esetekben az aktív szakaszban a pulzatilis intravénás kortikoszteroid kezelést kell választanunk, majd áttérve az orális kezelésre, fokozatosan kell csökkentenünk a dózist. A kumulatív dózis az évi 6 gramm metilprednizolont nem haladhatja meg a fulmináns májelégtelenség veszélye miatt (34, 48). A súlyos esetekben, amelyek opticus neuropathiát okozhatnak és a látást veszélyeztetik, elsővonalon nagy dózisú intravénás kortikoszteroid kezelést alkalmazunk. Amennyiben a fenti kezelés hatására nem tapasztalunk objektív javulást az első napokban, a sürgős orbita dekompresziós műtét elvégzése a következő lépés. Ha a kortikoszteroid kezelés nem hatásos, vagy valamilyen oknál fogva kontraindikált (pl.: szteroidindukált pszichózis) retrobulbáris irradiáció választható önmagában, bár ez a kezelés is szteroiddal kombinálva hatásosabb (34, 48). A szelén az antioxidáns hatású enzimeként funkcionáló szelenoproteinek alkotórésze, fontos szereppel bír az immunrendszer normál működésében. Marcocci és munkatársai vizsgálata alapján enyhe EOP-ban napi 200 µg szelén szedése kedvező hatással bír a szemtünetek időbeni alakulására és az életminőségre (50).

Már a betegség enyhe eseteiben is alkalmaznunk kell lokális szemészeti készítményeket, például műkönnyet a cornea védelmére, valamint ha a szemnyomás megemelkedik, antiglaucomás cseppek használata is indokoltá válhat.

Amennyiben a középsúlyos-súlyos EOP inaktív stádiumba lép, legalább 6 hónap várakozást követően rehabilitációs sebészeti beavatkozások válhatnak szükségessé. Ilyen például az orbitadekompreszió, melynél az indikáció legtöbbször az arc karakterének megváltozása, vagy súlyos cornea érintettséget okozó exophthalmus jelenléte. Szükségessé válhat strabizmus ellenes műtét is, amely az orbitopathia következtében kialakult restriktív myopathiát, valamint a visszamaradó kettőslátást hivatott korrigálni. Szemhéjműtétek akkor válhatnak szükségessé, ha a szemhéjak retractiója miatt lagophthalmus, vagy expozíciós keratopathia alakul ki. Amennyiben szükségessé válik a műtét, azokat mindig a fenti sorrendben kell elvégezni.

Először elektív orbita dekompressziót kell végezni, amelyet követhet a kancsalság-ellenes műtét, majd végül a szemhéjműtétek (48).

Napjainkig az aktív EOP konzervatív terápiáját a kortikoszteroidok és a retrobulbáris irradáció jelentik, ezek mellett kulcsszerepe van az euthyreoid állapot beállításának. A szelén alkalmazása a betegség enyhe formájában mindenképpen javasolt (45). Az elmúlt években ezen hagyományos kezelési lehetőségek mellett egyre több biológiai terápiás lehetőség jelent meg. A tumornekrózis-faktor-alfa (TNF- α) számos autoimmun folyamatban alapvető szerepet tölt be, és kezelési lehetőségként merült fel hatásának blokkolása EOP-ban is. Durrani és munkatársai anti-TNF- α antitestet, infliximabot alkalmaztak sikerrel súlyos EOP-os betegnél (51). Az interleukin-6 (IL-6) egy T-sejtek és makrofágok által szekretált proinflammatorikus cytokin. Az immunválaszok stimulálásán keresztül indukálhatja az EOP progresszióját is. Pérez-Moreiras és munkatársai tocilizumabbal, egy IL-6 receptor ellenes antitesttel kezeltek szteroidra rezisztens betegeket jó eredményekkel (52). Az anti-CD20-antitest terápiát eredetileg a B-sejtes lymphomák kezelésére fejlesztették ki, viszont az elmúlt időben autoimmun betegségek esetén is sikeresen alkalmazták (53). Az anti-CD20-antitest alkalmazásáról EOP-ban több közlemény is született, melyek biztató eredményekről számolnak be elsősorban a hagyományos, konzervatív terápiára nem reagáló esetekben (54-56). A teprotumumab egy monoklonális gátló antitest, amely az IGF-1R extracelluláris részéhez kötődik és gátolja az aktivációját. Az IGF-1R nagy számban kifejeződik az EOP orbita fibroblastok, valamint a lymphocyták felszínén (57). Ígéretes kezelési lehetőségnek tűnik, jelentős exophthalmust csökkentő hatással bír, valamint a kettőslátást és ezáltal a betegek életminőségét is javítja. Jelenleg másodvonalbeli kezelésként tartják számon (45).

2.7. A dohányzás káros hatásai endokrin orbiopathiában

A dohányzás káros hatásai a betegségre az alábbiakból tevődnek össze: reaktív oxigéngyökök (ROS) képződése, az oxidatív stressz hatásainak fokozódása, megnövekedett adipogenesis és kifejezettebb HA termelés (58-60). A dohányosok körében gyakrabban fordul elő az EOP és a betegség súlyossága egyenes arányban nő az elszívott cigaretták számával (61). A dohányfüst egy körülbelül 7000 anyagból álló keverék, melyek között vannak gáz halmazállapotúak, mint például a szén-monoxid, és vannak szilárd halmazállapotú alkotóelemei is, például a nikotin, policiklikus aromás szénhidrogének (PAH) és egyéb alkaloidok (62). Ezen anyagok közül 69 igazoltan karcinogén és jelen vannak mind a dohányos által beszívott fő füstáramban, mind a passzív dohányzással a környezetbe kerülő mellék füstáramban is (63). A cigarettázás az EOP

legjelentősebb befolyásolható környezeti rizikótényezője (64), valamint jelentős hajlamostó tényezőként szerepel mind a légzőszervi-, mind a nem légzőszervi daganatos betegségek kialakulásában (65-67).

2.8. A dohányzás újabb fajtái

Az elmúlt években a hagyományos cigaretták (CIG) mellett újabb dohányzási formák is megjelentek, mint például az elektromos cigaretta (ECIG), valamint a hevített dohánytermékek (HTP). Céljuk olyan nikotin tartalmú aeroszol létrehozása volt, amely a dohánytermék elégetése nélkül, dohányfüstmentes alternatívát kínál. Mivel ezen termékek elméletben kevesebb mellékáramú füstöt termelnek beltéri körülmények között, így társadalmilag is elfogadhatóbbnak ígérkeztek (68). Analitikus vizsgálatok igazolták az olyan toxikus anyagok jelenlétét az ECIG aeroszolban, mint például a nitrózaminok, PAH, vagy a szabad gyökök, de sokkal kisebb mennyiségben, mind a CIG füstben (69). Hasonlóképpen a HTP füstelegyen is megtalálhatók voltak káros hatású anyagok, viszont a CIG füsthöz képest itt is alacsonyabb mennyiségben, melyet feltehetően az égetés helyett az alacsonyabb hőmérsékleten történő hevítés magyaráz (70, 71). Eközben a nikotin szintek csak kis mértékben maradtak el a CIG füstelegyen mérhetőhöz képest (72). A kémiai összetétel mellett a füstelegy fizikai tulajdonságai is nagy hatással vannak az expozíció biológiai kimenetelére. Az ultrafinom részecskék (<100nm) a légutakban nagyobb mértékben képesek lerakódni, így toxikológiailag jelentősek. A HTP és ECIG aeroszol kisebb mennyiségben tartalmaz ultrafinom részecskéket, mint a CIG füstelegy. A közelmúltban több in vitro vizsgálat is foglalkozott az új típusú dohánytermékek füstjének citotoxikus, oxidatív és inflammatorikus hatásaival, azonban az eredmények interpretálását megnehezíti a piacon forgalomban lévő többféle készülék, valamint a vizsgálatokhoz használt különböző sejttípusok. A legtöbb kísérletben légúti epithel sejteket használtak, ahol az ECIG és HTP aeroszoloknak kimutatható ciotoxikus és pro-inflammatorikus hatása volt, de ez kisebb mértékű volt, mint a CIG füstelegyé (73-75).

A füstelegyek hatásairól az orbita fibroblastokon azonban csak korlátozott mennyiségű információ áll rendelkezésünkre. Tudomásunk szerint az ECIG és HTP füstelegyeket ilyen sejteken korábban még nem vizsgálták.

2.9. A terhesség és a Graves basedow kór kapcsolata, terhesség során kialakuló endokrin orbithopathia

A legtöbb autoimmun kórkép esetén terhesség során javulást tapasztalhatunk az ilyenkor jelentkező fokozott immuntoleranciának köszönhetően. Az autoimmun pajzsmirigybetegek, sclerosis multiplex és a rheumatoid arthritis javulást mutatnak várandósság során (76, 77). Ez alól csak pár betegség képez kivételt, mint például a systemás lupus erythematosus, vagy az 1-es típusú diabetes mellitus (78). GD-ben a humorális immunválasz predominál. Stimuláló antitestek termelődnek a TSH-receptorok ellen (TRAb), amelyek a betegség klinikai manifesztációjáért felelősek, úgymint a hyperthyreosis, golyva vagy az exophthalmus (79). A GD kialakulása, vagy súlyosbodása várandósság során ritka jelenség és általában spontán javulás figyelhető meg a második trimeszterben. Ezt a TRAb-k szintjének csökkenése is kíséri (80, 81). Az ilyen esetekben szülés után 4-8 hónappal gyakran relapszus figyelhető meg. Ekkor a korábbi immuntolerancia megszűnik, amely a TRAb szintjének újbóli emelkedésével jár (81).

3. Célkitűzés

3.1 A dohányzás újabb típusai hatásának vizsgálata endokrin orbitopathiában

Korábban már több kutatás foglalkozott a hagyományos dohánytermékek orbita fibroblastokra gyakorolt hatásával. Ezzel ellentétben az ECIG és HTP füstökkel ismereteink szerint hasonló vizsgálatok még nem történtek. Célunk ezen dohánytermékek hatásának vizsgálata volt EOP és egészséges orbita fibroblastokon, hagyományos és újonnan bevezetett laboratóriumi technikák használatával.

3.2 Terhesség hatása az endokrin orbitopathia kialakulására

Munkánk során egy olyan irodalomban egyedülálló esetet dolgozunk fel, melyben terhesség során alakult ki endokrin orbitopathia. A jelenség okai között egyértelmű összefüggés látszik a dohányzás jelenlétével.

4. Betegadatok és Módszerek

4.1. A dohányzás újabb típusai hatásának vizsgálata endokrin orbitopathiában

4.1.1. Betegadatok

Az EOP OF tenyészeteket négy, EOP-ban szenvedő beteg orbita dekompressziós műtete során eltávolított kötőszövetből, a kontroll OF tenyészeteket pedig négy intraocularis daganat miatt végzett enucleatio során eltávolított kötőszövetből hoztuk létre, ezen betegek anamnézisében nem szerepelt korábbi pajzsmirigybetegség. Az intraocularis daganat egyik esetben sem terjedt a szemből kívülre, sclerális beszűrtég sem volt jelen. Az extraocularis tér, beleértve az orbita szöveteket is, intaktak voltak. A szövetmintákra vonatkozó adatokat az 1. táblázatban összegeztük. Minden beteg írásos beleegyezést adott, valamint a vizsgálatot a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá, azokat a Helsinki Deklarációnak megfelelően végeztük el. Etikai engedély szám: 5913/2012/EKU (84/13.).

4.1.2. Sejtkultúrák

A sejtkultúrákat Bahn és munkatársai (82) leírása alapján hoztuk létre. Röviden, a műtéti szövetmintákat apró darabokra vágtuk, majd 199-es médiumot (M199) tartalmazó tenyésztőedényekbe helyeztük, 20% (v/v) FBS-szel és penicillin-streptomocinnal, és 37°C-on, 5% CO₂ mellett a tápfolyadékot 3-4 naponta cseréltük. A fibroblastok kinövése után a szövetdarabokat eltávolítottuk, és a sejtkultúrákat 10% (v/v) FBS-t tartalmazó M199-ben tartottuk fenn. Ezután a sejteket folyékony nitrogénben tároltuk a kísérletek kivitelezéséig. A primer orbita fibroblastokat alacsony passázsszámnál (2-8) vizsgáltuk.

Minták	Beteg kora	Nem	Műtéti típus	GO státusz műtétkor	Diagnózis
Minta 1	37 év	nő	orbitotomia, lipectomia	inaktív	EOP
Minta 2	44 év	nő	orbitotomia, lipectomia	inaktív	EOP
Minta 3	49 év	férfi	orbitotomia, lipectomia	inaktív	EOP
Minta 4	42 év	nő	orbitotomia, lipectomia	inaktív	EOP
Minta 5	66 év	férfi	Enucleatio	-	Malignus chorioidea melanoma
Minta 6	71 év	férfi	Enucleatio	-	Malignus chorioidea melanoma
Minta 7	69 év	férfi	Enucleatio	-	Malignus chorioidea melanoma
Minta 8	38 év	férfi	Enucleatio	-	Malignus chorioidea melanoma

1. táblázat: Betegadatok, szövetszövetminták eredete

4.1.3. Dohányfüstelegyek

A füstelegyeket Cawood és munkatársai korábbi közleménye alapján készítettük el (59). Négy darab referencia IR6F cigarettát használtunk a CIG füstelegy készítéséhez, melyek szálánként 8,6 mg kátrányt és 0,7 mg nikotint tartalmaznak. A szálak 75%-a lett elégetve, a füst egy speciális pumpa segítségével (MILLIPORE XF54 230-50) 30 ml puffer oldaton lett átvezetve. Az oldatot egy 0,2 µm-es membrán szűrőn keresztül sterilre szűrtük. Bernhard és munkatársai közlése alapján a 12,5%-os CIG füst oldat megfelel napi 100 szál elszívott cigarettának (83). Kísérletünkhöz egy alacsonyabb 1%-os, valamint egy magasabb 50%-os CIG füst oldatot használtunk.

Az új típusú dohánytermékek füstjét is teszteltük. A forgalomban lévő HTP eszköz (iQOS, Philip Morris International Global Services Inc., New York, NY, USA) esetén négy darab ízesítésmentes dohánytöltetet használtunk a füstelegy elkészítéséhez. Töltetenként 12 szippantást végeztünk a pumpával, összesen 48-at, Zagoriti és munkatársai közleménye alapján (84). Az általunk használt elektromos cigaretta (Eleaf iStick Pico, Shenzhen, Kína) szintén kereskedelmi forgalomban kapható eszköz volt. A készülék teljesítményét 16 W-atra állítottuk, és az ECIG folyadékot (e-liquid) amelyből a készülék a porlasztott füstöt állítja elő korábbi

közlések alapján 49,4% propilén-glikol, 49,4% glicerol és 1,2% nikotin arányban töltöttük be a készülékbe (84). Habár az ECIG terméke nem hagyományos értelemben vett füst, inkább porlasztott folyadéknak tekinthető, az egyszerűség kedvéért a továbbiakban mindhárom dohánytermékből nyert oldatra füstelegyként (FE) fogunk hivatkozni. A hígításhoz M199 mediumot használtunk.

Először a magas koncentrációjú (50%) CIG kivonatot adtunk a sejtekhez, hogy megvizsgáljuk létrjön-e RT-CES készülékkel mérhető változás a sejteken és hogy összehasonlíthassuk ezt a HA szintézisben és MTT teszttel mért eredményekkel. Majd a következő mérési sorozatban már mindhárom termékből származó (CIG, ECIG, HTP) alacsonyabb koncentrációjú (1%) füst kivonatokot használtunk. Mindegyik mérés időfüggő volt, az RT-CES 168 órán keresztül folyamatos méréseket biztosított, a HA és MTT vizsgálatokat 24, 48 és 72 óra elteltével végeztük el. Mindegyik mérést háromszor végeztük el, a végeredmények a három mérés átlagai.

4.1.4. Real-Time Cell Electronic Sensing (RT-CES) technika

A fentiek alapján elkészített három FE orbita fibroblastokra gyakorolt hatásának vizsgálatára az ún. RT-CES technikát alkalmaztuk. Ez egy viszonylag új jelölésmentes in vitro mérési módszer, melynek megbízhatóságát több korábbi közleményben leírták (85, 86). Ismereteink szerint elsőként alkalmaztuk OF sejtek vizsgálatára.

A készülék elektromos impedancia változás mérésén alapuló valós idejű impedancia meghatározást tesz lehetővé. A 16 lyukú sejtenyészítő lemez alján arany elektródák találhatók, melyeken sejtek nélkül a tápfolyadék ionjai szabadon áramolhatnak. Ahogy a sejtek kitapadnak az elektródákhoz megváltozik az ionáramlás, melyet a készülék érzékel és rögzít (87). A készülék váltóáramot használ, így elektromos impedanciát mér, nem ellenállást. A sejteket M199-ben szélesztettük, valamint FE-kezelt vonalak esetén a háromféle FE hozzáadása is megtörtént a vizsgálat indításakor. Valós idejű adatot gyűjtöttünk, a készülék 15 percenként végzett mérést, és az adatok kiértékeléséhez a Cell-Index/sejt-indexet (CI) használtuk, amely egy mértékegységek nélküli arányszám és a kiindulási impedancia értékhez viszonyított impedancia változást adja meg. A méréseket 168 órán át végeztük, azonban 72 órát követően egyik kísérletben sem tapasztaltunk változásokat, így az eredmények jobb interpretálása érdekében végül az első 72 óra adatait használtuk fel.

4.1.5. Metabolikus aktivitás mérése

A sejtek metabolikus aktivitásának meghatározására MTT tesztet alkalmaztunk, amely egy kolorimetriás teszt a sejtek metabolikus aktivitásának értékelésére. A sejteket 96 lyukú lemezre szélesztettük, 10^4 sejt/lyuk sűrűségben és CO₂ inkubátorban 37°C-on 7 napig M199 tápfolyadékban tartottunk fenn, a dohányfüstelegyeket ehhez az oldathoz adtuk hozzá a mérés elkezdése előtt. A vizsgálatok végpontjainak a 24. 48. és 72 órát határoztuk meg, így az MTT-vel történő 3 órás inkubációs idő figyelembevételével az MTT-t a 21., 45. és 69. óra után adtuk a sejtekhez. 10 µl (5mg/ml) MTT/ 100 µl tápfolyadék arányt használtunk. A sejtek anyagcsere-aktivitásuktól függően a sárga MTT-t vízben nem oldódó kék formazánná alakították. A kék formazán kristályokat dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk fel. Az 595 nm-en mért abszorbanciát egy Beckman Coulter, DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) készülék segítségével mutattuk ki. A sejtek metabolikus aktivitását a kezeletlen arányában fejeztük ki.

4.1.6. A hialuronsav szintjének meghatározása

A sejtek előkészítése az MTT tesztnél leírtakkal megegyezően történt, a 24., 48. és 72. órában a felülúszókat eltávolítottuk és -20°C-on tároltuk, a mérések elvégzéséig. A felülúszóban lévő HA mennyiségét, ELISA módszerrel, DuoSet Hyaluronan Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) felhasználásával mértük le a gyártó utasításainak megfelelően. Az eredményeket minden esetben az tápfolyadék HA tartalmához viszonyítva adtuk meg. A HA termelést a FE-vel nem kezelt sejtekhez viszonyítva, azok arányában adtuk meg.

4.1.7. Statisztikai elemzés

Az eredmények statisztikai elemzését ismételt méréses ANOVA-val végeztük, amelyet Tukey többszörös összehasonlító post hoc teszt követett (GraphPad Prism 8.0.1, GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A statisztikai szignifikancia szintet $p < 0,05$ -nak fogadtuk el.

4.2. Betegadatok – Terhesség hatása az endokrin orbitopathia kialakulására

4.2.1. A tanulmányozott beteg klinikai jellemzői

Graves-Basedow-kórral szövődött terhesség vizsgálata, mely során endokrin orbitopathia alakult ki. A vizsgált, irodalmi ritkaságként leírt várandós páciens esetén EOP alakult ki a terhesség során. Anamnézisében nem szerepelt korábbi pajzsmirigybetege, és szemészeti panaszai sem voltak ezt megelőzően, korábbi két terhessége során egyáltalán nem észlelt hasonló tüneteket. A páciensnél anamnézis felvétel mellett az alábbi vizsgálatok történtek.

4.2.2. Laboratóriumi vizsgálatok:

Az alábbi betegségsspecifikus laboratóriumi vizsgálatokat végeztük el:

- **TSH szint meghatározás:** A TSH a hypophysis specifikus bazofil sejtjeiben képződik. Stimuláló hatással bír a pajzsmirigy hormonok termelésére és szekréciójára. A TSH egy nagyon érzékeny és specifikus paraméterként szolgálhat a pajzsmirigy működésének mérésére, és különösen alkalmas a pajzsmirigybetegek korai felismerésére vagy kizárására (88). A TSH szint meghatározása Elecsys TSH kit segítségével történt (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim).
- **T3 és T4 meghatározás:** A pajzsmirigy által termelt és szekretált trijód-thyronin (T3), valamint thyroxin (T4) a keringésbe kerülve fontos szerepet játszanak az anyagcsere szabályzásában, befolyásolják a szív- és érrendszer működését, a növekedést és a csontanyagcserét, és fontosak az ivarmirigy-funkciók és az idegrendszer normális fejlődéséhez (88). Mindkét hormon legnagyobb részben fehérjékhez kötődve szállítódik a véráramban, ilyenek például a thyroxin-binding globulin (TBG), pre-albumin, albumin. A T4 mindössze 0.03%-a, a T3 0,2-0,4%-a van jelen biológiailag aktív, szabad formában (fT3, fT4) (89). Ezen szabad hormonok szintjének meghatározása fontos szereppel bír a pajzsmirigybetegek állapotának követésében. Mérésükhöz az Elecsys FT3 III, valamint Elecsys FT4 III kit-et használtuk (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim).

- **TSH receptor elleni autoantitest meghatározás:** GD-ben a pajzsmirigy túlműködést jellemzően a TSH receptor (TSHR) elleni autoantitestek okozzák, és ezeknek a TSHR-antitesteknek (TRAb) a mérése fontos eszköz a betegség diagnózisában és kezelésében (90). Mérését Elecsys Anti-TSHR kit segítségével végeztük (Roche Diagnostics GmbH, Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim).
- **Tiroglobulin elleni antitest meghatározás:** A tiroglobulin nagyméretű glikoprotein, melynek szintézisét és felszabadulását a TSH szabályozza (91). A tiroglobulin elleni antitestek meghatározását főként autoimmun pajzsmirigybetegek gyanúja esetén alkalmazzák. Méréséhez a LIAISON® Anti-Tg kit-et használtuk (DiaSorin S.p.A. Via Crescentino snc - 13040 Saluggia (VC) – Italy).

4.2.3. Szemészeti vizsgálatok

Az exophthalmus az EOP egyik legismertebb tünete, mely a betegek akár 70%-ban is előfordulhat. Megjelenése legtöbbször kétoldali, de az esetek 10-20%-ban aszimmetrikus formában is jelentkezhetsz (92). Az exophthalmus mértékének meghatározására a Hertel-féle exophthalmometert használjuk. Az eszköz a cornea és a csontos orbita lateralis pereme közötti távolságot adja meg milliméterben kifejezve. Rasszonként változik a normál értéke, a kaukázusi populációban 20 mm a felső határ, míg afrikaiakban magasabb, az ázsiaiak körében pedig alacsonyabb (93, 94). A protrusio mértéke nagy egyéni változatosságot mutathat, ezért figyelembe kell vennünk az adott beteg kezdeti Hertel értékét, és amennyiben nem rendelkezünk ilyen adattal, a populációs átlagtól való 2 mm-es eltérést javasolják a diagnózis felállításához (95).

Az EOP aktivitásának megítéléséhez a Clinical Activity Score besorolást alkalmaztuk, melynek felméréséhez réslámpás vizsgálatot végeztünk (2. táblázat). A pontok meghatározása a négy klasszikus gyulladásos jel szemészeti tünetei alapján történik. Orbitánként vizsgáljuk, hogy a tünetek közül mennyi van jelen. Ha a beteg CAS pontszáma 3 vagy annál nagyobb, akkor az immunológiailag aktív betegségre utal (35).

Kezdeti CAS pontszám (1-7)		
Fájdalom	1	Szem mögötti fájdalom, nyomásérzés az elmúlt 4 hétben
	2	Fájdalom felfelé, oldalra, vagy lefelé tekintéskor az elmúlt 4 hétben
Vörösség	3	A szemhéjak vörössége
	4	A conjunctiva diffúz vörössége legalább 1 quadránst érintve
Duzzanat	5	A szemhéjak duzzanata
	6	Chemosis
	7	Duzzadt caruncula
1-3 hónapos kontrolll alkalmával végzett vizsgálat (8-10)		
Megromlott funkció	8	Exophthalmus növekedése >2mm
	9	A szemmozgások bármely irányba történt > 5 fokos beszűkülése
	10	A visus > 1 vonallal történő csökkenése a Snellen táblán (stenoplyukat használva)

2. Táblázat: A Clinical Activity Score (CAS) értékének meghatározása

4.2.4. Perinatológiai vizsgálatok

A megjelenést követően elvégzett fizikális- és ultrahangvizsgálatok során a magzat nem mutatta fejlődési rendellenesség, tachcardia, vagy golyva jeleit, továbbá megnyugtató növekedési ütemet láthattunk a kontroll ultrahang vizsgálatok során.

A beteg laboratóriumi eredményeit, valamint szemészeti vizsgálati eredményeit összefoglalva a 3. és 4. táblázat tartalmazza.

Gesztációs hét	sTSH (mU/L)	fT4 (pmol/L)	fT3 (pmol/L)	Thiamazole (mg/nap)
33	<0,005	40,9	18,1	30+20
34	-	31,9	12,9	15+15
36	<0,005	29,1	11,3	15+15
38	<0,005	29,5	9,6	15+15
Post partum 6. nap	<0,005	44,0	19,3	30+20

3. Táblázat: Hormonszintek és gyógyszeradagok; sTSH referencia tartomány: 0,4-4,2 mU/L; fT4 referencia tartomány: 12–22 pmol/L; fT3 referencia tartomány: 3,1–6,8 pmol/L

Gesztációs hét	Hertel (mm)	CAS (o.d./o.s.)	Vízus (o.d./o.s.)
33	28-21/90	6/0	0,6/1,0
38	26-18/90	5/0	0,8/1,0
Post partum 3. nap	26-18/90	4/0	1,0/1,0

4. Táblázat: Szemészeti vizsgálatok; CAS: Clinical Activity Score

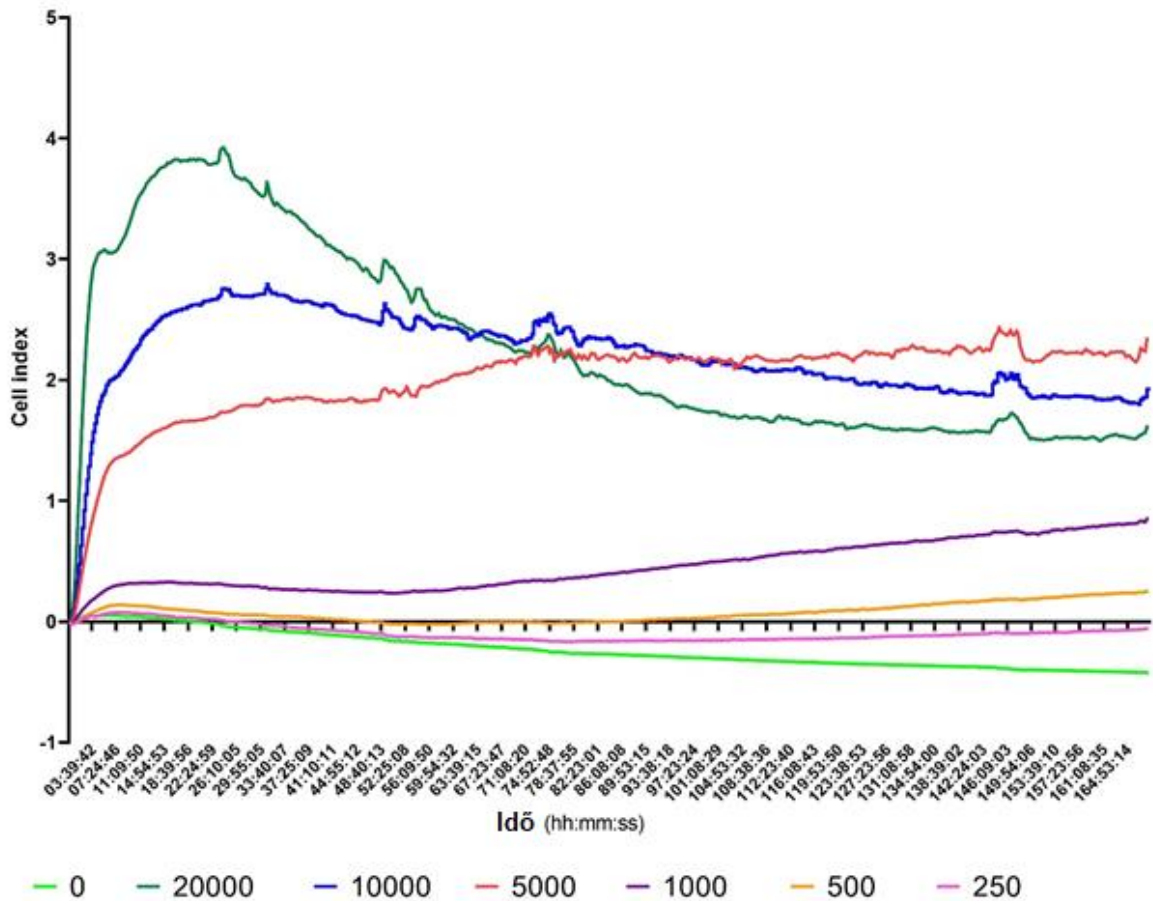
5. Eredmények

5.1. A dohányzás újabb típusai hatásának vizsgálata endokrin orbitopathiában

5.1.1. Magasabb (50%) koncentrációjú CIG füstelegy hatása az orbita fibroblastokra

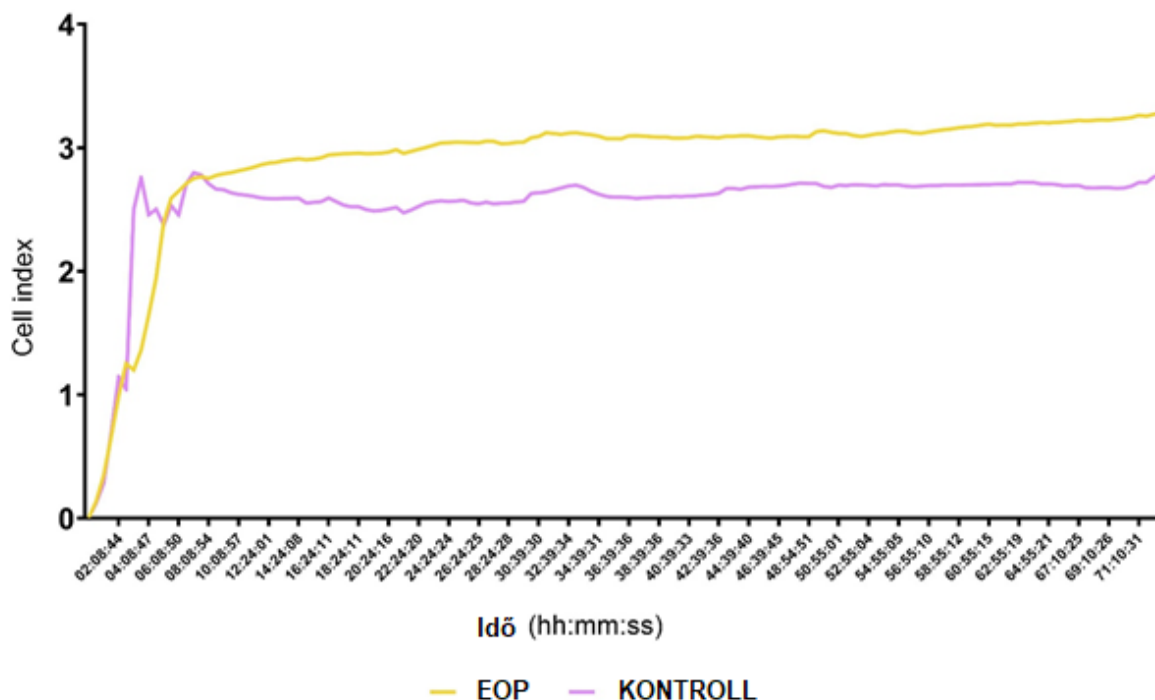
RT-CES mérések magasabb (50%) koncentrációjú CIG füstelegy mellett

Kezdetben magas CIG-koncentrációt (50%) használtunk. Kísérleteinkben annak megfigyelésére törekedtünk, hogy a HA szekréciója és az OF-ok metabolikus aktivitása összefügg-e a RT-CES módszerrel mért CI-vel. Az optimális sejtsűrűség azonosításához először az RT-CES készülékkel hat különböző OF-sűrűségnél vettük fel a CI-görbéket. E mérés alapján (4. ábra), az összes további kísérletben a sejtszámot lyukanként 10 000-ben határoztuk meg, és 200ul-ben szélesztettük a sejteket.



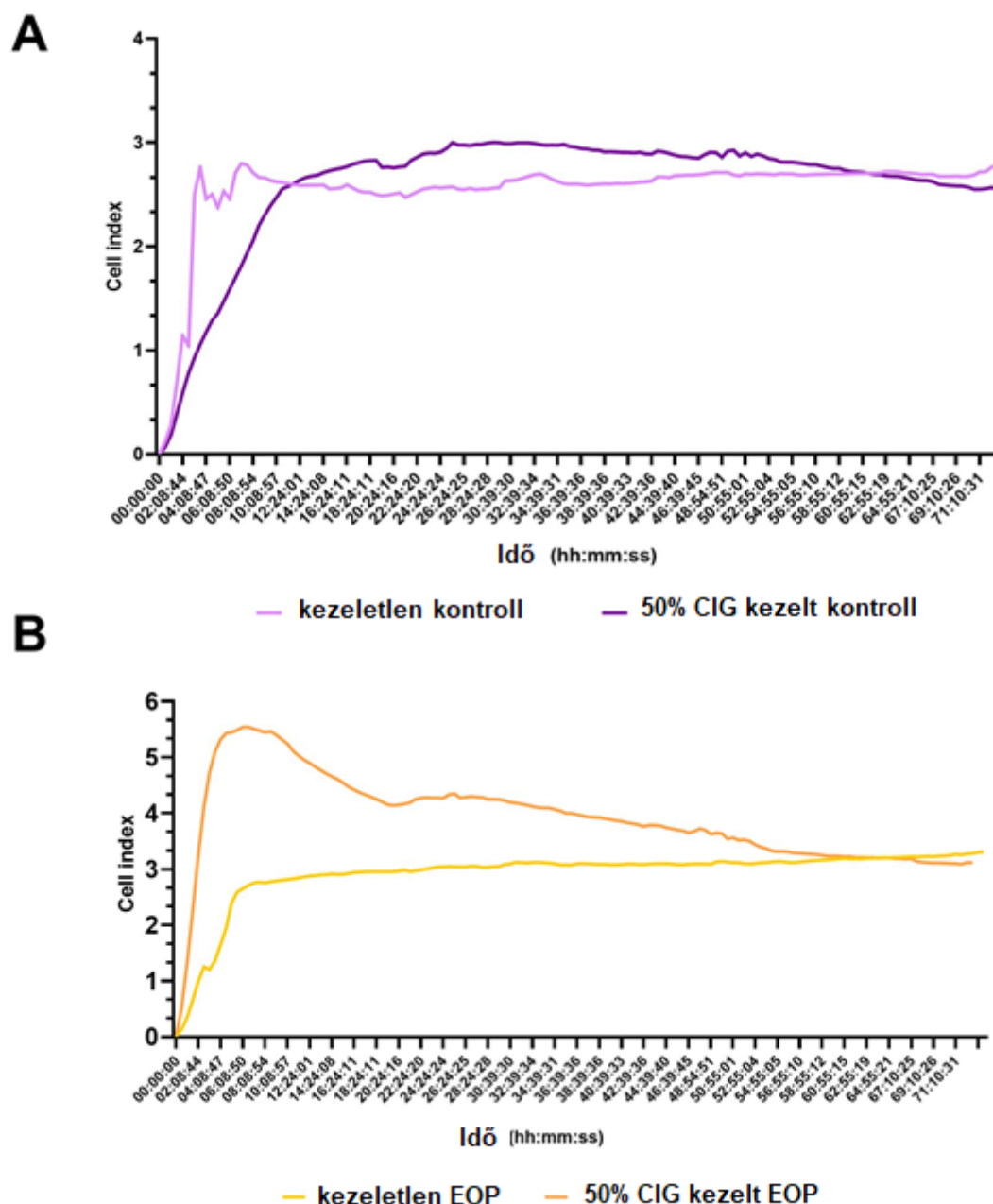
4. ábra: Az optimális sejtsűrűség meghatározása RT-CES mérésekhez. A sejteket 250, 500, 1000, 5000, 10 000 és 20 000 darabos sűrűségben vizsgáltuk. Ebben a 168 órás kísérletben a 10 000 sejt/lyuk sűrűségű bizonyult optimálisnak (kék görbe)

Ahogy az 5. ábrán látható az EOP sejtek alap CI értékei jelentősen különböztek a kontroll sejtektől ($p < 0,0001$). Az EOP OF-k maximális CI értéke a mérés alapján itt 3,3 volt, míg a kontroll OF-k CI értéke 2,79-nál tetőzött. A sejtek eredete meghatározta a viselkedésüket, a mérés során az EOP OF-k a kezdeti 10 óra elteltével végig magasabb CI értékeket vettek fel. ($p < 0,0001$).



5. ábra: Sejt Index (CI) értékek összehasonlítása. A FE-vel nem kezelt EOP sejtek maximális CI értéke 3,3 volt, a FE-vel nem kezelt kontroll sejteké 2,79 a választott 10000 sejt/lyuk sűrűség mellett.

Amint az 6. ábrán látható, a kontroll sejtek nem reagáltak az 50%-os CIG-re ($p=0,46$); a kontroll OF-ok CI-je nem nőtt a kitapadást követően és a kezelés nem okozott növekedést a CI-szintekben. A maximális CI-t ($CI = 3,00$) 29 óránál érték el a sejtek. Az EOP OF-k másképp viselkedtek, a sejtek kitapadása körülbelül 4-6 órát vett igénybe, és a kezelt EOP OF-ok CI-értéke jelentősen megnőtt a kezeletlen EOP OF-okéhoz képest ($p<0,0001$). A maximumot 6 óránál érték el ($CI = 5,53$). Ezt követően, gyors csökkenést figyelhettünk meg, a CI-értékek a 60. órára a kezeletlen EOP OF-ok szintjére csökkentek.

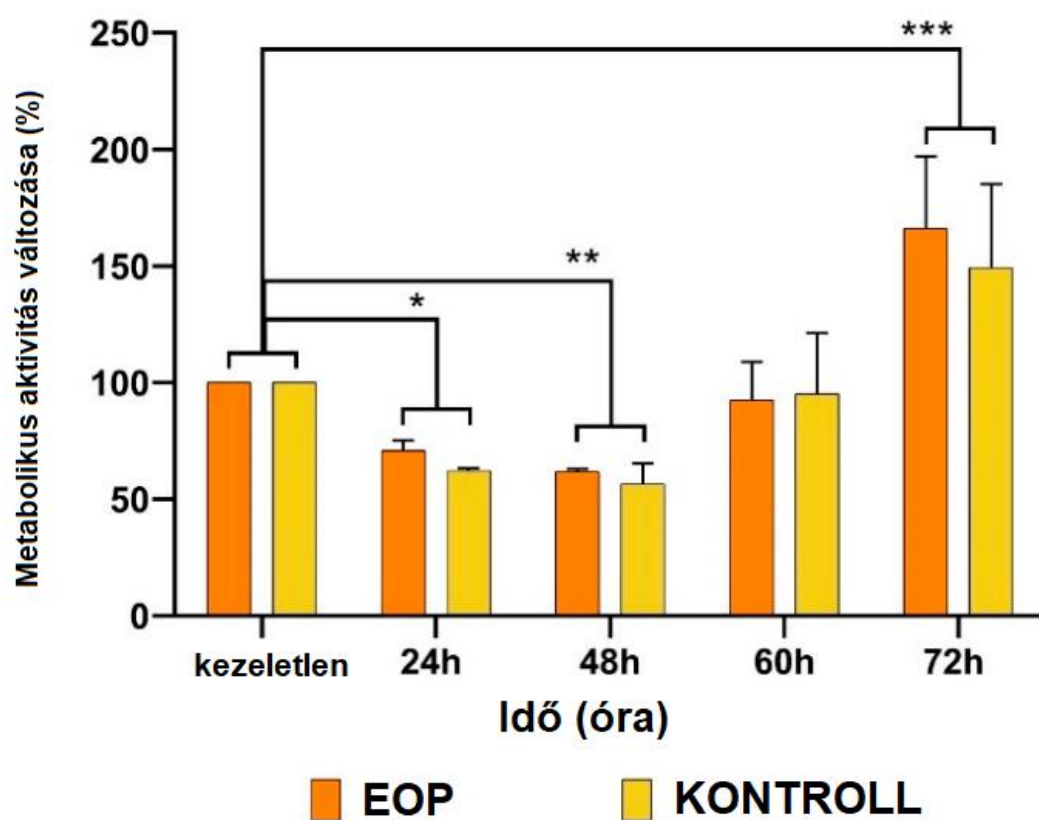


6. ábra: Az 50%-os CIG füstteleg hatása a CI-re. (A) Kontroll OF, (B) EOP OF sejtek. Az EOP sejteknél emelkedést láthatunk a CI értékekben, a kontroll vonalon viszont nem tapasztaltunk változást a kezeletlen OF-hoz viszonyítva.

A metabolikus aktivitás mérése (50%) koncentrációjú CIG füstteleg mellett

A metabolikus aktivitás tekintetében (7. ábra) az EOP és a kontroll sejtek eltérő módon viselkedtek. A kezelés 24. és 48. órájában a CIG-vel kezelt sejtek metabolikus aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt a FE-vel kezeletlen sejtekhez képest (mind a 24 órás EOP OF esetében $p < 0,03$; mind a 48 órás $p < 0,01$; mind a kontroll OF esetében 24 óránál $p < 0,01$; 48

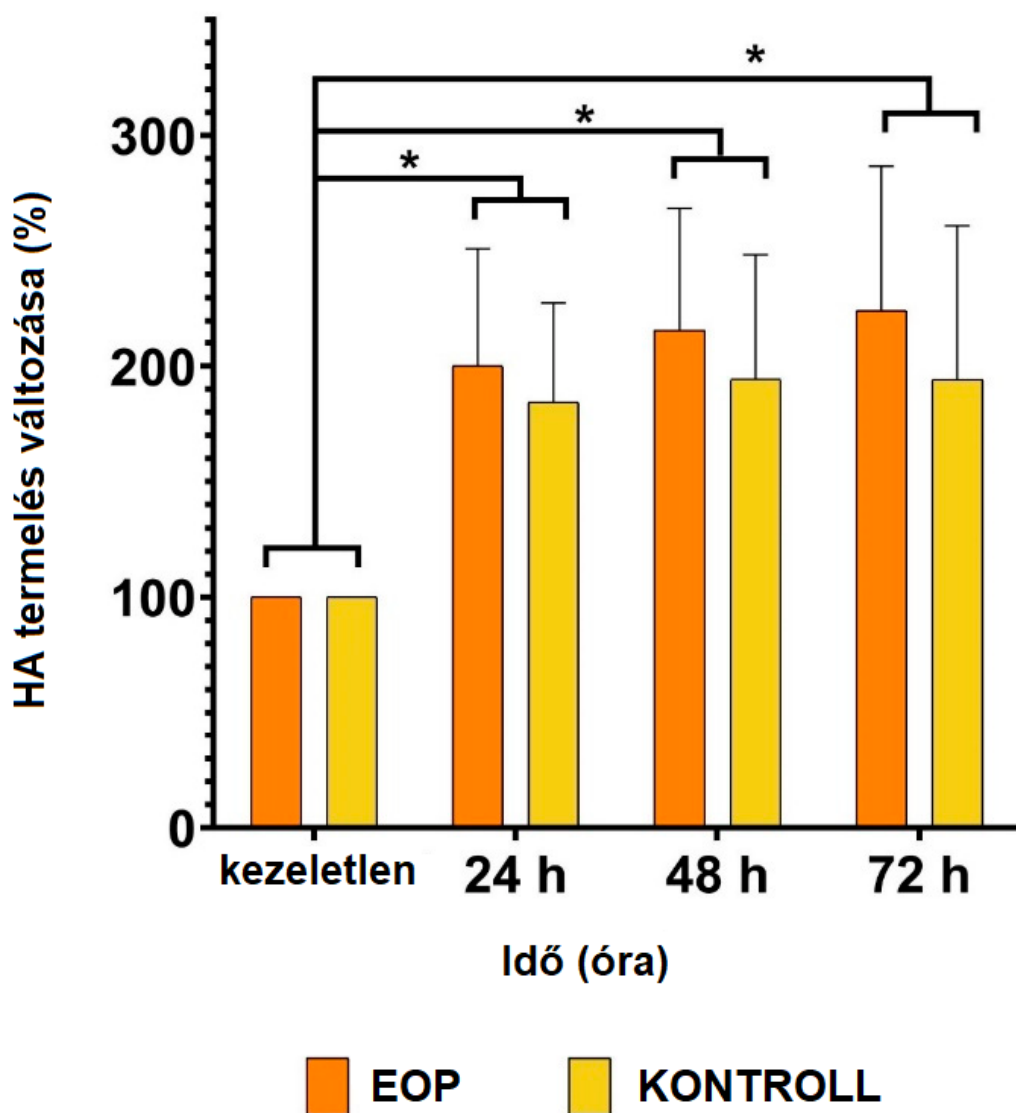
óránál $p < 0,01$). Nem találtunk különbséget a CIG kezelés metabolikus aktivitásra gyakorolt hatásában a 24 óra és 48 óra elteltével mért eredmények között ($p = 0,07$). A 60. órában a kezeletlen és CIG-el kezelt sejtek metabolikus aktivitása közötti különbség eltűnt minden vizsgált sejtvonal esetében (EOP $p = 0,66$, kontroll $p = 0,89$). 72 óra elteltével a CIG kezelt vonalak már szignifikánsan magasabb aktivitási rátát mutattak, mint a kezeletlen sejtek (EOP $p = 0,001$; kontroll $p = 0,004$).



7. ábra: 50%-os CIG füsttelegy hatása a metabolikus aktivitásra EOP és kontroll OF-kon. 100%-nak vettük a kezeletlen sejtek metabolikus aktivitását, az eredményeket a kezeletlen sejtekhez viszonyított százalékos arányban fejeztük ki. * $p < 0,03$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,005$.

Hialuronsav termelés (50%) koncentrációjú CIG füstelegy mellett

A CIG kezelés mind a kontroll, mind az EOP sejtek HA-termelésének növekedését okozta az összes vonalon, minden mért időpontban (EOP $p < 0,002$; kontroll $p < 0,04$). Az EOP és kontroll sejtek az 50 %-os koncentrációjú CIG kezelésre állandó, kétszeres HA-termeléssel reagáltak. (8. ábra). A HA-termelés nem különbözött az EOP és a kontroll fibroblastoknál, sem a kezeletlen, sem a FE-vel kezelt kultúrákban (kezeletlen $p = 0,99$, 24 óra $p = 0,95$, 48 óra $p = 0,87$, 72 óra $p = 0,67$).



8. ábra: Az 50%-os CIG füstelegy hatása a HA termelésre EOP és kontroll OF-kon. 100%-nak vettük a kezeletlen sejtek HA termelését, az eredményeket a kezeletlen sejtekhez viszonyított százalékos arányban fejeztük ki. * $p < 0,02$.

5.1.2 Alacsony koncentrációjú (1%) füstelvegek hatása az orbita fibroblastokra

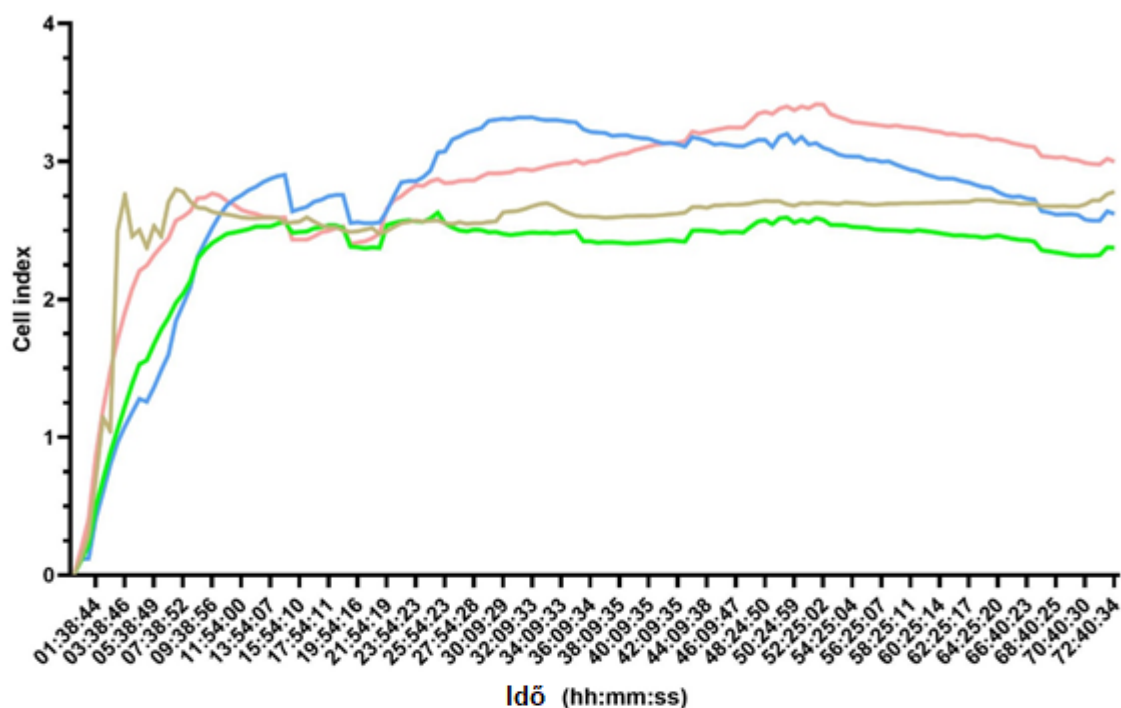
RT-CES mérések alacsony koncentrációjú (1%) füstelvegek mellett

A következő kísérletsorozatban az összes EOP és kontroll OF-ot alacsony koncentrációjú (1%-os) füstelvegnek tettük ki, amely körülbelül napi 8 szál elszívott cigarettának felel meg. Ebben a koncentrációban mind a CIG, a HTP, valamint az ECIG kivonatokat megvizsgáltuk az összes OF kultúrában. Az eredmények a 5. táblázatban láthatóak.

A FE-vel nem kezelt kontroll sejtek (9. ábra) gyors növekedést mutattak, majd 8 óra elteltével elérték a csúcspontjukat ($CI=2,79$). Ettől a ponttól kezdve a görbe platószerű lefutást mutatott, az értékek 2,47 és 2,78 között váltakoztak. A CIG füstelveggyel kezelt kontroll sejtek hasonló értékeket mutattak, mint a kezeltlen kontroll OF-k, a legmagasabb CI érték 2,62 volt és a CI értékek görbéje hasonló lefutást mutatott. Ehhez képest a HTP-vel és ECIG-el kezelt kontroll sejtek szignifikáns különbséget mutattak a CI-ben ($p<0,0001$); mind a HTP-vel, mind az ECIG-vel kezelt kontroll fibroblastok hasonlóan viselkedtek a 22. óráig, amikor a CI mindkét sorban növekedni kezdett. A HTP kezelt kontroll vonal a 32. órában érte el a maximumot ($CI=3,32$), az ECIG vonal pedig az 52. órában. ($CI=3,41$).

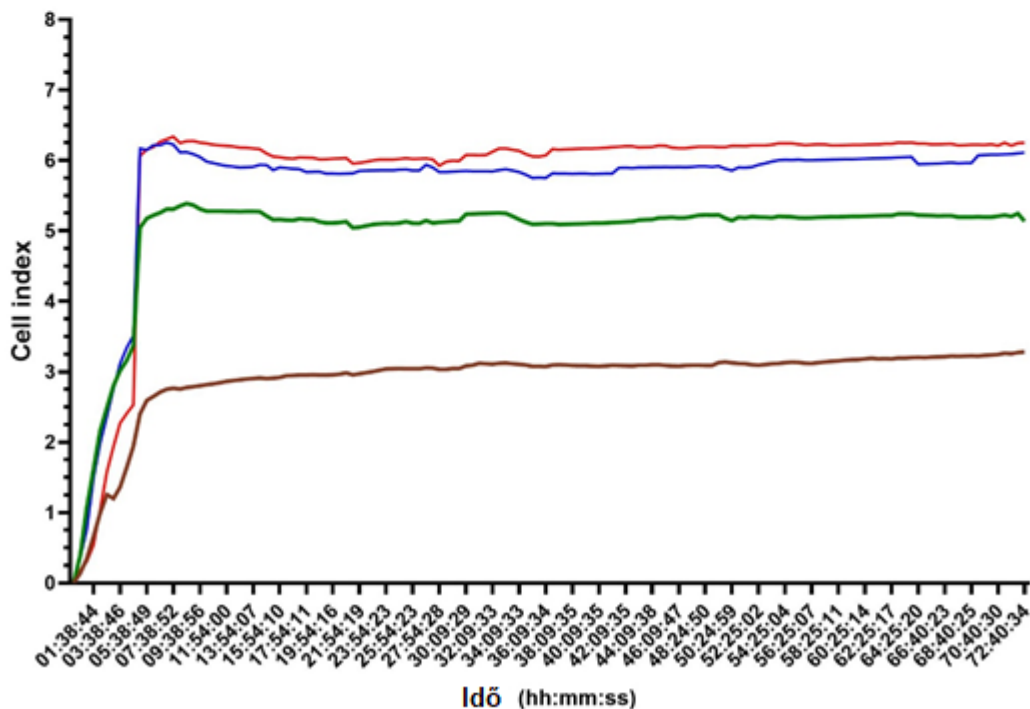
A FE-vel nem kezelt EOP sejtek CI-értékei a letapadást követően lapos görbét mutattak, 2,75 és 3,3 között váltakoztak (9. ábra). A FE expozíció után jelentősen eltérő görbét láttunk. Az 5,5 óránál bekövetkező letapadást követően a CIG-el kezelt EOP sejtek CI-értékei szintén egy többnyire lapos görbét követtek, csúcspontjukat 9 óránál érték el ($CI=5,38$); a HTP és ECIG kezelt EOP sejtek hasonló viselkedést mutattak, görbájuk platószerű volt, de a CIG-el kezelt sejtekhez képest magasabb értékeket értek el az adhéziót követően. ECIG kezelt EOP sejtek 7,5 óránál ($CI=6,33$), a HTP kezelt EOP vonalak pedig 7 óránál ($CI=6,25$) érték el a csúcspontot. A CIG-re, HTP-re és ECIG-re adott sejt indexben kifejezhető válaszok különbözőek voltak ($p<0,0001$).

A



— kezeletlen kontroll — 1% CIG — 1% HTP — 1% ECIG

B



— kezeletlen EOP — 1% CIG — 1% HTP — 1% ECIG

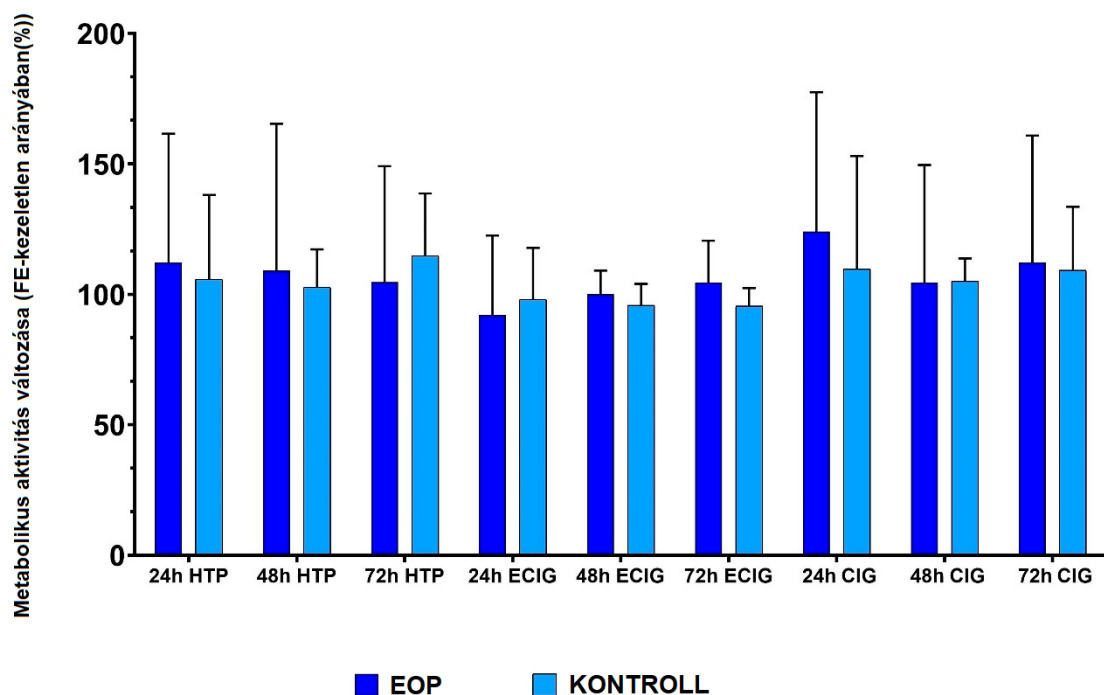
94. ábra: Az 1%-os CIG, HTP, ECIG füstanyag hatása a CI értékekre (A) kontroll, (B) EOP OF-kon. Az összes füstanyag jelentős emelkedést okozott a CI értékekben EOP sejtekénél, míg a kontroll sejtek kevésbé voltak érintettek.

	50% CIG kontroll	50% CIG EOP	1% CIG EOP	1% HTP EOP	1% ECIG EOP	1% CIG kontroll	1% HTP kontroll	1% ECIG kontroll	Untreated EOP	Untreated kontroll
8 h	2,05	5,44	5,30	6,11	6,24	2,04	2,08	2,63	2,75	2,79
16 h	2,76	4,41	5,15	5,88	6,02	2,48	2,67	2,43	2,55	2,90
24 h	2,90	4,26	5,09	5,86	6,01	2,57	2,88	2,82	2,55	3,00
32 h	2,99	4,14	5,24	5,84	6,12	2,47	3,31	2,93	2,64	3,12
48 h	2,90	3,69	5,20	5,91	6,19	2,52	3,15	3,34	2,69	3,08
60 h	2,71	3,23	5,20	6,02	6,22	2,49	2,89	3,21	2,69	3,16
72 h	2,56	3,11	5,24	6,11	6,24	2,37	2,62	3,01	2,71	3,26

5. Táblázat: Meghatározott időpontokban mért CI értékek az összes OF vonalon

Metabolikus aktivitás mérése alacsony koncentrációjú (1%) füstelegyek mellett

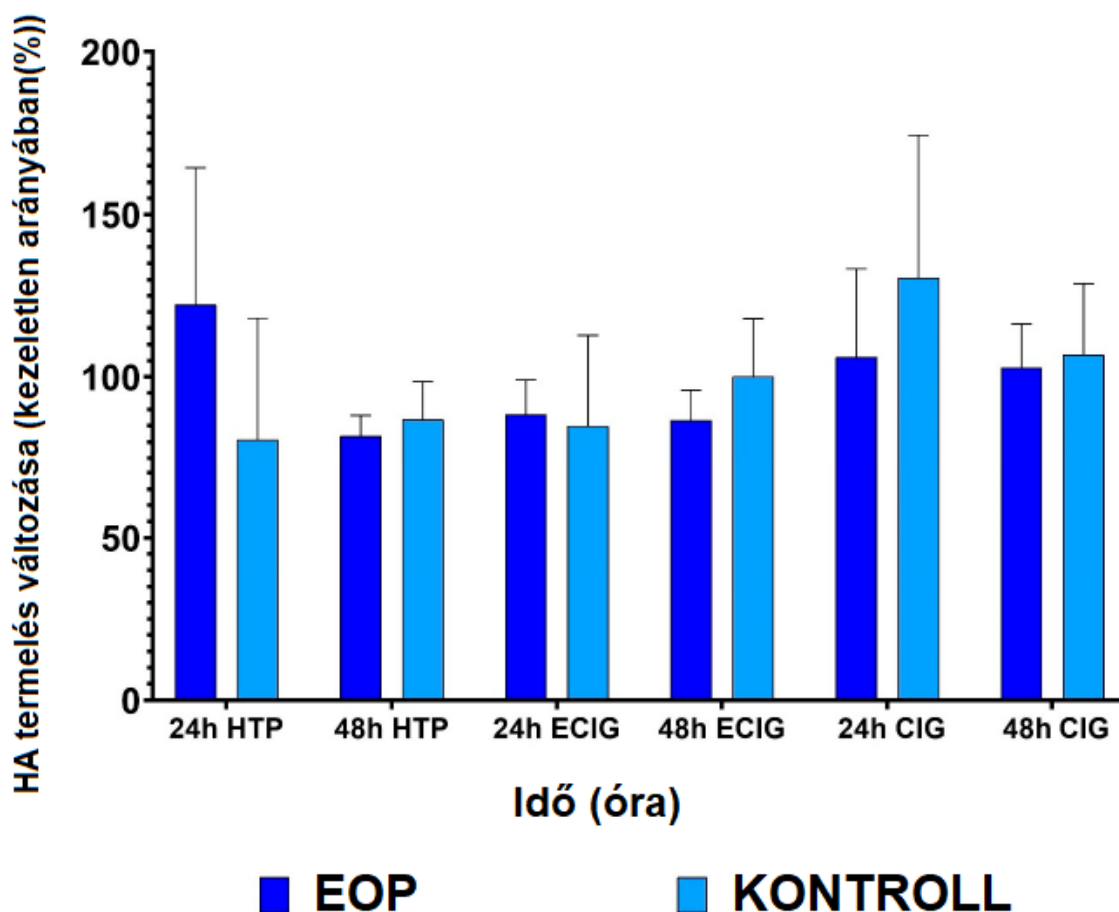
Az 1%-os HTP-vel, ECIG-vel és CIG-vel végzett kezelésnél 24, 48 és 72 óra után sem volt szignifikáns különbség az anyagcsere-aktivításban a FE-kezelt OF vonalakon összehasonlítva a kezeletlen sejtekkel (10. ábra). A kezeletlen EOP és kontroll sejtek metabolikus alapaktivitása szintén nem különbözött. Az 50%-os CIG-kezeléssel ellentétben (amely a fenti 7. ábrán látható), az 1%-os HTP, ECIG és CIG nem volt hatással a metabolikus aktivitásra ($p=0,9$)



5. ábra: Metabolikus aktivitás EOP és kontroll OF-kon, 1%-os CIG, HTP, ECIG kezelés után. Ezen alacsony koncentrációnál nem találtunk eltérést a metabolikus aktivitásban a különböző sejtek között. 100%-nak tekintettük a kezeletlen sejtek metabolikus aktivitását, az eredményeket a kezeletlen sejtekhez viszonyított százalékos arányban fejeztük ki.

Hialuronsav termelés alacsony koncentrációjú (1%) füstelegyek mellett

A hialuronsav termelésében sem találtunk különbséget az EOP és kontroll OF-oknál 1%-os FE kezelést követően a kezeletlen OF-k értékeihez viszonyítva (11. ábra). Minden sejtvonal hasonlóan viselkedett ebben a tekintetben, függetlenül attól, hogy beteg vagy kontroll orbitából származtak-e ($p=0,83$). Az 1%-os FE nem volt hatással a vizsgált sejtek HA termelésére sem 24 órával, sem 48 órával a kezelés után ($p=0,14$).



6. ábra: 1%-os CIG, HTP, ECIG kezelés hatása az EOP és kontroll OF-k HA termelésére. 100%-nak vettük a kezeletlen sejtek HA termelését, az eredményeket a kezeletlen sejtekhez viszonyított százalékos arányban fejeztük ki.

5.2. A terhesség hatása az endokrin orbitopathia kialakulására

Vizsgálatunk során GD-val, majd EOP-val szövődött terhességet követtünk, mely során a várttal ellentétes klinikai kép hátterének, pathogenesisének tisztázására törekedtünk.

Az irodalomban elsőként írunk le egy 19 éves nő harmadik terhessége során, a második trimeszterben újonnan kialakult EOP betegséget.

A páciens anamnézisében nem szerepelt korábban pajzsmirigybetegség. A hyperthyreosist háziorvosa diagnosztizálta a terhesség 20. hetében.

Laborleletei ekkor a következőképp alakultak: TSH 0,01 mU/L (referencia tartomány: 0,4-4,2 mU/L), FT4: 78,4 pmol/L (referencia tartomány: 12–22 pmol/L), FT3: 37,4 pmol/L (referencia tartomány: 3,1–6,8 pmol/L). Ismeretlen okok miatt csak a 30. terhességi héten jelentkezett legközelebb a területileg illetékes endokrin szakrendelésen, a laboreredményekben továbbra is hyperthyreosis jelei mutatkoztak, mely miatt thyreosztatikus terápiát (thiamazole) indítottak. Egyéb ismert betegségről nem számolt be, korábban nem voltak pajzsmirigy problémái és terhesség előtti laboreredmények nem álltak rendelkezésre. Mindhárom terhessége természetes úton fogant, előző két gyermekét császármetszéssel hozta világra téraránytalanság miatt. Anamnéziséből kiemelendő, hogy naponta 20 szál cigarettát szívott, melyet a terhesség alatt sem hagyott el.

Klinikánkon először a 33. terhességi héten jelentkezett, főbb panaszai a jobb oldali exophthalmus, csökkent és fájdalmas szemmozgások, valamint a csökkent vízus voltak (4. táblázat). Elmondása szerint az első tünete, az exophthalmus a terhesség 14. hetén jelentkezett jobb szemén. Felvételkor a TSH és pajzsmirigyhormon szintek még továbbra is a hyperthyreoid tartományban voltak (3. táblázat). A TRAb érték 2,4 U/L (referencia tartomány: < 1 U/L), az anti-thyreoglobulin antitest szint 1324,0 IU/ml (referencia tartomány < 60 IU/ml.) voltak. Az aktuális ajánlások (96) ellenére metimazol indult 50 mg/nap dózisban, mivel a súlyos hyperthyreosis jelentősen növelte a koraszülés kockázatát, emellett a harmadik trimeszterben a metimazol már nem bírt magzatkárosító kockázattal. Három nap után a metimazol dózisát 30 mg/napra csökkentettük. A szemészeti vizsgálatok ekkor továbbra is jelentős jobb oldali exophthalmust mutattak, beszűkült és fájdalmas szemmozgásokkal. A látásélesség 0,6 volt a jobb szemén és szemhéj oedema is jelen volt ezen az oldalon. Az exophthalmus mértéke 28/21 mm volt 90 mm-es alap mellett Hertel vizsgálattal (a normál határérték 20 mm). Az EOP állapotát súlyosnak ítéltük meg az EUGOGO osztályozás alapján (97), a Clinical Activity Score (CAS) érték jobb oldalt 6/7 és bal oldalt 0/7 volt. A magzat folyamatos monitorozás mellett megfelelő növekedési ütemet mutatott, golyvát és tachycardiát sem láttunk az ultrahangos vizsgálatokkal. A 34. terhességi héttől kezdve a metimazol terápiát 2x15 mg/napra módosítottuk. A 38. héten végzett szemészeti vizsgálatokon a vízus, a CAS érték és az exophthalmus javuló tendenciát mutatott (4. táblázat), habár a szem mögötti fájdalom, valamint a szemmozgáskor jelentkező fájdalom és a szemhéjoedema még jelen voltak. Mivel nem alakult ki látást veszélyeztető EOP, így a magas dózisú kortikoszteroid terápiától eltekintettünk.

Betegünk a 39. héten egészséges, 3170 grammos leány újszülöttet hozott a világra császármetszéssel. A szülészeti munkacsoport a szakmai irányelvek alapján, az EOP és a fennálló téraránytalanság miatt is a császármetszés mellett döntöttek. Az újszülött nem mutatta a pajzsmirigy-alulműködés klinikai jeleit, és a 3. napi TSH szintje is az újszülött referencia tartományban volt. Az anya pajzsmirigyhormonszintjei a szülés után emelkedni kezdtek; a thiamazol adagját ennek megfelelően módosítottuk, bisoprolollal kiegészítve. Szempanaszai a császármetszést követő napon lényegesen javultak, a CAS csökkent, és a látásélesség normalizálódott (4. táblázat). Az exophthalmus, a szemhéj- és kötőhártya-vörösség, valamint a szemhéj- és a caruncula duzzanata a szülés utáni 3. napon is jelen voltak (12. ábra). A továbbiakban MRI vizsgálatot terveztünk, melybe a páciens nem egyezett bele. Továbbá előjegyeztük thyreoidectomia műtetre is, melyre azonban nem jelent meg, ahogy a későbbi kontroll vizsgálatkora sem, így az újszülött és az anya későbbi állapotáról nem tudtunk információt nyerni.



12. ábra: A beteg szemei a 3. post partum napon. Jobb oldalon még jelen volt az exophthalmus, a visus viszont már 1,0 volt

6. Megbeszélés

6.1. A dohányzás újabb típusai hatásának vizsgálata endokrin orbitopathiában

Az orbita fibroblastok különböző immunológiai folyamatok célpontjai lehetnek GD-ben, az autoimmun folyamat hatására a sejtek működése megváltozik, olyan folyamatok sorozatát indítva el, melyek az orbita kötőszövetes térfogatának megnövekedéséhez és az EOP típusos klinikai képének kialakulásához vezetnek (13). Az OF-k nagy mennyiségű HA-t termelnek bizonyos cytokinek jelenlétében (13), és érett adipocytává képesek differenciálódni, melyek nagyobb számú thyrotropin receptor expresszáására is képesek mint a fibroblastok (20, 98). Sejtszintű változások vezetnek az EOP betegek jellegzetes klinikai tüneteinek kialakulásához, amely magában foglalja az extraocularis izmok megnagyobbodását és az orbitális kötőszövet expanszióját. Más helyekről származó fibroblastokkal összehasonlítva az OF-k fokozott gyulladásos reakciót mutatnak (81). A dohányzás az EOP kialakulásának egyik fő rizikótényezője és pozitív korreláció figyelhető meg a naponta elszívott cigaretták száma és a betegség súlyossága között (59). A hagyományos dohányzás alternatívái a közelmúltban kerültek bevezetésre; az ECIG és a HTP egyre nagyobb népszerűségnek örvendenek. Azonban ezen új típusú dohánytermékeknek az EOP lefolyására gyakorolt hatásairól nem áll rendelkezésre adat, így azt még nem ismerjük, hogyan befolyásolják a betegség pathogenezisét. Klinikai tapasztalatunk, hogy egyes EOP betegeknél, akik nem tudtak lemondani a dohányzásról, az EOP szubjektív és objektív tünetei mérséklődtek a dohányzás HTP formájára váltása után. Ezen tapasztalat alapján választottuk a kísérletsorozatunk alapjául a különböző dohánytermékek vizsgálatát orbita fibroblast sejtenyészeteken. Célunk volt, hogy megvizsgáljuk az egyes dohányfüst termékek (CIG, HTP, ECIG) hatását. Laboratóriumi módszernek egy új, rendkívül szenzitív technikát (RT-CES) választottunk, összevetve hagyományos módszerekkel (MTT teszt a metabolikus aktivitás vizsgálatára, valamint ELISA a hialuronsav termelés meghatározására).

A RT-CES technológiát, mint mérési módszert a sejtbiológiában már több területen alkalmazzák, például a sejtproliferáció- (85, 99), sebgyógyulás- (100), citotoxicitás meghatározása (86, 101, 102), valamint a daganatos sejtek kutatásánál (103). Ezzel a módszerrel leírható a CI, amely becslésként szolgál a proliferáció és metabolikus aktivitás meghatározására, az eljárást legtöbbször immortalizált sejtvonalakon alkalmazzák (86, 104). Bagnaninchi és munkatársai zsírszövet eredetű őssejtek differenciálódását vizsgálta (105),

Yalcin és munkatársai pedig különböző haemostaticumok cytotoxikus hatását vizsgálta gingiva eredetű fibroblastokon (105, 106). A technika előnye, hogy időfüggő, amely lehetővé teszi, hogy valós időben elemezzük a füst kivonatok hatásait az orbita fibroblastokon. Tanulmányunk célja az volt, hogy megvizsgálja az OF-k sejtválasztát in vitro a hagyományos cigaretták és a közelmúltban kapható dohánytermékek füst-expozíciójára. A humán primer OF-kultúrákat EOP és pajzsmirigybetegségben nem szenvedő kontroll betegektől nyertük. Tudomásunk szerint ez az első olyan tanulmány, amely a CIG, a HTP és az ECIG termékek hatását vizsgálja az EOP és kontroll betegekből származó orbita fibroblastokon, és ez az első alkalom, amikor valós idejű impedanciameghatározást alkalmaznak ezen sejt típuson.

Az első kísérletsorozatban a hagyományos cigarettafüst-kivonat hatását vizsgáltuk magas koncentrációban (50%) az EOP és kontroll OF-kon. A vizsgálat célja a magas koncentrációnál részben annak megállapítása volt, hogy az RT-CES módszerrel detektálunk-e változást az EOP fibroblastokon, valamint, hogy az új módszer eredményeit összevegyük a hagyományos labortechnikákkal mérhető és várt eredményekkel.

A kontroll OF-k nem reagáltak az 50%-os FE-kezelésre, azonban az EOP OF-k másképp viselkedtek. A kezelt EOP OF-k CI-értéke jelentősen nőtt a FE-mentes EOP OF-okhoz képest. Ebben a kísérletsorozatban a korábban leírtaknak megfelelően magasabb koncentrációjú FE-kivonatokat használtunk (59). Az eredmények a vártak megfelelőek voltak, azonban a toxicitáson kívül egyéb folyamatokat is sejtetnek a háttérben. A vizsgálatunk első 72 órája alatt megfigyelt változások arra engednek következtetni, hogy azon fibroblastok, amelyek túléltek a magas koncentrációjú kezelés toxicitását, olyan változásokon mentek keresztül, amelyek az EOP OF működését a kontrolloktól eltérően befolyásolják. Elemeztük az RT-CES által mért CI értékeket és összehasonlítottuk az MTT-teszt eredményeivel a metabolikus aktivitás értékeléséhez. A kezelt és a kezeletlen OF-ok HA-termelését szintén elemeztük, így következtetve a fibroblastok anyagcseréjében bekövetkezett változásokra. Az MTT- és HA-méréseket 24, 48 és 72 óra elteltével végeztük, míg az RT-CES 72 órán keresztül folyamatos adatokat szolgáltatott és ezen mérések eredményeit hasonlítottuk össze. A kezelés 24. és 48. órájában az anyagcsere-aktivitás a CIG-vel kezelt sejtek esetén szignifikánsan alacsonyabb volt a kezeletlen sejtekhez képest (EOP és a kontroll: 24 óra $p < 0,001$; 48 óra $p < 0,0001$). A 60. órára a különbség a metabolikus aktivitásban a FE kezelt és FE-vel nem kezelt sejtek között eltűnt az összes sejtvonalon (EOP $p = 0,3$; kontroll $p = 0,63$). 72 óra elteltével a CIG-kezelt vonalak metabolikus aktivitása szignifikánsan magasabb volt, mint a kezeletlen sejteké (EOP $p = 0,007$; kontroll $p = 0,012$). Feltételezzük, hogy a kezelt sejtek 72 óránál megfigyelhető metabolikus

aktivitás növekedése a CIG mérgező vegyületeinek a közegben történő lebomlása miatt alakult ki, ami lehetővé tette a sejtek számának növekedését. A proliferáció az OF-ok esetén függ a sejtsűrűségtől (107). Az EOP és kontroll sejtek az 50%-os CIG kezelésre egy állandó jellegű, kétszeres HA termeléssel reagáltak, amely összhangban van a dohányzás betegségekre gyakorolt hatásaival és a klinikai képpel. Az 50%-os CIG füstelegy hozzáadása után az EOP és a kontroll sejtek eltérően viselkedtek a CI-értéket tekintve, a CIG-kezelt sejtek metabolikus aktivitása az első 48 órában jelentősen alacsonyabb volt, mint a kezeletlen sejteké, azonban 72 óra elteltével a CIG-kezelt fibroblastok aktivitása már megelőzte a FE kezelés-mentes vonalakét. Az EOP és kontroll sejtek az 50%-os koncentrációjú CIG-kezelésre állandó, kétszeres HA-termeléssel reagáltak. Ezzel szemben ezen sejtvonalak CI-je a sejtek eredetétől függ (9. ábra). A CIG kezelt EOP sejtek esetén a CI gyors növekedése, majd az azt követő folyamatos csökkenés a nagy FE koncentráció toxikus hatására vezethető vissza. Ez okozhatta a sejtek elpusztulását és az elektródákról való leválását, ami a CI megváltozásához vezetett. Ugyanez a toxikus hatás okozhatta az MTT-tesztben észlelt csökkenést az első 24 órában. A 72. órára a metabolikus aktivitás megemelkedett a CIG füstelegy kezelt EOP és kontroll sejteken. Mivel a magas (50%) koncentráció toxikus lehetett a sejtek számára, és csökkentette a metabolikus aktivitást, a második kísérletsorozatban egy alacsonyabb (1%-os) koncentrációt alkalmaztunk, amely napi 8 szál cigaretta elszívásának felel meg. Bár az 1%-os CIG füst kivonat valóban elhanyagolható hatást gyakorolt a kontroll OF-kra, mégis azt feltételezzük, hogy nem volt toxikus ebben a koncentrációban.

Az RT-CES figyelemre méltó különbséget mutatott ki az 1%-os HTP, ECIG és CIG kezelés hatásában az OF-kon. Az OF-ok eredetétől függően különböző válaszokat kaptunk, az EOP fibroblastok érzékenyebbek voltak a füstelegyekre, és ez az érzékenység függött a felhasznált füstelegy típusától is. Minden tesztelt füstelegy egyértelmű változást eredményezett a CI értékekben az összes sejtvonalon. Azonban amikor 1%-os HTP, ECIG és CIG eleggyel történt a kezelés, sem az EOP, sem a kontroll OF-k esetén nem találtunk különbséget a metabolikus aktivitásban, valamint a hialuronsav termelésben sem, amely jelzi az RT-CES technika érzékenységét. Az RT-CES eredmények alapján az ECIG okozta a legnagyobb változást az EOP sejteken (9. ábra). A HTP kisebb változásokat okozott a CI-ben és a CIG kezelésre reagáltak a legkevésbé a sejtek az EOP csoportban. A FE-vel nem kezelt EOP sejtek a középmezőnyben helyezkedtek el, kisebb CI-t mutattak a kezelt csoportokhoz képest. A kontroll sejtek esetében az 1%-os HTP, ECIG és CIG kisebb különbséget okoztak a CI-ben, de az még így is szignifikáns volt (10. ábra). Mindegyikük CI értéke kisebb volt a kezelt EOP

vonalakhoz képest, és aktivitásuk hasonló volt. Míg a CI-értékek a sejtaktivitás időfüggő, dinamikus változását mutatják 1%-os CC, HTP és ECIG koncentráció mellett, addig a metabolikus aktivitásra és a HA-termelésre nem volt jelentős hatással ez a koncentráció (10. és 11. ábra).

Vizsgálatunk egyik limitáló tényezője egy viszonylag új módszer, az RT-CES technika használata. Továbbá, jelenleg még nem tisztázott, hogyan tudjuk lefordítani eredményeinket a mindennapi gyakorlatra. In vivo többféle szisztémás és lokális tényező egyszerre van jelen a szemüregben, beleértve az immunológiai és endokrin folyamatokat, a megnövekedett nyomást és az egyedi szöveti struktúrát. Az orbita fibroblastok csak az egyik lehetséges célpontok az EOP pathogenezisében. Összefoglalva, a három különböző füst kivonat alacsony koncentrációban befolyásolta az EOP és a kontroll OF-k RT-CES-sel mért CI-jét, amely koncentráció még nem idézett elő változásokat a HA termelésben vagy metabolikus aktivitásban. A magas koncentrációjú CIG füst elegy csak az EOP fibroblastok viselkedését befolyásolta az RT-CES mérésekkel, habár a HA termelés az EOP és kontroll sejt vonalakon is emelkedett volt. Az RT-CES technika egy érzékeny módszer a dohányfüst elegy okozta változások mérésére OF-kon. A HTP és ECIG füst elegy különböző hatással bírtak, mint a CIG füst elegy, melyből arra következtethetünk, hogy a dohányzás új fajtái más hatással lehetnek a GD lefolyására. Ez alátámasztja klinikai gyakorlatban tett megfigyelésünket, miszerint egyes betegek, akik nem hajlandók lemondani a dohányzásról, annak alternatív formái eltérően befolyásolják szemtüneteiket. Megközelítésünk egy alkalmas in vitro modell lehet az OF-k viselkedésének vizsgálatára különböző körülmények között.

6.2. Terhesség hatása az endokrin orbitopathia kialakulására

A normál terhesség során számos élettani változás következik be (108). Mind a vörösvértestek tömege, mind a plazmavolumen megnő, ez utóbbi folyamat kifejezettebb, így fiziológiás haemodilutio jelenik meg. A pulzus és a perctérfogat megnő, az erek ellenállása pedig csökken. A glükóztolerancia csökken, ahogyan az epekiválasztás is. Az ösztrogén és progeszteron szintek jelentősen megemelkednek, az ösztrogén százszor magasabb is lehet, mint a menstruációs ciklus során (108). A természetes ölősejtek (NK-sejtek) száma a normál szinten van, azonban csökkent cytolytikus aktivitást mutatnak (109). A keringő plasmasejtek és B-sejtek száma megtartott marad, csak úgy mint az antitest válasz és antitest termelés is (110). Habár a keringő T-lymphocyták számában nincs jelentős változás, a CD4⁺ sejtek arányában enyhe csökkenés figyelhető meg terhesség során, amely az immunaktivitás enyhülését

eredményezi (111). A regulatorikus CD4+, CD25+ T-sejtek, vagy Treg sejtek a Th1- és Th2-típusú folyamatok irányításában játszanak fontos szerepet. A Th1- típusú és a Th2-típusú immunfolyamatok a sejtes és a humorális immunitásban vesznek részt (112). A terhesség korai szakában a Treg sejtek száma gyors növekedést mutat, a csúcsát a második trimeszterben éri el (113). Ezen sejtek képesek elnyomni a Th1- és Th2-típusú reaktivitást is a foetalis alloantigének ellen. A Th1 klónok érzékenyebbek a Treg effektusokkal szemben, amely a Th2 klónok túlsúlyához vezet a Th1 sejtes immunválasszal szemben. A cytokin egyensúly így elmozdul a Th1 sejtes aktivitás kedvezőtlen hatásai felől, amelyek abortuszhoz vezethetnek (114). A fentiek miatt a Th1/Th2 sejtes aktivitásban a terhesség fenntartása szempontjából fontos a megfelelő egyensúly. A Treg sejtek számának egyértelmű csökkenése figyelhető meg a szülés előtti hetekben. Az így visszaálló terhesség előtti állapot elősegítheti az autoimmun betegségek fellángolását a szülést követően (115, 116).

A terhességnek összetett hatása van az autoimmun betegségek lefolyására. A legtöbb ilyen kórkép javulást mutat a várandósság során, pár kivétellel, úgymint az SLE és az 1-es típusú diabetes mellitus, amelyek súlyosbodhatnak is (76, 78). A metimazollal kezelt, beállított GD betegeknél jelentkezhet súlyosbodás az első trimeszterben a hCG emelkedés okozta stimuláló hatásnak köszönhetően (117). A második trimeszterben a fiziológiás immuntolerancia miatt javulás következik be. Azonban a szülés utáni időszakban, amikor az immunfunkció visszatér a normális szintre, gyakran megfigyelhető a visszaesés (118). Ezért, a betegség aktivitásának javulására mind a Graves-Basedow-kór, mind az EOP esetén számítani lehet terhesség során. Az EOP terhesség alatti lefolyásáról az irodalmi adatok szegényesebbek (119, 120). A GD és az EOP különböző lefolyást mutathat terhesség alatt. Egy vizsgálatban 9 terhesség előtt már ismert GD-ben szenvedő nőből 5-nél alakult ki enyhe orbithopathia várandóssága során. Másfelől a már meglévő betegségben szenvedő hölgyek 70 százaléka változatlan szemészeti státuszt, vagy javulást tapasztalt és csupán 30 százaléuk számolt be romlásról a post partum időszakban (121).

Vizsgálatunk tárgyát képező esetben a GD és az EOP is a terhesség során került felismerésre. Az EOP a 14. gesztációs héten jelentkezett, valamint a gravidának nem voltak hasonló panaszai a két korábbi terhessége alatt. A páciens megjelenésekor kifejezett EOP tüneteket láttunk, jobb oldali túlsúllyal. A beteg orbitopathiáját az EUGOGO beosztás szerint közepesúlyosnak ítéltük meg, látást veszélyeztető állapot nem állt fenn (34). Első vonalbeli kezelésként az euthyreoid állapot visszaállítása érdekében gyógyszeres terápia került beállításra. Thiamazole-t adtunk, kezdetben 30+20 mg adagban naponta, majd egy hét elteltével naponta kétszer 15 mg-ot. A

páciens a terhességet megelőzően, valamint annak során is naponta körülbelül 20 szál cigarettát szívott, bár figyelmét minden kezelőorvos felhívta a dohányzás felfüggesztésének fontosságára. A dohányzás elhagyása önmagában javítja a szemtüneteket, illetve megléte rontja a kezelés hatékonyságát (6). Ahogy a fent leírt kezelés hatására a vízús és a klinikai kép javulását tapasztaltuk, eltekintettünk az immunszuppresszív terápiától.

Esetünkben az EOP megjelenéséhez és súlyosbodásához a terhesség során leginkább az ilyenkor jelentkező hypervolaemia és a vele összefüggő élettani változások vezethettek. Az orbita szövetek térfogatának kismértékű növekedése az EOP súlyosbodását eredményezheti, mivel a csontos üreg bármilyen térfogatfeleslege emelkedett nyomáshoz, a rectus izmok további megnyúlásához és a sinus cavernosusba történő vénás elvezetés csökkenéséhez vezet (122). A szülés után jelentkező gyors térfogat redistribúció magyarázhatja az EOP gyors javulását. Az nem ismert, hogy egyes esetekben miért csak féloldali exophthalmus alakul ki, a beteg vizsgálatakor ki kell zárni az unilateralis előfordulás egyéb lehetséges okait. Munkacsoportunk (123) és mások is arra a következtetésre jutottak, hogy képalkotó eljárásokkal vizsgálva az orbita folyamat még azokban az esetekben is kétoldali, amikor az egyik oldal teljesen megkíméltnak tűnik a klinikai kép alapján. MRI vizsgálatot terveztünk, melyet a szülés utánra halasztottunk összhangban az aktuális nemzetközi irányelvekkel (124), azonban később betegünk nem jelent meg az egyeztetett MRI vizsgálatra.

A vizsgált páciens naponta 20 szál cigarettát szívott el a terhessége előtt és az alatt. Az előző két terhessége során a napi elszívott cigaretták száma nem ismert, azonban az egyre nagyobb mennyiségben fogyasztott dohánytermék az évek alatt ugyancsak összefüggésbe hozható az EOP megjelenésével. Ezek mellett esetünk azért is tekinthető szokatlannak, mivel a GD és az EOP nem korlátozta magát a terhesség során, és egy háttérben fennálló pajzsmirigy működési zavar hozzájárulhatott a betegség fellángolásához. Vizsgálatunk limitáló tényezője, hogy sem a tervezett MRI vizsgálatot, sem a tervezett kontroll vizsgálatokat nem tudok elvégezni az alacsony beteg compliance miatt. A páciens alacsony társadalmi- és gazdasági státusza magyarázhatja eltűnését az egészségügyi kontrollvizsgálatokról, valamint a masszív dohányzást is terhessége során.

A felismert esetben a Graves-Basedow-kór mellett az erős dohányzás valamint a terhesség során jelentkező a hypervolaemia együttesen járulhatott hozzá az EOP kialakulásához. A harmadik trimeszterben észlelt romlás, különösen a látásromlás valószínűleg a térfogattal, azaz az oedemaképződéssel függhetett össze, mivel a szülés után a szemtünetek gyorsan visszafejlődtek, a vízús spontán javult miközben a dohányzás intenzitása változatlan maradt. A

szemtünetek további javulását a páciens egy telefonos konzultáció alkalmával megerősítette. A GD-ben szenvedő várandós anyáknak a terhesség során a szemtünetek követésére van szükségük, lehetőleg EOP gondozásában járatos centrumban. Megfelelő terápia mellett az esetek 70%-ában szülés után javulás, vagy változatlan státusz várható, szülés után 6 hónappal azonban újabb relapsusra lehet számítani, melyre külön fel kell hívni a páciensek figyelmét. Ezen esetekben döntő az endokrinológus, a szülész-nőgyógyász és a szemész hatékony kollaborációja. Fontos hangsúlyozni, hogy az ilyen betegek kezelése olyan centrumokban történjen, ahol a társszakmák között biztosított a hatékony kollaboráció.

A prekonceptcionális és a várandósgondozás kiemelt feladata, hogy a hyperthyreosisban szenvedő gravidák edukációja kitérjen a dohányzás okozta egészségkárosító hatás mellett az EOP megjelenésének fokozott veszélyére is.

7. Új eredmények

7.1. Új eredmények – A dohányzás újabb típusai hatásának vizsgálata endokrin orbitopathiában

1. Az RT-CES módszer alkalmasnak bizonyult a különböző környezeti tényezők orbita fibroblastokon történő tanulmányozására. Kellően érzékeny módszernek bizonyult ahhoz, hogy detektálni tudja az alacsonyabb koncentrációjú FE okozta hatásokat a sejteken, így alkalmas lehet a kötőszövetben lejátszódó folyamatok pontosabb vizsgálatára.
2. A módszer alkalmas arra, hogy különbséget tudjunk kimutatni az EOP és kontroll orbita fibroblastok viselkedésében.
3. Igazoltuk, hogy magas koncentrációjú CIG füstanyag hozzáadása esetén az EOP és kontroll fibroblastok viselkedése eltérő. A magasabb koncentrációjú CIG füstanyag mellett az EOP OF-k magasabb CI értékeket mutatnak. Ez alátámasztja a dohányfüst szerepét az EOP pathogenezisében.
4. Az 50%-os CIG füstanyag kezelésre mind az EOP, mind a kontroll fibroblastok fokozott HA termeléssel reagáltak, amely összhangban van a betegség feltételezett pathomechanizmusával és a klinikai kép következményes romlásával.
5. Kutatásunk elsőként igazolta, hogy az új típusú dohánytermékek hatására (ECIG, HTP) az EOP fibroblastok viselkedése eltérő, mely alátámasztja a feltételezést, hogy az alternatív dohányzási formák különbözően hatnak a betegség lefolyására, mint a hagyományos cigaretta füst.

7.2. Új eredmények - Terhesség hatása az endokrin orbitopathia kialakulására

1. A terhesség második és harmadik trimeszterében számítani kell a fennálló EOP súlyosbodására, annak ellenére hogy a Graves-Basedow-kóros hyperthyreosis melynek szövődményeként az EOP fellépett általában javulást mutat.
2. A terhesség alatt kialakuló vagy romló EOP esetén a dohányzás elhagyása önmagában a szemészeti eltérés gyors és jelentős javulásához vezethet.

8. Összefoglalás

A dohányzás az EOP legjelentősebb befolyásolható rizikófaktora, valamint jelentős hajlamostó tényezőként szerepel mind a légzőszervi-, mind a nem légzőszervi daganatos betegségek kialakulásában. Amellett, hogy a dohányosok körében gyakrabban fordul elő az EOP, a betegség súlyossága egyenes arányban nő az elszívott cigaretták számával.

Napjainkban a hagyományos cigaretták (CIG) mellett elterjedőben vannak az alternatív dohányzási formák, úgymint a hevített dohánytermékek (HTP), vagy az e-cigaretták (ECIG). Szerepük az EOP pathogenezise szempontjából jelenleg még nem ismert. Klinikai tapasztalataink azt mutatják, hogy a dohányzásról lemondani képtelen páciensek körében a hagyományos cigarettáról a dohányzás HTP formájára történő váltás kis mértékben a klinikai tünetek javulását eredményezte. Kutatásunkban a fenti jelenséget szeretnénk volna részletesebben megvizsgálni.

Vizsgálatunk újdonsága a Real Time Cell Electronic Sensing technika (RT-CES). Ez a módszer impedancia változás mérésével határozza meg a letapadó kultúrában növekvő sejtek kinetikáját. Dohányfüstelegyeket hoztunk létre a fent említett dohánytermékeket használva, melyeket a méréseknél az OF-hoz adtuk.

Az RT-CES módszer alkalmasnak bizonyult a különböző környezeti tényezők orbita fibroblastokon történő tanulmányozására. Kellően érzékeny módszer ahhoz, hogy detektálni tudja a dohányfüstelegyek okozta hatásokat a sejteken, így alkalmas lehet a kötőszövetben lejátszódó folyamatok pontosabb vizsgálatára. Kutatásunk elsőként igazolta, hogy az új típusú dohánytermékek hatására az EOP fibroblastok viselkedése eltérő, mely alátámasztja a feltételezést, hogy az alternatív dohányzási formák különbözően hatnak a betegség lefolyására, mint a hagyományos cigaretta füst.

Vizsgálni kívántuk az irodalomban ritkaságnak számító várandós hölgy esetét, aki harmadik terhessége során újonnan kialakult EOP miatt jelentkezett Klinikánkon. Anamnézisében pajzsmirigybetegetség nem szerepelt és korábbi két terhessége során hasonló panaszok nem jelentkeztek, egészséges újszülötteleket hozott a világra. Terhessége során folyamatosan dohányzott, mely nagyban hozzájárulhatott a szemtünetek kialakulásához.

A terhesség második és harmadik trimeszterében számítani kell a fennálló EOP súlyosbodására, annak ellenére hogy a Graves-Basedow-kóros hyperthyreosis melynek szövődményeként az EOP fellépett általában javulást mutat. A terhesség alatt kialakuló vagy romló EOP esetén a dohányzás elhagyása önmagában a szemészeti eltérés gyors és jelentős javulásához vezethet.

9. Summary

Smoking is the most important modifiable risk factor for thyroid associated orbitopathy (TAO) and a major predisposing factor for both respiratory and non-respiratory cancers. While TAO is more common among smokers, the severity of the disease increases in direct proportion to the number of cigarettes smoked. Today, alternative forms of smoking, such as heated tobacco products (HTP) or e-cigarettes (ECIG), are becoming more common in addition to traditional cigarettes (CIG). Their role in the pathogenesis of TAO is currently unknown. Our clinical experience shows that switching from traditional cigarettes to HTP in patients unable to quit smoking resulted in a small improvement in clinical symptoms. In our research we wanted to investigate this phenomenon in more detail.

A novel technique used in our study is Real Time Cell Electronic Sensing (RT-CES), which determines the kinetics of growing cells in a scanning culture by measuring impedance changes. Tobacco smoke extracts were generated using the aforementioned tobacco products, which were added to the orbital fibroblasts for measurements.

The RT-CES method has been shown to be suitable for studying different environmental factors on orbital fibroblasts. It is sensitive enough to detect the effects of tobacco smoke extract on the cells and may therefore be suitable for a more precise study of the processes occurring in connective tissue. Our study is the first to demonstrate that TAO fibroblasts behave differently when exposed to new types of tobacco products, supporting the hypothesis that alternative forms of tobacco smoke have different effects on disease progression than traditional cigarette smoke.

We wanted to investigate the case of a pregnant woman, a rarity in the literature, who presented to our clinic with a new-onset TAO during her third pregnancy. She had no history of thyroid

disease and had no similar complaints in her previous two pregnancies, delivering two healthy newborns. She smoked continuously during her pregnancy, which may have contributed to the ocular symptoms.

In the second and third trimesters of pregnancy, an exacerbation of existing TAO should be expected, although Graves-Basedow hyperthyroidism with complications of TAO usually improves. In cases of TAO that develops or worsens during pregnancy, smoking cessation alone can lead to a rapid and significant improvement of the ocular abnormality.

10. Irodalomjegyzék

10.1. Az értekezés által idézett közlemények

1. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, et al. The spectrum of thyroid disease in a community: the Whickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1977;7(6):481-93.
2. Bartley GB. The epidemiologic characteristics and clinical course of ophthalmopathy associated with autoimmune thyroid disease in Olmsted County, Minnesota. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1994;92:477-588.
3. Manji N, Carr-Smith JD, Boelaert K, Allahabadia A, Armitage M, Chatterjee VK, et al. Influences of age, gender, smoking, and family history on autoimmune thyroid disease phenotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(12):4873-80.
4. Stan MN, Garrity JA, Bahn RS. The evaluation and treatment of graves ophthalmopathy. *Med Clin North Am*. 2012;96(2):311-28.
5. Chin YH, Ng CH, Lee MH, Koh JWH, Kiew J, Yang SP, et al. Prevalence of thyroid eye disease in Graves' disease: A meta-analysis and systematic review. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2020;93(4):363-74.
6. Mann K. Risk of smoking in thyroid-associated orbitopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999;107 Suppl 5:S164-7.
7. Rapoport B, McLachlan SM. The thyrotropin receptor in Graves' disease. *Thyroid*. 2007;17(10):911-22.
8. Bahn RS. Graves' ophthalmopathy. *N Engl J Med*. 2010;362(8):726-38.
9. Otto EA, Ochs K, Hansen C, Wall JR, Kahaly GJ. Orbital tissue-derived T lymphocytes from patients with Graves' ophthalmopathy recognize autologous orbital antigens. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(8):3045-50.
10. Smith TJ. Insights into the role of fibroblasts in human autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol*. 2005;141(3):388-97.
11. Vigetti D, Viola M, Karousou E, De Luca G, Passi A. Metabolic control of hyaluronan synthases. *Matrix Biol*. 2014;35:8-13.
12. Monslow J, Govindaraju P, Puré E. Hyaluronan - a functional and structural sweet spot in the tissue microenvironment. *Front Immunol*. 2015;6:231.
13. Prabhakar BS, Bahn RS, Smith TJ. Current perspective on the pathogenesis of Graves' disease and ophthalmopathy. *Endocr Rev*. 2003;24(6):802-35.

14. Wang Y, Smith TJ. Current concepts in the molecular pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(3):1735-48.
15. Smith TJ, Wang HS, Hogg MG, Henrikson RC, Keese CR, Giaever I. Prostaglandin E2 elicits a morphological change in cultured orbital fibroblasts from patients with Graves ophthalmopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(11):5094-8.
16. Wang HS, Keese CR, Giaever I, Smith TJ. Prostaglandin E2 alters human orbital fibroblast shape through a mechanism involving the generation of cyclic adenosine monophosphate. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(12):3553-60.
17. Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol.* 1991;146(1):108-13.
18. Brown DM, Warner GL, Alés-Martínez JE, Scott DW, Phipps RP. Prostaglandin E2 induces apoptosis in immature normal and malignant B lymphocytes. *Clin Immunol Immunopathol.* 1992;63(3):221-9.
19. Hu ZQ, Asano K, Seki H, Shimamura T. An essential role of prostaglandin E on mouse mast cell induction. *J Immunol.* 1995;155(4):2134-42.
20. Sorisky A, Pardasani D, Gagnon A, Smith TJ. Evidence of adipocyte differentiation in human orbital fibroblasts in primary culture. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(9):3428-31.
21. Valyasevi RW, Erickson DZ, Harteneck DA, Dutton CM, Heufelder AE, Jyonouchi SC, et al. Differentiation of human orbital preadipocyte fibroblasts induces expression of functional thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(7):2557-62.
22. Bahn RS. Clinical review 157: Pathophysiology of Graves' ophthalmopathy: the cycle of disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(5):1939-46.
23. DeGrendele HC, Estess P, Siegelman MH. Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science.* 1997;278(5338):672-5.
24. Grewal IS, Flavell RA. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunol Rev.* 1996;153:85-106.
25. Feldon SE, O'Loughlin C W, Ray DM, Landskroner-Eiger S, Seweryniak KE, Phipps RP. Activated human T lymphocytes express cyclooxygenase-2 and produce proadipogenic prostaglandins that drive human orbital fibroblast differentiation to adipocytes. *Am J Pathol.* 2006;169(4):1183-93.
26. Sempowski GD, Rozenblit J, Smith TJ, Phipps RP. Human orbital fibroblasts are activated through CD40 to induce proinflammatory cytokine production. *Am J Physiol.* 1998;274(3):C707-14.
27. Korducki JM, Loftus SJ, Bahn RS. Stimulation of glycosaminoglycan production in cultured human retroocular fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1992;33(6):2037-42.
28. Wang HS, Cao HJ, Winn VD, Rezanka LJ, Frobert Y, Evans CH, 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.
29. Blandford AD, Zhang D, Chundury RV, Perry JD. Dysthyroid optic neuropathy: update on pathogenesis, diagnosis, and management. *Expert Rev Ophthalmol.* 2017;12(2):111-21.
30. Rundle FF, Wilson CW. Development and course of exophthalmos and ophthalmoplegia in Graves' disease with special reference to the effect of thyroidectomy. *Clin Sci.* 1945;5(3-4):177-94.
31. Verity DH, Rose GE. Acute thyroid eye disease (TED): principles of medical and surgical management. *Eye (Lond).* 2013;27(3):308-19.
32. Wiersinga WM, Bartalena L. Epidemiology and prevention of Graves' ophthalmopathy. *Thyroid.* 2002;12(10):855-60.
33. Enzmann DR, Donaldson SS, Kriss JP. Appearance of Graves' disease on orbital computed tomography. *J Comput Assist Tomogr.* 1979;3(6):815-9.

34. Bartalena L, Baldeschi L, Dickinson A, Eckstein A, Kendall-Taylor P, Marcocci C, et al. Consensus statement of the European Group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) on management of GO. *Eur J Endocrinol*. 2008;158(3):273-85.
35. Mourits MP, Prummel MF, Wiersinga WM, Koornneef L. Clinical activity score as a guide in the management of patients with Graves' ophthalmopathy. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1997;47(1):9-14.
36. Gorman CA. Clever is not enough: NOSPECS is form in search of function. *Thyroid*. 1991;1(4):353-5.
37. Utech CI, Khatibnia U, Winter PF, Wulle KG. MR T2 relaxation time for the assessment of retrobulbar inflammation in Graves' ophthalmopathy. *Thyroid*. 1995;5(3):185-93.
38. Szucs-Farkas Z, Toth J, Balazs E, Galuska L, Burman KD, Karanyi Z, et al. Using morphologic parameters of extraocular muscles for diagnosis and follow-up of Graves' ophthalmopathy: diameters, areas, or volumes? *AJR Am J Roentgenol*. 2002;179(4):1005-10.
39. Bartalena L, Pinchera A, Marcocci C. Management of Graves' ophthalmopathy: reality and perspectives. *Endocr Rev*. 2000;21(2):168-99.
40. Kahaly GJ. Recent developments in Graves' ophthalmopathy imaging. *J Endocrinol Invest*. 2004;27(3):254-8.
41. Postema PT, Krenning EP, Wijngaarde R, Kooy PP, Oei HY, van den Bosch WA, et al. [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹] octreotide scintigraphy in thyroidal and orbital Graves' disease: a parameter for disease activity? *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;79(6):1845-51.
42. Krassas GE. Octreoscan in thyroid-associated ophthalmopathy. *Thyroid*. 2002;12(3):229-31.
43. Rinderknecht J, Shapiro L, Krauthammer M, Taplin G, Wasserman K, Uszler JM, et al. Accelerated clearance of small solutes from the lungs in interstitial lung disease. *Am Rev Respir Dis*. 1980;121(1):105-17.
44. Galuska L, Leovey A, Szucs-Farkas Z, Szabados L, Garai I, Berta A, et al. Imaging of disease activity in Graves' orbitopathy with different methods: comparison of (99m)Tc-DTPA and (99m)Tc-depreotide single photon emission tomography, magnetic resonance imaging and clinical activity scores. *Nucl Med Commun*. 2005;26(5):407-14.
45. Bartalena L, Kahaly GJ, Baldeschi L, Dayan CM, Eckstein A, Marcocci C, 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.
46. Bahn Chair RS, Burch HB, Cooper DS, Garber JR, Greenlee MC, Klein I, et al. Hyperthyroidism and other causes of thyrotoxicosis: management guidelines of the American Thyroid Association and American Association of Clinical Endocrinologists. *Thyroid*. 2011;21(6):593-646.
47. Lazarus JH, Bartalena L, Marcocci C, Kahaly GJ, Krassas G, Wiersinga WM. Glucocorticoid administration for Graves' hyperthyroidism treated by radioiodine. A questionnaire survey among members of the European Thyroid Association. *J Endocrinol Invest*. 2010;33(6):409-13.
48. Bartalena L, Baldeschi L, Boboridis K, Eckstein A, Kahaly GJ, Marcocci C, et al. The 2016 European Thyroid Association/European Group on Graves' Orbitopathy Guidelines for the Management of Graves' Orbitopathy. *Eur Thyroid J*. 2016;5(1):9-26.
49. Hofbauer LC, Mühlberg T, König A, Heufelder G, Schworm HD, Heufelder AE. Soluble interleukin-1 receptor antagonist serum levels in smokers and nonsmokers with Graves' ophthalmopathy undergoing orbital radiotherapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(7):2244-7.
50. Marcocci C, Kahaly GJ, Krassas GE, Bartalena L, Prummel M, Stahl M, et al. Selenium and the course of mild Graves' orbitopathy. *N Engl J Med*. 2011;364(20):1920-31.

51. Durrani OM, Reuser TQ, Murray PI. Infliximab: a novel treatment for sight-threatening thyroid associated ophthalmopathy. *Orbit*. 2005;24(2):117-9.
52. Pérez-Moreiras JV, Alvarez-López A, Gómez EC. Treatment of active corticosteroid-resistant graves' orbitopathy. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*. 2014;30(2):162-7.
53. Pescovitz MD. Rituximab, an anti-cd20 monoclonal antibody: history and mechanism of action. *Am J Transplant*. 2006;6(5 Pt 1):859-66.
54. El Fassi D, Nielsen CH, Bonnema SJ, Hasselbalch HC, Hegedüs L. B lymphocyte depletion with the monoclonal antibody rituximab in Graves' disease: a controlled pilot study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(5):1769-72.
55. Salvi M, Vannucchi G, Campi I, Currò N, Dazzi D, Simonetta S, et al. Treatment of Graves' disease and associated ophthalmopathy with the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab: an open study. *Eur J Endocrinol*. 2007;156(1):33-40.
56. Erdei A, Paragh G, Kovacs P, Karanyi Z, Berenyi E, Galuska L, et al. Rapid response to and long-term effectiveness of anti-CD20 antibody in conventional therapy resistant Graves' orbitopathy: A five-year follow-up study. *Autoimmunity*. 2014;47(8):548-55.
57. Smith TJ, Janssen J. Insulin-like Growth Factor-I Receptor and Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *Endocr Rev*. 2019;40(1):236-67.
58. Szucs-Farkas Z, Toth J, Kollar J, Galuska L, Burman KD, Boda J, et al. Volume changes in intra- and extraorbital compartments in patients with Graves' ophthalmopathy: effect of smoking. *Thyroid*. 2005;15(2):146-51.
59. Cawood TJ, Moriarty P, O'Farrelly C, O'Shea D. Smoking and thyroid-associated ophthalmopathy: A novel explanation of the biological link. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(1):59-64.
60. Yoon JS, Lee HJ, Chae MK, Lee SY, Lee EJ. Cigarette smoke extract-induced adipogenesis in Graves' orbital fibroblasts is inhibited by quercetin via reduction in oxidative stress. *J Endocrinol*. 2013;216(2):145-56.
61. Mack WP, Stasior GO, Cao HJ, Stasior OG, Smith TJ. The effect of cigarette smoke constituents on the expression of HLA-DR in orbital fibroblasts derived from patients with Graves ophthalmopathy. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg*. 1999;15(4):260-71.
62. Centers for Disease Control and P, National Center for Chronic Disease Prevention and Health P, Office on Smoking and H. Publications and Reports of the Surgeon General. How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2010.
63. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2004;83:1-1438.
64. Prummel MF, Wiersinga WM. Smoking and risk of Graves' disease. *Jama*. 1993;269(4):479-82.
65. Pesch B, Kendzia B, Gustavsson P, Jöckel KH, Johnen G, Pohlabeln H, et al. Cigarette smoking and lung cancer--relative risk estimates for the major histological types from a pooled analysis of case-control studies. *Int J Cancer*. 2012;131(5):1210-9.
66. Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT, Petersen G, Bracci PM, Ji BT, et al. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann Oncol*. 2012;23(7):1880-8.
67. Liang PS, Chen TY, Giovannucci E. Cigarette smoking and colorectal cancer incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2009;124(10):2406-15.
68. Cancelada L, Sleiman M, Tang X, Russell ML, Montesinos VN, Litter MI, et al. Heated Tobacco Products: Volatile Emissions and Their Predicted Impact on Indoor Air Quality. *Environ Sci Technol*. 2019;53(13):7866-76.

69. Goniewicz ML, Knysak J, Gawron M, Kosmider L, Sobczak A, Kurek J, et al. Levels of selected carcinogens and toxicants in vapour from electronic cigarettes. *Tob Control*. 2014;23(2):133-9.
70. Farsalinos KE, Yannovits N, Sarri T, Voudris V, Poulas K, Leischow SJ. Carbonyl emissions from a novel heated tobacco product (IQOS): comparison with an e-cigarette and a tobacco cigarette. *Addiction*. 2018;113(11):2099-106.
71. Mallock N, Böss L, Burk R, Danziger M, Welsch T, Hahn H, et al. Levels of selected analytes in the emissions of "heat not burn" tobacco products that are relevant to assess human health risks. *Arch Toxicol*. 2018. p. 2145-9.
72. Farsalinos KE, Yannovits N, Sarri T, Voudris V, Poulas K. Nicotine Delivery to the Aerosol of a Heat-Not-Burn Tobacco Product: Comparison With a Tobacco Cigarette and E-Cigarettes. *Nicotine Tob Res*. 2018;20(8):1004-9.
73. Hiemstra PS, Bals R. Basic science of electronic cigarettes: assessment in cell culture and in vivo models. *Respir Res*. 2016;17(1):127.
74. Barna S, Rózsa D, Varga J, Fodor A, Szilasi M, Galuska L, et al. First comparative results about the direct effect of traditional cigarette and e-cigarette smoking on lung alveolocapillary membrane using dynamic ventilation scintigraphy. *Nucl Med Commun*. 2019;40(2):153-8.
75. Isik AG, Zoi Z, Stavros T, Konstantinos P. Oxidative stress induced by electronic nicotine delivery systems (ENDS): Focus on respiratory system. *Current Opinion in Toxicology*. 2019;Volume 13:Pages 81-9.
76. Buyon JP. The effects of pregnancy on autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 1998;63(3):281-7.
77. Adams Waldorf KM, Nelson JL. Autoimmune disease during pregnancy and the microchimerism legacy of pregnancy. *Immunol Invest*. 2008;37(5):631-44.
78. Baer AN, Witter FR, Petri M. Lupus and pregnancy. *Obstet Gynecol Surv*. 2011;66(10):639-53.
79. Gaberšček S, Zaletel K. Thyroid physiology and autoimmunity in pregnancy and after delivery. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011;7(5):697-706.
80. Chan GW, Mandel SJ. Therapy insight: management of Graves' disease during pregnancy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2007;3(6):470-8.
81. Amino N, Izumi Y, Hidaka Y, Takeoka K, Nakata Y, Tatsumi KI, et al. No increase of blocking type anti-thyrotropin receptor antibodies during pregnancy in patients with Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(12):5871-4.
82. Bahn RS, Gorman CA, Woloschak GE, David CS, Johnson PM, Johnson CM. Human retroocular fibroblasts in vitro: a model for the study of Graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987;65(4):665-70.
83. Bernhard D, Huck CW, Jakschitz T, Pfister G, Henderson B, Bonn GK, et al. Development and evaluation of an in vitro model for the analysis of cigarette smoke effects on cultured cells and tissues. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2004;50(1):45-51.
84. Zagoriti Z, El Mubarak MA, Farsalinos K, Topouzis S. Effects of Exposure to Tobacco Cigarette, Electronic Cigarette and Heated Tobacco Product on Adipocyte Survival and Differentiation In Vitro. *Toxics*. 2020;8(1).
85. Szulcek R, Bogaard HJ, van Nieuw Amerongen GP. Electric cell-substrate impedance sensing for the quantification of endothelial proliferation, barrier function, and motility. *J Vis Exp*. 2014(85).
86. Róka E, Ujhelyi Z, Deli M, Bocsik A, Fenyvesi É, Szenté L, et al. Evaluation of the Cytotoxicity of α -Cyclodextrin Derivatives on the Caco-2 Cell Line and Human Erythrocytes. *Molecules*. 2015;20(11):20269-85.

87. Solly K, Wang X, Xu X, Strulovici B, Zheng W. Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev Technol.* 2004;2(4):363-72.
88. Vargatu I. WILLIAMS TEXTBOOK OF ENDOCRINOLOGY. Acta Endocrinol (Buchar). 12: ©by Acta Endocrinologica Foundation.; 2016. p. 113.
89. Ekins R. Measurement of free hormones in blood. *Endocr Rev.* 1990;11(1):5-46.
90. Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM. The thyrotropin (TSH) receptor: interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr Rev.* 1998;19(6):673-716.
91. Erregragui K, Cheillan F, Defoort JP, Prato S, Fert V. Autoantibodies to thyroid hormones: the role of thyroglobulin. *Clin Exp Immunol.* 1996;105(1):140-7.
92. Wiersinga WM, Smit T, van der Gaag R, Mourits M, Koornneef L. Clinical presentation of Graves' ophthalmopathy. *Ophthalmic Res.* 1989;21(2):73-82.
93. Migliori ME, Gladstone GJ. Determination of the normal range of exophthalmometric values for black and white adults. *Am J Ophthalmol.* 1984;98(4):438-42.
94. Amino N, Yuasa T, Yabu Y, Miyai K, Kumahara Y. Exophthalmos in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980;51(6):1232-4.
95. Burch HB, Wartofsky L. Graves' ophthalmopathy: current concepts regarding pathogenesis and management. *Endocr Rev.* 1993;14(6):747-93.
96. Alexander EK, Pearce EN, Brent GA, Brown RS, Chen H, Dosiou C, et al. 2017 Guidelines of the American Thyroid Association for the Diagnosis and Management of Thyroid Disease During Pregnancy and the Postpartum. *Thyroid.* 2017;27(3):315-89.
97. Wiersinga WM, Perros P, Kahaly GJ, Mourits MP, Baldeschi L, Boboridis K, et al. Clinical assessment of patients with Graves' orbitopathy: the European Group on Graves' Orbitopathy recommendations to generalists, specialists and clinical researchers. *Eur J Endocrinol.* 2006;155(3):387-9.
98. Starkey KJ, Janezic A, Jones G, Jordan N, Baker G, Ludgate M. 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.
99. Wegener J, Keese CR, Giaever I. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Exp Cell Res.* 2000;259(1):158-66.
100. Keese CR, Wegener J, Walker SR, Giaever I. Electrical wound-healing assay for cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(6):1554-9.
101. Tarantola M, Schneider D, Sunnick E, Adam H, Pierrat S, Rosman C, et al. Cytotoxicity of metal and semiconductor nanoparticles indicated by cellular micromotility. *ACS Nano.* 2009;3(1):213-22.
102. Xiao C, Lachance B, Sunahara G, Luong JH. Assessment of cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing: concentration and time response function approach. *Anal Chem.* 2002;74(22):5748-53.
103. Tarantola M, Marel AK, Sunnick E, Adam H, Wegener J, Janshoff A. Dynamics of human cancer cell lines monitored by electrical and acoustic fluctuation analysis. *Integr Biol (Camb).* 2010;2(2-3):139-50.
104. Kósa D, Pető Á, Fenyvesi F, Váradi J, Vecsernyés M, Gonda S, et al. Formulation of Novel Liquid Crystal (LC) Formulations with Skin-Permeation-Enhancing Abilities of *Plantago lanceolata* (PL) Extract and Their Assessment on HaCaT Cells. *Molecules.* 2021;26(4).
105. Bagnaninchi PO, Drummond N. Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(16):6462-7.

106. Yalçın M, Barutçigil C, Umar I, Bozkurt BS, Hakki SS. Cytotoxicity of hemostatic agents on the human gingival fibroblast. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(7):984-8.
107. Galgoczi E, Jeney F, Gazdag A, Erdei A, Katko M, Nagy DM, 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.
108. Branch DW. Physiologic adaptations of pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 1992;28(3-4):120-2.
109. Gregory CD, Shah LP, Lee H, Scott IV, Golding PR. Cytotoxic reactivity of human natural killer (NK) cells during normal pregnancy: a longitudinal study. *J Clin Lab Immunol*. 1985;18(4):175-81.
110. Marolis GB, Buckley RH, Younger JB. Serum immunoglobulin concentrations during normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 1971;109(7):971-6.
111. Sridama V, Pacini F, Yang SL, Moawad A, Reilly M, DeGroot LJ. Decreased levels of helper T cells: a possible cause of immunodeficiency in pregnancy. *N Engl J Med*. 1982;307(6):352-6.
112. Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):601-10.
113. Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update*. 2009;15(5):517-35.
114. Mjösberg J, Berg G, Ernerudh J, Ekerfelt C. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in human pregnancy: development of a Treg-MLC-ELISPOT suppression assay and indications of paternal specific Tregs. *Immunology*. 2007;120(4):456-66.
115. Weetman AP. Immunity, thyroid function and pregnancy: molecular mechanisms. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6(6):311-8.
116. Galofre JC, Davies TF. Autoimmune thyroid disease in pregnancy: a review. *J Womens Health (Larchmt)*. 2009;18(11):1847-56.
117. Bucci I, Giuliani C, Napolitano G. Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Antibodies in Pregnancy: Clinical Relevance. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:137.
118. Mestman JH, Goodwin TM, Montoro MM. Thyroid disorders of pregnancy. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1995;24(1):41-71.
119. Stafford IP, Dildy GA, 3rd, Miller JM, Jr. Severe Graves' ophthalmopathy in pregnancy. *Obstet Gynecol*. 2005;105(5 Pt 2):1221-3.
120. Abbouda A, Trimboli P, Bruscolini A. A mild Grave's ophthalmopathy during pregnancy. *Semin Ophthalmol*. 2014;29(1):8-10.
121. Wall JR, Lahooti H, Hibbert EJ, Champion B. Relationship between Clinical and Immunological Features of Thyroid Autoimmunity and Ophthalmopathy during Pregnancy. *J Thyroid Res*. 2015;2015:698470.
122. Meyer P, Das T, Ghadiri N, Murthy R, Theodoropoulou S. Clinical pathophysiology of thyroid eye disease: The Cone Model. *Eye (Lond)*. 332019. p. 244-53.
123. Nagy EV, Toth J, Kaldi I, Damjanovich J, Mezosi E, Lenkey A, et al. Graves' ophthalmopathy: eye muscle involvement in patients with diplopia. *Eur J Endocrinol*. 2000;142(6):591-7.
124. Radiology TACo. ACR–SPR PRACTICE PARAMETER FOR THE SAFE AND OPTIMAL PERFORMANCE OF FETAL MAGNETIC RESONANCE IMAGING (MRI). 2020.

10.2. A jelölt saját közleményeinek listája

1. Aranyosi, J., Deli, T., Erdei, A., Tóth, G., Jakab, A., Fodor, M., Nagy, E., Ujhelyi, B.: Unusual onset of thyroid associated orbitopathy during pregnancy: case report and review of literature. BMC Endocr. Disord. 20 (1), 1-5, 2020.
2. Aranyosi, J., Galgóczi, E., Erdei, A., Katkó, M., Fodor, M., Ujhelyi, Z., Bácskay, I., Nagy, E., Ujhelyi, B.: Different Effects of Cigarette Smoke, Heated Tobacco Product and E-Cigarette Vapour on Orbital Fibroblasts in Graves' Orbitopathy; a Study by Real Time Cell Electronic Sensing. Molecules. 27 (9), 1-14, 2022.

11. Tárgyszavak

Graves-Basedow-kór, endokrin orbitopathia, dohányzás, valós idejű impedanciameghatározás, orbita fibroblast, terhesség

Graves disease, thyroid associated orbitopathy, smoking, Real-Time Cell Electronic Sensing, orbital fibroblast, pregnancy

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék hálás köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Ujhelyi Bernadett adjunktusnőnek a szakmai tanácsadásért, a folyamatos támogatásért és bátorításért, valamint a sok közös munkáért, melyet a PhD képzést követően is szeretnénk folytatni.

Nagy hálával tartozom Dr. Fodor Mariann tanárnőnek, aki a Szemklinika vezetőjeként nagyban támogatta a tudományos munkám elvégzését.

Nagyon szépen köszönöm Prof. Dr. Nagy Endre professzor úrnak, hogy munkám során az Endokrinológiai Tanszék laboratóriumában dolgozhattam és hogy a munkacsoport részese lehettem.

Külön köszönettel tartozom Galgóczi Erikának, az Endokrinológiai Tanszékről a laboratóriumi munkában, valamint a tudományos munkám során nyújtott megannyi segítségért.

Köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Ujhelyi Zoltánnak a Gyógyszertechnológiai Tanszékről az RT-CES mérések kivitelezésében való segítségéért és a témában történő hasznos iránymutatásáért.

Köszönettel tartozom összes szerzőtársamnak a közös munka során nyújtott segítségükért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak a mindvégig tartó lelkes ösztönzést és a tőlük kapott sok támogatást.

13. Függelék