

**Maria Kurowska¹, Joanna Malicka¹, Agnieszka Zwolak^{1,2,3},
Helena Jankowska⁴, Marta Dudzińska²**

¹ Katedra i Klinika Endokrynologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

² Katedra Interny z Zakładem Pielęgniarstwa Internistycznego, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

³ Katedra Zdrowia, Państwowa Szkoła Wyższa im. Papieża Jana Pawła II w Białej Podlaskiej

⁴ Katedra i Zakład Medycyny Nuklearnej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Stymulujące przeciwciała przeciw receptorowi dla TSH oraz przeciwciała przeciwko tyreoperoksydazie i tyreoglobulinie u pacjentów z aktywną postacią orbitopatii tarczycowej

Streszczenie

Orbitopatia Gravesa (GO - Graves' orbitopathy) jest przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniem tkanek oczodołu, występującym głównie w chorobie Gravesa i rzadko w chorobie Hashimoto. Głównym celem autoimmunologicznej reakcji zapalnej są wspólne antygeny tarczycy i tkanek oczodołu. Przeciwtarczycowe przeciwciała stymulujące (TSI) są uznawane za główny marker aktywności GO. Celem pracy była ocena miana i częstości występowania przeciwciał przeciw tarczycowych (TSI, anty - TPO i anty-TG) oraz ich współwystępowania u pacjentów w aktywnej fazie orbitopatii Gravesa. Materiał i metody: 63 chorych (53K; 10M) z GO hospitalizowanych między 2009 a 2013 r. Przeciwciała przeciw receptorowi TSH oznaczano metodą radioimmunologiczną z zastosowaniem odczynnika HUMAN TRAK RIA, przeciwciała anty-TG i anty -TPO - metodą elektrochemiluminescencji. TSI oznaczono u wszystkich chorych, równocześnie TSI i anty -TPO – oznaczono tylko u 29 pacjentów, natomiast TSI, anty -TPO i anty-TG – u 16. Wyniki. Podwyższony poziom TSI stwierdzono u 90.5% badanych. Stężenie TSI >40U/L wykryto u 12.7%. U 44.4% pacjentów stężenie TSI wahało się między 10.1-40.0 U/L. U 33.3% pacjentów poziom TSI zawierał się w przedziale między 2.5-10.0 U/L a u około 9.5% stężenia TSI były prawidłowe [$<1,5$ U/l]. Współwystępowanie TSI i anty - TPO stwierdzono u 77% a obecność równocześnie TSI, anty -TPO i anty- TG u 61% chorych w badanej grupie. Obecność przeciwciał anty -TPO w stężeniu >1000 U/ml stwierdzono u 56% pacjentów z TSI >10.0 U/L, natomiast w grupie z TSI<10.0 U/L - w 57% przypadków. Wnioski. U większości chorych z aktywną fazą orbitopatii Gravesa stwierdzono znacznie podwyższone miana TSI i anty -TPO. Współwystępowanie TSI i anty -TPO obserwowano przede wszystkim u osób z niższymi stężeniami TSI. Występowanie przeciwciał anty-TG jak również ich współwystępowanie z innymi przeciwciałami przeciw tarczycowymi u pacjentów z GO obserwowano rzadko.

Słowa kluczowe: Orbitopatia Gravesa, stymulujące przeciwciała przeciw receptorowe (TSI), przeciwciała anty- TPO, przeciwciała anty-TG

Wstęp

Orbitopatia Gravesa (GO - Graves' orbitopathy), często nazywana również tarczycową chorobą oczu (TED - thyroid eye disease) lub orbitopatią tarczycową (TAO - thyroid associated orbitopathy), jest przewlekłym autoimmunologicznym zapaleniem tkanek oczodołu, występującym u około 50% pacjentów z chorobą Gravesa i tylko u 5-10% pacjentów z chorobą Hashimoto (Lazarus 2012; Shan, Douglas 2014; Wiersinga 2011).

Orbitopatia tarczycowa jest najczęstszą i najważniejszą pozatarczycową manifestacją choroby Gravesa, występującą w populacji ogólnej u 16 kobiet i 3 mężczyzn na 100.000 osób na rok (Lytton i in. 2010; McLachlan i in. 1992). Ciężkie postaci GO, wymagające intensywnej terapii przeciwzapalnej, stwierdza się w 3-5% wszystkich przypadków i właśnie one najczęściej stwarzają największe problemy diagnostyczno-lecznicze (Lytton i in. 2010; Naik i in. 2010).

Chociaż patogenezę GO pozostaje nadal do końca niewyjaśniona, to największe znaczenie przypisuje się procesom autoimmunologicznym, w których głównym antygenami reakcji autoimmunologicznej są białka wspólne dla tkanki tarczycowej i tkanek oczodołu. W przebiegu GO, jak to zostało potwierdzone w licznych badaniach (Fernando i in. 2014; Goh i in. 2004; Lai i in. 2006; Lytton i in. 2010; Smith i in. 2011), głównym celem ataku immunologicznego są fibroblasty i preadipocyty tkanek oczodołu aktywowane przez skierowane przeciwko nim autoprzeciwciała. Do najważniejszych i najczęściej wymienianych wspólnych auto-antygenów tarczycy i tkanek wewnątrz oczodołowych zaliczane są receptor dla TSH (TSHR), peroksydaza tarczycowa (TPO), tyreoglobulina (TG), insulinopodobny czynnik wzrostu -1 (IGF-1 - insulin-like growth factor-1) i antygeny mięśni zewnątrz gałkowych (takie jak kalsekwestryna) (Maheshwari, Weis 2012; Naik i in. 2010; Wall, Lahooti 2010; Wiersinga 2011).

Według Wiersingi (2011), największe znaczenie w inicjacji procesu autoimmunologicznego odgrywa antygen receptora dla TSH. Obecność receptorów dla TSH, na fibroblastach tkanki łącznej oczodołu wykryto już w latach 90-tych XX wieku (Fernando i in. 2014; Ponto i in. 2011; Shan, Douglas 2014).

Udowodniono, że częstość orbitopatii zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia TSHR-Ab. Ekspresja antygenów TSHR w tkance tłuszczowej i łącznej oczodołu jest największa w aktywnej fazie GO. Przeciwtarczycowe przeciwciała stymulujące (TSI-thyroid-stimulating immunoglobulins) wykazują istotny związek z obrazem klinicznym GO i są uznawane za ważny marker ciężkości i aktywności choroby (Khoo i in. 1999; Lytton i in. 2010; Meheshwari, Weis 2012; Naik i in. 2010; Ponto i in. 2011).

Lai i wsp. (2006) wykryli gen i białko tarczycowej peroksydazy w fibrocytach i tkance tłuszczowej oczodołu zarówno u pacjentów z GO jak również osób zdrowych i sugerują, iż reakcja immunologiczna skierowana przeciwko tarczycowej peroksydazie (TPO) może uczestniczyć w modulowaniu reakcji zapalnych w przebiegu orbitopatii Gravesa.

Celem pracy była ocena częstości występowania i miana przeciwciał przeciwtarczycowych przeciw receptorowi dla TSH (TSI, TRAb), przeciwko tyreoperoksydazie (anty - TPO) oraz przeciw tyreoglobulinie (anty - TG), jak również ich współwystępowania w populacji pacjentów z aktywną fazą orbitopatii Gravesa.

Materiały i metody

Badaniem objęto 63 chorych (53 kobiety, 10 mężczyzn) hospitalizowanych w Klinice Endokrynologii w Lublinie, w latach 2009-2013 z powodu orbitopatii tarczycowej, rozpoznanej w oparciu o obraz kliniczny uzupełniony obrazowaniem tkanek oczodołów metodą rezonansu magnetycznego. Badanie przeprowadzono w oparciu o retrospektywną analizę dokumentacji medycznej.

Przeciwciała przeciwko receptorowi TSH oznaczano metodą radioimmunologiczną z zastosowaniem zestawu HUMAN TRAK RIA system (B.R.A.H.M.S AG, Henningsdorf/Berlin Germany). Za wartości pozytywne przyjęto miano $\geq 1,5$ U/L.

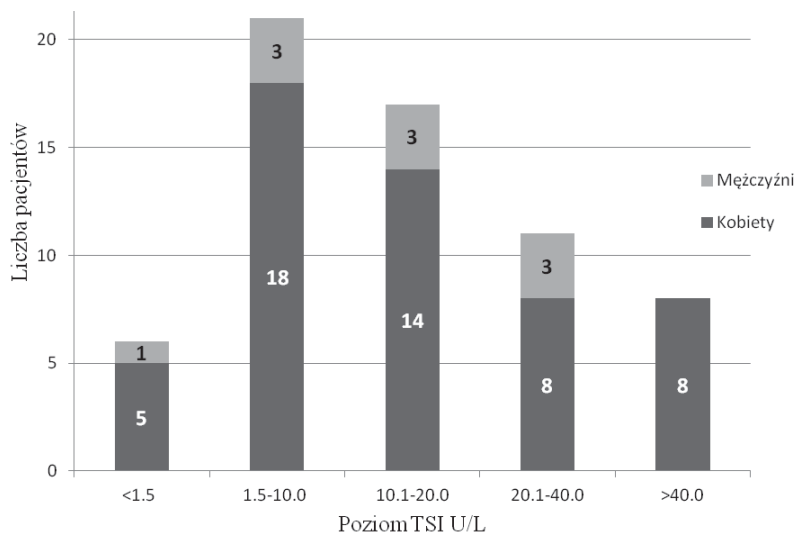
Przeciwciała anti-TG oraz anti-TPO oznaczano metodą elektrochemiluminescencji (CLIA) przy użyciu analizatora Centaur. Zakres wartości prawidłowych dla obydwu przeciwciał wynosił od 0 do 60 U/ml, natomiast w niniejszym badaniu za wynik pozytywny przyjęto wartości >100 U/ml.

Pomiar dwóch rodzajów przeciwciał: TSI oraz anti-TPO wykonano u 29 pacjentów (28 K; 1M) (tab.1), natomiast wszystkich trzech przeciwciał (TSI, anti-TPO oraz anti-TG) tylko w 16 przypadkach (15K; 1M) (tab. 2).

W oparciu o miano TSI podzielono pacjentów na pięć podgrup: z prawidłowym stężeniem (<1.5 U/L), w przedziale 1.5 - 10.0 U/L, 10.1 - 20.0 U/L, 20.1- 40 U/L oraz > 40 U/L.

Wyniki

Wyniki przedstawiono na rycinach 1-4 oraz zestawiono w tabelach 1 i 2. Częstość występowania i poziom przeciwciał TSI u pacjentów z orbitopatią tarczycową zobrazowano na ryc. 1.



Rycina 1. TSI u pacjentów z GO w zależności od wysokości ich miana

Źródło: Opracowanie własne

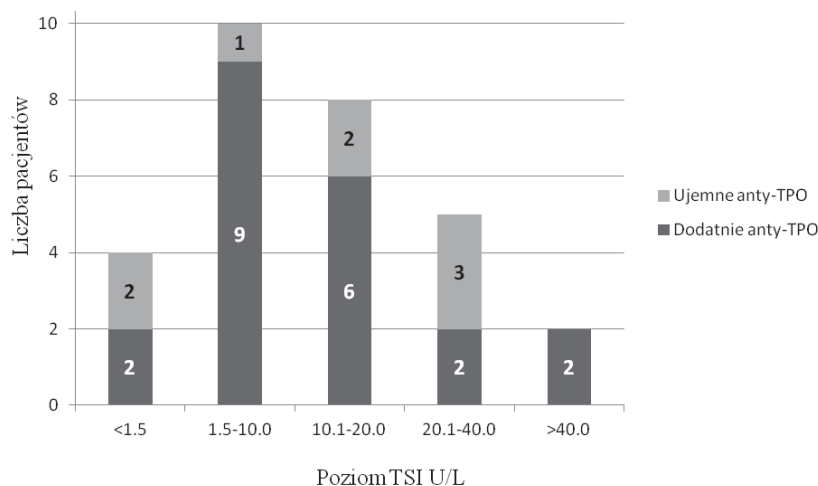
Poziom przeciwciał TSI >1.5 U/L stwierdzono u 90.5% badanych. Wysokie stężenie TSI >40.0 U/L wykryto u 12.7% pacjentów. U 44.4% zawierało się ono w przedziale 10.1 - 40.0 U/L (średnia 18.6 ± 6.1 U/L). U 21 [33,3%] chorych poziom TSI mieścił się w zakresie między 2.5 a 10.0 U/L (średnia 5.9 ± 2.1). U 9.5% (n=6) chorych stężenie TSI było prawidłowe (<1.5 U/L).

Zachowanie się stężeń przeciwciał anty-TPO w korelacji z poziomem przeciwciał TSI (w grupie 29 pacjentów, u których przeprowadzono oznaczenia obu przeciwciał) zestawiono w tab. 1 i zobrazowano na ryc. 2.

Tabela 1. Stężenia przeciwciał TSI i anty-TPO u pacjentów z wykonanymi pomiarami tylko 2 przeciwciał

L	Płeć	Wiek	TSI U/L	Anty -TPO U/ml	L	Płeć	Wiek	TSI U/L	Anty -TPO U/ml
1	K	70	>40	26 756	16	K	48	8.3	325.8
2	K	36	>40	>3000	17	K	29	8.2	317.8
3	K	52	30.5	50.8	18	K	42	8.0	335.0
4	K	57	29.2	>3000	19	K	58	7.8	11 250
5	K	51	24.1	7286	20	K	31	7.3	>3000
6	K	79	23.4	76.0	21	K	28	5.5	694.5
7	K	70	23.2	27.2	22	K	60	3.6	3764
8	K	25	18.8	<5.5	23	K	55	3.2	2048
9	K	52	18.5	1362	24	K	64	2.5	>3000
10	K	52	17.7	1434	25	K	40	1.5	>3000
11	K	51	14.4	746.9	26	K	52	0.7	1562
12	M	61	14.1	162.0	27	K	55	<0.3	2660
13	K	50	13.3	2024	28	K	61	<0.3	64.1
14	K	55	11.2	74.9	29	K	60	<0.3	16.3
15	K	48	11.1	>3000					

Źródło: Opracowanie własne



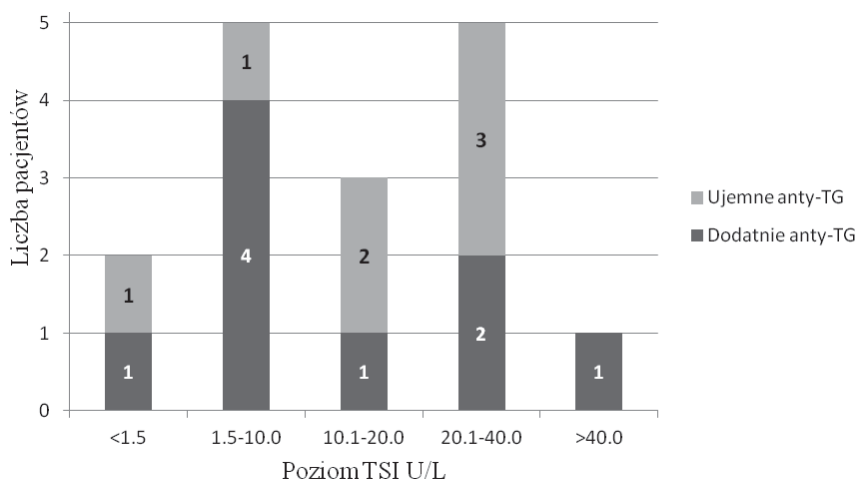
Rycina 2. Miana przeciwciał anty -TPO w odniesieniu do stężenia TSI u pacjentów z GO

Źródło: Opracowanie własne

Współwystępowanie podwyższonych stężeń obu rodzajów przeciwciał (TSI i anty -TPO) stwierdzono u 72.4% badanych. Najczęściej (90%) dodatnie przeciwciała anty- TPO były obecne w grupie pacjentów, u których poziom TSI zawierał się w przedziale 1.5 - 10.0 U/L, nieco rzadziej (u 75%) u osób z TSI w zakresie 10.1 - 20.0 U/L, natomiast w grupie z TSI od 20.1 do 40.0 U/L obecność anty - TPO potwierdzono tylko w 40% przypadków

co wskazywało na tendencję spadkową częstości występowania przeciwciał anty - TPO wraz ze wzrostem miana TSI. Częstość występowania przeciwciał anty - TPO w mianie >1000 U/ml była porównywalna w grupach pacjentów z TSI poniżej jak i powyżej 10.0 U/L [57%].

Podwyższone miana przeciwciał anty-TG wykryto w 56.3% wykonanych oznaczeń (ryc. 3, tab. 2).



Rycina 3. Przeciwciała anti-TG w odniesieniu do stężenia TSI u pacjentów z GO

Źródło: Opracowanie własne

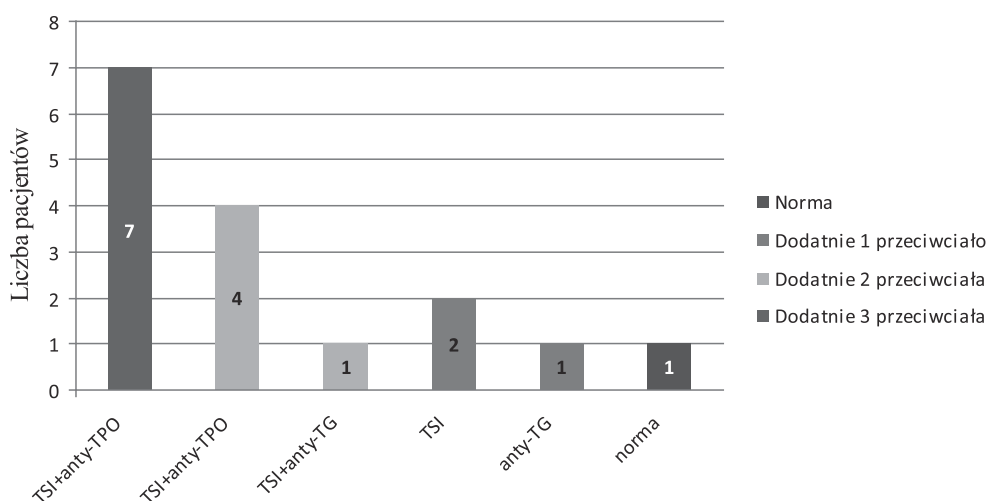
Tabela 2. Stężenia przeciwciał TSI, anty-TPO i anty-TG u pacjentów z przeprowadzonymi pomiarami stężeń wszystkich 3 przeciwciał

L	Płeć	Wiek	TSI U/L	Anty - TPO U/ml	anty-TG U/ml
1	F	70	>40	26 756	67 800
2	F	52	30.5	50.8	17.0
3	F	57	29.2	>3000	4400
4	F	51	24.1	7286	55
5	F	79	23.4	76	8700
6	F	70	23.2	27.2	34
7	M	61	14.1	162	29
8	F	50	13.3	2024	424
9	F	48	11.1	>3000	64
10	F	29	8.2	317.8	112
11	F	42	8.0	335	47
12	F	60	3.6	3764	633
13	F	55	3.2	2048	233
14	F	64	2.5	>3000	207
15	F	61	<0.3	64.1	347
16	F	60	<0.3	16.3	22.5

Źródło: Opracowanie własne

Podobnie jak anty -TPO, dodatnie anti-TG był najczęściej obecne w grupie pacjentów z TSI w przedziale 1.5 - 10.0 U/L i częstość ich występowania zmniejszała się wraz ze

wzrostem stężenia TSI (tab. 2). W przeciwieństwie do anty - TPO przeciwciała anty-TG częściej pozostawały w zakresie normy (43,7%).



Rycina 4. Liczba pacjentów z wykonanymi oznaczeniami wszystkich trzech przeciwciał

W grupie pacjentów z przeprowadzonymi oznaczeniami wszystkich trzech rodzajów przeciwciał (tab. 2, rys. 4), podwyższone stężenia TSI, anty -TPO i anty-TG stwierdzono w 7 przypadkach (43.7%). Obecność pozytywnych wartości dwóch z trzech analizowanych przeciwciał tj. TSI i anty - TPO wykryto u kolejnych 4 pacjentów (25%), natomiast dodatnie TSI i anty-TG potwierdzono w jednym przypadku. U dwóch pacjentów dodatnim wartościami TSI nie towarzyszył wzrost pozostałych przeciwciał, a u jednego wszystkie przeciwciała pozostawały w zakresie wartości prawidłowych.

W badanej grupie u 6 pacjentów (37.5%) poziom TSI mieścił się w granicach 23.2 - 40.0 U/L (tab.2), a u kolejnych 8 osób (50%) w zakresie 2.5 – 14.1 U/L. W przypadku 2 pacjentów poziom TSI był niski (<0.3U/L). Stężenie anty –TPO u 50% pacjentów wynosiło ≥ 1000 U/ml, podczas gdy w odniesieniu do anty-TG poziom ≥ 1000 U/ml stwierdzono tylko u trzech osób.

Dyskusja

Związek pomiędzy chorobami autoimmunologicznymi tarczycy i GO jest dobrze poznany i udokumentowany i wiąże się z obecnością antygenów wspólnych dla tkanek tarczycy i oczodołów.

Częstość występowania i korelacje zachodzące pomiędzy różnymi przeciwciałami przeciwtarczycowymi w GO oraz wysokość ich miana były wielokrotnie badane przez różnych autorów (Goh i in. 2004; Kloprogge i in. 2005; Lazarus 2012; Naik i in. 2010; Shan, Douglas 2014).

Dowodzono, że kluczową rolę w patogenezie orbitopatii tarczycowej odgrywiają immunoglobuliny stymulujące receptor dla TSH (TSI) (Goh i in. 2004; Naik i in. 2010; Wall, Lahooti 2010; Ponto i in. 2011; Wiersinga 2011). W badaniu przeprowadzonym przez McLachlan i in. (1992) przeciwciała anty-TSHR były obecne u 88% pacjentów z ciężką postacią GO i dominowały w spektrum autoprzeciwciał.

Ponto i in. (2011) potwierdzili obecność immunoglobulin stymulujących tarczycę u 98%, a Lytton i in. (2010) u 95% chorych z GO. Obydwaj autorzy (Lytton i in. 2010;

Ponto i in. (2011) wykazali istotny związek TSI z objawami klinicznymi GO i uznali je za marker orbitopatii tarczycowej.

Khoo i in. (1999) badali możliwy udział innych przeciwciał tarczycowych w patogenezie GO i wykazali, że wysokie stężenie TSI przy nieobecności przeciwciał anti-TPO wiązało się z wyższym ryzykiem występowania ciężkiej orbitopatii, ale inni autorzy (Lytton i in. 2010) nie potwierdzili związku pomiędzy stopniem ciężkości lub aktywnością orbitopatii Gravesa a poziomami przeciwciał anti-TPO, anti-TG czy TSI.

Goh i in. (2004) porównali profil autoprzeciwciał u chorych z nowo rozpoznaną chorobą Gravesa z orbitopatią i bez orbitopatii i podobnie jak Khoo i in. (1999) wykazali, że chorych z GO charakteryzowały wyższe miana TSI oraz niższe miana przeciwciał anti-TPO i anti-TG. W grupie McLachlan i in. (1992) przeciwciała anti-TPO były obecne u 60% chorych a anti-TG tylko u 25% pacjentów z GO.

Wśród naszych chorych z aktywną orbitopatią częstość występowania przeciwciał przeciw receptorowi dla TSH była podobna jak w badaniu McLachlan i in. (1992) i nieco niższa niż w doniesieniach Ponto (2011) i Lytton (2010). Ponadto u około 60% z nich miana TSI były znacznie podwyższone, co jest zgodne z doniesieniami innych badaczy (Goh i in. 2004; Kloprogge i in. 2005) w których u większości chorych z GO stwierdzono występowanie wysokich stężeń przeciwciał przeciw receptorowi TSH.

Współistnienie TSI i anti-TPO obserwowaliśmy w naszej grupie chorych częściej niż McLachlan i in. (1992) i dotyczyło ono szczególnie osób z niższymi stężeniami TSI. Podobnie jak inni autorzy (Goh i in. 2004; Kloprogge i in. 2005) stwierdziliśmy odwrotną zależność między mianem TSI i anti-TPO, a mianowicie chorych z wyższymi mianami TSI charakteryzowały niższe stężenia przeciwciał anti TPO.

Częstość występowania przeciwciał anti TPO w wysokim stężeniu (>1000 U/ml) nie różniła się w grupach chorych z wysokim i niskim mianem TSI. Obserwacja ta, analogicznie jak u Lytton i in. (2010), sugeruje, że zarówno obecność jak i stężenie przeciwciał anti-TPO nie może służyć za marker aktywności orbitopatii Gravesa.

W badanej przez nas populacji chorych rzadko oznaczano p/ciała anti TG. Dodatkowo ich miana (>100 U/ml) potwierdzono w ponad 50% wykonanych oznaczeń. Częstość ich występowania była wyższa u pacjentów z najniższymi poziomami TSI. W większości dodatknych oznaczeń miano nie przekraczało 1000 U/ml. Prawidłowe stężenie przeciwciał anti-TG potwierdzono w prawie połowie analizowanych próbek. Tylko u 3 osób z poziomem TSI w przedziale od 20.0 do >40.0 U/L stężenie anti-TG przekroczyło 1000 U/ml.

Równoczesne występowanie dodatniego miana przeciwciał anti-TG i TSI było w naszym materiale dwukrotnie częstsze niż u McLachlan i in. (1992) ale były one zazwyczaj niskie. Na podstawie własnych obserwacji stwierdziliśmy, że częstość występowania i wysokość miana przeciwciał anti-TG u pacjentów z aktywną fazą orbitopatii Gravesa są niższe niż przeciwciał anti-TPO.

W dostępnej literaturze brakuje doniesień na temat współwystępowania u pacjentów z orbitopatią tarczycową wszystkich trzech typów przeciwciał przeciwtarczycowych. W naszej małej grupie chorych, u których oceniano występowanie wszystkich trzech przeciwciał, ich równoczesną obecność potwierdzono w około 40% przypadków. W ¼ przypadków potwierdziliśmy współwystępowanie 2 przeciwciał, głównie TSI i anti-TPO. U jednego chorego poziomy wszystkich trzech przeciwciał mieściły się w granicach nor-

my. Duży odsetek chorych miał wysokie miano TSI, a u połowy z nich stwierdzono także wysokie stężenia anty-TPO.

W dwóch przypadkach poziom TSI był niewykrywalny - poniżej czułości metody. Podobnie jak Wall i Lahooti (2010) sądzimy, że u dwóch chorych z niskim stężeniem TSI i u jednego z prawidłowymi poziomami wszystkich przeciwciał, mamy do czynienia z przebytą chorobą Gravesa, cichym lub podoстрыm zapaleniem tarczycy albo tak zwaną "euthyroid Graves disease".

Wnioski

U większości chorych z aktywną fazą orbitopatii Gravesa stwierdzono znacznie podwyższone miano TSI i anty -TPO. Współwystępowanie TSI i anty -TPO obserwowano przede wszystkim u osób z niższymi stężeniami TSI. Występowanie przeciwciał anty-TG jak również ich współwystępowanie z innymi przeciwciałami przeciw tarczycowym u pacjentów z GO obserwowano rzadko.

Piśmiennictwo

1. Fernando R. i in. (2014) Human fibrocytes express multiple antigens associated with autoimmune endocrine diseases. *J Clin Endocrinol Metab*, s. 796-803. doi: 10.1210/jc.2013-3072.
2. Goh SY. i in. (2004) Thyroid autoantibody profiles in ophthalmic dominant and thyroid dominant Graves' disease differ and suggest ophthalmopathy is a multiantigenic disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*, s. 600-607.
3. Khoo DH. i in. (1999) The combination of absent thyroid peroxidase antibodies and high thyroid-stimulating immunoglobulin levels in Graves' disease identifies a group at markedly increased risk of ophthalmopathy. *Thyroid*, s. 1175-1180.
4. Klopogge S. i in. (2005) The clinico-pathologic basis of Graves opthalmopathy: a review. *Eur J Ophtalmol*, s. 315-323.
5. Lai OF. i in. (2006) Detection of thyroid peroxidase mRNA and protein in orbital tissue. *Eur J Endocrinol*, s. 213-218.
6. Lazarus JH. (2012) Epidemiology of Graves' orbitopathy (GO) and relationship with thyroid disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, s. 273-279.
7. Lytton SD. i in. (2010) A novel thyroid stimulating immunoglobulin bioassay is a functional indicator of activity and severity of Graves' orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab*, s. 2123-2131.
8. Maheshwari R., Weis E. (2012) Thyroid associated orbitopathy. *Indian J Ophtalmol*, s. 87-93.
9. McLachlan SM. i in. (1992) Endocrine ophthalmopathy: a re-evaluation of the association with thyroid autoantibodies. *Autoimmunity*, s. 143-148.
10. Naik VM. i in. (2010) Immunopathogenesis of thyroid eye disease: emerging paradigms. *Surv Ophtalmol*, s. 215-226.
11. Ponto KA. i in. (2011) Clinical relevance of thyroid-stimulating immunoglobulins in Graves' ophthalmopathy. *Ophtalmology*, s. 2279-2285. doi: 10.1016/j.opht.2011. 03.030.
12. Shan SJ., Douglas RS. (2014) The pathophysiology of thyroid eye disease. *J Neuroophthalmol*, s. 177-185. doi: 10.1097/WNO.0000000000000132.
13. Smith TJ. i in. (2011) Fibroblasts expressing the thyrotropin receptor overarch thyroid and orbit in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab*, s. 3827-3837.
14. Wall JR., Lahooti H. (2010) Pathogenesis of thyroid eye disease – does autoimmunity against the TSH receptors explain all cases? *Pol J Endocrinol*, s. 222-227.
15. Wiersinga WM. (2011) Autoimmunity in Graves' Ophtalmopathy: The Result of unfortunate Marriage between TSH Receptors and IGF-1 Receptors? *J Clin Endocrinol Metab*, s. 2386 -2394.

Liczba znaków ze spacjami: 27 934 w tym 8 717 grafika