

Ekspresija mikroRNA u T limfocitima oboljelih od Hashimotove bolesti

Štrbat, Iris

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:509012>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Iris Štrbat

EKSPRESIJA microRNA U

T-LIMFOCITIMA OBOLJELIH OD

HASHIMOTOVE BOLESTI

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Iris Štrbat

EKSPRESIJA microRNA U

T-LIMFOCITIMA OBOLJELIH OD

HASHIMOTOVE BOLESTI

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za analizu DNA pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: doc.dr.sc. Stana Tokić

Rad ima 53 lista, 4 tablice i 11 slika.

*Svoje iskrene zahvale upućujem mentorici doc. dr. sc. Stani Tokić na iznimnoj susretljivosti,
pristupačnosti, trudu i uloženom vremenu pri izradi ovog diplomskog rada.
Zahvaljujem ujedno svojoj obitelji i ostalim bliskim osobama na bezuvjetnoj podršci i vjerovanju
u mene.*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. ŠTITNA ŽLIJEZDA I HASHIMOTOVA BOLEST	1
1.2. EPIDEMIOLOGIJA.....	3
1.3. GENSKI I OKOLIŠNI ČIMBENICI U ETIOLOGIJI HASHIMOTOVE BOLESTI.....	3
1.3.1. Genski rizični čimbenici	3
1.3.2. Čimbenici okoliša.....	5
1.4. IMUNOPATOGENEZA HASHIMOTOVE BOLESTI	6
1.4.1. Inicijacija autoimunog odgovora	6
1.4.2. Uloga pomoćničkih T-limfocita u razvoju Hashimotova tireoiditisa.....	7
1.4.3. Uloga citotoksičnih T-limfocita u razvoju Hashimotova tireoiditisa	9
1.5. ULOGA microRNA U RAZVOJU AUTOIMUNOG ODGOVORA U HT-u.....	11
1.5.1. Sinteza microRNA.....	11
1.5.2. Uloga microRNA u imunom sustavu.....	13
1.5.2.1. Obitelj molekula miRNA let-7.....	15
1.5.2.2. MiR-301a	15
1.5.2.3. MiR-20a	16
1.5.2.4. MiR-106a	16
2. HIPOTEZA	18
3. CILJEVI.....	19
4. MATERIJALI I METODE	20
4.1. Ustroj istraživanja	20
4.2. Ispitanici	20
4.3. Upotrijebljene kemikalije.....	21
4.4. METODE	22
4.4.1. Sinteza cDNA	22
4.4.2. Kvantitativna analiza ekspresije miRNA na PCR uređaju	23
4.4.3. Priprema standardne krivulje.....	23
4.4.4. Analiza ekspresije miRNA s pomoću proba TaqMan	25
4.4.5. Relativna kvantifikacija metodom $\Delta\Delta C_t$	27
4.4.6. Statistička obrada podataka	28
5. REZULTATI.....	29

5.1. OPĆA DESKRIPTIVNA ANALIZA ISPITANIKA.....	29
5.2. Pokazatelji učinkovitosti i preciznosti RT-qPCR reakcija.....	31
5.3. Ekspresijski profili hsa-let7a-5p, hsa-mir-20a-5p, hsa-mir-106a-5p te hsa-mir-301a-3p..	33
5.4. Korelacijska analiza kliničkih obilježja i ekspresijskog profila microRNA	35
6. RASPRAVA	36
7. ZAKLJUČAK.....	40
8. SAŽETAK	41
9. SUMMARY	42
10. LITERATURA	43
11. ŽIVOTOPIS.....	52

POPIS KRATICA

HT – Hashimotov tireoiditis

AITD – autoimune bolesti štitnjače (engl. *autoimmune thyroid disease*)

T3 – trijodtironin

T4 – tiroksin

TRH – tireotropin oslobađajući hormon (engl. *thyrotropin-releasing hormone*)

TSH – tiroid stimulirajući hormon (engl. *thyroid-stimulating hormone*)

TSHR – receptor tiroid stimulirajućeg hormona (engl. *thyroid-stimulating hormone receptor*)

TPO – tiroidna peroksidaza (engl. *thyroid peroxidase*)

Tg – tireoglobulin

Anti-TPO – protutijelo na tiroidnu peroksidazu

Anti-TgAb – protutijelo na tireoglobulin

Anti-TSHAb – protutijelo na receptor za tireostimulin

MHC – glavni sustav tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*)

HLA – humani leukocitni antigeni (engl. *human leukocyte antigen*)

CTLA-4 – engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*

PTPN22 – engl. *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*

LYP – engl. *lymphoid tyrosine phosphatase*

FOXP3 – engl. *forkhead box P3*

Th – pomoćnički T-limfociti (engl. *T-helper cell*)

Tc – citotoksični T-limfociti (engl. *cytotoxic T-cells*)

Treg – regulatorni T-limfociti

CTL – citotoksični T-limfociti (engl. *cytotoxic T lymphocyte*)

TCR – T-stanični receptor (engl. *T-cell receptor*)

BCR – B-stanični receptor (engl. *B-cell receptor*)

IFN – interferon

TNF – faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*)

TGF – transformirajući faktor rasta (engl. *transforming growth factor*)

IL – interleukin

GATA3 – GATA vezujući protein 3 (engl. *GATA binding protein 3*)

RORC2 – engl. *retinoic-acid-receptor-related orphan receptor C2*

STAT3 – engl. *signal transducer and activators of transcription-3*

ROR γ t – engl. *retinoic-acid-receptor-related orphan nuclear receptor gamma t*

ROR α – engl. *retinoic-acid-receptor-related orphan receptor alpha*

RUNX3 – engl. *runt-related transcription factor 3*

IRF4 – engl. *interferon regulatory factor 4*

Eomes – Eomesodermin

T-bet – engl. *T-box transcription factor*

FOXO – engl. *forkhead box protein O*

PLZF – engl. *promyelocytic leukemia zinc finger*

SLEC – kratkoživuće efektorske stanice (engl. *short lived effector cells*)

MPEC – prekursor memorijsko efektrskih stanica (engl. *memory precursor effector cells*)

NKT – prirodno ubilačke T-stanice (engl. *natural killer T cells*)

NK – prirodno ubilačke stanice (engl. *natural killer cells*)

iNKT – invarijantne prirodno ubilačke T-stanice (engl. *invariant natural killer T cells*)

miRNA, miR – microRNA

RISC – RNA inducirani utišavajući kompleks (engl. *RNA induced silencing complex*)

UTR – netranslatirana regija (engl. *untranslated region*)

qRT-PCR – kvantitativna metoda lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (engl. *quantitative real time polymerase chain reaction*)

MGB probe – probe s vezivačem za manji urez (engl. *minor groove binder*)

POPIS TABLICA

Tablica 1. Popis proba TaqMan	21
Tablica 2. Uvjeti za qRT-PCR	26
Tablica 3. Demografska i klinička obilježja ispitanika	29
Tablica 4. Biokemijska obilježja ispitanika.....	30

POPIS SLIKA

Slika 1. Razvoj T-limfocita CD4 ⁺ i lučenje citokina	7
Slika 2. Struktura humane microRNA	11
Slika 3. Uloga microRNA u regulaciji ekspresije gena	12
Slika 4. Uređaj QuantStudio 5 Real-Time PCR	23
Slika 5. Lančana reakcija polimerazom – linearna ovisnost količine PCR produkta o broju ciklusa	24
Slika 6. Mikrotitarska ploča.....	26
Slika 7. Standardne krivulje hsa-let7a.5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-301a-3p i hsa-miR-192-5p kompleta TaqMan Advanced miRNA	32
Slika 8. Relativna ekspresija hsa-miR-let7a, hsa-miR-20a, hsa-miR-106a i hsa-miR-301a u T-limfocitima periferne krvi zdravih ispitanika, eutiroidnih i hipotiroidnih bolesnika	34
Slika 9. Razina ekspresije gena <i>RORC</i> negativno korelira s razinom ekspresije hsa-miR-106a-5p u T-limfocitima HT ispitanika	35

1. UVOD

1.1. ŠTITNA ŽLIJEZDA I HASHIMOTOVA BOLEST

Hashimotova bolest, također poznata kao Hashimotov tireoiditis (HT) i kronični limfocitni tireoiditis, autoimuno je oboljenje u kojem dolazi do pojave autoimunih stanica i protutijela koji dovode do postupnog uništavanja tkiva štitne žlijezde (1).

Štitna žlijezda ili štitnjača (lat. *glandula thyroidea*) endokrini je organ. Smještena je u prednjem donjem dijelu vrata, gdje obavlja dušnik. Građom nalikuje leptiru. Štitnjaču čine dva režnja (desni i lijevi) koji su povezani središnjim dijelom (istmusom; lat. *isthmus*). Svaki je režanj, kod zdrave štitnjače, širok između 2 i 2,5 cm te dug oko 4 cm, a volumena između 15 i 30 cm³. Masa zdrave štitnjače iznosi između 16 i 25 grama (2).

Osnovne su građevne jedinice štitnjače folikuli građeni od stanica tireocita i amorfne koloidne mase u kojoj je koncentriran tireoglobulin (Tg), protein na koji su vezani hormoni štitnjače tiroksin (T4) i trijodtironin (T3). Hormoni štitnjače primarno utječu na bazalni metabolizam (BMR; engl. *basal metabolic rate*) povećanjem sinteze proteina, razgradnje ugljikohidrata i masti te stimulacijom oksidativne fosforilacije i staničnog disanja, ali imaju i mnoge druge učinke, uključujući rast i sazrijevanje tkiva, potrošnju energije i proizvodnju topline (2).

Sinteza hormona T3 i T4 regulirana je mehanizmom negativne povratne sprege na relaciji hipotalamus – hipofiza – štitna žlijezda. Tireotropin-oslobađajući hormon (TRH, engl. *thyrotropin-releasing hormone*) koji izlučuje hipotalamus najprije se veže na receptor TRH u stanicama prednjeg režnja hipofize te ona započinje sintezu i lučenje tiroid-stimulirajućeg hormona (TSH, engl. *thyroid-stimulating hormone*). TSH se krvlju prenosi do štitnjače gdje se veže na receptor TSHR (engl. *thyroid-stimulating hormone receptor*) na membrani tireocita, čime dolazi do aktivacije G-proteina te posljedično do aktivacije enzima adenil-ciklaze i sinteze cAMP sekundarnog glasnika. Aktivacijom folikularnih stanica štitnjače dolazi do aktivacije tiroidne peroksidaze (TPO, engl. *thyroid peroxidase*), sinteze tireoglobulina i apsorpcije jodida iz cirkulacije. Tireoglobulin, koji se nalazi u lumenu folikularnih stanica štitnjače, sadrži aminokiselinske ostatke tirozina potrebne za sintezu hormona T3 i T4. Enzim TPO katalizira

oksidaciju jodidnih iona i njihovo vezanje na aminokiselinske ostatke tirozina. Na taj način dolazi do sinteze monojodtirozina (MIT) i dijodtirozina (DIT). Uz to, TPO katalizira udruživanje MIT i DIT te nastaju T3 i T4. Nakon stimulacije s pomoću TSH-a, Tg endocitozom ulazi u folikularne stanice gdje enzimi poput peptidaza i kiselih proteaza kataliziraju njegovu hidrolizu do sastavnih aminokiselina te dolazi do otpuštanja hormona T3 i T4 u cirkulaciju (3,4). Povećanje koncentracije hormona T3 i T4 u krvi povratno inhibira lučenje TRH-a i TSH-a, čime se zaustavlja sinteza hormona štitnjače.

Razvoj bolesti štitnjače usko je povezan s gubitkom kontrole nad regulatornim mehanizmima povezanim s proizvodnjom hormona štitnjače. Pojava povećanog stvaranja i sinteze hormona štitnjače povezana je s razvojem hipertireoze, dok hipotireozu obilježava smanjena funkcija štitnjače i stanje nedovoljnog lučenja hormona, koje, između ostaloga, može biti uzrokovano deficijencijom joda ili pojavom autoimunog odgovora usmjerenog protiv štitnjače (5).

Najčešći je uzrok hipotireoidizma Hashimotov tireoiditis – autoimuna bolest koju obilježava razvoj imunskih stanica i protutijela usmjerenih protiv tkivnih antigena štitnjače, tireoidne peroksidaze (anti-TPO), tireoglobulina (anti-TgAb) i receptora za tireostimulin (anti-TSHAb) (6,7), koji zajedničkim djelovanjem dovode do tkivnog oštećenja i razvoja hipotireoze. Na početku bolesti oboljeli ne moraju imati nikakve simptome. S vremenom, međutim, može doći do povećanja štitnjače uzrokovanog infiltracijom limfocita i oštećenjem tireocita. Progrijem bolesti dolazi do razvoja hipotireoze i pojave sekundarnih simptoma poput povećanja tjelesne mase, osjećaja umora i hladnoće, blijedog ili nabuhlog lica, konstipacije, depresije i bolova u tijelu. Kod žena su moguće menstrualne nepravilnosti, a sterilitet je primijećen u oba spola. Nakon više godina veličina štitnjače se smanjuje (8).

Dijagnoza Hashimotove bolesti potvrđuje se testiranjem razine hormona TSH, FT3, FT4 i antitiroidnih protutijela u serumu, a uobičajeno se liječi nadomjesnom hormonskom terapijom, L-tiroksinom (L-T4) (8). U **eutiroidnih HT bolesnika** serumske vrijednosti hormona TSH, FT4 i FT3 nalaze se unutar referentnog raspona (TSH; 0,46 – 4,7 mIU/L, FT4 10 – 22 pmol/L) uz pozitivan nalaz protutijela anti-TPO. U bolesnika koji izražavaju kliničku, **hipotiroidnu formu Hashimotove bolesti**, osim povišenog TSH-a (> 4,7 mIU/L) i prisutnih protutijela anti-TPO, serumska je razina hormona FT4 snižena (< 10 pmol/L), a FT3 može varirati od niskih do fizioloških vrijednosti. Sljedeću skupinu čine bolesnici kod kojih simptomi bolesti još uvijek

nisu prisutni, zbog čega su uglavnom slučajno dijagnosticirani. To su tzv. **supklinički ili latentni** bolesnici, koji zbog urednih vrijednosti hormona FT4 i FT3 ne zahtijevaju primjenu nadomjesne terapije, ali je razvoj bolesti primjetan u pojavi protutijela anti-TPO i povišenoj koncentraciju serumskog TSH-a ($> 4,7$ mIU/L) (6,7).

1.2. EPIDEMIOLOGIJA

Autoimune bolesti štitnjače smatraju se organ-specifičnim bolestima, a čine oko 30 % svih autoimunih bolesti. Hashimotov tireoiditis najčešća je autoimuna bolest štitnjače i jedan od najčešćih uzroka hipotireoze u populacijama s dovoljnim unosom joda prehranom (7,9). Prevalencija simptomatskog oblika bolesti u općoj populaciji iznosi od 2 do 5 % te je 5 do 10 puta češća u žena nego u muškaraca (9,10). Asimptomatski, supklinički oblik bolesti, uz pozitivan nalaz antitiroidnih protutijela ima približno 8 % žena i 3 % muškaraca (10). Incidencija HT-a iznosi 0,3 do 1,5 slučajeva na 1000 osoba godišnje (7), raste s dobi i najčešće se javlja između 45 i 65 godine života, a rjeđe u djece i starijih osoba (9,11). HT se također, često javlja u komorbiditetu s drugim autoimunim bolestima poput reumatoidnog artritisa i šećerne bolesti tipa I (9).

1.3. GENSKI I OKOLIŠNI ČIMBENICI U ETIOLOGIJI HASHIMOTOVE BOLESTI

1.3.1. Genski rizični čimbenici

Uloga nasljednih, genskih čimbenika u razvoju HT-a uočena je u obiteljskim studijama koje pokazuju povećanu vjerojatnost pojave HT-a među članovima obitelji oboljelih u odnosu na opću populaciju. U istraživanju koje su proveli Hall i Stanbury incidencija AITD-a među srodnicima oboljelih od Hashimotove ili Gravesove bolesti iznosila je 33 %, a antitiroidna protutijela pronađena su u 56 % srodnika. U općoj populaciji incidencija antitiroidnih protutijela u žena ne prelazi 25 %, a u muškaraca 13 % (12). U studiji koju su proveli Villanueva R. i sur.

kao kvantitativna mjera utjecaja genskih čimbenika na razvoj bolesti i procjene rizika obolijevanja pojedinaca koji su u srodstvu s oboljelom osobom primijenjen je koeficijent λ_s , dobiven metodom *sibling risk ratio*. Vrijednost koeficijenta λ_s veća od 5 ukazuje na znatan utjecaj genskih čimbenika u razvoju bolesti. Studija je proučavala incidenciju HT-a i GD-a među članovima obitelji 155 pacijenata oboljelih od AITD-a. Zabilježene su visoke vrijednosti koeficijenta λ_s ; za AITD ($\lambda_s = 16,9$), GD ($\lambda_s = 11,6$) i HT ($\lambda_s = 28,0$) (13). Studije parova monozigotnih (MZ) i dizigotnih (DZ) blizanaca također potvrđuju ulogu genske osnove u razvoju oboljenja AITD. Istraživanja na danskoj populaciji ukazuju na incidenciju HT-a u 55 % monozigotnih (MZ) i 0 % dizigotnih (DZ) parova (14).

Geni koji sudjeluju u razvoju HT-a mogu se podijeliti u dvije skupine: gene specifične za štitnjaču i imunomodulatorne gene. Prvoj skupini pripadaju gen za receptor tireostimulirajućeg hormona (TSHR) i gen za tireoglobulin (Tg). Tg čini oko 80 % ukupnih proteina štitnjače, normalno se nalazi u cirkulaciji te je izložen imunom sustavu. Zbog toga se smatra jednim od glavnih pokretača autoreaktivnog imunskog odgovora u štitnjači (1).

U skupini gena koji kodiraju proteine imunomodulatornih učinaka važnu ulogu u razvoju autoimunih bolesti štitnjače imaju geni glavnog sustava tkivne podudarnosti (MHC, engl. *major histocompatibility complex*), koji se u ljudi nazivaju geni sustava HLA (engl. *human leukocyte antigen*). Molekule HLA razreda I i II sudjeluju u prezentaciji endogenih i egzogenih antigena stanicama imunskog sustava. Molekule HLA klase I (HLA-A, HLA-B, HLA-C) prezentacijom endogenih antigena stanicama imunskog sustava mogu potaknuti aktivaciju citotoksičnih CD8⁺ T-limfocita i stanično-posredovano uništavanje tireocita s pomoću citotoksičnih CD8⁺ T-limfocita. S druge strane, molekule HLA razreda II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR, HLA-DM, HLA-DO), izražene na površini antigen-prezentirajućih stanica, sudjeluju u prezentaciji egzogenih antigena i aktivaciji pomoćničkih CD4⁺ T-limfocita. Aktivirane loze pomoćničkih T-limfocita stimuliraju B-limfocite na proizvodnju protutijela za specifične antigene (9). Pojedine varijante gena *HLA*, posebice alelne varijante *HLA-DRB1*03* genskog lokusa povezane su s povećanim rizikom razvoja Hashimotova tireoiditisa (15). U uvjetima upalnog mikrookoliša folikularne stanice štitnjače na svojoj površini izražavaju molekule HLA razreda II te prezentacijom antigena štitnjače potencijalno pospješuju razvoj autoimunog odgovora u štitnoj žlijezdi (9).

S razvojem HT-a povezani su i geni koji kodiraju inhibitorne površinske receptore kao što su *CTLA-4* (engl. *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4*) te *PTPN22* (engl. *protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22*) (1). *CTLA-4* djeluje kao negativni regulator aktiviranih T-limfocita, a trajna ekspresija *CTLA-4* na površini regulatornih T-limfocita (Treg) osigurava njihovo supresivno djelovanje. Polimorfizmi u egzonu I (49A/G) i u blizini 3' netranslatirane regije (CT60) gena *CTLA-4* potencijalno pospješuju smanjenu funkciju receptora *CTLA-4*, a povezuju se s pojavom i razvojem AITD fenotipa. Gen *PTPN22* kodira LYP (engl. *lymphoid tyrosine phosphatase*) protein koji također djeluje kao negativni regulator funkcije T-limfocita. Polimorfizam C1858T u genu *PTPN22*, koji dovodi do zamjene arginina za triptofan, povezan je s razvojem HT-a (1).

Promjene u ekspresiji transkripcijskih čimbenika koji sudjeluju u kontroli diferencijacije subpopulacija limfocita, kao što su T-bet, FOXP3 (engl. *forkhead box P3*) (16), Eomesodermin, Bcl6 (17), TIGIT i FCRL3 (18), također se povezuju s razvojem i progresijom HT-a.

1.3.2. Čimbenici okoliša

Važnu ulogu u razvoju HT-a imaju i okolišni čimbenici, kao što su količina joda i selena u organizmu, unos alkohola, pušenje, infektivna stanja, izloženost radioaktivnom zračenju, fizički i emotivni stres. Fiziološka stanja poput puberteta, rasta, trudnoće i menopauze također pridonose riziku razvoja HT-a (19). Istraživanja su pokazala da povećani unos joda prehranom nosi povećani rizik od pojave tiroidnih autoprotiljela i razvoja autoimunog hipotiroidizma (15). Prekomjeren unos joda direktno blokira sintezu hormona ili djeluje toksično na tireocite. Također, povećana iodinizacija tireoglobulina može potaknuti razvoj autoimunog odgovora na jodidom promijenjene tireoglobulinske epitope te pospješiti povećanu sintezu opasnih kisikovih radikala, nusprodukata oksidacije suvišnih jodidnih iona u reakciji koju katalizira tiroidna peroksidaza (1,7). Također, smatra se da nedostatak selena može potaknuti razvoj i progresiju autoimunih bolesti štitnjače. Njegova se uloga očituje kroz funkciju enzima glutation-peroksidaze i tioredoksin-reduktaze, selenoproteina potrebnih za zaštitu stanice od oksidativnog

oštećenja. U stanjima nedostatka selena funkcija je ovih enzima smanjena, dolazi do oslobađanja slobodnih radikala, slabljenja imunosne funkcije te oštećenja tkiva štitnjače (15).

Među ostalim okolišnim čimbenicima, znatne učinke u razvoju HT-a ima terapija interferonom α , direktnim toksičnim djelovanjem na tireocite ili kao posljedica imunomodulatornih učinaka u imunosnim stanicama. Ženski spol znatno pridonosi riziku razvoja HT-a, najvjerojatnije zbog utjecaja spolnih hormona, inaktivacije X-kromosoma, kao i posljedica trudnoće ili pojave fetalnog mikrokimerizma (9,19). Starija dob, kao i pozitivna obiteljska anamneza ili pojava drugih autoimunih bolesti također pridonose riziku razvoja Hashimotova tireoiditisa (20).

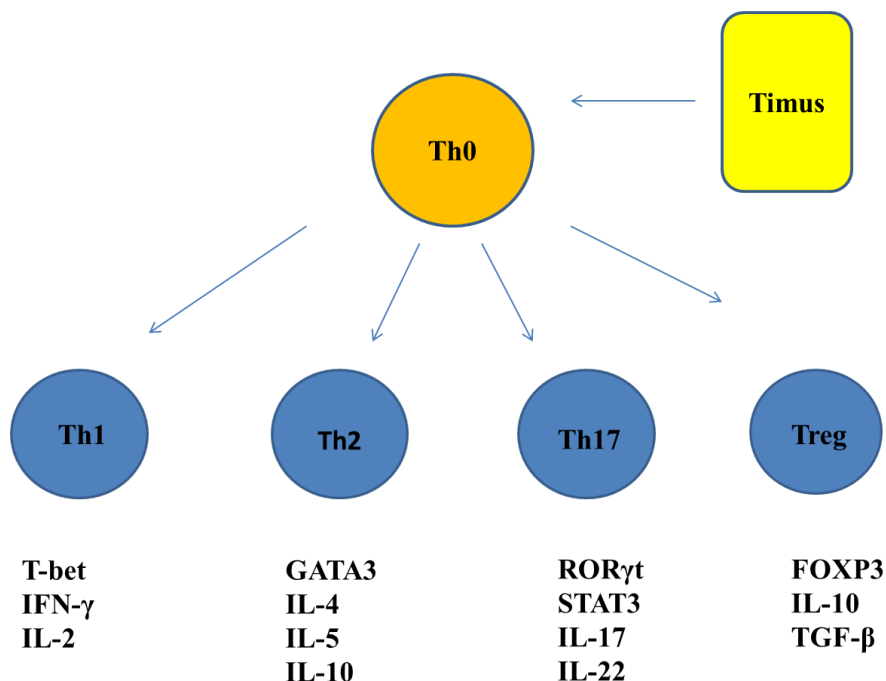
1.4. IMUNOPATOGENEZA HASHIMOTOVE BOLESTI

1.4.1. Inicijacija autoimunog odgovora

Etiologija Hashimotove bolesti do danas ostaje nedovoljno razjašnjena, ali vjeruje se da su potencijalni uzročni događaji povezani s oštećenjem tireocita izazvani okolišnim čimbenicima. Antigen-prezentirajuće stanice fagocitiraju stanične komponente oštećenih tireocita te ih prezentiraju na svojoj površini u kompleksu s molekulama HLA razreda II. Prezentacija antigena štitnjače u kompleksu s molekulama HLA razreda II potiče aktivaciju pomoćničkih $CD4^+$ T-limfocita vezanjem na TCR (engl. *T-cell receptor*). Uz to, aktivirane antigen-prezentirajuće stanice počinju lučiti upalne citokine i potiču razvoj upalnog mikrookoliša (24). Pod utjecajem upalnih citokina poput interferona- γ (INF- γ) i TNF- α (engl. *tumor necrosis factor- α*) stanice štitne žlijezde počinju ekspimirati molekule HLA razreda II te prezentacijom tkivnih autoantigena štitnjače potiču ekspanziju autoreaktivnih T-limfocita i upalni odgovor. Uvjeti upalnog mikrookoliša u štitnjači dovode do sinteze i ekspresije upalnih citokina i kemokina, što pospješuje kemotaksiju i tkivnu infiltraciju citotoksičnih $CD8^+$ T-limfocita i pomoćničkih $CD4^+$ T-limfocita, B-limfocita i makrofaga (6). Pod utjecajem T-staničnih citokina, stanični i humoralni čimbenici autoimunog odgovora pospješuju apoptozu tireocita te pridonose smanjenoj sintezi hormona T3 i T4 (6,9). Napredak bolesti prati povećana infiltracija limfocita, fibroza i atrofija žljezdanog parenhima te posljedični razvoj hipotireoze (9).

1.4.2. Uloga pomoćničkih T-limfocita u razvoju Hashimotova tireoiditisa

U razvoju HT-a sudjeluje više različitih subpopulacija pomoćničkih T-limfocita, uključujući limfocite Th1, Th2, Th17, Th22 i Treg (slika 1.) (22,23).



Slika 1. Razvoj T-limfocita CD4⁺ i lučenje citokina (shema pripremljena u računalnom programu PowerPoint).

Pomoćnički limfociti Th1 luče IFN- γ , IL-2 i druge citokine koji sudjeluju u staničnom imunosnom odgovoru. Oni potiču aktivaciju citotoksičnih T-limfocita (CTL) i makrofaga koji direktno uništavaju folikularne stanice štitnjače. Važan transkripcijski čimbenik limfocita Th1 jest T-bet. On upravlja njihovom diferencijacijom i razvojem te ekspresijom IFN- γ (24).

Limfociti Th2 luče IL-4, IL-5 i IL-10, stimuliraju aktivaciju B-limfocita i razvoj plazma-stanica koje potom stvaraju protutijela protiv tkivnih antigena štitnjače te tako potiču humoralni imunosni odgovor. Diferencijacijom limfocita Th2 i ekspresijom upalnih citokina upravlja transkripcijski čimbenik GATA3 (engl. *GATA binding protein 3*) (25).

Limfociti Th17 sudjeluju u imunosnom odgovoru protiv ekstracelularnih antigena te u patogenezi upalnih i autoimunih bolesti. Djeluju suprotno regulatornim (Treg) stanicama, a luče IL-17 i IL-22. Oni potiču sintezu kemokina i proinflammatoryh citokina inducirajući na taj način razvoj autoimunih bolesti (22,23). Limfociti Th17 eksprimiraju transkripcijske čimbenike ROR γ t (engl. *retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor gamma t*) i STAT3 (engl. *signal transducer and activators of transcription-3*), koji imaju ključnu ulogu u njihovu razvoju (22).

Stanice Treg CD4⁺ imaju važnu ulogu u održavanju periferne tolerancije te u prevenciji razvoja autoimunosti. Luče citokine IL-10 i TGF- β potrebne za indukciju tolerancije. Niske razine autoantigena potrebne su za održavanje stanica Treg u osnovnom stanju i za sprječavanje razvoja autoimunog procesa (22). Stanice Treg eksprimiraju transkripcijski čimbenik FOXP3, važan za njihov razvoj i funkciju. Nedostatak gena FOXP3 smanjuje supresorsku funkciju stanica Treg (22,26).

Oboljeli od HT-a pokazuju sniženu razinu i funkciju limfocita Treg u perifernoj krvi i tkivu štitne žlijezde (22). U perifernoj krvi oboljelih utvrđena je i snižena razina mRNA FOXP3 (23). Isto tako, u perifernoj krvi i tkivu štitnjače oboljelih od HT-a pronađene su povišene razine limfocita Th17 i njihovih citokina. Utvrđena je i povećana diferencijacija limfocita Th17, što ukazuje na njihovu moguću ulogu u razvoju HT-a (22). Također, u perifernoj krvi i tkivu štitnjače oboljelih od HT-a pronađena je i povišena razina mRNA IL-17 te RORC (engl. *retinoic-acid-receptor-related orphan receptor C*) (23). U osoba oboljelih od HT-a dokazan je povećan omjer stanica Th17/Treg. S obzirom na to da limfociti Th17 i Treg imaju suprotno djelovanje u razvoju autoimunih bolesti, a njihov je omjer u pozitivnoj korelaciji s koncentracijom TgAb, njihov promijenjeni omjer može ukazivati na težinu bolesti (23). U perifernoj krvi i tkivu štitne žlijezde bolesnika oboljelih od HT-a prisutna je povećana ekspresija mRNA IFN- γ , što ukazuje na utjecaj limfocita Th1 na razvoj bolesti (27). Broj stanica Th22 i IL-22 također je povećan u perifernoj krvi i tkivu štitnjače oboljelih. Pronađena je pozitivna korelacija između razine limfocita Th17 i Th22, što upućuje na njihovu moguću sinergističku ulogu u razvoju HT-a (28).

1.4.3. Uloga citotoksičnih T-limfocita u razvoju Hashimotova tireoiditisa

U razvoj HT-a uključeni su CD8⁺ T-limfociti usmjereni protiv TPO i Tg antigena u štitnjači (21). Nakon prezentacije štitnih antigena u kompleksu s molekulama HLA razreda I na površini stanica štitnjače dolazi do aktivacije i diferencijacije CD8⁺ efektorskih linija. One uništavaju tireocite citokinskom ozljedom i apoptozom (29).

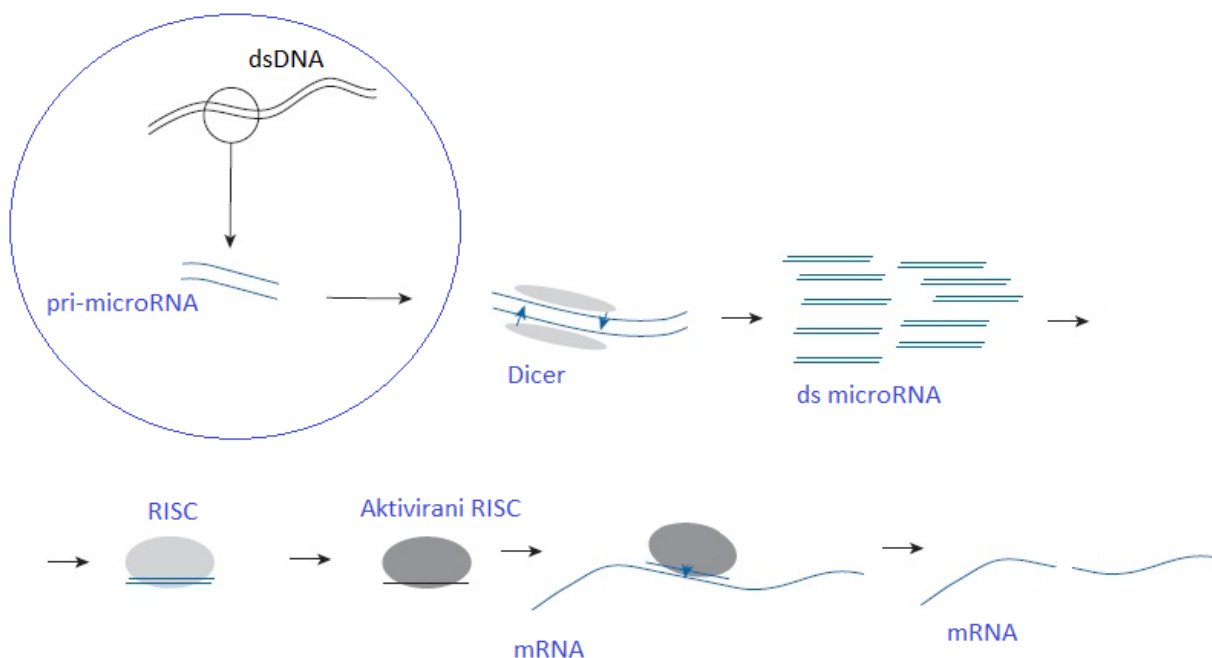
Ključnu ulogu u tim destruktivnim procesima u štitnjači imaju efektorski limfociti Tc1 CD8⁺. Oni potiču imunosti odgovor protiv ciljnih antigena lučenjem citotoksičnih molekula i upalnih citokina poput INF- γ , TNF- α , granzima i perforina (30). Djelovanjem citokina poput IL-12 i IL-2 dolazi do diferencijacije limfocita Tc1. Razvoj efektorskih limfocita Tc1 nalazi se pod kontrolom transkripcijskih čimbenika T-bet (engl. *T-box transcription factor*), Eomesodermina i RUNX3 (engl. *runt-related transcription factor 3*) (30,31). Štoviše, RUNX3 djeluje kao primarni regulator ekspresije proteolitičkih enzima poput granzima B i perforina, a zajedno s transkripcijskim čimbenicima T-bet i EOMES potiče ekspresiju IFN- γ i time stabilizira efektorski fenotip i razvoj stanica Tc1. U slučaju nedostatka ekspresije RUNX3, CD8⁺ T-limfociti gube sposobnost citolitičkog djelovanja i diferencijacije u stanice CTL (32).

Transkripcijski čimbenici FOXO1 (engl. *forkhead box protein O1*) i TCF-7 (engl. *transcription factor 7*) pridonose pak razvoju memorijskih limfocita (30,31). FOXO1 regulira ključne stanične procese uključujući diobu, stanično preživljenje i metaboličke procese u službi proizvodnje energije, čime znatno utječe na homeostazu limfocita, njihovu diferencijaciju i proliferaciju (33,34). Ekstracelularni podražaji, antigeni i proinflamatorni citokini poput IL-12 pojačavaju i održavaju fosforilaciju FOXO1 te inhibiraju njegovu aktivnost (35). Gubitak aktivnosti FOXO1 pospješuje diferencijaciju efektorskih limfocitnih linija i onemogućuje razvoj memorijskih CD8⁺ T-limfocita (34).

Osim Tc1, limfociti Tc17 vežu se uz imunopatogenezu HT-a. Njihovim razvojem upravljaju upalni citokini IL-1 β , IL-6, IL-21 i TGF- β te transkripcijski čimbenici ROR γ t i ROR α (engl. *RAR-related orphan receptor alpha*). Transkripcijski čimbenik ROR γ t ima ključnu ulogu u regulaciji ekspresije gena *IL-17*, *IL-17F*, *IL-22*, *CCR20* i *CCR6* i razvoju tip 17 fenotipa koji obilježava ekspresija citokinskih i kemokinskih receptora IL-23R, CCR20 (36) i CCR6, CCR4 i

CCR5 (37), površinskih biljega CD161 i lučenje upalnih citokina IL-17, IL-17F, IL-21 i IL-22 (38). Povećani broj IL-17⁺ limfocita T čest je upalni biljeg različitih autoimunih bolesti, što naglašava važnu ulogu IL-17 transkripcijskih regulatora poput ROR γ t u kontroli imunskog odgovora i razvoju autoimunosti (39). Za razliku od Tc1, stanice Tc17 pokazuju smanjenu ekspresiju transkripcijskih čimbenika T-bet i EOMES te imaju manji citotoksični učinak. Istraživanjima je utvrđena povećana razina limfocita Tc17 kod osoba oboljelih od HT-a u odnosu na zdrave ispitanike, što ukazuje na njihovu moguću povezanost s razvojem bolesti (40). Osim navedenih stečenih CD8⁺ limfocitnih linija, u razvoju Hashimotova tireoiditisa sudjeluju i prirodne CD8⁺ populacije stanica, poput stanica NKT (engl. *natural killer T*) koje u okviru redovne uloge u organizmu sudjeluju u ranoj obrani organizma od mikrobnih organizama, ali imaju ulogu i u razvoju imunskog odgovora protiv tumora te razvoju autoimunih bolesti. Stanice NKT obilježava ekspresija invarijantnog receptora $\alpha\beta$ TCR (posebice subpopulaciju invarijantnih NKT, iNKT stanica), koji prepoznaje antigene prezentirane u kompleksu s prezentirajućim molekulama CD1d. Na svojoj površini stanice NKT ekspimiraju CD3 T limfocitni biljeg u kombinaciji sa staničnim obilježjima prirodnih NK stanica, poput CD16, CD56, KIR, NKG2A i NKG2C površinskih receptora te lučenjem citokina poput INF- γ , IL-4, IL-10 i IL-13 pospješuju razvoj limfocitnih linija stečenog imunskog odgovora (41). Diferencijacijom iNKT stanica dominantno upravlja transkripcijski čimbenik PLZF (engl. *promyelocytic leukemia zinc finger*, kodiran genom *ZBTB16*). U nedostatku ekspresije PLZF-a, iNKT stanice gube memorijski fenotip i mogućnost proizvodnje upalnih citokina tijekom primarne stimulacije. Visoka razina ekspresije PLZF-a opisana je također u CD8⁺ stanicama koje izražavaju površinski biljeg CD161, odnosno stanicama MAIT (engl. *mucosal-associated invariant T cells*) te dvostruko negativnim CD161^{hi} $\gamma\delta$ T limfocitima. Te stanice pripadaju stanicama prirodne imunosti i ekspimiraju karakterističan, ograničen TCR repertoar. U nedostatku ekspresije PLZF-a iNKT, MAIT i $\gamma\delta$ T stanice gube sposobnost izvršnog djelovanja, što potvrđuje važnu ulogu transkripcijskog čimbenika PLZF u razvoju stanica prirodne imunosti (42). U kontekstu uloge NKT-a u razvoju HT bolesti opisana je potencijalna uloga hidrofobnih regija tireoglobulina kao potencijalnih NKT liganada koji u kompleksu s CD1d molekulama mogu stimulirati aktivaciju stanica NKT i razvoj tireoiditisa (41).

način miRNA sudjeluje u regulaciji staničnih procesa poput diferencijacije, proliferacije i apoptoze te imaju važnu ulogu u razvoju autoimunih procesa i bolesti (slika 3.) (44).



Slika 3. Uloga microRNA u regulaciji ekspresije gena (shema pripremljena u računalnom programu Paint).

Nomenklatura molekula microRNA temelji se na nekoliko kriterija. Prva tri ili četiri slova u nazivu specifična su za vrstu od koje microRNA potječe; npr. hsa određuje vrstu *Homo sapiens* te prethodi nazivima svih ljudskih microRNA. Zrele microRNA određene su kraticom „miR”, a genski lokus i prekursor zrele microRNA kraticom „mir” (45). Identifikacijski broj koji određuje microRNA, npr. hsa-miR-301, dodjeljuje se prema redosljedju otkrivanja i publikacije molekule microRNA; svaka sljedeća molekula microRNA određena je identifikacijskim brojem za jedan većim u odnosu na prethodnu. Identične microRNA u različitim vrstama određene su istim identifikacijskim brojem (46). Ortologne sekvence microRNA porijeklom od različitih vrsta razlikuju se samo prema kratlici specifičnoj za vrstu; npr. hsa-miR-101 kod ljudi i mmu-miR-101 kod miševa predstavljaju ortologne microRNA. Nadalje, ako se microRNA razlikuju

samo u položaju jednog ili dva nukleotida u svojim sekvencama, oni predstavljaju paraloge, a označavaju se sufiksom; npr. hsa-miR-301a i miR-301b (45). U slučaju kada dva različita lokusa produciraju istu zrelu microRNA, na kraj imena dodaje se broj te se oni označavaju kao hsa-mir-121-1 i hsa-mir-121-2, a njihov se produkt označava kao hsa-miR-121 (47,48). Također, ako različite microRNA potječu od suprotnih lanaca istoga dvostrukog kompleksa microRNA, na kraj imena dodaje se sufiks 3p ili 5p, ovisno o lancu prekursoru; npr. hsa-miR-301a-3p ili hsa-miR-301-5p. U konačnici, postoji i nekoliko iznimaka poput miR-let7 i miR-lin4. One su otkrivene i imenovane prije standardizacije sustava za nomenklaturu microRNA te su njihovi nazivi iznimno zadržani (47).

1.5.2. Uloga microRNA u imunom sustavu

Regulacija molekulama miRNA rezultira malim promjenama u ekspresiji gena, no budući da istodobno utječe na stotine gena, može imati značajne učinke na fenotip i funkciju stanica (49). Molekule microRNA uključene su u regulaciju mnogih aspekata imunog sustava, uključujući diferencijaciju stanica, sintezu i izlučivanje citokina i staničnu migraciju (50). Ravnoteža između ekspresije miRNA i citokinskog profila potrebna je za održavanje T-stanične homeostaze i razvoja imunostolerancije. Poremećaj te ravnoteže može dovesti do razvoja upalnih stanja i autoimunih bolesti (51). Također, regulacijom mnogih pozitivnih ili negativnih regulatora staničnih procesa molekule miRNA posredno djeluju na različite signalne putove koji imaju ulogu u razvoju autoimunosti (44).

Ključna uloga miRNA u razvoju i diferencijaciji T-limfocita CD4⁺ i CD8⁺ prvi je put uočena u animalnim modelima u kojih je genetičkim inženjerstvom uklonjena ekspresija enzima Dicer i Drosha. U takvih je životinja primijećen znatan gubitak broja i funkcije perifernih T-limfocita (52,53). Štoviše, u animalnim modelima s nedostatkom enzima Dicer zabilježen je gubitak supresivne funkcije limfocita Treg i transdiferencijacija perifernih stanica Treg u pomoćničke efektorske linije (54).

Dakle, molekule miRNA imaju važnu ulogu u kontroli razvoja periferne, ali i centralne tolerancije. MiRNA koje sudjeluju u regulaciji preživljavanja stanica, transdukciji aktivacijskog

signala i dostupnosti autoantigena tijekom razvoja limfocita imaju važnu ulogu u sazrijevanju i selekciji limfocita T i B (49). U ranoj fazi razvoja T-limfocita u timusu interakcija receptora TCR i autoantigena određuje sudbinu i preživljenje nezrelih limfocita. Stanice koje izražavaju receptore koji prepoznaju autoantigene bit će eliminirane apoptozom. MiRNA koje utječu na jačinu signala TCR mogu pospješiti preživljenje takvih autoreaktivnih limfocita i time pospješiti pojavu autoimunosti. Zreli autoreaktivni limfociti koji su izbjegli mehanizmima centralne tolerancije ne mogu razlikovati strane i vlastite antigene. Stoga u susretu s ciljnim tkivom mogu potaknuti razvoj autoimune bolesti. Mehanizmi periferne tolerancije ograničavaju limfocite T i B u stvaranju autoprotutijela, upalu i uništavanje tkiva. Ti su mehanizmi također pod utjecajem regulacije miRNA, a njihovom promjenom može doći do razvoja autoimunosti (49). MicroRNA imaju ulogu u razvoju i selekciji limfocita B i T s odgovarajućim receptorima BCR i TCR. Tako reguliraju preživljavanje stanica, signalizaciju antigenim receptorima i dostupnost autoantigena tijekom razvoja limfocita te upravljaju mehanizmima centralne tolerancije. Utvrđeno je da nedostatak enzima Dicer dovodi do promjena u repertoaru receptora BCR regulirajući preživljavanje potencijalno autoreaktivnih B-limfocita. Primjerice, obitelj miR-17-92 potiče preživljavanje nezrelih B-limfocita regulirajući signalni put PI3K (55,56). Nadalje, miR-17-92 utječe na aktivnost tumor supresora PTEN, koji djeluje kao negativni regulator signalnog puta PI3K. U slučaju nedostatka miR-17-92 u B-limfocitima dolazi do povećane ekspresije PTEN-a te stanice podliježu apoptozi rezultirajući deficijencijom B-limfocita. Suprotno, povećana ekspresija miR-17-92 tijekom razvoja limfocita B i T potiče preživljavanje stanica i time potencijalno dovodi do limfoproliferativnih i autoimunih bolesti (57).

U ranoj fazi razvoja T-limfocita u timusu jačina signalizacije vezanjem autoantigena i TCR receptora određuje preživljenje specifičnih limfocitnih vrsta. Stoga miRNA koje utječu na jačinu TCR signala u timusu, poput miR-181, mogu pogodovati preživljavanju stanica koje bi normalno bile eliminirane. Ti podaci upućuju na mogući utjecaj miR-181 u razvoju autoimunosti. Nadalje, miRNA djeluju na centralnu toleranciju djelujući na aktivnost antigenprezentirajućih stanica u timusu. Stanice mTEC (engl. *medullary thymic epithelial cells*) eksprimiraju tkivno specifične autoantigene, prezentiraju ih timocitima u razvoju te eliminiraju stanice s receptorima TCR koji prepoznaju tkivno specifične autoantigene (58,59). Delecija gena *Dicer* dovodi do promjene ekspresije gena u stanicama mTEC (59). Uobičajeno, u stanicama mTEC prisutna je visoka ekspresija miR-29a. Delecija miR-29a uzrokuje povećanje ekspresije

IFNAR1 (engl. *interferon alpha/beta receptor 1*), koji kodira IFN- α , i fosforilaciju STAT1 te ima sličan učinak kao delecija gena *Dicer* (58). Zreli autoreaktivni limfociti koji su izbjegli mehanizme centralne tolerancije mogu postati efektorske stanice te mogu pokrenuti autoimuni odgovor.

1.5.2.1. Obitelj molekula miRNA let-7

MiRNA let-7 najveća je i najzastupljenija obitelj miRNA u limfocitima. Obitelj miRNA let-7 otkrivena je istraživanjima na vrsti *Caenorhabditis elegans* 2000. godine (60). Varijante miRNA let-7 sudjeluju u regulaciji staničnog ciklusa, metabolizma, diferencijaciji i funkciji stanica NKT (61), CD4⁺ (62) i CD8⁺ T-limfocita. Povećana ekspresija miRNA let-7 u stanicama iNKT suprimira ekspresiju transkripcijskog čimbenika PLZF i pospješuje diferencijaciju efektorskih iNKT linija koje izlučuju INF- γ . Suprotno, u limfocitima CD8⁺ animalnih modela visoke razine miRNA let-7 potrebne su za održavanje naivnog fenotipa. Tijekom aktivacije i slijedom signalne kaskade, koju inducira vezanje antigena za TCR, dolazi do inhibicije ekspresije miRNA let-7, čime se pospješuje klonalna proliferacija i razvoj citotoksičnog kapaciteta aktiviranih T-limfocita CD8⁺. Naime, miRNA let-7 negativno regulira funkciju stanica CTL, prevenirajući ekspresiju citotoksičnih molekula poput granzima A, granzima B i perforina. Štoviše, let-7 u CTL direktno veže dio kodirajuće regije mRNA EOMES reducirajući njegovu ekspresiju i time kompromitirajući diferencijaciju i citotoksičnu funkciju CTL (63).

1.5.2.2. MiR-301a

Transfekcijom antagonista miR-301a u aktivirane T-stanice dolazi do smanjenja sekrecije IL-17. Isto tako, antagonisti miR-301a dovode do smanjenja ekspresije transkripcijskih čimbenika ROR α , ROR γ i upalnih citokina IL-17A i IL-17F, karakterističnih za diferencijaciju stanica Th17 i Tc17. Ti podaci upućuju na važnu ulogu miR-301a u razvoju, diferencijaciji i citokinskom profilu tipa 17 T-limfocita (64). Pronađeno je da miR-301a potiče diferencijaciju

stanica Th17 djelujući direktno na PIAS3 (engl. *protein inhibitor of activated STAT3*), snažan inhibitor signalnog puta STAT3, i time posredno potiče povećanu sintezu upalnih citokina koji obilježavaju upalni imunski odgovor tipa 17 (51).

1.5.2.3. MiR-20a

MiR-20a pripada obitelji microRNA miR-17-92. Uz nju, istoj obitelji pripadaju i miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-19b i miR-92. Ove microRNA molekule kodiraju regije na kromosomu 13q31. MiR-17-92 miRNA obitelj obilježava identična *seed* regija potrebna za vezanje na ciljne mRNA molekule. Tijekom razvoja limfocita članovi obitelji miR-17-92 imaju ključnu ulogu u regulaciji staničnog ciklusa, proliferaciji i apoptozi stanica (57). Većina molekula miR iz te skupine sudjeluje u regulaciji razvoja i proliferacije T-limfocita CD8⁺, a njihova se ekspresija smanjuje tijekom diferencijacije stanica (65). MiR-20a ima ulogu u regulaciji gena važnih za aktivaciju T-limfocita te sudjeluje u kontroli funkcije imunskog sustava (66). Povišena ekspresija miR-20a povezuje se s povećanim proliferativnim kapacitetom i razvojem CD8⁺ centralnih memorijskih T-limfocita. Zanimljivo, prekomjerna ekspresija miR-20a-5p uočena je u tumorskim stanicama dojke uz istodobno smanjenu ekspresiju (i na razini mRNA i na razini proteina) transkripcijskog čimbenika RUNX3 (67).

1.5.2.4. MiR-106a

Tijekom klonalne ekspanzije CD8⁺ T-limfociti eksprimiraju visoke razine miR-106a i miR-20a, ali se njihova ekspresija smanjuje tijekom diferencijacije stanica. MiR-106a, jednako kao i miR-20a, ima važnu ulogu u regulaciji klonalnog i funkcijskog kapaciteta linija efektorskih CTL, potencijalno putem regulacije transkripcijskih čimbenika ROR γ t (68) i RUNX3 (69).

Dosadašnje spoznaje o ulozi miRNA u regulaciji fenotipa, funkcije i razvoja CTL-a naglašavaju važnost istraživanja njihove uloge u razvoju autoimunih bolesti. Unatoč tome, gotovo ništa nije poznato o eventualnoj ulozi miR-let-7, miR-20a, miR-106a i miR-301a u pojavi, progresiji i ishodu HT-a. Jednako tako, ništa nije poznato o promjenama njihova transkriptoma u CTL CD8⁺ u Hashimotovoj bolesti i eventualnoj povezanosti tih promjena s oštećenjem štitne žlijezde i obilježjima bolesti. U tom smislu uloga hsa-miR-let7a, hsa-miR-20a, hsa-miR-106a i hsa-miR-301a u HT-u ostaje neistražena.

2. HIPOTEZA

1. Profili ekspresije microRNA koji reguliraju proliferativni i funkcijski kapacitet citotoksičnih T-limfocita razlikuju se između zdravih ispitanika i bolesnika oboljelih od Hashimotove bolesti.
2. Promjene u ekspresiji ispitivanih microRNA povezane su s fenotipskim obilježjima Hashimotove bolesti poput hipotireoze, volumena štitnjače i potrebe za L-tiroksinom (dnevna doza) tijekom nadomjesnoga hormonskog liječenja.

3. CILJEVI

1. Ispitati, opisati i usporediti ekspresiju hsa-miR-let7a, hsa-miR-20a, hsa-miR-106a i hsa-miR-301a u perifernim krvnim T-limfocitima bolesnika oboljelih od Hashimotove bolesti i zdravih ispitanika.

2. Ustanoviti transkripcijske profile ispitivanih microRNA u kontrolnoj i HT skupini te odrediti njihovu povezanost s dobi ispitanika, volumenom štitnjače, serumskom razinom tireostimulina (TSH), slobodnog (F)T3 i FT4, anti-TPO antitijela te nadomjesnom hormonskom terapijom (stabilna dnevna doza L-tiroksina u $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase kod liječenih ispitanika).

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ustroj istraživanja

Provedeno je opažajno, presječno i *case-control*, istraživanje.

4.2. Ispitanici

Istraživanjem su obuhvaćeni arhivski uzorci RNA izolirane iz T-limfocita periferne krvi 13 zdravih ispitanika i 33 po dobi i spolu podudarnih, punoljetnih, nesrodnih osoba oboljelih od Hashimotove bolesti. Probir ispitanika kontrolne i skupine HT te prikupljanje i izolacija biološkog materijala prethodno su provedeni u okviru studije koja je odobrena odlukom Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek (Potvrda br. 29-1:9890-11/2007).

Hashimotova bolest definirana je, kako je ranije opisano, pozitivnim nalazom protutijela anti-TPO u serumu i/ili citološkim nalazom kroničnog limfocitnog tireoiditisa u ciljanoj citološkoj punkciji pod kontrolom ultrazvuka i karakterističnim nalazom ultrazvuka štitnjače (70). Ovisno o stupnju rezidualne funkcije žlijezde i dozi primijenjene hormonalne terapije, oboljeli od Hashimotove bolesti klasificirani su u tri podskupine ispitanika:

- 1) spontanog eutiroidnog statusa (EU HT),
- 2) hipotiroidni, liječeni nadomjesnom terapijom L-T₄, s terapijski postignutom stabilnom biokemijskom eutireozom (SUBST HT)
- 3) hipotiroidni, novodijagnosticirani, neliječeni (HYPO HT).

Skupina liječenih hipotiroidnih bolesnika liječena je L-tiroksinom (L-T₄) u dozi kojom se postiže stabilna biokemijska eutireoza. Prosječna primijenjena dnevna doza iznosila je 1,16 µg/kg (interkvartilni raspon 0,96 – 1,3 µg/kg).

Kontrolna skupina (CTRL) sastavljena je od odraslih nesrodnih zdravih eutiroidnih ispitanika s urednim nalazom ultrazvuka štitnjače, bez obiteljske anamneze bolesti štitnjače, autoimunih ili endokrinih bolesti, u kojih je analizom krvi potvrđena odsutnost protutijela anti-TPO (17,71).

Primarna hipotireoza i isključni kriteriji definirani su kako je ranije navedeno (17,71,72).

4.3. Upotrijebljene kemikalije

- TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)
- TaqMan Advanced miRNA Assay (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)

Tablica 1. Popis proba TaqMan

ID probe	miRNA	Sekvenca zrele miRNA	miRBase pristupni broj	Ciljna mRNA
477815_mir	hsa-miR-301a-3p	CAGUGCAAUAGUAUUGUCAAGC	MIMAT0000688	RUNX3
478575_mir	hsa-let7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	MIMAT0000062	FOXO1, PLZF
478586_mir	hsa-miR-20a-5p	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	MIMAT0000075	HIF1A, BCL2, STAT3, RUNX3, RORC
478225_mir	hsa-miR-106a-5p	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	MIMAT0000103	HIF1A, BCL2, STAT3, RUNX3, RORC
478262_mir	hsa-miR-192-5p	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	MIMAT0000222	Control miRNA
478366_mir	hsa-miR-345-5p	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC	MIMAT0000772	Control miRNA

4.4. METODE

4.4.1. Sinteza cDNA

Za sintezu cDNA korišteni su arhivski uzorci RNA izolirani iz perifernih T-limfocita odabranih ispitanika. Izolacija T-limfocita iz periferne krvi učinjena je tijekom ranijih studija negativnom imunomagnetskom selekcijom s pomoću komercijalnog kompleta Dynabeads Untouched Human T cells Isolation Kit, Invitrogen, Paisley, UK. Biokemijske metode za analizu serumske razine hormona štitnjače, metode izolacije mononukleara periferne krvi i T-limfocita te ekstrakcije i kontrole kvalitete RNA detaljno su opisane drugdje (16,17).

Sinteza microRNA cDNA učinjena je iz ukupne RNA i provedena je metodom reverzne transkripcije s pomoću komercijalnog kompleta TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit, prema uputama proizvođača. U prvom koraku zrele miRNA, koje se nalaze u uzorku ukupne RNA, podvrgnute su modifikaciji dodavanjem lanca poly(A) na njihov 3' kraj te ligacijom oligonukleotidnih adaptora na 5' kraj. Dodatkom enzima reverzne transkriptaze (RT) provedena je sinteza cDNA te preamplifikacija cDNA molekula u posljednjem koraku.

Postupak:

Poliadenilacija microRNA molekula provedena je dodatkom 2 μL uzorka ukupne RNA (koncentracije 20 ng/ μL) i 3 μL reakcijske smjese Poly(A) u tubice volumena 1,5 mL. Smjesa je potom vorteksirana, centrifugirana te inkubirana 45 min na 37 °C i potom 10 min na 65 °C. U sljedećem koraku 10 μL ligacijske smjese dodano je u tubice s produktima poliadenilacije. Nakon vorteksiranja i centrifugiranja, smjesa je inkubirana 60 min na 16 °C. U tubice s produktima reakcije ligacije adaptora dodano je 15 μL reakcijske smjese za RT sastavljene od 6 μL 5X RT pufera, 1,2 μL dNTP miksa, 1,5 μL 20x univerzalnih RT početnica, 3 μL 10x RT enzimskog miksa i 3,3 μL RNaza-free vode. Smjesa produkata reakcije ligacije adaptora i RT miksa vorteksirana je, centrifugirana i inkubirana 15 min na 42 °C te 5 min na 85 °C. 5 μL produkta reverzne transkripcije dodano je u nove tubice s 45 μL reakcijske smjese miR-Amp te su vorteksirane i centrifugirane. Preamplifikacija pripremljenih cDNA produkata provedena je u

uređaju QuantStudio 5 Real-Time PCR u sljedećim uvjetima: 1 ciklus (95 °C, 5 min), 14 ciklusa (95 °C, 3 s te 60 °C, 30 s), jedan ciklus (99 °C, 10 min) te završetak reakcije (4 °C).

4.4.2. Kvantitativna analiza ekspresije miRNA na PCR uređaju

Kvantitativna analiza ekspresije ciljnih miRNA (hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106a-5p i hsa-let7a-5p) i referentne hsa-miR-192-5p provedena je lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *real-time PCR*) na uređaju QuantStudio 5 (slika 4.) upotrebom TaqMan Advanced miRNA proba i početnica.



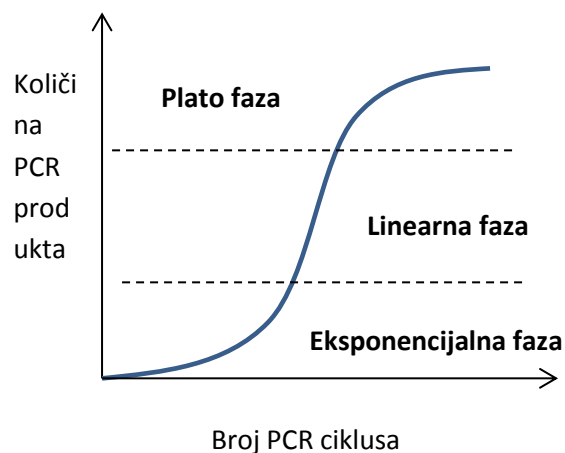
Slika 4. Uređaj QuantStudio 5 Real-Time PCR

4.4.3. Priprema standardne krivulje

Za kvantifikaciju cDNA primijenjena je kvantitativna metoda qRT-PCR. Ona se temelji na mjerenju fluorescencijskog signala koji tijekom PCR reakcije raste proporcionalno s brojem kopija ciljnih cDNA molekula. Na temelju zabilježenih vrijednosti fluorescentnog signala

izračunava se Ct vrijednost (engl. *threshold cycle*). Ct vrijednost predstavlja broj PCR ciklusa u kojima fluorescencijski signal nadmašuje prag fluorescencije, odnosno najnižu vrijednost fluorescencije koja se znatno razlikuje od nespecifične, pozadinske fluorescencije.

Najbrži porast fluorescencije događa se tijekom eksponencijalne faze qPCR reakcije kada se cDNA udvostručuje u svakom ciklusu. U linearnoj fazi dolazi do usporavanja amplifikacije zbog iskorištenja komponenti smjese te reakcija konačno staje u plato fazi, a fluorescencijski signal stagnira (slika 5.).



Slika 5. Lančana reakcija polimerazom – linearna ovisnost količine PCR produkta o broju ciklusa

U svrhu kvantifikacije izmjerenih vrijednosti fluorescencije potrebno je pripremiti standardnu krivulju. Priprema standardne krivulje također omogućuje određivanje učinkovitosti PCR reakcije. Standardna krivulja predstavlja dijagram dobivenih Ct vrijednosti u odnosu na pridružene, poznate logaritamske vrijednosti koncentracije standarda, a nastaje amplifikacijom najmanje pet serijskih razrjeđenja uzorka poznate koncentracije. Standardnu krivulju potrebno je pripremiti za ciljane i referentne gene. Na temelju zabilježenih vrijednosti fluorescencije (Ct) i poznate koncentracije cDNA u standardnim uzorcima određuje se koncentracija ispitivanih cDNA molekula u nepoznatim uzorcima.

Linearan odnos koncentracije i Ct vrijednosti u standardnim uzorcima opisuje jednadžba pravca $y = ax + b$. Pravilan porast fluorescencije u odnosu na koncentraciju očekuje se u 100 %

učinkovitoj reakciji. Stoga se učinkovitost PCR reakcije može izračunati iz vrijednosti nagiba pravca prema formuli:

$$E = 10^{\left(\frac{1}{\text{nagib}}\right)} - 1$$

Usporedbom omjera Ct vrijednosti i koncentracije izmjerenih u prvoj i krajnjoj točki standardne krivulje određuje se nagib pravca standardne krivulje prema jednadžbi:

$$y - y_1 = \frac{(y_2 - y_1)}{((x_2 - x_1))(x - x_1)}$$

Postupak:

Za pripremu standardne krivulje pet uzoraka ukupne RNA koncentracije 60 ng/μL prevedeno je reverznom transkripcijom u cDNA. Dobivene cDNA zatim su združene u jednu reakcijsku tubicu dodavanjem 5 μL od svake do volumena od 25 μL. Taj je uzorak razrijeđen 10 puta do 250 μL i koncentracije cDNA od 1,25 ng/μL. Potom je pripremljeno pet serijskih razrjeđenja, pri čemu je svaki uzorak standarda razrijeđen četiri puta u odnosu na prethodni.

4.4.4. Analiza ekspresije miRNA s pomoću proba TaqMan

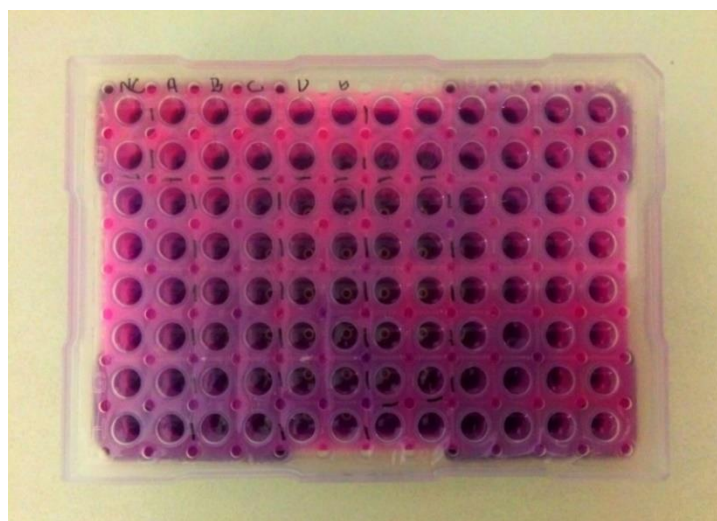
Probe TaqMan MGB (engl. *minor groove binder*) upotrebljavaju se za analizu ekspresije miRNA tijekom PCR reakcije. TaqMan probe na 5' kraju imaju vezanu fluorescentnu boju, a na 3' kraju nefluorescentni utišavač (engl. *quencher*) koji apsorbira fluorescentno zračenje s 5' kraja probe te MGB koji povećava temperaturu taljenja i omogućuje primjenu kraćih proba. Upotreba takvih proba omogućuje smanjenje pozadinskog signala, povećanje osjetljivosti i precizniju kvantifikaciju. Tijekom reakcije PCR dolazi do vezanja početnica na komplementarne sekvencije vodećeg i tromog lanca cDNA kalupa. Probe TaqMan MGB specifično se vežu na sekvencu između početnica. Tijekom polimerizacije DNA polimeraza cijepa samo one MGB probe koje su se vezale na ciljane sekvencu te dolazi do odvajanja fluorescentno obilježenih krajeva probe TaqMan, pri čemu dolazi do povećanja fluorescentnog signala koji se mjeri na kraju svakog PCR ciklusa.

Postupak:

Za amplifikaciju specifičnih cDNA primijenjen je komercijalni komplet TaqMan Advanced miRNA Assay i TaqMan Fast Advanced Master Mix. Reakcija je provedena u ukupnom volumenu od 20 μ L po jažici mikrotitarske ploče; 15 μ L reakcijske smjese PCR i 5 μ L cDNA razrijeđene u omjeru 1 : 10. Mikrotitarska ploča (slika 6.) potom je centrifugirana 1 min na 3000 okretaja u minuti. U računalnom programu definirani su uvjeti reakcije PCR. Amplifikacija cDNA provedena je na uređaju QuantStudio 5 prema unaprijed zadanim uvjetima (tablica 2.). Analiza ekspresije hsa-miR-301a-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106a-5p i hsa-let7a-5p učinjena je u odnosu na ekspresiju referentne hsa-miR-192-5p. Svi uzorci analizirani su u triplikatu.

Tablica 2. Uvjeti za qRT-PCR

	Temperatura (°C)	Vrijeme (s)	Broj ciklusa
Aktivacija enzima	95	20	1
Denaturacija	95	1	
Spajanje lanaca / produžavanje	60	20	40



Slika 6. Mikrotitarska ploča

4.4.5. Relativna kvantifikacija metodom $\Delta\Delta Ct$

Za relativnu kvantifikaciju miRNA ekspresije primijenjena je metoda $\Delta\Delta Ct$ (73). Komparativna ili metoda $\Delta\Delta Ct$ oslanja se na izravnu usporedbu Ct vrijednosti izmjerenih amplifikacijom ciljne i referentne miRNA u istom uzorku. Odabir referentne miRNA kontrole učinjen je na temelju analize stabilnosti ekspresije dviju microRNA primjenom algoritma NormFinder. U odnosu na hsa-miR-345-5p ($M = 0,012$; $SD \pm 1,03$), hsa-miR-195-5p pokazala je niže vrijednosti koeficijenta stabilnosti ($M = 0,011$) i manju intergrupnu varijabilnost ($SD \pm 0,78$) te je stoga izabrana za endogenu kontrolu. U svakom uzorku zatim je provedena qPCR amplifikacija cDNA sekvencija ciljne i referentne miRNA te su dobivene Ct vrijednosti ciljne miRNA normalizirane u odnosu na Ct vrijednosti hsa-miR-192-5p.

Postupak:

Ct vrijednosti referentne hsa-miR-192-5p i ciljanih hsa-miR-20a-5p, hsa-let7a-5p, hsa-miR-106a-5p i hsa-miR-301a-3p, dobivene tijekom reakcije qPCR upotrijebljene su za analizu razlike u ekspresiji ispitivanih miRNA kontrolnih i HT uzoraka metodom $\Delta\Delta Ct$.

Ct vrijednosti ispitivanih miRNA normalizirane su u odnosu na Ct vrijednosti referentne hsa-miR-192 za svaki HT i kontrolni uzorak, prema sljedećim formulama:

$$\Delta CT (\text{uzorak}) = \Delta CT (\text{ciljna miRNA}) - \Delta CT (\text{referentna miRNA})$$

$$\Delta CT (\text{kontrola}) = \Delta CT (\text{ciljna miRNA}) - \Delta CT (\text{referentna miRNA})$$

Potom je za svaki uzorak određena vrijednost $\Delta\Delta CT$. Ona se izračunava oduzimanjem ΔCT vrijednosti kontrolnog uzorka od ΔCT vrijednosti ispitivanog uzorka prema formuli:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{uzorak}) - \Delta CT (\text{kontrola})$$

U sljedećem se koraku izračunava normalizirana ekspresija ciljnih miRNA s pomoću formule:

$$\text{Normalizirana razina ekspresije gena u uzorku} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Usporedbom normaliziranih vrijednosti određene su razlike u razini ekspresije miRNA između HYPO HT, SUBST HT, EU HT i kontrolne skupine ispitanika.

4.4.6. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu rezultata primijenjen je računalni program NCSS2007 (v07.1.20, NCSS LLC, Kaysville, Utah, USA). Nominalne varijable prikazane su apsolutnim frekvencijama i proporcijama. Omjerne varijable opisane su medijanom s interkvartilnim rasponom. Normalnost distribucije i homogenost varijanci procijenjene su testovima Anderson-Darling i Levene. Za testiranje razlika neovisnih skupina primijenjeni su testovi Fisher exact, Freeman-Halton, Mann-Whitney i Kruskal-Wallis s *post-hoc* poredbom Bonferroni-Dunn, prema mjernoj skali. Povezanost kontinuiranih varijabli procijenjena je neparametrijskim Spearmanovim testom korelacije rangova. Ako nije drugačije navedeno, dvostrani $P < 0,05$ predstavlja prag značajnosti.

5. REZULTATI

5.1. OPĆA DESKRIPTIVNA ANALIZA ISPITANIKA

U svrhu analize uloge hsa-let7a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106a-5p te hsa-miR-301a-3p u razvoju Hashimotove bolesti, ispitivani su njihovi ekspresijski profili u tri skupine ispitanika koji su klasificirani kao eutiroidni HT (EU HT, n = 11), subklinički, neliječeni (HYPO HT, n = 10) i hipotiroidni, liječeni (SUBST HT, n = 12) bolesnici te kontrolna skupina zdravih ispitanika (CTRL, n = 13).

Demografska i klinička obilježja opisana su medijanom s interkvartilnim rasponom (tablica 3.). Za statističku analizu podataka primijenjene su neparametrijske metode. Znatne razlike u dobi između ispitivanih skupina nisu zabilježene, ali su u hipotiroidnih liječenih ispitanika primijećene znatno manje vrijednosti volumena štitnjače [median (IQR) 11 (7,7 – 13,4), $P < 0,05$] u odnosu na zdrave ispitanike [12,2 (10,5 – 13)].

Tablica 3. Demografska i klinička obilježja ispitanika

Skupina	N	Dob (god)	Volumen (mL)
HYPO HT	10	51 (42 – 64)*	15,6 (12,1 – 19,4)
SUBST HT**	12	61 (56 – 64)	11 (7,7 – 13,4) ^a
EU HT	11	54 (39 – 60)	15 (13,5 – 20,6)
CTRL	13	47 (40 – 60)	12,2 (10,5 – 13)
KRUSKAL- WALLIS, P		0,106	0,0042

^a $P < 0,05$ vs EU HT, Bonferroni-Dunn *post-hoc* test

* medijan (interkvartilni raspon)

** LT4 doza = 1,16 (0,96 – 1,3) $\mu\text{g/kg}$

U tablici 4. opisana su biokemijska obilježja ispitanika, koja uključuju razine FT4, FT3, TSH i TPOAb. Razina FT3 hormona ne razlikuje se među skupinama, a protutijela TPOAb prisutna su u svih oboljelih ispitanika. Ispitanici hipotiroidnog statusa na hormonskoj terapiji pokazuju značajno više serumske razine FT4 u odnosu na eutiroidne i hipotiroidne, neliječene ispitanike, u kojih su pak zabilježene najviše vrijednosti serumskog TSH-a.

Tablica 4. Biokemijska obilježja ispitanika

Skupina	FT4 (pmol/l)	FT3 (pmol/l)	TSH (mIU/l)	TPOAb (kIU/l)
HYPO HT	11,3 (10,5 – 12) *	2,9 (2,3 – 3,2)	9,6 (5,6 – 13,1) ^{a,d}	324 (77 – 1434)
SUBST HT**	14,2 (12,1 – 17,6) ^{b,c}	3,1 (2,6 – 3,6)	2,6 (1,5 – 3,5) ^c	480 (131 – 1267)
EU HT	11,5 (11,3 – 12)	2,6 (2,2 – 3,2)	3,3 (1,5 – 4,3)	695 (176 – 3000)
CTRL	12,4 (10,7 – 12,7)	3,2 (2,7 – 3,6)	1,6 (1, – 2,52)	neg
KRUSKAL- WALLIS, P	3,5 x 10 ⁻⁴	0,224	7 x 10 ⁻⁶	-

^a P < 0,05 vs EU HT, Bonferroni-Dunn *post-hoc* test

^b P < 0,01 vs EU HT, Bonferroni-Dunn *post-hoc* test

^c P < 10⁻³ vs HYPO HT, Bonferroni-Dunn *post-hoc* test

^d P < 10⁻⁵ vs CTRL, Bonferroni-Dunn *post-hoc* test

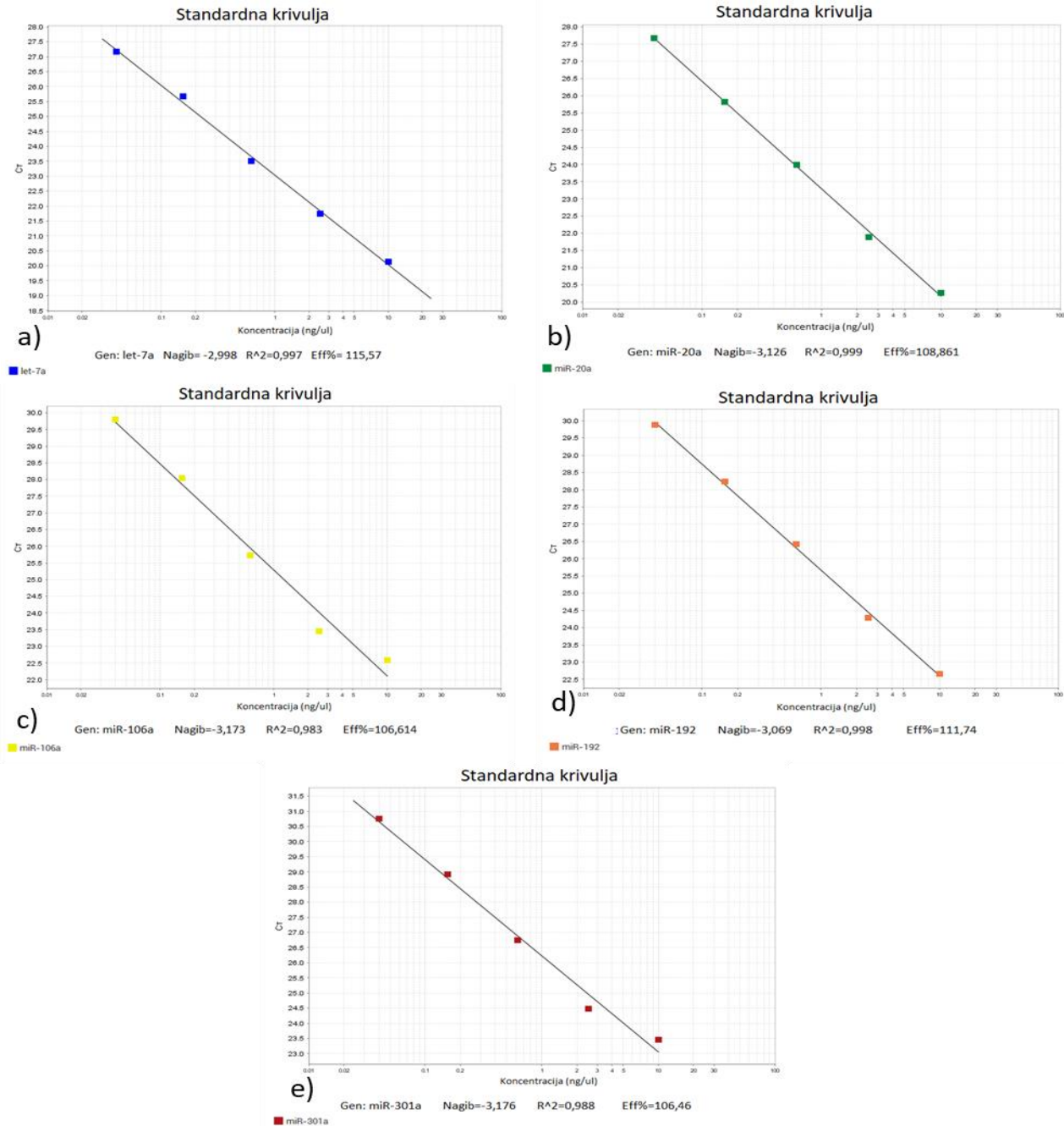
* medijan (interkvartilni raspon)

** LT4 doza = 1,16 (0,96 – 1,3) µg/kg

5.2. Pokazatelji učinkovitosti i preciznosti RT-qPCR reakcija

Učinkovitost amplifikacije ispitivanih microRNA procijenjena je mjerenjem Ct vrijednosti pet točaka serijskog razrjeđenja u duplikatu. Svi ispitivani kompleti početnica i proba TaqMan pokazali su visoku stopu učinkovitosti amplifikacije cDNA kalupa u rasponu od 98 do 115 %. Za procjenu preciznosti qPCR mjerenja određene su vrijednosti linearnog korelacijskog koeficijenta (R^2), koji opisuje veličinu podudarnosti očekivanih i izmjerenih vrijednosti fluorescencije u svih pet točaka standardne krivulje. Što je vrijednost R^2 bliže 1, to je slaganje između izmjerenih i modelom predviđenih Ct vrijednosti jače, a pouzdanost predviđanja koncentracije cDNA na temelju izmjerenih vrijednosti fluorescencije veća. U svim qPCR reakcijama zabilježene su visoke vrijednosti R^2 u rasponu od 0,988 do 0,999 (slika 7.).

Učinjena je i analiza varijabilnosti Ct mjerenja standardnih serijskih razrjeđenja izmjerenih unutar jednog (engl. *intra-assay*) ili više (engl. *inter-assay*) qPCR eksperimenata za svaki komplet proba i početnica TaqMan. Varijabilnost Ct mjerenja unutar pojedinačnog qPCR testiranja bila je manja od 1,03 %, a između dva qPCR mjerenja manja od 1,21 % za sve osim za hsa-let7-5p transkripte (1,44 % intra i 2,33 % inter-test varijabilnost).



Slika 7. Standardne krivulje hsa-let7a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-301a-3p i hsa-miR-192-5p kompleta TaqMan Advanced miRNA. Učinkovitost (Eff%) i preciznost (R^2) a) hsa-let7a-5p, b) hsa-miR-20a-5p, c) hsa-miR-106a-5p, d) hsa-miR-301a-3p i e) hsa-miR-192-5p qPCR eksperimenata utvrđena je qPCR analizom pet standardnih uzoraka pripremljenih nizom serijskih razrjeđenja u omjeru 1 : 4. Analiza rezultata provedena je računalnim programom QuantStudio Design & Analysis v1.4.3.

5.3. Ekspresijski profili hsa-let7a-5p, hsa-mir-20a-5p, hsa-mir-106a-5p te hsa-mir-301a-3p

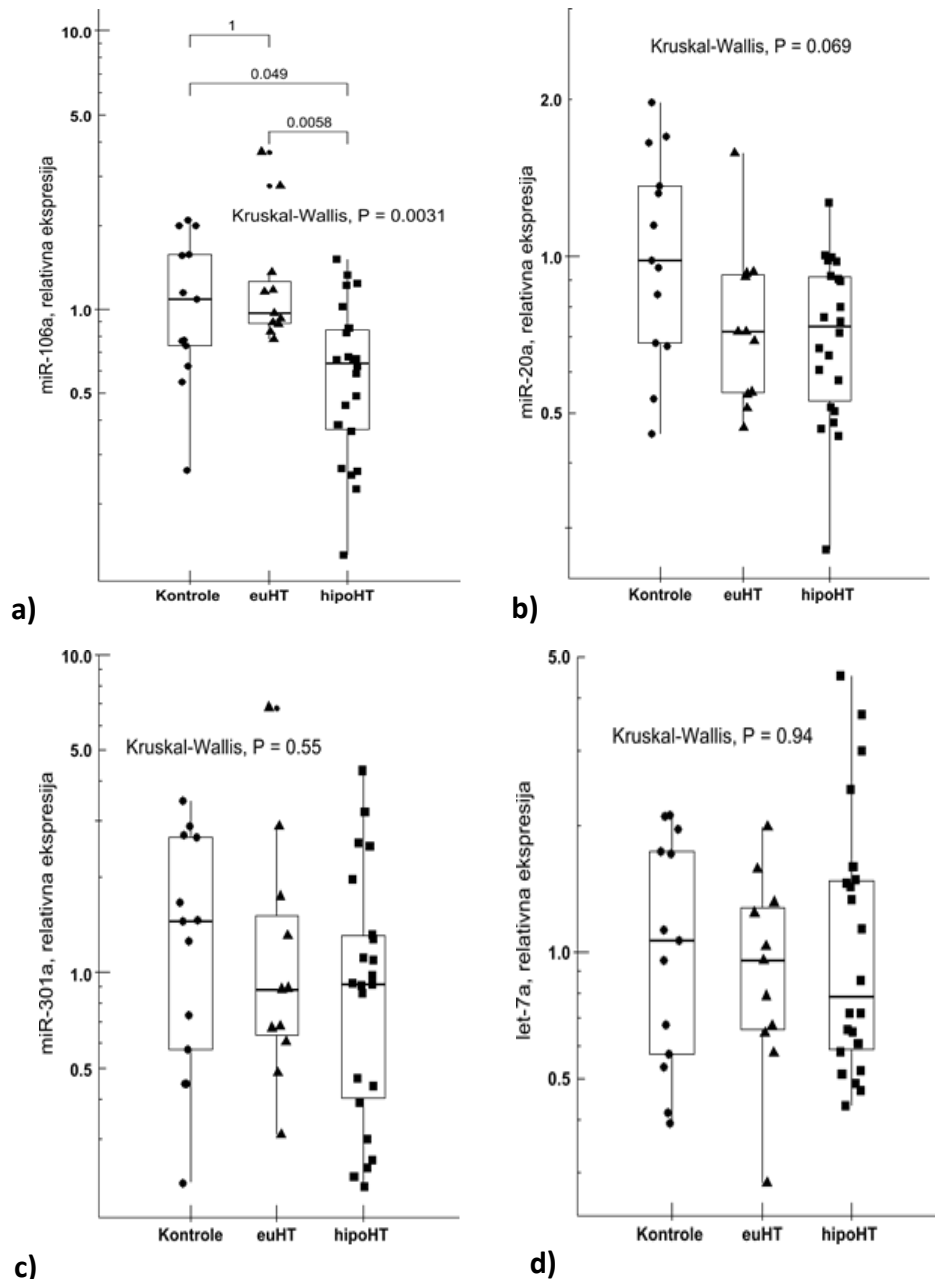
Rezultati analize ekspresijskih profila microRNA hsa-let7a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106a-5p te hsa-miR-301a-3p izmjereni u kontrolnih (CTRL), eutiroidnih (euHT) i hipotiroidnih (hipoHT; liječeni + neliječeni) ispitanika prikazani su na slici 8.

U odnosu na euHT skupinu ispitanika [median (IQR); $M_e = 0,97$ (0,88 – 1,36)], T-limfociti hipotiroidnih ispitanika pokazuju statistički značajno nižu vrijednost ekspresije hsa-miR-106a-5p [$M_e = 0,64$ (0,34 – 1,89); $P = 0,0058$]. Također, zabilježena je statistički značajna razlika u ekspresiji hsa-miR-106a-5p između hipotiroidnih i kontrolnih ispitanika [CTRL vs hipoHT; $M_e = 1,08$ (0,68 – 1,78) vs $M_e = 0,64$ (0,34 – 1,89); $P = 0,049$]. S druge strane, razlika između euHT i kontrolne grupe nije uočena (slika 8.a).

Sličan trend hsa-miR-20a-5p ekspresije zabilježen je usporedbom kontrolnih, eutiroidnih i hipotiroidnih ispitanika, ali statistički značajne razlike ($P=0,069$) među skupinama hipoHT [median (IQR); 0,73 (0,51 – 0,93)], euHT [0,72 (0,54 – 0,93)] i CTRL [0,98 (0,68 – 1,51)] nisu zabilježene ($P = 0,069$) (slika 8.b).

Također, nisu uočene statistički značajne razlike ($P=0,55$) u ekspresiji hsa-miR-301a-3p između kontrolne [median (IQR); 1,44 (0,51 – 2,69)], euHT [0,88 (0,61 – 1,73)] i hipoHT [0,92 (0,37 – 1,48)] skupine ispitanika (slika 8.c).

U konačnici, analizom ekspresije hsa-let7a-5p uočeno je da ne postoji statistički značajna razlika ($P = 0,94$) između kontrolnih [median (IQR); 1,06 (0,55 – 1,85)], euHT [0,96 (0,64 – 1,31)] i hipoHT [0,79 (0,57 – 1,51)] ispitanika (slika 8.d).



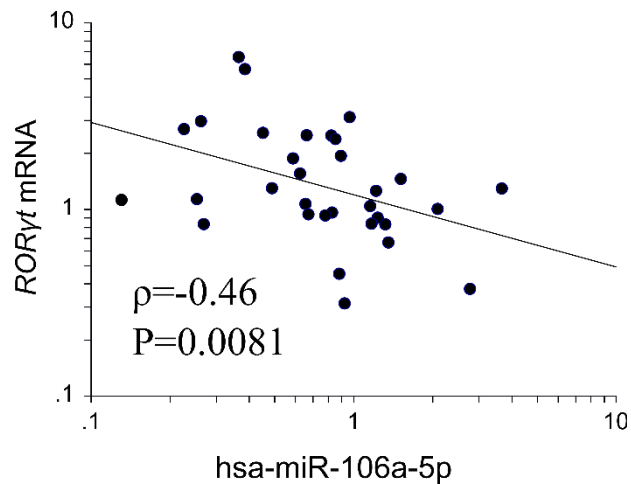
Slika 8. Relativna ekspresija hsa-let7a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-106a-5p te hsa-miR-301a-3p u T-limfocitima periferne krvi zdravih eutiroidnih i hipotiroidnih ispitanika.

Ekspresija a) hsa-miR-106a-5p, b) hsa-miR-20a-5p, c) hsa-miR-301a-3p i d) hsa-let7a-5p u 13 zdravih, 22 hipoHT i u 11 euHT ispitanika izmjerena je metodom qRT-PCR. Unutar pravokutnog ili box-plot dijagrama, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju 1.5xIQR. Razlike između skupina utvrđene su usporedbom normaliziranih vrijednosti ekspresije ispitivanih microRNA metodom $\Delta\Delta C_t$ i primjenom Kruskal-Wallis i Bonferroni-Dunn *post-hoc* testa uz prag značajnosti $P < 0,05$.

5.4. Korelacijska analiza kliničkih obilježja i ekspresijskog profila microRNA

Povezanost ekspresijskih profila ispitivanih microRNA molekula hsa-let7a-5p, hsa-miR-20a-5p i hsa-miR-301a-3p s dobi, volumenom štitnjače, serumskom razinom FT3, FT4, TSH i dozom nadomjesne terapije L-tiroksinom nije zabilježena.

Međutim, utvrđena je inverzna korelacija između ROR γ t mRNA i razine hsa-miR-106a-5p ekspresije u perifernim T-limfocitima liječenih i neliječenih hipotiroidnih HT ispitanika (slika 9.).



Slika 9. Razina ekspresije gena *RORC* negativno korelira s razinom hsa-miR-106-5p ekspresije u T-limfocitima HT ispitanika (n=32; liječeni + neliječeni hipotiroidni HT ispitanici, log-log prikaz). ρ – Spearmanov korelacijski koeficijent; prag značajnosti $P < 0,05$

6. RASPRAVA

U okviru ovog istraživanja ispitivana je ekspresija hsa-let7a-5p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-301a-3p i hsa-miR-106a-5p u perifernim T-limfocitima oboljelih od Hashimotove bolesti i zdravih ispitanika, a u svrhu utvrđivanja njihovih transkripcijskih profila te povezanosti promjena u ekspresiji microRNA s dobi ispitanika, volumenom štitnjače, serumskom razinom hormona TSH, FT3, FT4 i anti-TPO te nadomjesnom hormonskom terapijom liječenih ispitanika.

Biokemijska i klinička obilježja HT i kontrolnih ispitanika odgovaraju očekivanim razlikama serumskih vrijednosti hormona štitnjače i hipofize koje se razvijaju uslijed pojave Hashimotove bolesti (8,74). U skladu s navedenim, u skupini eutiroidnih HT ispitanika zabilježene su normalne razine hormona TSH i FT4 u serumu. S druge strane, u skupini hipotiroidnih neliječenih ispitanika utvrđene su znatno povišene vrijednosti TSH-a u odnosu na kontrolnu skupinu i skupinu eutiroidnih HT ispitanika. Razina FT4 u serumu liječenih hipotiroidnih ispitanika viša je u odnosu na razine u serumu eutiroidnih i hipotiroidnih neliječenih ispitanika, moguće zbog primjene nadomjesne terapije L-T4 potrebne za normalizaciju TSH-a u serumu. Protutijela TPOAb pronađena su u sve tri skupine oboljelih ispitanika.

Rezultati analize ekspresije ispitivanih microRNA pokazali su znatno nižu ekspresiju hsa-miR-106a-5p u skupini hipotiroidnih bolesnika u odnosu na eutiroidne i zdrave ispitanike (slika 8.a). Također, zabilježena je inverzna korelacija između razine ekspresije mRNA $ROR\gamma t$ i hsa-miR-106a-5p u T-limfocitima periferne krvi liječenih i neliječenih hipotiroidnih HT ispitanika (slika 9.). Zabilježeni inverzni obrasci ekspresije *RORC* i hsa-miR-106a-5p potvrđuju ranije opisanu supresivnu ulogu hsa-miR-106a-5p u diferencijaciji pomoćničkih i citotoksičnih limfoidnih linija tipa 17 (68). Suprotno, transkripcijski čimbenik $ROR\gamma t$ dobro je definirani pozitivni regulator fenotipa i funkcije limfocita Th17 (39), čija je povećana brojnost ranije opisana u perifernoj krvi i tkivu štitnjače oboljelih od HT-a. Budući da limfociti Th17 sudjeluju u patogenezi različitih upalnih i autoimunih bolesti (22,23), povećana ekspresija $ROR\gamma t$ često se povezuje s nekontroliranom diferencijacijom $CD4^+IL-17^+$ i $CD8^+IL-17^+$ stanica te pojavom autoimunosti (40). Rezultati našeg istraživanja ukazuju pak na mogućnost da u pozadini razvoja

nekontroliranog imunosnog odgovora tipa 17 u HT-u stoji poremećena ekspresija regulatornih microRNA molekula, posebice hsa-miR-106a-5p, ali i drugih članova obitelji miR-17, poput miR-20a paraloga koji zajedno s miR-106a ciljano veže slične 3'UTR vezujuće sekvence (75). U tom kontekstu, zabilježeni trend miR-20a-5p ekspresije, nalik ekspresiji miR-106a-5p, potencijalno ukazuje na patogeni ulogu obitelji microRNA miR-17 u razvoju HT-a.

Zanimljivo, snižena razina miR-106a i povišena ekspresija ROR γ t u stanicama CD4⁺ zabilježena je u aktivnoj fazi multiple skleroze u odnosu na kontrolnu, zdravu skupinu i na skupinu ispitanika kod kojih je bolest bila u fazi mirovanja (68). Suprotno, povišena ekspresija miR-106a-5p pronađena je u krvi bolesnika oboljelih od Crohnove bolesti (76) te u kožnim lezijama oboljelih od psorijaze (77).

Osim ROR γ t, miR-106a sudjeluje i u regulaciji RUNX3 transkripcijskog čimbenika, koji u sinergiji s T-bet stimulira ekspresiju INF- γ i time stabilizira efektorski fenotip i promovira razvoj Tc1 efektorske loze. U tom kontekstu snižena ekspresija miR-106a u T-limfocitima HT ispitanika ima potencijalno pozitivan učinak na ekspresiju RUNX3 i ekspanziju izvršnih citotoksičnih Tc1 limfocita koji sudjeluju u razaranju stanica štitnjače citokinskom ozljedom i apoptozom. Slični regulacijski obrasci T-limfocita na razini microRNA ranije su opisani na primjeru hsa-miR-29a-3p, snažnoga negativnog regulatora ekspresije gena *T-bet* i *EOMES*. Naime, u oboljelih od HT-a uočena je povezanost snižene ekspresije miR-29a-3p s povišenim vrijednostima serumskog TSH-a, sniženim vrijednostima hormona FT4 i smanjenim volumenom štitnjače u neliječenih hipotiroidnih HT ispitanika (78). Naši rezultati potvrđuju ulogu gubitka kontrolnih mehanizama na relaciji miRNA – mRNA te zajedno s ranije zabilježenim obrascima povišene ekspresije gena *RORC* i *RUNX3* (79) ukazuju na potencijalno važnu supresivnu funkciju hsa-miR-106a-5p u razvoju patogenoga autoimunog odgovora u HT-u.

S druge strane, ekspresija hsa-let7a-5p i hsa-miR-301a-3p nije se znatno razlikovala u hipotiroidnih, eutiroidnih i zdravih ispitanika.

Hsa-miR-301a-3p djeluje kao pozitivan regulator razvoja i funkcije limfocita Th17. Naime, hsa-miR-301a-3p direktno suprimira ekspresiju PIAS3, snažanog inhibitora STAT3 signalnog puta, te time indirektno potiče diferencijaciju Th17/Tc17 limfocita i povećanu sintezu upalnih citokina koji obilježavaju upalni imunski odgovor tipa 17 (51).

Istodobno, hsa-miR-301a-3p djeluje kao negativan regulator ekspresije transkripcijskog čimbenika RUNX3 i potencijalno inhibira razvoj efektorskih limfocita Tc1. Preciznije, hsa-miR-301a-3p direktno veže 3'UTR sekvence RUNX3 mRNA te smanjuje ekspresiju transkripcijskog čimbenika RUNX3 (80), čime posredno suprimira razvoj i citolitički kapacitet CTL stanica (32). Zanimljivo je da obje microRNA, hsa-miR-106a-5p (81) i hsa-miR-301a-3p (80), posreduju supresivne učinke u regulaciji razvoja Tc1 stanica inhibicijom ekspresije gena *RUNX3*, ali imaju suprotnu ulogu u razvoju limfocita Th17. Naime, za razliku od hsa-miR-106a-5p koja direktno suprimira ekspresiju transkripcijskog čimbenika ROR γ t i time inhibira razvoj limfocita Th17/Tc17, hsa-miR-301a-3p djeluje kao indirektni pozitivni regulator signalnog puta STAT3 koji potiče razvoj tipa 17 imunskog odgovora. Moguće je da izostanak znatne razlike u ekspresiji hsa-miR-301a-3p stoga ukazuje na manju ulogu indirektno regulacije STAT3 ekspresije u razvoju autoimunog odgovora u HT-u u odnosu na posljedice koje potencijalno izaziva gubitak direktnih inhibitornih učinaka miR-106a-5p.

Nadalje, usporedbom hipotiroidnih, eutiroidnih i zdravih ispitanika također nije zabilježena statistički značajna razlika u ekspresiji hsa-let-7a-5p u perifernim T-limfocitima. Osim hsa-let-7a, poznata je uloga i drugih članova obitelji let-7 u regulaciji staničnog ciklusa, metabolizmu, diferencijaciji i funkciji NKT (51), CD4⁺ (52) i CD8⁺ T-limfocita. Primjerice, let-7e spominje se kao negativan regulator ekspresije protuupalnog citokina IL-10 (82), a let-7f kao inhibitor ekspresije IL-23R, važnoga površinskog biljega Th17/Tc17 limfocita (83). Povećana ekspresija članova miRNA obitelji let-7 također se povezuje s inhibicijom ekspresije transkripcijskog čimbenika PLZF, ključnog regulatora razvoja stanica prirodene imunosti (42). PLZF upravlja diferencijacijom stanica iNKT, čija je uloga u razvoju HT bolesti nedavno opisana (42). Visoka razina ekspresije PLZF karakterizira i MAIT stanice te CD161^{hi} $\gamma\delta$ T-limfocite, koji također pripadaju stanicama prirodene imunosti. U nedostatku ekspresije PLZF iNKT, MAIT i $\gamma\delta$ T stanice gube sposobnost izvršnog djelovanja, što potvrđuje važnost uloge transkripcijskog čimbenika PLZF u razvoju stanica prirodene imunosti (42).

Osim transkripcijskog čimbenika PLZF, miRNA let-7 suprimira i ekspresiju gena *EOMES* i time negativno regulira diferencijaciju, razvoj citotoksičnog kapaciteta i memorijskog fenotipa CTL limfocita. Međutim, tijekom aktivacije, vezanjem antigena za T-stanični receptor dolazi do

redukcije ekspresije miRNA let-7, čime se pospješuje klonalna proliferacija i diferencijacija aktiviranih CD8⁺ limfocitnih linija (53).

U oboljelih od HT-a do danas je zabilježena povećana ekspresija gena *ZBTB16* (79) i *EOMES* (17) koji se nalaze pod direktnom kontrolom obitelji let-7 microRNA. Također, opisana je povećana razina varijante let-7e, koja se povezuje sa smanjenom ekspresijom protuupalnog citokina IL-10, odnosno let-7f, koja inhibira ekspresiju IL-23R. Navedeni rezultati ukazuju na važnu ulogu prirodnih i efektorsko/memorijskih T-staničnih linija u razvoju Hashimotova tireoiditisa, čije djelovanje potencijalno selektivno reguliraju specifične varijante obitelji let-7 microRNA. Izostanak znatne razlike u ekspresiji let-7a stoga ukazuje na manju ulogu ove varijante let-7 microRNA u regulaciji gena *EOMES* i *ZBTB16* te naglašava potrebu za analizom drugih članova obitelji let-7a u kontekstu Hashimotova tireoiditisa.

7. ZAKLJUČAK

- U odnosu na eutiroidne i zdrave ispitanike, periferni T-limfociti hipotiroidnih ispitanika pokazuju znatno snižene razine hsa-miR-106a microRNA.
- Snižena ekspresija hsa-miR-106a-5p povezana je s povećanom razinom RORC mRNA u T-limfocitima hipotiroidnih ispitanika.
- Moguće je da poremećeni ekspresijski obrasci na relaciji hsa-miR-106a-5p/*RORC* imaju ulogu u razvoju nekontroliranoga imunskog odgovora tipa 17 u Hashimotovoj bolesti.

8. SAŽETAK

Uvod: Hashimotova je bolest kronična autoimuna bolest koju obilježava pojava autoreaktivnih limfocita i antitireoidnih protutijela koji združenim djelovanjem uzrokuju postupno oštećenje štitnjače. Znatan udio limfocitnog infiltrata u štitnjači čine $CD4^+$ i $CD8^+$ T-limfociti, čiji se razvoj, diferencijacija i funkcija nalaze pod kontrolom malih nekodirajućih microRNA molekula, hsa-let7a, hsa-miR-20a, hsa-miR-106a i hsa-miR-301a.

Cilj istraživanja: Ispitati transkripcijske profile hsa-let7a, hsa-miR-20a, hsa-miR-106a i hsa-miR-301a u T-limfocitima periferne krvi oboljelih od Hashimotove bolesti te ustanoviti njihovu povezanost s dobi, volumenom štitnjače, serumskom razinom hormona TSH, FT3 i FT4, anti-TPO i nadomjesnom terapijom L-T4.

Materijali i metode: Istraživanjem su obuhvaćeni uzorci RNA izolirani iz perifernih T-limfocita 13 kontrolnih ispitanika i 33 ispitanika oboljela od HT-a. Sinteza cDNA provedena je pomoću komercijalnog kompleta „TaqMan Advanced microRNA cDNA Synthesis Kit“. Kvantitativna analiza ekspresije microRNA provedena je na uređaju QuantStudio5 lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR) upotrebom TaqMan Advanced miRNA proba i početnica.

Rezultati: U odnosu na eutiroidne i zdrave ispitanike, T-limfociti hipotiroidnih ispitanika pokazuju znatno sniženu ekspresiju microRNA hsa-miR-106a-5p. Štoviše, snižena ekspresija hsa-miR-106a-5p korelira s povećanom ekspresijom gena *RORC* u liječenih i neliječenih hipotiroidnih ispitanika.

Zaključak: Moguće je da poremećeni ekspresijski obrasci na relaciji hsa-miR-106a-5p/*RORC* imaju ulogu u razvoju nekontroliranoga imunosnog odgovora tipa 17 u Hashimotovoj bolesti.

Ključne riječi: Hashimotov tireoiditis, miR-106a, miR-let7, miR-20a, miR-301a

9. SUMMARY

Introduction: Hashimoto's disease is a chronic, autoimmune disease characterized by the appearance of autoreactive lymphocytes and anti-thyroid antibodies, which mediate progressive thyroid destruction. A significant proportion of the lymphocytic thyroid infiltrate consists of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, whose development, differentiation and function are controlled by small non-coding microRNA molecules, hsa-let7a, hsa-miR-20a, hsa-miR-106a and hsa-miR-301a.

Study aim: To examine transcriptional profiles of hsa-let7a, hsa-miR-20a, hsa-miR-106a and hsa-miR-301a in peripheral blood T lymphocytes of HT patients and to determine their association with age, thyroid volume, levels of TSH, FT3, FT4 and anti-TPO in serum samples and replacement L-T4 therapy.

Material and methods: The study included a collection of archive RNA samples isolated from peripheral blood T lymphocytes of 13 healthy controls and 33 HT patients. The cDNA synthesis was performed with use of TaqMan Advanced microRNA cDNA Synthesis Kit, whereas miRNA expression levels were assessed by quantitative real-time PCR reaction (qRT-PCR) in a Quant Studio 5 instrument using TaqMan Advanced miRNA expression assays.

Results: Compared to euthyroid patients and healthy controls, peripheral blood T lymphocytes of hypothyroid subjects exhibit a significantly lower hsa-miR-106a-5p expression. Moreover, decreased hsa-miR-106a-5p expression correlates with the increased *RORC* gene expression in treated and untreated hypothyroid patients.

Conclusion: Dysregulated hsa-miR-106a-5p/*RORC* circuit potentially play a role in the development of an uncontrolled type 17 immune response in Hashimoto's disease.

Key words: Hashimoto's thyroiditis, miR-106a, miR-let7, miR-20a, miR-301a

10. LITERATURA

1. Tomer Y. Mechanisms of autoimmune thyroid diseases: from genetics to epigenetics. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:147-156.
2. Hall J. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 12. izd. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2011.
3. Murray R, Bender D, Botham K, Kennelly P, Rodwell V, Weil P. Harperova ilustrirana biokemija. 28.izd. Zagreb. Medicinska naklada. 2011.
4. Shahid MA, Sharma S. Physiology, Thyroid, Hormone. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018.
5. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine. 18. izd. McGraw-Hill Professional; 2011.
6. Stassi G, De Maria R. Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(3):195-204.
7. Hiromatsu Y, Satoh H, Amino N. Hashimoto's Thyroiditis: History and Future Outlook. *Hormones.* 2013;12(1):12-18.
8. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease. Hashimoto's disease. Dostupno na adresi: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/endocrine-diseases/hashimotos-disease>. Datum pristupa: 15.03.2019.
9. Pyzik A, Grywalska E, Matyjaszek-Matuszek B, Rolinski J. Immune Disorders in Hashimoto's Thyroiditis: What Do We Know So Far?. *J Immunol Res.*2015; Article ID 979167, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/979167s>
10. Chistiakov DA. Immunogenetics of Hashimoto's thyroiditis. *J Autoimmune Dis.* 2005; 2(1):1.
11. Akamizu T, Amino N. Hashimoto's Thyroiditis. *Endotext.* 2017; Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285557/>. Datum pristupa: 27.10.2018.

12. Hall R, Stanbury JB. Familial studies of autoimmune thyroiditis. *Clin. Exp. Immunol.* 1967;2:719-725.
13. Villanueva R, Greenberg TF, Tomer Y. Sibling Recurrence Risk in Autoimmune Thyroid Disease. *Thyroid.* 2004; 13(8):761-764.
14. Brix TH, Kyvik KO, Hegedüs L. A population-based study of chronic autoimmune hypothyroidism in Danish twins. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2000; 85: 536-539.
15. Effriamidis G, Wiersinga WM. Autoimmune thyroid disease: old and new players. *Eur J Endocrinol.* 2014;170:241-252.
16. Tokić S, Štefanić M, Glavaš-Obrovac Lj, Jaman S, Novosadova E, Petrkova J i sur. The expression of T cell FOXP3 and T-bet is upregulated in severe but not euthyroid Hashimoto's thyroiditis. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:3687420.
17. Štefanić M, Tokić S, Suver Stević M, Glavaš-Obrovac Lj. Association of increased eomesodermin, BCL6, and granzyme B expression with major clinical manifestations of Hashimoto's thyroiditis – an observational study. *Immunol Invest.* 2018;47:279-292.
18. Štefanić M, Tokić S, Suver Stević M, Glavaš-Obrovac Lj. Expression of TIGIT and FCRL3 in T cells from patients with distinct patterns of chronic autoimmune thyroiditis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2018; doi: 10.1055/a-0597-8948.
19. Weetman AP. The Immunopathogenesis of Chronic Autoimmune Thyroiditis One Century after Hashimoto. *Eur Thyroid J.* 2012;1:243-250.
20. Ruggeri RM, Trimarchi F, Giuffrida G, Certo R, Cama E, Campenni A i sur. Autoimmune comorbidities in Hashimoto's thyroiditis: different patterns of association in adulthood and childhood/adolescence. *Eur J Endocrinol.* 2017 Feb;176(2):133-141.
21. Cogni G, Chiovato L. An overview of the pathogenesis of thyroid autoimmunity. *Hormones.* 2013;12(1):19-29.

22. Figueroa-Vega N, Alfonso-Perez M, Benedicto I, Sanchez-Madrid F, Gonzalez-Amaro R, Marazuela M. Increased circulating pro-inflammatory cytokines and Th17 lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:953-962.
23. Liu Y, Tang X, Tian J, Zhu C, Peng H, Rui K i sur. Th17/Treg cells imbalance and GITRL in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Int. J. Mol. Sci.* 2014;15:21674-86.
24. Lazarevic V, Glimcher LH, Lord GM. T-bet: a bridge between innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13:777-789.
25. Nanba T, Watanabe M, Inoue N, Iwatani Y. Increases of the Th1/Th2 cell ratio in severe Hashimoto's disease and in the proportion of Th17 cells in intractable Graves' disease," *Thyroid*, 2009; 495–501.
26. Inoue N, Watanabe M, Morita M, Tomizawa R, Akamizu T, Tatsumi K i sur. Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol.* 2010;162:402-406.
27. Qin Q, Liu P Liu L, Wand R, Yan N, Yang J. The increased but non-predominant expression of Th17- and Th1-specific cytokines in Hashimoto's thyroiditis but not in Graves' disease. *Braz J Med Biol Res.* 2012;45:1201-1208.
28. Bai X, Sun J, Wang W, Shan Z, Zheng H, Li Y i sur. Increased differentiation of Th22 cells in Hashimoto's thyroiditis. *Endocr J.* 2014;61:1181-1190.
29. Obar JJ, Lefrançois L. Early events governing memory T-cell differentiation, *International Immunology.* 2010; 22(8):619–625.
30. Mittrücker HW, Visekruna A, Huber M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2014;62:449–458.
31. Knox J, Cosma G, Betts MR, McLane LM. Characterization of T-bet and Eomes in peripheral human immune cells. *Front. Immunol.* 2014;5:217.

32. Cruz-Guilloty F, Pipkin ME, Djuretic IM, Levanon D, Lotem J, Lichtenheld MG i sur. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J Exp Med.* 2009;206:51-59.
33. Hedrick SM, Hess Michelini R, Doedens AL, Goldrath AW, Stone EL. FOXO transcription factors throughout T cell biology. *Nat Rev Immunol.* 2012;12:649-661.
34. Michelini RH, Doedens AL, Goldeath AW, Hedrick SM. Differentiation of CD8 memory T cells depends on Foxo1. *JEM.* 2013;210:1189-1200.
35. Rao RR, Li Q, Gubbel Bup MR, Shrikant PA. Transcription factor Foxo1 represses T-bet-mediated effector functions and promotes memory CD8⁺ T cell differentiation. *Immunity.* 2012;36:374-387.
36. Castro G, Liu X, Ngo K, De Leon-Tabaldo A, Zhao S, Luna-Roman R i sur. ROR γ t and ROR α signature genes in human Th17 cells. *Plos One.* 2017;12(8): e0181868.
37. Ivanov I, Zhoua LR, Littman D. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. *Seminars in Immunology.* 2007;19:409-417.
38. Jetten AM. Retinoid-related orphan receptors (RORs): critical roles in development, immunity, circadian rhythm, and cellular metabolism. *Nucl Recept Signal;*2009:7e 003.
39. Srensthan U, Steel K, Taams LS. IL-17+CD8⁺ Tcells: Differentiation, phenotype and role in inflammatory disease. *Immunol Lett.* 2016;178:20-26.
40. Liu Y, You R, Yu N, Gong Y, Qu C, Zhang Y, i sur. Increased proportions of Tc17 cells and NK cells may be risk factors for disease progression in Hashimoto's thyroiditis. *Int Immunopharmacol.* 2016;40:332-338.
41. Burek CL, Sharma RB, Rose NR. NKT cell regulation of autoimmune thyroiditis. *Autoimmunity.* 2003;36:405-408.
42. Eidson M, Wahlstrom J, Beaulieu AM, Zaidi B, Carsons SE, Crow PK, i sur. Altered Development of NKT Cells, CD T Cells, CD8 T Cells and NK Cells in a PLZF Deficient Patient. *PLoS ONE.* 2011; 6(9): e24441.

43. Qu Z, Li W, Fu B. MicroRNAs in autoimmune diseases. *BioMed Research International*. 2014; Article ID 527895: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/527895>.
44. Hu R, O'Connell RM. MicroRNA control in the development of systemic autoimmunity. *Arthritis Res Ther*. 2013;15:202. doi: 10.1186/ar4131.
45. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, Van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. MiRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acid research*. 2006;34: 140–144.
46. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X i sur. A uniform system for microRNA. 2003;9:277-79.
47. News Medical. MicroRNA Nomenclature. Dostupno na adresi: <https://www.news-medical.net/life-sciences/MicroRNA-Nomenclature.aspx>. Datum pristupa 14.03.2019.
48. MiRBase. What do the miRNA names/identifiers mean?. Dostupno na adresi: <http://www.mirbase.org/help/nomenclature.shtml>. Datum pristupa: 14.03.2019.
49. Simpson LJ, Mark Ansel K. MicroRNA regulation of lymphocyte tolerance and autoimmunity. *J Clin Invest*. 2015;125:2242–2249.
50. Jeker LT, Bluestone JA. MicroRNA regulation of T-cell differentiation and function. *Immunol Rev*. 2013;253:65-81.
51. Amado T, Schmolka N, Metwally H, Silva-Santos B, Gomes AQ. Cross-regulation between cytokine and microRNA pathways in T cells. *Eur J Immunol*. 2015;45:1584–1595.
52. Muljo S, Ansel KM, Kanellopoulou C, Livingston DM, Rao A, Rajewski K. Aberrant T cell differentiation in the absence of Dicer. *J Exp Med*. 2005;202:261-269.
53. Chong MMW, Rasmussen JP, Rudensky AY, Littman DR. The RNaseIII enzyme Drosha is critical in T cells for preventing lethal inflammatory disease. *J Exp Med*. 2008;205: 2005–2017.

54. Zhou X, Jeker LT, Fife BT, Zhu S, Anderson MS, McManus MT i sur. Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J Exp Med*. 2008;205:1938–1991.
55. Koralov SB, Muljo SA, Galler GR, Krek A, Chakraborti T, Kanellopoulou C i sur. Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell*. 2008;132(5):860–874.
56. Ventura A, Young AG, Winslow MM, Lintault L, Meissner A, Erkeland SJ i sur. Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*. 2008;132(5):875–886.
57. Xiao C, Srinivasan L, Calado DP, Petterson HC, Zhang B, Wang J i sur. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol*. 2008;9(4):405–414.
58. Papadopoulou AS, Dooley J, Linterman MA, Pierson W, Ucar O, Kyewski B i sur. The thymic epithelial microRNA network elevates the threshold for infection-associated thymic involution via miR-29a mediated suppression of the IFN- α receptor. *Nat Immunol*. 2011;13(2):181-187.
59. Ucar O, Tykocinski LO, Dooley J, Liston A, Kyewski B. An evolutionarily conserved mutual interdependence between Aire and microRNAs in promiscuous gene expression. *Eur J Immunol*. 2013;43(7):1769–1778.
60. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE i sur. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403:901–906.
61. Pobezinsky LA, Etzensperger R, Jeurling S, Alag A, Kadakia T, McCaughtry TM i sur. Let-7 microRNAs target the lineage-specific transcription factor PLZF to regulate terminal NKT cell differentiation and effector function. *Nature Immunol*. 2015;16:517–524.

62. Swaminathan S, Suzuki K, Seddiki N, Kaplan W, Cowley MJ, Hood CL i sur. Differential regulation of the Let-7 family of microRNAs in CD4⁺ T cells alters IL-10 expression. *J Immunol.* 2012;188:6238–6246.
63. Wells AC, Daniels KA, Angelou CC, Fagerberg E, Burnside AS, Markstein M i sur. Modulation of let-7 miRNAs controls the differentiation of effector CD8 T cells. *Elife.* 2017;6:e26398.
64. Mycko MP, Cichalewska M, Machlanska A, Cwiklinska H, Mariasiewicz M, Selmaj KW. MicroRNA-301a regulation of a T-helper 17 immune response controls autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:E1248–57.
65. Wu T, Wieland A, Araki K, Davis CW, Ye L, Scott Hale J i sur. Temporal expression of microRNA cluster miR-17-92 regulates effector and memory CD8⁺ T-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:9965–9970.
66. Salaun B, Yamamoto T, Badran B, Tsunetsugu-Yokota Y, Roux A, Baitsch L i sur. Differentiation associated regulation of microRNA expression in vivo in huma CD8⁺ T cell subsets. *J Transl Med.* 2011;9:44.
67. Bai X, Han G, Liu Y, Jiang H, He Q. MiRNA-20a-5p promotes the growth of triple-negative breast cancer cells through targeting RUNX3. *Biomed Pharmacother.* 2018;103:1482–1489.
68. Majd M. i sur. MiR-9-5p and miR-106a-5p dysregulated in CD4⁺ T-cells of multiple sclerosis patients and targeted essential factors of T helper17/regulatory T-cells differentiation *Iran J Basic Med Sci* 2018;21:277–283.
69. Skalsky RL, Corcoran DL, Gottwein E, Frank CL, Kand D, Hafner M. The viral and cellular microRNA targetome in lymphoblastoid cell lines. *PLoS Pathog* 8(1): e1002484
70. Štefanić M, Papić S, Suver M, Glavaš-Obrovac Lj, Karner I. Association of vitamin D receptor gene 3'-variants with Hashimoto's thyroiditis in the Croatian population. *Int J Immunogenet.* 2008;35:125–131.

71. Tokić S, Štefanić M, Karner I, Glavaš-Obrovac Lj. Altered expression of CTLA-4, CD28, VDR, and CD45 mRNA in T cells of patients with Hashimoto's thyroiditis –a pilot study. *Endokrynol Pol.* 2017;68:274–282.
72. Štefanić M, Karner I. Thyroid peroxidase autoantibodies are associated with lesser likelihood of late reversion to hyperthyroidism after successful non-ablative treatment of Graves' disease in Croatian patients. *J Endocrinol Invest.* 2014;37:71–77.
73. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and 2- $\Delta\Delta$ CT method. 2001;25:402–408.
74. Shleenkova A, Luta E, Bogun L, Yabluchansky M, Karazin VN. Hypothyroidism & Thyroiditis. National University Medical School' Internal Medicine Dpt. Dostupno na adresi:http://dspace.univer.kharkov.ua/bitstream/123456789/10861/2/Lecture_Hypothyroidism_%26_Thyroiditis.pdf. Datum pristupa: 20.05.2018.
75. Gruszka R, Zakrzewska M. The Oncogenic Relevance of miR-17-92 Cluster and Its Paralogous miR-106b-25 and miR-106a-363 Clusters in Brain Tumors. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3):879. doi:10.3390/ijms19030879.
76. Paraskevi A, Theodoropoulos G, Papaconstantinou I, Mantzaris G, Nikiteas N, Gazouli M. Circulating microRNA in inflammatory bowel disease. *J Chrons Colitis.* 2012;6(9):900–904.
77. Sonkoly E, Wei T, Janson PC, Saaf A, Lundeberg L, Tengvall-Linder M i sur. MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis?. *Plos One.* 2007;2(7):e610.
78. Tokić S, Štefanić M, Glavaš-Obrovac LJ, Kishore A, Navratilova Z, Petrek M. MiR-29a-3p/T-bet Regulatory Circuit Is Altered in T Cells of Patients With Hashimoto's Thyroiditis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:264. doi: 10.3389/fendo.2018.00264.
79. Nedić J. Uloga transkripcijskih čimbenika CD8+ stanične diferencijacije u razvoju Hashimotove bolesti. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2018.

80. Li X, Zhong M, Wang J, Wang L, Lin Z, Cao Z i sur. MiR-301a promotes lung tumorigenesis by suppressing Runx3. *Mol Cancer*. 2019;18:99. doi: 10.1186/s12943-019-1024-0.
81. Zhang Y, Lu Q, Cai X. MicroRNA-106a induces multidrug resistance in gastric cancer by targeting RUNX3. *FEBS Lett*. 2013;587(18):3069–3075.
82. Kagawa T, Watanabe M, Inoue N, Otsu H, Saeki M, Katsumata Y i sur. Increases of microRNA let-7e in peripheral blood mononuclear cells in Hashimoto's disease. *Endocr J*. 2016;63(4):375–380.
83. Li Z, Wu F, Brant SR, Kwon JH. IL-23 receptor regulation by let-7f in human CD4+ memory T cells. *J Immunol*. 2011;186(11):612–690.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Iris Štrbat
Datum rođenja: 4. rujna 1993.
Mjesto rođenja: Zagreb
Adresa: Brune Bušića 28, 10020 Zagreb, Hrvatska
Telefon: 091 409 1993
e-pošta: iris.strbat@gmail.com

OBRAZOVANJE

2016. – ~ Medicinski fakultet u Osijeku; Sveučilišni diplomski studij medicinsko-laboratorijske dijagnostike
2012. – 2016. Zdravstveno veleučilište u Zagrebu, Medicinsko-laboratorijska dijagnostika – stručni studij
2008. – 2012. Prirodoslovna škola Vladimira Preloga – smjer Prirodoslovna gimnazija
2000. – 2008. Osnovna škola „Zaprude” u Zagrebu

RADNO ISKUSTVO

2008. – sezonski rad u parfumeriji Limoni (pomoć prodajnom osoblju u pripremi i slaganju robe i ostalim potrebama maloprodajnog prostora)
2017. – sezonski rad u Financijskoj agenciji (rad u urudžbenom uredu, rad na informacijama)
2018. – sezonski rad u Financijskoj agenciji (rad u centrali)
– sezonski rad u Weitnaueru (deklariranje robe)

2019. – sezonski rad u Weitnaueru (deklariranje robe)

2019. – sezonski rad u banci Raiffeisenbank Austria d.d. (promocija)

KVALIFIKACIJE

JEZICI: Engleski jezik

- prva godina Zdravstvenog veleučilišta, kolegij Engleski jezik
- Prirodoslovna škola Vladimira Preloga
- osnovna škola

Talijanski jezik

- Prirodoslovna škola Vladimira Preloga

VJEŠTINE

Rad na računalu (paket MS Office, internet)

Vozačka dozvola (B kategorija)