

# Raznovrsnost fibroblasta u humanom tkivu štitnjače iz perspektive sekvenciranja jednostanične RNK

---

**Klepić, Nikolina**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*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:152:906179>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Nikolina Klepić**

**RAZNOVRSNOST FIBROBLASTA U  
HUMANOM TKIVU ŠTITNJAČE IZ  
PERSPEKTIVE SEKVENCIRANJA  
JEDNOSTANIČNE RNK**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2023.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Nikolina Klepić**

**RAZNOVRSNOST FIBROBLASTA U  
HUMANOM TKIVU ŠTITNJAČE IZ  
PERSPEKTIVE SEKVENCIRANJA  
JEDNOSTANIČNE RNK**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2023**

Rad je ostvaren u Katedri za nuklearnu medicinu i onkologiju, Medicinski fakultet Osijek.

Mentor rada: izv. prof. dr. sc. Mario Štefanić

Rad ima 33 lista, 3 tablice i 11 slika.

*Veliko hvala mentoru, izv. prof. dr. sc. Mariu Štefaniću, na nesebičnoj pomoći, razumijevanju za moje obiteljske obaveze i posao, trudu i strpljenju tijekom pisanja diplomskog rada.*

*Hvala mojim roditeljima, sestri i bratu koji su me poticali na napredak i bili velika podrška tijekom studiranja. Roditeljima što su uvijek vjerovali u moje mogućnosti, žrtvujući sebe, hrabрили me, poticali i dali neizmjernu snagu te svojim primjerom pokazali da se uspornost i trud uvijek isplate. Sestri s kojom sam oduvijek sve djelila pa tako i ove dane studiranja koje smo zajedno prolazile i koje mi je olakšala svojom pristunošću. Posebno veliko hvala mojoj obitelji, suprugu Vedranu i našoj petogodišnjoj djevojčici Mili, koji su mi bili velika podrška i vjetar u leđa u trenucima kada je bilo teško, bez njih ne bih uspjela. Stoga ovu diplomu posvećujem svojim najbližima, koji su me kroze sve ove dane studiranja hrabрили, tješili i nesebično preuzeli dio mojih obiteljskih obaveza koje zbog čestih odlazaka u Osijek nisam bila u mogućnosti obaviti.*

## SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 1.1. Građa štitnjače .....                           | 1  |
| 1.2. Fibroblasti u zdravlju i bolesti .....          | 2  |
| 1.3. Fibroblasti u benignom tkivu štitnjače .....    | 4  |
| 1.4. Sekvenciranje jednostanične RNK (scRNAeq) ..... | 5  |
| 2. HIPOTEZA .....                                    | 6  |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....                        | 7  |
| 4. MATERIJALI I METODE .....                         | 8  |
| 4.1. Vrsta istraživanja .....                        | 8  |
| 4.2. Materijali .....                                | 8  |
| 4.3. Obrada podataka .....                           | 9  |
| 4.4. Statističke metode .....                        | 10 |
| 5. REZULTATI .....                                   | 11 |
| 5.1. Deskriptivna analiza .....                      | 11 |
| 5.2. Analiza fibroblasta štitnjače .....             | 14 |
| 6. RASPRAVA .....                                    | 21 |
| 7. ZAKLJUČAK .....                                   | 23 |
| 8. SAŽETAK .....                                     | 24 |
| 9. ABSTRACT .....                                    | 25 |
| 10. LITERATURA .....                                 | 26 |
| 11. ŽIVOTOPIS .....                                  | 33 |

## POPIS KRATICA

|           |   |
|-----------|---|
| BMP       | koštani morfogenetski protein (eng. <i>bone morphogenetic protein</i> )   |
| CD        | klasifikacijska determinanta (eng. <i>cluster of differentiation</i> )  |
| cDNK      | komplementarna DNK  |
| CCL       | C-C ligand  |
| CGP       | kemijske i genetske perturbacije (eng. <i>Chemical and Genetic Perturbations</i> )  |
| COL       | kolagen   |
| CXCL      | C-X-C ligand  |
| CyoTRACE  | rekonstrukcija staničnih putanja korištenjem genskog izražaja (eng. <i>Cellular Trajectory Reconstruction Analysis using gene Counts and Expression</i> ) |
| EPCAM     | epitelna stanična adhezijska molekula (eng. <i>epithelial cellular adhesion molecule</i> )  |
| FB        | fibroblast  |
| FC        | omjer promjene izražaja (eng. <i>fold change</i> )  |
| FDR       | stopa lažno pozitivnih (eng. <i>false discovery rate</i> )  |
| GEO       | eng. <i>Gene Expression Omnibus</i>   |
| HT        | Hashimoto tireoditis  |
| HLA       | humani leukocitni antigen (eng. <i>human leukocyte antigen</i> )  |
| IL        | interleukin   |
| KEGG      | Kyoto enciklopedija gena i genoma   |
| MYOFB     | miofibroblast (eng. <i>myofibroblast</i> )  |
| PDGFR     | receptor za trombocitni čimbenik rasta (eng. <i>platelet-derived growth factor receptor</i> )   |
| RNK       | ribonukleinska kiselina   |
| scRNA-Seq | sekvenciranje jednostanične RNK (eng. <i>single-cell RNA sequencing</i> )   |
| SFRP      | eng. <i>secreted frizzled-related protein</i>   |
| SMC       | glatka mišićna stanica (eng. <i>smooth muscle cell</i> )  |
| SN        | čvorasta guša (lat. <i>struma nodosa</i> )  |
| T3        | trijodtironin   |
| T4        | tiroksin  |
| TGF       | transformirajući čimbenik rasta (eng. <i>transforming growth factor</i> )   |
| Th        | pomoćnički T (eng. <i>T-helper</i> )  |

UMAP

eng. *Uniform Manifold Approximation and Projection*

WNT

eng. *Wingless*



## POPIS TABLICA

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tablica 1. | Apsolutni broj (N) stromalnih stanica u različitim histološkim kategorijama .                         | 14 |
| Tablica 2. | Apsolutni broj stanica u pojedinim subpopulacijama (mio)fibroblasta, poredak odgovara brojnosti ..... | 15 |
| Tablica 3. | Sažetak obilježja stromalnih fibroblasta (FB) .....   | 20 |

## POPIS SLIKA

|           |   |    |
|-----------|---|----|
| Slika 1.  | Stanične subpopulacije (27 grupa) .....   | 11 |
| Slika 2.  | Izražaj biljega stromalnih fibroblasta .....  | 12 |
| Slika 3.  | Toplinska mapa, prikazano je 10 vodećih biljega .....   | 13 |
| Slika 4.  | Apsolutni broj (N) stromalnih stanica u različitim histološkim kategorijama .                                 | 14 |
| Slika 5.  | Stanične subpopulacije fibroblasta UMAP ( <i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i> ).....         | 14 |
| Slika 6.  | Točkasti dijagram ekspresije razlikovnih biljega u pojedinim subpopulacijama fibroblasta.....                 | 15 |
| Slika 7.  | Toplinska mapa, prikazano je 10 vodećih biljega (lijevi stupac) za svaku populaciju stanica .....             | 16 |
| Slika 8.  | Razlikovni izražaj gena, populacija (broj gena).....  | 17 |
| Slika 9.  | Izražaj odabranih genskih potpisa u stromalnim stanicama .....  | 18 |
| Slika 10. | Genski izražaj biljega matičnosti (CytoTRACE, A) i antigen-predočnih molekula u stromalnim stanicama (B)..... | 18 |
| Slika 11. | Točkasti dijagram ekspresije pojedinih genskih obitelji u subpopulacijama fibroblasta.....                    | 19 |

### 1. UVOD

#### 1.1. Građa štitnjače

Štitnjača (lat. *glandula thyroidea*) je najveća endokrina žlijezda, smještena s prednje strane vrata. Osnovna funkcija štitnjače je proizvodnja i lučenje dvaju hormona (1): trijodtironina (T3) i tiroksina (T4). Ima dva režnja, koje povezuje središnji parenhimski mostić u razini druge do četvrte hrskavice dušnika. Svaki režanj širok je 1,5-2,5 cm i dugačak oko 3,5-4,5 cm. Volumen uredne štitnjače iznosi 15 do 20 cm<sup>3</sup>, a ovisi o njezinom funkcionalnom stanju, spolu, hormonskom statusu, te tjelesnoj građi (2). Štitnu žlijezdu oblikuju žlijezdano tkivo (parenhim) i vezivna stroma. Parenhim zdrave štitnjače u odrasloj dobi uglavnom izgrađuju folikuli obloženi jednoslojnim epitelom, u čijem se lumenu nalazi želatinozni koloid. Koloid u folikulima po svom je sastavu uglavnom tireoglobulin i predstavlja zalihu hormona koju epitelne stanice po potrebi mobiliziraju i otpuštaju u krv. Folikuli su različito veliki, a folikularne stanice mogu biti pločaste, kubične ili niske cilindrične. Posebna vrsta stanica u štitnjači su parafolikularne (C-stanice) koje mogu biti uključene u folikularni sloj epitela ili tvore izdvojene nakupine među folikulima. Funkcijski, C-stanice proizvode peptidni hormon kalcitonin (3). Gusta mreža krvnih i limfnih kapilara okružuje svaki folikul, a sama žlijezda obavijena je vezivnom čahurom, koja se u unutrašnjost parenhima grana u pregrade (4). Vezivna septa postupno se stanjuju, slijede grananje arterija i vena, i s kapilarama dosežu do svih folikula obavijajući ih nježnim, oskudnim vezivnim tkivom izgrađenim pretežito od vlakana endotelne i epitelne bazalne membrane. Unutar ove vezivne strome raspršene su pojedinačne imune stanice, fagociti, živčana vlakna i rezidentni limfociti. Sama vezivna stroma proizvod je rijetkih fibroblasta raspršenih unutar izvanstanične tvari koja okružuje angiofolikularne jedinice i povezuje folikule u parenhim štitnjače.

### 1.2. Fibroblasti u zdravlju i bolesti

Fibroblasti su heterogena skupina mezenhimskih stromalnih stanica čija je zadaća osigurati strukturu, mehaničku i metaboličku potporu parenhimu tkiva (5, 6). U molekularnom smislu (7), obilježeni su membranskim izražajem  $\alpha$ - i  $\beta$ -podjedinice receptora za trombocitni čimbenik rasta (eng. *platelet-derived growth factor*, PDGFR $\alpha^+$ , PDGFR $\beta^+$ ), izražajem kolagenskih prijepisa (COL $^+$ ), i nedostatkom izražaja endotelnih biljega (CD31 $^-$ ), epitelnih biljega (EPCAM $^-$ ) i biljega imunih stanica (CD45 $^-$ ). Nastanjuju sva tkiva, obavljajući brojne univerzalne i specijalizirane zadatke u svojim staničnim ekosustavima. Svako tkivo odlikuje se jedinstvenim obrascem diverzifikacije fibroblasta čiji je krajnji rezultat podjela uloga među specijaliziranim subpopulacijama koje zajedno nastanjuju vezivo. Raspon ovih uloga mijenja se od tkiva do tkiva, od zdravlja do bolesti (8), a razvrstavanje i razdioba fibroblasta u različite subpopulacije obično se temelji na izražaju kanoničkih biljega u sekvenciranju jednostanične RNK [eng. *single-cell RNA sequencing*, scRNA-Seq]. Na taj način, do sada su opisane brojne podklase fibroblasta koje igraju središnju ulogu u diferencijaciji, imunoregulaciji i zoniranju tkiva.

Različite klase fibroblasta obično koegzistiraju unutar istog tkiva, a svaka klasa odlikuje se tipičnim prostornim smještajem. Razvojno podrijetlo specijaliziranih fibroblasta nije jasno, no barem dio njih potomci su dvije skupine (PII6 $^+$ DPT $^+$  i COL15A1 $^+$ DPT $^+$ ) matičnih pan-fibroblasta koji su prisutni u manje-više svim tkivima (9), tipično u perivaskularnom sijelu (10). Matrisomski fibroblasti sudjeluju u izgradnji i pregradnji izvanstaničnog matriksa, obično izlučivanjem kolagenskih molekula, lizil-oksidaza i proteaza koje umrežavaju ili omekšavaju lokalnu izvanstaničnu tvar. Kolagenski repertoar ovisi o sijelu, i prati ga pomak prema kolagenu tipa I (COL1A1) u fibrogenim fibroblastima koji se pojavljuju tijekom ožiljnog cijeljenja nekih tkiva, poput pluća. Među takvima, najpoznatiji primjer su CTHRC1 $^+$ POSTN $^+$  fibroblasti (11). Među specijaliziranim fibroblastima, prominentno mjesto zauzimaju aktivirane stanice poput miofibroblasta i upalnih fibroblasta (8). Miofibroblasti su kontraktilne, ACTA2 $^+$ LRRC15 $^+$  stanice koje reguliraju lokalni tonus povezujući protok s regionlnim metabolizmom, a često su umnoženi u odgovoru na ozljedu tkiva, posebice tijekom procesa cijeljenja rane i ožiljavanja (9). U ovu skupinu pripadaju i periciti, muralne RGS5 $^+$  stanice koje pokrivaju stijenku kapilara i postkapilarnih venula, zamjenjujući arterijske glatke mišićne stanice. Među patološkim miofibroblastima, tipični predstavnik su sluzničke HHIP $^+$ NPNT $^+$  stanice u Crohnovoj bolesti (12), stanju koje prate ožiljnja suženja tankog crijeva. Upalni fibroblasti su obilježeni prezentacijom antigena (HLAII $^+$ ), izlučivanjem

## 1. UVOD

upalnih medijatora, interleukina (IL-1 $\beta$ , IL-11, IL-32, IL-33) i kemokina CC (CCL2, CCL5), odnosno CXC klase (CXCL9, CXCL10, CXCL12) koji kemotaksijom novače upalne stanice iz cirkulacije u vezivo (13). Iz tog razloga, nerijetko se nazivaju i sekretornim fibroblastima. U ovu skupinu pripada i skupina retikularnih fibroblasta, *CCL21*<sup>+</sup>*CCL19*<sup>+</sup> stanica koje potiču lokalno bujanje organiziranog limfoidnog tkiva u parenhimu, građom sličnog limfnim čvorovima, bijeloj pulpi slezene i Peyerovim pločama crijeva (tercijarni limfoidni organi). Upalni fibroblasti su rijetki u zdravlju i homeostazi, a pojavljuju su različitim oblicima i u značajnijim brojevima u neoplazmama i kroničnim upalnim procesima (upalne bolesti crijeva, idiopatska plućna fibroza). U tkivima čija funkcija ovisi o kontinuiranom znavljanju epitelnih stanica (sluznica crijeva, koža), ili se odlikuju regeneracijskim potencijalom (alveole pluća, jetra), posebno specijalizirani fibroblasti (14, 15, 16) izlučuju različite morfogene molekule koje upravljaju proliferacijom matičnih stanica (npr. *CD81*<sup>+</sup> trofociti u kriptama crijeva) i razvojnom putanjom njihovih epitelnih potomaka (npr. *FOSL1*<sup>+</sup> telociti crijevih resica). Među tipičnim morfogenima, najčešće su recipročno zastupljeni agonisti i inhibitori *Wingless* (WNT) signalnog puta, odnosno receptora za koštane morfogenetske proteine (BMP, eng. *bone morphogenetic protein*). Specifična kombinacija ovisi o niši, a detalji ovih procesa dostupni su u nekoliko izvrsnih pregleda (17, 18). Među poznatijim kombinacijama, nalazimo izražaj WNT agonista (*WNT2B*, *RSPO3*) s BMP inhibitorom (*CHRDLI*, *GREM1*), i obratno, izražaj BMP agonista (*BMP3/4*) s WNT inhibitorom, poput *WIF1* i *SFRP2/4* (13, 19, 20).

Sveukupno, dominira izrazita fenotipska plastičnost fibroblasta s velikim brojem prijelaznih stanja i hibridnih tipova u različitim nišama. U svakom slučaju, ovaj popis je nepotpun, nomenklatura često neujednačena, i kompletan cenzus svih populacija fibroblasta u zdravlju i patologiji čovjeka tek predstoji. Bez obzira na to, fibroblasti su u međuvremenu postali nerazdvojni i prominentni dio staničnih atlasa (*Human Lung Cell Atlas* (21), <https://hlca.ds.czbiohub.org/>, *Gut Cell Atlas*, <https://www.gutcellatlas.org/>) (22), odražavajući središnju ulogu u fiziologiji i patologiji mnogih organa.

### 1.3. Fibroblasti u štitnjači

Za razliku od crijeva, pluća, kože i srca, sastav i narav fibroblasta u štitnjači potpuna je nepoznanica. Rane i opsežne promjene vezivnog tkiva (poput fibroze i ožiljavanja) sastavni su dio upalne i proliferativne patologije štitnjače, no unatoč tome, stanični sastav intersticijskog veziva i njegova dinamika podjednako su nejasni i u zdravlju i u bolestima štitnjače.

Primjerice, čvorasta netoksična (eutiroidna) guša, koja predstavlja najčešći benigni poremećaj štitnjače u odrasloj dobi, karakterizirana je klonalnom proliferacijom folikularnih stanica i hiperplastičnim čvorovima koji se izmjenjuju sa žarištima krvarenja, i vezivnim ožiljcima (23). Češća je u žena (13:1, M:Ž), nakon 60. g. života, i u područjima s dijetalnim deficitom joda, gdje ukupna prevalencija dostiže i 10 %.

Hashimotova bolest (HT), kao druga najčešća autoimuna bolest zapadne hemisfere, karakterizirana je kroničnim upalnim infiltratom citotoksičnih T i B stanica, nadomještanjem stanica štitnjače limfoidnim tkivom i umnožavanjem upalne strome (24). Vodeći je uzrok primarne hipotireoze u područjima s dovoljnim unosom joda (25), a prevalencija doseže 5 % i pokazuje rastući trend, osobito u žena. Histološki, dominira infiltracija citotoksičnim, centralno-memorijskim CD8<sup>+</sup> T–stanicama i efektorsko-memorijskim CD4<sup>+</sup> T–stanicama, uz pojavu polariziranih makrofaga, dendritičkih stanica i B–stanica u svim fazama sazrijevanja. Kasna, hipotiroidna faza obilježena je potpunom destrukcijom folikularne arhitekture žarištima kljanja plazma–stanica i ožiljcima, kada raste i rizik za pojavu papilarnog karcinoma i B–staničnog limfoma u dezorganiziranom tkivu. U ranoj upalnoj fazi, regeneracijski potencijal tireocita dijelom kompenzira funkcijsku i strukturnu ozljedu folikularnih stanica, no ona je prolazna, i praćena oksifilnom metaplazijom folikularnih stanica ("Hürthlizacija") čiji su molekularni detalji nepoznati. Nedavno, ovaj proces povezan je s pojavom CD36<sup>+</sup> miofibroblasta i CCL21<sup>+</sup> miofibroblasta duž aktiviranih ACKR1<sup>+</sup> venula visokog endotela koje upravljaju ekstravazacijom CD45<sup>+</sup> leukocita u parenhim štitnjače (26). CCL21<sup>+</sup> fibroblasti također su zapaženi u parenhimskim tercijskim limfoidnim organima (27, 28), u prilog fenotipske raznolikosti fibroblasta štitnjače. Unatoč tome, sustavna i sveobuhvatna karakterizacija fibroblasta štitnjače, počevši od zdravlja duž cijelog raspona kliničkih manifestacija, još uvijek nedostaje. Očito, cjelovito razumijevanje patologije štitnjače nemoguće je bez detaljnog cenzusa vezivnih stanica, o čemu svjedoče i lekcije naučene tijekom stanične tipizacije drugih sličnih stanja, poput Crohnove bolesti (18), ulceroznog kolitisa (13), idiopatske plućne fibroze (29), skleroderme (30) i psorijaze (31). Štitnjača je jedno od tkiva u kojima taj posao tek slijedi.

### 1.4. Sekvenciranje jednostanične RNK

U svim opisanim slučajevima, ključnu ulogu u fenotipskoj i funkcijskoj raščlambi fibroblasta odigrale su metode sustavne biologije, na čelu sa sekvenciranjem jednostanične RNK. Jedinstvena vrijednost i učinkovitost ove metode odraz je njenog potencijala, koji počiva na cjelogenomskoj kvantifikaciji genskog izražaja istodobno u tisućama pojedinačnih stanica tkiva. Detaljni atlas genskog izražaja svake stanice polazište je u staničnom profiliranju složenih ekosustava, čime je omogućeno otkrivanje i opis rijetkih vrsta stanica, identifikacija njihovih karakterističnih biljega, rekonstrukcija genskih regulacijskih mreža, i praćenje razvojnih putanja stanica (32).

Tehnički i vrlo općenito, sama metoda uključuje tri glavna koraka: I) izolaciju pojedinačnih stanica (disekcija tkiva, disocijacija uzorka i razvrstavanje/sortiranje stanica), II) pripremu knjižnice (reverzna transkripcija glasničke RNK, sinteza barkodirane cDNK, amplifikacija) i III) sekvenciranje knjižnice tehnikama sljedeće generacije. Detalji pojedinih koraka variraju u različitim izvedenicama metode (inDrops/Chromium 10x Genomics, Drop-Seq, Smart-Seq2), od kojih svaka ima specifične namjene (33), prednosti i nedostatke (34, 35). Bioinformatička analiza sekvencijskih knjižnica, redukcija podataka i analiza matrica genskog izražaja sastavni su dio scRNA-Seq.

U štitnjači, dosadašnja primjena scRNA-Seq je vrlo ograničena, i svodi se na jednu studiju tkiva čvoraste guše, jednu studiju HT, i nekoliko studija diferenciranog karcinoma štitnjače, obično u paru s kontrolnim, paratumorskim tkivom štitnjače. U svim ovim eksperimentima, fokus je prvenstveno na profiliranju malignog epitela i upalnog infiltrata, bez detaljnijeg osvrta na vezivnu komponentu. Razlog tome je i ograničen broj vezivnih stanica u pojedinim eksperimentima, što bitno ograničava analitički doseg za metodu koja počiva na masovnosti (poput scRNA-Seq). Uobičajen pristup ovom problemu je spajanje i integracija podataka iz različitih eksperimenata, koju u slučaju štitnjače tek treba napraviti.

Popunjavajući ovaj jaz, cilj je rada ispitati sastav i transkripcijska obilježja fibroblasta benignog tkiva štitnjače na jednostaničnoj rezoluciji, i to harmonizacijom sirovih podataka 12 scRNA-Seq eksperimenata koji su trenutno dostupni u javnim repozitorijima. Očekivani ishod je cenzus svih populacija fibroblasta u zdravlju, proliferativnoj i upalnoj patologiji štitnjače.

## 2. HIPOTEZA

### 2. HIPOTEZA

Fibroblasti štitnjače su heterogena skupina stanica koja se razlikuje genskim izražajem u sekvenciranju jednostanične RNK.



### 3. CILJEVI

#### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi istraživanja :

1. Cenzus fibroblasta štitnjače na jednostaničnoj rezoluciji uporabom scRNA-Seq.
2. Ispitati zastupljenost pojedinih klasa fibroblasta u zdravom, upalno i čvorasto promijenjenom tkivu štitnjače.

### 4. MATERIJAL I METODE

#### 4.1. Vrsta istraživanja

Bioinformatička analiza, cenzus stanica.

#### 4.2. Materijali

U istraživanju su korišteni anonimizirani, sirovi cjelogenomski scRNA-Seq podaci koji su preuzeti iz *Gene Expression Omnibus* (GEO, [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo)) i Zenodo repozitorija (<https://zenodo.org>). Svi podaci su javno dostupni bez ograničenja (zadnji pristup 21.12.2022.). Procesni detalji su ranije objavljeni (26, 36-38). Svi uzorci pripadaju odraslim osobama (ukupno 14 donora), pretežito kineskog podrijetla.

Za istraživanje je pribavljena suglasnost Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku (URBROJ: 2158-61-46-23-24, KLASA: 602-04/23-08/03, 17. veljače 2023.).

Analiza obuhvaća:

- 1) Uredno (paratumorsko) tkivo štitnjače (36), GSE184362 (uzorci oznake GSM5585105, GSM5585108, GSM5585113, GSM5585118, GSM5585120, 10x Genomics/Illumina NovaSeq 6000);
- 2) Uredno tkivo štitnjače (37), GSE134355 (uzorci oznake GSM4008659, GSM4008660, *Homo sapiens*, Microwell-seq/Illumina HiSeq X Ten);
- 3) Hashimoto tiroiditis (26), DOI:10.5281/zenodo.4575509 (uzorci oznake HT12Thyroid, HT13Thyroid, HT28Thyroid, HT29Thyroid, 10x Genomics/Illumina Nova Seq6000);
- 4) Tkivo čvoraste guše (38), GSE158291 (uzorci oznake GSM4796530, 3 donora, BD Rhapsody/Microwell-seq/Illumina NextSeq).

Uzorci maligno preobraženog tkiva štitnjače isključeni su iz analize.

## 4.3. Obrada podataka

Nakon rekonstrukcije matrice očitavanja, svaki uzorak zasebno je podvrgnut eliminaciji dubleta [DoubletFinder, (39)] i preprocesiranju u Seurat alatu (v4.0.3, satijalab.org/seurat/). Korištene su sljedeće postavke (40):  $200 < nFeature\_RNA < 3000$ , postotak mitohondrijske RNK  $< 10$ , 3000 varijabilnih gena (*FindVariableFeatures* funkcija), prvih 30 glavnih komponenti. Za transformaciju podataka, korištena je logaritamska transformacija (normalization.method = "LogNormalize"), uz stabilizaciju varijance "vst" metodom. Za integraciju svih Seurat objekata korišten je Harmony (41) algoritam ( $\Lambda=2$ ,  $\theta=1$ , assay=RNA, <https://portals.broadinstitute.org/harmony/>). Na ovom koraku, svi objekti u kojima nije pronađena niti jedna *PDGFRA*<sup>+</sup> ili *PDGFRB*<sup>+</sup> stanica isključeni su iz integracije.

Nakon harmonizacije preostalih eksperimenata, preliminarno grupiranje stanica provedeno je metodom K-najbližih susjeda [Louvain algoritam, (42)]. Vizualizacija rezultata postiguta je upotrebom nelinearne redukcije dimenzionalnosti [*Uniform Manifold Approximation and Projection*, UMAP, (43)], na rezoluciji 0,5.

Nakon grupiranja, stromalne mezenhimske stanice izdvojene su digitalnim sortiranjem *PDGFRA*<sup>+</sup> i *PDGFRB*<sup>+</sup> stanica. Kontaminirane stromalne stanice eliminirane su korištenjem isključnih biljega: *PTPRC*, *CD3D* (biljeg T stanica), *TG*, *TFF3* (biljezi folikularnih epitelnih stanica), *PLVAP*, *VWF* (biljezi endotelnih stanica), *CD79A*, *IGKC* (biljezi B i plazma stanica) i *CD14* (biljeg mijeloidnih stanica). Izdvojene stromalne stanice potom su podvrnute ponovnoj integraciji i grupiranju, ovaj puta uporabom 20 glavnih komponentni i 2000 varijabilnih gena u istom Seurat + Harmony slijedu (rezolucija 0,3-0,7).

Nakon završnog grupiranja, analiza razlikovno izraženih gena u svakoj subpopulaciji stromalnih stanica izvedena je neparametrijskim Wilcoxon testom (Seurat, *FindAllMarkers* funkcija), a na konačnom popisu zadržani su samo geni s omjerom izražaja  $|\log_2FC/fold\ change| > 0,25$ , dvostranim Bonferroni  $P < 0,05$  i izražajem u najmanje 25 % stanica. Za konačnu klasifikaciju pojedinih skupina fibroblasta korištene su liste fenotipskih biljega iz Buechler i sur. (9), Lendahl i sur. (44), te Muhl i sur. (45).

Analiza bioloških putova koji su zastupljeni u listi staničnih biljega napravljena je uporabom H (*Hallmark*), C2 [Kyoto enciklopedija gena i genoma, KEGG (46), *Chemical and Genetic Perturbations*, CGP], C5 (*Gene Ontology*) i C8 seta MSigDB zbirke v7.5.1 [*The Molecular Signatures Database* (47), University of California San Diego / Broad Institute, Cambridge,

Massachusetts, SAD]. Prag značajnosti definiran je kao FDR ( $q$ , *false discovery rate*)  $< 0,05$ , i to za genske skupove s minimalno 10 gena (*Gene Set Enrichment* algoritam).

U analizi biljega disocijacijskog stresa (*AddModuleScore* funkcija) korišteni su genski potpisi iz rada van der Brink i sur. (48). Biljezi procesiranja i prezentacije antigena preuzeti su iz Chen i sur. (49). Lista biljega pericita, glatkih mišića, fibromiocita i perivaskularnih fibroblasta preuzeta je iz (50).

Analiza diferencijacijskog statusa pojedinačnih stanica učinjena je upotrebom CyoTRACE (*Cellular Trajectory Reconstruction Analysis using gene Counts and Expression*) alata (51). Za vizualizaciju rezultata korištena je Nebulosa knjižnica v1.11.0 (52). Za genska imena korišteni su HGNC (*The HUGO Gene Nomenclature Committee*) simboli.

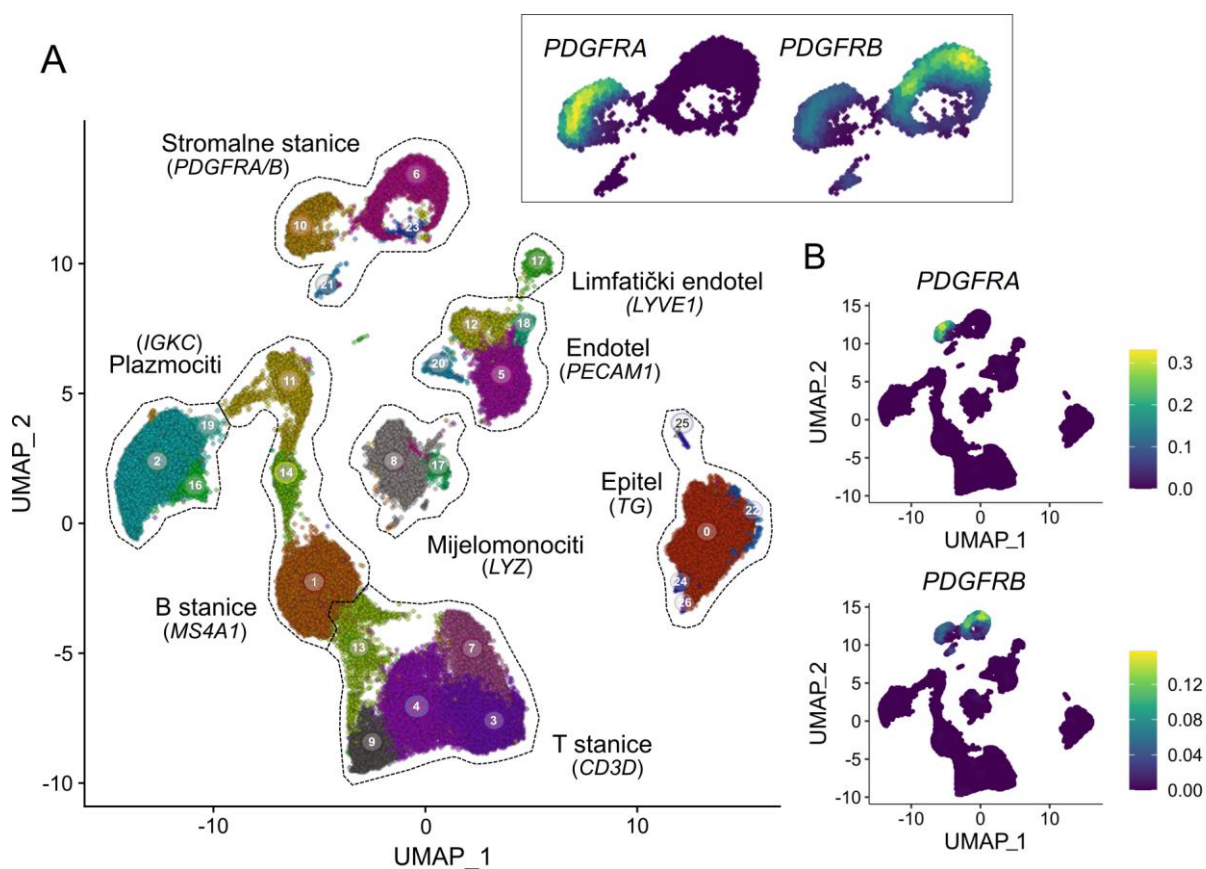
#### 4.4. Statističke metode

Deskriptivna analiza slijedi uobičajena pravila prikaza podataka za scRNA-Seq (53, 54) Kategoričke varijable sažete su upotrebom apsolutnih i relativnih frekvencija (postotak). Prosječni izražaj gena odgovara aritmetičkoj sredini. Sličnost dvaju skupova (genskih listi) procijenjena je Jaccardovim indeksom (55). Redukcija scRNA-Seq podataka slijedi preporučene smjernice (56). Ako nije drugačije naznačeno, procesiranje i vizualizacija rezultata provedeni su u R4.0.3 programu (The R Project for Statistical Computing, [www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Svi kodovi potrebni za reprodukciju rezultata i slika dostupni su na razuman zahtjev.

## 5. REZULTATI

## 5.1. Deskriptivna analiza

Nakon kontrole kvalitete, za daljnju analizu je zadržano 10 scRNA-Seq matrica s ukupno 76859 stanica (4 uzorka urednog tkiva, 5 HT uzoraka, 1 kombinirani uzorak tkiva čvoraste guše). Na temelju ekspresije linijskih biljega (Slika 1), stanice su razvrstane u osam glavnih razreda: mezenhimske stromalne stanice ( $PDGFRA/B^+$ , Slika 1B), epitelne stanice ( $TG^+$ ), T stanice ( $CD3D^+$ ), B stanice ( $MS4A1^+$ ,  $CD79A^+$ ), plazma stanice ( $IGKC^+$ ), endotelne stanice ( $PECAM1^+$ ,  $PLVAP^+$ ), limfatički endotel ( $LYVE1^+$ ) i mijelomonocite ( $LYZ^+$ ).

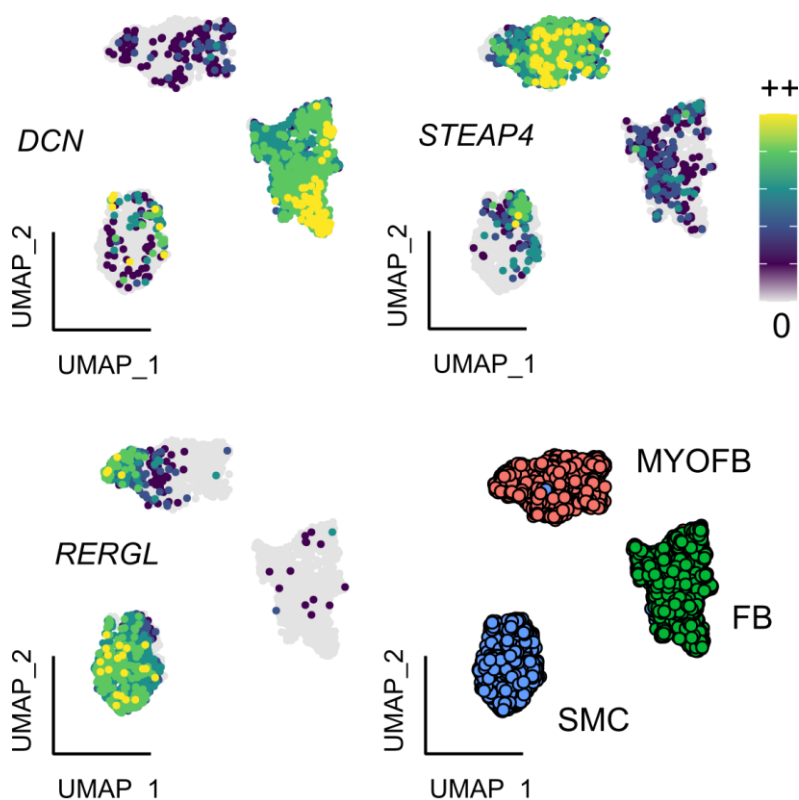


Slika 1. Stanične subpopulacije (27 grupa), UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) reprezentacija, rezolucija=0,5 (A). Genski zražaj  $PDGFRA$  i  $PDGFRB$  biljega (stromalne stanice) u pojedinim grupama (B). Svaka točka odgovara jednoj stanici.

## 5. REZULTATI

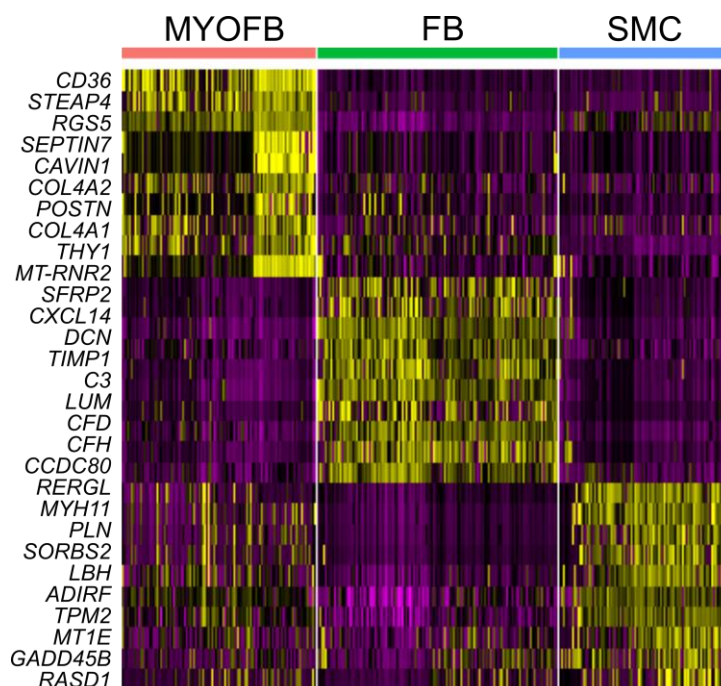
Za daljnju analizu i grupiranje izdvojeno je 7125 *PDGRFA/B*<sup>+</sup> stanica. Nakon striktno inspekcije i eliminacije kontaminiranih/stresiranih stanica, za konačnu analizu preostalo je 3217 stromalnih stanica visoke kvalitete.

U konačnom grupiranju (Slika 2), ova čista populacija stromalnih stanica razdvojena je u tri jasno odijeljene skupine koje se odlikuju karakterističnim izražajem kanoničkih biljega: glatke mišićne stanice (*MYH11*<sup>+</sup>*RERGL*<sup>+</sup>*TPM2*<sup>+</sup>), miofibroblaste (*RGS5*<sup>+</sup>*CD36*<sup>+</sup>*STEAP4*<sup>+</sup>) i fibroblaste (*DCN*<sup>+</sup>, Slika 3). Nisu zabilježene značajne razlike u stupnju disocijacijskog stresa među ovim skupinama (podaci nisu prikazani).



Slika 2. Izražaj biljega stromalnih fibroblasta (FB, *DCN*), miofibroblasta (*MYOFB*, *STEAP4*) i glatkih mišićnih stanica (eng. *smooth muscle cell*, *SMC*, *RERGL*). Okomita vrpca kodira intenzitet izražaja gena (normalizirana vrijednost). Svaki kružić odgovara jednoj stanici. Za sve slike, rječnik genskih simbola dostupan je na [www.genecards.org](http://www.genecards.org) (GeneCards: The Human Gene Database, v5.14, 03-01-2023, Weizmann Institute of Sciences, Rehovot, Izrael). UMAP = *Uniform Manifold Approximation and Projection*.

## 5. REZULTATI



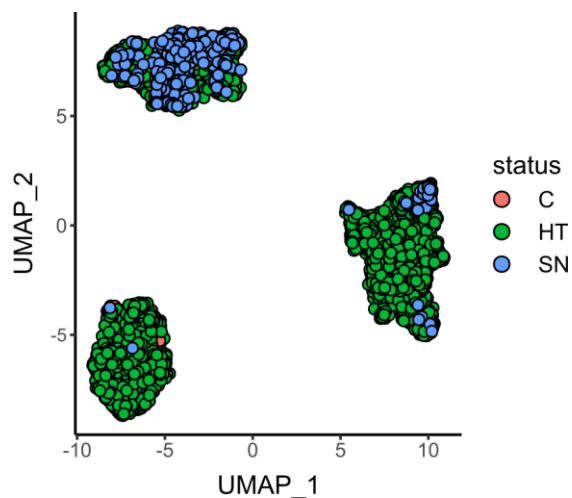
Slika 3. Toplinska mapa, prikazano je 10 vodećih biljega (lijevi stupac) za svaku populaciju stromalnih stanica. Širina vrpce razmjerna je broju stanica u svakoj kategoriji. FB, fibroblasti, MYOFB miofibroblasti, SMC glatke mišićne stanice (eng. *smooth muscle cell*). Rječnik genskih simbola dostupan je na [www.genecards.org](http://www.genecards.org) (GeneCards: The Human Gene Database, v5.14, 03-01-2023, Weizmann Institute of Sciences, Rehovot, Izrael).

Očekivano, najveći prinos stromalnih stanica zabilježen je u HT (95 % svih stanica), uz podjednako skroman doprinos urednog tkiva i tkiva čvoraste guše (Tablica 1, Slika 4). Ovaj nalaz je u skladu s ožiljnom prirodom HT i nježnom, oskudnom stromom u normalnoj folikularnoj građi štitnjače. U kontrolnim uzorcima, prevladavaju glatke mišićne stanice (prvenstveno vaskularnog podrijetla), a u čvorastoj guši miofibroblasti, ali ove podatke ne treba smatrati reprezentativnim. U HT, najbrojniju populaciju čine fibroblasti (44 % svih vezivnih stanica), a slijede ih glatke mišićne stanice (Tablica 1).

## 5. REZULTATI

Tablica 1 i Slika 4. Apsolutni broj (N) stromalnih stanica u različitim histološkim kategorijama (status).

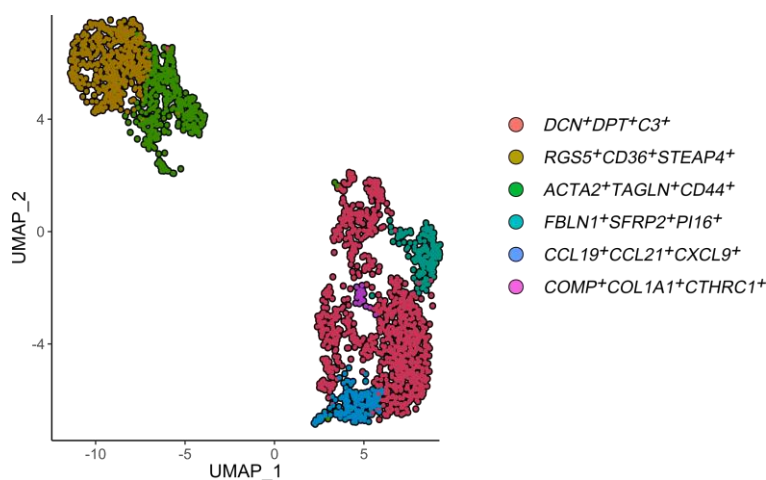
| Skupina | C  | HT   | SN | Ukupno |
|---------|----|------|----|--------|
| MYOFB   | 1  | 768  | 33 | 802    |
| FB      | 16 | 1367 | 27 | 1410   |
| SMC     | 55 | 947  | 3  | 1005   |
| Ukupno  | 72 | 3082 | 63 | 3217   |



FB, fibroblasti, MYOFB miofibroblasti, SMC glatke mišićne stanice (eng. *smooth muscle cell*), C kontrole, HT Hashimotov tiroiditis, SN čvorasta guša, UMAP = *Uniform Manifold Approximation and Projection*. Svaki kružić odgovara jednoj stanici.

### 5.2. Analiza fibroblasta štitnjače

U nastavku, pobliže su opisane pojedine subpopulacije (mio)fibroblasta i njihova glavna transkripcijska obilježja. U tu svrhu, fibroblasti i miofibroblasti (ukupno 2302 stanice) su sljedećim ciklusom grupiranja raščlanjeni u 6 subpopulacija (Slika 5, 1714 razlikovno izraženih gena). Glatke mišićne stanice su izostavljene iz daljnje analize.



Slika 5. Stanične subpopulacije fibroblasta UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*) reprezentacija, rezolucija=0,7. Svaka točka odgovara jednoj stanici.



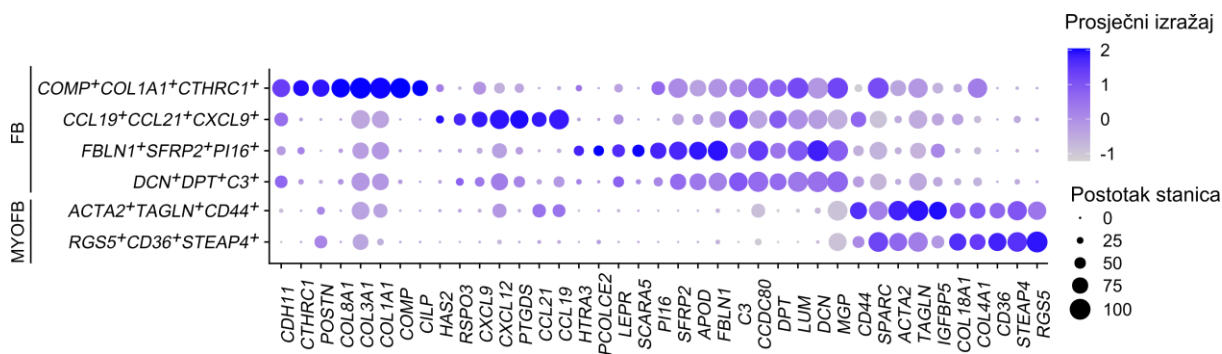
## 5. REZULTATI

Točan broj stanica u svakoj subpopulaciji prikazan je u Tablici 2, a izražaj karakterističnih razlikovnih biljega u Slici 6 i Slici 7. Ukupan broj razlikovno izraženih gena prikazan je u Slici 8, a cjeloviti popis dostupan je na razuman zahtjev.

Tablica 2. Apsolutni broj stanica u pojedinim subpopulacijama (mio)fibroblasta, poredak odgovara brojnosti (FB fibroblasti, MYOFB miofibroblasti).

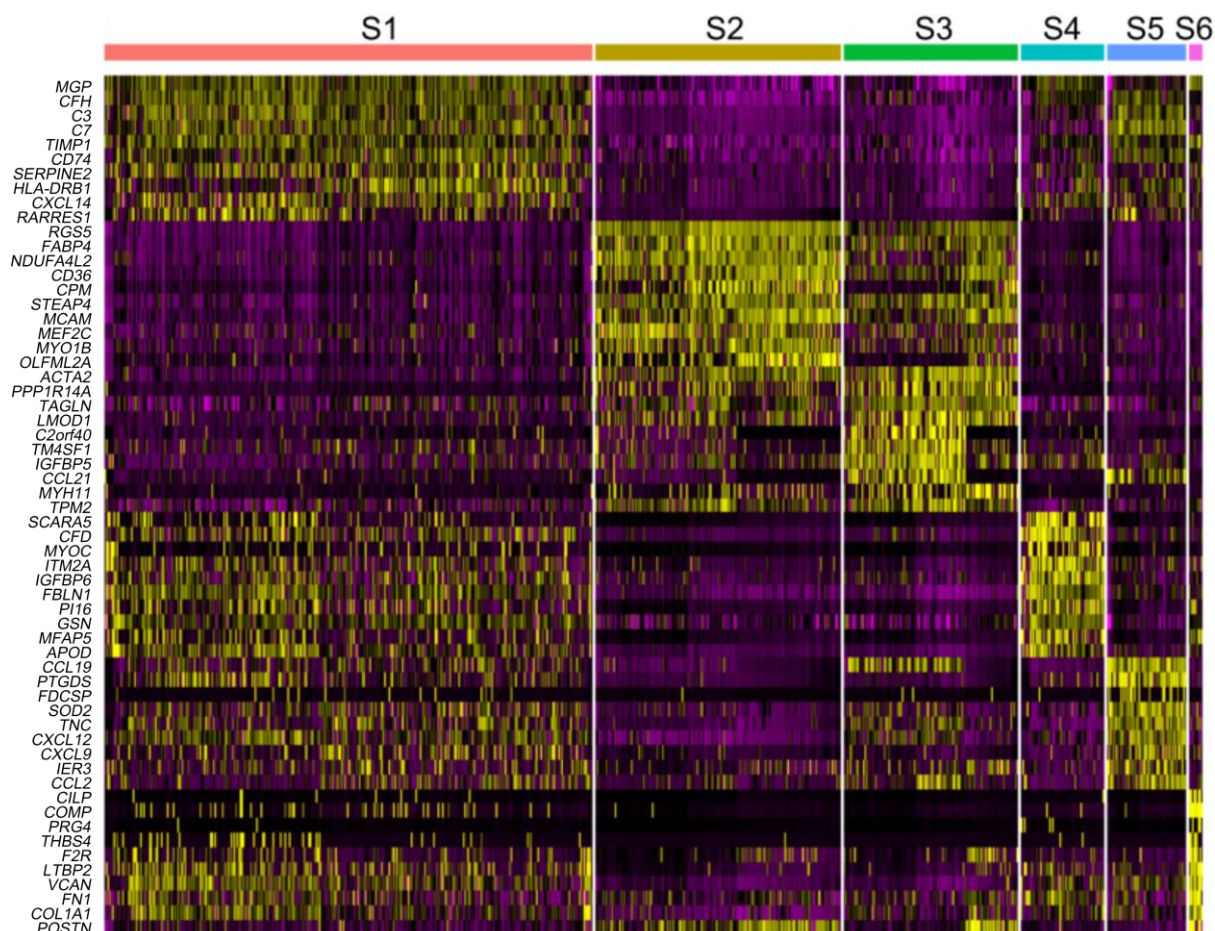
| Skupina   | Klasa | C  | HT   | SN  | Ukupno |
|---|-------|----|------|-----|--------|
| <i>DCN<sup>+</sup>DPT<sup>+</sup>C3<sup>+</sup></i>         | FB    | 6  | 1012 | 19  | 1037   |
| <i>RGS5<sup>+</sup>CD36<sup>+</sup>STEAP4<sup>+</sup></i>   | MYOFB | 1  | 299  | 223 | 523    |
| <i>ACTA2<sup>+</sup>TAGLN<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup></i>   | MYOFB | 0  | 259  | 110 | 369    |
| <i>FBLN1<sup>+</sup>SFRP2<sup>+</sup>PI16<sup>+</sup></i>   | FB    | 10 | 162  | 5   | 177    |
| <i>CCL19<sup>+</sup>CCL21<sup>+</sup>CXCL9<sup>+</sup></i>  | FB    | 0  | 169  | 1   | 170    |
| <i>COMP<sup>+</sup>COL1A1<sup>+</sup>CTHRC1<sup>+</sup></i> | FB    | 0  | 24   | 2   | 26     |
| Ukupno  |       | 17 | 1925 | 360 | 2302   |

C kontrole, HT Hashimotov (limfocitni) tiroiditis, SN benigna čvorasta guša



Slika 6. Točkasti dijagram ekspresije razlikovnih biljega u pojedinim subpopulacijama fibroblasta. Intenzitet boje i veličina kruga proporcionalni su razini ekspresije (Prosječni izražaj) i postotnom udjelu stanica. MYOFB miofibroblasti, FB fibroblasti. Rječnik genskih simbola dostupan je na [www.genecards.org](http://www.genecards.org) (GeneCards: The Human Gene Database, v5.14, 03-01-2023, Weizmann Institute of Sciences, Rehovot, Izrael).

## 5. REZULTATI



Slika 7. Toplinska mapa, prikazano je 10 vodećih biljega (lijevi stupac) za svaku populaciju stanica. S1:  $DCN^+DPT^+C3^+$ , S2:  $RGS5^+CD36^+STEAP4^+$ , S3:  $ACTA2^+TAGLN^+CD44^+$ , S4:  $FBLN1^+SFRP2^+PII6^+$ , S5:  $CCL19^+CCL21^+CXCL9^+$ , S6:  $COMP^+COL1A1^+CTHRC1^+$ . Širina vrpce razmjerna je broju stanica u svakoj kategoriji. Rječnik genskih simbola dostupan je na [www.genecards.org](http://www.genecards.org) (GeneCards: The Human Gene Database, v5.14, 03-01-2023, Weizmann Institute of Sciences, Rehovot, Izrael).

## 5. REZULTATI

|  | <i>RGS5<sup>+</sup>CD36<sup>+</sup>STEAP4<sup>+</sup></i><br>(512) | <i>ACTA2<sup>+</sup>TAGLN<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup></i><br>(273) | <i>FBLN1<sup>+</sup>SFRP2<sup>+</sup>PI16<sup>+</sup></i><br>(251) | <i>CCL19<sup>+</sup>CCL21<sup>+</sup>CXCL9<sup>+</sup></i><br>(208) | <i>COMP<sup>+</sup>COL1A1<sup>+</sup>CTHRC1<sup>+</sup></i><br>(162) |
|--|--|--|--|---|--|
| <i>DCN<sup>+</sup>DPT<sup>+</sup>C3<sup>+</sup></i> (308)  | 0<br>0   | 0<br>0,279   | 122<br>0,157   | 70<br>0,086   | 37<br>0,086  |
| <i>RGS5<sup>+</sup>CD36<sup>+</sup>STEAP4<sup>+</sup></i>  | 181<br>0,3   | 1<br>0,001   | 3<br>0,004   | 4<br>0,006  |  |
| <i>ACTA2<sup>+</sup>TAGLN<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup></i>  |  | 1<br>0,002   | 10<br>0,021  | 3<br>0,007  |  |
| <i>FBLN1<sup>+</sup>SFRP2<sup>+</sup>PI16<sup>+</sup></i>  |  |  | 12<br>0,027  | 34<br>0,09  |  |
| <i>CCL19<sup>+</sup>CCL21<sup>+</sup>CXCL9<sup>+</sup></i> |  |  |  | 4<br>0,011  |  |

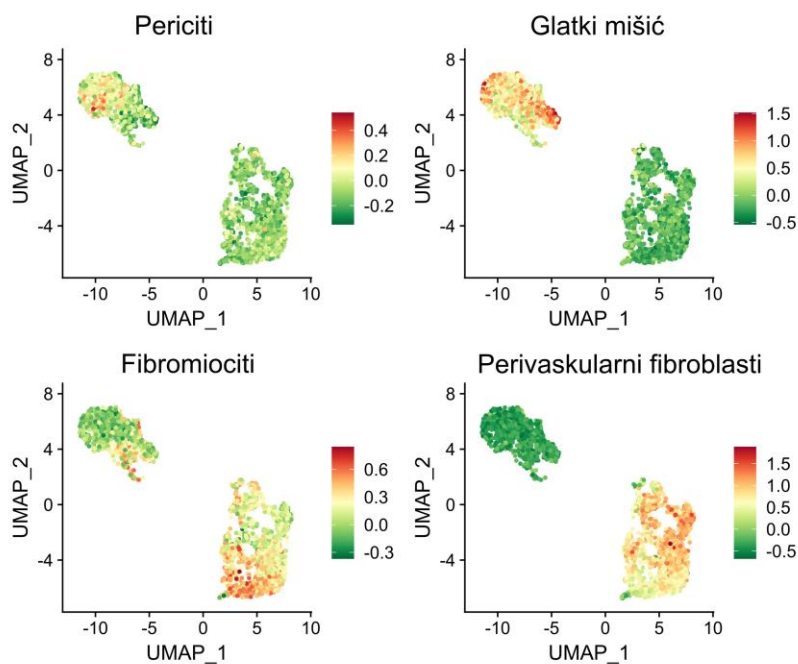
Slika 8. Razlikovni izražaj gena, populacija stanica (broj gena). Za svako polje, gornji redak odgovara broju zajedničkih gena (presjek dvije liste razlikovno izraženih gena), a donji redak Jaccardovom indeksu (mjera sličnosti dvije liste, min. 0, max. 1).

Očekivano, već na srednjoj rezoluciji vidljiva je manja raznolikost stanica u grupi miofibroblasta. Većina stanica u ovoj skupini ima obilježja pericita (*RGS5<sup>+</sup>CD36<sup>+</sup>STEAP4<sup>+</sup>*, Slika 9), čijim genskim izražajem dominiraju prijepisi kolagena bazalne membrane (*COL4A1*, *COL18A1*), angiogene molekule poput *NOTCH3* (58 gena,  $q=2,0 \times 10^{-21}$ , *Gene Ontology*, Biološki procesi), cGMP signalni put (*PRKG1*, 29 gena,  $q=3,65 \times 10^{-16}$ , KEGG), oksidativna fosforilacija (19 gena,  $q=1,13 \times 10^{-19}$ , KEGG) i metabolizam lipida (*LPL*, *ANGPTL2*, *CD36*, *FABP4*, *FABP5*, *STEAP4*, *PPARG*, ukupno 22 gena,  $q=7,6 \times 10^{-9}$ , H).

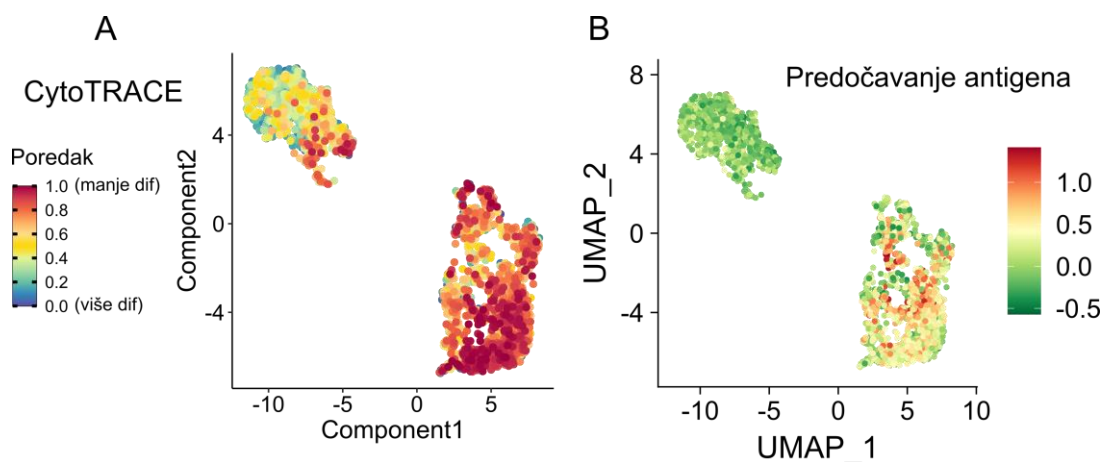
Manja skupina stanica (*ACTA2<sup>+</sup>TAGLN<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>*) odlikuje se snažnim izražajem molekula kontraktilnog aparata (35 gena,  $q=2,1 \times 10^{-19}$ , *Gene Ontology*, Slika 9) i morfogena poput *BMP2* (koštani morfogenetski protein 2).

*DCN<sup>+</sup>DPT<sup>+</sup>C3<sup>+</sup>* stanice imaju obilježja matrisomskih fibroblasta, a odlikuje ih snažni izražaj adhezijskih molekula ( $q=4,02 \times 10^{-38}$ , *Gene Ontology*, Biološki procesi), nekolagenskih komponenti izvanstaničnog matriksa ( $q=6,9 \times 10^{-43}$ , *Gene Ontology*, Molekularne funkcije) i komponenti komplekta ( $q=2,78 \times 10^{-10}$ ). Jedno od obilježja ovih stanica je i izražaj biljega matičnosti (CGP: *BOQUEST STEM CELL UP*,  $q=1,45 \times 10^{-123}$ , Slika 10A), *HLA II* molekula (Slika 10B,  $q=1,1 \times 10^{-11}$ ) i *NNMT*, stromalne metil-transferaze sa središnjom ulogom u metabolizmu fibroblasta.

## 5. REZULTATI



Slika 9. Izražaj odabranih genskih potpisa u stromalnim stanicama. Svaka točka odgovara jednoj stanici. Okomita vrpca kodira intenzitet izražaja genskog modula. Genski biljezi preuzeti su iz ref. (50). UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*).

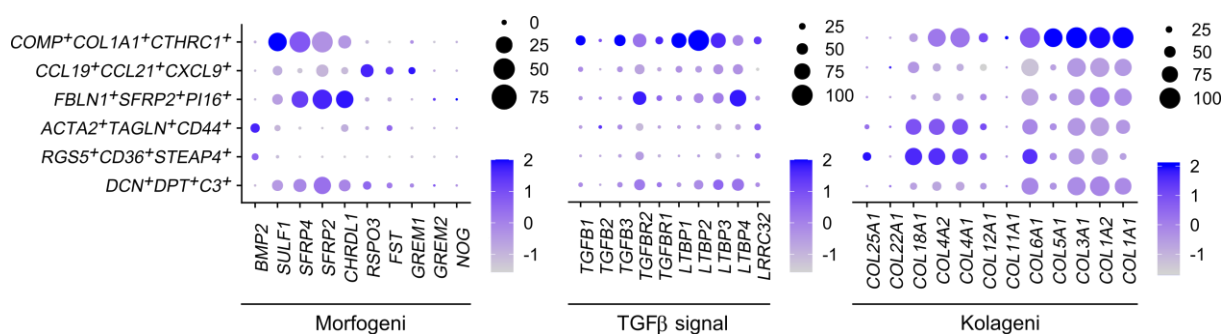


Slika 10. Genski izražaj biljega matičnosti (CytoTRACE, A) i antigen-predočnih molekula u stromalnim stanicama (B). Svaka točka odgovara jednoj stanici. Okomita vrpca kodira stupanj diferenciranosti (dif, A) i intenzitet izražaja genskog modula (B). Genski biljezi preuzeti su iz ref. (49). UMAP (*Uniform Manifold Approximation and Projection*).

$DCN^+DPT^+C3^+$ ,  $CCL19^+CCL21^+CXCL9^+$  i  $COMP^+COL1A1^+CTHRC1^+$  fibroblasti dijele osnovi skup gena s  $FBLN1^+SFRP2^+PII6^+$  stanicama (Slika 6, Slika 7), koje vjerojatno predstavljaju matičnu populaciju, odnosno ishodište, početnu točku na putu diverzifikacije ostalih klasa fibroblasta.

## 5. REZULTATI

*FBLN1<sup>+</sup>SFRP2<sup>+</sup>PII6<sup>+</sup>* stanice, kao najbliži srodnici *DCN<sup>+</sup>DPT<sup>+</sup>C3<sup>+</sup>* fibroblasta (Slika 8), pokazuju karakteristike još jedne homeostatske populacije stanica, perivaskularnih (adventicijskih) fibroblasta (Slika 9, C8: *TRAVAGLINI ADVENTITIAL FIBROBLAST*,  $q=4,12 \times 10^{-195}$ ). Odlikuju se opsežnim genskim izražajem prokolagen-endopeptidaza (*PCOLCE2*), matriks-metaloproteaza (*MMP2*), serin-peptidaza (*HTRA3*) i lizosomskih katepsina (KEGG: Lizosom,  $q=3,74 \times 10^{-4}$ ) iz grupe cistein-proteaza (B, F, H, K, L) koje sudjeluju u razgradnji izvanstaničnog matriksa i profibrogenih čimbenika (poput TGF $\beta$ ). U istom kontekstu nalazimo izražaj gena iz metabolizma prolina, terminalnog produkta razgradnje kolagena (KEGG: Metabolizam arginina i prolina,  $q=3,7 \times 10^{-4}$ , *GLUL*, *ALDH2*, *CKB*, *P4HA1/2*, *SMS*). Među drugim osobitostima, izdvaja se aktivnost leptin receptor (*LEPR*)-*IGF1* osi i izražaj WNT antagonista iz SFRP obitelji molekula (*SFRP2*>*SFRP4*, Slika 11, eng. *secreted Frizzled-related protein*).



Slika 11. Točkasti dijagram ekspresije pojedinih genskih obitelji u subpopulacijama fibroblasta. Intenzitet boje i veličina kruga proporcionalni su razini ekspresije (okomita vrpca) i postotnom udjelu stanica. COL kolagen, TGF transformirajući čimbenik rasta. Cjeloviti rječnik genskih simbola dostupan je na [www.genecards.org](http://www.genecards.org) (GeneCards: The Human Gene Database, v5.14, 03-01-2023, Weizmann Institute of Sciences, Rehovot, Izrael).

*CCL19<sup>+</sup>* i *COMP<sup>+</sup>* fibroblasti su fenotipski snažno polarizirane populacije (imunofibroblasti i fibrociti), u prilog podjele posla među stanicama (Tablica 3). Ove dvije funkcionalno specijalizirane populacije pronađene su isključivo u HT (Tablica 2).

*CCL19<sup>+</sup>CCL21<sup>+</sup>CXCL9<sup>+</sup>* stanice imaju obilježja retikularnih stanica, odnosno limfoidnih organizatora kakve nalazimo u limfnim čvorovima i terciarnim limfoidnim organima. Odlikuju se proupalnom aktivnošću (*Gene Ontology*, Biološki procesi: *REGULATION OF IMMUNE SYSTEM PROCESS*,  $q=2,26 \times 10^{-34}$ ), lipidnim metabolizmom (C8: *TRAVAGLINI*

## 5. REZULTATI

*LUNG LIPOFIBROBLAST CELL*,  $q=4,79 \times 10^{-84}$ ), sekrecijom brojnih kemokina (npr. *CXCL9*, *CXCL12*, *CCL2*, *IL33*,  $q=1,52 \times 10^{-10}$ ), biljezima izlaganja interferonu ( $q=7,1 \times 10^{-30}$ , H) i izražajem topivih antagonista BMP receptora (*RSPO3*, *FST*, *GREM1*) koji blokiraju djelovanje koštanih morfogenetskih proteina. Povrh ove uloge, *RSPO3* djeluje i kao agonist WNT signalnog puta.

Malobrojna *COMP<sup>+</sup>COL1A1<sup>+</sup>CTHRC1<sup>+</sup>POSTN<sup>+</sup>* grupa fibroblasta odlikuje se biljezima aktivacije (*FAP*), odnosno profibrogenim i migratornim (*CTHRC1*, *ANTXR1*) fenotipom (CGP: *ANASTASSIOUS INVASIVNESS SIGNATURE*,  $q=8.81 \times 10^{-58}$ ). Ova skupina fibrocita (Slika 9) obilježena je masivnim prepisivanjem fibrilarnih kolagena (*COL I*, *III*, *V*,  $q=1,9 \times 10^{-22}$ ), umrežavanjem izvanstaničnog matriksa (*LOXLI*, *COMP*,  $q=4,53 \times 10^{-21}$ ) i aktivnošću *TGFB-TGFBR* signalnog puta (KEGG: TGF beta signalni put,  $q=1,7 \times 10^{-6}$ , Slika 11). U tim karakteristikama, ove stanice su vrlo slične *CTHRC1<sup>+</sup>* fibroblastima koji su opisani u idiopatskoj plućnoj fibrozi i sklerodermi (29, 30). Prisutan je i izražaj WNT modulatora, poglavito iz klase endosulfataza (*SULF1*).

Tablica 3. Sažetak obilježja stromalnih fibroblasta (FB)

| Skupina*  | Fenotip                                  | Produkt*  |
|---|--|---|
| <i>DCN<sup>+</sup>DPT<sup>+</sup>C3<sup>+</sup></i>         | Matrisomski FB                           | Izvanstanični matriks, komplement                 |
| <i>FBLN1<sup>+</sup>SFRP2<sup>+</sup>PII6<sup>+</sup></i>   | Vaskularni FB                            | Angiokrine molekule, IGF1, WNT antagonisti (SFRP) |
| <i>CCL19<sup>+</sup>CCL21<sup>+</sup>CXCL9<sup>+</sup></i>  | Imunofibroblasti, retikularne stanice    | Citokini, kemokini, BMP antagonisti               |
| <i>COMP<sup>+</sup>COL1A1<sup>+</sup>CTHRC1<sup>+</sup></i> | Aktivirani fibrociti, migratorni fenotip | Fibrilarni kolagen, TGFβ, WNT modulatori (SULF)   |

\* [www.genecards.org](http://www.genecards.org) (GeneCards: The Human Gene Database, v5.14, 03-01-2023, Weizmann Institute of Sciences, Rehovot, Izrael).



## 6. RASPRAVA

Unazad 2-3 godine, tehnološki napredak u molekularnoj biologiji redefinirao je opis i ulogu fibroblasta u razvoju, funkciji i obrani ljudskih tkiva. Gotovo preko noći, fibroblasti su prerasli u šaroliku i dinamičnu obitelj čiji članovi obavljaju komplementarne zadaće u fiziologiji i patologiji složenih staničnih ekosustava poput kože, pluća i crijeva. U usporedbi s ovim organima, sastav i uloga fibroblasta štitnjače i dalje su relativna nepoznanica, posebice njihove promjene na putu iz zdravlja u bolest.

Koristeći jednostaničnu RNK >3000 stromalnih stanica iz tkiva štitnjače, ovim istraživanjem smo identificirali najmanje 6 različitih tipova fibroblasta: dvije populacije univerzalnih pan-fibroblasta ( $DCN^+$  i  $PII6^+$ ), dvije populacije miofibroblasta, i dvije populacije reaktivnih fibroblasta ( $CCL19^+$  i  $CTHRC1^+$ ). Njihova brojnost i obilježja u tkivu štitnjače variraju, od malobrojnih pan-fibroblasta u zdravom, kontrolnom tkivu, preko umnažanja  $ACTA2^+$  miofibroblasta u tkivu čvoraste guše, do ekspanzije i pojave visokospecijaliziranih fibroblasta u autoimunom tiroiditisu ( $CCL19^+$ ,  $CTHRC1^+$  fibroblasti). Pan-fibroblasti su postojano prisutni u svim stanjima i odlikuju se obilježjima muralnih, adventicijskih stanica (perivaskularni progenitori,  $PII6^+$ ), odnosno matičnih stanica s pretežito kataboličkim fenotipom ( $DCN^+$  stanice) u kojima dominira razgradnja izvanstaničnog matriksa i sekrecija parakrinih modulatora WNT signalnog puta ( $SFRP2$ ). Slični  $DCN^+/PII6^+$  fibroblasti mogu se naći i u većini drugih organa. Nasuprot pan-fibroblastima koji dominiraju stromom u zdravoj štitnjači, miofibroblasti dominiraju vezivom u čvorastoj guši, ali prisutni su i u limfocitnom tiroiditisu. U skladu s principom podjele posla, izražaj komponenti kontraktilnog aparata prisutan je poglavito u miofibroblastima, čije odlike većinom upućuju na pericitno podrijetlo, vaskularnu biologiju ( $NOTCH3$ ) i smještaj u području bazalne membrane (kolagen tipa IV i XVIII).  $CCL19^+$  i  $CTHRC1^+$  fibroblasti pronađeni su isključivo u limfocitnom tiroiditisu, gdje u histološkoj slici dominira citotoksičnost, ožiljavanje i pojava organiziranog limfnog tkiva unutar parenhima štitnjače. U homeostatskim uvjetima (zdravo tkivo) i benignoj čvorastoj guši,  $CCL19^+$  i  $CTHRC1^+$  fibroblasti su vrlo rijetki ili odsutni.  $CCL19^+CCL21^+$  stanice pripadaju klasi imunofibroblasta iz obitelji limfoidnih organizatora, a svojim transkripcijskim profilom slični su nedavno opisanim T-B retikularnim stanicama (TBRC) smještenim na razmeđi T i B-zone žarišta klijanja u sekundarnim limfoidnim organima (57, 58).  $CXCL9$ , koji kodira istoimeni CXCR3 ligand, je prominentni biljeg ovih stanica. Izražaj  $CXCL9$  je također kanonički biljeg izloženosti interferonu- $\gamma$  (59) i dobro korelira s intenzitetom tkivne infiltracije T stanicama (60), osobito citotoksičnog i pomoćničkog tipa 1 (Th1, eng. *T-helper*).

Imunofibroblasti nisu jedinstveni za Hashimotov tiroiditis. Slične stanice pojavljuju se i u drugim organima tijekom upalnog remodeliranja strome. Primjerice,  $CCL19^+CCL21^+$  stanice iz autoimunog tiroiditisa slične su sluzničkim, proupalnim S4 fibroblastima iz Crohnove bolesti (18, 61), s kojima dijele i izražaj *GREM1*, topivog antagonista BMP receptora. *GREM1* je već ranije povezan s fibrogenim upalnim procesima u crijevu i plućima (17, 62, 63), a *RSPO3*, drugi biljeg ovih stanica, dio je mezenhinskog odgovora na izlaganje interleukinu-1 (64). Uloga ovih morfogena u homeostazi i reparaciji epitela detaljno je opisana u crijevnoj i plućnoj niši, a čini se da analogni mehanizmi djeluju i u štitnjači, u opsegu i dosegu koji tek treba istražiti. Cenzus zaključuju malobrojni  $COMP^+COL1A1^+CTHRC1^+$  fibroblasti koji imaju značajke aktiviranih i migrirajućih stanica. U drugim tkivima, *CTHRC1* fibroblasti biljeg su tkivne ozljede (65), a vodeća im je karakteristika prepisivanje patološkog kolagena tipa I i molekula iz signalnog puta TGF $\beta$ , što ih čini vrlo sličnim istoimenim fibroblastima u idiopatskoj plućnoj fibrozi i sistemske sklerozi (11). Obje bolesti dijele dvije zajedničke karakteristike s Hashimotovim tiroiditisom: vjerojatno autoimuno podrijetlo i uništenje tkivne arhitekture neobuzdanim ožiljavanjem. Ugrubo, time je potvrđen razumni sklad rezultata s postojećim atlasima fibroblasta.

Unatoč uvidu u transkripcijsko remodeliranje i diverzifikaciju fibroblasta štitnjače, postoje neke manjkavosti u ovom istraživanju koje su karakteristične za scRNA-Seq. Ponajprije, razmještaj stanica u prostoru i njihovo neposredno stanično susjedstvo ostaju nejasni zbog gubitka prostorne informacije tokom disocijacije stanica. Nedavna uspješna imunohistokemijska validacija pojedinih subpopulacija (npr.  $CCL19^+CCL21^+$  fibroblasta u limfocitnom tiroiditisu) ohrabruje, ali funkcionalna disekcija njihovih uloga biti će daleko zahtjevniji zadatak. Jednako tako, nejasno je i razvojno podrijetlo specijaliziranih klasa fibroblasta, njihov diferencijacijski put. Ukupni broj stanica i dalje je ograničen, a protokoli koji su korišteni za disocijaciju tkiva nisu specifično optimizirani za stromalne stanice. Zbog toga, broj i omjere staničnih vrsta treba smatrati donjom procjenom. S većim brojem stanica, rastu i izgledi za finiju raščlambu staničnih podvrsta. Konačno, istraživanje je usmjereno prema benignim bolestima štitnjače, za koje je znanje o fibroblastima posebno ograničeno, a mogućnost proširenja analize na karcinomske fibroblaste je očita.

Sveukupno, rezultat ovog istraživanja daje uvid u stanični ekosustav fibroblasta štitnjače, proširujući znanje o podjeli i rasponu njihovih uloga u zdravlju i bolesti. Time je definiran i translacijski potencijal rezultata, kao i smjer budućih istraživačkih napora.



### 7. ZAKLJUČAK

Tijekom provedenog istraživanja i dobivenih rezultata i analiza mogu se proizvesti slijedeći zaključci:

1. Fibroblasti štitnjače su heterogena populacija stanica. U benignim bolestima štitnjače (limfocitni tiroiditis, čvorasta guša) i u zdravom tkivu dokazana je prisutnost najmanje 6 različitih klasa fibroblasta.
2. Brojnost pojedinih vrsta fibroblasta u tkivu štitnjače varira, od univerzalnih pan-fibroblasta koji čine glavninu u zdravom tkivu, preko miofibroblasta u tkivu čvoraste guše, do ekspanzije i pojave visokospecijaliziranih (fibrogenih i proupalnih) fibroblasta u autoimunom tiroiditis.

## 8. SAŽETAK

**CILJ.** Sveobuhvatna karakterizacija fibroblasta štitnjače ključna je za bolje razumijevanje zdravlja i bolesti ljudske štitnjače. Kako bismo popunili ovu prazninu, predstavljamo integrirani jednostanični transkriptomski atlas fibroblasta štitnjače kombinirajući 10 objavljenih skupova podataka za 12 zdravih i oboljelih odraslih osoba koje imaju benigne poremećaje štitnjače.

**METODE.** Koristili smo integracijsku metodu visokih performansi, Harmony, za integrirano ugniježđenje svih 76589 stanica i harmonizaciju pripadnih metapodataka iz prikupljenih eksperimenata (benigno tkivo štitnjače, Seurat v4 protokol). Odatle, iterativno grupiranje je korišteno za identifikaciju i karakterizaciju podskupa od 2302 fibroblasta. Diferencijalna ekspresija temeljila se na Wilcoxonovom testu rangova, s popratnom analizom obogaćenih bioloških putova (*Broad Molecular Signatures Database v7.51*).

**REZULTATI:** Identificirali smo brojna zajednička i jedinstvena stanična stanja u više poremećaja štitnjače, uključujući zdrave kontrole, Hashimotov tireoiditis i benignu čvorastu gušu. Ukupno je zabilježeno 6 različitih podskupova, uključujući dva skupa univerzalnih pan-fibroblasta, dva skupa miofibroblasta, i dva skupa visoko specijaliziranih proupalnih i profibrogenih fibroblasta povezanih isključivo s bolešću.

**ZAKLJUČCI:** Fibroblasti štitnjače vrlo su heterogena populacija stanica čiji broj, sastav i funkcija značajno variraju među zdravim i oboljelim osobama. Ortogonalna validacija je nužna za potvrdu ovih preliminarnih rezultata.

**Ključne riječi:** autoimuni;čvorasta guša; fibroblasti; jednostanična analiza;profiliranje genskog izražaja; računalna biologija; RNK; štitnjača; tiroiditis;

9. ABSTRACT

"Fibroblast diversity in human thyroid tissue: a single-cell RNA sequencing perspective"

**AIM.** A comprehensive characterization of thyroid fibroblasts is central to better understanding of both health and disease in the human thyroid. To help fill this gap, we present an integrated single-cell transcriptomic atlas of the thyroid fibroblasts by combining 10 published datasets from 12 healthy and affected adult individuals having benign thyroid disorders.

**METHODS.** We used the high-performing integration method, Harmony, to create an integrated embedding of all 76589 cells and their respective metadata from the collected experiments (benign thyroid tissue, Seurat v4 workflow). From there, iterative clustering was used to identify and characterize a subset of 2302 fibroblasts. Differential expression was based on the Wilcoxon rank sum test, followed by gene set enrichment analysis (Broad Molecular Signatures Database v7.51).

**RESULTS.** We identified a number of shared and unique cell states across multiple thyroid diseases, including healthy controls, Hashimoto's thyroiditis and benign nodular goiter. In total, 6 different subsets were observed, encompassing two sets of universal pan-fibroblasts, two sets of myofibroblasts, and two sets of highly specialized, disease-associated proinflammatory and profibrogenic fibroblasts.

**CONCLUSIONS.** The thyroid fibroblasts are a highly heterogeneous population of cells whose number, composition and function vary considerably among the healthy and diseased individuals. Orthogonal validation is necessary to confirm these preliminary results.

**Keywords:** Autoimmune; Computational Biology; Fibroblasts; Gene Expression Profiling; Goiter, Nodular; RNA; Sequence Analysis; Single-Cell Analysis; Thyroid gland; Thyroiditis

## 10. LITERATURA

1. Shahid MA, Ashraf MA, Sharma S. Physiology, Thyroid Hormone. [Updated 2022 May 8]. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500006/>. Datum pristupa: 21.8.2023.
2. Krmpotić-Nemanić J. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.
3. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2012, str. 907-10.
4. Bradamante Ž, Kostović-Knežević L, ur. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 2005, str. 423-28.
5. Plikus MV, Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, i sur. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell*. 2021 Jul 22;184(15):3852-3872.
6. Koliaraki V, Prados A, Armaka M, Kollias G. The mesenchymal context in inflammation, immunity and cancer. *Nat Immunol*. 2020 Sep;21(9):974-982.
7. Davidson S, Coles M, Thomas T, Kollias G, Ludewig B, Turley S, i sur. Fibroblasts as immune regulators in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2021 Nov;21(11):704-717.
8. Korsunsky I, Wei K, Pohin M, Kim EY, Barone F, Major T, i sur. Cross-tissue, single-cell stromal atlas identifies shared pathological fibroblast phenotypes in four chronic inflammatory diseases. *Med*. 2022 Jul 8;3(7):481-518.e14.
9. Buechler MB, Pradhan RN, Krishnamurty AT, Cox C, Calviello AK, Wang AW, i sur. Cross-tissue organization of the fibroblast lineage. *Nature*. 2021 May;593(7860):575-579.
10. Di Carlo SE, Peduto L. The perivascular origin of pathological fibroblasts. *J Clin Invest*. 2018 Jan 2;128(1):54-63.
11. Tsukui T, Sun KH, Wetter JB, Wilson-Kanamori JR, Hazelwood LA, Henderson NC, i sur. Collagen-producing lung cell atlas identifies multiple subsets with distinct localization and relevance to fibrosis. *Nat Commun*. 2020 Apr 21;11(1):1920.28(1):54-63.

## 10. LITERATURA

12. Kong L, Pokatayev V, Lefkovich A, Carter GT, Creasey EA, Krishna C, i sur. The landscape of immune dysregulation in Crohn's disease revealed through single-cell transcriptomic profiling in the ileum and colon. *Immunity*. 2023 Feb 14;56(2):444-458.e5.
13. Smillie CS, Biton M, Ordovas-Montanes J, Sullivan KM, Burgin G, Graham D, i sur. Intra- and Inter-cellular Rewiring of the Human Colon during Ulcerative Colitis. *Cell*. 2019 Jul 25;178(3):714-730.e22.
14. Kim JE, Fei L, Yin WC, Coquenlorge S, Rao-Bhatia A, Zhang X, i sur. Single cell and genetic analyses reveal conserved populations and signaling mechanisms of gastrointestinal stromal niches. *Nat Commun*. 2020 Jan 17;11(1):334.
15. Liu X, Rowan SC, Liang J, Yao C, Huang G, Deng N, i sur. Categorization of lung mesenchymal cells in development and fibrosis. *iScience*. 2021 May 19;24(6):102551.
16. Vu R, Jin S, Sun P, Haensel D, Nguyen QH, Dragan M, i sur. Wound healing in aged skin exhibits systems-level alterations in cellular composition and cell-cell communication. *Cell Rep*. 2022 Aug 2;40(5):111155.
17. Brügger MD, Basler K. The diverse nature of intestinal fibroblasts in development, homeostasis, and disease. *Trends Cell Biol*. 2023 Apr 18:S0962-8924(23)00048-X.
18. Elmentaite R, Ross ADB, Roberts K, James KR, Ortmann D, Gomes T, i sur. Single-Cell Sequencing of Developing Human Gut Reveals Transcriptional Links to Childhood Crohn's Disease. *Dev Cell*. 2020 Dec 21;55(6):771-783.e5.
19. Holloway EM, Czerwinski M, Tsai YH, Wu JH, Wu A, Childs CJ, i sur. Mapping Development of the Human Intestinal Niche at Single-Cell Resolution. *Cell Stem Cell*. 2021 Mar 4;28(3):568-580.e4.
20. Fawkner-Corbett D, Antanaviciute A, Parikh K, Jagielowicz M, Gerós AS, Gupta T, i sur. Spatiotemporal analysis of human intestinal development at single-cell resolution. *Cell*. 2021 Feb 4;184(3):810-826.e23.
21. Sikkema L, Ramírez-Suástegui C, Strobl DC, Gillett TE, Zappia L, Madisson E, i sur. An integrated cell atlas of the lung in health and disease. *Nat Med*. 2023 Jun;29(6):1563-157.

## 10. LITERATURA

22. Zilbauer M, James KR, Kaur M, Pott S, Li Z, Burger A, i sur. A Roadmap for the Human Gut Cell Atlas. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2023 May 31. doi: 10.1038/s41575-023-00784-1.
23. Medeiros-Neto G. Multinodular Goiter. [Updated 2016 Sep 26]. U: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, i sur., urednici. *Endotext* [Internet]. South Dartmo.uth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK285569/>. Datum pristupa: 21.8.2023.
24. Pearce EN, Farwell AP, Braverman LE. Thyroiditis. *N Engl J Med*. 2003 Jun 26;348(26):2646-55. Erratum in: *N Engl J Med*. 2003 Aug 7;349(6):620.
25. Chaker L, Bianco AC, Jonklaas J, Peeters RP. Hypothyroidism. *Lancet*. 2017 Sep 23;390(10101):1550-1562.
26. Zhang QY, Ye XP, Zhou Z, Zhu CF, Li R, Fang Y, i sur. Lymphocyte infiltration and thyrocyte destruction are driven by stromal and immune cell components in Hashimoto's thyroiditis. *Nat Commun*. 2022 Feb 9;13(1):775.
27. Marinkovic T, Garin A, Yokota Y, Fu YX, Ruddle NH, Furtado GC, Lira SA. Interaction of mature CD3+CD4+ T cells with dendritic cells triggers the development of tertiary lymphoid structures in the thyroid. *J Clin Invest*. 2006 Oct;116(10):2622-32.
28. Furtado GC, Marinkovic T, Martin AP, Garin A, Hoch B, Hubner W, i sur. Lymphotoxin beta receptor signaling is required for inflammatory lymphangiogenesis in the thyroid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 20;104(12):5026-31.
29. Adams TS, Schupp JC, Poli S, Ayaub EA, Neumark N, Ahangari F, i sur. Single-cell RNA-seq reveals ectopic and aberrant lung-resident cell populations in idiopathic pulmonary fibrosis. *Sci Adv*. 2020 Jul 8;6(28):eaba1983.
30. Gur C, Wang SY, Sheban F, Zada M, Li B, Kharouf F, i sur. LGR5 expressing skin fibroblasts define a major cellular hub perturbed in scleroderma. *Cell*. 2022 Apr 14;185(8):1373-1388.e20.
31. Castillo RL, Sidhu I, Dolgalev I, Chu T, Prystupa A, Subudhi I, i sur S. Spatial transcriptomics stratifies psoriatic disease severity by emergent cellular ecosystems. *Sci Immunol*. 2023 Jun 8;8(84):eabq7991.

32. HuBMAP Consortium. The human body at cellular resolution: the NIH Human Biomolecular Atlas Program. *Nature*. 2019 Oct;574(7777):187-192.
33. Ding J, Adiconis X, Simmons SK, Kowalczyk MS, Hession CC, Marjanovic ND, i sur. Systematic comparison of single-cell and single-nucleus RNA-sequencing methods. *Nat Biotechnol*. 2020 Jun;38(6):737-746.
34. Ziegenhain C, Vieth B, Parekh S, Reinius B, Guillaumet-Adkins A, Smets M, i sur. Comparative Analysis of Single-Cell RNA Sequencing Methods. *Mol Cell*. 2017 Feb 16;65(4):631-643.e4.
35. Lafzi A, Moutinho C, Picelli S, Heyn H. Tutorial: guidelines for the experimental design of single-cell RNA sequencing studies. *Nat Protoc*. 2018 Dec;13(12):2742-2757.
36. Pu W, Shi X, Yu P, Zhang M, Liu Z, Tan L, i sur. Single-cell transcriptomic analysis of the tumor ecosystems underlying initiation and progression of papillary thyroid carcinoma. *Nat Commun*. 2021 Oct 18;12(1):6058.
37. Han X, Zhou Z, Fei L, Sun H, Wang R, Chen Y, i sur. Construction of a human cell landscape at single-cell level. *Nature*. 2020 May;581(7808):303-309.
38. Peng M, Wei G, Zhang Y, Li H, Lai Y, Guo Y, i sur. Single-cell transcriptomic landscape reveals the differences in cell differentiation and immune microenvironment of papillary thyroid carcinoma between genders. *Cell Biosci*. 2021 Feb 15;11(1):39.
39. McGinnis CS, Murrow LM, Gartner ZJ. DoubletFinder: Doublet Detection in Single-Cell RNA Sequencing Data Using Artificial Nearest Neighbors. *Cell Syst*. 2019 Apr 24;8(4):329-337.e4.
40. Hafemeister C, Satija R. Normalization and variance stabilization of single-cell RNA-seq data using regularized negative binomial regression. *Genome Biol*. 2019 Dec 23;20(1):296.
41. Korsunsky I, Millard N, Fan J, Slowikowski K, Zhang F, Wei K, i sur. Fast, sensitive and accurate integration of single-cell data with Harmony. *Nat Methods*. 2019 Dec;16(12):1289-1296.
42. Traag VA, Waltman L, van Eck NJ. From Louvain to Leiden: guaranteeing well-connected communities. *Sci Rep*. 2019 Mar 26;9(1):5233.

## 10. LITERATURA

43. Becht E, McInnes L, Healy J, Dutertre CA, Kwok IWH, Ng LG, i sur. Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol.* 2018 Dec 3. doi: 10.1038/nbt.4314.
44. Lendahl U, Muhl L, Betsholtz C. Identification, discrimination and heterogeneity of fibroblasts. *Nat Commun.* 2022 Jun 14;13(1):3409.
45. Muhl L, Genové G, Leptidis S, Liu J, He L, Mocci G, i sur. Single-cell analysis uncovers fibroblast heterogeneity and criteria for fibroblast and mural cell identification and discrimination. *Nat Commun.* 2020 Aug 7;11(1):3953. Erratum in: *Nat Commun.* 2020 Sep 3;11(1):4493.
46. Kanehisa M, Goto S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jan 1;28(1):27-30.
47. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst.* 2015 Dec 23;1(6):417-425.
48. Van den Brink SC, Sage F, Vértesy Á, Spanjaard B, Peterson-Maduro J, Baron CS, i sur. Single-cell sequencing reveals dissociation-induced gene expression in tissue subpopulations. *Nat Methods.* 2017 Sep 29;14(10):935-936.
49. Chen B, Scurrah CR, McKinley ET, Simmons AJ, Ramirez-Solano MA, Zhu X, i sur. Differential pre-malignant programs and microenvironment chart distinct paths to malignancy in human colorectal polyps. *Cell.* 2021 Dec 22;184(26):6262-6280.e26.
50. Kadur Lakshminarasimha Murthy P, Sontake V, Tata A, Kobayashi Y, Macadlo L, Okuda K, i sur. PR. Human distal lung maps and lineage hierarchies reveal a bipotent progenitor. *Nature.* 2022 Apr;604(7904):111-119.
51. Gulati GS, Sikandar SS, Wesche DJ, Manjunath A, Bharadwaj A, Berger MJ, i sur. Single-cell transcriptional diversity is a hallmark of developmental potential. *Science.* 2020 Jan 24;367(6476):405-411.
52. Alquicira-Hernandez J, Powell JE. Nebulosa recovers single-cell gene expression signals by kernel density estimation. *Bioinformatics.* 2021 Aug 25;37(16):2485-2487.



## 10. LITERATURA

53. Hwang B, Lee JH, Bang D. Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Exp Mol Med*. 2018 Aug 7;50(8):1-14. Erratum in: *Exp Mol Med*. 2021 May;53(5):1005.
54. Luecken MD, Theis FJ. Current best practices in single-cell RNA-seq analysis: a tutorial. *Mol Syst Biol*. 2019 Jun 19;15(6):e8746.
55. Jaccard P. THE DISTRIBUTION OF THE FLORA IN THE ALPINE ZONE. *New Phytologist*. 1912;11:37-50. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1912.tb05611.x>.
56. Heumos L, Schaar AC, Lance C, Litinetskaya A, Drost F, Zappia L, i sur. Best practices for single-cell analysis across modalities. *Nat Rev Genet*. 2023 Aug;24(8):550-572.
57. Alexandre YO, Schienstock D, Lee HJ, Gandolfo LC, Williams CG, Devi S, i sur. A diverse fibroblastic stromal cell landscape in the spleen directs tissue homeostasis and immunity. *Sci Immunol*. 2022 Jan 7;7(67):eabj0641.
58. Lütge M, De Martin A, Gil-Cruz C, Perez-Shibayama C, Stanossek Y, Onder L, i sur. Conserved stromal-immune cell circuits secure B cell homeostasis and function. *Nat Immunol*. 2023 Jul;24(7):1149-1160.
59. Metzemaekers M, Vanheule V, Janssens R, Struyf S, Proost P. Overview of the Mechanisms that May Contribute to the Non-Redundant Activities of Interferon-Inducible CXC Chemokine Receptor 3 Ligands. *Front Immunol*. 2018 Jan 15;8:1970.
60. Ding Q, Lu P, Xia Y, Ding S, Fan Y, Li X, i sur. CXCL9: evidence and contradictions for its role in tumor progression. *Cancer Med*. 2016 Nov;5(11):3246-3259.
61. Kinchen J, Chen HH, Parikh K, Antanaviciute A, Jagielowicz M, Fawcner-Corbett D, i sur. A. Structural Remodeling of the Human Colonic Mesenchyme in Inflammatory Bowel Disease. *Cell*. 2018 Oct 4;175(2):372-386.e17.
62. Shi X, Wang J, Zhang X, Yang S, Luo W, Wang S, i sur. GREM1/PPP2R3A expression in heterogeneous fibroblasts initiates pulmonary fibrosis. *Cell Biosci*. 2022 Aug 6;12(1):123.
63. Yang Y, Zeng QS, Zou M, Zeng J, Nie J, Chen D, i sur. Targeting Gremlin 1 Prevents Intestinal Fibrosis Progression by Inhibiting the Fatty Acid Oxidation of Fibroblast Cells. *Front Pharmacol*. 2021 Apr 22;12:663.

## 10. LITERATURA

64. Cox CB, Storm EE, Kapoor VN, Chavarria-Smith J, Lin DL, Wang L, i sur. IL-1R1-dependent signaling coordinates epithelial regeneration in response to intestinal damage. *Sci Immunol*. 2021 May 7;6(59):eabe8856.
65. Tsukui T, Sheppard D. Tracing the origin of pathologic pulmonary fibroblasts. *bioRxiv* 2022.11.18.517147; doi: <https://doi.org/10.1101/2022.11.18.517147>.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime: Nikolina Klepić

Datum i mjesto rođenja: 14.1.1988., Karlovac, Republika Hrvatska

Adresa stanovanja: Kralja Zvonimira 3, 47 000 Karlovac

E-mail: ninna1988@gmail.com

OBRAZOVANJE I RADNO ISKUSTVO

2002.- 2006. Medicinska škola Karlovac, smjer medicinska sestra/tehničar.

2006.–2010. Zdravstveno veleučilište Zagreb, stručni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike.

2011.-danas Odjel medicinsko-biokemijskog laboratorija, Opća bolnica Karlovac.

2021.–2023. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet, Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike.