

Uloga transkripcijskih čimbenika CD8+ stanične diferencijacije u razvoju Hashimotove bolesti

Nedić, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:152:581484>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Jelena Nedić

ULOGA TRANSKRIPCIONIJSKIH ČIMBENIKA

CD8⁺ STANIČNE DIFERENCIJACIJE U

RAZVOJU HASHIMOTOVE BOLESTI

Diplomski rad

Osijek, 2018.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Jelena Nedić

ULOGA TRANSKRIPCIJSKIH ČIMBENIKA

CD8⁺ STANIČNE DIFERENCIJACIJE U

RAZVOJU HASHIMOTOVE BOLESTI

Diplomski rad

Osijek, 2018.

Rad je ostvaren u Laboratoriju za analizu DNA pri Katedri za medicinsku kemiju, biokemiju i kliničku kemiju Medicinskog fakulteta Osijek.

Mentor rada: doc.dr.sc. Stana Tokić

Rad ima 48 listova, 4 tablice i 10 slika.

Sadržaj:

1. UVOD	1
1.1. Hashimotova bolest	1
1.2. Incidencija i epidemiologija	2
1.3. Učinci okolišnih faktora na razvoj Hashimotova tireoiditisa	4
1.4. Patogeneza Hashimotove bolesti	5
1.4.1. Prezentacija antigena	5
1.4.2. Odgovor limfocita T	6
1.4.3. Odgovor limfocita B	7
1.4.4. Protutijela na tireoidnu peroksidazu (TPOAt)	8
1.4.5. Protutijela na tireoglobulin (TgAt)	8
1.4.6. Izvršni mehanizmi oštećenja štitnjače	8
1.5. Uloga CD8 ⁺ T limfocita u razvoju Hashimotove bolesti	10
1.5.1. Subpopulacije CD8 ⁺ limfocita T	12
1.5.2. Transkripcijski faktori citotoksičnih/CD8 ⁺ limfocita	13
2. HIPOTEZA	16
3. CILJ ISTRAŽIVANJA	17
4. MATERIJALI I METODE	18
4.1. Materijali	18
4.1.1. Ispitanici	18
4.1.2. Upotrijebljene kemikalije:	19
4.2. Metode	20
4.2.1. Sinteza cDNA	20
4.2.2. Kvantitativna analiza na real-time PCR uređaju	20
4.2.3. Statistička analiza rezultata	24
5. REZULTATI	25
5.1. Kliničke i biokemijske karakteristike ispitanika	25
5.2. Pokazatelji učinkovitosti i preciznosti RT- qPCR reakcija	26
5.3. Ekspresijski profili gena FOXO1, PLZF, RUNX3 i RORC	28
5.4. Međugenske korelacije	30
5.5. Povezanost kliničkih karakteristika i genske ekspresije HT ispitanika	32
6. RASPRAVA	34

7. ZAKLJUČAK	38
8. SAŽETAK	39
9. SUMMARY	40
10. LITERATURA	41
11. ŽIVOTOPIS	48

POPIS KRATICA

- ADCC (engl. *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*) stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima
- AITD (engl. *Autoimmune Thyroid Disorders*) autoimune bolesti štitnjače
- TgAb (engl. *Antithyroglobulin Antibodies*) tireoglobulinska autoprotutijela
- TPOAb (engl. *Antithyroperoxidase Antibodies*) protutijela usmjerena protiv tireoidne peroksidaze
- APC (engl. *Antigen Presenting Cells*) antigen predložne stanice
- APL (engl. *Acute promyelocytic leukemia*) akutna promijelocitna leukemija
- BCL-6 (engl. *B-cell lymphoma 6 protein*) B-stanični limfoma protein 6
- Blimp-1 (engl. *B lymphocyte-induced maturation protein-1*) protein sazrijevanja induciran B-limfocitima
- BTB-ZF (engl. *bric-a-brac or poxvirus and zinc finger-zinc finger*)
- CTL (engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte*) citotoksični T-limfociti
- CTLA-4 (engl. *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein*) – površinski receptor, negativni regulator aktivacije limfocita T
- DNA (engl. *Deoxyribonucleic Acid*) deoksiribonukleinska kiselina
- DZ (engl. *Dizygotic Twins*) dizigotni blizanci
- FOXO1 (engl. *Forkhead box protein O1*) transkripcijski čimbenik
- Foxp3 (engl. *Forkhead box P3*) transkripcijski čimbenik
- GD (engl. *Graves' Disease*) Gravesova bolest
- HT (engl. *Hashimoto's Thyroiditis*) Hashimotov tiroiditis
- I⁻ (engl. *Iodide Ion*) jodidni ion
- Id-3 (engl. *DNA-binding protein inhibitor ID-3*) DNA-vezujući proteinski inhibitor
- IL-2 (engl. *Interleukin 2*) interleukin 2
- ILC (engl. *Innate Lymphoid Cells*) urođene limfoidne stanice
- INF- γ (engl. *Interferon Gamma*) interferon gama
- iNKT (engl. *Invariant Natural Killer T Cells*) invarijantne prirodno ubilačke T stanice
- IRF4 (engl. *Interferon Regulatory Factor*) transkripcijski čimbenik
- KLRG1 (engl. *Killer Cell Lectin-like Receptor G1*) površinski receptor prirodno ubilačkih stanica
- MAC (engl. *The Membrane Attack Complex*) kompleks koji napada membranu

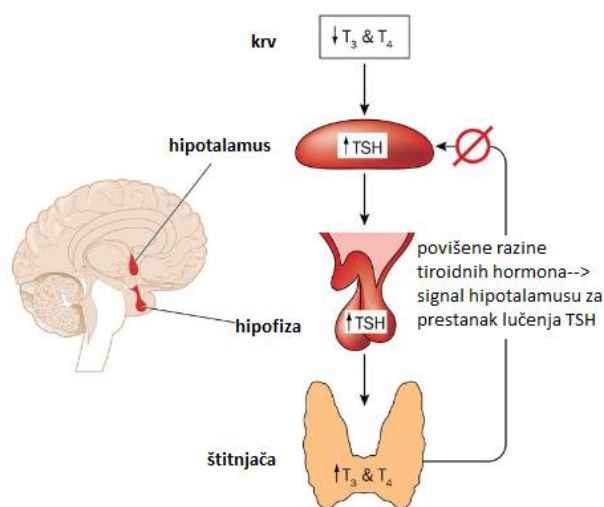
- MHC (engl. *Major Histocompatibility Complex*) molekula glavnog sustava tkivne snošljivosti
- MZ (engl. *Monozygotic Twins*) monozigotni blizanci
- NK cells (engl. *Natural Killer*) stanice prirodne ubojice
- PCR (engl. *Polymerase chain reaction*) lančana reakcija polimerazom
- PLZF (engl. *Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*) transkripcijski čimbenik
- RNA (engl. *Ribonucleic acid*) ribonukleinska kiselina
- ROR γ t (engl. *RAR-related orphan receptor gamma*) transkripcijski čimbenik
- RT-qPCR (engl. *Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction*) kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu
- RUNX3 (engl. *Runt-related transcription factor 3*) Runt-povezan transkripcijski faktor
- SLEC (engl. *Short Lived Effector Cells*) kratkoživuće efektorske stanice
- T3 (engl. *Triiodothyronine*) trijodtironin
- T4 (engl. *Thyroxine*) tiroksin
- T-Bet (engl. *T-box transcription factor*) T-box transkripcijski faktor
- Tc cell (engl. *Cytotoxic T-cells*) citotoksične T-stanice
- TCF-7 (engl. *Transcription Factor 7*) transkripcijski faktor 7
- TCR (od engl. *T-cell receptor*) T-stanični receptor
- Tg (engl. *Thyroglobulin*) tireoglobulin
- TGF- β (engl. *Transforming Growth Factor beta*) transformirajući faktor rasta
- Th cell (engl. *T-helper cells*) pomoćničke T-stanice
- Th1 (engl. *T Helper Cell*) pomoćničke T stanice tipa 1
- TNFR (engl. *Tumour-Necrosis-Factor Receptor*) receptor tumor nekroza faktora
- TNF α (engl. *Tumor Necrosis Factor Alpha*) faktor nekroze tumora α
- TPO (engl. *Thyroid Peroxidase*) tiroidna peroksidaza
- TRAIL (engl. *TNF-related Apoptosis-inducing Ligand*) ligand povezan s TNF-om koji inducira apoptozu
- Treg cells (engl. *Regulatory T cells*) regulatorne T-stanice
- TRH (engl. *Thyrotropin Releasing Hormone*) tirotropin oslobađajući hormon
- TSH (engl. *Thyroid Stimulating Hormone*) tireotropin

1. UVOD

1.1. Hashimotova bolest

Hashimotov tireoiditis (HT) pripada skupini autoimunih bolesti štitnjače (AITD, engl. *Autoimmune Thyroid Disorders*), koje obilježava pojava imunskih stanica usmjerenih protiv tkivnih antigena štitne žlijezde. Zajednička obilježja ovih bolesti (uključujući HT) su: 1.) tkivna infiltracija autoreaktivnih limfocita usmjerenih protiv antigena štitnjače; 2.) prisutnost cirkulirajućih autoreaktivnih protutijela; 3.) zajednička imunološka podloga u razvoju sekundarnih autoimunih oboljenja; 4.) obiteljska pojavnost, uglavnom kod žena (1).

Hashimotov tireoiditis najučestaliji je imunološki poremećaj štitne žlijezde. Razvoj bolesti prati gubitak funkcije štitne žlijezde kao posljedica destruktivnog djelovanja infiltrirajućih autoimunskih stanica i posljedične zamjene parenhimalnog tkiva fibroznim. Uz autoreaktivne limfocite pojavljuju se i protutijela koja prepoznaju specifične antigene štitnjače, tiroidnu peroksidazu (TPO) i tireoglobulin (Tg). Razorno djelovanje autoreaktivnih limfocita i protutijela naposljetku dovodi do razvoja primarne hipotireoze - smanjene funkcije štitne žlijezde uz posljedičnu smanjenu proizvodnju hormona štitnjače, tiroksina (T₃) i trijodtironina (T₄). Lučenje hormona T₃ i T₄ regulira tireostimilirajući hormon (tireotropin) hipofize (TSH, engl. *Thyroid Stimulating Hormone*), čije je izlučivanje pod nadzorom hipotalamusa, kao i tireotropin oslobađajućeg hormona (TRH, engl. *Thyrotropin Releasing Hormone*) (2). U HT, hipotireozu prati porast serumskih vrijednosti TSH, s obzirom na to da pad razine hormona štitnjače potiče hipofizu na pojačano lučenje TSH-a mehanizmom povratne sprege (Slika 1).



Slika 1. Shematski prikaz mehanizama povratne sprege koji kontroliraju nastanak hormona štitnjače (Preuzeto i prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 3.)

HT je otkrio Hakaru Hashimoto, koji je 1912. godine objavio svoje istraživanje u njemačkom časopisu za kliničku kirurgiju „Archiv für Klinische Chirurgie“. Pregledom tkiva štitnjače uočio je infiltraciju limfoidnih i plazma stanica, formiranje limfoidnih folikula s germinativnim centrima, fibrozu i degeneraciju tiroidnih epitelnih stanica. Struma limfomatoza, kako ju je Hashimoto tada nazvao, zaboravljena je potom sve do 1931. g., kada su Allen Graham i sur. opisali bolest istih obilježja kao i Hashimoto, te time podržali njegovu hipotezu o strumi limfomatozi kao samostalnoj bolesti. Tada je bolest dobila naziv koji upotrebljavamo i danas - Hashimotov tiroiditis (4).

Većina oboljelih od HT-a javlja se liječniku zbog bezbolnog povećanja štitne žlijezde, odnosno gušavosti i osjećaja pritiska u vratu. Prilikom pregleda uočava se guša, koja može biti glatka ili čvorasta, a pacijenti obično imaju eutireozu ili hipotireozu, te u rijetkim slučajevima hipertireozu. Hashimotova bolest može se prezentirati u eutiroidnoj, subkličkoj i kliničkoj formi. Razlika između ta tri statusa očituje se u serumskoj razini slobodnog (engl. *free*) tiroksina (FT4) i trijodtironina (FT3) i TSH-a. U eutiroidnoj formi bolesti, serumska koncentracija FT3, FT4, i TSH nepromijenjena je i ostaje unutar referentnih granica. Subkličku hipotireozu u HT obilježava povišena koncentracija TSH-a uz uredne vrijednosti FT4 i FT3, a u težoj, hipotiroidnoj ili kliničkoj formi, serumska koncentracija TSH-a je povišena, FT4-a smanjena, a FT3 može varirati od niskih do fizioloških vrijednosti. Kako bolest napreduje, javljaju se simptomi poput umora, malaksalosti, pospanosti, oticanja vrata, zatvora, dobitka na tjelesnoj težini uz smanjenje apetita, smanjeno znojenje i naglušost. Koža je blijedožuta, suha, hrapava, hladna, sa znatnim gubitkom dlakavosti, te prorijeđenom i grubom kosom. Kod žena su uočene menstrualne nepravilnosti, a sterilitet je moguć kod oba spola (5).

1.2. Incidencija i epidemiologija

U populacijama s dovoljnim dijetalnim unosom joda, Hashimotov tiroiditis je najčešća bolest u pozadini razvoja hipotireoze. Zajedno s Gravesovom bolesti (GD), HT pripada skupini tkivno specifičnih autoimunih bolesti štitnjače, koje čine 30% svih autoagresivnih bolesti (6).

HT zahvaća približno 5 % ukupne populacije. Češće se javlja kod žena nego muškaraca (6 do 15 puta) u životnoj dobi između 30 i 60 godina, a rjeđe u djece i starijih osoba. Prema istraživanju velike američke epidemiološke studije NHANES III (engl. *Nathional Health and Nutrition Examination Survey*), učestalost subkličke i kliničke hipotireoze u američkoj

populaciji iznosi 4,3%. Studija je također pokazala da je prosječna serumska koncentracija TSH-a i prevalencija anti-tiroidnih protutijela veća u žena, te da se povećava s dobi (7). Sljedeća NHANES studija (1999-2002) otkriva povećani rizik (3,1%) za razvoj hipotireoze u žena reproduktivne dobi (12-49 godina), te 5 puta veću vjerojatnost hipotireoze u osoba starijih od 80 godina (8). Dvadesetogodišnja studija Whickham provedena na britanskoj populaciji oboljelih od kroničnog autoimunog tireoiditisa bilježi učestalost bolesti u 7,7% žena, odnosno 1,3% ispitivanih muškaraca. U samo 9 % ispitanica bolest je dijagnosticirana u dobi manjoj od 45 godina, a najveći rizik zabilježen je ženskoj populaciji starosnog raspona od 60 do 70 godina (četiri puta veći rizik u usporedbi s mlađim ženama) (9).

Budući da je učestalost HT podjednaka u zemljopisno udaljenim i etnički različitim populacijama, smatra se da genetički čimbenici imaju jak utjecaj na razvoj te bolesti. U skladu s time, obiteljske studije pokazuju visoku vjerojatnost pojave HT bolesti među srodnicima oboljelih u odnosu na ukupnu populaciju (metodom „sibling risk ratio“- λ_s). Koeficijent λ_s kvantitativna je mjera genskog doprinosa razvoju bolesti i određuje koliki je rizik oboljenja kod pojedinca koji je u srodstvu s oboljelom osobom. Ako je vrijednost λ_s veća od 5, može se zaključiti da nasljedne genetičke varijante snažno doprinose razvoju bolesti (10).

Istraživanjem, koje su 1960. godine proveli Hall i Stanbury, AITD fenotip zabilježen je u 33% srodnika oboljelih od GD ili HT bolesti, a pojava tiroidnih autoprotutijela (TAb) opažena je u 56% srodnika. Ustanovili su, također, da bar jedan od roditelja oboljele osobe posjeduje TgAb, što upućuje na snažnu ulogu nasljednih čimbenika u razvoju autoreaktivnih protutijela (11). Villanueva R. i sur. također su zabilježili visoku pojavnost GD i HT u srodnicima 155 oboljelih AITD pacijenata, izmjerivši visoke vrijednosti λ_s koeficijenta za AITD ($\lambda_s=16,9$), GD ($\lambda_s=11,6$) i HT ($\lambda_s= 28,0$) fenotip (10).

Studije parova monozigotnih i dizigotnih blizanaca potvrđuju ulogu genske osnovice u razvoju AITD oboljenja. Pojavnost HT-a u oba blizanca zabilježena je u 55% monozigotnih (MZ), odnosno 0% dizigotnih (DZ) parova u danskoj populaciji (12). U britanskoj populaciji, tiroglobulinska autoprotutijela (TgAb) prisutna u oba blizanca opažena su u 59% MZ i 23% DZ parova (13), a protutijela usmjerena protiv tireoidne peroksidaze (anti-TPOAb) u 47% MZ i 29% DZ blizanaca. Navedeni rezultati ukazuju na značajnu ulogu nasljednih genetičkih čimbenika u razvoju HT.

1.3. Učinci okolišnih faktora na razvoj Hashimotova tireoiditisa

Sama činjenica da je učestalost AITD fenotipa u monozigotnih blizanaca manja od 100%, upućuje i na važnost okolišnih čimbenika u razvoju bolesti (1). Najznačajniji okolišni čimbenici koji se povezuju s razvojem AITD su jod, pušenje, pojedini lijekovi i infekcije.

Jedan od najzanimljivijih okolišnih čimbenika s potencijalnom ulogom u razvoju autoimunih bolesti jest infekcija. Postoje dokazi da infekcija virusom hepatitisa C doprinosi razvoju Hashimotove bolesti (14), a 36% oboljelih od GD oboljenja pokazuje tragove nedavne bakterijske ili virusne infekcije (15).

Mnoge dosadašnje studije dokazale su da pretjerani unos joda hranom i pićem također može utjecati na razvoj i pogoršanje stanja kod oboljelih od HT-a. Naime, apsorpcija i oksidacija jodidnih iona (I^-) u stanicama štitnjače (tireocitima) ključna je za sintezu hormona štitnjače. Oksidaciju (I^-) posreduje enzim tiroidna peroksidaza, a nastali (I^+) sudjeluje u sintezi hormona T3 i T4 vezanjem za tirozilne ostatke tireoglobulina, velikoga glikoziliranog proteina koji osigurava ugradnju jodida u organsku strukturu hormona štitnjače. Tireoglobulin se sintetizira u bazalnom dijelu folikularnih stanica štitnjače, a zatim se izlučuje u koloid – želatinoznu tekućinu unutar okruglastih folikula koje oblaže jednoslojni epitel tireocita. Unutar koloida, tireoglobulin služi za pohranu hormona T3 i T4. Nakon TSH stimulacije, tireoglobulin iz koloida endocitozom dopijeva u lizosome folikularnih stanica, gdje se odvija hidroliza tireoglobulina do sastavnih aminokiselina, pri čemu se hormoni T3 i T4 oslobađaju iz bazalnog dijela stanice u krvotok (16). Prekomjeren unos joda dovodi do povišene iodinizacije tireoglobulina, te potencijano doprinosi razvoju novih tireoglobulinskih epitopa i povećanju antigenskog potencijala tireoglobulina. S druge strane, djelovanjem enzima tiroidne peroksidaze dolazi do oksidacije suvišnih jodidnih iona (I^-), proizvodnje visoko reaktivne hipojodidne kiseline i kisikovih radikala koji uzrokuju oštećenje stanične membrane i nekrozu tireocita, čime potencijalno olakšavaju prezentaciju autoantigena i aktivaciju autoimunog odgovora. Jod također stimulira aktivnost makrofaga, povećava sazrijevanje dendritičkih stanica i broj cirkulirajućih limfocita T, testimulira proizvodnju imunoglobulina, koji zajedničkim djelovanjem mogu dovesti do pokretanja autoimunune reakcije (16).

Pušenje se pokazalo rizičnim faktorom za razvoj Gravesove bolesti, a u HT učinci su nejasni (17,18). Liječenje interferonom α (INF- α) na tireocite djeluje toksično i potiče razvoj autoimunog odgovora u HT. Korištenje lijeka alemtuzumab (antiCD52), primjerice uzrokuje depleciju limfocita, te stvaranje autoreaktivnih limfocitnih klonova. Zbog nastanka tih komplikacija, uporaba ovog lijeka povezuje se s patogeneom AITD (19).

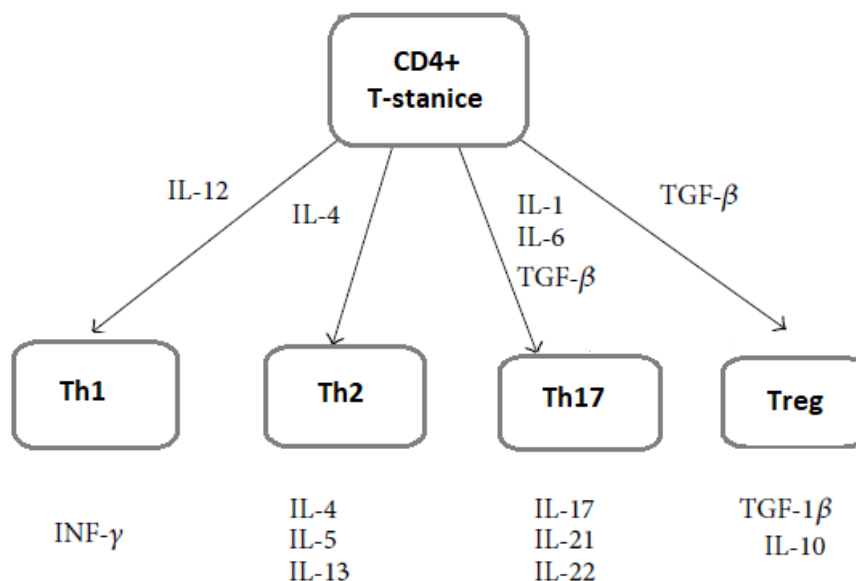
1.4. Patogeneza Hashimotove bolesti

1.4.1. Prezentacija antigena

U razvoju HT značajnu ulogu imaju stanični i humoralni imunološki odgovor, ali etiologija bolesti još uvijek je nerazjašnjena. Vjeruje se da autoreaktivni imunološki odgovor u štitnjači započinje upalnom reakcijom koja se razvija kao odgovor na oštećenje tireocita izazvano okolišnim čimbenicima. Stanične komponente oštećenih tireocita endocitozom dopijevaju u unutrašnjost antigen predočnih stanica (APC, engl. *Antigen Presenting Cells*), koje ih zatim prezentiraju na svojoj površini u kompleksu s molekulama glavnog sustava tkivne snošljivosti (MHC, engl. *Major Histocompatibility Complex*). Prezentacija štitnih antigena u kompleksu s MHC molekulama razreda II pospješuje aktivaciju CD4⁺ pomoćničkih limfocita T koji su izbjegli kontrolnim mehanizmima centralne i periferne tolerancije. Njihovu aktivaciju osigurava vezanje antigen-MHC II kompleksa za T-stanični receptor. Osim primarnog signala, za aktivaciju limfocita T potrebna je dodatna stimulacija u vidu upalnih citokina i kostimulacijskih receptora na površini antigen prezentirajućih stanica. Kostimulacijski receptor B7 može vezati pozitivni (CD28) ili negativni (CTLA-4, engl. *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein*) regulator aktivacije limfocita T i tako usmjeriti razvoj imunološkog odgovora. Aktivirane antigen predočne stanice, pak potiču razvoj upalnog mikrokoliša, izlučivanjem upalnih citokina, IL(interleukin)-1, IL-6, INF- γ (engl. *Interferon-gamma*), TNF- α (engl. *Tumor Necrosis Factor Alpha*) te stimuliraju susjedne tireocite na ekspresiju kemokinskih liganada i MHC molekula. Budući da MHC II molekule nisu izražene na površini normalnih tireocita, nego samo kod oboljelih od HT-a, tkivna ekspresija MHC II molekula povezuje se s razvojem i napredovanjem bolesti (1).

1.4.2. Odgovor limfocita T

Ovisno o načinu predočavanja antigena, kostimulacije i citokinskog mikrokoliša limfociti T diferenciraju u Th1 (engl. *T helper cell*), Th2, Th17 ili regulatorne Treg (engl. *Regulatory T-cells*) pomoćničke stanice (**Slika 2**).



Slika 2. Diferencijacija CD4⁺ limfocita T (Preuzeto i prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 5.)

CD4⁺ Th1 limfociti luče IL-2, INF-γ i TNF-α, te na taj način stimuliraju aktivaciju makrofaga, prirodno ubilačkih (NK, engl. *Natural Killer*) i citotoksičnih (CTL, engl. *Cytotoxic T-Lymphocyte*) stanica, koje potom zahvaćaju tkivo štitnjače i uništavaju tiroidne folikularne stanice. Razvoj Th1 imunološkog odgovora potaknut je združenim djelovanjem B7.1 kostimulacijskog signala i upalnog citokina IL-12. U tkivu štitnjače pacijenata sa HT bolesti zabilježen je povećan udio Th1 limfocita (20).

Th2 imunološki odgovor stimulira vezanje CD28 i B7.2 kostimulacijskog receptora, te djelovanje citokina IL-4 i IL-10. CD4⁺ Th2 limfociti stimuliraju razvoj limfocita B i plazma stanica koje proizvode protutijela usmjerena protiv štitnih antigena i na taj način pospješuju razvoj autoimunog tireoiditisa (6).

Nedavna istraživanja pokazala su značajnu ulogu Th17 limfocita u razvoju HT (21). U serumu zdravih osoba Th17 stanice čine oko 1% svih CD4⁺ limfocita T, a obilježava ih ekspresija transkripcijskog čimbenika ROR γ t (engl. *RAR-related orphan receptor gamma t*) i lučenje upalnih citokina poput IL-17A, IL-17F, IL-12, IL-19, IL-21 i IL-22. Razvoj Th17 imunološkog odgovora stimulira združeno djelovanje faktora rasta TGF- β (engl. *Transforming Growth Factor beta*) i citokina IL-6, IL-21 i IL-23 (22). TGF- β ima dvojaku ulogu; samostalnim djelovanjem inhibira diferencijaciju Th17 stanica i potiče razvoj regulatornih Treg limfocita (21,23).

U odnosu na zdrave osobe, u serumu oboljelih od HT-a zabilježena je povišena razina IL-6 i IL-23 te povećan broj Th17 limfocita u perifernoj krvi i tkivu štitnjače (21). Također, opisan je smanjeni udio Treg populacija u HT ispitanika, te pozitivna korelacija između povećanog omjera Th17/Treg limfocita i koncentracije TgAb (24). Slične studije proveli su Bossowski i sur. koji su proučavali djecu s neliječenim HT-om, te su u njihovom serumu otkrili povišenu razinu IL-17 i IL-23 i povećan broj Th17 limfocita (25). Ta istraživanja potvrdila su značajnu ulogu Th17 CD4⁺ limfocita T u razvoju HT bolesti (6,26).

Regulatorne Treg-stanice čine manju populaciju pomoćničkih limfocita T (5-10%), koje obilježava visoka ekspresija površinskog receptora CD25 i transkripcijskog čimbenika Foxp3 (engl. *Forkhead box P3*), te supresivna aktivnost u svrhu regulacije aktivnog imunološkog odgovora. Treg stanice mogu prigušiti imunološki odgovor direktnim kontaktom, ili indirektno, lučenjem citokina TGF- β i IL-10 (27). Također, imaju mogućnost potisnuti proliferaciju CD8⁺ limfocita in vitro, NK stanica i dendritičkih stanica (1,6). U perifernoj krvi oboljelih, zabilježene su numeričke i funkcijske aberacije CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg limfocita (24, 28).

1.4.3. Odgovor limfocita B

Prisutnost limfocita B u štitnjači AITD oboljelih važna je karika u patogenezi bolesti. Limfociti B ne samo da su ključni za stvaranje autoprotutijela, nego su važni za razvoj i održavanje autoimunog odgovora. Nakon aktivacije in vitro, limfociti B sazrijevaju u plazma stanice i sintetiziraju TgAb, TPOAb i TSHRab protutijela (29). Studija koju su proveli Ben-Skowornek i sur. otkriva povišene koncentracije plazma stanica u pacijenata sa Hashimotovim tireoiditisom. Gotovo polovicu mononuklearnog tiroidnog infiltrata čine CD79⁺ alfa plazma

stanice, a na mjestima akumulacije plazma stanica u tkivu štitnjače vidljivi su uništeni tiroidni folikuli i tireociti (30).

1.4.4. Protutijela na tireoidnu peroksidazu (TPOAt)

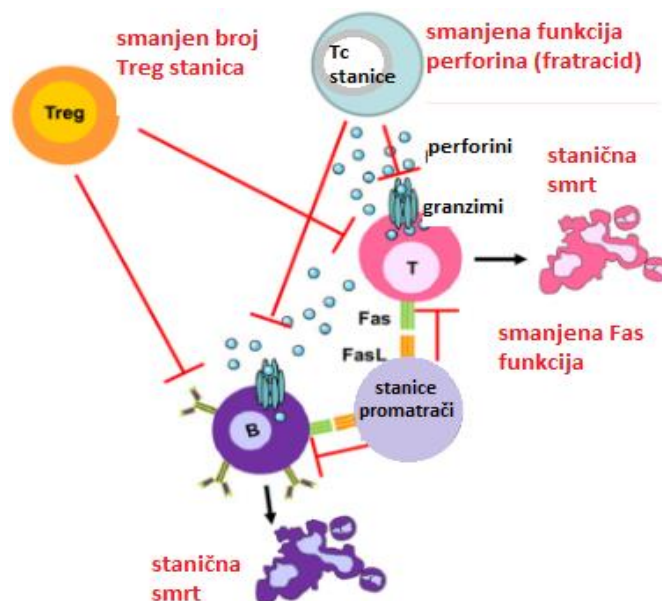
U serumu oboljelih od HT-a najčešća protutijela su usmjerena protiv tireoidne peroksidaze (TPOAb). Nalazimo ih u >90% svih oboljelih, a mjerenje njihove razine može služiti tek za ograničenu procjenu rizika za razvoj hipotireoze (31). Protutijela TPOAb imaju svojstvo vezanja i aktivacije sustava komplementa koji uzrokuje lizu stanica štitnjače stvaranjem kompleksa koji napada membranu (MAC, engl. *Membrane Attack Complex*). Osim aktivacije komplementa, TPOAb posreduju staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima, te ciljano uništavanje tireocita. Štoviše, visok titar TPOAb povezan je s povećanom frekvencijom limfocita T koji luče upalne citokine poput INF- γ i TNF- α (31).

1.4.5. Protutijela na tireoglobulin (TgAt)

Tireoglobulin je glikoprotein molekularne mase 660 kDa, te kao glavni sastojak folikula štitnjače čini 80 % proteinskog sadržaja štitnjače. Iako Tg protutijela nisu najspecifičniji biljeg u dijagnostici HT, Tg je značajan u ulozi potencijalnog uzročnog epitopa u inicijaciji bolesti (32), te je prepoznat kao jedan od ključnih nasljednih čimbenika u razvoju AITD fenotipa. Patogena uloga TgAb u razvoju HT-a nije u potpunosti razjašnjena. TgAb su zabilježena u većini bolesnika s kroničnim autoimunim tireoiditisom, ali njihova korelacija s aktivnošću bolesti nije dokazana (33).

1.4.6. Izvršni mehanizmi oštećenja štitnjače

U HT, oštećenje tireocita uzrokuju humoralno i stanično posredovani imunološki mehanizmi. Poznato je više mehanizama staničnog oštećenja: stanična citotoksičnost ovisna o protutijelima (ADCC, engl. *Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*), Fas/FasL posredovana apoptoza tireocita i direktni CD8⁺, CD4⁺ citotoksični učinak koji je MHC I i MHC II ograničen, te posredovan granularnom egzocitozom proteolitičkih enzima, perforina, i granzima (**Slika 3**) (1).



Slika 3. Prikaz mehanizama citotoksičnog djelovanja limfocita T (Preuzeto i prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 34.)

Protutijela usmjerena protiv glavnih tiroidnih antigena, poput tireoglobulina i tiroidne peroksidaze, igraju nejasnu ulogu u razaranju tireocita. Tireoidna protutijela u štitnjači vezuju komponente sustava komplementa koje uzrokuju sintezu MAC kompleksa i oštećenje stanične membrane. Oštećene stanice oslobađaju upalne molekule kao što su prostaglandini, IL-1 i IL-6 koje mogu aktivirati okolne imunostne stanice i tako utjecati na proširenje patološkog imunostnog odgovora.

Staničnu citotoksičnost posredovanu protutijelima pak posreduju stanice prirodne ubojice (NK, engl. *Natural Killer*). Te stanice izražavaju FcγRIII receptore koji prepoznaju Fc regiju protutijela vezanih na površini tireocita i posreduju uništenje stanica štitnjače egzocitozom perforina i granzima (35). Liu i sur. zabilježili su povećan broj NK stanica u oboljelih od HT-a, što upućuje na njihovu ulogu u patogenezi HT-a (26).

Ključnu ulogu u razvoju i progresiji autoimunog tireoiditisa imaju ipak direktni učinci citotoksičnih limfocita T (CTL). T-stanična citotoksičnost usmjerena na ciljane stanice posredovana je djelovanjem receptora smrti i otpuštanjem citotoksičnih granula s pohranjenim perforinima i granzimima. Perforini stvaraju pore u staničnoj membrani ciljnih stanica i pospješuju lizu stanice osmozom, a granzimi aktiviraju kaspaznu kaskadu koja vodi stanicu u apoptozu. Tijekom autoimunog odgovora u štitnjači, tireociti izražavaju MHC I i MHC II molekule, te su stoga ciljane mete CD4⁺ i CD8⁺ citotoksičnih limfocita T. CTL također izražavaju ligande koji nakon vezanja receptora smrti na površini tireocita stimuliraju njihovu

apoptozu aktivacijom kaspaza (35).

Receptori smrti (engl. *Death Receptors*) pripadaju skupini receptora tumor nekroza faktora (TNFR, engl. *Tumour-Necrosis-Factor Receptor*), koji nakon vezanja liganda na površini ciljnih stanica posreduju programiranu smrt ili staničnu apoptozu (35).

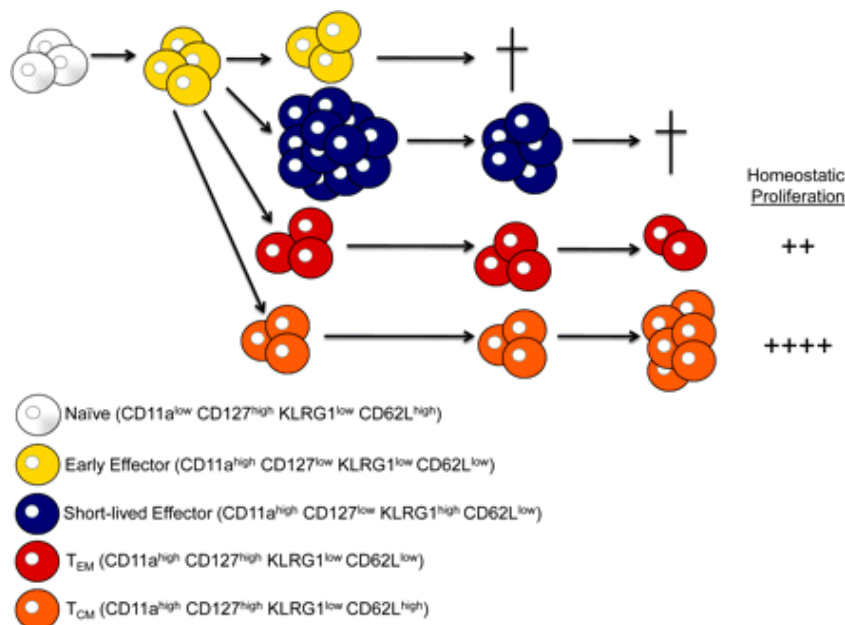
Izvršni mehanizam staničnog oštećenja često prisutan u podlozi razvoja AITD oboljenja jest apoptoza inducirana vezanjem Fas (CD95)/Fas ligand (CD178) receptora. Aktivirane CTL stanice na svojoj površini izražavaju Fas ligand (FasL) i vezanjem za Fas receptor na površini ciljnih stanica pokreću kaskadu kaspaznih proteaza i uzrokuju posljedičnu smrt stanice. U fiziološkim uvjetima, tireociti pokazuju kontinuiranu ekspresiju FasL molekula, a pojava upalnih procesa pospješuje i ekspresiju Fas receptora. Istodobna pojava Fas receptora i njegovog liganda na površini tireocita uzrokuje posljedični suicid ili fratricid stanica štitnjače (36).

Druga vrsta liganada receptora smrti, poput molekula TNF- α (engl. *Tumor Necrosis Factor*) i TRAIL (engl. *TNF-related Apoptosis-inducing Ligand*), također sudjeluju u uništavanju tireocita. TNF- α proizvode imunociti i tireociti tijekom autoimunog tireoiditisa (35). TNF- α i FasL zajedno posreduju destrukciju tireocita u HT bolesti (37).

1.5. Uloga CD8⁺ T limfocita u razvoju Hashimotove bolesti

Zadnjih nekoliko godina proučava se uloga CD8⁺ citotoksičnih limfocita T i njihovih subpopulacija u razvoju Hashimotove bolesti. Te stanice čine značajan udio limfocitnog infiltrata u HT oboljelih i pronađene su među tireocitima, unutar folikula, te unutar novonastalog terciarnog limfoidnog tkiva, strukturom i funkcijom nalik tkivu primarnih (timus i koštana srž) i sekundarnih (limfni čvorovi) limfoidnih organa. Kolokalizacija limfocita T, B i dendritičkih stanica unutar germinativnih centara terciarnog limfoidnog tkiva u štitnjači, pospješuje aktivaciju autoreaktivnih limfocitnih loza. Nakon vezanja antigen-MHC I kompleksa na površini ciljnih stanica, aktivirani citotoksični CD8⁺ limfociti T, diferenciraju u izvršne (efektorske) loze koje posreduju destrukciju tireocita citokinskom ozljedom i apoptozom (38). Nakon aktivacije i klonalne proliferacije, glavnina kratkoživućih efektorskih stanica (SLEC, engl. *Short Lived Effector Cells*) umire apoptozom, a dio preživjelih antigen-specifičnih CD8⁺ stanica formira dugoživući memorijski odjeljak (MPEC, od engl. *memory precursor effector cells*), koji nakon ponovnog susreta sa antigenom, podliježe brzom reaktivaciji

i reekspanziji (**Slika 4**) (39). Proces diferencijacije efektorskih linija prati povećana ekspresija površinskih markera CD44 i CD69, KLRG1 (engl. *Killer Cell Lectin-like Receptor G1*) i CD25 receptora, dok je ekspresija L-selektina (CD62L), receptora za IL-7 (IL-7R α ili CD127) i CD27 receptora smanjena u odnosu na ekspresiju istih na površini naivnih limfocita T. Memorijske CD8⁺ stanice, koje možemo uočiti već u ranoj fazi imunološkog odgovora, razlikuju se od efektorskih zbog visoke ekspresije CD44, niske razine CD25 i kontinuirane ekspresije CD127 i CD27 receptora. Memorijske CD8⁺ loze izražavaju smanjenu razinu KLRG1 receptora, među kojima efektorske memorijske (T_{EM}) linije obilježava smanjena, a centralne memorijske (T_{CM}) stanice povećana ekspresija površinskog biljega CD62L. T_{EM} obično borave u perifernim tkivima i zadržavaju visoki citotoksični kapacitet, a T_{CM} se uglavnom udomljavaju u sekundarnim limfoidnim organima i posreduju snažu reaktivaciju imunološkog odgovora pri susretu s antigenom (39).



Slika 4. Shematski prikaz CD8⁺ T staničnog odgovora (Preuzeto i prilagođeno prema shematskom prikazu iz reference 39.)

Do danas je opisano više heterogenih subpopulacija CD8⁺ citotoksičnih limfocita T (Tablica 1). Novije studije ukazuju na značajnu ulogu efektorskih linija u patogenezi HT-a, posebice Tc1 (31) Tc17 (26) i prirodno-bilačkih T (NKT) stanica (40), koje izlučuju upalne citokine tipa I (INF- γ , engl. *Interferon Gamma*) i/ili tipa 17 (IL-17A, IL-17F) te pospješuju stvaranje novih autoreaktivnih stanica i širenje upalnog odgovora. Opisan je i doprinos CD8⁺CD28⁻ memorijskih efektor, koje obilježava dugovječnost, smanjeni prag aktivacije te visoki citotoksični i proliferativni kapacitet (41).

Tablica 1. Prikaz subpopulacija efektorskih CD8⁺ T- stanica, njihovih poznatih funkcija i transkripcijskih faktora koji kontroliraju njihov razvoj

Tip	Važni transkripcijski faktori	Efektorske molekule	Funkcija
Tc1	T-bet, Blimp-1, Id2, IRF4	IFN- γ , TNF- α , granzimi, perforini	Imunološko djelovanje protiv intracelularnih patogena i tumora
Tc2	GATA3 (GATA Binding Protein 3)	IL-5, IL-13, IL-4, granzimi, perforini	Širenje Th2-posredovanih alerfija, doprinos razvoju artritisa
Tc17	ROR γ t, ROR α , IRF4	IL-17, IL-21	Širenje autoimunosti, imunološki odgovor na virusne infekcije, doprinos anti-tumorskim odgovorima
CD8⁺ Treg	Foxp3	TGF- β , IL-10, granzimi, perforini	Regulacija T-stanično posredovanog odgovora

1.5.1. Subpopulacije CD8⁺ limfocita T

Tc1 citotoksični limfociti T pripadaju subpopulaciji efektorskih CD8⁺ limfocita T i imaju ključnu ulogu u uništavanju unutarstaničnih patogena. Te stanice imaju sposobnost otpuštanja citotoksičnih molekula i sekrecije upalnih citokina poput INF- γ i TNF- α koji posreduju imunološki odgovor protiv unutarstaničnih patogena (42).

Diferencijacija naivnih CD8⁺ limfocita T u efektorske Tc1 stanice potaknuta je djelovanjem upalnih citokina, kao što su IL-2 i IL-12. Uz citokine, diferencijaciju Tc1 limfocita nadziru transkripcijski regulatori, T-bet (engl. *T-box Transcription Factor*), Blimp-1 (engl. *B lymphocyte-induced Maturation Protein-1*) i IRF4 (engl. *Interferon Regulatory Factor*) koji doprinose razvoju efektorskih, a BCL-6 (engl. *B-cell Lymphoma 6 Protein*), Eomesodermin (Eomes), Id-3 (engl. *DNA-binding Protein Inhibitor ID-3*), TCF-7 (engl. *Transcription Factor 7*) i FOXO1 (engl. *Forkhead Box Protein O1*) razvoju memorijskih Tc1 limfocitnih loza (42).

Tc2 citotoksični limfociti T pripadaju subpopulaciji CD8⁺ stanica, a njihov nastanak može se potaknuti u uvjetima in vitro, stimulacijom u prisutnosti IL-4. Te stanice proizvode IL-5 i IL-13, što ih čini vrlo sličnima Th2 stanicama. Ovisno o tipu imunološkog odgovora, Tc2

stanice mogu steći nisku ili visoku citotoksičnost. Njihova prisutnost vezana je uz nastanak alergijskih reakcija, gripe i reumatoidnog artritisa (42).

Upalni citokini poput IL-6, IL-21 i TGF- β igraju značajnu ulogu u diferencijaciji Tc17 CD8⁺ limfocita T. Tc17 stanice proizvode IL-17 i IL-21, te izražavaju receptore za IL-23 i transkripcijske čimbenike ROR γ t (engl. *RAR-related Orphan Receptor gamma t*) i ROR α (engl. *RAR-related Orphan Receptor alpha*) (42). Tc17 limfociti štite domaćina od virusnih infekcija i posreduju regresiju tumora, ali također doprinose razvoju autoimunih oboljenja poput multiple skleroze, dijabetesa, kolitisa i psorijaze (43). U nedavnom istraživanju koje su proveli Liu i sur., zabilježen je povećan udio Tc17 limfocita u HT oboljelih u odnosu na zdrave kontrole, čime je potvrđena povezanost Tc17 limfocita s nastankom Hashimotove bolesti (26).

1.5.2. Transkripcijski faktori citotoksičnih/CD8⁺ limfocita

PLZF (engl. *Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*) je transkripcijski regulator koji pripada obitelji proteina sa širokim spektrom bioloških aktivnosti, te značajnim utjecajem na razvoj i funkciju imunološkog sustava. Upravo zbog utjecaja na razvoj akutne promijelocitne leukemije PLZF je i prvi identificiran u skupini BTB-ZF proteina (engl. *Bric-a-brac or Poxvirus and Zinc Finger-zinc Finger*). Nedavno je dokazano da je PLZF rani transkripcijski regulator diferencijacije NKT stanica i efektorsko-memorijskih CD8⁺ stanica, koje dijele prirodene i adaptivne karakteristike. Kovalovsky i sur. otkrili su da je PLZF jako izražen u ljudskim i mišjim NKT stanicama tipa 1 (iNKT, engl. *Invariant Natural Killer T Cells*) (44). Te stanice prepoznaju lipidne antigene u kompleksu s CD1d površinskim molekulama, te sudjeluju u regulaciji funkcije različitih imunskih stanica. Istraživanja na mišjim modelima koja su proveli Eidson i sur. pokazala su nedvojbenu ulogu PLZF u razvoju NKT stanica i njihovih efektorskih svojstava. Naime, otkriveno je da u odsustvu PLZF transkripcijskog faktora, iNKT stanice gube karakteristični memorijski fenotip, ne izražavaju granzim B i IL-4, gube sposobnost proizvodnje citokina prilikom primarne stimulacije te više nalikuju naivnim limfocitima T. Također, otkrivena je PLZF ekspresija u citotoksičnim $\gamma\delta$ i MAIT T-stanicama, pripadnicima urođene imunosti koje izražavaju TCR (engl. *T-cell Receptor*) receptor sastavljen od gamma i delta, odnosno V α 7.2 lanca. PLZF^{-/-} $\gamma\delta$ T-stanice gube sposobnost sekrecije INF- γ i IL-4 prilikom primarne stimulacije, što potvrđuje značajnu ulogu PLZF faktora u razvoju stanica urođene imunosti (45). Nadalje, dokazano je da inducirana ekspresija gena PLZF u

CD8⁺ limfocitima T transgeničnih animalnih modela dovodi do povećane ekspresije CD44, odnosno smanjene ekspresije CD62L površinskih biljega, karakterističnih obilježja memorijske loze CD8⁺ limfocita T. Osim ovih površinskih markera, u CD8⁺ PLZF⁺ T stanica, uočena je i povišena ekspresija CD127 (IL-7R) receptora, što je također karakteristika dugoživućih memorijskih T-stanica. Funkcijski, takvi limfociti dijele obilježja adaptivne i prirodne imunosti, poput ekspresije KIR i NKG2A molekula, brze sekrecije IFN- γ u odgovoru na stimulaciju s IL-12/IL-18, te ekspresije transkripcijskog čimbenika EOMES. U konačnici, iz ovih rezultata zaključujemo kako PLZF ekspresija dovodi do regulacije specifičnih biljega povezanih sa razvojem i funkcijom memorijskih limfocita T nalik NK stanicama i iNKT stanica (46).

RUNX3 (engl. *Runt-related Transcription Factor 3*) je transkripcijski čimbenik ključan za diferencijaciju efektorskih CD8⁺ CTL. Zajedno s T-box transkripcijskim čimbenicima, T-bet i Eomesodermin, RUNX3 pospješuje razvoj i citotoksični kapacitet efektorskih CD8⁺ CTL. Naime, RUNX3 izravno upravlja ekspresijom tri glavna čimbenika efekorskog CTL programa: INF- γ , granzim B (GZMB) i perforin. RUNX3 je također nužan za ekspresiju gena EOMES, te združenim djelovanjem potiču prepisivanje Prf lokusa vežući se za njegov promotor. U sinergiji s T-bet, RUNX3 stimulira ekspresiju INF- γ , time stabilizira efektorski fenotip i promovira razvoj Tc1 efektorske loze. Odsustvo RUNX3 transkripcijskog čimbenika u limfocitima T animalnih mišjih modela, uzrokuje oslabljenu sposobnost diferencijacije CD8⁺ CTL stanica te smanjenu sintezu granzima B i INF- γ (47,48,49).

ROR γ t je transkripcijski čimbenik koji upravlja diferencijacijom pomoćničkih Th17, te citotoksičnih MAIT i Tc17 limfocita. Gen RORC kodira transkripcijski faktor ROR γ t, koji regulira ekspresiju upalnog citokina IL-17 i receptora za interleukin 23 (IL-23R). ROR γ t zajedno s transkripcijskim čimbenikom PLZF regulira diferencijaciju visokopatogenih, citotoksičnih Tc17 limfocita, te posreduje razvoj Tc17 fenotipa indukcijom kemokinskog receptora CCR6 (50). Odsustvo ROR γ t rezultira ranom apoptozom CD4⁺ i CD8⁺ timocita i dovodi do preranjenog, nekontroliranog ulaska T stanice u S-fazu staničnog ciklusa (51).

FOXO1 (engl. *Forkhead Box O*) dolazi iz FOXO obitelji transkripcijskih čimbenika koji imaju ulogu u regulaciji staničnih procesa kao što su proliferacija, apoptoza i stanični metabolizam. FOXO1 igra važnu ulogu u održavanju homeostaze i regulaciji periferne tolerancije limfocita T. Inaktivacija FOXO1 potiče ulazak limfocita T u ciklus stanične diobe, a deficijencija FOXO1 povezuje se s razvojem povećanog broja aktiviranih CD44^{hi} CD62L^{low}

limfocita (52) i pojavom autoimunosti. Nedavna istraživanja opisala su ulogu FOXO1 u diferencijaciji efektorskih u memorijske CD8⁺ stanice, sazrijevanju i preživljavanju memorijskih CD4⁺ i CD8⁺ limfocita, te u očuvanju memorijskog fenotipa i funkcije CD8⁺ T stanica (53). Naime, FOXO1 omogućuje diferencijaciju memorijskih limfocita T tako što suprimira sazrijevanje tip 1 efektorskih stanica inhibicijom ekspresije transkripcijskog čimbenika T-bet i stimulacijom transkripciju gena EOMES (54).

Unatoč nedavnom značajnom napretku u razumijevanju transkripcijskih mehanizama koji reguliraju aktivaciju i diferencijaciju CD8⁺ CTL stanica, gotovo ništa nije poznato o njihovoj eventualnoj ulozi u pojavi, progresiji i ishodu Hashimotove bolesti. Jednako tako, gotovo ništa nije poznato o promjenama transkriptoma CD8⁺ CTL u Hashimotovoj bolesti ni eventualnoj povezanosti tih promjena s oštećenjem štitnjače i obilježjima bolesti. U tom smislu, uloga PLZF, RUNX3, RORC i FOXO1 transkripcijskih čimbenika u HT-u ostaje neistražena.

2. HIPOTEZA

1. Ekspresijski profili gena koji sudjeluju u procesu diferencijacije CD8⁺ limfocita T razlikuju se u između zdravih ispitanika i pacijenata oboljelih od Hashimotove bolesti.
2. Promjene u genskoj ekspresiji ispitivanih gena povezane su s progresijom Hashimotove bolesti prema hipotireozu, i nadomjesnom hormonskom liječenju.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

1. Ispitati ekspresiju transkripcijskih čimbenika PLZF, RUNX3, RORC i FOXO1 u postojećoj biobazi RNA uzoraka prethodno izoliranih iz perifernih limfocita T pacijenata oboljelih od Hashimotove bolesti i zdravih ispitanika.
2. Ustanoviti transkripcijske profile ispitivanih gena u kontrolnoj i HT skupini, te odrediti njihovu povezanost s volumenom štitnjače, serumskom razinom hormona TSH, FT3 i FT4, anti-TPO antitijela, te dozom nadomjesne hormonske terapije.
3. Utvrditi međugenske korelacije ekspresije, te utjecaj dobi na ekspresiju ispitivanih gena.

4.MATERIJALI I METODE

4.1.Materijali

4.1.1. Ispitanici

Za istraživanje je prikupljena periferna krv 11 zdravih (CTRL) i 35 odraslih, nesrodnih bolesnika iz istočne Hrvatske kojima je dijagnosticiran Hashimotov tireoditis u Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja, Kliničkog bolničkog centra Osijek. Odabir ispitanika kontrolne i HT skupine, te prikupljanje i izolacija biološkog materijala prethodno su provedeni u okviru studije koja je odobrena od strane Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek. (Potvrda br. 29-1:9890-11/2007).

Hashimotova bolest dijagnosticirana je na temelju pozitivnog nalaza serumskih vrijednosti anti-TPO, karakterističnog nalaza ultrazvuka štitnjače, te specifičnih citopatoloških obilježja u razmazima tkivnih aspirata dobivenih ciljanom punkcijom štitnjače pod kontrolom ultrazvuka. Ovisno o stupnju funkcijskog oštećenja štitnjače, skupina bolesnika nadalje je podijeljena u tri podskupine ispitanika:

- 1) spontano eutiroidni (euHT, n=13);
- 2) hipotiroidni, liječeni L-tiroksinom (n=12);
- 3) hipotiroidni, neliječeni (hipoHT, n=10);

Skupina hipotiroidnih liječenih ispitanika tretirana je nadomjesnom terapijom, L-tiroksinom (L-T4) u dozi koja normalizira serumski TSH, sukladno tjelesnoj masi i dobi [primjenjena prosječna doza L-T4 = 1,16 (interkvartilni raspon (0.96-1.3) µg/kg].

Kontrolna skupina sastavljena je od 11 odraslih, zdravih, nesrodnih, eutiroidnih ispitanika s urednim nalazom ultrazvuka štitnjače, bez obiteljske anamneze bolesti štitnjače, autoimunih ili endokrinih bolesti, u kojih je analizom krvi potvrđeno odsustvo anti-TPO protutijela.

Primarna hipotireoza i isključni kriteriji definirani su kako je ranije navedeno (55, 56), a mjerenje FT4, TSH, volumena štitnjače i TPOAb učinjeni su kako je ranije opisano (56). Probir ispitanika kontrolne i HT skupine, te prikupljanje krvi i izolacija RNA iz perifernih limfocita T prethodno su provedeni u okviru studije (56) koja je odobrena odlukom Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Osijek (Potvrda br. 29-1:9890-11/2007).

4.1.2. Upotrijebljene kemikalije:

- PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Nojihigashi, Japan)
- TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD) (Tablica 2)
- Single Tube TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD)

Tablica 2. Popis TaqMan proba i veličina amplicona istraživanih gena

ID testa	Skraćenica gena	Naziv gena	Pristupni broj u banci gena	Veličina PCR odsječaka
Hs00232313_m1	PLZF (ZBTB16)	Promyelocytic leukemia zinc finger	NM_001018011.1	67
Hs01091094_m1	RUNX3	Runt-related transcription factor 3	NM_001031680.2	108
Hs00231709_m1	RUNX3	Runt-related transcription factor 3	NM_001031680.2	77
Hs01076112_m1	RORC	RAR-related Orphan Receptor C	NM_001001523.1	62
Hs00231106_m1	FOXO1	Forkhead box protein O1	NM_002015.3	103
Hs99999910_m1	TPB	TATA box binding protein	NM_003194.4	127

4.2. Metode

4.2.1. Sinteza cDNA

Sinteza cDNA iz ukupne RNA učinjena je metodom reverzne transkripcije, upotrebom komercijalnog kita „PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit“.

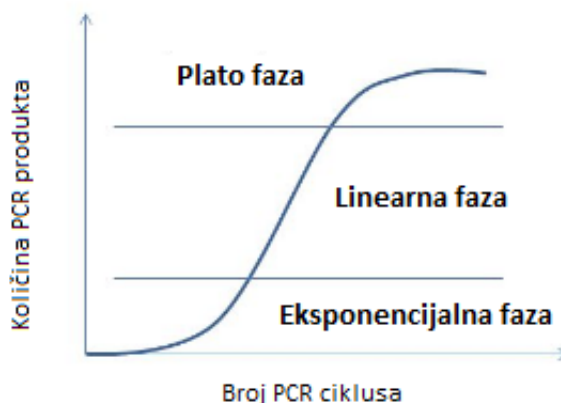
Postupak: u ukupnu reakcijsku smjesu (20 μ l) dodano je 3 μ l RNase Free dH₂O , 4 μ l 5 \times PrimeScript™Buffer , 1 μ l Oligo dT početnica, 1 μ l PrimeScript™RT Enzyme Mix smjese, 1 μ l početnica od 6 nasumičnih nukleotida (random hexamers) i 10 μ l ukupne RNA radne koncentracije 20 ng/ μ l. Nakon pripreme reakcijske smjese, uzorci su inkubirani 15 minuta na 37 °C, nakon čega je reakcija reverzne transkripcije zaustavljena zagrijavanjem 5s na 85 °C. Reverzna transkripcija ukupne RNA u cDNA provedena je upotrebom PCR uređaja Proflex 3 x 32-well PCR system (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD). Svi dobiveni cDNA uzorci razrijeđeni su 8 puta, do krajnje koncentracije od 1,25 ng/ μ l, nakon čega su uzorci cDNA alikvotirani i pohranjeni na -20 °C do ponovne upotrebe.

4.2.2. Kvantitativna analiza na real time PCR uređaju

Razina mRNA ekspresije 4 ciljna gena (PLZF, RUNX3, RORC, FOXO1) određena je metodom kvantitativne RT PCR reakcije (RT-qPCR) na uređaju Quant Studio 5 (Applied Biosystems, Foster City, California).

4.2.2.1. Priprema standardne krivulje

RT-qPCR precizna je i pouzdana metoda za kvantifikaciju cDNA koja se temelji na mjerenju fluorescencijskog signala, koji tijekom PCR reakcije raste proporcionalno broju kopija početnog cDNA materijala. Razina fluorescencije mjeri se na kraju svakog PCR ciklusa, stoga je proces amplifikacije moguće pratiti u stvarnom vremenu. Najbrži rast fluorescencije bilježi se tijekom eksponencijalne faze PCR reakcije, kada se cDNA materijal udvostručuje u svakom ciklusu. U linearnoj fazi PCR reakcije, amplifikacija usporava radi nedostatka jedne ili više iskorištenih komponenti smjese, te u konačnici reakcija staje, a fluorescencijski signal stagnira (**Slika 5**).



Slika 5. Faze PCR reakcije

Učinkovitost PCR reakcije može se utvrditi pripremom standardne krivulje koja nastaje amplifikacijom najmanje 5 uzoraka pripremljenih serijskim razrijeđenjem uzorka poznate koncentracije. Po završetku PCR reakcije, primjenom računalnog programa za analizu zabilježenih fluorescencijskih signala, određuje se najniža vrijednost fluorescentnog signala koja značajno nadmašuje nespecifičnu pozadinsku fluorescenciju, odnosno prag fluorescencije, te se izračunava u kojem je ciklusu (threshold cycle, Ct) vrijednost fluorescencije u svakoserijskog razrijeđenja dosegla prag fluorescencije. Izmjerene Ct vrijednosti i logaritamske vrijednosti koncentracije cDNA serijskih razrijeđenja koriste se za pripremu standardne krivulje. Jednadžba pravca $y=ax+b$, opisuje karakter linearnog odnosa između koncentracije i Ct vrijednosti u standardnim uzorcima. U reakciji 100% učinkovitosti očekujemo linearan porast fluorescencije u odnosu na koncentraciju cDNA u uzorcima serijskih razrijeđenja, pa se stoga učinkovitost PCR reakcije može izračunati iz vrijednosti nagiba pravca standardne krivulje prema jednadžbi:

Nagib pravca standardne krivulje određuje se usporedbom omjera Ct vrijednosti i koncentracije cDNA izmjerenih u prvoj i krajnjoj točki standardne krivulje prema jednadžbi:

Postupak: u svrhu pripreme standardne krivulje, odabrano je 6 uzoraka RNA radne koncentracije 30 ng/ μ l, te je učinjena reverzna transkripcija u ukupnom volumenu od 20 μ l. Dobivena cDNA iz 6 reakcijskih tubica potom je združena u 120 μ l, zatim razrijeđena 3 puta na ukupni volumen od 360 μ l, nakon čega je napravljeno 5 serijskih razrijeđenja pri čemu je svaki uzorak razrijeđen 4 puta u odnosu na prethodni. Pripremljeni standardi poznate koncentracije su alikvotirani i pohranjeni na -20°C do ponovne upotrebe.

4.2.2.2. Analiza genske ekspresije pomoću Taq man proba

TaqMan probe su oligonukleotidne probe dizajnirane za kvantitativnu analizu genske ekspresije tijekom PCR reakcije. TaqMan probe sastoje se od fluorofora koji je kovalentno vezan za 5' kraj oligonukleotidne probe i „utišivača“ (engl. *quencher*) na 3' kraju koji absorbira fluorescentno zračenje fluorofora. Tijekom PCR reakcije 5' endonukleazna aktivnost enzima Taq polimeraze osigurava cijepanje TaqMan probe i emisiju fluorescentnog zračenja koje se mjeri na kraju svakog PCR ciklusa.

Postupak: u računalnom programu QuantStudio Design & Analysis Software v 1.3.1, definirani su temperaturni uvjeti PCR reakcije i raspored pipetiranja ispitivanih uzoraka DNA na PCR ploči sukladno shemi na Slici 6. Za umnažanje specifičnih genskih odsječaka korišten je komercijalni komplet TaqMan polimeraze, nukleotida i pufera, TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, Kalifornija, SAD). Amplifikacija ciljanih transkripcijskih čimbenika provedena je na real-time PCR uređaju QuantStudio 5 u 15 μ l ukupne reakcijske smjese, koja je sadržavala 6,75 μ l cDNA, 7,5 μ l smjese TaqMan Universal Master Mix i 0,75 μ l TaqMan Expression kompleta specifičnih početnica i probe. PCR reakcijska smjesa jednoliko je raspodijeljena u mikrotitarske jažice PCR ploče, povrh koje je zatim zalijepljena prozirna plastična folija i ploča je centrifugirana 1 min na 3000 rpm. Amplifikacija DNA materijala provedena je u real-time PCR uređaju QuantStudio 5, tijekom ponavljajućih ciklusa zagrijavanja i hlađenja PCR smjese prema unaprijed zadanom temperaturnom protokolu (Tablica 3). Svi uzorci testirani su u triplikatu.

Tablica 3. Program za RT-qPCR

		Temperatura	Vrijeme
Hold		95 °C	10 min
PCR Stage (40 cycles)	Denature	95 °C	15s
	Anneal/extend	60 °C	1 min
Hold		4 °C	∞

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NC	81	82	38	42	44	26	26	26	817	817	817
B	NC	81	82	38	42	44	57	57	57	34	34	34
C	29	29	29	61	61	61	74	74	74	63	63	63
D	56	56	56	64	64	64	67	67	67	808	808	808
E	28	28	28	25	25	25	76	76	76	68	68	68
F	782	782	782	3	3	3	82	82	82	83	83	83
G	98	98	98	97	97	97	1	1	1	2	2	2
H	31	31	31	77	77	77	93	93	93	803	803	803

Slika 6. Raspored pipetiranja ispitivanih DNA uzoraka na PCR ploči

4.2.2.3. Kvantifikacija genske ekspresije $\Delta\Delta C_t$ metodom

Za analizu genske ekspresije odabrana je metoda relativne kvantifikacije kojom se određuje omjer između količine ciljnog gena i količine kontrolnog ili referentnog gena u ispitivanom uzorku cDNA. Geni za održavanje ključnih staničnih funkcija („housekeeping“ geni) obično se odabiru kao referentni geni. U svakom uzorku provodi se qPCR analiza ciljnog i referentnog gena. Dobivene Ct vrijednosti ciljnog gena normaliziraju se u odnosu na Ct vrijednosti referentnog gena izmjerene u istom uzorku cDNA, te se mogu koristiti za usporedbu diferencijalne ekspresije mRNA u različitim tkivima, ili stanicama različitog porijekla (npr. iz kontrolnih i oboljelih ispitanika).

Postupak: Kvantitativne, Ct vrijednosti ekspresije referentnog (TBP) i ciljnih gena (FOXO1, PLZF, RUNX3, RORC), zabilježene tijekom qPCR reakcije, izvezene su u program Microsoft Excel, gdje su upotrijebljene za analizu razlike mRNA ekspresije ispitivanih gena u HT ispitanika i zdravih kontrola, primjenom metode $\Delta\Delta Ct$ koju su opisali Livak i sur. (57).

U prvom koraku, Ct vrijednosti ciljnih gena izmjerene u populaciji HT i kontrolnih ispitanika, normalizirane su u odnosu na Ct vrijednosti referentnog TBP gena, primjenom sljedećih formula:

$$\Delta CT (\text{uzorak}) = CT \text{ ciljni gen} - CT \text{ referentni gen}$$

$$\Delta CT (\text{kontrola}) = CT \text{ ciljni gen} - CT \text{ referentni gen}$$

U sljedećem koraku, vrijednost $\Delta\Delta CT$ za svaki uzorak određena je na temelju razlike ΔCT vrijednosti ispitivanih uzoraka i ΔCT vrijednosti kontrole, prema formuli:

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

Normalizirana razina ekspresije ciljnih gena određena je pomoću formule:

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

U konačnici, razlike u razini mRNA ekspresije između HT i kontrolnih ispitanika utvrđene su usporedbom normaliziranih vrijednosti genske ekspresije među ispitivanim skupinama.

4.2.3. Statistička analiza rezultata

Kategoričke varijable prikazane su apsolutnim frekvencijama i proporcijama, a omjerne varijable medijanom s interkvartilnim rasponom (IQR). Normalnost distribucije procijenjena je Shapiro-Wilk testom. Statistička značajnost razlike među neovisnim skupinama testirana je neparametrijskim Mann-Whitney ili van der Waerden testom, s post-hoc Bonferroni procedurom (R paketi *kSamples* i *PMCMR*) Povezanost kontinuiranih varijabli procijenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije (ρ). Ukoliko nije drugačije naznačeno, dvostrani $P < 0.05$ predstavlja prag značajnosti. Za grafički prikaz korišten je *ggpubr* paket za R program v3.4.1 (<http://www.R-project.org>).

5. REZULTATI

5.1. Kliničke i biokemijske karakteristike ispitanika

S obzirom na veličinu skupina i odstupanja od normalnosti distribucije, usvojen je neparametrijski pristup u analizi omjernih varijabli. Tablica 4. prikazuje rezultate analize biokemijskih, kliničkih i demografskih obilježja ispitanika. Vidljivo je da nema značajne razlike u dobi između ispitivanih grupa. Serumske FT4 vrijednosti su snižene, a TSH vrijednosti značajno povišene kod hipotiroidnih neliječanih u odnosu na liječene, spontano eutiroidne, i zdrave ispitanike. Značajne razlike TSH vrijednosti između zdravih, oboljelih/eutiroidnih i liječenih hipotiroidnih ispitanika nisu zabilježene.

Tablica 4. Deskriptivna analiza kliničkih i biokemijskih karakteristika HT pacijenata i zdravih kontrola

Skupine	N	Volumen (mL)	FT4 (pmol/L)	TSH (mIU/L)	Dob (god)	TPOAt (kIU/L)
HT, hipotiroidni, neliječeni	10	15.5 (11.6-20.4)	11.2 (10-12.1) ^a	10.35 (6.9-15.2) ^{a,b,c}	50 (40-61)	349 (136-1542)
HT, hipotiroidni, liječeni	12	10.4 (7.2-13.6)	13.9 (12.1-16.3) ^d	2.61 (1.88-3.52)	62 (53-64)	276 (92-1253)
HT, spontano eutiroidni	13	14 (13.1-19.3)	11.5 (11.3-12.5)	2.77 (1.23-4.23)	51 (40-58)	677 (150-2389)
Kontrolni Ispitanici	11	12.6 (10.3-13.3)	12.4 (10.6-13.6)	1.5 (1.11-2.56)	49 (40-62)	neg
P, van der Waerden test		0.041	0.002	0.000022	0.142	-

^a P<0.001, vs HT, hipotiroidni, liječeni

^b P<10⁻⁴, vs HT, spontano eutiroidni

^c P<10⁻⁶, vs kontrole

^d P<0.05, vs HT, spontano eutiroidni

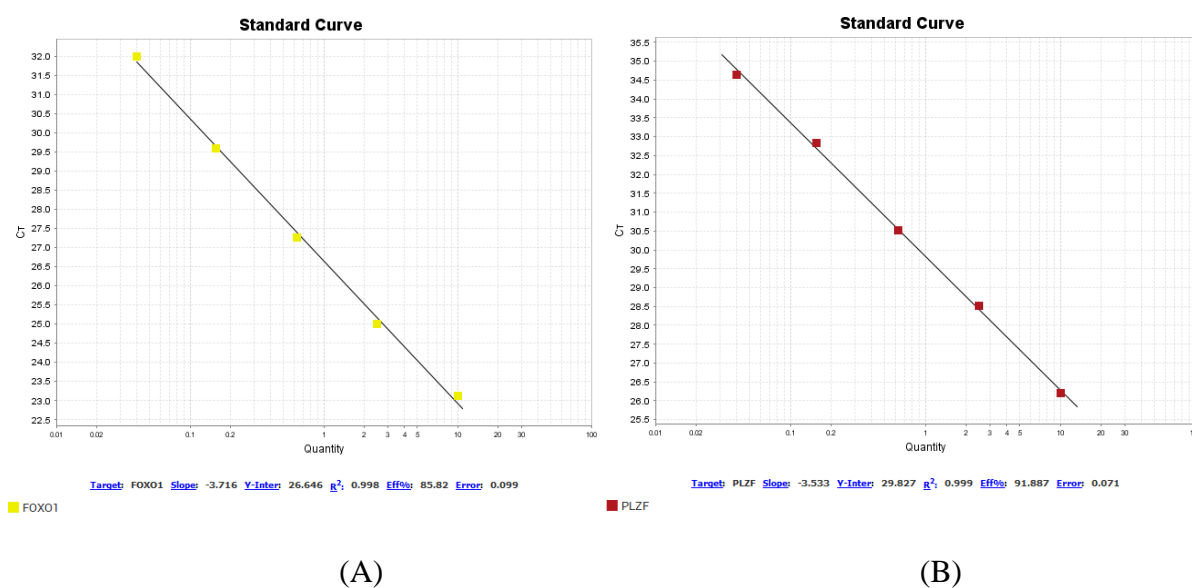
^{a-d} post hoc, Bonferroni test

5.2. Pokazatelji učinkovitosti i preciznosti RT- qPCR reakcija

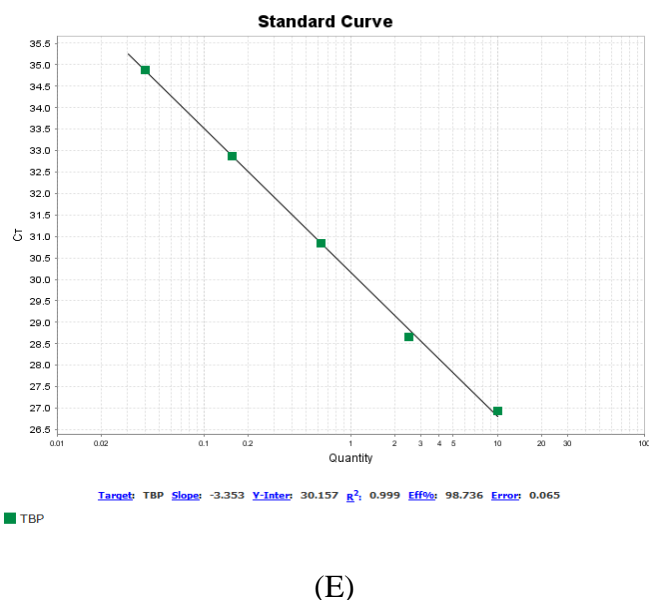
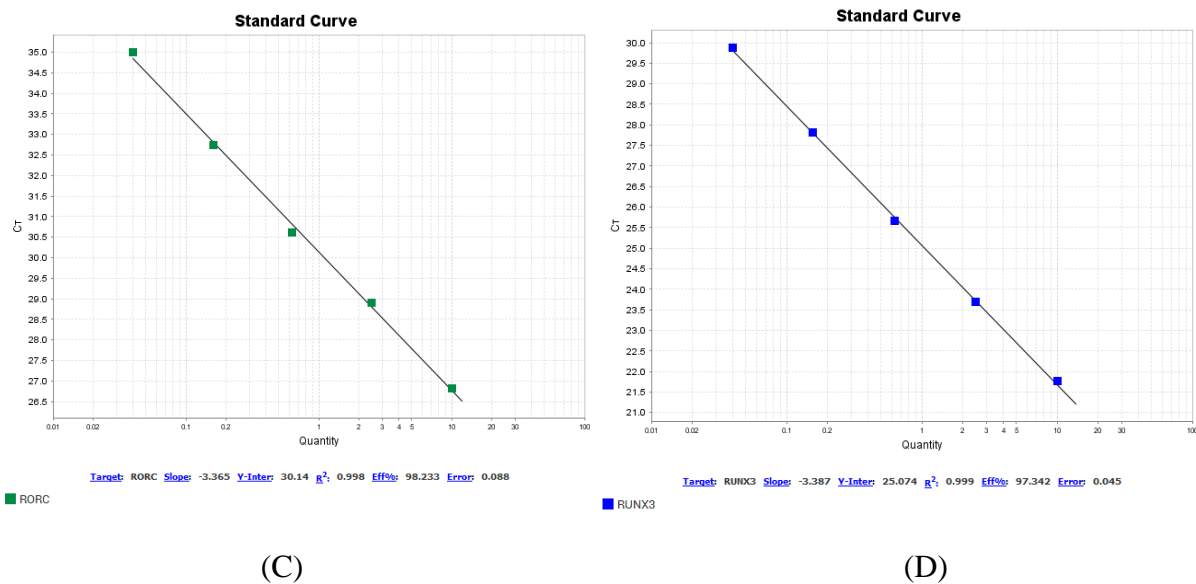
U svrhu procjene učinkovitosti amplifikacije ciljnih gena u ispitivanoj populaciji cDNA uzoraka, tijekom svih qPCR reakcija usporedno su provedena mjerenja Ct vrijednosti ispitivanih uzoraka u triplicatu, i standardnih serijskih razrijeđenja u duplikatu. Svi ispitivani TaqMan kompleti početnica i proba, osim FOXO1 (Slika 7.A), pokazali su visoku učinkovitost amplifikacije cDNA kalupa, u rasponu od 91.9% - 98.7% (Slika 3. B-E).

Preciznost qPCR mjerenja određena je linearnim korelacijskim koeficijentom (R^2), koji opisuje koliko dobro zabilježene vrijednosti fluorescencije serijskih razrijeđenja odgovaraju zadanim podacima standardne krivulje. Što je vrijednost R^2 bliže 1, to je slaganje između vrijednosti izračunatih modelom i izmjerenih vrijednosti jače, a pouzdanost predviđanja koncentracije cDNA u odnosu na vrijednost fluorescencije veća. U svim qPCR reakcijama zabilježene su visoke vrijednosti R^2 u rasponu od 0.998-0.999.

Također, učinjena je analiza varijabilnosti Ct mjerenja standardnih serijskih razrijeđenja izmjerenih u duplikatu unutar jednog („intra-assay“) ili više („inter-assay“) qPCR eksperimenata. Sukladno tomu, varijabilnost „intra-assay“ pokusa bila je manja od 1.49% za sve ispitivane transkripte, te manja od 1.54 % između različitih qPCR eksperimenata.



Rezultati



Slika 7. Standardne krivulje FOXO1, PLZF, RORC, RUNX3 i TBP TaqMan kompleta. . Učinkovitost (Eff%) i preciznost (R^2) (A) FOXO1, (B) PLZF, (C) RORC (D) RUNX3 i (E) TBP qPCR eksperimenata utvrđena je qPCR analizom 5 standardnih uzoraka pripravljenih nizom serijskih razrijeđenja u omjeru 1:3. Analiza rezultata provedena je računalnim programom QuantStudio Design & Analysis Software v 1.3.1.

5.3. Ekspresijski profili gena FOXO1, PLZF, RUNX3 i RORC

Za ovu analizu, hipotiroidni ispitanici, liječeni i neliječeni, grupirani su zajedno (HT, hipotiroidni) budući da nisu pronađene statistički značajne razlike u ekspresiji između liječenih i neličenih hipotiroidnih ispitanika (rezultati nisu prikazani). Zabilježene su značajne razlike u ekspresiji PLZF, RUNX3 i RORC transkripta među skupinama.

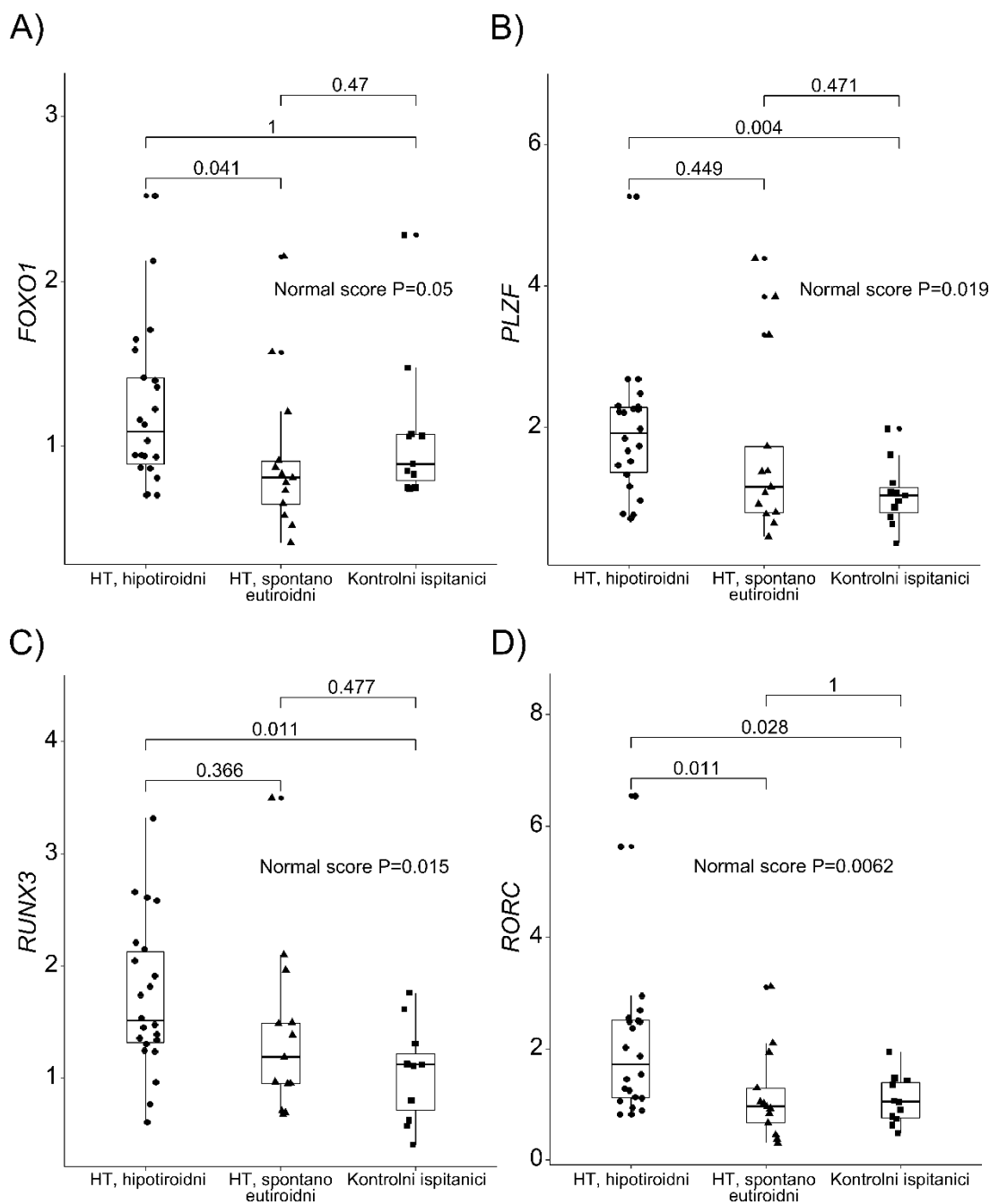
Analizom normaliziranih vrijednosti mRNA ekspresije FOXO1 transkripcijskog čimbenika u perifernim limfocitima T, značajne razlike između skupine HT hipotiroidnih [median; $M_e=1.09$ (IQR (0.89-1.41))] i kontrolnih ispitanika [$M_e=0.89$ (0.79-1.07); $P=0.05$] nisu zabilježene. Međutim, u odnosu na hipotiroidnu HT skupinu, eutiroidni ispitanici pokazuju značajno smanjenu ekspresiju FOXO1 mRNA [$M_e=0.81$ (0.65-0.91); $P=0.041$] (**Slika 8.A**). Na globalnoj razini, razlika granično izmiče značajnosti.

Za razliku od FOXO1, PLZF mRNA ekspresija je značajno povišena u skupini HT hipotiroidnih [$M_e=1.92$ (1.38-2.29)] u odnosu na kontrolne ispitanike [$M_e=1.05$ (0.81-1.16); $P=0.004$], a značajne razlike među skupinama HT ispitanika (hipotiroidni i eutiroidni) nisu uočene ($P=0.449$). Također, nije zabilježena značajna razlika u ekspresiji gena PLZF usporedbom spontano eutiroidnih HT ispitanika i zdravih kontrola [euHT vs CTRL; 1.17 (0.8-1.74) vs 1.05 (0.81-1.16); $P=0.471$] (**Slika 8.B**).

Ekspresija RUNX3 mRNA u perifernim T limfocitima HT i zdravih ispitanika, nalikuje zabilježenom ekspresijskom profilu gena PLZF. Naime, u odnosu na zdrave kontrole [$M_e=1.12$ (0.71-1.22)], HT hipotiroidni ispitanici pokazuju značajno povišene razine mRNA ekspresije gena RUNX3 [$M_e=1.51$ (1.31-2.12); $P=0.011$], a usporedbom hipotiroidnih i spontano eutiroidnih HT skupina [hipoHT vs euHT; 1.51 (1.31-2.12) vs 1.19 (0.95-1.49); $P=0.366$], odnosno eutiroidnih HT i kontrolnih ispitanika [euHT vs CTRL; 1.19 (0.95-1.49) vs 1.12 (0.71-1.22); $P=0.477$] nisu zabilježene značajne razlike. (**Slika 8.C**).

Analizom izmjerenih vrijednosti ekspresije gena RORC uočena je značajno povišena razina RORC mRNA u skupini HT hipotiroidnih [$M_e=1.72$ (1.13-2.51)], u odnosu na zdrave [$M_e=1.05$ (0.76-1.39); $P=0.028$] i spontano eutiroidne ispitanike [$M_e=0.96$ (0.67-1.29); $P=0.011$] (**Slika 8.D**).

Rezultati



Slika 8. Relativna ekspresija gena FOXO1, PLZF, RUNX3 i RORC u perifernim limfocitima T zdravih kontrola i HT ispitanika. Ekspresija gena (A) FOXO1, (B) PLZF, (C) RUNX3 i (D) RORC izmjerena RT-qPCR metodom u populaciji 35 HT i 11 kontrolnih ispitanika. Unutar pravokutnog ili box-plot dijagrama, gornje i donje vertikalne linije predstavljaju 1.5xIQR. Prema Tukey-u, ekstremne vrijednosti označene su točkom. Razlike među skupinama utvrđene su usporedbom normaliziranih vrijednosti qPCR mjerenja učinjenih u triplikatu primjenom metode $\Delta\Delta Ct$, i van der Waerden testom s Bonferroni post-hoc procedurom, a prag značajnosti je definiran kao $P < 0.05$.

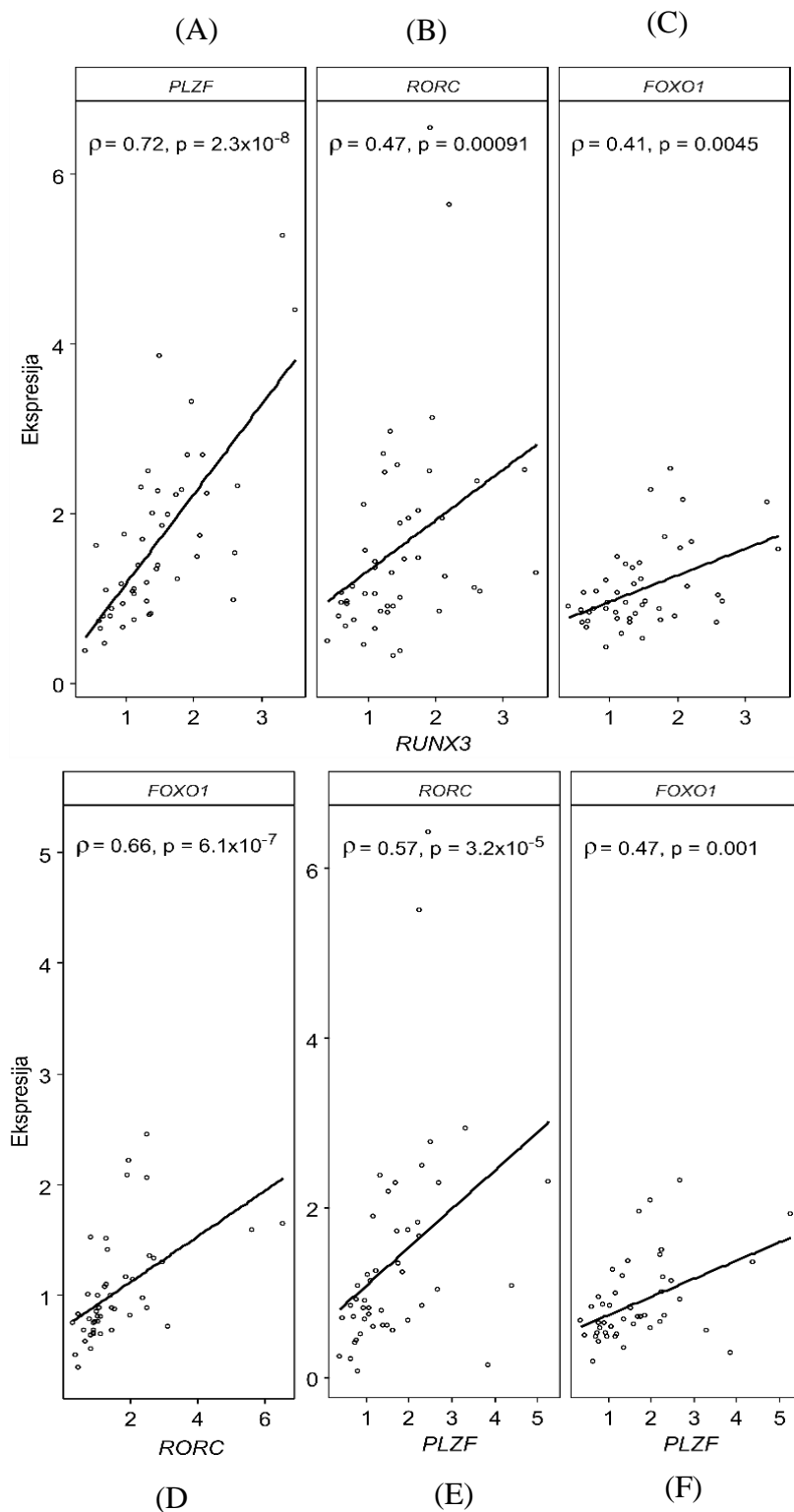
5.4. Međugenske korelacije

Da bismo utvrdili postoji li povezanost između mRNA ekspresije ispitivanih transkripcijskih čimbenika FOXO1, PLZF, RUNX3 i RORC u perifernim limfocitima T, učinjena je Spearmanova analiza povezanosti genskih parova u ukupnoj populaciji ispitivanih uzoraka (n=46). Za ovu analizu, primijenjen je Bonferroni-korigirani prag značajnosti $P < 0.0083$ ($0.05/6$).

Pozitivni genski odnosi na razini mRNA ekspresije zabilježeni su između transkripcijskih čimbenika RUNX3 i PLZF ($P = 2.3 \times 10^{-8}$, **Slika 9.A**) FOXO1 i RUNX3 ($P = 0.0045$, **Slika 9.B**), te RUNX3 i RORC ($P = 0.00091$, **Slika 9.C**).

Nadalje, uočena je i pozitivna korelacija između mRNA ekspresije gena RORC i FOXO1 ($P = 6.1 \times 10^{-7}$, **Slika 9.D**), PLZF i RORC ($P = 3.2 \times 10^{-5}$, **Slika 9.E**), te FOXO1 i PLZF ($P = 0.001$, **Slika 9.F**).

Rezultati



Slika 9. Grafički prikaz Spearmanove analize povezanosti ekspresije mRNA genskih parova FOXO1, PLZF, RUNX3 i RORC

5.5. Povezanost kliničkih karakteristika i genske ekspresije HT ispitanika

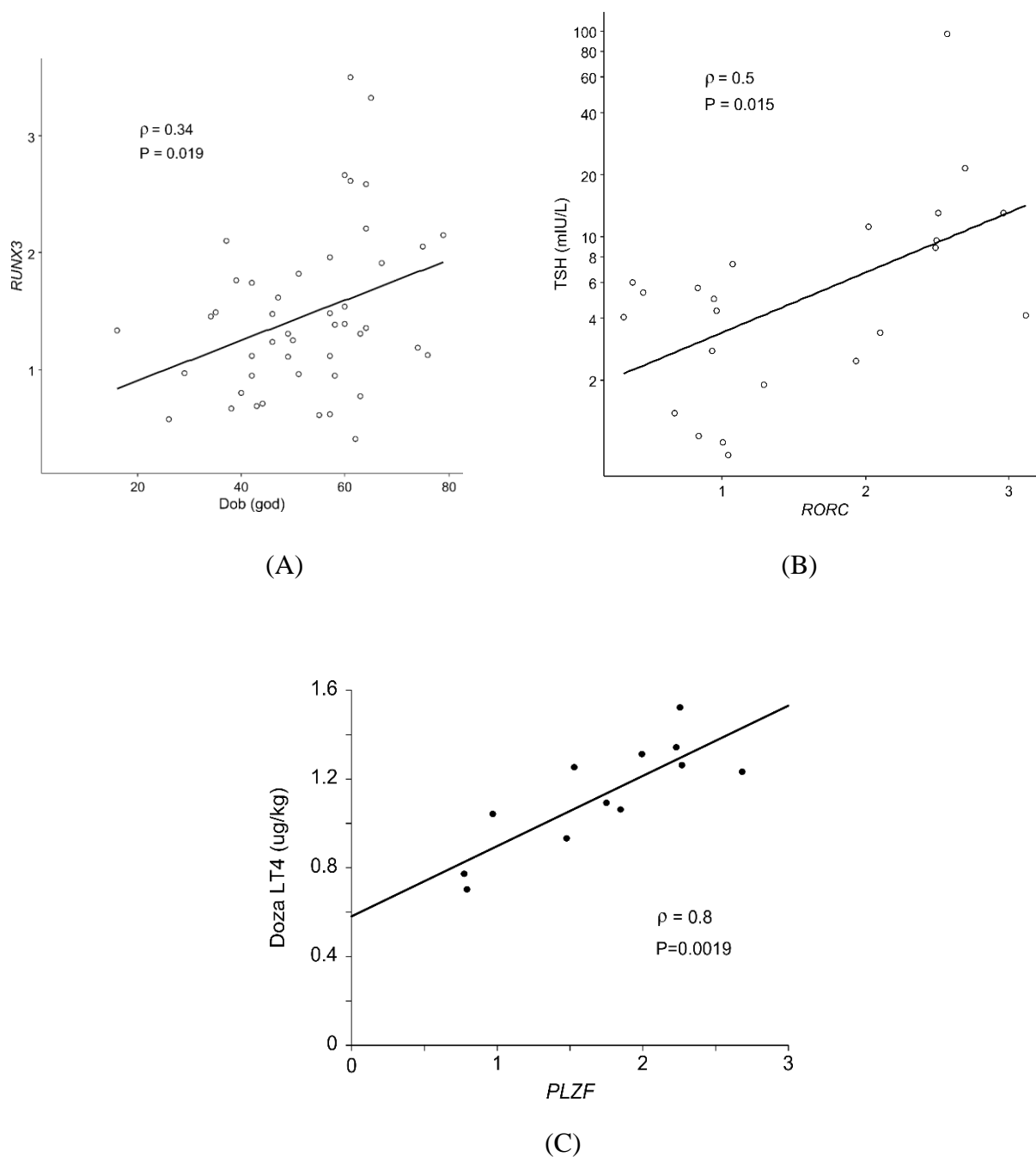
Istraživana je moguća povezanost ekspresijskog profila mRNA gena FOXO1, PLZF, RUNX3 i RORC s kliničkim karakteristikama ispitanika, poput dobi, serumske razine TSH-a u trenutku uzorkovanja krvi za ekspresijsku analizu, i primjenjene doze nadomjesne hormonske terapije.

U ukupnoj populaciji ispitanika (n=46) uočena je značajna povezanost između ekspresije mRNA transkripcijskog čimbenika RUNX3 i dobi ispitanika ($\rho=0.34$; $P=0.019$) (**Slika 10. A**).

Nadalje, u skupini terapijski naivnih (spontano eutiroidnih i neliječenih, hipotiroidnih HT ispitanika, n=23), serumska razina TSH pozitivno korelira s razinom ekspresije gena RORC u perifernim limfocitima T ($\rho=0.5$; $P=0.015$) (**Slika 10. B**). Zanimljivo, doza nadomjesne terapije L-tiroksinom potrebna za normalizaciju TSH, u liječenih hipotiroidnih HT ispitanika (n=12), pozitivno korelira s razinom PLZF mRNA ($\rho=0.8$; $P=0.019$) (**Slika 10. C**).

Povezanost ekspresijskih profila gena FOXO1, PLZF, RUNX3 i RORC s volumenom štitnjače, serumskom razinom FT3 i FT4 u neliječenih bolesnika, ili titrom anti-TPO protutijela nije zabilježena.

Rezultati



Slika 10. Analiza povezanosti ekspresijskog profila limfocita T i kliničkih karakteristika HT i kontrolnih ispitanika. Razina ekspresije gena RUNX3 (A) pozitivno korelira s dobi ispitanika ($n=46$), a povećanu ekspresiju gena RORC (B) u neliječenih HT ispitanika ($n=23$; spontano eutiroidni + neliječeni hipotiroidni) prati porast serumske razine TSH. Doza nadomjesne terapije L-tiroksinom u liječenih hipotiroidnih HT ispitanika ($n=12$) pozitivno korelira s povećanom ekspresijom gena PLZF (C). Y-os u (B) je log-os. ρ - Spearmanov korelacijski koeficijent; prag značajnosti $P < 0.05$

6. RASPRAVA

U svrhu analize promjena transkripcijskog profila perifernih T limfocita u Hashimotovoj bolesti, u ovom istraživanju ispitivana je razina mRNA ekspresije transkripcijskih čimbenika PLZF, RUNX3, RORC i FOXO1 u oboljelih (liječenih/neliječenih hipotiroidnih, eutiroidnih) i zdravih ispitanika. Također, proučavana je i povezanost genske ekspresije navedenih gena s dobi ispitanika te izabranim kliničkim obilježjima poput serumske razine TSH, volumena štitnjače u neliječenih i doze LT4 potrebne za normalizaciju TSH-a u liječenih ispitanika, normalizirano za tjelesnu masu. Nadalje, zbog složenih obrazaca međusobne regulacije na razini transkripcije, analizirane su i međugenske korelacije u HT i kontrolnim ispitanicima.

Zabilježena biokemijska i klinička obilježja HT i kontrolnih ispitanika odgovaraju do danas dobro poznatim obrascima regulacije na relaciji štitnjača - hipofiza (2, 58). U skupini neliječenih hipotiroidnih ispitanika zabilježene su snižene vrijednosti T4 te povišene vrijednosti serumskog TSH-a. Suprotno, razina slobodnog tiroksina u skupini liječenih hipotiroidnih ispitanika je povišena, što se može pripisati nadomjesnoj hormonskoj terapiji levotiroksinom, i nerijetkoj potrebi za nešto višim koncentracijama FT4 u svrhu normalizacije serumskog FT3 u ovih bolesnika (58). Prisutnost TPOAb protutijela, kao glavne biokemijske karakteristike Hashimotovog tiroiditisa (2), zabilježena je, očekivano, u sve tri skupine HT oboljelih.

Rezultati analize genske ekspresije pokazali su povišene razine mRNA ekspresije gena PLZF, (van der Waerden test; $P=0,004$; **Slika 8.B**), RUNX3 ($P=0,011$; **Slika 8.C**) i RORC ($P=0,028$; **Slika 8.D**) u skupini hipotiroidnih (liječenih i neliječenih) bolesnika u odnosu na zdrave ispitanike, sugerirajući time njihovu ulogu u razvoju hipotiroidnih oblika Hashimotove bolesti. Sličan obrazac ekspresije u perifernim T-limfocitima HT ispitanika pokazuju ključni regulatori efektorsko/memorijskog programa, T-bet i EOMES, čija je povećana ekspresija zabilježena u hipotiroidnih, ali ne i u eutiroidnih HT ispitanika (59, 55). Oba ova čimbenika povezana su s akumulacijom CD8⁺T-limfocita nalik NK-stanicama u drugim patološkim stanjima. Opisana je i proporcionalna relacija između ekspresije PLZF u T i iNKT stanicama i ekspresije EOMES-a u prirođenim CD8⁺ T stanicama (60).

Robustna razlika u ekspresiji gena FOXO1 nije utvrđena usporedbom bolesnika i kontrolnih ispitanika, ali je u skupini spontano eutiroidnih HT pacijenata zabilježena nešto niža ekspresija FOXO1 mRNA u odnosu na T-limfocite hipotiroidnih donora (van der Waerden test; $P=0,041$; **Slika 8.A**). Transkripcijski čimbenik FOXO1 nije esencijalan u razvoju efektorskih CD8⁺ linija, ali je neophodan za stabilizaciju i funkcionalnost memorijskih stanica, čiju diferencijaciju potiče utišavanjem ekspresije gena T-bet, i stimulacijom ekspresije gena EOMES (54). Nadalje, FOXO1 izravno regulira ekspresiju CTLA-4 i FOXP3, dvije ključne molekule u diferencijaciji i funkciji regulacijskih T-limfocita (61).

Za razliku of FOXO1, limfociti T hipotiroidnih HT ispitanika pokazuju povišenu razinu PLZF mRNA u odnosu na zdrave kontrole. Na temelju nedavnog istraživanja zabilježen je povišen udio NKT stanica u HT oboljelih (26), koje potencijalno dijelom pridonose povišenoj ekspresiji gena PLZF zabilježenoj u našoj populaciji HT ispitanika. Jedan do pet posto infiltriranih mononukleara u Hashimoto štitnjačama izražava perforin, od čega 25% čine CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (DN) stanice (62). Ukupno, IFN γ /IL-17⁺ DN T-stanice čine gotovo 5% svih infiltriranih stanica u upalno promijenjenim štitnjačama, s podjednakom proporcijom iNKT (63) i $\gamma\delta$ stanica. Obje ove linije u svom razvoju ključno ovise o PLZF. S tim u svezi, zanimljiv je nalaz pozitivne povezanosti između veličine doze nadomjesne hormonske terapije, normalizirane za tjelesnu masu, potrebne za normalizaciju TSH i razine ekspresije gena PLZF u perifernim limfocitima T hipotiroidnih, neliječenih HT ispitanika (Spearmanov korelacijski koeficijent $\rho=0,8$; $P=0,0019$; **Slika 10C**).

Drugu značajnu citotoksičnu populaciju u Hashimoto štitnjačama čine autoreaktivne, klonalno ekspanzirane Pfr1⁺CD8⁺T stanice (62, 64), s većim udjelom u hipotirezi nego u eutireozu. Ova populacija osobito je umnožena u hipotiroidnom HT (65), gdje čini i vodeću komponentu, a na periferiji opisane su umnožene cirkulirajuće CD8⁺Tc17 i CD8⁺CD28⁻T_{EM} stanice. Među njima, CD28⁻T stanice karakterizirane su izrazito citotoksičnim profilom, visokom ekspresijom T-bet, EOMES-a i membranskih NK biljega.

NKT stanice, kao i efektorski CD8⁺ CTL u čijoj diferencijaciji sudjeluje i RUNX3 (47), otpuštanjem perforina stvaraju pore u staničnoj membrani tireocita i osmozom pospješuju lizu stanice, a otpuštanjem granzima aktiviraju kaspaznu kaskadu koja dovodi do apoptoze (66). Danas je poznato kako RUNX3 inducira ekspresiju T-box transkripcijskih čimbenika, a zatim združenim djelovanjem s T-bet i EOMES potiče ekspresiju INF- γ i perforina. Direktnim djelovanjem RUNX3 samostalno inducira ekspresiju još jednog efekorskog čimbenika,

granzima B (GZMB), čija je povećana razina mRNA ekspresije nedavno zabilježena u perifernim limfocitima oboljelih od HT (55). Štoviše, povećana ekspresija gena GZMB povezana je s redukcijom žljezdanog volumena i porastom doze nadomjesne hormonske terapije u hipotiroidnih HT ispitanika. RUNX3 dakle, posreduje ključne korake u diferencijaciji i razvoju citotoksičnog kapaciteta $CD8^{+}INF-\gamma^{+}$ Tc1 efektor, čija je povećana frekvencija prethodno zabilježena u HT oboljelih i povezana s porastom TPOAb protutijela (31). Rezultati tog istraživanja sugeriraju značajnu ulogu povećane ekspresije gena RUNX3 u razvoju i progresiji Hashimotove bolesti i barem djelomično odražavaju udio Tc1 limfocitne loze u hipotiroidnih HT ispitanika. Kao i slučaju $CD8^{+}EOMES^{+}T$ -stanica, starenje (67) značajno utječe na transkripcijski profil $CD8^{+}T$ stanica, uključujući promjene na RUNX3 lokusu.

Nedavno je otkrivena potencijalna uloga stanica Tc17 u razvoju Hashimotova tiroiditisa (26), a povećana razina ekspresije mRNA gena RORC u perifernoj krvi HT oboljelih prethodno je opisana u nekoliko studija (23, 28). Štoviše, povećana frekvencija Th17 stanica ranije je povezana s razvojem upalnih procesa u štitnjači (21), progresijom bolesti (23) i povećanim stupnjem oštećenja štitnjače u HT ispitanika (68). Budući da diferencijacijom i funkcijom Th17/Tc17/ $\gamma\delta 17$ /MAIT stanica upravlja transkripcijski čimbenik $ROR\gamma$ (51), povišena mRNA ekspresija gena RORC zabilježena u ovoj studiji, također potvrđuje ulogu tip 17 imunološkog odgovora u HT patogenezi. Tu hipotezu potvrđuje i nalaz pozitivne korelacije između povećane ekspresije gena RORC i porasta serumskih vrijednosti TSH u neliječenih HT ispitanika (Spearmanov korelacijski koeficijent $\rho=0,5$; $P=0,015$; **Slika 10.B**).

Nadalje, uočeni su brojni pozitivni međugenski odnosi na razini mRNA ekspresije; reflektirajući linearni model diferencijacije stanica i očekivanu modularnu ekspresiju transkripcijskih regulatora. Među njima, zanimljiva je snažna korelacija ekspresije PLZF i RORC, koja upućuje na povezanost PLZF i $ROR\gamma$ programa, bilo unutar iste linije, bilo multilinijskom suradnjom. U cirkulirajućem odjeljku, i MAIT stanice i $\gamma\delta 17$ stanice pripadaju neklasičnim $PLZF^{+}ROR\gamma^{+}T$ -limfocitima prirodene stanične imunosti. Bilo kako, rezultat upućuje na potencijalni značaj prirodnih limfoidnih stanica u HT.

Dobiveni rezultati međugenske korelacijske analize u skladu su s nedavnim studijama koje upućuju na postojanje složenih regulatornih mehanizama na razini transkripcije. Naime, ekspresiju gena RUNX3 u prirođenim limfoidnim stanicama inducira vezanje transkripcijskog čimbenika PLZF (69). PLZF također direktno inducira ekspresiju $ROR\gamma$, vezanjem za RORC promotor u $CCR6^{+}$ stanicama, što je potvrđeno istraživanjem koje su proveli Singh i sur (50).

Nadalje, uočeno je da u Th17 stanicama koje sintetiziraju INF- γ , RUNX3 održava visoke razine ekspresije gena TBX21 i RORC ekspresije, što je nužno za stvaranje INF- γ i IL-17A (70). Nadalje, na razini proteina zabilježeni su i učinci transkripcijskog čimbenika FOXO 1, koji vezanjem za DNA vezujuću domenu čimbenika ROR γ t inhibira njegovu transkripcijsku aktivnost i tako suprimira razvoj Th17 fenotipa (71). Treba naglasiti, međutim, da se navedeni rezultat odnosi na proteinske interakcije, pri čemu brojni translacijski i posttranslacijski mehanizmi značajno modificiraju odnos mRNA-protein.

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na značajnu povezanost ekspresijskih profila gena RUNX3, PLZF i RORC perifernih limfocita T s HT u hipotiroidnoj fazi. Međutim, daljnja istraživanja na razini proteina, unutar tkivnih i perifernih subpopulacija CD8⁺ CTL, potrebna su za identifikaciju linijski specifičnih, funkcionalnih učinaka limfocita T u inicijaciji i progresiji HT bolesti.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- 1) U odnosu na kontrolne ispitanike, periferni limfociti T hipotiroidnih, ali ne i spontano eutiroidnih HT ispitanika, pokazuju značajno povišene razine mRNA ekspresije gena PLZF, RUNX3 i RORC
- 2) Promjene u mRNA ekspresiji gena RORC i PLZF povezane su s funkcijskom rezervom štitnjače u neliječenih bolesnika, odnosno parametrima nadomjesne hormonske terapije
- 3) Na razini mRNA ekspresije, postoje ko-korelacije između ispitivanih CD8⁺ transkripcijskih čimbenika.

8. SAŽETAK

Uvod: HT je kronična autoimuna bolest štitnjače koja nastaje spregom podložnih genetičkih čimbenika i rizičnih okolišnih faktora. Bolest obilježava pojava autoreaktivnih imunskih stanica i antitijela koja prepoznaju tkivne antigene, te citokinskom ozljedom i apoptozom dovode do oštećenja štitnjače. CD8⁺ citotoksični limfociti, čine značajan udio limfocitnog infiltrata štitnjače u HT oboljelih, a njihovu diferencijaciju i razvoj regulira niz transkripcijskih čimbenika, poput PLZF, RUNX3, RORC i FOXO1.

Cilj istraživanja: Ispitati transkripcijske profile gena PLZF, RUNX3, RORC i FOXO1 u oboljelih, te ustanoviti njihovu povezanost s volumenom štitnjače, razinom hormona TSH i FT4, anti-TPO protutijela i dozom nadomjesne hormonske terapije.

Materijali i metode: Prikupljena je periferna krv 11 kontrolnih i 35 ispitanika oboljelih od HT-a. Sinteza cDNA provedena je pomoću komercijalnog kita „PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit“, a kvantitativna analiza mRNA ekspresije reakcijom lančane polimeraze u stvarnom vremenu na uređaju QuantStudio 5 upotrebom komercijalnih kompleta TaqMan proba i početnica.

Rezultati: U odnosu na kontrolne ispitanike, oboljeli od HT pokazuju značajno povišene razine mRNA ekspresije gena PLZF, RUNX3 i RORC u hipotiroidnoj fazi. Štoviše, povišena razina ekspresije gena PLZF pozitivno korelira s porastom doze nadomjesne hormonske terapije u liječenih hipotiroidnih HT pacijenata (n=12), a razina RORC mRNA raste s povećanjem serumskih vrijednosti TSH u neliječenih HT ispitanika (n=23). Ekspresija gena RUNX3 raste s dobi ispitanika (n=46).

Zaključak: Ekspresijski profili gena PLZF, RORC i RUNX3 u perifernih limfocita T, razlikuju se između HT oboljelih i zdravih kontrola, a promjene u njihovoj ekspresiji povezane su s progresijom HT bolesti prema hipotireozu i obilježjima nadomjesnog hormonskog liječenja.

Ključne riječi: FOXO1, Hashimotova bolest, PLZF, RORC, RUNX3

9. SUMMARY

Introduction: Hashimoto's thyroiditis (HT) is a chronic autoimmune thyroid disease developing under the influence of susceptible genetic and environmental factors. The disease is characterised by the presence of autoreactive immune cells and antibodies directed against the thyroid tissue antigens, which mediate thyroid cell destruction through cytokine injury and apoptosis. CD8⁺ cytotoxic lymphocytes comprise a significant proportion of the lymphocytic thyroid infiltrate in HT patients. Their differentiation and development are regulated by a number of transcription factors such as PLZF, RUNX3, RORC and FOXO1.

Study aim: To examine transcriptional profiles of PLZF, RUNX3, RORC and FOXO1 genes, and determine their association with the thyroid volume, TSH and FT4 hormone levels, anti-TPO antibodies, and the dosage of hormone replacement therapy.

Material and methods: Peripheral blood was collected from 11 healthy controls and 35 HT subjects. cDNA was synthesized with the use of commercial PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit, whereas quantitative analysis of mRNA expression in real time PCR instrument QuantStudio 5, was performed with a set of predesigned TaqMan expression assays.

Results: Compared to the control subjects, patients with HT showed significantly increased levels of PLZF, RUNX3 and RORC mRNA expression. Moreover, the increased level of PLZF gene expression positively correlated with the increment of hormone replacement dose in treated hypothyroid HT patients (n = 12), and the RORC mRNA levels were associated with the increase of the serum TSH in untreated HT examinees (n = 23). RUNX3 transcript abundance increased with age (n = 46).

Conclusion: Expression profiles of PLZF, RORC and RUNX3 genes in peripheral T lymphocytes of HT patients differ from the ones in healthy control subjects, and changes in their expression are associated with the progression of HT disease, hypothyroidism and the dosage of hormone replacement therapy.

Key words: FOXO1, Hashimoto's disease, PLZF, RORC, RUNX3

10. LITERATURA

1. Cogni G, Chiovato L. An overview of the pathogenesis of thyroid autoimmunity. *Hormones*. 2013; 12(1):19-29
2. Zaletel K, Gaberscek S. Hashimoto's Thyroiditis: From Genes to the Disease. *Current Genomics*. 2011; 12: 576-588
3. Thyroid Advisor. What You Should Know about the Thyroid Feedback Loop. Dostupno na adresi: <https://thyroidadvisor.com/know-thyroid-feedback-loop/>
4. Hiromatsu Y, Satoh H, Amino N. Hashimoto's Thyroiditis: History and Future Outlook. *Hormones*. 2013; 12(1):12-18
5. Hennessey J, Wartofsky L. Hashimoto's Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007; 92(7):1
6. Pyzik A, Grywalska E, Matyjaszek-Matuszek B, Roliński J. Immune Disorders in Hashimoto's Thyroiditis: What Do We Know So Far? *Journal of Immunology Research*. 2015; 979167:1-8
7. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Carole A, i sur. Serum TSH, T4, and Thyroid Antibodies in the United States Population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002; 87(2): 489–499
8. Kohlstadt I. *Advancing Medicine with Food and Nutrients*. 2. izd. Boca Raton: Taylor & Francis Group; 2012
9. Vanderpump MPJ, Tunbridge WMG, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F, i sur. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Wickham Survey. 1995; 43(1):55-68
10. Villanueva R, Greenberg TF, Tomer Y. Sibling Recurrence Risk in Autoimmune Thyroid Disease. *Thyroid*. 2004; 13(8):761-764
11. Hall R, Stanbury JB. Familial studies of autoimmune thyroiditis. *Clin Exp Immunol*. 1967; 2:719 -725
12. 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

13. Phillips DI, Osmond C, Baird J, Huckle A, Rees-Smith B. Is birthweight associated with thyroid autoimmunity? A study in twins. *Thyroid*. 2002; 12:377-380
14. Tomer Y, Villanueva R. Hepatitis C and Thyroid Autoimmunity: Is There a Link? *Am J Med*. 2004;117:60 – 61
15. Tomer Y, Huber A. The etiology of autoimmune thyroid disease: A story of genes and environment. *Journal of Autoimmunity*. 2009; 32:231–239
16. Rose NR, Bonita R, Burek CL. Iodine: an environmental trigger of thyroiditis. *Autoimmunity Reviews*. 2002; 1:97-103
17. Effraimidis G, Strieder TG, Tijssen JG, Wiersinga WM. Natural history of the transition from euthyroidism to overt autoimmune hypo-orhyperthyroidism: a prospective study. *Eur J Endocrinol*. 2011; 164:107–113
18. Krassas GE, Wiersinga W. Smoking and autoimmune thyroid disease: the plot thickens *Eur J Endocrinol*. 2006; 154(6):777-80.
19. Effraimidis G, Wiersinga WM. Autoimmune thyroid disease: old and new players. *European Society of Endocrinology*. 2014; 170: 241–252
20. 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; 19(5): 495-501
21. 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(2):953–962
22. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol*. 2010; 40: 1830–1835
23. Shi Y, Wang H, Su Z, Chen J, Xue Y, Wang S. Differentiation Imbalance of Th1/Th17 in Peripheral Blood Mononuclear Cells Might Contribute to Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2010; 72, 250–255
24. Liu Y, Tang X, Tian J, Zhu C, Peng H, Rui K, i sur. Th17/Treg Cells Imbalance and GITRL Profile in Patients with Hashimoto's Thyroiditis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(12):21674-21686

25. Bossowski A, Moniuszko M, Dabrowska M, Rusak M, Jeznach M, Bodzenta-Łukaszyk A, i sur. Role of Th17 cells and IL-17, IL-23 cytokines in pathogenesis of autoimmune thyroid disease in children. *Thyroid Research*. 2013; 6(2):1-8
26. Liu Y, You R, Yua N, Gong Y, Qu Ch, Zhang Y. Increased proportions of Tc17 cells and NK cells may be risk factors for disease progression in Hashimoto's thyroiditis. *International Immunopharmacology*. 2016; 40:332–338
27. Ajjan R.A, Weetman A.P. The pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis: further developments in our understanding. *Hormone and Metabolic Research*. 2015; 47(10):702-710
28. Xue H, Yu X, Ma L, Song S, Li Y, Zhang L. The possible role of CD4+ CD25highFoxp3+ /CD4+ IL-17A+ cell imbalance in the autoimmunity of patients with Hashimoto thyroiditis. *Endocrine*. 2015; 50(3):665-673
29. Armengol MP, Juan M, Lucas-Martin A, Fernandez-Figueras MT, Jaraquemada D, Gallart T i sur., Thyroid Autoimmune Disease. *American Journal of Pathology*. 2001; 159(3):861-873
30. Ben-Skowronek I, Szewczyk L, Ciechanek R, Korobowicz E. Interactions of Lymphocytes, Thyrocytes and Fibroblasts in Hashimoto's Thyroiditis: An Immunohistochemical and Ultrastructural Study. *Horm Res Paediatr*. 2011;76:335–342
31. Karanikas G, Schuetz M, Wahl K, Paul M, Kontur S, Pietschmann P i sur. Relation of anti-TPO autoantibody titre and T-lymphocyte cytokine production patterns in Hashimoto's thyroiditis. *Clinical Endocrinology*. 2005; 63:191–196
32. Menconi F, Huber A, Osman R, Concepcion E, Jacobson EM, Stefan M. Tg.2098 is a major human thyroglobulin T-cell epitope. *Journal of Autoimmunity*. 2010; 35: 45-51
33. Tomer Y. Mechanisms of autoimmune thyroid diseases: from genetics to epigenetics. *Annu Rev Pathol*. 2014; 9: 147–156
34. Boggio E, Gigliotti CL, Rossi D, Toffoletti E, Cappellano G, Clemente N. Decreased function of Fas and variations of the perforin gene in adult patients with primary immune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*. 2016; 176(2): 258–267

35. Stassi G, De Maria R. Autoimmune thyroid disease: new models of cell death in autoimmunity. *Macmillan Magazines Ltd.* 2002; 2:195-204
36. Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G i sur. Potential Involvement of Fas and Its Ligand in the Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis. *Science.* 1997; 275:960–963
37. Bretz JD, Arscott PL, Myc A, Baker Jr JR. Inflammatory Cytokine Regulation of Fas-mediated Apoptosis in Thyroid Follicular Cells. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 25433–25438
38. Iwona BS. Hashimoto's Thyroiditis – Interactions of Lymphocytes, Thyroid Cells and Fibroblasts. *Web of Science.* 2011;13:241-254
39. Obar JJ, Lefrançois L. Early events governing memory CD8⁺ T-cell differentiation, *International Immunology.* 2010; 22(8):619–625,
40. Guo H, Xu B, Yang X, Wang Y, Liu X, Cui C, i sur. A high frequency of peripheral blood NKG2D⁺NK and NKT cells in euthyroid patients with new onset hashimoto's thyroiditis—a pilot study. *Immunological Investigations.* 2014; 43(4): 312–323
41. Topp MS, Riddell SR, Akatsuka Y, Jensen MC, Blattman JN, Greenberg PD. Restoration of CD28 Expression in CD28[–] CD8⁺ Memory Effector T Cells Reconstitutes Antigen-induced IL-2 Production. *Journal of Experimental Medicine.* 2003; 198 (6): 947
42. Mittrücker HW. Visekruna A. Huber M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8⁺ T Cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2014;62:449–458
43. Liang Y, Pan HF, Ye DQ. Tc17 Cells in Immunity and Systemic Autoimmunity. *International Reviews of Immunology.* 2014; 34(4): 318–331
44. Kovalovsky D, Uche OU, Eladad S, Hobbs RM, Yi W, i sur. The BTB zinc finger transcriptional regulator PLZF controls the development of invariant natural killer T cell effector functions. *Nat Immunol.* 2008; 9:1055–1064
45. 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
46. Kovalovsky D, Alonzo ES, Uche OU, Eidson M, Nichols KE, Sant'Angelo DB. PLZF Induces the Spontaneous Acquisition of Memory/Effector Functions in T Cells Independently of NKT Cell-Related Signals. *J Immunol.* 2010; 184:6746-6755

47. Woolf E, Xiao C, Fainaru O, Lotem J, Rosen D, Negreanu V, i sur. Runx3 and Runx1 are required for CD8 T cell development during thymopoiesis. PNAS. 2003; 100(13): 7731–7736
48. Cruz-Guilloty FE, Pipkin MM, Djuretic I, Levanon D, Lotem JG, Lichtenheld M, i sur. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. J. Exp. Med. 2017; 206 (1): 51-59
49. Djuretic MI, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate IFN γ and silence IL4 in T helper type 1 cells. Nature Immunol. 2006; 8(2):1-10
50. Singh PS, Zhang H, Tsang HJ, Gardina PG, Myers T, Nagarajan V, i sur. PLZF Regulates CCR6 and Is Critical for the Acquisition and Maintenance of the Th17 Phenotype in Human Cells. J Immunol. 2015; 194:4350-4361
51. Ivanov I, Zhoua LR, Littman D. Transcriptional regulation of Th17 cell differentiation. Seminars in Immunology. 2007; 19: 409–417
52. Ouyang W, Beckett O, Flavell RA, Li MO. An Essential Role of the Forkhead-Box Transcription Factor Foxo1 in Control of T Cell Homeostasis and Tolerance. Immunity. 2009; 30: 358–371
53. Tejera MM, Kim EH, Sullivan JH, Plisch E, Suresh M. FoxO1 Controls Effector to Memory Transition and Maintenance of Functional CD8 T-Cell Memory. J Immunol. 2013; 191(1): 187–199
54. Rao R, Li Q, Gubbels Bupp MR, Shrikant P. Transcription Factor Foxo1 Represses T-bet-Mediated Effector Functions and Promotes Memory CD8⁺ T Cell Differentiation. Immunity. 2012; 36:374–387
55. 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. Immunological Investigations. 2018; 47(3): 279–292
56. 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. Endokrynologia Polska 2017;68(3):274-828
57. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using RealTime Quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta C_t$} Method. Methods. 2001; 25, 402–408.

58. Midgley JEM, Larisch R, Dietrich JW, Hoermann R. Variation in the biochemical response to L-thyroxine therapy and relationship with peripheral thyroid hormone conversion efficiency. *Endocrine Connections* 2015; 4(4):196-205
59. Tokić S, Štefanić M, Glavaš-Obrovac Lj, Jaman S, Novosadová E, Petrková J. The Expression of T Cell FOXP3 and T-Bet Is Upregulated in Severe but Not Euthyroid Hashimoto's Thyroiditis. *Mediators of Inflammation*. 2016; 1–9
60. Barbarin A, Cayssials E, Jacomet F, et al. Phenotype of NK-Like CD8(+) T Cells with Innate Features in Humans and Their Relevance in Cancer Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8:316.
61. Ohkura N, Sakaguchi S. Foxo1 and Foxo3 help Foxp3. *Immunity* 2010; 33(6):835-837
62. Iwatani Y, Hidaka Y, Matsuzuka F, Kuma K, Amino N. Intrathyroidal lymphocyte subsets, including unusual CD4+ CD8+ cells and CD3loTCR alpha beta lo/-CD4-CD8- cells, in autoimmune thyroid disease. *Clinical and Experimental Immunology*. 1993;93(3):430-436.
63. Imam S, Pappas R, Sharma D, Jaume JC. Lymphocytic Profiling in Thyroid Cancer Provides Clues for Failure of Tumor Immunity. *Endocrine-related cancer*. 2014;21(3):505-516. doi:10.1530/ERC-13-0436.
64. Sugihara S, Fujiwara H, Niimi H, Shearer GM. Self-thyroid epithelial cell (TEC)-reactive CD8+ T cell lines/clones derived from autoimmune thyroiditis lesions. They recognize self-thyroid antigens directly on TEC to exhibit T helper cell 1-type lymphokine production and cytotoxicity against TEC. *J Immunol* 1995; 155: 1619–28.
65. Zeppa P, Marino G, Lepore M, Troncone G, Lupoli GA, Biondi B, Picardi M, Pane F, Vetrani A, Palombini L. Flow cytometry phenotypization of thyroid lymphoid infiltrate and functional status in Hashimoto's thyroiditis. *Anal Quant Cytol Histol* 2006; 28. 148-56.
66. Kotani T, Aratake Y, Hirai K, Fukazawa Y, Sato H, Ohtaki S. Apoptosis In Thyroid Tissue From Patients With Hashimoto's Thyroiditis. *Autoimmunity*. 1995; 20:231-236
67. Tserel L, Kolde R, Limbach M, Tretyakov K, Kasela S, Kisand K, et al. Age-related profiling of DNA methylation in CD8+ T cells reveals changes in

- immune response and transcriptional regulator genes. *Scientific Reports*. 2015;5:13107
68. Li D, Cai W, Gu R, Zhang Y, Zhang H, Tang K, i sur. Th17 cell plays a role in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis in patients. *Clinical Immunology*. 2013; 149(3):411–420
69. Mao AP, Constantinides MG, Mathewa R, Zuoc Z, Chen X, Weirauch MT, i sur. Multiple layers of transcriptional regulation by PLZF in NKT-cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016; 113(27):7602–7607
70. Wang Y, Godec J, Ben-Aissa K, Cui K, Zhao K, Pucsek AB, i sur. The Transcription Factors T-bet and Runx Are Required for the Ontogeny of Pathogenic Interferon- γ -Producing T Helper 17 Cells. *Immunity*. 2014; 40: 355–366
71. Lainé A, Martin B, Luka M, Mir L, Auffray C, Lucas B, i sur. Foxo1 Is a T Cell–Intrinsic Inhibitor of the ROR γ t-Th17 Program. *The Journal of Immunology*. 2015; 195: 000–000

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI

Ime i prezime: Jelena Nedić

Datum i mjesto rođenja: 27.01.1993., Vinkovci, Republika Hrvatska

Adresa: Vladimira Nazora 292, Tolisa, Bosna i Hercegovina

Mobitel: +387 63 471 806

E-mail adresa: jelena.93nedic@gmail.com

OBRAZOVANJE

2015. - 2018. g. - Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet,
Sveučilišni diplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika

2012. - 2015. g. - Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet,
Sveučilišni preddiplomski studij medicinsko laboratorijska dijagnostika

2008. - 2012. g. - Opća gimnazija, SŠ fra Martin Nedić, Orašje, Bosna i Hercegovina

OSTALO

Jezici: engleski jezik, B1 razina njemačkog jezika

Računalne vještine: dobro poznavanje Microsoft Office paketa

Položen vozački ispit