

# Izražaj receptora za vitamin D u štitnjači ispitanika s Hashimotovim tireoiditisom

---

**Kranjčec, Martin**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:705976>

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

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



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**Martin Kranjčec**

**IZRAŽAJ RECEPTORA ZA VITAMIN D U ŠTITNJAČI ISPITANIKA S  
HASHIMOTOVIM TIREOIDITISOM**

**Diplomski rad**

**Akadska godina:**

**2023./2024.**

**Mentor:**

**dr. sc. Dean Kaličanin**

**Split, srpanj 2024.**

# SADRŽAJ:

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD.....   | 1  |
| 1.1. Štitnjača.....  | 2  |
| 1.1.1. Anatomija.....  | 2  |
| 1.1.2. Embriologija i histologija.....                                 | 3  |
| 1.1.3. Fiziologija i funkcija štitne žlijezde.....                     | 5  |
| 1.2. Hashimotov tireoiditis.....                                       | 8  |
| 1.2.1. Povijest.....   | 9  |
| 1.2.2. Epidemiologija.....   | 9  |
| 1.2.3. Etiologija i patogeneza HT-a.....                               | 9  |
| 1.2.4. Patohistološka slika.....                                       | 11 |
| 1.2.5. Klinička slika i dijagnoza.....                                 | 11 |
| 1.2.6. Liječenje HT-a.....   | 13 |
| 1.3. Vitamin D.....  | 13 |
| 1.3.1. Metabolizam vitamina D i receptor vitamina D (VDR).....         | 13 |
| 1.3.2. Insuficijencija i deficijencija vitamina D.....                 | 15 |
| 1.3.3. Uloga vitamina D u imunološkim reakcijama.....                  | 16 |
| 1.3.4. Povezanost vitamina D i VDR-a s Hashimotovim tireoiditisom..... | 17 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....  | 19 |
| 3. MATERIJALI I METODE.....  | 21 |
| 3.1. Mjesto i ustroj istraživanja.....                                 | 22 |
| 3.2. Materijali.....   | 22 |
| 3.3. Imunohistokemijski protokol.....                                  | 22 |
| 3.4. Metode kvantifikacije imunofluorescencijskog signala.....         | 23 |
| 3.5. Etička načela.....  | 23 |
| 3.6. Statistička obrada.....   | 23 |
| 4. REZULTATI.....  | 24 |
| 5. RASPRAVA.....   | 28 |

|                     |                                     |
|---------------------|-------------------------------------|
| 6. ZAKLJUČCI.....   | 32                                  |
| 7. LITERATURA.....  | 34                                  |
| 8. SAŽETAK.....     | 39                                  |
| 9. SUMMARY .....    | 41                                  |
| 10. ŽIVOTOPIS ..... | <b>Error! Bookmark not defined.</b> |

*Zahvaljujem svom mentoru dr. sc. Dean Kaličaninu, čiji su stručnost, strpljenje i podrška bili neprocjenjivi tijekom cijelog procesa izrade ovog diplomskog rada. Hvala Vam što ste u svako doba dana bili dostupni za sva pitanja i na njih odgovarali u rekordnom roku.*

*Posebnu zahvalnost dugujem izv. prof. dr. sc. Nataliji Filipović koja je svojim znanjem, savjetima i korisnim komentarima značajno pridonijela kvaliteti mog rada.*

*Veliko hvala mom prijatelju, dr. sc. Marin Ogorevcu, na nesebičnoj pomoći, podršci i dijeljenju svojih stručnih znanja. Njegovi savjeti i suradnja bili su ključni za nastanak ovog rada.*

*Zahvaljujem se i svojim prijateljima, koji su me bodrili i bili uz mene tijekom cijelog studija.*

*Na kraju, najdublju zahvalnost upućujem svojim roditeljima i obitelji, bez čije ljubavi, razumijevanja i neprekidne podrške ne bih bio tu gdje jesam danas. Hvala vam što ste vjerovali u mene i omogućili mi da ostvarim svoje ciljeve.*

*Posebnu posvetu upućujem svojoj baki, čija je ljubav ostavila neizbrisiv trag u mom srcu. Njena ljubav i sjećanja na nju pružali su mi, a i dalje će mi pružati, snagu i inspiraciju kroz sve životne izazove.*

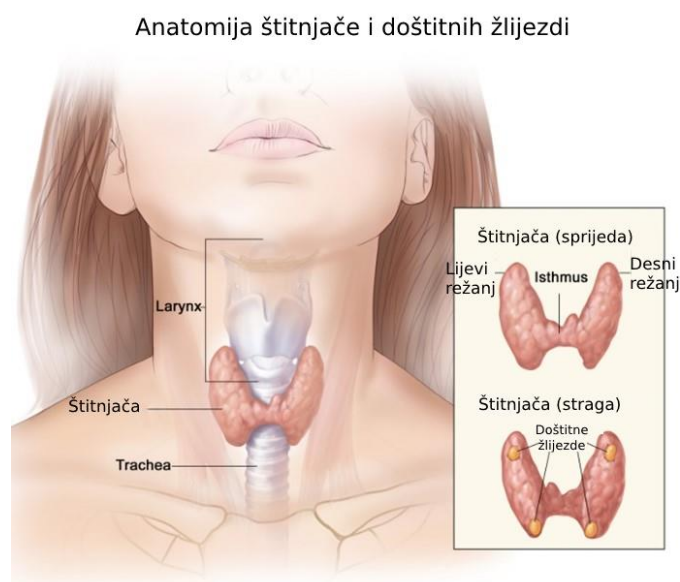
## **1. UVOD**

## 1.1. Štitnjača

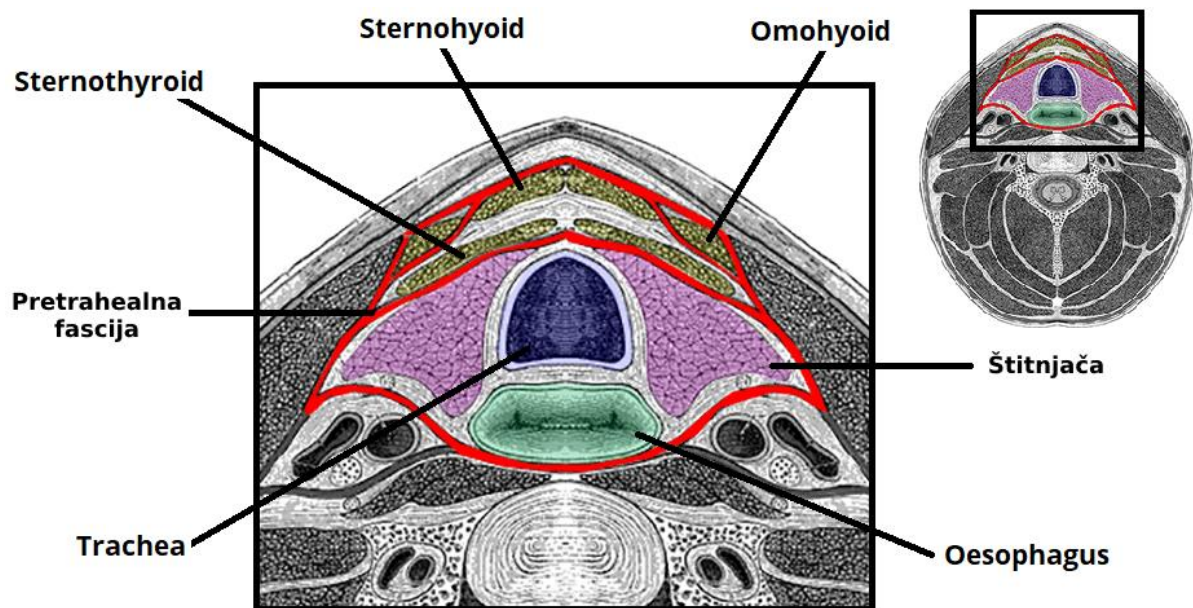
Štitnjača je endokrina žlijezda smještena u središnjoj liniji u prednjem dijelu vrata. Kao organ s unutrašnjim izlučivanjem glavna joj je uloga proizvodnja hormona koji sudjeluju u kontroli bazalnog tjelesnog metabolizma, somatskog i psihičkog razvoja, kao i sudjelovanje u metabolizmu kalcija (1).

### 1.1.1. Anatomija

Štitnjača je podijeljena na dva režnja povezana istmusom, koji prelazi anteriorno preko gornjeg dijela dušnika na razini drugog i trećeg trahealnog prstena (Slika 1). U svojem anatomskom položaju, štitnjača leži posteriorno sternotireoidnim i sternohioidnim mišićima, obavijajući se oko krikoidne hrskavice i trahealnih prstena. Nalazi se inferiorno tireoidnoj hrskavici, protežući se obično u razini od C5 do Th1. Štitnjača je pričvršćena za dušnik vezivnim tkivom nazvanim Berryjev ligament. Taj ligament povezuje svaki od režnjeva štitnjače s dušnikom. Štitnjača se zajedno s jednjakom, ždrijelom i dušnikom, nalazi unutar visceralnog prostora vrata koji je ograničen pretrahealnom fascijom (Slika 2). "Normalna" štitnjača ima simetrične lateralne režnjeve s jasno označenim središnje smještenim istmusom. Unatoč tim općim karakteristikama, poznato je da štitnjača ima mnogo morfoloških varijacija (2).



**Slika 1.** Shematski prikaz anatomije štitnjače i doštitnih žlijezdi. Preuzeto i prilagođeno prema: Asadi S. Iss 1 Citation: Asadi S. The Role of Mutations on Genes FGF23 & GNAS1 in McCune-Albright Syndrome. Journal of Neurology. 2020;3:1-13.



**Slika 2.** Transverzalni presjek kroz anatomske strukture vrata u razini štitnjače sa shematski označenim mišićima, pretrahealnom fascijom te njom obavijenom štitnom žlijezdom. Preuzeto i prilagođeno: Teach Me Series. Teach Me Anatomy [Internet]. Engleska i Wales: Teach Me Series; 2024 [citirano 17 lipnja 2024]. Dostupno na: <https://teachmeanatomy.info/wp-content/uploads/Diagram-of-the-Pretracheal-Fascia-Layer-of-the-Neck-Labelled.png>

Zbog svoje fiziološke važnosti, štitnjača je jako dobro vaskularizirana. Gornja štitnjačna arterija (STA, engl. *superior thyroid artery*), koja je ogranak vanjske karotidne arterije (ECA, engl. *external carotid artery*) i donja štitnjačna arterija (ITA, engl. *inferior thyroid artery*), koja se odvaja od tireocervikalnog trunkusa, anastomoziraju bilateralno pružajući ovom organu dvostruku krvnu opskrbu (3). U 10% populacije može se pronaći i arteria thyroidea inominata (engl. *thyroid ima artery*) koja ima dosta varijabilno ishodište (2). Štitnjača je prvenstveno inervirana autonomnim živčanim sustavom. Nervus vagus pruža glavna parasimpatička vlakna, dok simpatička vlakna potječu iz donjih, srednjih i gornjih ganglija simpatičkog debla. Ovi živci ne utječu na kontrolu hormonske proizvodnje, već uglavnom utječu na vaskulaturu (2).

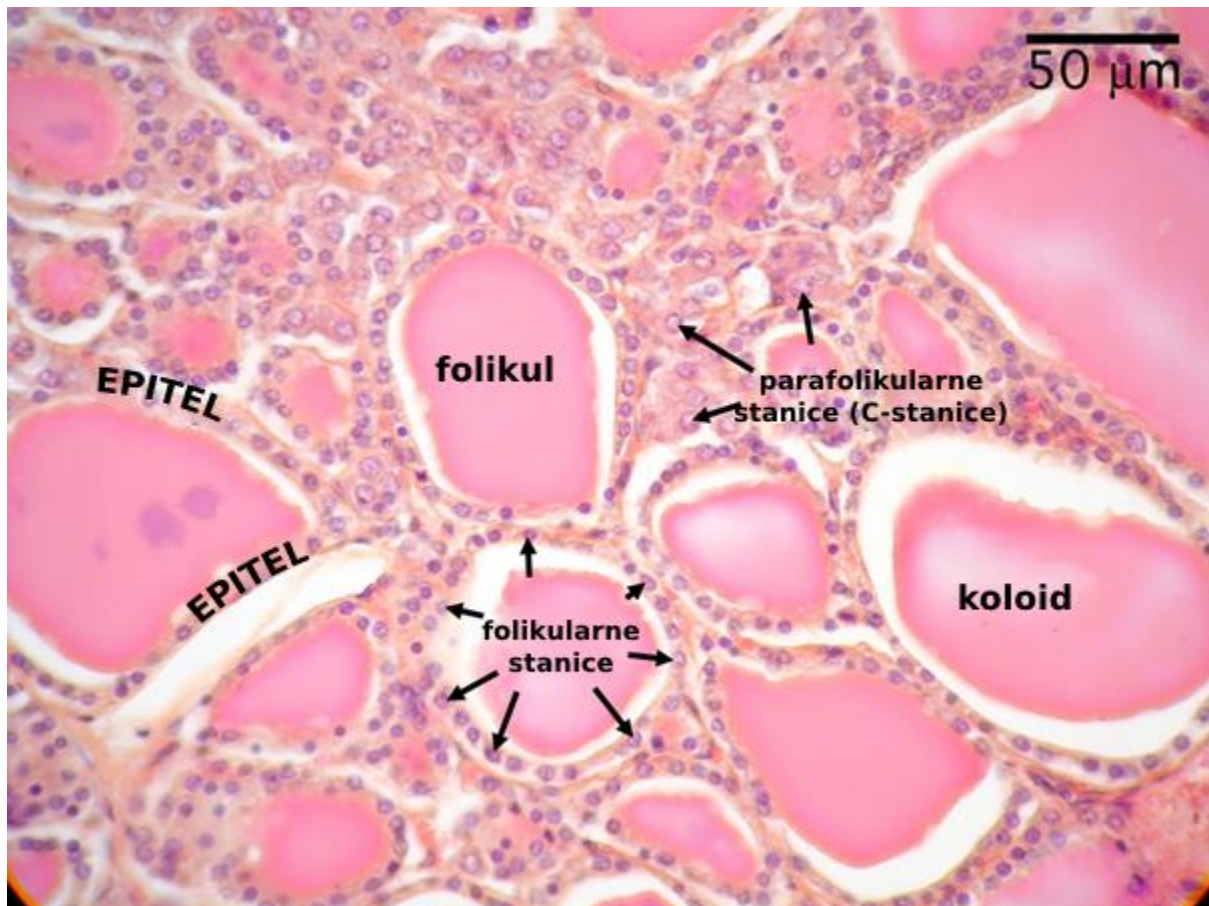
### 1.1.2. Embriologija i histologija

Štitnjača je prva endokrina žlijezda koja se razvija u ljudskom tijelu, s početkom razvoja oko trećeg tjedna gestacije. Razvoj započinje između druge i treće škržne vrećice u blizini baze jezika. Stanice endoderma primitivnog farinksa proliferiraju, stvarajući tireodni divertikul koji migrira kaudalno dok ne dostigne završno mjesto u vratu tijekom sedmog tjedna gestacije.



Tijekom migracije, štitnjača ostaje povezana s bazom jezika preko tireoglosalnog duktusa. Tijekom petog tjedna razvijaju se ultimobranhijalna tijela iz četvrte/pete škržne vrećice. Ona se spajaju sa superiornim dorzolateralnim dijelom razvijajuće štitnjače. Ultimobranhijalna tijela na kraju se diferenciraju u parafolikularne C-stanice koje diseminiraju po tkivu štitnjače. Parafolikularne stanice igraju ključnu ulogu u homeostazi kalcija. Tireoglosalni duktus obično degenerira do 10. tjedna zaostavljajući za sobom foramen cecum. Stanična diferencijacija i maturacija tkiva štitnjače nastavlja se dok tkivo štitnjače ne dostigne funkcionalnu zrelost uobičajeno tijekom 12. tjedna gestacije (4).

Parenhim štitne žlijezde (Slika 3) sastoji se od milijuna epitelnih folikula različitog promjera, svaki s jednostavnim epitelom i središnjom šupljinom gusto ispunjenom želatinastim koloidom unutar kojeg se pohranjuje veliki glikoprotein tireoglobulin (660 kDa), prekursor aktivnih hormona štitnjače T3 i T4 (trijdotironin i tiroksin). Štitnjača je obavijena fibroznom kapsulom čiji se izdanci pružaju u parenhim, dijeleći ga na režnjeve i noseći krvne žile, živce i limfne žile. Folikuli su međusobno ograničeni malim retikularnim vezivnim tkivom koje je bogato fenestriranim kapilarama za prijenos sintetiziranih hormona u krv. U tkivu štitnjače pronalazimo dva tipa specijaliziranih stanica: folikularne stanice, ili tireociti, čiji oblik, veličina i druge značajke variraju u odnosu na stimulaciju TSH (tiroidni stimulirajući hormon) te parafolikularne, tj. C-stanice, koje luče kalcitonin, peptidni hormon koji sudjeluje u kontroli serumske razine kalcija. Oblik i veličina folikularnih stanica koje oblažu folikul uvelike ovisi o aktivnosti štitnjače. Tako aktivnije tkivo štitnjače sadrži više folikula s niskim cilindričnim epitelom, dok se folikularne stanice pločastog oblika više pronalaze u hipoaktivnom tkivu (5).



**Slika 3.** Histološka slika parenhima štitne žlijezde s označenim folikulima i stanicama. Preuzeto i prilagođeno: Histology-World and its licensors. Histology-World [Internet]. Minnesota: Histology-World and its licensors; 2009 [citirano 17 lipnja 2024]. Dostupno na: [http://www.histology-world.com/photoalbum/displayimage.php?album=85&pid=4413#top\\_display\\_media](http://www.histology-world.com/photoalbum/displayimage.php?album=85&pid=4413#top_display_media)

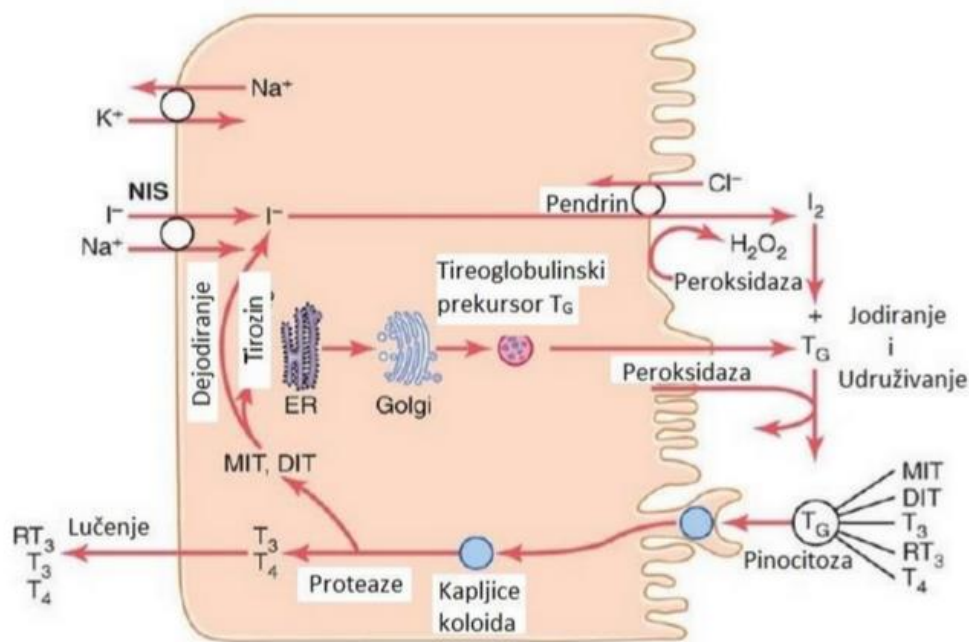
### 1.1.3. Fiziologija i funkcija štitne žlijezde

Hormoni štitnjače dobro su poznati po kontroli metabolizma, rasta i mnogih drugih tjelesnih funkcija. Štitnjača, adenohipofiza i hipotalamus međusobno se reguliraju putem osi hipotalamus-hipofiza-štitnjača. Regulacija hormona štitnjače započinje u hipotalamusu unutar kojeg stanice periventrikularne jezgre (PVN, engl. *periventricular nucleus*) proizvode peptidni hormon koji oslobađa tireotropin (TRH, engl. *tireotropin releasing hormon*). TRH iz hipotalamusa preko hipotalamičko-hipofiznog portalnog sustava dolazi do prednjeg reznja hipofize gdje potiče sintezu i sekreciju tireotropina (6). TSH, kojeg izlučuje adenohipofiza, glavni je stimulacijski hormon štitnjače. On potiče štitnjaču na izlučivanje dva važna hormona:

T3 i T4. Oba hormona podižu bazalni tjelesni metabolizam. Smatra se da potpuni nedostatak štitne žlijezde uzrokuje pad bazalnog metabolizma za 40-50% od normale, dok pretjerano izlučivanje štitnjačnih hormona može uzrokovati porast metabolizma za 60% do čak 100% iznad normalne razine. U tkivu štitnjače također se proizvodi i secernira kalcitonin, peptidni hormon koji sudjeluje u regulaciji kalcija u krvi. Od svih metabolički aktivnih hormona izlučenih u štitnjači, 93% otpada na T4, dok T3 čini 7%. Međutim, kroz nekoliko dana otprilike polovica T4 eventualno se u tkivima dejodinira u T3, tako da je trijodtironin zapravo hormon koji je na kraju većinski zastupljen i iskorišten u tkivu (7).

Jod je esencijalni element u tragovima koji se apsorbira u tankom crijevu. On je neizostavan dio T3 i T4 hormona. U glavne izvore joda spadaju jodirana kuhinjska sol, morski plodovi, alge i povrće (6). Da bi normalna sinteza hormona u štitnjači bila moguća potrebno je godišnje unijeti kroz prehranu 50 mg joda u obliku jodida, odnosno 1 mg tjedno (7). TSH oslobođen u krv veže se za svoj receptor smješten na bazolateralnom dijelu folikularnih stanica štitnjače. TSH receptor spada u skupini receptora vezanih s Gs-proteinom, a njegova aktivacija dovodi do aktivacije adenilat ciklaze i povećanja intracelularne razine cAMP-a (ciklički adenzin-mono-fosfat). Povećani cAMP aktivira protein kinazu A (PKA). PKA fosforilira različite proteine te na taj način modificira njihovu ulogu u procesu sinteze hormona štitnjače (6). Iz krvi se jodidi unose u tireocite olakšanom difuzijom preko Na-I simportera nasuprot koncentracijskom gradijentu, a proces je omogućen preko Na-K ATP-azne pumpe koja stvara koncentracijski gradijent natrija za olakšanu difuziju. Ovaj proces koncentriranja joda u tireocitima naziva se jodidna stupica (*engl. iodide trapping*). Jodidi se potom iz tireocita izbacuju u koloid kroz apikalnu membranu putem transportera koji se naziva pendrin. Sljedeći je korak proces stvaranja velikog glikoproteina, tireoglobulina, za koji će se vezati jodidi u folikulu. Endoplazmatski retikul i Golgijev aparat sintetiziraju i secerniraju molekule tireoglobulina u folikul. Dakle, hormoni štitnjače formiraju se unutar folikula vezanjem jodida na molekulu tireoglobulina. Svaka molekula tireoglobulina sadrži otprilike 70 aminokiselina tirozina, ključne molekule za koju će se vezati jodidi. Neposredno nakon što se jodidi transportiraju kroz apikalnu membranu enzim peroksidaza pretvara ih u oksidiranu formu, elementarni jod ( $I_0$ ) ili  $I_3^-$ , koja je sposobna vezati se direktno za tirozin na tireoglobulinu. Proces vezanja jodida za tireoglobulin naziva se organifikacija tireoglobulina. Ovaj proces događa se i spontano s molekulom joda, međutim traje sporo. Peroksidaza ubrzava ovu reakciju i na taj način pruža oksidirani jod u točno određenom trenutku kada se novonastali tireoglobulin iz Golgijevog aparata otpusti u koloid. Jodiranjem tirozina prvo nastaje monojodtirozin (MIT),

zatim dijodtirozin (DIT). Spajanjem dvije molekule dijodtirozina nastaje T<sub>4</sub>, a spajanjem molekule monojodtirozina s dijodtirozinom nastaje T<sub>3</sub>, koji čini jednu petnaestinu završnih hormona (7). Zanimljivo je da je ovo jedina endokrini žlijezda u kojoj se velika količina sekretornog proizvoda pohranjuje, a pohrana se odvija izvan stanice, u koloidu folikula, što je također neuobičajeno. U folikulima ima dovoljno hormona da tijelu pruži opskrbu tijekom 3 mjeseca bez dodatne sinteze (5).



**Slika 4.** Osnovna fiziologija folikularne stanice i proces stvaranja hormona štitne žlijezde. Preuzeto i prilagođeno prema: Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 14. izdanje. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016. str. 942.

Većina tireoglobulina ostaje unutar štitnjače i ne otpušta se u krvotok. Umjesto toga, T<sub>4</sub> i T<sub>3</sub> odvajaju se od molekule tireoglobulina. Ovo odvajanje događa se stvaranjem pinocitnih vezikula, nastalih formacijom pseudopoda s apikalne membrane koje uvuku molekule tireoglobulina. Ove vezikule stapaju se s lizosomima, tvoreći probavne vezikule koje sadrže enzime koji oslobađaju tiroksin i trijodtironin iz tireoglobulina. Oslobođeni hormoni zatim difundiraju kroz bazalnu membranu tireocita i ulaze u obližnje kapilare te krvotok (7).

Približno tri četvrtine jodiranog tirozina u tireoglobulinu ne pretvara se u hormone štitnjače, već perzistira kao monojodtirozin i dijodtirozin. Kako se tireoglobulin probavlja za oslobađanje tiroksina i trijodtironina, ti jodirani tirozini (MIT, DIT) također se oslobađaju, ali

se ne izlučuju u krvotok. Umjesto toga, enzim dejodinaza odvaja jod od njih, čineći ga dostupnim za recikliranje unutar tireocita za stvaranje novih hormona (7).

Nakon ulaska u krvotok, više od 99% tiroksina i trijodtironina odmah se veže s različitim proteinima plazme, ponajviše za globulin. Ovi proteini u plazmi imaju visok afinitet za hormone štitnjače tako da se oni sporo otpuštaju u tkiva. Nakon ulaska u stanice tkiva, i tiroksin i trijodtironin vežu se za unutarstanične proteine, pri čemu se tiroksin veže jače od trijodtironina. To rezultira skladištenjem hormona unutar ciljnih stanica, a hormoni se postupno iskorištavaju tijekom nekoliko dana ili tjedana. Opći je učinak hormona štitnjače unutar ciljnih stanica aktivacija transkripcije velikog broja gena. Prije nego što aktivira transkripciju, gotovo sav tiroksin prolazi proces dejodinacije u kojem se uklanja jedan jodid, što rezultira stvaranjem trijodtironina. Intracelularni receptori za hormone štitnjače pokazuju snažan afinitet za trijodtironin tako da on čini više od 90% hormona štitnjače koji se vežu za intracelularne receptore (7). Važnost periferne dejodinacije T4 u T3 može se primjetiti kod osoba s odstranjenom štitnjačom koje imaju normalne vrijednosti cirkulirajućeg T3 u krvi kada uzimaju oralnu suplementaciju s T4 (8).

Intracelularni receptori, smješteni na DNA ili u blizini, tipično tvore heterodimere s receptorom za retinoid X (RXR, *engl. retinoid X receptor*) na specifičnim dijelovima DNA (7). Tri regije receptora za hormone štitnjače od posebne su važnosti: amino-terminalna A/B regija koja pokreće transkripciju nakon konformacijske promjene, zatim srednja ili C regija zaslužna za vezanje receptora na DNA pomoću dva cinkova prstena te E regija prema karboksil terminalnom kraju koja je zaslužna za vezanje liganda (T3 ili T4) (8). Nakon vezanja s hormonom štitnjače, ti se receptori aktiviraju i započinju transkripciju, što dovodi do proizvodnje različitih tipova mRNA. Translacija u citoplazmatskim ribosomima rezultira stvaranjem brojnih unutarstaničnih proteina. Dodatno, hormoni štitnjače pokazuju negenomske učinke neovisne o transkripciji gena, koji se pojavljuju unutar nekoliko minuta (7). Mnoštvo ovih intracelularnih promjena sumacijski se izražava kroz raznorazne tjelesne procese kao što su metabolizam ugljikohidrata, masti i bjelančevina te procesi termogeneze kao i pojačana ekspresija beta adrenoreceptora što dovodi do povećane osjetljivosti na kateholamine (8).

## 1.2. Hashimotov tireoiditis

Hashimotov tireoiditis (HT) najbolje se definira kao organ-specifična autoimuna bolest koju karakterizira autoimuno posredovano razaranje štitnjače. Autoimuna bolest štitnjače

(AITD, engl. *autoimmune thyroid disease*) može se definirati kao složena bolest u kojoj dolazi do pojave autoimunog odgovora protiv antigena štitnjače, koji se razvija na određenoj genetskoj podlozi, a doprinosi mu izloženost određenim okolišnim čimbenicima. Hashimotov tireoiditis i Gravesova bolest dobro su poznati primjeri AITD (9). HT uzrokuje kroničnu upalu tkiva štitnjače, s razvojem hipotireoze u oko 20-30% bolesnika (10).

### **1.2.1. Povijest**

Dr. Hakaru Hashimoto je 1912. kod četiri pacijenta prvi identificirao kronični poremećaj štitnjače kojeg je nazvao "struma lymphomatosa", karakteriziran difuznom limfocitnom infiltracijom, fibrozom, atrofijom parenhima i eozinofilnim promjenama u acinarnim stanicama. Ovo stanje, kasnije poznato kao Hashimotov tireoiditis, nazivano je različitim nazivima poput kroničnog tireoiditisa, limfocitnog tireoiditisa, limfadenoidne guše i autoimunog tireoiditisa. U početku se bolest smatrala neuobičajenom, no razvojem dijagnostičkih testova poput biopsije iglom i seroloških testova na antitijela povećala se svijest i bolest je postala jedna od najčešćih poremećaja štitnjače, s naznakama rastuće učestalosti (11).

### **1.2.2. Epidemiologija**

Hashimotov tireoiditis najčešća je autoimuna bolest, s prevalencijom od 10-12% u općoj populaciji. Češći je kod žena nego kod muškaraca, incidencija se povećava s godinama i najveća je kod bijelaca, a najniža kod crnačke populacije. Učestalost je u regijama s dovoljno joda otprilike 350 slučajeva na 100 000 godišnje za žene i 60 slučajeva na 100 000 godišnje za muškarce. U područjima s nedostatkom joda, učestalost je 44 slučaja na 100 000 godišnje za žene i 12 slučajeva na 100 000 godišnje za muškarce (9). HT je najčešći uzrok hipotireoze u razvijenim zemljama. Nasuprot tome, u svijetu je najčešći uzrok hipotireoze neadekvatan unos joda hranom. HT može biti dio poliglandularnog autoimunog sindroma tipa 2 s autoimunom deficijencijom nadbubrežne žlijezde i DM tipa 1, a povezan je i s nekoliko drugih autoimunih bolesti, poput perniciozne anemije, insuficijencije nadbubrežne žlijezde i celijakije (12).

### **1.2.3. Etiologija i patogeneza HT-a**

Iako točna etiologija nije u potpunosti razjašnjena, Hashimotov tireoiditis povezan je s interakcijom između genetskih, okolišnih čimbenika i epigenetskih utjecaja. Stanična i humoralna imunost imaju ključnu ulogu u razvoju bolesti pa se u tkivu štitnjače često nalazi upalna infiltracija T i B stanica (13). Podaci iz blizanačkih genetskih studija sugeriraju da je

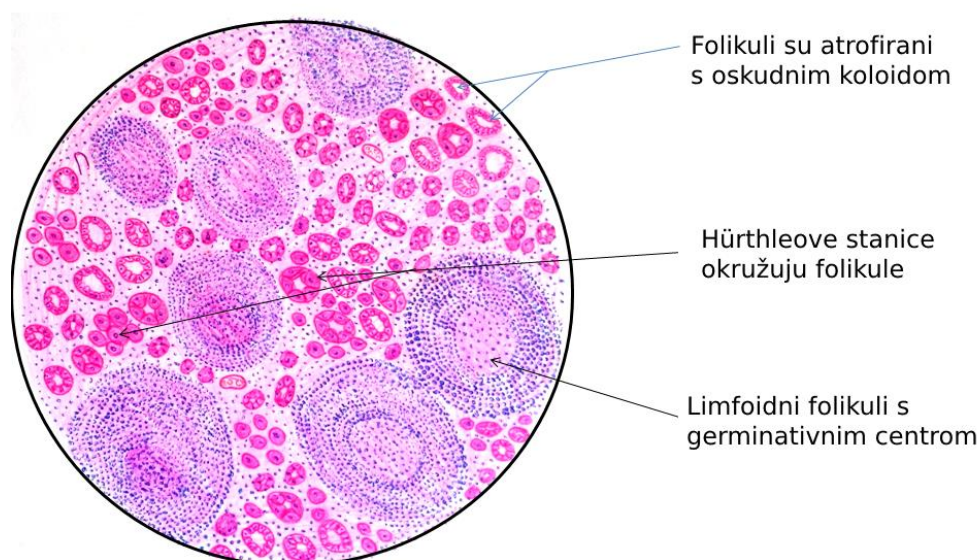
79% predispozicije posljedica genetskih čimbenika, a 21% se izdvaja za utjecaje okoliša i spolnih hormona (12). Genetska predispozicija uključuje MHC gene (npr. HLA-DR3) i gene koji reguliraju imunološki odgovor poput IL-7R (receptor za interleukin 7), OR2J3 (olfaktorni receptor 2J3) ili CTLA4 (gen za citotoksični T-limfocit povezan s proteinom 4) (14).

Hashimotov tireoiditis uzrokovan je slomom autotolerancije na autoantigene štitnjače (15). Većina bolesnika razvije protutijela na različite antigene štitnjače, od kojih je najčešće antitireoidna peroksidaza (anti-TPO). Mnogi također stvaraju antitireoglobulin (anti-Tg) i antitijela koja blokiraju TSH receptor (TBII, engl. *TSH receptor-blocking antibodies*). Ova antitijela napadaju tkivo štitnjače, što na kraju dovodi do neadekvatne proizvodnje hormona štitnjače. Postoji mala podskupina populacije, ne više od 10% do 15%, s klinički evidentnom bolešću koja je negativna na antitijela u serumu. Pozitivna TPO antitijela nagovještavaju klinički sindrom. Unatoč poznatoj prisutnosti antitijela na peroksidazu štitnjače (anti-TPO), postoji ograničen broj dokaza koji pokazuju njihovu ulogu u patogenezi autoimune bolesti štitnjače (AITD). Studije in vitro pokazuju da anti-TPO antitijela mogu fiksirati komplement i razoriti tireocite. Međutim, istraživanja na ljudima nisu pokazala korelaciju između težine bolesti i koncentracije anti-TPO protutijela u serumu. Pozitivna koncentracija anti-TPO protutijela u serumu ipak je povezana s aktivnom fazom bolesti (12).

Regulatorne T stanice (Treg, engl. *regulatory T cells*) igraju ključnu ulogu u sprječavanju autoimunosti, a abnormalnosti u Treg podskupovima identificirane su u HT. Citokini iz limfocitnih infiltrata pridonose ozljedi stanica štitnjače, potičući oslobađanje proupalnih medijatora i održavajući autoimuni odgovor. Broj Th17 stanica, koje izlučuju IL-17 i IL-22, povišen je kod HT-a, a IL-21, važan citokin u razvoju Th17 stanica, povećan je u bolesnika s HT-om. Inflammasomska kaskada koja uključuje više komponenti i citokina prisutna je u štitnjači pacijenata s HT-om, što ukazuje na njen utjecaj u otpuštanju citokina i staničnoj smrti (16). Poremećaj sinteze hormona posljedica je apoptotičkog uništavanja stanica štitnjače. Povećana ekspresija Fas receptora na folikularnim stanicama štitnjače okolnim citokinima i aktivacija Fas ligandima na T stanicama može inducirati ovu apoptozu, iako drugi putovi stanične smrti, kao što je citotoksičnost vezanja komplementa i citotoksičnost posredovana T stanicama specifična za tireoglobulin, također mogu biti uključeni (17). Razaranje tkiva štitnjače također se događa putem humoralne imunosti. Infiltrirajući B-limfociti (potaknuti Th2 citokinima, tj. IL-4, IL-5 i IL-10) oslobađaju autoantitijela (ponajviše anti-TPO i anti-Tg), što može dalje dovesti do uništenja tireocita putem mehanizma citotoksičnosti ovisne o protutijelima (ADCC, engl. *antibody-dependent cell cytotoxicity*) (14).

#### 1.2.4. Patohistološka slika

Kod HT-a štitnjača je blijeda, gumaste do čvrste konzistencije. Karakteristične histopatološke promjene vidljive kod HT-a su difuzna limfoplazmocitna infiltracija, formiranje limfoidnih folikula s germinativnim centrima, različit stupanj fibroze, atrofija parenhima i prisutnost velikih folikularnih stanica s obilnom granularnom eozinofilnom citoplazmom, takozvanih Hürthleovih, oksifilnih ili Askanazyjevih stanica. Elektromikroskopija pokazuje naslage imunoglobulina (Ig) G i Tg duž bazalne membrane folikularnih stanica. I B i T stanice infiltriraju štitnjaču (17).



**Slika 5.** Ilustrirani prikaz patohistoloških promjena tkiva štitnjače kod Hashimotovog tireoiditisa. Preuzeto sa: Dr Vijay Shankar S. I Love Pathology – Pathology Made Simple [Internet]. Adichunchanagiri, India: Dr Vijay Shankar S; 2016 [citirano 17 lipnja 2024]. Dostupno na: <https://ilovepathology.com/hashimotos-thyroiditis/>

#### 1.2.5. Klinička slika i dijagnoza

Hashimotov tireoiditis obično se očituje kao bezbolno povećanje štitnjače, obično povezano s hipotireozom, češće u žena srednje dobi. Povećanje štitnjače uglavnom je simetrično i difuzno, ali u nekim slučajevima može izgledati lokalizirano, izazivajući



zabrinutost od moguće neoplazme. Hipotireoza se obično razvija postupno, a u nekim slučajevima može joj prethoditi prolazna tireotoksikoza (hašitoksikoza) zbog autoimunog uništenja folikula štitnjače, što dovodi do oslobađanja hormona štitnjače. Tijekom ove faze, razine slobodnih T4 i T3 su povišene, a TSH je smanjen. Nakon prolaska tireotoksikoze, ostaje fibrozno nefunkcionalno tkivo te nastaje hipotireoza sa smanjenim razinama T4 i T3, popraćena kompenzacijskim povećanjem TSH (15). U sklopu hipotireoze može se uočiti niz simptoma i znakova: umor, porast težine uz smanjen apetit, suha i ljuskava koža, lomljiva kosa, nepodnošenje hladnoće, gubitak kose, konstipacija, otežana koncentracija i slabije pamćenje, promuklost, bradikardija, hladni udovi, periorbitalni edemi i drugo (18). Klasična je karakteristika kože povezane s hipotireozom miksedem, koji se odnosi na stanje kože nalik edemu uzrokovano povećanim odlaganjem glikozaminoglikana. To je, međutim, neuobičajeno i događa se samo u teškim slučajevima. Koža može biti ljuskava i suha, osobito na ekstenzornim površinama, dlanovima i tabanima (12). Tradicionalno se prijelaz iz eutireoze u hipotireozu smatrao nepovratnim procesom zbog oštećenja stanica štitnjače i smanjenja zaliha joda. Međutim, nedavna saznanja pokazuju da se otprilike jedna četvrtina pacijenata s hipotireozom može spontano vratiti na normalnu funkciju štitnjače tijekom nekoliko godina. Ovaj preokret mogao bi se povezati sa smanjenim učinkom inicijalno visokih titara protutijela koja blokiraju stimulaciju štitnjače (TSBab, engl. thyroid stimulation blocking antibodies; blokiraju vezanje TSH za receptor za TSH, a ne stimuliraju stanice štitnjače), što omogućuje obnovu funkcije štitnjače tijekom vremena (11).

Dijagnostički kriteriji uvelike su se promijenili od prvog opisa 1912. Oni sada uključuju prisutnost protutijela protiv peroksidaze (TPOAb) i tiroglobulina (TgAb), hipoehogenost na ultrazvuku štitnjače i često, ali ne uvijek, hipotireozu. Odsutnost guše i hipotireoze ne isključuje dijagnozu Hashimotovog tireoiditisa. Zapravo, velika većina pacijenata s Hashimotovim tireoiditisom nema razvijenu gušavost, a u vrijeme postavljanja dijagnoze samo manjina pacijenata s očitom autoimunom hipotireozom ima gušavost. Prevalencija gušavosti u okruženju Hashimotovog tireoiditisa iznosi 5-10% prema gruboj procjeni. Biokemijska slika ukazuje na povišeni TSH kao odgovor na nizak slobodni T4. Niska razina ukupnog T4 ili slobodnog T4 u prisutnosti povišene razine TSH potvrđuje dijagnozu primarne hipotireoze. Prisutnost antitijela protiv peroksidaze štitnjače (TPOAb) i antitireoglobulina (TgAb) ukazuje na Hashimotov tireoiditis. Međutim, 10% pacijenata može biti negativno na antitijela. TgAb su pozitivna u oko 80% pacijenata, a ako se mjere i TgAb i TPOAb, 97% pacijenata je pozitivno. Ultrazvučne značajke HT-a uključuju hipoehogenost, heterogenost,

hipervaskularnost i prisutnost malih cista. Ultrazvučni pregled štitnjače može pomoći u diferencijalnoj dijagnozi, osobito u bolesnika s negativnim TPOAb (9, 12, 19).

### **1.2.6. Liječenje HT-a**

Glavni tretman za hipotireozu uključuje zamjensku hormonsku terapiju oralnim levotiroksinom, koji se obično uzima rano ujutro na prazan želudac. Za optimalnu apsorpciju savjetuje se izbjegavanje istodobnog uzimanja s određenim dodacima prehrani. Standardne doze levotiroksina kreću se od 1,6 - 1,8 mcg/kg dnevno, s varijacijama ovisno o dobi i zdravstvenom stanju. U trudnoći se preporučuje povećanje doze za 30%, dok one sa sindromom kratkog crijeva mogu zahtijevati veće doze. Predlaže se autoimuna/protuupalna dijeta za rješavanje potencijalne upale. Međutim, potrebna su dodatna istraživanja prije nego što se uključi u kliničke smjernice (12).

### **1.3. Vitamin D**

Vitamin D steroidna je molekula, uglavnom proizvedena u koži, a zaslužna je za regulaciju ekspresije velikog broja gena. Donedavno je njegova glavna poznata uloga bila kontrola metabolizma kostiju i homeostaze kalcija i fosfora, no tijekom posljednja 2 desetljeća uočeno je da bi nedostatak vitamina D, koji je vrlo čest u svijetu, mogao biti novi čimbenik rizika za mnoge kronične bolesti poput: metaboličkog sindroma, cijelog spektra kardiovaskularnih bolesti, nekoliko autoimunih bolesti, mnogih vrsta raka kao i opće smrtnosti (20).

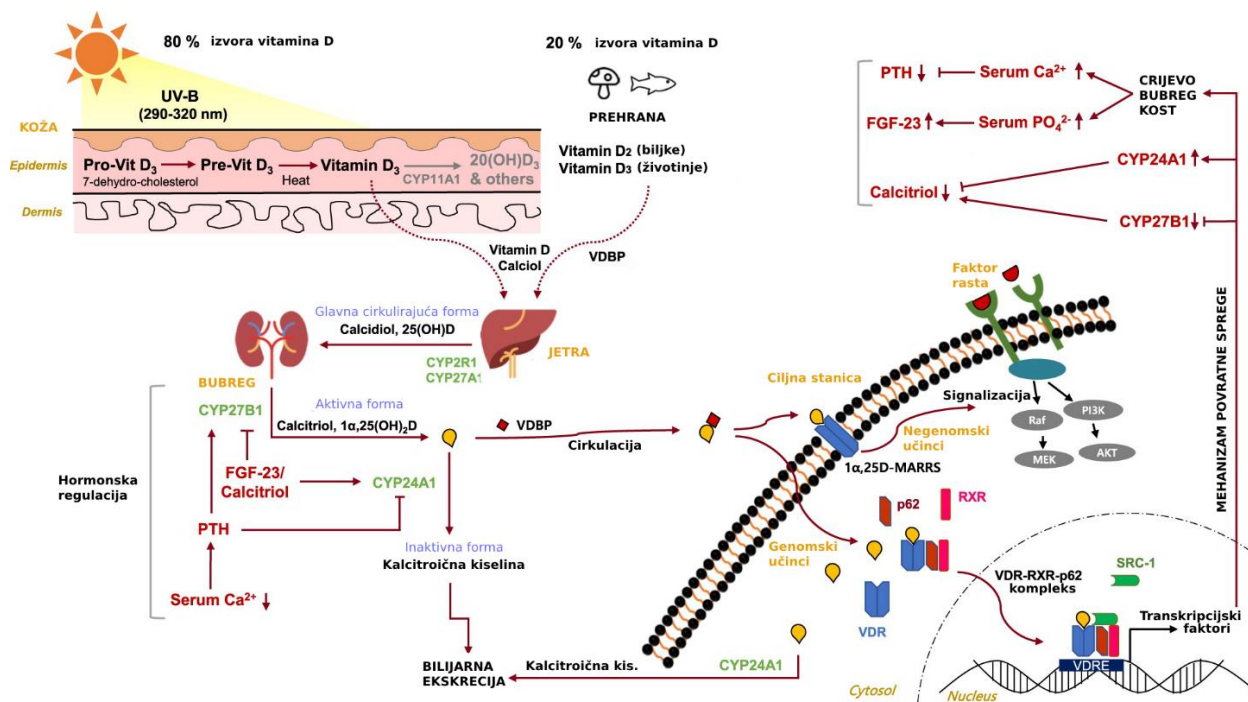
#### **1.3.1. Metabolizam vitamina D i receptor vitamina D (VDR)**

Postoje dva oblika vitamina D, vitamin D<sub>3</sub> (kolekalciferol) i vitamin D<sub>2</sub> (ergokalciferol). Prvi se uglavnom sintetizira u koži pomoću 7-dehidrokolesterol reduktaze nakon izlaganja ultraljubičastom (UVB) zračenju, a može se dobiti i iz nekoliko prehrambenih izvora (uglavnom masna riba), dok D<sub>2</sub> proizvode biljke i gljive (Slika 6). Oba oblika transportiraju se krvlju do jetre gdje se pretvaraju u 25-hidroksivitamin D (25(OH)D ili kalcidiol) pomoću enzima 25-hidroksilaze (CYP27A1 i CYP2R1). U fiziološkim je koncentracijama 25(OH)D biološki neaktivan i mora se pretvoriti u biološki aktivan oblik 1,25-dihidroksivitamin D (1,25(OH)<sub>2</sub>D ili kalcitriol) pomoću 1 $\alpha$ -hidroksilaze (CYP27B1) u bubrezima. Aktivnost enzima 1 $\alpha$ -hidroksilaze pod strogim nadzorom kontrolira paratiroidni hormon (PTH), a inhibiraju ga visoke razine 1,25(OH)<sub>2</sub>D i faktor rasta fibroblasta 23 (FGF23). Također, enzim 24-hidroksilaza (CYP24A1) zaslužan je za inaktivaciju kalcitriola (21).

1,25(OH)<sub>2</sub>D ulazi u ciljne stanice, veže se za receptor vitamina D (VDR, engl. *vitamin D receptor*) i inducira konformacijsku promjenu koja dovodi do njegove interakcije s RXR-om. VDR/RXR heterodimer ima visoki afinitet za specifičnu sekvencu DNA koja se naziva VDRE (engl. *vitamin D response element*), što dovodi do ekspresije mnogih gena. Iako je najpoznatija uloga vitamina D održavanje ravnoteže kalcija i fosfata u serumu, čime se promiče zdravlje kostiju, vezanje 1,25(OH)<sub>2</sub>D za unutarstanični VDR potiče regulaciju više od 900 gena uključenih u mnoge fiziološke procese (21, 22).

Metabolit vitamina D, 1,25-dihidroksivitamin D, prirodni je ligand visokog afiniteta za transkripcijski faktor - VDR. U brojnim tkivima i tipovima stanica, VDR se veže na tisuće genomskih lokusa na način ovisan o ligandu, utječući, putem lokalnih promjena kromatina, na ekspresiju brojnih ciljnih gena. Posljedično, epigenom i transkriptom stanica koje izražavaju VDR izravno su oblikovani prisutnošću vitamina D (23). Postoji i forma membranski vezanog VDR-a koja bi mogla biti zaslužna za neposredne, negenomske procese vezane uz učinak vitamina D (24, 25). Ovi negenomske učinci ostvaruju se brzo, za razliku od genomskih vezanih uz nuklearni VDR, putem sekundarnih glasnika (26). Smatra se da je cis-izomer vitamina D odgovoran za ostvarenje negenomskih učinaka, a trans-izomer za ostvarenje genomskih, nuklearnih, učinaka (27).

VDR je prvotno otkriven u tkivima koja sudjeluju u regulaciji homeostaze kalcija i fosfata, kao što su crijeva, kosti, bubrezi i paratireoidne žlijezde. S obzirom na to da ova tkiva imaju najviše razine ekspresije VDR-a, ovo otkriće nije bilo iznenađujuće. Međutim, kako se ekspresija VDR-a pokazala u drugim tkivima, postalo je jasno da vitamin D sudjeluje u mnogim staničnim procesima nevezanim uz regulaciju kalcija i fosfata, što sugerira mogućnost postojanja dodatnih funkcija vitamina D. Sada je poznato da se VDR izražava u mnogim stanicama koje nisu povezane s regulacijom kalcija, uključujući dermalne fibroblaste i keratinocite kože, imunološke stanice, određene stanice kardiovaskularnog sustava i stanične komponente brojnih drugih tkiva (28).



**SLIKA 6.** Metabolizam vitamina D te genomski i negenomski učinci na stanice. Preuzeto i prilagođeno prema: Jeon SM, Shin EA. Exploring vitamin D metabolism and function in cancer. *Exp Mol Med.* 2018;50:1-14.

### 1.3.2. Insuficijencija i deficijencija vitamina D

Osobe koje su obično izložene riziku od nedostatka vitamina su one s nedovoljnom izloženošću suncu, ograničenim oralnim unosom ili oslabljenom crijevnom apsorpcijom. Adekvatnost vitamina D najbolje se utvrđuje mjerenjem koncentracije 25-hidroksivitamina D u krvi. Preporučeni je "optimalni" raspon za 25-hidroksivitamin D (25(OH)D) širok, a iznosi 25-80 ng/mL. Postoje različita mišljenja o definicijama insuficijencije vitamina D (<30 ng/mL) i deficijencije (<20 ng/mL). Blagi do umjereni nedostatak može biti povezan s osteoporozom i/ili sekundarnim hiperparatireoidizmom (HPT), dok ozbiljan nedostatak može rezultirati neuspjehom mineralizacije novoformiranog osteoida, što dovodi do rahitisa kod djece i osteomalacije kod odraslih. Receptori vitamina D prisutni su u većini stanica, a nedostatak može utjecati na različite organe, potencijalno utječući na imunitet, autoimunitet, miopatiju, dijabetes te povećavajući rizik od raka debelog crijeva, dojke i prostate. Više razine vitamina D također su povezane s duljim životom (29).

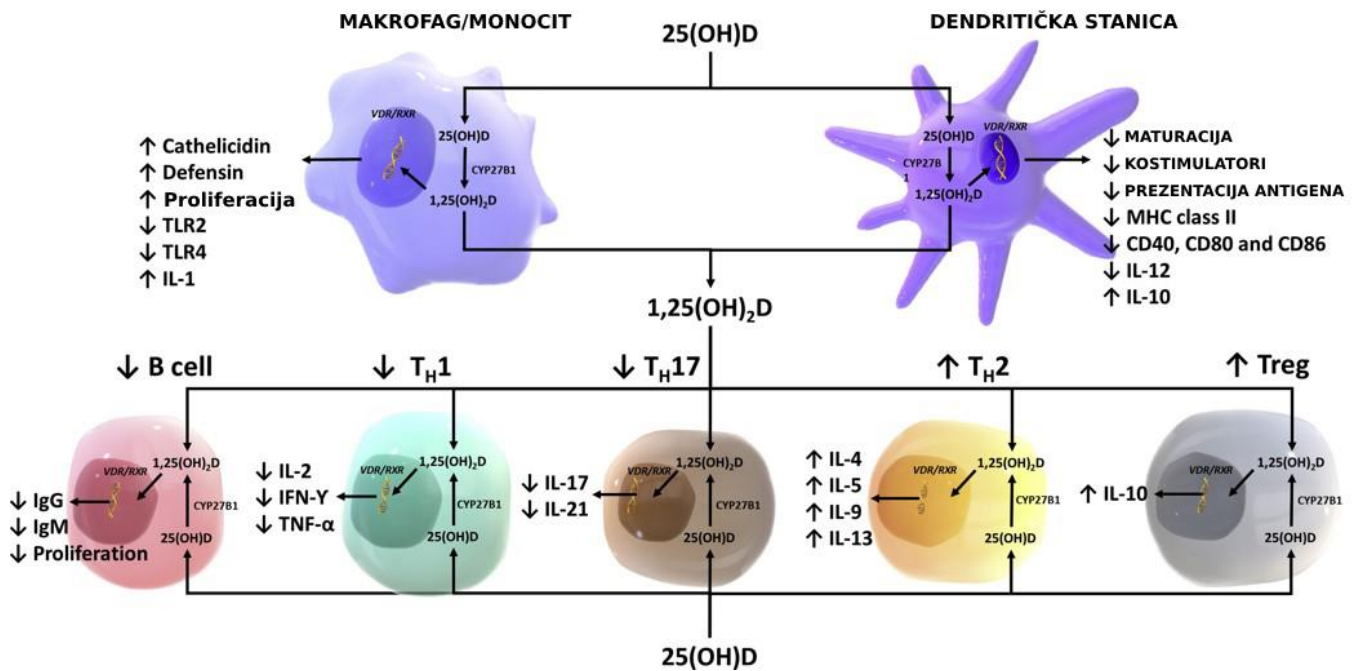
Prema jednoj nedavnoj analizi provedenoj na populaciji veličine oko 7,9 milijuna smatra se da 15.7% svjetske populacije pati od nedostatka vitamina D. Istovremeno, drugo

istraživanje pokazuje da prevalencija nedostatka vitamina D u europskoj populaciji možda čak doseže 40%, a prevalencija teškog nedostatka vitamina D do 13%. Zbog obujma ovog problema, potreba za ispravljanjem statusa vitamina D, uglavnom suplementacijom, često se smatra javnozdravstvenim problemom (14).

### 1.3.3. Uloga vitamina D u imunološkim reakcijama

Aktivacija VDR receptora pokreće široki raspon tzv. ne-klasičnih reakcija kao što je rast stanica, proliferacija, apoptoza i aktivacija imunoloških stanica. Otkriće proširenosti VDR receptora u skoro svim imunološkim stanicama potaknulo je na razmišljanje da bi vitamin D mogao imati ulogu u regulaciji imunološkog odgovora. Pokazano je da interakcija između VDR i njegovog liganda ostvaruje anti-inflamatorni učinak na prirodenu imunost i imunosupresivni učinak na stečenu imunost (22).

Pretpostavlja se da vitamin D ima imunosupresivnu ulogu u Hashimotovom tireoiditisu (HT) inhibicijom različitih komponenti imunološkog odgovora prikazanih na Slici 7. Većina imunoloških stanica, uključujući limfocite T, limfocite B i antigen prezentirajuće stanice (APC, engl. *antigen presenting cells*), poput dendritičnih stanica (DC, engl. *dendritic cells*) i makrofaga, izražavaju VDR i  $1\alpha$ -hidroksilazu. Na razini APC-a,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  inhibira površinsku ekspresiju MHC (engl. *major histocompatibility complex*) klase II i ko-stimulacijskih molekula te sprječava diferencijaciju i sazrijevanje DC-a, kao i njihovu aktivaciju te preživljavanje, što dovodi do smanjene prezentacije antigena, a posljedično tomu smanjene aktivacije limfocita T. Nadalje, kalcitriol modulira i ekspresiju citokina tako što inhibira proizvodnju interleukina IL-12 i IL-23, glavnih citokina odgovornih za diferencijaciju pomagačkih T-limfocita (Th1 i Th17 limfocita koji proizvode IL-17). Na taj način kalcitriol pomiče ravnotežu s Th1 i Th17 fenotipova u korist Th2 fenotipa. Također, kalcitriol direktno dovodi do pomaka s pro-inflamatornog prema tolerabilnijem imunološkom odgovoru tako što smanjuje produkciju IL-2 i interferona- $\gamma$  u Th1 limfocitima te IL-17 i IL-21 koji potječu iz Th17 limfocita, dok u isto vrijeme potiče produkciju anti-inflamatornih Th2 citokina kao što su IL-3, IL-4, IL-5 i IL-10. Osim toga, vitamin D promiče diferencijaciju Treg stanica kako bi se uspostavila ravnoteža Th17/Treg stanica i suzbila upala štitnjače izazvana Th17 stanicama. Naposljetku,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}$  inhibira proliferaciju B stanica i njihovu diferencijaciju u plazma stanice, sekreciju imunoglobulina (IgG i IgM) te inducira apoptozu B limfocita (21, 30).



**Slika 7.** Utjecaj vitamina D na imunološke stanice i modulacija imunoloških reakcija. Preuzeto i prilagođeno prema: Charoenngam N, Holick MF. Immunologic effects of vitamin D on human health and disease. *Nutrients*. 2020;12(7).

### 1.3.4. Povezanost vitamina D i VDR-a s Hashimotovim tireoiditisom

Nedavno je pokazano da vitamin D djeluje kao imunomodulatorni hormon, te je, sukladno tome, nedostatak vitamina D otkriven kao čimbenik rizika za autoimune bolesti štitnjače, iako su temeljni mehanizmi još uvijek nepoznati (30). Otkriće prisutnosti receptora za vitamin D u monocitima, dendritičkim stanicama i aktiviranim limfocitima T dovelo je do razmišljanja o potencijalnoj uključenosti vitamina D u imunološkom sustavu i patogenezi autoimunih bolesti (24). Niske razine vitamina D i polimorfizmi VDR gena prepoznati su kao bitni rizični čimbenici za razvitak autoimunih poremećaja. Smatra se da varijacije alela za VDR gen mogu biti u vezi s osjetljivošću za razvoj endokrinih autoimunih bolesti, a rizik za razvoj autoimunih bolest štitnjače posebno se povezuje s Bsm1 ili Taq1 polimorfizmima. Također, pronađeno je da su Taq1 TT i Fok1 FF genotipovi VDR gena povezani s rizikom za razvoj Hashimotovog tireoiditisa (22). Osim same povezanosti polimorfizama VDR gena s rizikom od razvoja HT-a, važno je istaknuti da je odgovor na suplementaciju vitaminom D također ovisan o polimorfizmu VDR gena. Poznato je da VDR gen, smješten na kromosomu 12 (12q13.11), ima preko 900 alelnih varijanti, a najviše proučavani polimorfizmi su Apal (rs7975232), BsmI (rs1544410), Taq1 (rs731236) i Fok1 (rs10735810). Ovi polimorfizmi mogu

mijenjati aktivnost VDR-a, što potencijalno objašnjava različite reakcije na suplementaciju vitaminom D. Konkretno, polimorfizam TaqI i FF genotip varijante FokI povezani su s boljim odgovorom na suplementaciju vitaminom D (31).

Većina istraživanja ukazuju na to da osobe s Hashimotovim tireoiditisom i Gravesovom bolešću imaju veću prevalenciju deficijencije vitamina D ili nižu razinu 25 (OH)-D u serumu, te deficijencija ili insuficijencija vitamina D mogu povećati rizik od autoimunih bolesti kao što je Hashimotov tireoiditis (32). Međutim, postoje i istraživanja s oprečnim rezultatima. Jedno takvo istraživanje, provedeno na ispitanicima iz CROHT biobanke od strane naših znanstvenika, navodi kako nije pronađena jasna povezanost između razine vitamina D i bolesnika s HT u svim stadijima bolesti. Ova studija predlaže i potrebu za diferencijacijom HT bolesnika prema stadijima bolesti budući da je pokazano da bolesnici u naprednijim stadijima bolesti imaju niže vrijednosti vitamina D kao i veću prevalenciju deficijencije vitamina D u odnosu na bolesnike u ranijim, blažim stadijima (33).

Pokazalo se da suplementacija vitaminom D može smanjiti prevalenciju i aktivnost više autoimunih bolesti, kao što su primjerice reumatoidni artritis, upalne bolesti crijeva i vitiligo. Randomizirano kliničko istraživanje VITAL iz 2022. godine, koje je obuhvatilo 25,871 sudionika iz Sjedinjenih Američkih Država, pokazalo je da suplementacija vitaminom D u dozi od 2000 IU/dnevno tijekom pet godina smanjuje rizik od razvoja bilo koje autoimune bolesti za 22%. Višestruke meta-analize također su pokazale da nedostatak vitamina D povećava rizik od razvoja različitih autoimunih stanja, uključujući i autoimune bolesti štitnjače (14).

Uloga vitamina D u nastanku autoimunih bolesti i dalje ostaje poprilično kontroverzna tema među znanstvenicima. Iako većina opservacijski studija pronalazi negativnu korelaciju između razine vitamina D i autoimunih bolesti, u većini istraživanja suplementacija vitaminom D nije pokazala učinke kod liječenja ovih bolesti. Ova diskrepancija između opservacijskih i intervencijskih istraživanja sugerira da bi deficijencija vitamina D mogla biti rezultat, a ne uzrok bolesti (22).

## **2. CILJ ISTRAŽIVANJA**



**Cilj istraživanja:** Cilj je istraživanja utvrditi i usporediti imunohistokemijski izražaj receptora za vitamin D (VDR) u bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom s kontrolnim ispitanicima čija patohistološka analiza tkiva štitnjače nije pokazala prisutnost HT-a.

**Hipoteza:** Imunohistokemijski izražaj VDR-a će biti niži u ispitanika s HT-om u usporedbi s kontrolnim ispitanicima.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Mjesto i ustroj istraživanja

Istraživanje je provedeno na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

### 3.2. Materijali

Parafinski blokovi tkiva štitnjače dobiveni su od pacijenata s Hashimotovim tireoiditisom (HT) koji su dio CROHT biobanke (*engl. Croatian biobank of patients with Hashimoto's thyroiditis*) i kontrolnih sudionika iz biobanke "10001 Dalmatinac" koji su prošli tireoidektomiju u Kliničkom bolničkom centru Split (34). CROHT biobanka formirana je u okviru Uspostavne potpore Hrvatske zaklade za znanost pod nazivom „Cjelogenomska analiza povezanosti Hashimotovog tireoiditisa“. Potrebno je naglasiti da se radi o izrazito rijetkim uzorcima tkiva štitnjače za koje imamo dostupne cjelogenomske genotipove i čitav niz dodatnih fenotipskih informacija koje nam mogu omogućiti provođenje dodatnih istraživanja. Tkiva su pregledana od strane stručnog patologa radi potvrde i diferencijacije HT od zdravog (kontrolnog) tkiva. Prikupili smo 19 različitih uzoraka tkiva štitnjače, 13 uzoraka tkiva štitnjače s HT-om i 6 uzoraka kontrolnih ispitanika.

### 3.3. Imunohistokemijski protokol

Uzorci su deparafinizirani i obrađeni kroz proces povrata antigena u citratnom puferu. Vežanje za nespecifične antigene blokirano je Protein Block-om (Abcam, Cambridge, UK). Presjeci tkiva inkubirani su s primarnim antitijelima za VDR (Sc-13133, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) u razrijeđenju 1:50 preko noći u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi. Zatim su preparati inkubirani sa sekundarnim antitijelima označenim zelenim (donkey anti-mouse AF488) fluorokromima u razrijeđenju 1:300. Naposljetku, uzorci su bojani s DAPI-jem (4',6-diamidino-2-fenilindol) u svrhu fluorescentnog bojanja jezgri. Svi obojani uzorci uklopljeni su u medij (Immu-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD) te su prekriveni pokrovnim stakalcem i osušeni na zraku.

Presjeci tkiva fotografirani su pomoću Nikon DS-Ri2 digitalne kamere (Diagnostic Instruments, USA), postavljene na Olympus BX51 fluorescentni mikroskop (Olympus, Tokio, Japan). Postavke kamere su podešene koristeći softver za snimanje slike NIS-Elements F na rezoluciji 1608×1608, s ekspozicijom od 100ms i filtrom za smanjenje šuma. Dvanaest mikrofotografija folikula štitnjače, pod povećanjem od 400×, snimljeno je po preparatu u sva tri fluorescentna kanala. Također, dvanaest mikrofotografija po preparatu snimljeno je s

ekspozicijom od 1ms kroz plavi fluorescentni filter u svrhu prikazivanja DAPI-jem obojanih jezgara.

### **3.4. Metode kvantifikacije imunofluorescencijskog signala**

Softver ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) korišten je za kvantitativnu evaluaciju imunoreaktivnosti. Mjerali smo postotak područja („area percentage“) označenog imunofluorescencijom VDR protutijela. Prvo je oduzet kanal crvene boje kako bi se izolirao zeleni signal. Zatim je korišten medijan filter s radijusom od 30,0 piksela. Rezultirajuće slike pretvorene su u 8-bitne slike, a prag je određen metodom „triangle“ u svrhu razdvajanja pozitivnih od negativnih piksela. Postotak površine pod pozitivnim signalom u tkivu štitnjače izmjeren je korištenjem funkcije "analyze particles" (ImageJ). Dobiveni postotak površine iskorišten je za statističku analizu rezultata. Za svaki uzorak, koji je uključivao 12 mikrofotografija, izračunali smo postotak površine obilježen imunofluorescencijom VDR protutijela te smo za svaki uzorak u konačnici izračunali aritmetičku sredinu postotka površine obilježenog imunofluorescencijom VDR protutijela koju smo koristili u daljnjoj analizi.

### **3.5. Etička načela**

Pismeni informirani pristanak dobiven je od svih sudionika studije, a studiju su odobrila dva odvojena etička povjerenstva: Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu (Klasifikacijski br. 003-08/14-03/0001; Urudžbeni br. 2181-198-03-04-14-0028) i Klinički bolnički centar Split (Klasifikacijski br. 530-02/13-01/11; Urudžbeni br. 2181-147-01/06/J.B.-14-2). Oba etička povjerenstva izjavila su da je studija u skladu s odredbama Etičkog kodeksa i Helsinške deklaracije.

### **3.6. Statistička obrada**

Podatci dobiveni u ImageJ-u statistički su obrađeni koristeći MedCalc softver (MedCalc software, Ostend, Belgija). Uzorke smo grupirali u dvije skupine: HT i kontrole. Podaci su prikazani kao medijani uz prvi i treći kvartil (Q1-Q3) ili kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju (SD). Kolmogorov-Smirnovljevim testom smo utvrdili normalnost distribucije postotka površine histološkog tkiva s fluorescentnim signalom u ispitanika s HT-om i kontrola. Postotak površine tkiva je bio normalno distribuiran u obje ispitivane skupine pa smo koristili parametrijski t-test za usporedbu srednjih vrijednosti između dviju skupina. Za procjenu statističke značajnosti ista je postavljena na  $P < 0,05$ .

## **4. REZULTATI**

Prikupili smo 19 različitih uzoraka tkiva štitnjače, 13 uzoraka tkiva štitnjače s HT-om i 6 uzoraka kontrolnih ispitanika. Medijan za dob ispitanika oboljelih od HT-a iznosio je 55,83 (50,32-60,99), a kontrolnih ispitanika 52,4 (46,4-57,9). U skupini ispitanika s HT-om svi su ispitanici bile žene, dok je udio žena u kontrolnoj skupini iznosio 66,7%. Nismo imali podatke o hormonima štitnjače, protutijelima na štitnjaču i razini vitamina D za kontrolne ispitanike (Tablica 1).

**Tablica 1.** Demografske i kliničke karakteristike ispitanika

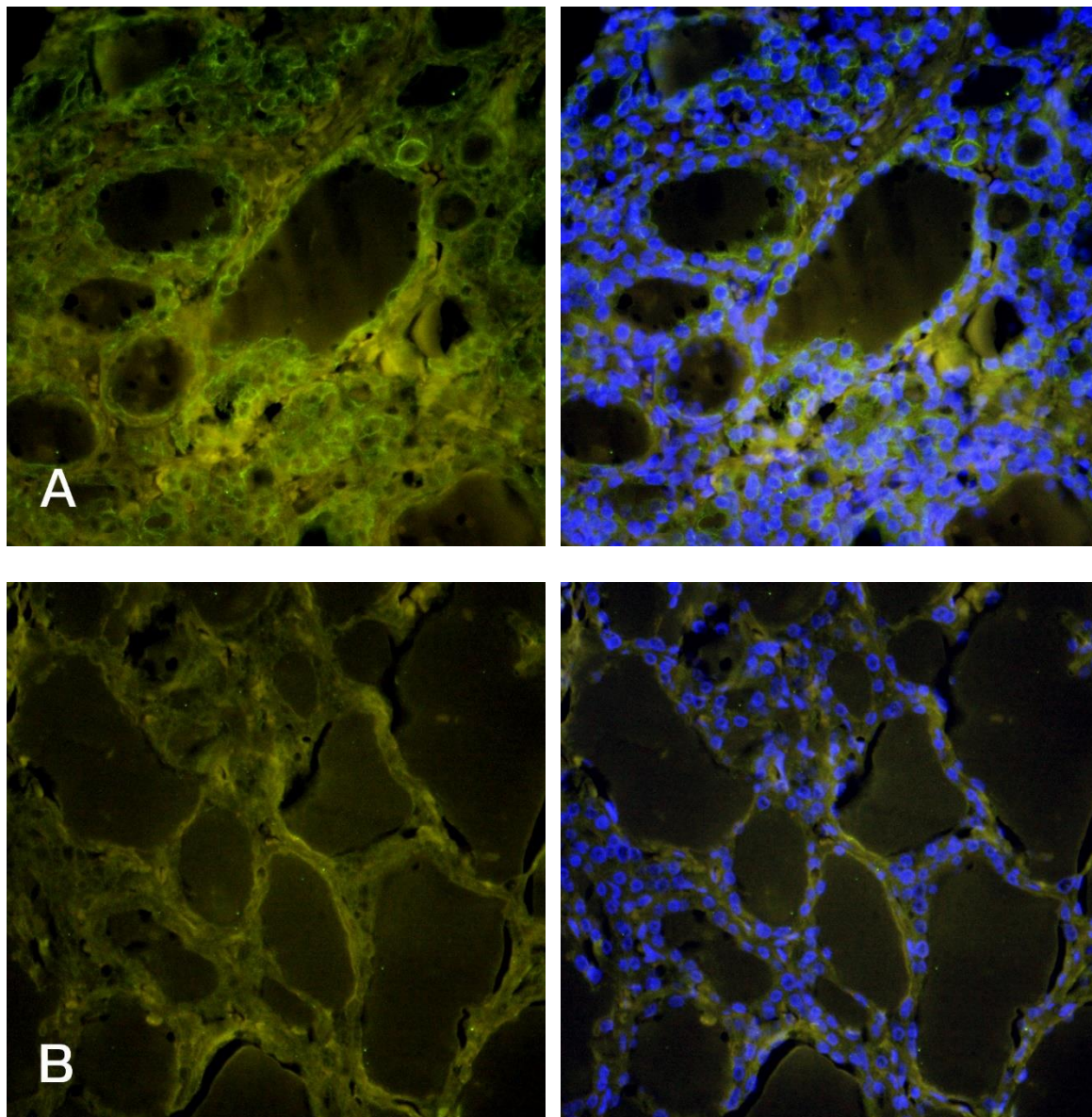
|                    | <b>Ispitanici oboljeli od HT-a<br/>(N=13)</b> | <b>Kontrolni ispitanici<br/>(N=6)</b> |
|--------------------|---|---------------------------------------|
|                    | <b>Medijan (Q1-Q3)</b>                        | <b>Medijan (Q1-Q3)</b>                |
| TSH, mIU/l         | 1,82 (1,21-2,97)                              | /                                     |
| T3, nmol/l         | 1,65 (1,50-1,90)                              | /                                     |
| T4, nmol/l         | 112 (112-137)                                 | /                                     |
| fT4, pmol/l        | 13,05 (11,9-14,1)                             | /                                     |
| TgAb, IU/ml        | 115 (24,3-345,8)                              | /                                     |
| TPOAb, IU/ml       | 158 (124-273)                                 | /                                     |
| Vitamin D, ng/ml   | 23,15 (16,1-28,8)                             | /                                     |
| Dob, godine        | 55,83 (50,32-60,99)                           | 52,4 (46,4-57,9)                      |
| <b>Spol, N (%)</b> |   |                                       |
| Muškarci           | 0 (0%)  | 2 (33,3%)                             |
| Žene               | 13 (100%)                                     | 4 (66,7%)                             |

Rezultati su prikazani kao medijan uz prvi i treći kvartil (Q1-Q3) za izmjerene laboratorijske parameter i za dob te kao broj uzoraka (udio od ukupnog broja uzoraka) za spol.

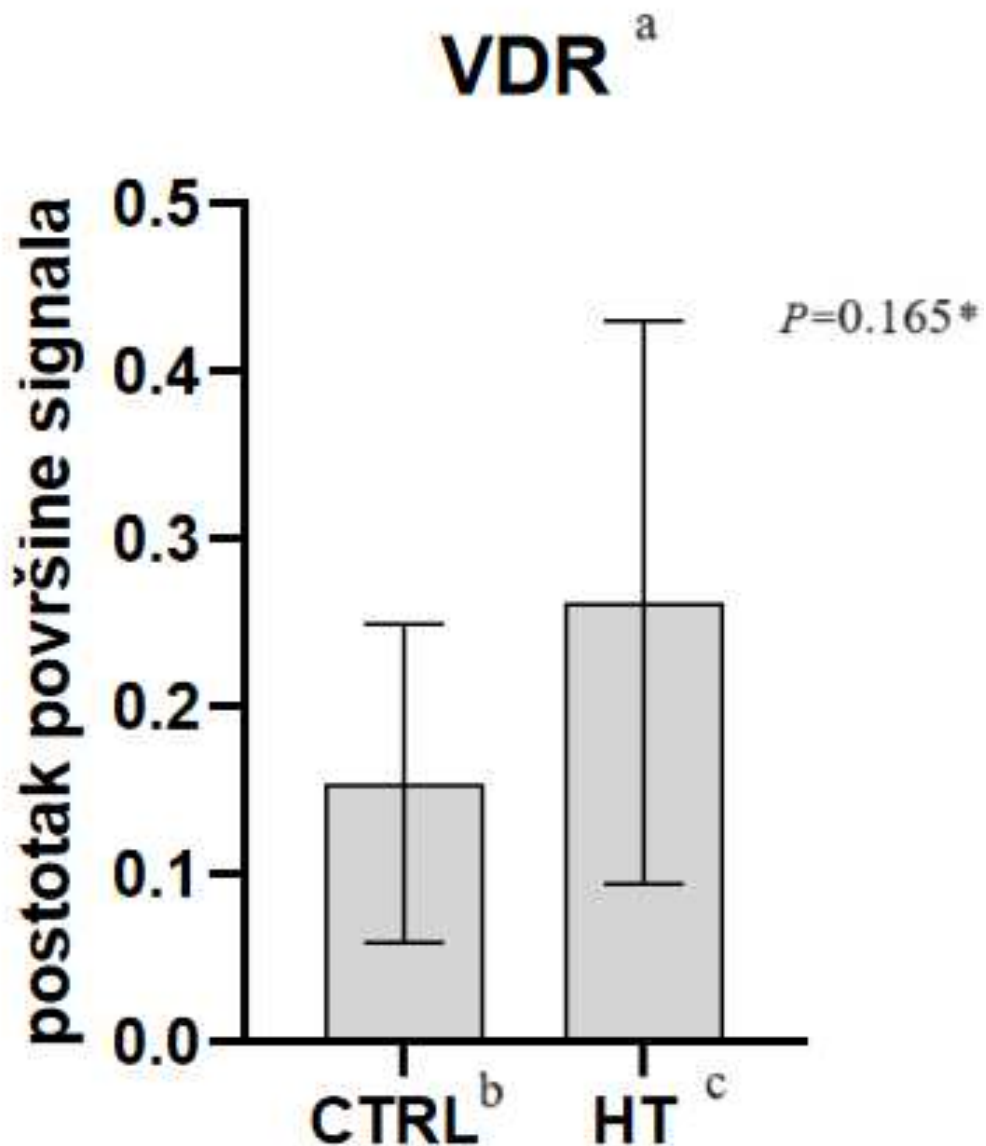
N - broj ispitanika, Q1 – prvi kvartil, Q3 – treći kvartil

Imunofluorescencijsko bojenje na VDR prikazalo je uglavnom zrnati citoplazmatski uzorak umjerenog do jakog intenziteta u tkivu štitnjače bolesnika s HT-om. Pozitivitet je bio prisutan i u folikularnim i parafolikularnim stanicama. U tkivu štitnjače zdravih ispitanika pronađen je sličan uzorak, no slabijeg intenziteta bojenja (Slika 8). Prema rezultatima t-testa, nismo utvrdili statistički značajnu razliku u izražaju VDR-a između ispitanika s HT-om i kontrolnih ispitanika ( $P=0.165$ ). Uočili smo trend većeg postotka površine histološkog tkiva s

fluorescentnim signalom u ispitanika s HT-om ( $0.262 \pm 0.168$ ) u odnosu na kontrolne ispitanike ( $0.154 \pm 0.095$ ). Rezultate smo prikazali i grafički (Slika 9).



**Slika 8.** Imunohistokemijski izražaj receptora za vitamin D u tkivu štitnjače. **A** - intenzitet fluorescencije prikazan u tkivu štitnjače ispitanika s HT-om (lijevo) i preklopljeno s DAPIjem (desno), povećanje x400; **B** - intenzitet fluorescencije u tkivu štitnjače zdravih ispitanika (lijevo) i preklopljeno s DAPIjem (desno), povećanje x400.



**Slika 9.** Usporedba izražaja receptora za vitamin D između ispitanika s HT-om i kontrolnih ispitanika prema postotku površine signala. Podaci su prikazani kao aritmetička sredina uz standardnu devijaciju. <sup>a</sup> receptor za vitamin D, <sup>b</sup> kontrole, <sup>c</sup> ispitanici s Hashimotovim tireoiditisom, \*t-test za nezavisne uzorke



## **5. RASPRAVA**

Budući da uloga vitamina D u nastanku HT-a još nije jasno objašnjena, odlučili smo usporediti imunohistokemijski izražaj VDR-a na tkivu štitnjače u bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom i kontrolnim ispitanicima. Nismo utvrdili statistički značajnu razliku u izražaju VDR-a, ali smo detektirali njegovu povećanu ekspresiju u ispitanika s HT-om.

Prema nekim spoznajama za očekivati je da bi deficijencija vitamina D trebala biti uzrokom snižene, a ne povišene ekspresije VDR-a. Jedno od mogućih objašnjenja ove snižene ekspresije mogla bi biti povećana prevalencija deficijencije vitamina D kod oboljelih od HT-a. Zanimljiva je sposobnost vitamina D da poveća razinu ekspresije gena za VDR, odnosno može se reći da vitamin D autoregulira ekspresiju gena za VDR preko intronskih i "upstream" pojačivača. Budući da se većina biološke aktivnosti vitamina D odvija putem receptora za vitamin D, ekspresija receptora u stanicama glavni je uvjet za odgovor, a sama koncentracija receptora ključna je komponenta osjetljivosti na taj vitamin (35). Također, pokazano je i da je hipermetilacija VDR gena značajno povezana sa sniženim razinama vitamina D kao i sa sniženom ekspresijom VDR gena (36). Osim toga, u jednoj blizanačkoj genetskoj studiji pokazano je da je suplementacija kolekalciferolom u koncentraciji od 2000 IU kroz 2 mjeseca povećala koncentraciju vitamina D u serumu za 65% kao i ekspresiju VDR mRNA 60 puta (37). Zbog toga bi bilo korisno uzeti u obzir i razine vitamina D prilikom očitavanja rezultata ekspresije VDR-a, a svaka istraživanja na temu ekspresije VDR-a trebala bi imati izmjerene vrijednosti vitamina D.

Bitno je napomenuti kako su naši rezultati u pogledu razina vitamina D u ispitanika s HT-om u skladu s prethodnim istraživanjem iz CROHT biobanke prema kojima nije utvrđena značajna razlika u razinama vitamina D između 461 bolesnika s HT-om i 176 kontrola uz korekcije za dob, spol, pušenje, indeks tjelesne mase i sezonalnost. Također u spomenutom je istraživanju prikazan i veliki trend deficijencije vitamina D s malo više od 60% i u ispitanika oboljelih od HT-a i kontrolnih ispitanika (33). Naša kohorta također nije statistički značajno različita što se tiče i ekspresije VDR-a i razina vitamina D. Budući da su podatci naših ispitanika s HT-om dobiveni iz iste biobanke, izmjerene povećane razine vitamina D mogu biti odlika upravo CROHT biobanke.

Iako brojna druga istraživanja dokazuju povezanost deficijencije vitamina D s Hashimotovim tireoiditisom, ne može se sa velikom sigurnošću reći na koji način vitamin D utječe na patofiziologiju HT-a (32). Unatoč velikoj zainteresiranosti znanstvene zajednice za vitamin D i njegov utjecaj na autoimune bolesti, dosad nije bilo nikakvih istraživanja na temu

ekspresije receptora za ovaj vitamin u tkivu štitnjače bolesnika s HT-om. Jedno istraživanje rađeno je na temu ekspresije VDR mRNA u T-stanicama bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom, međutim nismo uspjeli pronaći nijedno istraživanje koje bi uspoređivalo razliku u imunohistokemijskoj ekspresiji samog VDR-a između zdravog tkiva štitnjače i tkiva štitnjače kod HT-a (38). Time bi ovo istraživanje bilo prvo u svijetu koje se dotaklo ove problematike.

Na fotosintezu i bioraspoloživost vitamina D utječe niz rizičnih čimbenika koji utječu na status vitamina D te ja jako teško sustavno analizirati vitamin D i njegov utjecaj na razvoj autoimunih bolesti. U rizične čimbenike pripadaju varijacija u izloženosti suncu zbog geografske širine, godišnjeg doba, doba dana, odjeće, korištenja kreme za sunce, pigmentacije kože, kao i starost, pretilost i učestalost nekoliko kroničnih bolesti (39). Tako su rezultati nekih studija pokazali visoku sezonsku varijaciju u razinama serumskog 25(OH)D u populaciji odraslih i starijih osoba, pri čemu je nedostatak bio posebno izražen tijekom zime (40). Prednost našeg istraživanja jest u tome što imamo podatke o vremenu izvršenih tireoidektomija u ispitanika oboljelih od HT-a, a koji nam navode da su sve tireoidektomije izvršene u približno istom godišnjem dobu. Time se može ukloniti ovaj zbunjujući faktor za skupinu ispitanika s HT-om. Međutim, nismo uspjeli pronaći istu vrstu podataka za kontrolnu skupinu iz "10001 dalmatinac" biobanke. Zbog nedostatka tih podataka, ne možemo sa sigurnošću procijeniti kakav bi utjecaj potencijalna izloženost vitaminu D mogla imati na ekspresiju VDR kod kontrolne skupine.

Osim toga, u ovom istraživanju o izražaju VDR-a u štitnjači ispitanika s Hashimotovim tireoiditisom ima još nekoliko potencijalnih nedostataka koji mogu utjecati na generalizaciju i interpretaciju rezultata. Mali uzorak ispitanika ograničava statističku snagu i može dovesti do pristranosti rezultata. Istraživanje je također provedeno u samo jednom centru, što smanjuje mogućnost ekstrapolacije nalaza na širu populaciju. Konačno, korištenje imunohistokemije kao metode može dovesti do subjektivnosti prilikom snimanja slika, što dovodi do ograničenja u smislu specifičnosti i osjetljivosti detekcije imunofluorescencijskog signala VDR-a.

Buduća istraživanja mogla bi preciznije usporediti postoji li razlika u ekspresiji VDR-a između različitih stanica tkiva štitnjače. Naše istraživanje obuhvatilo je cjelokupnu ekspresiju VDR-a cijelog tkiva štitnjače, ali bi moglo biti korisno i istražiti razlike u ekspresiji između specifičnih staničnih tipova, kao što su folikularne stanice i limfocitni infiltrati u tkivu štitnjače kod ispitanika s Hashimotovim tireoiditisom. Takva diferencirana analiza omogućila bi

detaljnije razumijevanje uloge VDR-a u različitim staničnim komponentama štitnjače, što bi moglo pružiti bolji uvid u specifične patofiziološke mehanizme bolesti.

VDR nije jedini protein uključen u metabolizam vitamina D. RXR,  $1\alpha$ -hidroksilaza i 24-hidroksilaza neki su od proteina također uključenih u metabolizam vitamina D. Istraživanje izražaja ovih proteina moglo bi produbiti znanja o mehanizmima vezanim za metabolizam vitamina D kod ispitanika s HT-om (41).

Brojne studije pokazale su da suplementacija vitaminom D može imati brojne korisne učinke kod bolesnika s HT-om modulirajući imunološki sustav i unaprjeđujući funkciju štitnjače. Osim sniženja anti-TPO i anti-TG protutijela, zapažen je i značajan porast razine FT3 i FT4, što bi značilo da je osim smanjenog imunološkog odgovora na antigene štitnjače poboljšana i njena funkcija (42). Uzimajući u obzir nisku cijenu i minimalan rizik od nuspojava, za pacijente s Hashimotovim tireoiditisom preporuča se laboratorijska provjera na deficijenciju vitamina D i shodno tome pažljiva suplementacija vitaminom D uz mjesečno praćenje razine kalcija i vitamina D (43).

Saznanje o razini ekspresije VDR-a važno je jer nam pojašnjava utjecaj vitamina D na tkivo štitnjače, a njegova poznata uloga u imunološkim procesima mogla bi biti od velike važnosti prilikom istraživanja mogućih terapijskih i kliničkih implikacija, kako za Hashimotov tireoiditis, tako i za ostale autoimune bolesti.

## **6. ZAKLJUČCI**

Iz rezultata ovog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Nismo pokazali statistički značajnu razliku u ekspresiji VDR-a između tkiva štitnjače u oboljelih od Hashimotovog tireoiditisa i u zdravih ispitanika.
2. Funkcionalno smo potvrdili rezultat prijašnjeg opservacijskog istraživanja iz CROHT biobanke u kojem je pronađeno da nema razlike u razinama vitamina D između ispitanika oboljelih od HT-a i kontrola, a kojoj pripadaju naši ispitanici.
3. Imunohistokemijski izražaj ovog receptora mogao bi biti od važnosti za buduća istraživanja koja istražuju učinkovitost suplementacije vitaminom D kod oboljelih od HT-a i drugih autoimunih bolesti štitnjače.

## **7. LITERATURA**

1. Khan YS, Farhana A. Histology, thyroid gland. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Aisha Farhana declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.; 2023.
2. Allen E, Fingeret A. Anatomy, head and neck, thyroid. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Abbey Fingeret declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.; 2023.
3. White AM, Lasrado S. Anatomy, head and neck, thyroid arteries. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Savita Lasrado declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2023.
4. Rosen RD, Sapra A. Embryology, thyroid. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Amit Sapra declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2023.
5. AL M. Junqueira's basic histology text and atlas. 13. izdanje. New York: McGraw Hill Medical; 2013. str. 930-4.
6. Shahid MA, Ashraf MA, Sharma S. Physiology, thyroid hormone. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Muhammad Ashraf declares no relevant financial relationships with ineligible companies. Disclosure: Sandeep Sharma declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2024.
7. Hall JE. Guyton and Hall textbook of medical physiology. 14. izdanje. Philadelphia, PA: Elsevier; 2016. str. 941-6.
8. Boron WF, Boulpaep EL. Medical physiology. 3. izdanje. Philadelphia, PA: Elsevier; 2017. str. 1974-90.
9. Vitti P, Hegedüs L. Thyroid diseases pathogenesis, diagnosis, and treatment. 1. izdanje. Cham, Switzerland: Springer; 2018. str. 206-36.
10. Ragusa F, Fallahi P, Elia G, Gonnella D, Paparo SR, Giusti C, i sur. Hashimotos' thyroiditis: Epidemiology, pathogenesis, clinic and therapy. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2019;33:101367.
11. Akamizu T, Amino N. Hashimoto's Thyroiditis. U: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, i sur., editors. Endotext. South Dartmouth (MA)2000.



12. Mincer DL, Jialal I. Hashimoto thyroiditis. StatPearls. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Ishwarlal Jialal declares no relevant financial relationships with ineligible companies.2023.
13. Ralli M, Angeletti D, Fiore M, D'Aguanno V, Lambiase A, Artico M, i sur. Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation. *Autoimmun Rev.* 2020;19:102649.
14. Lebiedzinski F, Lisowska KA. Impact of vitamin D on immunopathology of Hashimoto's thyroiditis: From theory to practice. *Nutrients.* 2023;15.
15. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 9. izdanje. Philadelphia, PA: Elsevier; 2015. str. 1086.
16. Weetman AP. An update on the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *J Endocrinol Invest.* 2021;44:883-90.
17. Hiromatsu Y, Satoh H, Amino N. Hashimoto's thyroiditis: history and future outlook. *Hormones (Athens).* 2013;12:12-8.
18. Kasper DL, Jameson JL, Longo DL, Loscalzo J, Hauser SL, Fauci AS. Harrison's manual of medicine. 19. izdanje. New York: McGraw Hill Medical; 2016. str. 887-8.
19. Klubo-Gwiezdzinska J, Wartofsky L. Hashimoto thyroiditis: an evidence-based guide to etiology, diagnosis and treatment. *Pol Arch Intern Med.* 2022;132.
20. Makariou S, Liberopoulos EN, Elisaf M, Challa A. Novel roles of vitamin D in disease: what is new in 2011? *Eur J Intern Med.* 2011;22:355-62.
21. Kim D. The Role of vitamin D in thyroid diseases. *Int J Mol Sci.* 2017;18.
22. Bizzaro G, Antico A, Fortunato A, Bizzaro N. Vitamin D and Autoimmune Diseases: Is vitamin D receptor (VDR) polymorphism the culprit? *Isr Med Assoc J.* 2017;19:438-43.
23. Carlberg C. Vitamin D and its target genes. *Nutrients.* 2022;14.
24. Miteva MZ, Nonchev BI, Orbetzova MM, Stoencheva SD. Vitamin D and autoimmune thyroid diseases - a review. *Folia Med (Plovdiv).* 2020;62:223-9.
25. Fleet JC. Vitamin D receptors: not just in the nucleus anymore. *Nutr Rev.* 1999;57:60-2.
26. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, i sur. The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res.* 1998;13:325-49.
27. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1alpha,25(OH)(2)vitamin D(3): genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25:543-59.

28. Pike JW, Meyer MB, Lee SM, Onal M, Benkusky NA. The vitamin D receptor: contemporary genomic approaches reveal new basic and translational insights. *J Clin Invest.* 2017;127:1146-54.
29. Kennel KA, Drake MT, Hurley DL. Vitamin D deficiency in adults: when to test and how to treat. *Mayo Clin Proc.* 2010;85:752-7; quiz 7-8.
30. Zhao R, Zhang W, Ma C, Zhao Y, Xiong R, Wang H, i sur. Immunomodulatory function of vitamin D and its role in autoimmune thyroid disease. *Front Immunol.* 2021;12:574967.
31. Usategui-Martin R, De Luis-Roman DA, Fernandez-Gomez JM, Ruiz-Mambrilla M, Perez-Castrillon JL. Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms modify the response to vitamin D supplementation: A systematic review and meta-analysis. *Nutrients.* 2022;14.
32. Khozam SA, Sumaili AM, Alflan MA, Shawabkeh RAS. Association between vitamin D deficiency and autoimmune thyroid disorder: A systematic review. *Cureus.* 2022;14:e25869.
33. Cvek M, Kalicanin D, Baric A, Vuletic M, Gunjaca I, Torlak Lovric V, i sur. Vitamin D and Hashimoto's thyroiditis: Observations from CROHT biobank. *Nutrients.* 2021;13.
34. Rudan I, Marusic A, Jankovic S, Rotim K, Boban M, Lauc G, i sur. "10001 Dalmatians:" Croatia launches its national biobank. *Croat Med J.* 2009;50:4-6.
35. Pike JW, Meyer MB. The vitamin D receptor: new paradigms for the regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D(3). *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2010;39:255-69, table of contents.
36. Maruthai K, Sankar S, Subramanian M. Methylation status of VDR gene and its association with vitamin D status and VDR gene expression in pediatric tuberculosis disease. *Immunol Invest.* 2022;51:73-87.
37. Medeiros JFP, de Oliveira Borges MV, Soares AA, Dos Santos JC, de Oliveira ABB, da Costa CHB, i sur. The impact of vitamin D supplementation on VDR gene expression and body composition in monozygotic twins: randomized controlled trial. *Sci Rep.* 2020;10:11943.
38. Tokic S, Stefanic M, Karner I, Glavas-Obrovac L. Altered expression of CTLA-4, CD28, VDR, and CD45 mRNA in T cells of patients with Hashimoto's thyroiditis - a pilot study. *Endokrynol Pol.* 2017;68:274-828.
39. Tsiaras WG, Weinstock MA. Factors influencing vitamin D status. *Acta Derm Venereol.* 2011;91:115-24.

40. Hribar M, Hristov H, Gregoric M, Blaznik U, Zaletel K, Oblak A, i sur. Nutrihealth study: Seasonal variation in vitamin D status among the Slovenian adult and elderly population. *Nutrients*. 2020;12.
41. Bikle DD. Vitamin D: Production, metabolism and mechanisms of action. U: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, i sur., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA)2000.
42. Tang J, Shan S, Li F, Yun P. Effects of vitamin D supplementation on autoantibodies and thyroid function in patients with Hashimoto's thyroiditis: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2023;102:e36759.
43. Lontiris MI, Mazokopakis EE. A concise review of Hashimoto thyroiditis (HT) and the importance of iodine, selenium, vitamin D and gluten on the autoimmunity and dietary management of HT patients.Points that need more investigation. *Hell J Nucl Med*. 2017;20:51-6.

## **8. SAŽETAK**

**Cilj:** usporedba izražaja receptora za vitamin D (VDR) između tkiva štitnjače bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom (HT) i tkiva štitnjače zdravih ispitanika.

**Materijali i metode:** prikupljeno je 19 uzoraka tkiva štitnjače za potrebe istraživanja. 13 uzoraka s HT-om iz CROHT biobanke te 6 uzoraka zdravih ispitanika iz biobanke “10001 dalmatinac”. Uzorci su imunohistokemijski obojeni s protutijelom na VDR, slikani na fluorescentnom mikroskopu i obrađeni u ImageJ programu. Za procjenu statističke značajnosti koristili smo parametrijski t-test za usporedbu srednje vrijednosti postotka površine obilježene imunofluorescencijom VDR protutijela između dviju ispitivanih skupina.

**Rezultati:** nismo utvrdili statistički značajnu razliku u izražaju VDR-a između ispitanika s HT-om i kontrolnih ispitanika ( $P=0.165$ ). Detektiran je veći postotak izražaja u ispitanika s HT-om ( $0.262 \pm 0.168$ ) u odnosu na kontrolne ispitanike ( $0.154 \pm 0.095$ ).

**Zaključci:** naše istraživanje koje istražuje izražaj VDR-a potencijalno je važno jer nam pomaže u razumijevanju utjecaja vitamina D na tkivo štitnjače. Naši rezultati nisu utvrdili statistički značajnu razliku u izražaju VDR-a između ispitanika s HT-om i kontrolnih ispitanika, što funkcionalno potvrđuje rezultat prijašnjeg opservacijskog istraživanja iz iste biobanke kojoj pripadaju i naši ispitanici, a u kojem je pronađeno da nema razlike u razinama vitamina D između ove dvije skupine ispitanika.

## **9. SUMMARY**

**Diploma thesis title:** Immunohistochemical expression of vitamin D receptor (VDR) in thyroid tissue of patients with Hashimoto's thyroiditis.

**Objectives:** Comparison of vitamin D receptor (VDR) expression between thyroid tissue of patients with Hashimoto's thyroiditis (HT) and thyroid tissue of healthy individuals.

**Materials and Methods:** Nineteen thyroid tissue samples were collected for the study: 13 samples with HT from the CROHT biobank and 6 samples from healthy participants from the "10001 Dalmatians" biobank. The samples were immunohistochemically stained with an VDR antibody, images were taken using a fluorescent microscope, and processed with ImageJ software. For the assessment of statistical significance, we used a parametric t-test to compare the mean percentage of area marked by VDR antibody immunofluorescence between the two study groups.

**Results:** We did not find a statistically significant difference in VDR expression between patients with HT and control subjects ( $P=0.165$ ). A higher percentage of expression was detected in HT patients ( $0.262 \pm 0.168$ ) compared to control subjects ( $0.154 \pm 0.095$ ).

**Conclusions:** Our research investigating VDR expression is potentially important as it helps us understand the impact of vitamin D on thyroid tissue. Our results did not establish a statistically significant difference in VDR expression between subjects with HT and control subjects, functionally confirming the result of a previous observational study from the same biobank to which our subjects belong, which found no difference in vitamin D levels between these two groups.