



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Tihana Serdar Hiršl

UČINAK REGULACIJE SUPKLINIČKE HIPOTIREOZE LEVOTIROKSINOM NA BILJEGE ENDOTELNE DISFUNKCIJE

DOKTORSKI RAD

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Anita Somborac Bačura

Zagreb, 2025.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Tihana Serdar Hiršl

**EFFECTS OF LEVOTHYROXINE THERAPY
ON MARKERS OF ENDOTHELIAL
DYSFUNCTION IN SUBCLINICAL
HYPOTHYROIDISM**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Assoc. Prof. Anita Somborac Bačura, PhD

Zagreb, 2025

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Ovaj je doktorski rad izrađen pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Anite Somborac Bačura, u sklopu poslijediplomskog dokorskog studija Farmaceutsko-biokemijske znanosti na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu.

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Aniti Somborac Bačura na podršci, stručnim savjetima i pomoći u izradi doktorskog rada.

Veliko hvala mojim suradnicama doc. dr. sc. Koraljki Đurić, dr. sc. Marini Čepnji i dr. sc. Ivani Zec na poticanju, motivaciji i organizacijskim rješenjima za prepreke na koje smo nailazili, ali zahvaljujući njima nikad nismo ni smjeli pomisliti stati.

Zahvaljujem liječnicima i laboratorijskim djelatnicima medicinsko-biokemijskog laboratorija Specijalne bolnice Agram te liječnicima i laboratorijskim djelatnicima Klinike za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice na velikodušnoj pomoći pri sakupljanju uzoraka uz sav svoj užurbani rutinski dio posla. Zahvaljujem na poticaju i financijskoj podršci u izradi istraživanja Synlab Hrvatska Poliklinici i ravnateljici mr. sc. Tanji Bobetić-Vranić te Hrvatskom društvu za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu na dodijeljenoj istraživačkoj stipendiji naziva: „Program poticanja znanstveno – istraživačke aktivnosti članova HDMBLM prof. dr. sc. Elizabeta Topić“.

Od srca zahvaljujem mojim divnim prijateljima jer su mi uvijek bili podrška i inspiracija za neodustajanje.

Hvala mojoj obitelji, roditeljima, sestri, mužu i djeci na strpljenju i vjeri u mene.

SAŽETAK

Supklinička hipotireoza (SH) stanje je povišene koncentracije tireotropina (TSH) uz normalnu koncentraciju slobodnog tiroksina (FT4) i slobodnog trijodtironina (FT3) u serumu. Ovisno o vrijednosti povišenog TSH dijeli se na blaži oblik SH ($TSH \leq 10,0$ mIU/L) i teži oblik SH ($TSH > 10,0$ mIU/L). Supklinička hipotireoza je najčešće asimptomatska bolest, no predstavlja neovisni čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti zbog razvoja endotelne disfunkcije i ateroskleroze.

Cilj istraživanja bio je utvrditi učinak levotiroksina u bolesnika s blažim oblikom SH na koncentraciju biljega endotelne disfunkcije u krvi (endokan, asimetrični dimetilarginin (ADMA) i endotelin-1 (ET-1)) te drugih biokemijskih kardiovaskularnih čimbenika rizika (trigliceridi, ukupni kolesterol, LDL (lipoproteini niske gustoće) kolesterol i ne-HDL kolesterol (sve aterogene lipoproteinske čestice koje nisu lipoproteini visoke gustoće), visokoosjetljivi C-reaktivni protein (hs-CRP), broj leukocita, trombocita te srednji volumen trombocita (MPV)), budući da je liječenje ovih bolesnika individualno, a klinička važnost i korisnost liječenja jesu i dalje predmet čestih rasprava.

U ovoj prospektivnoj studiji ispitanici (18 - 75 godina, oba spola) su obrađivani putem sistematskih pregleda u Specijalnoj bolnici Agram i pri specijalističkom pregledu u Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice. Studijom je obuhvaćeno 29 odraslih osoba s postavljenom dijagnozom blažeg oblika SH kojima je pri uključivanju u istraživanje propisana nadomjesna terapija levotiroksinom, 32 odrasle osobe s postavljenom dijagnozom blažeg oblika SH kojima terapija nije propisana i 30 zdravih ispitanika s urednom funkcijom štitnjače koji su prema spolu i dobi odgovarali bolesnicima s SH. Biljezi endotelne disfunkcije i odabrani biokemijski biljezi određeni su kod svih ispitanika na početku istraživanja te u bolesnika s propisanom terapijom levotiroksinom nakon šest mjeseci liječenja od uspostavljene eutireoze i u bolesnika kojima terapija nije propisana nakon šest mjeseci praćenja.

Bolesnici s blažim oblikom SH pokazali su značajno više serumske koncentracije ADMA, endokana, LDL kolesterola i ne-HDL kolesterola u usporedbi sa zdravim ispitanicima. U bolesnika sa SH nakon šest mjeseci liječenja levotiroksinom od uspostavljene eutireoze došlo je do značajnog smanjenja koncentracije endokana i ukupnog kolesterola. U skupini bolesnika sa SH bez terapije levotiroksinom nakon šest mjeseci praćenja značajno se povećala koncentracija ET-1, dok nije bilo promjena u koncentracijama ADMA i endokana.

Ovo istraživanje pokazalo je da bolesnici s blažim oblikom SH imaju povećanu koncentraciju biljega endotelne disfunkcije i dodatnih biokemijskih čimbenika rizika u krvi što bi moglo upućivati na povećani rizik za razvoj kardiovaskularnih bolesti. Temeljem praćenja odabranih parametara endotelnog statusa također je pokazano da je uvođenje supstitucijske terapije levotiroksinom kod ovih bolesnika dovelo do poboljšanja endotelnog statusa i potencijalno smanjenja rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti te dodatno usporavanje napredovanja hipotireoze u klinički manifestnu bolest.

Ključne riječi: supklinička hipotireoza, levotiroksin, asimetrični dimetilarginin, endotelin-1, endokan

SUMMARY

Background: Subclinical hypothyroidism (SCH) is a condition characterized by elevated serum thyroid-stimulating hormone (TSH) concentrations with normal free thyroxine (FT4) and free triiodothyronine (FT3) concentrations. According to serum TSH concentrations, SCH can be classified into mild ($\text{TSH} \leq 10.0 \text{ mIU/L}$) and severe ($\text{TSH} > 10.0 \text{ mIU/L}$) forms, with the mild form accounting for approximately 75% of all cases. Although most patients with SCH are asymptomatic, the condition can negatively affect the cardiovascular system. SCH is an independent risk factor for atherosclerosis, congestive heart failure, coronary heart disease, ischemic heart disease, and associated mortality.

While the link between SCH and cardiovascular diseases is well-established, the underlying molecular mechanism remains unclear. It is hypothesized that these underlying mechanisms involve specific molecular pathways in endothelial cells, leading to decreased nitric oxide (NO) and other changes indicative of endothelial dysfunction. These alterations contribute to atherosclerosis development and an increased risk of cardiovascular disease.

In clinical practice, levothyroxine is typically prescribed for SCH patients with $\text{TSH} > 10.0 \text{ mIU/L}$. For those with $\text{TSH} \leq 10.0 \text{ mIU/L}$, treatment is individualized, based on factors such as age, pregnancy status or plans, goiter presence, positive anti-thyroid peroxidase (anti-TPO) antibodies, and symptoms (*e.g.* fatigue, cold intolerance, dry skin, depression, cardiac dysfunction, or menstrual irregularities). Yet, the clinical importance and treatment of mild SCH remain controversial, whereas the benefits of treating mild cases with levothyroxine are still insufficiently explored and require further investigation.

Aim: The aim of this study was to evaluate whether levothyroxine therapy affects serum concentrations of endothelial dysfunction markers (endocan, asymmetric dimethylarginine (ADMA) and endothelin-1 (ET-1)) as well as other biochemical cardiovascular risk markers, including triglycerides, total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL) cholesterol, non-high-density lipoprotein (non-HDL) cholesterol, high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), leukocytes, platelets and mean platelet volume (MPV), in patients with mild SCH.

Participants and methods: In this case-control prospective study, participants were recruited during routine health examinations conducted by hospital medical specialists. Patients with SCH were enrolled at the Department of Internal Medicine, Special Hospital Agram, and the

Clinic of Oncology and Nuclear Medicine, Sestre milosrdnice University Hospital Centre. The study included 61 adult patients with a mild form of SCH (under 75 years) and 30 healthy controls matched to the patient group by sex and age. Written informed consent was obtained from all participants. Clinical decisions regarding levothyroxine substitution therapy were made by medical specialists based on individual examinations. Of the 61 patients with confirmed SCH, 29 were prescribed levothyroxine substitution therapy, and 32 were not. Baseline concentrations of endothelial dysfunction markers (endocan, ADMA, and ET-1), and other biochemical markers were measured in all participants. These measurements were repeated in 29 SCH patients after six months of levothyroxine treatment (following the achievement of euthyroidism) and in 32 SCH patients who did not receive levothyroxine therapy after six months of follow-up.

Results: Our study demonstrated elevated concentrations of ADMA (248.00 (168.78 - 540.20) vs. 166.30 (140.60 - 243.40) $\mu\text{g/L}$, $P = 0.002$), endocan (114.30 (63.45 - 194.65) vs. 67.26 (50.80 - 126.10) ng/L , $P = 0.004$), LDL cholesterol (3.3 ± 0.6 vs. 3.7 ± 0.9 mmol/L , $P = 0.043$) and non-HDL cholesterol (3.8 ± 0.7 vs. 4.2 ± 1.0 mmol/L , $P = 0.020$) in patients with a mild SCH compared to healthy controls. In SCH patients treated with levothyroxine for six months after achieving euthyroidism, we observed a significant decrease in endocan concentrations (91.47 (61.88 - 200.03) vs. 97.90 (55.18 - 154.88) ng/L , $P = 0.004$), and total cholesterol concentrations (6.2 ± 1.0 vs. 5.8 ± 1.0 mmol/L , $P = 0.039$). In contrast, in the group of SCH patients who did not receive levothyroxine therapy a significant increase in ET-1 concentration (1.15 (0.99 - 1.29) vs. 1.25 (1.12 - 1.46) ng/L , $P = 0.003$) was observed. However, no significant changes in ADMA or endocan concentrations were noted in this group.

Conclusions: Our study demonstrated that patients with mild SCH exhibited elevated concentrations of cardiovascular disease risk factors, including endocan, ADMA, LDL cholesterol, and non-HDL cholesterol. Early diagnosis and levothyroxine treatment of SCH could offer potential benefits; first, by reducing the risk of cardiovascular-related mortality through improved endothelial function, and second, by preventing the progression to clinically manifested hypothyroidism. Among the endothelial dysfunction markers analyzed, only endocan showed a significant decrease in serum concentrations in patients receiving levothyroxine replacement therapy, suggesting an improvement in endothelial status. This finding highlights endocan's potential as a clinically valuable marker for endothelial function. Further research is needed to validate these results, as endocan shows the greatest promise for becoming a clinically assessed endothelial marker in routine practice. Such markers could play

a pivotal role in future randomized controlled trials exploring the mild form of SCH, providing additional evidence on the relationship between SCH, its adverse outcomes, and the benefits of treatment.

Keywords: subclinical hypothyroidism, levothyroxine, asymmetric dimethylarginine, endothelin-1, endocan

1. UVOD	1
1.1. Štitnjača	1
1.1.1. Hormoni štitnjače	2
1.1.2. Fiziološko djelovanje hormona štitnjače.....	6
1.2. Hipotireoza.....	10
1.2.1. Supklinička hipotireoza	13
1.2.2. Laboratorijska dijagnostika supkliničke hipotireoze.....	13
1.2.3. Klinička obilježja i liječenje supkliničke hipotireoze.....	14
1.3. Kardiovaskularni sustav	16
1.3.1. Ateroskleroza.....	17
1.3.2. Endotel krvnih žila i endotelna disfunkcija	22
1.3.3. Procjena endotelne disfunkcije u kliničkoj praksi.....	23
1.3.4. Biljezi endotelne disfunkcije u serumu.....	25
1.3.4.1. Endokan	25
1.3.4.2. Asimetrični dimetilarginin (ADMA).....	26
1.3.4.3. Endotelin-1 (ET-1).....	27
2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	29
3. ISPITANICI i METODE.....	30
3.1. Ispitanici	30
3.2. Ustroj istraživanja.....	31
3.3. Uzorci	33
3.4. Metode.....	34
3.4.1. Materijali.....	34

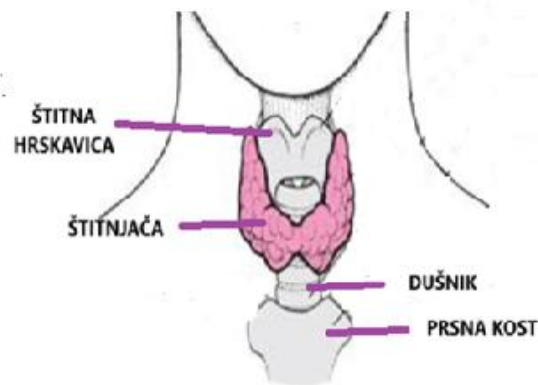
3.4.2. Metode određivanja serumskih koncentracija hormona i protutijela za utvrđivanje statusa štitnjače.....	34
3.4.2.1. Određivanje serumске koncentracije tireotropina (TSH).....	34
3.4.2.2. Određivanje serumске koncentracije slobodnog tiroksina (FT4).....	35
3.4.2.3. Određivanje serumске koncentracije slobodnog trijodtironina (FT3).....	35
3.4.2.4. Određivanje serumске koncentracije protutijela na tireoidnu peroksidazu (TPOAt).....	35
3.4.2.5. Određivanje serumске koncentracije protutijela na tireoglobulin (TGAt).....	36
3.4.3. Određivanje serumске koncentracije visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina (hs-CRP).....	36
3.4.4. Određivanje parametara kompletne krvne slike.....	37
3.4.5. Određivanje statusa lipidograma.....	37
3.4.5.1. Određivanje serumске koncentracije triglicerida.....	37
3.4.5.2. Određivanje serumске koncentracije ukupnog kolesterola.....	37
3.4.5.3. Određivanje serumске koncentracije LDL kolesterola.....	38
3.4.5.4. Određivanje serumске koncentracije HDL kolesterola.....	38
3.4.5.5. Određivanje serumске koncentracije ne-HDL kolesterola.....	39
3.4.6. Određivanje serumске koncentracije endotelних biljega.....	39
3.4.6.1. Određivanje serumске koncentracije endokana.....	39
3.4.6.2. Određivanje serumске koncentracije ADMA.....	40
3.4.6.3. Određivanje serumске koncentracije ET-1	40
3.4.7. Određivanje indeksa tjelesne mase.....	41
3.5. Statistička analiza.....	42
4. REZULTATI.....	43

4.1 Usporedba vrijednosti odabranih parametara dobivenih za kontrolnu skupinu zdravih ispitanika i skupinu bolesnika s blažim oblikom SH.....	43
4.2. Učinak levotiroksina na serumsku koncentraciju biljega endotelne disfunkcije i serumsku koncentraciju odabranih biokemijskih parametara u bolesnika s blažim oblikom SH.....	47
4.3. Serumske koncentracije biljega endotelne disfunkcije i serumske koncentracije odabranih biokemijskih parametara u bolesnika s blažim oblikom SH kojima levotiroksin nije propisan.....	49
4.4. Usporedba serumskih koncentracija biljega endotelne disfunkcije i serumskih koncentracija odabranih biokemijskih parametara u bolesnika s blažim oblikom SH kojima terapija levotiroksinom nije propisana i kojima je terapija levotiroksinom propisana.....	52
4.5 Povezanost serumskih koncentracija biljega endotelne disfunkcije, TSH i parametara dislipidemije u bolesnika s blažim oblikom SH.....	55
5. RASPRAVA.....	56
6. ZAKLJUČCI.....	66
7. POPIS LITERATURE.....	67
8. POPIS KRATICA.....	83
9. ŽIVOTOPIS.....	87
9.1. Popis objavljenih radova.....	88
9.2. Znanstveni radovi autorice.....	89

1. UVOD

1.1. Štitnjača

Štitnjača ili štitasta žlijezda (lat. *glandula thyroidea*) je neparna endokrina žlijezda smještena u prednjem dijelu vrata ispred dušnika (**Slika 1.**). Ima dva režnja, desni (lat. *lobus dexter*) i lijevi (lat. *lobus sinister*), međusobno povezana suženim dijelom istmusom (lat. *isthmus glandulae thyroideae*). Sprijeda štitnjača ima oblik slova H (okomiti krakovi odgovaraju režnjevima, a vodoravni dio odgovara istmusu). Katkad se od suženog dijela istmusa odvaja uski tračak žljezdano tkiva koji se penje do jezične kosti poznatiji kao treći režanj (lat. *lobus pyramidalis*) (1). Najveća je endokrina žlijezda u ljudskom tijelu i može težiti ponekad i više od 10 grama (2).



Slika 1. Smještaj štitnjače u tijelu.

Štitnjača je obavijena vezivnom ovojnicom (lat. *capsula fibrosa*), a od nje u dubinu žlijezde odlaze vezivne pregrade koje žljezdano tkivo dijele na sitnije režnjiće (lat. *lobule glandulae thyroideae*). Vezivnim snopovima je stražnja ploha žlijezde povezana s dušnikom, a od mišića (lat. *m. sternothyroideus*) odvaja se nekoliko vlakana koja se hvataju na vezivnu ovojnicu žlijezde (1).

Štitnjaču opskrbljuju dvije parne arterije (lat. *a. thyroidea inferior* i *a. thyroidea superior*), a katkad postoji i peta arterija (lat. *a. thyroidea ima*). Dvije parne arterije se na površini žlijezde razgranjuju u mrežu, od koje se odvajaju ogranci i idu vezivnim tračcima u žljezdano tkivo. Peta arterija je ogranak zajedničke karotidne arterije ili brahiocefalitičnog trunkusa. Vensku mrežu tvore vene koje polaze iz kapilarne mreže smještene oko nakupina stanica štitnjače i dolaze na površinu žlijezde preko vezivnih tračaka. S gornjeg dijela žlijezde

krv odvođe gornje štitaste vene (lat. v. *thyroidae superiores*), a s postraničnih dijelova odlaze srednje štitaste vene (lat. v. *thyroideae mediae*), te se navedene izlijevaju u unutarnju jugularnu venu (lat. v. *jugularis interna*). Vene koje odlaze s donjega dijela štitnjače tvore ispred dušnika venski splet (lat. *plexus thyreoideus impar*), a krv iz tog spleta odvodi vena (lat. v. *thyroidea ima*) koja se ulijeva u lijevu brahicefaličnu venu (lat. v. *brachiocephalica sin.*) (1).

Inervacija štitnjače započinje od gornjega, srednjega i donjega cervikalnog ganglija simpatičkog lanca. Živci dolaze preko srčanih i laringealnih ogranaka vagalnog živca do žlijezde te djelovanjem na krvne žile posredno djeluju na štitnjaču (1).

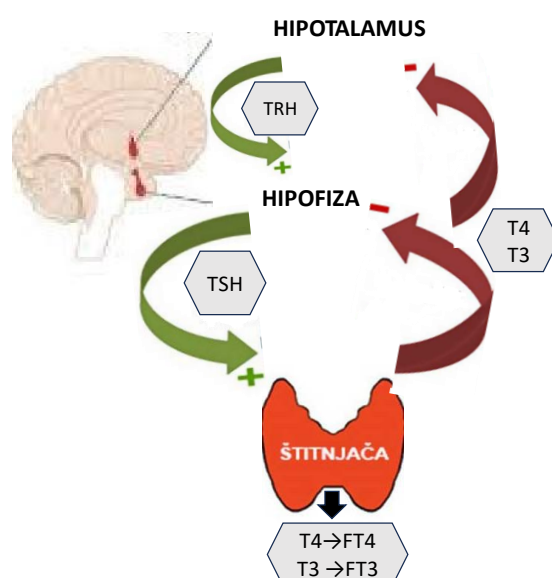
Štitnjača i njezini hormoni imaju velik značaj za metabolizam gotovo svih stanica u organizmu. Bolesti štitnjače spominju se već kroz davnu povijest, pa se tako gušavost prvi put opisuje 2700 godina prije Krista u kineskim zapisima. Hiperfunkciju štitnjače je prvi put opisao liječnik Karl von Basedow 1840. godine, a u 19. stoljeću Theodor von Billroth i njegov učenik Theodor Kocher uveli su u europsku medicinu kirurški način liječenja bolesti štitnjače tj operaciju odstranjenja štitnjače tzv. tireoidektomiju (3).

1.1.1. Hormoni štitnjače

Režnjevi štitnjače sastoje se od folikula ispunjenih amorfnom koloidnom masom i stanica tireocita što zajedno čini temeljnu jedinicu građe parenhima žlijezde. U folikulima se stvaraju hormoni trijodtironin (3,5,3'-trijodtironin, T3) i tiroksin (3,5,3',5'-tetrajodtironin, T4). Trijodtironin i tiroksin vezani su na glikoprotein tireoglobulin, glavni sastojak koloida. T3 i T4 nastaju iz aminokiseline tirozina, što je regulirano tireotropinom (TSH) kojeg luči adenohipofiza mehanizmom negativne povratne sprege. Hipotalamus detektira niske razine tiroidnih hormona u krvotoku (T3 i T4) i u odgovoru otpušta tireooslobađajući hormon (TRH). TRH stimulira hipofizu da proizvodi TSH. TSH je heterodimer koji se sastoji od α -podjedinice, koju dijeli s drugim tropinima, i β -podjedinice, specifične za TSH, koja određuje sposobnost vezanja za TSH receptor. TSH zatim stimulira štitnjaču da sintetizira i izlučuje tiroidne hormone dok se razine u krvi ne vrate na normalno stanje. Tiroidni hormoni imaju učinak negativne sprege na hipotalamus, kao i na prednji režanj hipofize, čime se kontrolira otpuštanje TRH-a iz hipotalamusa i TSH-a iz hipofize. U slučaju visokih razina tiroidnih hormona mehanizam je obrnut (**Slika 2.**) (4).

Hormoni T3 i T4 ostaju vezani za tireoglobulin u štitnjači sve dok u stanicama nema potrebe za njima. Ulazak u cirkulaciju posredovan je procesom pinocitoze kada čestice koloida

budu fagocitirane vežući se s lizosomima, a hormoni se odvajaju od tireoglobulina uz proteazu. U perifernoj cirkulaciji hormoni T3 i T4 su reverzibilno vezani na proteine. Oko 99,7 % T3 je vezano za proteine, a preostalih 0,3 % je slobodna frakcija (slobodni trijodtironin (engl. *free triiodothyronine*), FT3). Oko 60 % T4 je vezano na globulin koji veže tiroksin (engl. *thyroxine-binding globulin*, TBG), oko 30 % je vezano za prealbumin, 10 % je vezano za albumin, a manje od 0,1 % je slobodna frakcija (slobodni tiroksin (engl. *free thyroxine*), FT4). T4 je 10 - 20 puta jače vezan za TBG od T3. Biološki su aktivne samo slobodne frakcije hormona štitnjače, a proteini nosači su skladište hormona te se kao takvi ne mogu filtracijom u bubrezima gubiti iz organizma pa ne može doći do naglih promjena njihovih koncentracija (4).



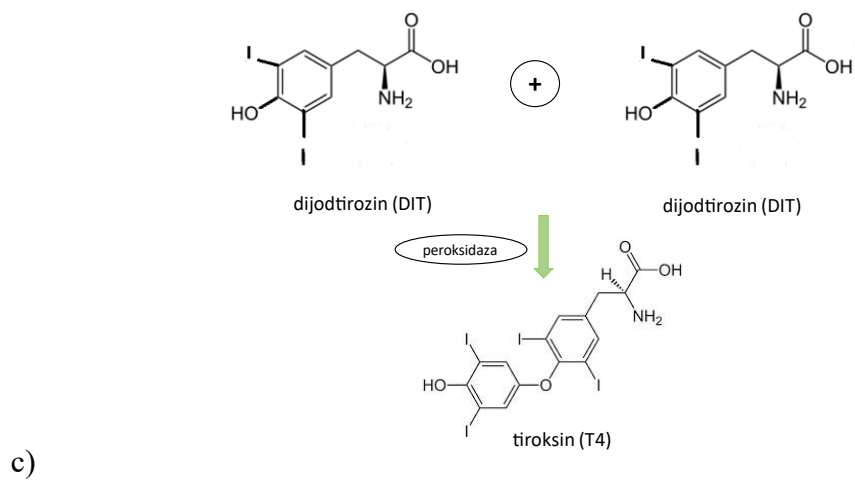
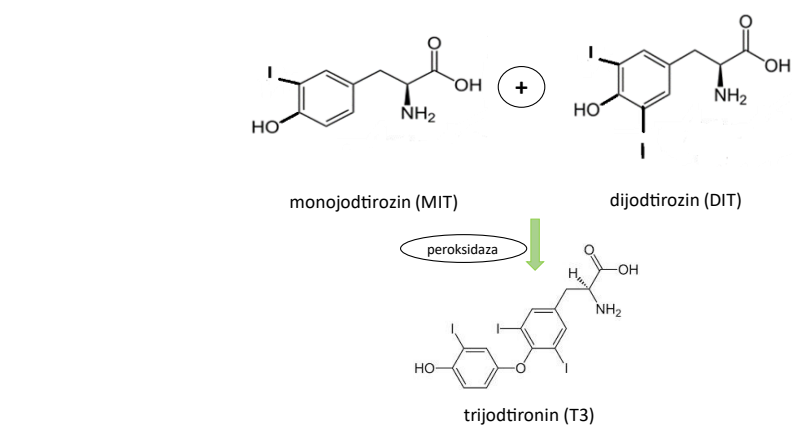
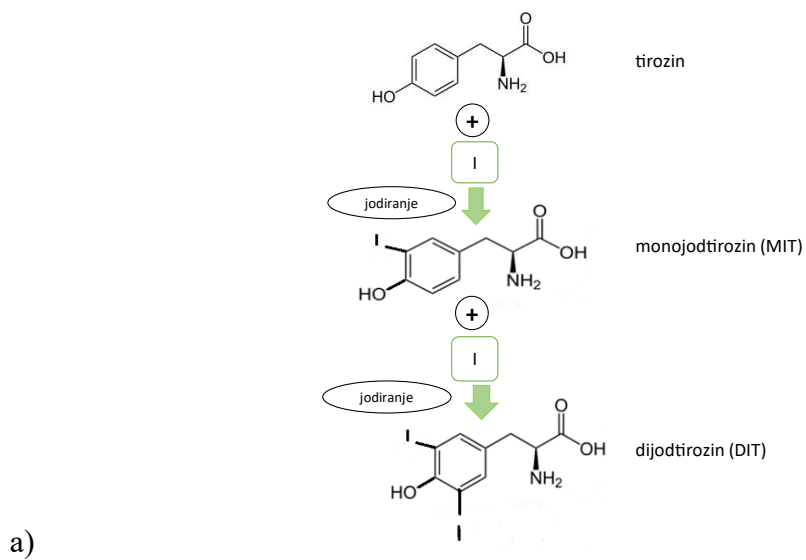
Slika 2. Regulacija stvaranja hormona štitnjače. *TRH* - tireoslobađajući hormon. *TSH* - tireostimulirajući hormon. *T3* - trijodtironin. *T4* - tiroksin. *FT3* - slobodni trijodtironin. *FT4* - slobodni tiroksin.

Tireostimulirajući hormon kontrolira sve aspekte funkcije štitnjače. Vezanje TSH za membranske receptore stanica štitnjače aktivira sustav G-proteina koji vežu gvaninske nukleotide. G-protein disocira na kompleks $\beta\gamma$ i podjedinicu α koja aktivira adenilat ciklazu, što dovodi do stvaranja cikličkog adenzin monofosfata (cAMP) iz adenzin trifosfata (ATP). Ciklički AMP aktivira proteinske kinaze koje dovode do fosforilacije različitih proteina. Stimulacija štitnjače TSH-om povećava unos joda i transport koloida u stanicu te tako dolazi do sekrecije T3 i T4 (5).

Biosinteza hormona štitnjače započinje ulaskom joda u štitnjaču u obliku jodida putem hrane, vode ili lijekovima te jodida koji nastaje dejodinacijom hormona štitnjače. Kako bi se zadovoljile potrebe za stvaranjem T3 i T4 potrebno je hranom unijeti 50 mg joda godišnje ili oko 1 mg tjedno, što se u današnje doba osigurava jodiranjem kuhinjske soli (4).

Jodid putem krvi ulazi u stanice štitnjače pomoću tzv. adenozin tri fosfat (ATP) ovisnog Na^+/I^- kotransportera na bazolateralnoj membrani folikularne stanice i tu se uz enzim peroksidazu i vodikov peroksid (H_2O_2) oksidira u elementarni jod (4). Proces oksidacije ubrzava enzim peroksidaza, pa u slučaju mutacije peroksidaze kao i ATPaze dolazi do potpunog zastoja funkcije štitnjače. Unos je energijski ovisan jer se odvija nasuprot koncentracijskog gradijenta (u normalnoj štitnjači je 20 do 50 više joda nego u krvi). Tiroidna peroksidaza regulira vezanje joda na tirozinske ostatke te spajanje jodtirozina, a TSH potiče njenu sintezu. Protutiroidni lijekovi (propiltiouracil i metimazol) djeluju na principu da inaktiviraju ovu peroksidazu (5).

Jodizacijom, tj. vezanjem joda na tirozinske ostatke na tireoglobulinu, nastaju monojodtirozin (MIT) i diiodtirozin (DIT). Oni se međusobno vežu pomoću enzima peroksidaze. Vezanjem jedne molekule MIT-a i jedne molekule DIT-a nastaje T3, oblik hormona koji čini 1/15 ukupne količine konačnih hormona, a vezanjem dviju molekula DIT-a nastaje T4 (**Slika 3.**) (3). Unatoč velikom broju MIT-a i DIT-a sinteza T3 i T4 je ograničena jer je za spajanje potreban međusobno povoljan sterički položaj jodtirozina. Relativna koncentracija MIT-a i DIT-a te T3 i T4 ovisi o stimulaciji TSH-om i raspoloživom jodu (5). Nakon što završi sinteza hormona u štitnjači, svaka molekula tireoglobulina sadrži i do 30 molekula T4 i nekoliko T3. Ovaj oblik pohrane hormona štitnjače u folikulima omogućava dostatnu opskrbu tijela hormonima za 2 do 3 mjeseca, što je razlog da se fiziološki učinak manjka hormona štitnjače očituju tek mjesecima nakon prestanka njihove sinteze (6).



Slika 3. Biosinteza hormona štitnjače: a) sinteza monoiodotirozina (MIT) i diiodotirozina (DIT); b) sinteza trijodironina (T3); c) sinteza tiroksina (T4)

Hormoni štitnjače metaboliziraju se dejodinacijom (dejodinaze tipa I, tipa II i tipa III), oksidativnom deaminacijom, dekarboksilacijom i hidrolizom eterske veze. Konjugiraju se sa sumpornom i glukuronskom kiselinom u jetri pri čemu nastaju sulfati i glukuronidi koji se putem žuči i crijeva izlučuju iz organizma. Enzim jod tirozin-dehalogenaza uklanja jod iz jod tirozina koji se tada u obliku jodida ponovno vraća u štitnjaču i služi za sintezu hormona (4).

Jedini izvor hormona T4 je štitnjača, a većina hormona T3 (oko 80 %) nastaje konverzijom uz enzim jodazu iz T4 u ciljnim organima, najviše u jetri. Enzimskim uklanjanjem 5'-joda iz vanjskog prstena tirozina nastaje T3, a dejodinacijom na petom C-atomu unutarnjeg prstena T4 nastaje i reverzni T3, koji je metabolički inaktivan. Daljnjom dejodinacijom nastaju dijod tirozini, monojod tirozini i završno tirozin. Ravnoteža hormona štitnjače najučinkovitije se kontrolira perifernom dejodinacijom. T3 je četiri do pet puta biološki aktivniji od T4 (4).

1.1.2. Fiziološko djelovanje hormona štitnjače

Od ukupne količine hormona otpuštenih iz štitnjače otprilike 93 % čini T4, 7 % čini T3 te se oko polovice T4 dejodira i nastaje T3 koji onda uglavnom dopire u tkiva i iskorištava se. Hormoni štitnjače dolaze do ciljnih organa cirkulacijom (4). Dugo se smatralo da hormoni štitnjače u stanicu ulaze pasivnom difuzijom preko stanične membrane zahvaljujući svojoj lipofilnoj strukturi, no postalo je sve jasnije da su hormonima štitnjače za prijenos preko membrane potrebni specifični prijenosnici (transporteri). Do danas je otkriveno nekoliko transportnih proteina, uključujući prijenosnike monokarboksilata, MCT8 i MCT10 (engl. *monocarboxylate transporter*, MCT), polipeptide koji prenose organske anione (engl. *organic anion transporting polypeptide*, OATP), prijenosnike neutralnih aminokiselina (engl. *L-type amino acid transporter*, LAT) i natrijev/taurokolat polipeptidni kotransporter (engl. *Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide*, NTCP). Oni se razlikuju u ekspresiji i afinitetu prijenosa hormona štitnjače, kao i sposobnosti prijenosa drugih molekula. MCT8 je specifičan baš za prijenos hormona štitnjače, dok ostali osim transporta hormona štitnjače posreduju i u prijenosu drugih molekula (7). Učinak hormona štitnjače je primarno rezultat vezanja T3 za specifične receptore u jezgri ciljnih stanica i poticanje transkripcije velikog broja gena u jezgri. Postoje dvije vrste receptora hormona štitnjače (engl. *thyroid hormone receptor*, TR), α i β , koji su kodirani genima *TR α* i *TR β* . Velike količine *TR α* nalaze se u stanicama mozga, bubrega, gonada, mišića i srca, a *TR β* se nalazi u jetri i hipofizi (4). Receptori za hormone štitnjače su ili pričvršćeni za lance DNA ili su smješteni u njihovoj neposrednoj blizini u jezgri stanice. Receptori obično stvaraju heterodimer s receptorom za retinoid X (engl. *retinoid X receptor*,

RXR) na specifičnim dijelovima DNA koji se nazivaju elementi odgovora na tireoidni hormon (engl. *thyroid hormone response element*, TRE). Vezanjem hormona štitnjače receptori se aktiviraju i započinju proces transkripcije gena, kao što su primjerice geni za enzime uključene u metabolizam masti i kolesterola (lipoprotein lipaza, acetil-CoA karboksilaza, 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA reduktaza), geni za enzime uključene u metabolizam ugljikohidrata (glukokinaza, fosfofruktokinaza), geni za enzime uključene u metabolizam proteina (aminotransferaze, proteaze), geni povezani s mitohondrijskom aktivnošću (nikotinamid adenin dinukleotid dehidrogenaza, citokrom c oksidaza, itd. Nakon toga se stvara veliki broj različitih vrsta glasničke RNA i slijedi translacija RNA na citoplazmatskim ribosomima i sinteza staničnih proteina. Smatra se da hormoni štitnjače djeluju u stanicama i bez posredovanja gena, tj. da su neki učinci neovisni o transkripciji gena budući da neki učinci nastaju unutar nekoliko minuta, što je prebrzo da bi se moglo objasniti promjenama u sintezi proteina. Ovakva djelovanja su opisana u tkivima kao što su srce, hipofiza i masno tkivo. Mjesta negenskog djelovanja hormona štitnjače su plazmatska membrana, citoplazma i organeli poput mitohondrija te ovo djelovanje uključuje regulaciju ionskih kanala i oksidacijsku fosforilaciju (6).

Hormoni štitnjače imaju značajan učinak na metabolizam gotovo svih organa i organskih sustava, a esencijalni su za rast i razvoj pre- i postnatalno. Fiziološko djelovanje hormona štitnjače je kompleksno i obuhvaća cijeli organizam (**Slika 4.**).

Hormoni štitnjače povećavaju metaboličke aktivnosti gotovo svih tkiva u tijelu tako što povećavaju broj i aktivnost mitohondrija i stvaranje ATP-a te time osiguravaju energiju za stanične funkcije. Nadalje, hormoni štitnjače povećavaju aktivni prijenos iona kroz stanične membrane, a jedan od enzima koji pojačava aktivnost u odgovoru na hormone je Na^+/K^+ -ATPaza. Zbog navedenog se u jetri, miokardu, skeletnim mišićima, tankom crijevu i bubregu povećava prijenos natrijevih i kalijevih iona kroz stanične membrane pri čemu se troši energija i povećava stvaranje topline u tijelu (6).

Hormoni štitnjače imaju opće i specifične učinke na rast. Važan učinak hormona štitnjače je poticanje rasta i razvoja mozga za vrijeme fetalnog života i u prvih nekoliko godina poslije rođenja. Ako fetus ne luči dovoljne količine hormona štitnjače, rast i razvoj mozga je usporen prije i poslije rođenja te je potrebno primijeniti specifično liječenje hormonima štitnjače unutar nekoliko dana od rođenja (6). Hormoni štitnjače potrebni su za normalan razvoj kosti i mišića. Oni djeluju sinergistički s hormonom rasta i inzulinu sličnim faktorom rasta na razini formiranja kosti. Hormoni štitnjače su potrebni za normalnu sintezu i sekreciju hormona rasta, pa tako

neliječena konatalna i juvenilna hipotireoza dovodi do zastoja rasta, usporenog sazrijevanja kosti i niskog rasta (8). Hormoni štitnjače izravnim vezanjem na TR α receptor u osteoblastima i osteoklastima, povećavaju koštanu pregradnju, pa se stvara kost manje čvrstoće i povećava rizik od patoloških prijeloma u menopauzi (9).

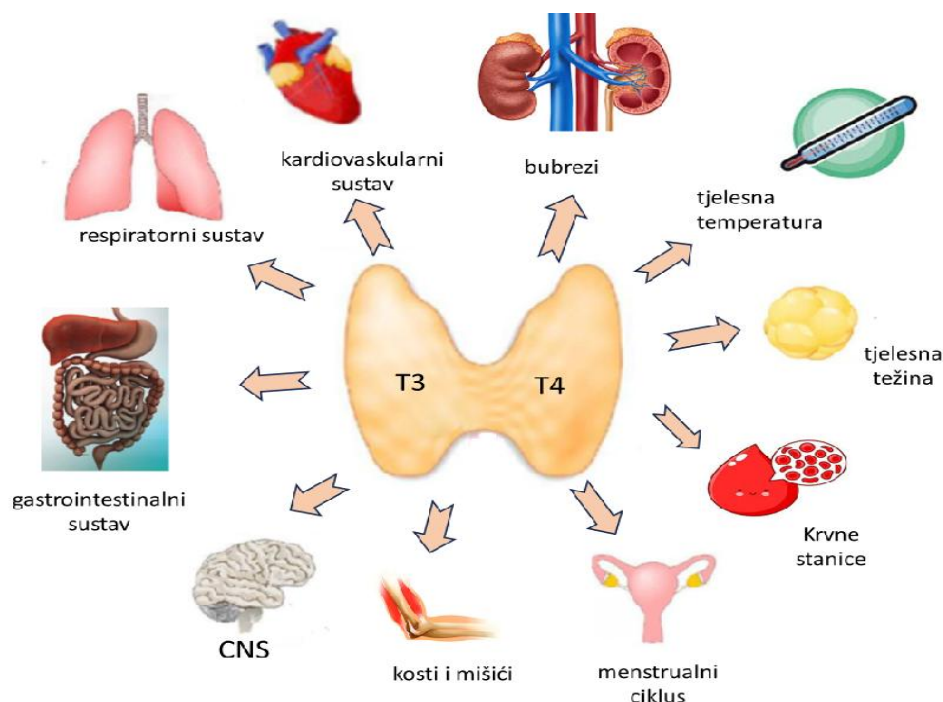
Hormoni štitnjače pospješuju metabolizam ugljikohidrata tako što ubrzavaju ulazak glukoze u stanice, pospješuju glikolizu i glukoneogenezu, povećavaju apsorpciju ugljikohidrata iz probavnog sustava te pojačavaju lučenje inzulina. Sva navedena djelovanja vjerojatno nastaju zbog učinka povećanja aktivnosti staničnih metaboličkih enzima pod utjecajem hormona štitnjače. Pod utjecajem hormona štitnjače pospješuje se i metabolizam masti tako što se iz masnog tkiva povećava mobilizacija lipida čime se smanjuju masne zalihe u tijelu i povećava koncentracija slobodnih masnih kiselina u plazmi i ubrzava oksidacija slobodnih masnih kiselina u stanicama. Povišena razina hormona štitnjače smanjuje koncentraciju kolesterola, fosfolipida i triglicerida u krvi, a povećava koncentraciju slobodnih masnih kiselina, dok smanjeno lučenje hormona štitnjače ima suprotan učinak. Hormoni štitnjače povećavaju izlučivanje kolesterola u žuč i dalje u feces. Povećano izlučivanje kolesterola se također povezuje s djelovanjem hormona štitnjače na povećanje broja receptora za lipoproteine niske gustoće na jetrenim stanicama što ubrzava njihovo uklanjanje iz plazme u jetru te izlučivanje kolesterola putem tih lipoproteina iz jeternih stanica (6).

Hormoni štitnjače povećavaju metabolizam u gotovo svim stanicama u tijelu te se kod povećane koncentracije hormona intenzitet bazalnog metabolizma može ponekad povećati čak 60 do 100 % iznad normalnih vrijednosti, a kada štitnjača uopće ne stvara hormone, smanjuje se na polovinu normalnih vrijednosti. U stanju smanjenog stvaranja hormona štitnjače tjelesna se masa povećava, dok se kod pojačanog stvaranja tjelesna masa gotovo uvijek smanjuje, a apetit se pojačava (6).

Djelovanje hormona štitnjače na krvožilni sustav očituje se kroz djelovanje na protok krvi i srčani minutni volumen te frekvenciju srca i snagu srčane kontrakcije. Kod prekomjerne količine hormona pojačava se metabolizam, tkiva imaju potrebu za bržom potrošnjom kisika nego inače, a iz tkiva se u većim količinama oslobađaju konačni proizvodi metabolizma. Zbog navedenog dolazi do vazodilatacije u većini tkiva u tijelu te se povećava protok krvi, a osobito se uveća kroz kožu radi povećane potrebe za otpuštanjem topline iz tijela. Zbog povećanog protoka krvi povećava se i srčani minutni volumen, ponekad i za 60 % više od normalnih vrijednosti, a u teškoj hipotireozu se može smanjiti na 50 % normalne vrijednosti. Zbog povećanja srčanog minutnog volumena, a dodatno i uslijed izravnog djelovanja hormona

štitnjače na podražljivost srca dolazi i do povećane srčane frekvencije. Srčana frekvencija jedan je od osjetljivih pokazatelja pri kliničkoj procjeni prekomjernog ili smanjenog stvaranja hormona štitnjače. Snaga srčane kontrakcije povećava se već i kod lučenja samo neznatno veće količine hormona zbog povećanja aktivnosti enzima (Na^+/K^+ -ATPaze, Ca^{2+} -ATPaze, cAMP-ovisne protein kinaze A, itd.), dok kod znatno povećane količine hormona štitnjače srčana snaga slabi zbog dugotrajno povećanog katabolizma proteina (6).

Pored navedenog, hormoni štitnjače djeluju i na disanje (povećani metabolizam povećava potrošnju kisika i stvaranje ugljikovog dioksida što povećava dubinu i frekvenciju disanja), pokretljivost probavnog sustava (hormoni štitnjače povećavaju peristaltiku, te probavni sustav postaje aktivniji i brže transportira hranu kroz probavni trakt, povećavaju brzinu apsorpcije hranjivih tvari iz probavnog sustava te ubrzavaju izbacivanje otpadnih tvari iz tijela), središnji živčani sustav (hormoni štitnjače imaju ključnu ulogu u razvoju mozga tijekom prenatalnog razdoblja i ranog djetinjstva te značajnu ulogu u razvoju neuroloških funkcija u odrasloj dobi, ključni su za metaboličku aktivnost u mozgu tako što reguliraju potrošnju kisika i proizvodnju energije u neuronima, utječu na ravnotežu neurotransmitera u mozgu, te utječu na raspoloženje i emocionalno stanje te kognitivne funkcije (pamćenje, učenje i razmišljanje), ciklus spavanja i budnosti), mišićnu djelatnost (povećavaju metabolizam u mišićima povećanjem potrošnje energije, povećanjem oksidacije masti i ugljikohidrata te povećanjem sinteze i razgradnje proteina u mišićima, igraju važnu ulogu u regulaciji kontraktilnosti mišića, reguliraju mišićnu masu i utječu na mišićnu izdržljivost), te ostale endokrine sustave (hormoni štitnjače utječu na funkciju nadbubrežnih žlijezda i proizvodnju kortizola, utječu na metabolizam glukoze, što ima izravan utjecaj na funkciju gušterače i povećavaju osjetljivost stanica na inzulin, utječu na reproduktivnu funkciju i ravnotežu spolnih hormona, utječu na paratireoidne žlijezde i ravnotežu kalcija i fosfora (6).



Slika 4. Fiziološko djelovanje hormona štitnjače. *CNS - središnji živčani sustav.*

1.2. Hipotireoza

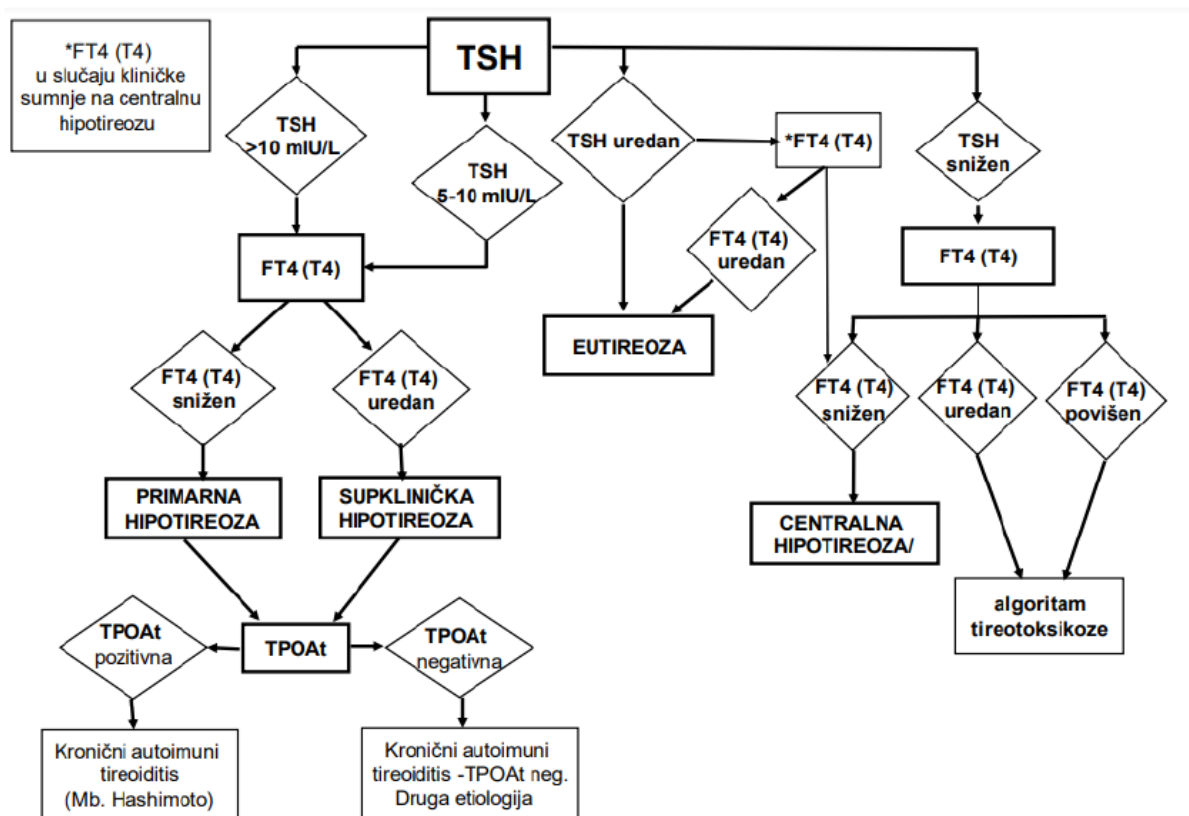
Hipotireoza je stanje smanjene funkcije štitnjače uslijed smanjenog stvaranja i lučenja hormona štitnjače (10). U njihovoj odsutnosti, na receptore za hormone štitnjače vežu se korepresori s posljedičnom inhibicijom genske ekspresije. U stanju kada heterodimer TR-RXR nije vezan s T3, on se veže na TRE, a zatim na korepresor čime se utišavaju geni koji se aktiviraju s T3 te dolazi do blokiranja genske transkripcije. Korepresori su posrednici utišavanja retinoične kiseline i receptora hormona štitnjače (engl. *silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*, SMRT) te korepresor nuklearnog receptora (engl. *nuclear receptor corepressor*, NCoR) (11). Uslijed uredne razine hormona štitnjače vezanje hormona za receptore uzrokuje disocijaciju korepresora i omogućuje dolazak i vezanje koaktivatora koji pojačavaju proces transkripcije gena. U slučaju izostanka optimalnog učinka hormona štitnjače, u stanicama javlja se stanje hipometabolizma. Hipotireoza može biti prirođena ili stečena te primarna ili sekundarna/tercijarna. Primarna hipotireoza je uzrokovana bolešću štitnjače ili postupkom koji uzrokuje razaranje žljezdanog parenhima i/ili dovodi do poremećaja sinteze hormona štitnjače. Primarna hipotireoza jest uzrok oko 95 % svih slučajeva hipotireoze, a obilježava je visoka koncentracija TSH i snižena koncentracija FT4 u serumu. U područjima s adekvatnim unosom joda najčešći uzrok primarne hipotireoze je kronični autoimunosni (Hashimotov) tireoiditis (10). Autoimuna bolest štitnjače dovodi do hipotireoze na dva načina.

Jedan je razaranje tkiva u sklopu kronične autoimune upale, pa hipersekrecija TSH ima za posljedicu razvijanje guše, a drugi je stvaranje protutijela koja vezanjem onemogućuju normalnu funkciju štitnjače te dovode do hipotireoze (protutijela na TSH receptore, protutijela na tireoidnu peroksidazu (TPOAt), protutijela na tireoglobulin (TGAt), protutijela na Na^+/I^- importer, protutijela na hormone štitnjače, protutijela na TSH te citotoksična protutijela) (5). Drugi je najčešći uzrok liječenje Gravesove hipertireoze radioaktivnim jodom-131 (J^{131}). Hipotireoza se također, može razviti nakon operacije štitnjače ili vanjskog zračenja područja glave te uslijed uzimanja lijekova koji koče sintezu hormona štitnjače kao što su tireostatici te lijekova poput litija, amiodarona, interferona, sunitiniba. Sekundarna hipotireoza uzrokovana je poremećajem u hipofizi, a tercijarna poremećajem u hipotalamusu. Zajedničko obilježje ovih centralnih hipotireoza je niska ili nedovoljno povišena serumska koncentracija TSH u odnosu na sniženu koncentraciju FT4. Prolazna hipotireoza se može javiti kod subakutnog, tihog i postapartalnog tireoiditisa te kod prekida nadomjesnog liječenja hipotireoze. Nedostatni je unos joda u određenim planinskim područjima Europe, Azije i Afrike i dalje čest uzrok razvoja hipotireoze kada je štitnjača često povećana, što se naziva gušom. Uzrok je tome manjak joda u prehrani što uzrokuje endemsku koloidnu gušu. Manjak joda sprječava stvaranje T3 i T4 te posljedično hipofiza luči iznimno velike količine TSH. Takvo povećano lučenje TSH potiče stanice štitnjače na lučenje golemih količina tireoglobulinskog koloida u folikule, pa štitnjača postaje sve veća. Zbog nedostatka joda nema stvaranja T3 i T4, dakle nema ni supresije lučenja TSH iz adenohipofize. Folikuli postaju ogromni, a štitnjača se može povećati 10 do 20 puta. U hrani obično ima dovoljno joda, osim u područjima gdje je tlo siromašno jodom (10). Dnevne potrebe za jodom su 150 μg /dan za odraslu osobu, 90 - 120 μg /dan za djecu i 200 μg /dan za trudnice (12). Hipotireoza je najčeći poremećaj funkcije štitnjače, s prevalencijom kod žena od 1 do 2 %, a kod muškaraca 0,2 % (10).

Klinički simptomi i znakovi hipotireoze posljedica su smanjenog učinka hormona štitnjače u perifernim tkivima, a glavna odrednica kliničkih obilježja je dob. Ukoliko hipotireoza nastupi već u fetalnom razdoblju ili ranom djetinjstvu može doći do brojnih razvojnih i funkcijskih poremećaja. Zaostajanje u psihofizičkom razvoju radi poremećaja razvoja mozga najvažniji je funkcijski poremećaj jer su posljedice trajne ukoliko se liječenje supstitucijom hormona ne započne na vrijeme. Hipotireoza kod starije djece je reverzibilna, no također, sa teškim posljedicama kao što je usporen rast i usporeno spolno sazrijevanje. Stariji bolesnici imaju manje ozbiljne simptome, no kako su simptomi nespecifični često se krivo pripisuju starenju.

Među najučestalijim simptomima su osjećaj hladnoće, porast tjelesne mase, opstipacija, slabost, pospanost, bezvoljnost, suha i gruba koža, ispadanje kose, tanki i krhki nokti (13).

Algoritam za racionalnu dijagnostiku hipotireoze (**Slika 5.**) primjenjuje se u bolesnika s kliničkim simptomima hipotireoze te u rizičnim skupinama. Rizične skupine ili stanja su bolesnici sa pozitivnim TPOAt, prethodno liječenje Gravesove bolesti, prethodno zračenje vrata, liječenje amiodaronom, guša, sumnja na hipopituitarizam, obiteljska anamneza autoimune bolesti štitnjače, osobna/obiteljska anamneza pridruženih autoimunih bolesti, starija dob i hiperkolesterolemija (13).



Slika 5. Algoritam racionalne dijagnostike hipotireoze. *TSH* - tireotropin. *T4* - tiroksin. *FT4* - slobodni tiroksin. *TPOAt* - protutijela na tireoidnu peroksidazu. Preuzeto iz Kusić i suradnici (8).

1.2.1. Supklinička hipotireoza

Supklinička hipotireoza (SH) jest stanje povišene koncentracije TSH uz normalnu koncentraciju FT4 i FT3 u serumu. Ovisno o vrijednosti povišenog TSH dijeli se na blaži oblik SH ($TSH \leq 10,0$ mIU/L) i teži oblik SH ($TSH > 10,0$ mIU/L) (14, 15), a pokazano je da je kod otprilike 75 % bolesnika sa SH prisutan blaži oblik (15). Učestalost SH širom svijeta iznosi od 4 do 10 % kod odraslih osoba, češća je kod žena, a prevalencija raste s godinama (kod starijih žena učestalost je i do 20 %) (14, 15).

Supklinička hipotireoza najčešće je početni stadij klinički manifestne hipotireoze stoga su uzroci poremećaja isti. Najčešći uzrok je kronični autoimuni (Hashimotov) tireoiditis (14). Prema smjernicama Mayo Klinike iz 2009. godine, kod 80 % bolesnika sa SH prisutna su pozitivna TPOAt (16). Liječenje Gravesove hipertireoze jodom-131 je drugi najčešći uzrok SH. Ostali uzroci su nedostatan nadomjesno liječenje hipotireoze, uzimanje tireostatika, amiodarona, pripravaka joda, interferona α i dr. Preboljenje subakutnog, tihog i postpartalnog tireoiditisa također može uzrokovati SH i biti trajna posljedica upalnog procesa. Rijetki uzroci su operacija štitnjače, vanjsko zračenje vrata, amiloidoza, hemokromatoza, Riedelov tireoiditis, a izrazito rijetko je to mutacija u genu za TSH-receptor (14).

1.2.2. Laboratorijska dijagnostika supkliničke hipotireoze

Laboratorijsko određivanje TSH i FT4 u serumu koristi se u dijagnostici hipotireoze. Dok primarnu hipotireozu obilježava visoka koncentracija TSH i snižena koncentracija FT4 u serumu, SH karakterizira blago povišena koncentracija TSH i normalna koncentracija FT4. Mjerenje serumske koncentracije TSH predstavlja test izbora za probir kod otkrivanja hipotireoze u bolesnika s nespecifičnim simptomima kao što su umor, poremećaj menstrualnog ciklusa, depersija i dr. Prije postavljanja dijagnoze SH potrebno je isključiti prolazna stanja s povišenim TSH kao što je postakutni, postpartalni ili tihi tireoiditis te također i faza oporavka od neke sustavne bolesti ili kratki prekid nadomjesnog liječenja hipotireoze. Treba isključiti i kronično bubrežno zatajenje, hipokorticism, uzimanje lijekova poput dopamina ili amiodarona. Samo trajna ili rastuća SH može se smatrati ranim stadijem hipotireoze stoga se nalaz blago povišenog TSH u serumu treba ponoviti nakon nekoliko tjedana uz određivanje i FT4. Varijabilnost vrijednosti TSH može se javiti uslijed prisutnosti heterofilnih protutijela (14), ali i poznate činjenice da metode za određivanje TSH nisu harmonizirane što znači da su referenti intervali preporuke pojedinog proizvođača ovisno o metodi, a različite metode nisu usporedive

te postoje blage razlike u određivanju TSH istog uzorka različitim metodama (17). Manje fluktuacije oko gornje granice za TSH javljaju se i u ovisnosti o godišnjem dobu, tjelesnoj aktivnosti, prisutnosti drugih komorbiditeta, stoga u odsutnosti kliničkih simptoma te vrijednosti treba pažljivo interpretirati. Temeljem gore navedenih okolnosti navodi se mogućnost da je stvarna prevalencija SH možda u nekim populacijama ipak precijenjena (18).

Serumska koncentracija TSH, kao prvi test izbora u probiru na poremećaje funkcije štitnjače jest najosjetljiviji test u otkrivanju blagog (supkliničkog) poremećaja funkcije štitnjače. Dodatni je uvjet, kako bi otkrivanje supkliničke hipotireoze pomoću mjerenja serumske koncentracije TSH bilo pouzdano, intaktna hipofiza-hipotalamus os (19) i stabilno stanje štitnjače (ne nužno funkcija štitnjača) (20). Tada je omjer TSH i FT4 obrnuto log/linearan te male promjene FT4 dovode do višestrukih promjena TSH (21).

Budući da većina bolesnika sa SH nema simptome, bolest se slučajno otkrije mjerenjem TSH i hormona štitnjače u serumu te zbog toga mnoga endokrinološka društva zagovaraju probiranje populacije, osobito starijih žena, trudnica i žena koje planiraju trudnoću. Međutim, stajališta nisu ujednačena (14). Primjerice, Američko društvo za štitnjaču (engl. *American Thyroid Association*, ATA) preporučuje probir svih žena i muškaraca svakih 5 godina, počevši od 35. godine (22), dok Hrvatsko društvo za štitnjaču preporučuje probir kod svih trudnica na početku trudnoće i žena starijih od 50 godina ako traže liječničku pomoć (13). Američko udruženje kliničkih endokrinologa (engl. *American Academy of Clinical Endocrinologists* AACE) preporučuje probir žena koje planiraju trudnoću i trudnica u prvom tromjesečju trudnoće (23) te probir starijih osoba, osobito starijih žena (24). Britansko društvo za štitnjaču (engl. *British Thyroid Association*, BTA) smatra da je probir zdrave odrasle populacije neopravdan, ali preporučuje ciljano testiranje žena u menopauzi ili ako traže liječničku pomoć zbog nespecifičnih simptoma (25).

1.2.3. Klinička obilježja i liječenje supkliničke hipotireoze

Bolesnici sa SH obično nemaju kliničke simptome ili su oni blagi i nespecifični. Neki od njih mogu imati nespecifične simptome poput umora, usporenosti, osjećaja hladnoće ili suhe kože te depresije. Neki bolesnici mogu imati gušu, poremećaj srčane funkcije, poremećaj menstrualnog ciklusa i dislipidemiju. Supklinička hipotireoza je najčešće rani stadij klinički manifestne hipotireoze, a istraživanja pokazuju kako je prelazak u manifestni oblik najučestaliji u bolesnika sa SH koji imaju visoki titar TPOAt (26). U istraživanju u kojem je praćen razvoj

hipotireoze kroz period od 20 godina, godišnje je 4,3 % žena sa SH i visokim TPOAt prešlo u hipotireozu. Kada je bio povišen samo TSH bez TPOAt, tada je u hipotireozu godišnje prešlo 3 % bolesnica, a ako su samo protutijela bila pozitivna, onda 2 % bolesnica (15). Huber i suradnici (27) proveli su desetogodišnje prospektivno istraživanje iz kojeg su zaključili da je u tom periodu 28 % žena prešlo u hipotireozu, 68 % je ostalo u supkliničkoj hipotireozu, a kod 4 % se TSH vratio u normalu. Desetogodišnji rizik za razvoj hipotireoze s obzirom na početnu vrijednost TSH iznosio je 0 % za TSH između 4 i 6 mIU/L, 42,8 % za TSH između 6 i 12 mIU/L te čak 76,9 % za vrijednosti TSH veće od 12 mIU/L.

Za bolesnike kojima je potrebno liječiti hipotireozu nadomjesnom hormonskom zamjenom predominantno lijek izbora jest levotiroksin, sintetski izomer tiroksina, uz smjernicu za postupno doziranje lijeka kojom se TSH održava unutar referentnog intervala (28). Levotiroksin je prihvaćena terapija svih vodećih društava za liječenje bolesti štitnjače (Američko udruženje kliničkih endokrinologa, Američko društvo za štitnjaču, Britansko društvo za štitnjaču, Europsko društvo za štitnjaču (engl. *European Thyroid Association*, ETA). Levotiroksin je sintetski pripravljen oblik tiroksina i strukturno je identičan samom T4 hormonu. Adekvatna doza varira ovisno o dobi i kilaži. Karakterizira ga poluživot od sedam dana u plazmi što omogućuje doziranje jednom tabletom dnevno (29). Preporuka je da se primjenjuje ujutro prije jela, četiri sata nakon jela ili prije spavanja jer hrana, kava i neki lijekovi smanjuju apsorpciju. Primjenjuje se u obliku natrijeva levotiroksina i dostupan je na tržištu pod imenom *Euthyrox R* i *Letrox R*. Potrebno je šest do osam tjedana da se dosegne adekvatna razina u plazmi nakon početka terapije. Pored monoterapije levotiroksinom postoji i kombinirana terapija s T3 i T4 istovremeno te rijetko terapija liotironinom (LT3). Propisivanje levotiroksina kao najčešće terapije ne rješava uvijek sve probleme u liječenju hipotireoze (30). Mogući je razlog neučinkovitosti levotiroksina prisutnost genskog polimorfizma dejodinaze 2 Thr92Ala u nekih bolesnika koji onemogućava adekvatnu pretvorbu T4 u T3 (31). Terapija levotiroksinom ne nadoknađuje manjak T3 podrijetlom iz štitnjače, stoga kombinirana terapija može dovesti do poželjnih koncentracija FT4 i FT3 u određenih bolesnika (32). Pored sintetskih pripravaka postoje i prirodni pripravci hormona štitnjače, u koje se ubrajaju ekstrakt štitnjače, tiroidni prah štitne žlijezde svinje ili goveda (engl. *dessicated thyroid*). Osim što njihovo propisivanje nije regulirano krovnim udruženjima koja se bave liječenjem bolesnika sa SH, nabava i primjena takvih pripravaka je često bez stručnog i medicinskog nadzora. Nadalje, istraživanja o nuspojavama, korisnosti i doziranju prirodnih tiroidnih lijekova se često međusobno ni ne slažu (33).

1.3. Kardiovaskularni sustav

Kardiovaskularni je sustav pod značajnim utjecajem hormona štitnjače, pa je tako i supklinička hipotireoza u korelaciji s povećanim rizikom od razvoja kardiovaskularnih bolesti. Promjene zabilježene u bolesnika sa SH su povećan periferni vaskularni otpor, dijastolička disfunkcija, smanjena sistolička funkcija i smanjeno punjenje srca, od kojih je u gotovo svim istraživanjima zabilježena dijastolička disfunkcija (14).

Hormoni štitnjače djeluju na kardiovaskularni sustav izravnim utjecajem na miokard, putem autonomnoga živčanog sustava te promjenama na perifernim krvnim žilama (34). Učinak na srce i periferne krvne žile tireoidni hormoni ostvaruju genskim i negenskim djelovanjem. Gensko se djelovanje očituje regulacijom ekspresije ključnih strukturnih i regulacijskih gena, među kojima su adrenomedulin, matriksni Gla protein, angiotenzin II receptor tipa 1, ekto-5'-nukleotidaza i bazični faktor rasta fibroblasta (35). Adrenomedulin je snažan vazorelaksans i antioksidacijski peptid. Zabilježeno je da T3 inducira ekspresiju adrenomedulina u endotelnim stanicama štakora (36). Indukcija adrenomedulina može biti jedan od mehanizama smanjenja vaskularnog tonusa djelovanjem hormona T3 budući da se u vaskularnim glatkim mišićnim stanicama pokazala veća ekspresija adrenomedulina inducirana putem T3. Premda se još malo zna o ciljnim genima za T3 na vaskularnom glatkom mišićju, istraživanje je pokazalo da T3 ima povoljan učinak na ekspresiju gena za matriksni Gla protein (37). Matriksni Gla protein djeluje kao snažan inhibitor vaskularne kalcifikacije, pa tako hormoni štitnjače svojim učinkom na ekspresiju ovog proteina mogu pridonijeti sprječavanju vaskularne kalcifikacije koja je uključena u progresiju ateroskleroznog plaka (38). Nadalje, pokazalo se da T3 povećava proizvodnju adenoizina, važnog lokalnog vazodilatatora, u vaskularnom glatkom mišićju. Pojačana hidroliza AMP-a posljedica je povećane razine ekspresije ekto-5'-nukleotidaze koja prevodi AMP u adenozin. Indukcija ekto-5'-nukleotidaze predstavlja dodatni mehanizam kojim T3 inducira vaskularnu relaksaciju (39).

Negensko djelovanje hormona štitnjače ostvaruje se putem promjena na membranskim ionskim kanalima i sintezom endotelnoga dušikovog monoksida (NO), što vodi prema smanjenju sistemskog vaskularnog otpora (40). Negenski učinak T3 vidljiv je kroz pojavu da nakon deset minuta od vezanja T3 na specifično mjesto vezno mjesto za T3 na plazmatskoj membrani glatkih mišićnih stanica dolazi do njihove relaksacije. Izravnim djelovanjem na glatke mišićne stanice hormoni štitnjače smanjuju srednji arterijski tlak i dovode do smanjenja otpora u perifernim arteriolama. Nadalje, dolazi do aktivacije sustava renin-angiotenzin-aldosteron i povećanja bubrežne resorpcije natrija. Povećanju volumena krvi pridonosi

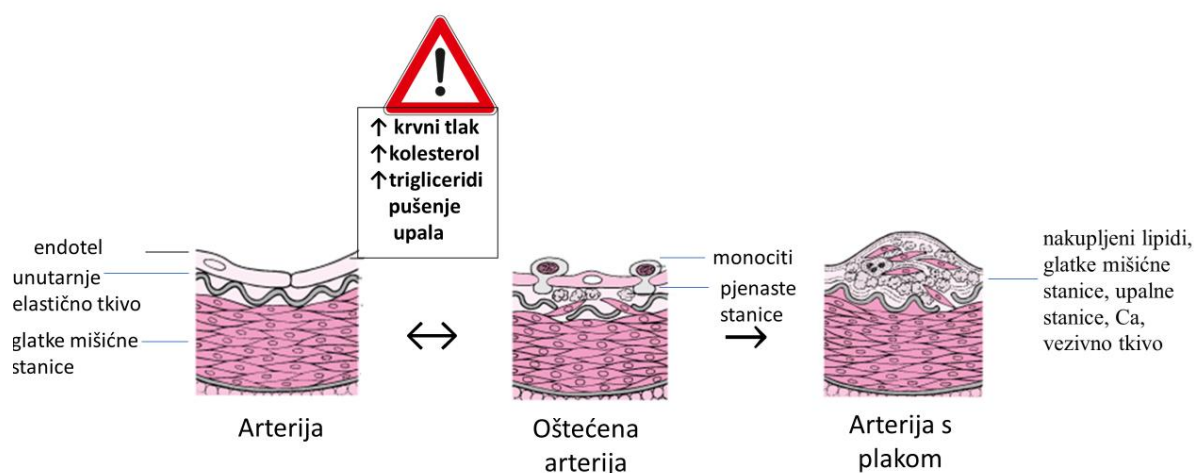
povećana sinteza eritropoetina pod utjecajem T3 i posljedično povećanje broja eritrocita. U hipotireoidizmu je prisutan porast dijastoličkoga krvnog tlaka, pa se zbog niskoga udarnog volumena smanjuje i pulsni tlak, udružen s niskim razinama renina. Ekspresija gena odgovornih za sintezu natriuretskih peptida regulirana je hormonima štitnjače, stoga je regulacija razine soli i vode u regulaciju krvnoga tlaka promijenjena (41).

Roterdamska studija bila je prva koja je pokazala povećani rizik za razvoj ateroskleroze i povećanu prevalenciju infarkta miokarda u bolesnika sa SH (žena starijih od 55 godina) (42). Međutim, istraživanja o kardiovaskularnom riziku u bolesnika sa SH nisu dala ujednačene rezultate, premda je broj istraživanja koja upućuju na korelaciju između SH i ateroskleroze u značajnom porastu. Dvadesetogodišnje praćenje populacije Whickhama nije pokazalo povećan rizik razvoja kardiovaskularnih bolesti u bolesnika sa SH (43), kao ni istraživanje u Velikoj Britaniji nakon desetogodišnjeg praćenja bolesnika sa SH (44). Naredna su istraživanja pak pokazala da je SH nezavisni čimbenik rizika za razvoj ateroskleroze (45), kongestivno zatajenje srca (46), ishemijsku bolest srca i posljedično smrt (47). Dodatno, meta-analiza temeljena na prethodnim istraživanjima iz 11 zemalja Amerike, Europe i Azije pokazala je da je SH povezana s koronarnom bolesti srca i smrtnošću, posebice uz koncentracije TSH veće od 10,0 mIU/L (48). Niz je istraživanja utvrdilo povezanost i korelaciju između SH i kardiovaskularnih bolesti, no molekularni mehanizmi u podlozi još uvijek nisu dovoljno razjašnjeni i predmet su brojnih istraživanja.

1.3.1. Ateroskleroza

Ateroskleroza je kronična bolest s progresivnim tijekom čiji razvoj počinje već u djetinjstvu, a predstavlja kronični fibroproliferativni i upalni proces koji zahvaća srednje i velike arterije. Najčešće kliničke manifestacije ateroskleroze su kardiovaskularna bolest (angina pectoris, srčani infarkt i dr.), cerebrovaskularna bolest i periferna vaskularna bolest. Ateroskleroza predstavlja promjene, oštećenja i naslage na stijenkama arterija. Stijenka krvnih žila sastoji se od triju odijeljenih slojeva: 1. *intima* (lat. *tunica intima*), koja neposredno oblaže lumen (endotel i subendotelno vezivno tkivo); 2. *medija* (lat. *tunica media*), srednji sloj čija debljina i građa (glatke mišićne stanice, elastična vlakna i lamele) najviše ovise o funkciji žile; 3. *adventicija* (lat. *tunica externa*), vanjski sloj koji stijenku krvne žile povezuje s njezinom okolinom. Stijenke arterije prekrivene su endotelom koji je u zdravim žilama gladak i neprekinut, a ateroskleroza započinje njegovim oštećenjem kao posljedica djelovanja različitih

agensa (mehaničkih (arterijska hipertenzija), kemijskih (povećana količina lipoproteina niske gustoće (LDL) kolesterola, homocisteina, pušenje), imunolosnih i infekcijskih). Oštećenje može biti pravo propadanje i ljuštenje endotelnih stanica ili poremećaj funkcije stanica, tj. aktivacija. Aktivaciju ponajprije potiču slobodni radikali kisika kao što je u stanju hiperkolestolemije, tj. povišene koncentracije LDL kolesterola. Aktivacijom endotelnih stanica dolazi do lučenja citokina iz njih i ekspresije adhezijskih vaskularnih molekula (engl. *vascular cell adhesion molecule*, VCAM-1), unutarstaničnih adhezijskih molekula (engl. *intercellular adhesion molecule*, ICAM-1) i E-selektina. Zbog toga se uz endotel nakupljaju monociti i limfociti T koji migriraju u subendotelni prostor. Slobodni kisikovi radikali oksidiraju LDL čestice, koje se tako promijenjene zadržavaju u subendotelu i u velikom se broju ugrađuju u makrofage koji su nastali iz mobiliziranih monocita. Makrofagi u kojima se nagomilao kolesterol iz LDL čestica nazivaju se pjenastim stanicama. Ovako aktivirani makrofagi počinju lučiti različite citokine. Oksidirani LDL ometa i sintezu NO zbog čega dolazi do disfunkcije endotela i lučenja vazokonstriktorskih čimbenika, kao što je endotelin-1. Aktivirane endotelne stanice i makrofagi luče faktore rasta koji potiču migraciju glatkih mišićnih stanica iz medije u intimu te dodatno dolazi do njihove proliferacije. Na mjestima oštećenja endotela nakupljaju se i trombociti, koji također luče trombocitne faktore rasta (engl. *platelet-derived growth factor*, PDGF) te zajedno sa lipoproteinima djeluju na migraciju glatkih mišićnih stanica. Nakupine makrofaga i glatkih mišićnih stanica s nagomilanim lipidima i pretvorene u pjenaste stanice se nazivaju masne pruge. One predstavljaju reverzibilni rani stadij ateroskleroze. Ako se oštećenje endotela nastavi, opisane se promjene šire. Pjenaste stanice umiru apoptozom, pri čemu se u okoliš otpuštaju tvari koje potiču umnažanje glatkih mišićnih stanica i fibroblasta te nastaje prekrivač u obliku kape. Pod utjecajem faktora rasta u glatkim mišićnim stanicama započinje sinteza kolagena i elastina, pa nakupina postaje fibrolipidna, tj. nastaje aterom ili plak. Plakovi rastu i dovode do zadebljanja stijenke arterije te tako sužavaju arteriju što otežava protok i uzrokuje hipoksiju tkiva kojeg opskrbljuju. Mogu je i u potpunosti začepiti te tako zaustaviti cirkulaciju na tom mjestu (**Slika 6.**) Neki plakovi ne začepi arteriju, već mogu puknuti i pokrenuti nastajanje krvnog ugruška koji iznenada zatvori arteriju. Čimbenici rizika za razvoj ateroskleroze su hiperlipidemija (osobito povećana koncentracija kolesterola u krvi, i to LDL kolesterola), pušenje, hipertenzija, pretilost, šećerna bolest, stres, smanjena fizička aktivnost, itd. (49).



Slika 6. Aterosklerotiske promjene krvnih žila. Ca - kalcij.

Trombociti imaju značajnu ulogu u patofiziologiji ateroskleroze. Receptori za hormone štitnjače nalaze se i na hematopoeznim matičnim stanicama, tako da hormoni štitnjače mogu modulirati proizvodnju trombocita i drugih krvnih stanica (50). Veliki trombociti jesu hemostatski i enzimski aktivniji te sadrže više protromboznih molekula, kao što su trombocitni faktor IV, serotonin i trombocitni faktor rasta (51). Veličinu trombocita procijenjujemo prema prosječnom volumenu trombocita (MPV). Povećani MPV dovodi do veće sklonosti protromboznom stanju uz povišenu koncentraciju tromboksana A₂ i B₂ te adhezijskih molekula kao što su P-selektin i glikoprotein II b/IIIa. Ovi trombociti u odgovoru na ADP pokazuju pojačanu agregaciju i smanjenu inhibiciju agregacije prostaciklinom, što dovodi do vazokonstrikcije (52). Zbog toga se veći trombociti i povišeni MPV mogu smatrati potencijalnim biljekom koji odražava napredovanje ateroskleroznog procesa i rizik od kardiovaskularnih komplikacija (53). Prethodna je studija pokazala da je povišeni MPV faktor rizika i prognostički biljeg za protrombozne bolesti, kao što su kardiovaskularne bolesti (54), a primijećeno je također, da je povišeni MPV neovisni faktor rizika za bolest koronarnih arterija i infarkt miokarda (55). Povišena vrijednost MPV prisutna je u stanjima koji se karakteriziraju kao faktori rizika za kardiovaskularne bolesti, a to su šećerna bolest, debljina, hipertenzija, pušenje, dislipidemija (56-58).

Značajan rizik za nastanak ateroskleroze i ateroskleroznih vaskularnih bolesti predstavlja dislipidemija. Dislipidemija je poremećaj metabolizma masti, kod kojega dolazi do porasta jedne ili više frakcija lipida u krvi, tzv. hiperlipoproteinemije, jednog od najčešćih metaboličkih poremećaja u općoj populaciji. S obzirom na etiopatogenezu,

hiperlipoproteinemije se mogu podijeliti na primarne (nasljedne genske bolesti metabolizma lipoproteina) i sekundarne (posljedica druge bolesti). Na temelju fizičko-kemijskih svojstava lipoproteini se dijele u pet skupina: hilomikroni (lipoproteini bogati trigliceridima), lipoproteini vrlo niske gustoće (engl. *very low-density lipoprotein*, VLDL), lipoproteini srednje gustoće (engl. *intermediate-density lipoprotein*, IDL), lipoproteini niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein*, LDL) i lipoproteini visoke gustoće (engl. *high-density lipoprotein*, HDL). U laboratorijskoj dijagnostici se rutinski najčešće izvodi mjerenje koncentracije ukupnog kolesterola, LDL kolesterola i HDL kolesterola te triglicerida. Lipoproteini niske gustoće sadrže 20 - 25 % proteina, 5 - 15 % triglicerida, 20 - 25 % fosfolipida, 40 - 50 % kolesterola te apoB-100 (ponekad i apo C III i apo E). Nastaju kao krajnji produkt katabolizma VLDL čestica i prenose endogeni kolesterol iz jetre do drugih tkiva. Zbog maloga promjera lako ulaze u subendotelne stanice krvnih žila te su podložni oksidaciji što sve vodi razvoju ateroskleroznog plaka. Lipoproteini visoke gustoće su najmanje lipoproteinske čestice, sadrže najviše proteina (oko 55 %), zatim 5 - 10 % triglicerida, 20 - 30 % fosfolipida te 15 - 25 % kolesterola. Osim toga, sadrže još apo A-I, II i IV, apo C-I, II i III te apo E. HDL čestica sintetizira se u jetri, a manjim dijelom u tankom crijevu. Prenosi kolesterol iz perifernih tkiva do jetre, odakle se on izlučuje u sklopu žučnih kiselina (59). Zahvaljujući svojim karakteristikama HDL čestice imaju protuupalna, antioksidacijska, vazodilatacijska te antiaterogena svojstva. Na površini HDL-a se nalaze i proteinske komponente koje su vrlo važne za njihovo antiaterogeno svojstvo. To su antioksidacijski enzim paraoksonaza 1, aktivirajući faktor trombocita (engl. *platelet-activating factor-acetylhydrolase*, PAF-AH) te proteini koji prenose lipide kao što su lecitin-kolesterol-aciltransferaza i kolesterol ester transfer protein . Ovi enzimi sudjeluju u razgradnji oksidiranog LDL-a i neutraliziraju njegov proupalni učinak. Zbog svega navedenog, smanjena koncentracija HDL-a predstavlja čimbenik rizika za nastanak ateroskleroze (60). Trigliceride se dugo smatralo samo markerom povećanog rizika, a ne i proaterogenim čimbenikom jer se ne akumuliraju u većim količinama u ateroskleroznom plaku. Trigliceridi se kao glavni sastavni dio hilomikrona transportiraju do različitih tkiva i organa, ponajviše do poprečno-prugastih mišića glatke muskulature srca i masnog tkiva. Na samom endotelu kapilara u ovim tkivima enzim lipoproteinska lipaza nalazi se u visokim koncentracijama i vrlo brzo ponovno razgrađuje trigliceride unutar hilomikrona na glicerol i masne kiseline. Razina triglicerida, koji su glavni sastavni dio adipocita, korelira s koncentracijom većine proaterogenih supstanci koje luči masno tkivo (faktori stimulacije kolonije makrofaga (engl. *macrophage colony stimulating factor*, M-CSF), proinflamatorni citokini, rezistin i angiotenzinogen). S druge strane, hipertrigliceridemija je u obrnutoj korelaciji s adiponektinom što dovodi do smanjene

osjetljivosti na inzulin, posebice u jetri, s posljedičnim povećanjem glukoneogeneze, smanjenjem katabolizma lipoproteina, klirensa triglicerida i beta-oksidacije, povećanjem inzulinske rezistencije i povećanjem disfunkcije endotela. Već i umjerena hipertrigliceridemija (1,7 – 10,0 mmol/L) predstavlja značajan rizični čimbenik za razvoj ateroskleroze, a dodatno se rizik povećava u kombinaciji s povišenom koncentracijom LDL kolesterola. Trigliceridi nadalje, imaju dokazano prokoagulacijsko djelovanje te i na taj način pospješuju razvoj ateroskleroze. Povišena koncentracija triglicerida utječe na viskoznost plazme i povećano stvaranje koagulacijskih faktora, kao što su faktor VII, inhibitor plazminogen aktivatora-1 (PAI-1), aktivator faktora X, fibrinogen i trombin (61)

Uz dislipidemiju, inzulinsku rezistenciju i oksidacijski stres, SH obilježava i kronična upala niske razine koja pridonosi razvoju i napredovanju endotelne disfunkcije i ateroskleroze. Osim što se TSH veže na TSH receptore u hepatocitima i povećava sintezu kolesterola (62), TSH se veže i na receptore u adipocitima i inducira sintezu interleukina-6 (IL-6) (63) te se veže se na receptore u stanicama koštane srži i tako povećava sekreciju faktora tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alfa*, TNF- α) (64). Nastali proupalni citokini stimuliraju sintezu C-reaktivnog proteina (CRP) u hepatocitima. Mehanizmi upale glavni su čimbenici posredovanja svih faza ateroskleroze, od početnog nakupljanja cirkulirajućih leukocita na stijenkama arterija do eventualne rupture nestabilnog plaka. Od svih plazmatskih biljega vaskularne upale, CRP ima najrašireniju primjenu u kliničkim studijama. Mjerenjem serumske koncentracije CRP-a predviđa se budući rizik u bolesnika sa stabilnom i nestabilnom anginom, u kroničnoj fazi infarkta miokarda i u bolesnika koji će biti podvrgnuti revaskularizirajućim postupcima (65, 66). Mnogo je podataka koji podržavaju ulogu CRP-a kao prediktora kardiovaskularnog rizika kod naizgled zdravih pojedinaca (67). Osim navedenog sve je više dokaza koji upućuju na mogućnost da CRP izravno sudjeluje u proupalnom stanju, tj. procesu vaskularne ozljede. Nekoliko je istraživanja dokazalo lokalizaciju CRP-a unutar ateroskleroznog plaka čime posreduje u nakupljanju monocita. CRP je aktivator komplementa što pridonosi nastajanju rane aterosklerozne lezije (68). CRP također potiče otpuštanje upalnih citokina (IL-1, IL-6 i TNF- α) iz monocita i tako djeluje kao izravni proupalni stimulans za fagocite (69). Mjerenjem serumskih koncentracija CRP-a koristeći test visoke osjetljivosti (engl. *high sensitivity C-reactive protein assay*, hs-CRP) dokazujemo supklinički stadij upale koji odražava vaskularnu upalu (70).

1.3.2. Endotel krvih žila i endotelna disfunkcija

Endotel je heterogena epitelna struktura koja oblaže čitav krvožilni sustav te posjeduje raznovrsne metaboličke aktivnosti (71). Najznačajnije funkcije endotela su kontrola vaskularnog tonusa i proliferacije glatkih mišića, inhibicija agregacije trombocita, utjecaj na migraciju leukocita te modifikacija propusnosti vaskularne stijenke (72).

Endotel krvne žile ima ključnu ulogu u održavanju vaskularnog tonusa zahvaljujući sposobnosti izazivanja vazodilatacije u odgovoru na naglu promjenu protoka u krvožilnom sustavu. Na stijenku žile djeluje krv u lumenu dvjema ortogonalnim silama. Frikcijska sila je poznata kao sila smicanja (engl. *shear stress*) i primarno je povezana s protokom te je usmjerena tangencijalno na jedinicu površine stijenke. Distenzijska sila je druga sila koja djeluje okomito i izravno te odgovara krvnom tlaku. Endotelne strukture reagiraju trenutačnim promjenama u staničnim membranama, reorganizacijom unutarnje strukture i programiranim usmjeravanjem niza biokemijskih procesa. Endotelne stanice ovako pokazuju sposobnost pretvaranja mehaničkih sila u biološke reakcije preko mehanoreceptora što dovodi do otpuštanja vazoaktivnih tvari i regulacije krvnog protoka (73). Od vazoaktivnih tvari koje otpuštaju endotelne stanice najznačajniji su endotelni faktori relaksacije (engl. *endothelium-derived relaxing factors*, EDRF), u koje se ubrajaju NO, prostaciklin (engl. *prostaglandin I2*, PGI₂) i hiperpolarizirajući faktor porijeklom iz endotela (engl. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF). NO je prvi definirani endotelni čimbenik relaksacije za koji je dokazano da relaksira vaskularni glatki mišić. NO sintetizira endotelna NO sintetaza (engl. *endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) iz L-arginina, a stvara se u odgovoru na žilni stres i djelovanje spojeva kao što su acetilkolin, trombin i dr. (74). Osim vazodilatacije krvnih žila, NO regulira sve ključne korake u razvoju ateroskleroze, sprječava adheziju i agregaciju trombocita, migraciju i adheziju leukocita u arterijsku stijenku te inhibira proliferaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica (75). Prostaciklin je drugi bitan endotelni čimbenik relaksacije, koji se također djelomično otpušta u odgovoru na krvožilni stres (76).

Vaskularni endotel proizvodi također, endotelne faktore kontrakcije (engl. *endothelial-derived constricting factors*, EDCF) od kojih su najznačajniji endotelin-1 (engl. *endothelin-1*, ET-1) i tromboksan (engl. *thromboxane*, TXA). ET-1 djeluje kao fiziološka protuteža NO-u (77). Na proizvodnju i otpuštanje ET-1 utječe krvožilni stres, angiotenzin II, adrenalin, trombin, oksidirani LDL i upalni citokini (78). ET-1 je važan čimbenik rizika kardiovaskularnog oboljenja i mortaliteta (79). Tromboksan, uz endotelne stanice proizvode i trombociti, a u njegovu su sintezu uključeni ciklooksigenaza-1 i tromboksan sintetaza. Povećano stvaranje

TXA dovodi do vazokonstrikcije i agregacije trombocita, tj. povećanog rizika za kardiovaskularna oboljenja (80).

Endotelna disfunkcija je stanje oštećenog endotela i posljedično njegove poremećene funkcije koju karakterizira proupalni, protrombozni i vazokonstriktorski fenotip (81). Neprimjerena aktivacija endotela predstavlja osnovni razlog nastanka endotelne disfunkcije. Pod utjecajem štetnih podražaja dolazi do neuobičajene ekspresije endotelnih aktivacijskih antigena (VCAM-1, ICAM-1, E-selektin i P-selektin) i razvoja disfunkcijskog endotela (82). Ključno je obilježje zdravog endotela sposobnost otpuštanja vazoaktivnih tvari i regulacija krvnog protoka, pa je tako nesrazmjer raspoloživosti NO-a i aktivnosti vazokonstriktorskih čimbenika jedno je od glavnih obilježja i vodeći mehanizam sindroma endotelne disfunkcije. Razlozi smanjene raspoloživosti NO-a mogu biti nedostatak NO supstrata (L-arginin), manjak kofaktora enzima tetrahidrobiopterina, razlika u aktivnosti enzima eNOS-a uslijed poremećeneg ekspresije (83), posttranslacijskih modifikacija enzima eNOS, kao i inhibicije djelovanja NO-a putem slobodnih radikala kisika (84).

Endotelna se disfunkcija javlja značajno prije pojave ateroskleroznih lezija krvnih žila (85) te može biti prisutna čak i kod djece s obiteljskom anamnezom kardiovaskularnih bolesti (86). Utvrđivanje endotelne disfunkcije služi kao bitan prognostički pokazatelj budućih kardiovaskularnih incidenata u bolesnika oboljelih od kardiovaskularnih bolesti (87). Povećanje biološke dostupnosti NO-a poboljšava endotelnu funkciju u bolesnika s povećanim rizikom za razvoja kardiovaskularnih bolesti (88), pa tako lijekovi koji se koriste u terapiji kardiovaskularnih bolesti (antihipertenzivi ili statini) imaju povoljan učinak na endotelnu funkciju kroz smanjenje razine oksidacijskog stresa i poboljšanje dislipidemije (89), kao i korištenje antiupalnih lijekova kod upalnih bolesti (90), a sve to zbog temeljne karakteristike endotelne disfunkcije, a to je reverzibilnost.

1.3.3. Procjena endotelne disfunkcije u kliničkoj praksi

U kliničkoj praksi procjena endotelne disfunkcije najčešće podrazumjeva mjerenje dilatacije krvnih žila u odgovoru na zadani stimulans gdje se kao pokazatelj poremećene funkcije endotela smatra nalaz smanjene dilatacije. Najvažnije i najčešće korištene metode za procjenu endotelne funkcije u različitim vrstama krvnih žila su:

1. metode za procjenu mikrovaskularne endotelne funkcije:

A) metoda mjerenja protoka krvi

Metoda mjerenja protoka krvi je najčešće korištena metoda za procjenu endotelne funkcije u mikrocirkulaciji (engl. *Laser Doppler Flowmetry*, LDF). Metoda radi na principu procjene protoka u mikrocirkulacijskoj vaskulaturi kože putem laserske zrake koja se reflektira od eritrocita u mikrocirkulaciji te se na temelju promjene valne duljine nakon odbijanja (Dopplerov efekt) računalnim programima određuje intenzitet protoka (91).

B) venska okluzivna pletizmografija

Venska okluzivna pletizmografija je metoda mjerenja protoka i procjene endotelne funkcije mikrocirkulacije tijekom infuzije različitih vazoaktivnih agenasa kao što su acetilkolin, bradikinin, indometacin. itd., a temelji se na zaustavljanju povratka venske krvi iz podlaktice uz održan arterijski priljev krvi u podlakticu, što dovodi do linearnoga povećanja krvnoga protoka u određenom vremenu, koji je proporcionalan arterijskome protoku krvi (92).

C) određivanje vaskularne reaktivnosti u izoliranim krvnim žilama

To je invazivna metoda koja se temelji na uzimanju biopsije određene vrste humanoga tkiva (npr. supkutano ili visceralno masno tkivo) iz kojeg se izoliraju otporničke krvne žile i u laboratoriju postavljaju na posebne elektrode uređaja koji u *in vitro* uvjetima oponaša uvjete u intaktnome organizmu i simulira protok kroz izoliranu krvnu žilu (93).

2. metoda procjene makrovaskularne endotelne funkcije

Ultrazvučni test protokom posredovane dilatacije perifernih arterija (engl. *Flow Mediated Dilation*, FMD) je tehnika koja se temelji na izazivanju vazodilatacije uslijed povećanja protoka krvi kroz arteriju – povećan protok izaziva žilni stres endotela s posljedičnom stimulacijom endotelnih stanica na povećano otpuštanje NO-a (94).

3. određivanje elastičnosti krvnih žila (engl. *arterial stiffness*)

Za procjenu elastičnosti perifernih krvnih žila koriste se brojne neinvazivne metode. Najčešće su korištene analiza pulsnoga vala (engl. *pulse wave analysis*, PWA) i određivanje brzine pulsnoga vala (engl. *pulse wave velocity*, PWV) zbog njihove reproducibilnosti i lakoće izvođenja (95).

4. određivanje debljine intima-medie karotidne arterije (engl. *carotid intima-media thickness*, cIMT)

Ovom metodom procjenjuje se debljina medije vaskularne stijenke karotidne arterije koja je prihvaćeni pokazatelj kardijalnih incidenata u bolesnika koji imaju rani stadij ateroskleroze (96)

1.3.4. Biljezi endotelne disfunkcije u serumu

Ultrazvučni test protokom posredovane dilatacije perifernih arterija, FMD metoda, je najraširenija, neinvazivna metoda u istraživanjima endotelne funkcije (97). Međutim, ova metoda uz nisku cijenu izvedbe i dobru prognostičku značajnost za razvoj kardiovaskularnih bolesti, značajno ovisi o operateru, daje ograničene podatke te na rezultat utječu fiziološke varijacije (98). Stoga su endotelni biljezi u cirkulaciji obećavajuća alternativa za tradicionalne metode u dijagnosticiranju i stratifikaciji kardiovaskularnog rizika već u ranim fazama bolesti (99).

Relevantan biljeg endotelne funkcije trebao bi biti specifičan za endotel, reprezentativan za određenu bolest, reproducibilan, koristan u kliničkoj procjeni bolesti, korelirati s težinom bolesti, a metoda za njegovu kvantifikaciju jednostavna i pristupačne cijene (100). Najbolje istraženi biljezi endotelne funkcije jesu endotelne progenitorske stanice, endotelne mikročestice, mikroRNA molekule i adhezijske molekule (E-selektin, ICAM-1, VCAM-1) te von Willebrandov faktor (engl. *von Willebrand factor*, vWF). Većina metoda određivanja ovih biljega nisu standardizirane, već se samo koriste u kliničkim istraživanjima (101).

1.3.4.1. Endokan

Endokan (endotel specifična molekula 1, ESM-1) je topljivi dermatan sulfat proteoglikan (50 kDa), kojeg ne izlučuju samo vaskularne endotelne stanice, nego i epitelne stanice bubrežnih distalnih tubula, bronha i submukoznih žlijezda pluća (102). Otkriven je kao proteoglikan kojeg izlučuju endotelne stanice humane umbilikalne vene (103) pod imenom endotel specifična molekula 1. Preimenovan je u endokan nakon što je zaključeno da su njegova sinteza, sekrecija i djelovanje najčešće povezani s aktiviranim vaskularnim endotelom (104).

Ekspresija endokana u endotelnim stanicama je regulirana kao odgovor na okidače upale, kao što su lipopolisaharidi i citokini poput TNF- α i IL-1 β (105). Jedna od najvažnijih uloga endokana je modulacija interakcije leukocita i endotelnih stanica kada je endotel aktiviran (106). Smatra se da endokan inhibira interakciju leukocita i ICAM-1 (107). Endokan simultano ima ulogu ciljne molekule i modulatora u signalizaciji puta faktora rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*, VEGF). Endokan povećava ekspresiju gena *VEGF-A* te interakciju VEGF-A i njegovog receptora (engl. *vascular endothelial growth factor receptor 2*, VEGFR-2). Time se povećava vaskularna permeabilnost (108), a signalizacija

VEGF-om dodatno potiče ekspresiju endokana (109). Ova je dvosmjerna veza ključna u procesu angiogeneze, upale i vaskularne permeabilnosti u fiziološkim i patološkim stanjima te se smatra ciljnim mjestom za terapiju kod kardiovaskularnih incidenata, primjerice moždanog udara (110). Endokan također povećava stvaranje proupalnih citokina u endotelnim stanicama, pojačava ekspresiju adhezijskih molekula (ICAM-1 i VCAM-2) te adheziju monocita i endotelnih stanica (108,109).

Temeljem svega, zaključuje se kako je endokan molekula koja utječe na procese u krvnim žilama kao što su endotelna aktivacija, permeabilnost i proliferacija. Značajan porast endokana vidljiv je kod niza autoimunih i sistemskih upalnih bolesti (sistemski eritemski lupus (111), sistemska skleroza (112), sepsa (113), i dr.) te poremećaja gdje je zahvaćen i vaskularni sustav (hipotireoidizam (114,115), hipertenzija (116), šećerna bolest (117) i dr.). Osim što je koncentracija endokana značajno povišena kod bolesti koje zahvaćaju vaskularni sustav ovaj biljeg reflektira razinu endotelne disfunkcije i korelirala s težinom bolesti te vrijednostima mjerenja metodom za procjenu endotelne disfunkcije FMD i cIMT (116,117). Endokan posjeduje odlične karakteristike kao biljeg endotelne disfunkcije s potencijalom široke primjene zbog svoje visoke reproducibilnosti i specifičnosti, kao i standardizacije metode te jednostavnosti za izvođenje i pristupačne cijene (118).

1.3.4.2. Asimetrični dimetilarginin (ADMA)

Asimetrični dimetilarginin (engl. *asymmetric dimethylarginine*, ADMA) je kompetitivni inhibitor eNOS što posljedično dovodi do smanjene sintezu NO. ADMA te u puno nižoj koncentraciji asimetrični izomer monometil-L-arginin (L-NMMA), detektiran je u ljudskoj plazmi i mokraći te je utvrđeno da ima svojstvo inhibicije o endotelu ovisne vazodilatacije (119). Klinička i eksperimentalna istraživanja pokazala su da čak i manje promjene u koncentraciji ADMA u cirkulaciji mogu značajno promijeniti stvaranje NO, vaskularni tonus i sistemski otpor (120).

Asimetrični dimetilarginin nastaje metilacijom aminokiseline L-arginina uz enzim proteinska arginin-metiltransferaza tip 1 (engl. *protein arginine methyltransferases*, PRMTs), a posttranslacijski se modificira proteolizom. Metilacijom L-arginina nastaju 3 različita derivata, L-NMMA, ADMA i simetrični dimetilarginin (SDMA) (121). Djelovanje ADMA se dokida razgradnjom uz enzim dimetilarginin dimetilaminohidrolazu (DDAH) pri čemu nastaje citrulin, a iz organizma se uklanja mokraćom. SDMA ne inhibira izravno enzimsku aktivnost eNOS-a,

već kompetitivno inhibira transport arginina u stanice pomoću hCAT-2B transportera i tako smanjuje njegovu koncentraciju u stanicama i dostupnost za sintezu NO (122). Općenito, opisana su tri moguća mehanizma odgovorna za porast koncentracije ADMA (*i*) povećana sinteza ADMA, (*ii*) smanjena enzimska hidroliza ADMA i (*iii*) smanjena eliminacija bubregom. Budući da bolesnike s hipotireozom karakterizira stanje pridružene dislipidemije i oksidacijskog stresa, ta dva stanja mogla bi objasniti i porast koncentracije ADMA. Enzime koji su uključeni u stvaranje i razgradnju ADMA (PRMT 1 i DDAH) regulira stanični redoks status. U kultiviranim endotelnim stanicama, ekspresija gena *PRMT* povećana je u prisutnosti LDL kolesterola i oksidiranog LDL kolesterola te raste ovisno o njihovoj koncentraciji (123). Isto tako, pokazano je da oksidacijski stres, koji je također obilježje hipotireoze, smanjuje aktivnost DDAH, enzima odgovornog za razgradnju ADMA (124).

Povišene koncentracije cirkulirajućeg ADMA zabilježene su u bolesnika sa sistemskom aterosklerozom (125), klinički zdravih osoba s izoliranom hiperkolesterolemijom (126), bolesnika s esencijalnom hipertenzijom (127), bolesnika s bubrežnim zatajenjem (128), bolesnika s hipertireozom i hipotireozom, bolesnika s metaboličkim sindromom (129) i dr. Prospektivne su studije pokazale moguću ulogu ADMA kao prognostičkog biljega kardiovaskularnih incidenata i kardiovaskularnog rizika. Jedno prospektivno kliničko istraživanje opisalo je ADMA kao prediktora kardiovaskularnog ishoda i smrtnosti u bolesnika na dijalizi koji su praćeni tijekom godine dana (130). Serumska koncentracija ADMA pokazala se značajnim biljekom smrtnog ishoda bolesnika u jedinicama intenzivne njege (131). AteroGen studija na velikom je broju ispitanika pokazala značajnu povezanost povišene koncentracije ADMA u krvi s povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih incidenata tijekom dvije i pol godine praćenja (132) te se tako nameće zaključak da bi ADMA mogla predstavljati biljeg za rizik od kardiovaskularnih događaja (133,134).

1.3.4.3. Endotelin-1 (ET-1)

Endotelini su skupina endogenih peptida koji imaju snažna dugotrajna vazokonstriksijska svojstva. Inicijalno su identificirani kao snažni vazoaktivni peptidi koji reguliraju vaskularni tonus, krvni tlak, proliferaciju stanica i proizvodnju hormona (135). Poznate su tri izoforme (ET-1, ET-2 i ET-3) te svaka izoforma pokazuje određenu tkivnu specifičnost. ET-1 je eksprimiran u endotelnim stanicama, glatkom mišićju krvnih žila, središnjem živčanom sustavu i reproduktivnim tkivima (136). Biosinteza endotelina počinje od prekursora, molekule koja se zove pre-pro-endotelin, koja se kod ljudi sastoji od 212

aminokiselina. Pre-pro-endothelin se hidrolizira u "veliki ET" ili pro-endothelin, koji se sastoji od 38 aminokiselina. Nadalje, endothelin-konvertirajući enzim (engl. *endothelin converting enzyme*, ECE) pretvara pro-endothelin u zreli endothelin (ET). ECE su atipične endopeptidaze (metaloproteaze koje za svoju aktivnost trebaju metalni ion kao kofaktor, najčešće cink), koje se nalaze u stanici ili u neposrednoj blizini stanica koje stvaraju ET (137).

ET-1 je najpotentniji vazokonstriktor u obitelji endothelina te je najčešća izoforma endothelina u cirkulaciji. Čimbenici koji induciraju sintezu mRNA u endotelnim stanicama su lokalni čimbenici (aktivirani trombociti, endotoksini, trombin, citokini (IL-1), čimbenici rasta, oksidirani LDL), hormoni (adrenalin, inzulin, antidiuretički hormon, angiotenzin II) te hipoksija i hipovolemija (138). Transkripciju gena *ET-1* koče NO, atrijski natriuretički peptid, prostaglandini E2 i E1, heparin, epidermalni faktor rasta i pojačani vaskularni stres (139). Endothelin primarno ima parakrino djelovanje, a manjim dijelom autokrino, što je podržano činjenicom da se endothelinski receptori obično nalaze na membranama stanica koje proizvode ET ili u njihovoj blizini (140).

Biološki učinci ET posredovani su aktivacijom jednog od dva receptora spregnuta s G-proteinom receptora, endothelinskog receptora A (ETRA) i B (ETRB1 i ETRB2) (141). ETRB je visoko eksprimiran na endotelu (ETRB1) kao i na vaskularnim glatkim mišićima (ETRB2) te ima sličan afinitet za sve izoforme ET. Aktivacija ETRA dovodi do vazokonstrikcije, bronhokonstrikcije i sekrecije aldosterona. Aktivacija ETRB1 stimulira stvaranje NO, prostaciklina i EDHF te tako dovodi do vazodilatacije. Aktivacija ETRB2 receptora uzrokuje vazokonstrikciju (142).

Učinci ET-1 na organe i organske sustave mogu se podijeliti na kratkoročne (lučenje hormona, kontrakcija mišića, kontrola staničnog transporta) i dugoročne (kontrola ekspresije gena, učinak na hipertrofiju stanica, mitogenezu, itd.). ET je parakrini posrednik koji stimulira otpuštanje nekoliko hormona uključujući atrijski natriuretički peptid, aldosteron, adrenalin te hormone hipotalamusa i hipofize (140).

Brojni eksperimentalni dokazi upućuju na ulogu endothelina u patofiziologiji određenih bolesti kao što su infarkt miokarda, koronarni vazospazam, akutno renalno zatajenje, Raynaudov sindrom, astma, primarna plućna hipertenzija i fibroza jetre (143).

Pokazalo se da ET-1 ima ključnu ulogu u razvoju endotelne disfunkcije kod kardiovaskularnih bolesti uključujući aterosklerozu. Količina ET-1 je lokalno povećana u ateroskleroznom plaku, a njegove cirkulirajuće vrijednosti koreliraju s ateroskleroznim lezijama (144). Povišene koncentracije ET-1 potiču dodatnu ekspresiju gena koji kodiraju za produkte lipidnog metabolizma što dodatno pridonosi razvoju ateroskleroze (145).

2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

Glavni je cilj ovog istraživanja ispitati učinak terapije levotiroksinom u bolesnika s blažim oblikom SH ($TSH \leq 10,0$ mIU/L) na biljege endotelne disfunkcije u krvi (koncentraciju endokana, ADMA i ET-1) i druge biokemijske kardiovaskularne čimbenike rizika (serumsku koncentraciju triglicerida, ukupnog kolesterola, LDL kolesterola, ne-HDL kolesterola i hs-CRP-a te broj leukocita, trombocita i MPV).

Ostali specifični ciljevi su:

- ispitati razliku u koncentracijama endotelnih i drugih prethodno navedenih biokemijskih biljega u krvi te u vrijednostima indeksa tjelesne mase (ITM) između bolesnika s blažim oblikom SH ($TSH \leq 10,0$ mIU/L) i kontrolne skupine zdravih ispitanika;
- ispitati promjene u koncentracijama endotelnih i drugih prethodno navedenih biokemijskih biljega u krvi nakon šest mjeseci u skupini bolesnika s blažim oblikom SH ($TSH \leq 10,0$ mIU/L) kojima terapija levotiroksinom nije propisana;
- ispitati razliku u inicijalnim koncentracijama endotelnih i drugih gore navedenih biokemijskih biljega u krvi između bolesnika s blažim oblikom SH ($TSH \leq 10,0$ mIU/L) kojima terapija levotiroksinom nije propisana i onih kojima je propisana;
- ispitati povezanost parametara koji su pokazali statistički značajne razlike u bolesnika s blažim oblikom SH ($TSH \leq 10,0$ mIU/L) u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika.

Na temelju istaknutih ciljeva postavljena je glavna istraživačka hipoteza:

Bolesnici s blažim oblikom SH ($TSH \leq 10,0$ mIU/L) imaju značajno više serumske koncentracije endokana, ADMA, ET-1, triglicerida, ukupnog kolesterola, LDL kolesterola, ne-HDL kolesterola i hs-CRP-a, kao i veći broj leukocita, trombocita te MPV u odnosu na kontrolnu skupinu zdravih ispitanika, a nakon uvođenja terapije levotiroksinom i uspostavljanja eutiroidnog stanja njihove vrijednosti značajno se snizuju u odnosu na početne vrijednosti.

3. ISPITANICI I METODE

3. 1. Ispitanici

U ovoj prospektivnoj studiji ispitanici (u dobi od 18 do 75 godina, oba spola) obrađivani su sistematskim pregledima u Specijalnoj bolnici Agram, Zagreb, i specijalističkim pregledom u Klinici za onkologiju i nuklearnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice, Zagreb. Prilikom pregleda regrutirani su u skupinu bolesnika s blažim oblikom supkliničke hipotireoze ($TSH \leq 10$ mIU/L) ili u kontrolnu skupinu zdravih ispitanika. Istraživanje je provedeno na uzorcima ispitanika u skladu s Helsinškom deklaracijom, zakonskom regulativom Republike Hrvatske i osnovama dobre laboratorijske prakse, s ciljem osiguranja sigurnosti ispitanika koji su sudjelovali u znanstvenom istraživanju. Ispitanici su bili u potpunosti upoznati s eksperimentalnim zadatkom te su svoj pristanak potvrdili potpisivanjem informiranog pristanka. Informirani pristanak je sadržavao informacije o ciljevima istraživanja, zdravstvenim rizicima i dobrobitima te ostalim korisnim aspektima sudjelovanja. Istraživanje je dobilo odobrenje Etičkog povjerenstva Specijalne bolnice Agram (broj odobrenja: 06-09-2021 od 6. rujna 2021. god.), Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Sestre milosrdnice (broj odobrenja: 003-06/22-03/025 od 6. listopada 2022. god.) i Povjerenstva za etičnost eksperimentalnog rada Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta (broj odobrenja: 643-02/21-03/01 od 13. listopada 2021. god.).

Analizom statističke snage testa, veličina učinka procijenjena je iz prijašnjih istraživanja (146). Zaključci su izvedeni uz pogrešku prvog reda od 5 % ($P < 0,05$) uz snagu istraživanja od najmanje 90 % ($\beta = 0,1$). Pomoću statističkog programa (MedCalc 10.1.2.0, Mariakerke, Belgium <https://www.stat.ubc.ca/~rollin/stats/ssize/>) dobivena je minimalno potrebna veličina uzorka svake grupe od 28 ispitanika koju je trebalo uključiti u istraživanje.

U ovo istraživanje je bilo uključeno 29 odraslih osoba s postavljenom dijagnozom blažeg oblika SH (TSH: 4,9 - 10,0 mIU/L), kojima je pri uključivanju u istraživanje propisana nadomjesna terapija levotiroksinom; 32 odrasle osobe s postavljenom dijagnozom blažeg oblika SH (TSH: 4,9 - 10,0 mIU/L), kojima terapija nije bila propisana pri uključivanju u studiju te 30 kontrolnih ispitanika koji su prema spolu i dobi odgovarali bolesnicima sa SH. Odluku o uvođenju nadomjesne terapije levotiroksinom za bolesnike sa SH donio je liječnik temeljem sveukupnih kliničkih i laboratorijskih pokazatelja.

Isključujući kriteriji za sudjelovanje ispitanika u istraživanju bili su trudnoća, bubrežne bolesti, bolesti jetre, hipertenzija, srčana oboljenja, respiratorne bolesti, šećerna bolest, maligna oboljenja, pušenje, terapija lijekovima koji mogu utjecati na hormone štitnjače (litij, jod,

amiodaron, dopamin, glukokortikoidi), terapija statinima, preboljenje teškog oblika COVID-19 bolesti, sistemske autoimune bolesti i ITM > 35 kg/m².

3.2. Ustroj istraživanja

Na liječničkom pregledu, temeljem anamneze, laboratorijskih nalaza i simptoma, bolesniku je postavljena ili potvrđena od prije poznata temeljem povijesti bolesti dijagnoza supkliničke hipotireoze ($TSH \leq 10,0$ mIU/L i FT4 unutar normalnog raspona od 11,9 - 21,6 pmol/L, što je referentni raspon definiran od strane proizvođača metode i reagensa), koja u trenutku pregleda nije liječena levotiroksinom. Temeljem postavljene dijagnoze SH, isključujućih kriterija i pristanka za sudjelovanje u istraživanju bolesnik je uključen u istraživanje.

Temeljem kriterija za uvođenje terapije liječnik je propisao početnu terapiju levotiroksinom ukoliko je bilo potrebna ili je samo preporučio kontrolu nakon određenog perioda te su na taj način formirane dvije skupine ispitanika (**Slika 7.**):

1. bolesnici sa SH ($TSH \leq 10,0$ mIU/L) kojima terapija levotiroksinom nije propisana i
2. bolesnici sa SH ($TSH \leq 10,0$ mIU/L) kojima je terapija levotiroksinom propisana.

Prvo mjerenje ispitivanih parametara (TSH, FT4, FT3, TPOAt, TGAt, ADMA, endokan, ET-1, hs-CRP, triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL kolesterola, ne-HDL kolesterola, LDL kolesterola, leukocita, trombocita i MPV) za potrebe istraživanja provedeno je u trenutku kada su bolesnici sa SH iz obje grupe uključeni u istraživanje. Tada su izmjereni i antropometrijski podaci (visina i težina) za potrebe izračuna indeksa tjelesne mase (ITM).

Drugo mjerenje ispitivanih parametara (TSH, FT4, FT3, ADMA, ET-1, endokana, hs-CRP, triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL kolesterola, ne-HDL kolesterola, LDL kolesterola, leukocita, trombocita i MPV) u bolesnika sa SH ($TSH \leq 10,0$ mIU/L) kojima nije propisana terapija levotiroksinom provedeno je nakon šest mjeseci od prvog mjerenja kada su uključeni u istraživanje.

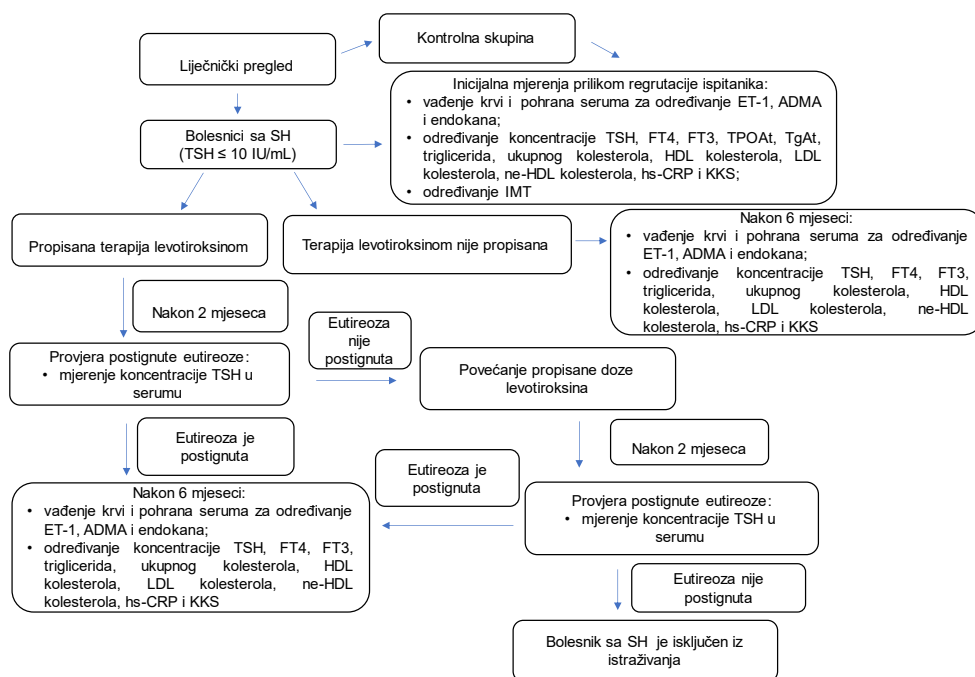
Sljedeće mjerenje serumske koncentracije TSH u bolesnika sa SH ($TSH \leq 10,0$ mIU/L) kojima je bila propisana terapija levotiroksinom bilo je obavljeno prema uobičajenom liječničkom protokolu, dva mjeseca nakon uvođenja terapije:

- Ukoliko je serumska koncentracija TSH bila u referentnom intervalu, odnosno ukoliko je postignuta eutireoza te je liječnik procjenio da je vrijednost zadovoljavajuća, terapija je ostala ista te je šest mjeseci nakon od uspostavljanja eutireoze provedeno drugo mjerenje serumske koncentracije ispitivanih parametara (TSH, FT4, FT3, ADMA, ET-1, endokana, hs-CRP, triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL kolesterola, ne-HDL kolesterola, LDL kolesterola, leukocita, trombocita i MPV).

U ovom je istraživanju eutireoza bila definirana kao stanje u kojem je serumska koncentracija TSH bila od 0,27 do 4,20 mIU/L, što odgovara referentnom rasponu definiranom prema metodi i proizvođaču reagensa. Za bolesnike s propisanom nadomjesnom terapijom levotiroksinom, liječenje je uglavnom započinjalo s 25 µg levotiroksina po danu.

- Ukoliko serumska koncentracija TSH nije bila unutar referentnog intervala, liječnik je propisao povećanje terapije te je serumska koncentracija TSH opet izmjerena dva mjeseca nakon korigiranja terapije. Ukoliko je tada serumska koncentracija TSH bila unutar referentnog raspona te je liječnik procijenio da je vrijednost zadovoljavajuća, terapija je ostala ista te je nakon šest mjeseci od uspostavljanja eutireoze provedeno drugo mjerenje ispitivanih parametara (TSH, FT4, FT3, ADMA, ET-1, endokana, hs-CRP, triglicerida, ukupnog kolesterola, HDL kolesterola, LDL kolesterola, leukocita, trombocita i MPV). Ukoliko i nakon korigiranja terapije stanje eutireoze nije bilo uspostavljeno, bolesnik je bio isključen iz istraživanja.

Kontrolnu su skupinu činili zdravi ispitanici koji su regrutirani na sistematskom pregledu u Specijalnoj bolnici Agrama, a također su zadovoljavali propisane isključujuće kriterije uz dodatni kriterij izostanka dijagnoze poremećaja rada štitnjače.



Slika 7. Grafički prikaz ustroja istraživanja. SH - supklinička hipotireoza. ITM - indeks tjelesne mase. TSH - tireotropin. FT4 - slobodni tiroksin. FT3 - slobodni trijodtironin. TGAt - protutijela na tireoglobulin. TPOAt - protutijela na tireoidnu peroksidazu. ADMA - asimetrični dimetilarginin. ET-1 - endotelin-1. LDL - lipoprotein niske gustoće. HDL - lipoprotein visoke gustoće. hs-CRP - visoko osjetljivi C-reaktivni protein. KKS - kompletna krvna slika.

3.3. Uzorci

Vađenje krvi provedeno je u sjedećem položaju od strane stručnog laboratorijskog osoblja prema Nacionalnim preporukama za uzorkovanje venske krvi, Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu (147). Uzorkovanje krvi provodilo se ujutro, između 7 i 9 sati, nakon 12-satnog posta. Uzorci krvi uzeti su iz površinske antekubitalne vene pomoću ravne igle (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria), izravno u vakuum epruvete s K₂EDTA kao antikoagulansom (1 x 3 mL; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) i serumske vakuum epruvete s aktivatorom zgrušavanja (1 x 9 mL; Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). Uzorci su seruma potom centrifugirani 10 minuta pri 1370g korištenjem Eppendorf Centrifuge 5702 (Merrck KGaA Darmstadt, Germany). Nakon odvajanja od taloga, serum je podijeljen u više alikvota: 3 alikvota (po 200 µL) odmah je pohranjeno na -80 °C za kasnije analize (ET-1, ADMA i endokana), a iz preostalog alikvota su odmah napravljene ostale biokemijske analize (TSH, FT4, FT3, TPOAt, TGAt, hs-CRP, trigliceridi, ukupni kolesterol, HDL kolesterol, ne-HDL kolestreol, LDL kolesterol). Leukociti, trombociti i MPV su također određeni odmah po vađenju krvi u epruvetu s K₂EDTA.

3.4. Metode

3.4.1. Materijali

U radu su korišteni sljedeći materijali:

Komercijalni reagensi i kompleti („kitovi“)

- Elecsys TSH (Roche Diagnostics, Švicarska)
- Elecsys FT4 IV (Roche Diagnostics, Švicarska)
- Elecsys FT3 III (Roche Diagnostics, Švicarska)
- Elecsys Anti-Tg (Roche Diagnostics, Švicarska)
- Elecsys Anti-TPO (Roche Diagnostics, Švicarska)
- Trygliceride (Beckman Coulter, SAD)
- Total Cholesterol (Beckman Coulter, SAD)
- LDL Cholesterol (Beckman Coulter, SAD)
- HDL Cholesterol (Beckman Coulter, SAD)
- CRP Latex (Beckman Coulter, SAD)
- Endothelin-1 ELISA kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA), for research use only
- ADMA ELISA kit (Elabscience, Houston, USA), for research use only
- Endocan ELISA kit (Abcam, Cambridge, United Kingdom), for research use only

3.4.2. Metode određivanja serumskih koncentracija hormona i protutijela za utvrđivanje statusa štitnjače

3.4.2.1. Određivanje serumske koncentracije tireotropina (TSH)

Koncentracija TSH-a određena je elektrokemiluminiscencijskom metodom sa sendvič principom na automatskom analizatoru Roche cobas e601 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka), prema specifikacijama proizvođača. U prvoj inkubaciji, nastaje kompleks TSH iz uzorka s monoklonskim anti-TSH protutijelima obilježenim biotinom i monoklonskim anti-TSH protutijelima obilježenim rutenijevim kompleksom. U drugoj inkubaciji kompleks se veže na čvrstu fazu preko biotina koji se veže za paramagnetske čestice obložene streptavidinom, a nevezana se protutijela ispiru. Primjenom napona inducira se kemiluminiscentna emisija koju mjeri fotomultiplikator. Emisija fotona proporcionalna je koncentraciji TSH u uzorku, a rezultat se određuje pomoću kalibracijske krivulje u dvije točke. Metoda je sljedeća prema drugom referentnom standardu (engl. *international reference preparation*, IRP) za TSH 80/558 kojeg je odobrila Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO). Granica detekcije metode iznosila je 0,005 mIU/L.

3.4.2.2. Određivanje serumske koncentracije slobodnog tiroksina (FT4)

Koncentracija FT4 određena je elektrokemiluminiscencijskom metodom temeljenoj na načelu kompeticije, na automatskom analizatoru Roche cobas e601 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka), prema specifikacijama proizvođača. U prvoj inkubaciji odvija se reakcija kompeticije između analita iz uzorka i derivata analita obilježenog rutenijevim kompleksom za vezanje na protutijela naspram FT4 obilježenih biotinom. U drugoj inkubaciji kompleks se preko biotina veže za paramagnetske čestice obložene streptavidinom. Primjenom napona na površini elektrode odvija se kemiluminiscencijska reakcija između rutenijevog kompleksa i tripropilamina. Emisija fotona obrnuto je proporcionalna koncentraciji FT4 u uzorku. Metoda je sljediva do metode "Enzymun Test FT4" koja koristi ravnotežnu dijalizu kao tehniku za postizanje standardizacije. Granica detekcije metode iznosila je 0,5 pmol/L.

3.4.2.3. Određivanje serumske koncentracije slobodnog trijodtironina (FT3)

Koncentracija FT3 određena je elektrokemiluminiscencijskom metodom temeljenom na načelu kompeticije na automatskom analizatoru Roche cobas e601 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka), prema specifikacijama proizvođača. U prvoj inkubaciji odvija se reakcija kompeticije između analita iz uzorka i derivata analita obilježenog rutenijevim kompleksom za vezanje na protutijela naspram FT3 obilježenih biotinom. U drugoj inkubaciji kompleks se preko biotina veže za paramagnetske čestice obložene streptavidinom. Primjenom napona na površini elektrode odvija se kemiluminiscencijska reakcija između rutenijevog kompleksa i tripropilamina. Emisija fotona obrnuto je proporcionalna koncentraciji FT3 u uzorku. Jačina emitirane svjetlosti indirektno je proporcionalna koncentraciji FT3 u uzorku. Metoda je sljediva do Elecsys FT3 testa (REF 11731386122) koja koristi ravnotežnu dijalizu kao tehniku za postizanje standardizacije. Granica detekcije metode iznosila je 0,6 pmol/L.

3.4.2.4. Određivanje serumske koncentracije protutijela na tireoidnu peroksidazu (TPOAt)

Serumska koncentracija TPOAt određena je elektrokemiluminiscencijskom metodom temeljenom na načelu kompeticije na automatskom analizatoru Roche cobas e601 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka), prema specifikacijama proizvođača. U postupku za određivanje TPOAt korišten je rekombinantni antigen (TPO) i reagens (poliklonsko anti-TPO protutijelo obilježeno rutenijevim kompleksom).

Uzorak seruma je inkubiran s anti-TPO protutijelima obilježenim rutenijevim kompleksom, nakon toga uslijedila je inkubacija s antigenom (TPO) obilježenim biotinom te mikročesticama obilježenima streptavidinom. Pri tome su se TPOAt iz uzorka natjecala s reagensom (anti-TPO protutijelima obilježenima rutenijevim kompleksom) za vezanje na TPO obilježen biotinom. Kompleksi su ostali vezani na čvrstu fazu reakcijom mikročestica obilježenih streptavidinom i biotina iz kompleksa. Reakcijska smjesa aspirira se u mjerne posudice gdje se magnetske mikročestice vežu na površinu elektrode i pod naponom potiču emisiju kemiluminiscencije koju mjeri fotomultiplikator. Jačina emitirane svjetlosti obrnuto je proporcionalna koncentraciji TPOAt u uzorku. Metoda je standardizirana prema NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Control*) 66/387 standardu. Donja granica detekcije metode iznosila je 5 IU/mL.

3.4.2.5. Određivanje serumske koncentracije protutijela na tireoglobulin (TGAt)

Serumska koncentracija TGAt određena je elektrokemiluminiscencijskom metodom temeljenom na načelu kompeticije na automatskom analizatoru Roche cobas e601 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Njemačka), prema specifikacijama proizvođača. U postupku za određivanje TGAt kao antigen korišten je humani TG obilježen biotinom i monoklonsko protutijelo naspram TG obilježeno rutenijevim kompleksom.

U prvoj inkubaciji odvija se reakcija kompeticije između analita iz uzorka i protutijela naspram TG obilježenih rutenijevim kompleksom prema derivatu antigena obilježenog biotinom. U drugoj inkubaciji kompleks se preko biotina veže za paramagnetske čestice obložene streptavidinom i tako ostaju vezani na čvrstu fazu. Reakcijska smjesa aspirira se u mjerne posudice gdje se magnetske mikročestice vežu na površinu elektrode i pod naponom potiču emisiju kemiluminiscencije koju mjeri fotomultiplikator. Jačina emitirane svjetlosti obrnuto je proporcionalna koncentraciji TGAt u uzorku. Metoda je standardizirana prema NIBSC (*National Institute for Biological Standards and Control*) 65/ 93 standardu. Donja granica detekcije metode iznosila je 10 IU/mL.

3.4.3. Određivanje serumske koncentracije visoko osjetljivog C-reaktivnog proteina (hs-CRP)

Serumska koncentracija hs-CRP-a određena je imunoturbidimetrijskom metodom korištenjem CRP Latex reagensa postavljenog na automatskom analizatoru AU480 plus (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD), prema specifikacijama proizvođača. Metoda se zasniva na specifičnoj imunokemijskoj reakciji antigena CRP-a iz uzorka i čestica lateksa obloženih zečjim anti-CRP protutijelima kojom nastaju netopivi agregati. Jačina apsorpcije stvorenih agregata

proporcionalna je koncentraciji CRP-a u uzorku. Vrijednosti CRP Latex visokoosjetljivog kalibratora sljedive su prema IFCC (engl. *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*) standardu CRM470. Granica detekcije metode iznosila je 0,02 mg/L.

3.4.4. Određivanje parametara kompletne krvne slike

Od parametara kompletne krvi slike obrađivani su izmjereni podaci za broj leukocita, trombocita i MPV. Navedeni parametri izmjereni su metodom električne impedancije na hematološkom brojaču DxH 800 autoanalyzer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Načelo impedancije ili promjene otpora na hematološkim brojačima temelji se na mjerenju promjena u električnom otporu koje nastaju prolaskom stanica suspendiranih u elektrolitskoj otopini. Kako stanice prolaze kroz otvor cijevi, mijenja se električni otpor između dviju elektroda ili impedancija, što uzrokuje pojavu mjerljivih promjena napona. Broj nastalih promjena razmjernan je broju stanica. Veličina promjene napona izravno je razmjerna volumenu stanica čime je omogućeno razlikovanje i brojanje stanica određene veličine.

3.4.5. Određivanje statusa lipidograma

3.4.5.1. Određivanje serumske koncentracije triglicerida

Koncentracija triglicerida određena je enzimskom metodom na automatskom analizatoru AU480 plus (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD), prema specifikacijama proizvođača. Trigliceridi iz uzorka hidroliziraju se kombinacijom mikrobnih lipaza na glicerol i masne kiseline. Glicerol se fosforilira adenzin trifosfatom u prisutnosti glicerol kinaze i stvara glicerol-3-fosfat, koji se potom oksidira molekulom kisika uz glicerol-fosfat oksidazu te se stvara H_2O_2 i dihidroksiacetone fosfat. Stvoreni H_2O_2 reagira s 4-aminofenazonom i N,N-bis(4-sulfobutil)-3,5-dimetilanilin dinatrijevim solju u prisutnosti peroksidaze i stvara kromofor, čija se apsorbanacija očitava pri valnoj duljini od 660/800 nm. Porast apsorbanacije pri valnoj duljini od 660/800 nm proporcionalan je koncentraciji triglicerida u uzorku. Vrijednost kalibratora triglicerida sljediva je prema referentnoj metodi *Isotope Dilution Mass Spectrometry* (IDMS).

3.4.5.2. Određivanje serumske koncentracije ukupnog kolesterola

Koncentracija ukupnog kolesterola određena je enzimskom metodom na automatskom analizatoru AU480 plus (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD), prema specifikacijama proizvođača. U ovoj metodi (CHO-PAP sustav) kolesterol esteraza hidrolizira estere kolesterola u uzorku. Potom, kolesterol oksidaza oksidira stvoreni slobodni kolesterol u kolesterol-3-on uz istodobno stvaranje H_2O_2 , koji oksidira 4-aminoantipirin i fenol u prisutnosti peroksidaze pri

čemu nastaje crvena kinoniminska boja, čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 540/600 nm, a porast apsorbancije proporcionalan je koncentraciji ukupnog kolesterola u uzorku. Vrijednost kalibratora kolesterola sljediv je prema standardnom referentnom materijalu, 909b, razina 1 (*Isotope Dilution Mass Spectrometry*). Nacionalnog instituta za standarde i tehnologiju (engl. *National Institute of Standards and Technology*, NIST). Ova je metoda također potvrđena prema referentnoj metodi centara za kontrolu bolesti (*Centers of Disease Control Reference Method*).

3.4.5.3. Određivanje serumske koncentracije LDL kolesterola

Serumska koncentracija LDL kolesterola određena je izračunom prema Friedewaldovoj formuli ($y = x - z - \frac{w}{2}$) za uzorke s izmjerenom serumskom koncentracijom triglicerida $< 4,5$ mmol/L, pri čemu je

y = serumska koncentracija LDL kolesterola (mmol/L),

x = serumska koncentracija ukupnog kolesterola (mmol/L),

z = serumska koncentracija HDL kolesterola (mmol/L),

w = serumska koncentracija triglicerida (mmol/L);

ili enzimskom metodom na automatskom analizatoru AU480 plus (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD) prema specifikacijama proizvođača, ukoliko je serumska koncentracija triglicerida bila $\geq 4,5$ mmol/L. Reakciji prethodi dodavanje reagensa koji sadrži reagens koji štiti LDL od enzimskih reakcija. Svi ne-LDL lipoproteini se nakon toga razgrađuju reakcijom s kolesterol esterazom i kolesterol oksidazom. Vodikov peroksid, stvoren u ovoj reakciji, razgrađuje katalazu iz reagensa 1. Dodatkom reagensa 2, s LDL-a se otpušta zaštitni reagens, a natrijev azid deaktivira katalazu. LDL se tada kvantificira putem CHO-PAP sustava. Kalibrator je sljediv prema referentnoj metodi za LDL kolesterol američkog Centra za kontrolu bolesti (engl. *Center for Disease Control*, CDC).

3.4.5.4. Određivanje serumske koncentracije HDL kolesterola

Koncentracija HDL kolesterola određena je enzimskom metodom na automatskom analizatoru AU480 plus (Beckman Coulter, Brea, CA, SAD), prema specifikacijama proizvođača. Protutijela razvijena naspram ljudskih β -lipoproteina vežu lipoproteine koji nisu HDL (LDL, VLDL i hilomikroni) u komplekske. Nevezani HDL kolesterol razgrađuje se, uz kolesterol esterazu i kolesterol oksidazu, na kolest-4-en-3-on, masne kiseline i H_2O_2 . Nastali H_2O_2 reagira s 4-aminoantipirinom i etil-N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoksi-4-fluoranilinom uz

peroksidazu te nastaje plavo obojenje čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 600/700 nm. Porast apsorbancije je proporcionalan koncentraciji HDL kolesterola. Kalibrator je sljediv prema referentnoj metodi za HDL kolesterol američkog Centra za kontrolu bolesti (engl. *Center for Disease Control*, CDC).

3.4.5.5. Određivanje serumske koncentracije ne-HDL kolesterola

Koncentracija ne-HDL kolesterola određena je izračunom prema formuli $y = x - z$, pri čemu je

y = serumska koncentracija ne- HDL kolesterola (mmol/L),

x = serumska koncentracija ukupnog kolesterola (mmol/L),

z = serumska koncentracija HDL kolesterola (mmol/L).

3.4.6. Određivanje serumske koncentracije endotelnih biljega

3.4.6.1. Određivanje serumske koncentracije endokana

Serumska koncentracija endokana određena je metodom enzimimunoanalize (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) koja se temelji na sendvič principu sukladno uputama proizvođača (Abcam, Cambridge, United Kingdom). Jažice mikroploče obložene su monoklonskim protutijelima koja prepoznaju ljudski endokan. Endokan iz uzorka veže se na imobilizirana protutijela te se dodaje se poliklonsko protutijelo na endokan koje je obilježeno biotinom. Nakon ispiranja nevezanih suspcanci dodaje se kompleks avidin-biotin-peroksidaza (ABC kompleks) te se ponovno ispiru nevezani konjugati. Dodatkom supstrata za peroksidazu iz hrena (TMB i H_2O_2) razvija se obojenje. Nakon određenog perioda inkubacije dodaje se otopina za zaustavljanje reakcije (TMB stop otopina) te se mjeri intenzitet žutog obojenja pri valnoj duljini od 450 nm, koji je proporcionalan koncentraciji endokana u uzorku. Koncentracija endokana u ispitanim uzorcima izračunata je pomoću kalibracijske krivulje. Za izradu kalibracijske krivulje korištena su razrjeđenja standarda endokana koji je dio ELISA kita. Originalni standard od 1000 ng/mL korišten je za izradu još 6 uzastopnih razrjeđenja, stoga je kalibracijska krivulja sadržavala 8 kalibracijskih točaka (2000 ng/L, 1000 ng/L, 500 ng/L, 250 ng/L, 125 ng/L, 62,5 ng/L, 31,25 ng/L i 0 ng/L). Svako razrjeđenje testirano je u duplikatu te je kalibracijska krivulja izrađena nanošenjem koncentracije kalibratora na apscisu i srednjih vrijednosti apsorbancija za svaku koncentraciju kalibratora na ordinatu grafa. Koncentracija endokana u uzorcima ispitanika određena je u duplikatu. Granica detekcije (LOD) iznosila je

10,0 ng/L. Analitičke specifikacije metode prema proizvođaču su za preciznost u seriji koeficijent varijacije (CV) < 7,9 % i preciznost između serija CV < 8,8 %.

3.4.6.2. Određivanje serumske koncentracije ADMA

Serumska koncentracija ADMA određena je kompetitivnom ELISA metodom sukladno uputama proizvođača (Elabscience, Houston, USA). Jažice mikroploče obložene su s ADMA. Tijekom reakcije, ADMA iz uzorka natječe se s fiksnom količinom ADMA na nosaču čvrste faze za mjesta na anti-ADMA protutijelima koja su obilježena biotinom. Višak konjugata i nevezane komponente se isperu, a konjugat avidin-peroksidaza hrena (HRP) se dodaje u svaku jažicu mikropločice i inkubira. Zatim se u svaku jažicu doda otopina tetrametilbenzidin (TMB) supstrata. Reakcija se prekida dodatkom otopine za zaustavljanje te se mjeri apsorbancija pri valnoj duljini od 450 nm. Koncentracija ADMA u ispitanim uzorcima izračunata je pomoću kalibracijske krivulje. Za izradu kalibracijske krivulje korištena su razrjeđenja ADMA standarda koji je dio ELISA kita. Originalni standard od 1000 µg/L korišten je za izradu još 6 uzastopnih razrjeđenja, stoga je kalibracijska krivulja sadržavala 8 kalibracijskih točaka (1000 µg/L, 500 µg/L, 250 µg/L, 125 µg/L, 62,5 µg/L, 31,25 µg/L, 15,63 µg/L i 0 µg/L). Svako razrjeđenje testirano je u duplikatu te je kalibracijska krivulja izrađena nanošenjem koncentracije kalibratora na apscisu i srednjih vrijednosti apsorbancija za svaku koncentraciju kalibratora na ordinatu grafa. Koncentracija ADMA u uzorcima ispitanika određena je u duplikatu. Granica detekcije (LOD) iznosila je 9,38 µg/L. Analitičke specifikacije metode prema proizvođaču su za preciznost u seriji CV < 6,95 % i preciznost između serija CV < 6,73 %.

3.4.6.3. Određivanje serumske koncentracije ET-1

Serumska koncentracija ET-1 određena je ELISA metodom temeljenom na sendvič principu sukladno uputama proizvođača (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA). Jažice mikroploče obložene su monoklonskim protutijelima specifičnim za ET-1. Endotelin-1 iz uzorka seruma ili standarda se veže na imobilizirana protutijela. Nakon ispiranja nevezanih tvari, dodaje se monoklonsko protutijelo na ET-1 obilježeno enzimom. Nakon novog ispiranja svih nevezanih komponenti dodaje se supstrat pri čemu se razvija boja. Reakcija se prekida dodatkom otopine za zaustavljanje (sumporna kiselina) i mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 450 nm s dodatnom korekcijom na valnoj duljini od 540 ili 570 nm. Intenzitet obojenja je proporcionalan koncentraciji ET-1 u uzorku, a koncentracija ET-1 u ispitanim uzorcima izračunata je pomoću

kalibracijske krivulje. Za izradu kalibracijske krivulje korištena su razrjeđenja ET-1 standarda koji je dio ELISA kita. Originalni standard od 250 ng/L korišten je za izradu 7 uzastopnih razrjeđenja, stoga je kalibracijska krivulja sadržavala 8 kalibracijskih točaka u duplikatu (25 ng/L, 12,5 ng/L, 6,25 ng/L, 3,13 ng/L, 1,56 ng/L, 0,78 ng/L, 0,39 ng/L i 0 ng/L). Kalibracijska krivulja izrađena je nanošenjem koncentracije kalibratora na apscisu i srednjih vrijednosti apsorbanacija za svaku koncentraciju kalibratora na ordinatu grafa. Koncentracija ET-1 u uzorcima ispitanika određena je u duplikatu. Srednja vrijednost donje granice detekcije (LOD) iznosila je 0,087 ng /L (u rasponu od 0,031- 0,207 ng/L). Analitičke specifikacije metode prema proizvođaču su za preciznost u seriji CV < 4,0 % i preciznost između serija CV < 7,6 %.

3.4.7. Određivanje indeksa tjelesne mase

Indeks tjelesne mase (ITM) ispitanika određen je iz izmjerenih vrijednosti težine i visine bolesnika i kontrolnih ispitanika, prema formuli $y = \frac{x}{z^2}$, pri čemu je

y = ITM (kg/ m²),

x = tjelesna težina ispitanika (kg),

z = tjelesna visina ispitanika (m).

3.5. Statistička analiza

Statistička analiza podataka provedena je pomoću statističkog softvera MedCalc ver. 20.013. (MedCalc Software Lcd., Ostend, Belgija).

Kolmogorov-Smirnovljev test korišten je za testiranje normalnosti distribucije. Ovisno o raspodjeli podataka, podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija ili medijan i interkvartilni raspon. Dob ispitanika je prikazana kao medijan i raspon (minimum - maksimum). Kod normalne raspodjele podataka, statistički značajna razlika između mjerenja procijenjena je pomoću t-testa za nezavisne podatke i pomoću parnog t-testa za zavisne podatke. Kod nenormalne raspodjele podataka, statistički značajne razlike procijenjene su pomoću Mann-Whitneyjevog testa za nezavisne podatke te Wilcoxonovog signed-rank testa za zavisne podatke. U slučaju nejasnih rezultata dobivenih Wilcoxonovim signed-rank testom za zavisna mjerenja, rezultati su dopunjeni Hodges-Lehmannovom analizom medijana razlike.

Moguća povezanost varijabli ispitana je Spearmanovom korelacijom. Koeficijent korelacije (r) tumačen je na razini $P < 0,05$, a jačina povezanosti interpretirana je sukladno Coltonovim kriterijima (148) prikazanima u **Tablici 1**.

Tablica 1. Interpretacija koeficijenta korelacije prema Coltonovim kriterijima

Interpretacija	r
Nema povezanosti	0 – 0,25
Slaba povezanost	0,26 – 0,50
Umjerena do dobra povezanost	0,51 – 0,75
Vrlo dobra do izvrsna povezanost	0,76 – 1,00

U svim analizama vrijednosti $P < 0,05$ smatrane su statistički značajnima.

4. REZULTATI

4.1. Usporedba vrijednosti odabranih parametara dobivenih za kontrolnu skupinu zdravih ispitanika i skupinu bolesnika s blažim oblikom SH

U ovo prospektivno istraživanje bilo je uključeno ukupno 30 zdravih ispitanika i 61 bolesnik s dijagnozom blažeg oblika SH ($TSH \leq 10$ mIU/L).

Demografske karakteristike (dob i spol) i rezultati laboratorijskih pretraga u ove dvije skupine ispitanika prikazani su u **Tablici 2**. Nije bilo statistički značajnih razlika u dobi ispitanika, kao niti statistički značajne razlike po spolu. Bolesnici s blažim oblikom SH su imali statistički viši ITM nego kontrolni ispitanici.

Serumska koncentracija TSH bila je statistički značajno viša, a koncentracija FT4 niža u bolesnika sa SH u odnosu na zdrave ispitanike, dok FT3 nije pokazao značajnu razliku između bolesnika i kontrolne skupine. Protutijela na tireoglobulin i TPOAt bila su prisutna u 25 bolesnika sa SH, dok su TPOAt bila pozitivna u 31 bolesnika, a TGAt u 29 bolesnika. Prema metodi i proizvođaču reagensa granične vrijednosti koje upućuju na prisutnost autoimunog poremećaja štitnjače za TPOAt i TGAt su 34 kIU/L odnosno 115 kIU/L, što se smatra pozitivnim rezultatom za antitijela. Serumske koncentracije TGAt i TPOAt su bile značajno više u bolesnika s blažim oblikom SH u usporedbi sa zdravim ispitanicima.

Analizom lipidnog statusa, nije bilo statistički značajne razlike u koncentracijama triglicerida, ukupnog i HDL kolesterola između bolesnika sa SH i kontrolne skupine, no koncentracija LDL kolesterola i ne-HDL kolesterola je bila statistički značajno viša u skupini bolesnika sa SH. Vrijednosti za leukocite, trombocite i MPV nisu pokazale statistički značajnu razliku između bolesnika sa SH i zdravih ispitanika.

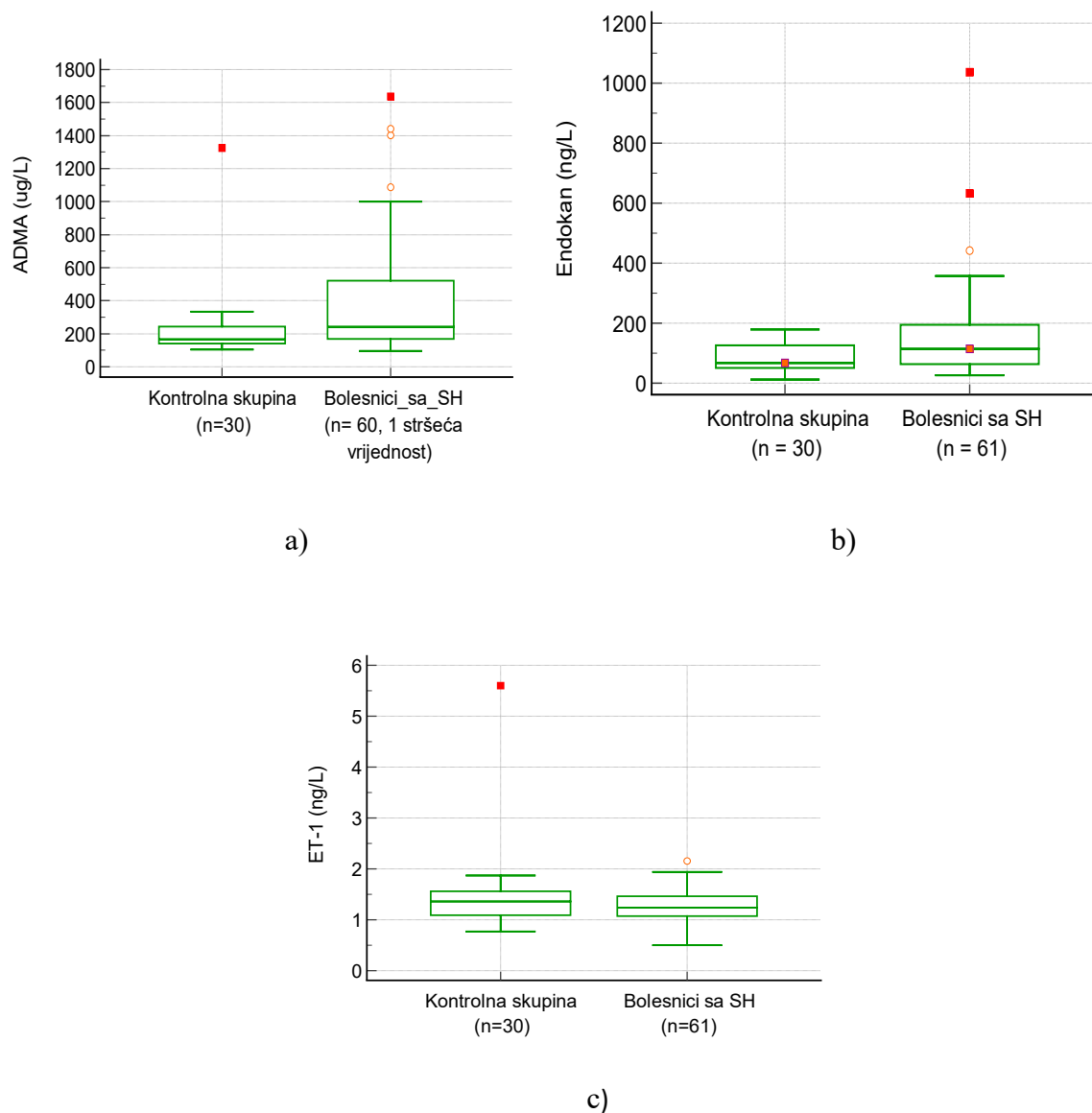
Tablica 2. Demografske karakteristike i rezultati laboratorijskih pretraga kontrolnih ispitanika i bolesnika s blažim oblikom SH

Parametar (jedinica)	Kontrolna skupina (n = 30)	SH bolesnici (n = 61)	P vrijednost
dob (godine)	43 (24 - 62)	46 (25 - 67)	0,161
spol (Ž/M)	23/7	48/13	0,828
ITM (kg/m ²)	23,9 ± 2,9	25,5 ± 3,9	0,046
TSH (mIU/L)	1,81 ± 0,82	7,19 ± 1,36	< 0,001*
FT4 (pmol/L)	15,0 (14,0 – 16,0)	14,0 (13,0 – 15,0)	0,014*
FT3 (pmol/L)	5,12 ± 0,53	5,11 ± 0,59	0,947
TGAt (kIU/L)	14,7 (14,2 – 15,2)	72,1 (15,7 – 209,4)	0,002*
TPOAt (kIU/L)	5,9 (5,0 – 7,9)	40,0 (7,3 – 131,2)	0,001*
trigliceridi (mmol/L)	0,9 (0,7 – 1,3)	1,1 (0,8 – 1,5)	0,064
kolesterol (mmol/L)	5,5 ± 0,9	5,9 ± 1,1	0,059
LDL kolesterol (mmol/L)	3,3 ± 0,6	3,7 ± 0,9	0,043*
HDL kolesterol (mmol/L)	1,7 ± 0,4	1,7 ± 0,4	0,575
ne-HDL kolesterol (mmol/L)	3,8 ± 0,7	4,2 ± 1,0	0,020*
hs-CRP (mg/L)	0,9 (0,5 - 1,2)	1,1 (0,6 - 1,9)	0,057
leukociti (x 10 ⁹ /L)	5,5 (5,0 - 6,6)	6,2 (5,4 - 7,2)	0,132
trombociti (x 10 ⁹ /L)	263 ± 47	252 ± 45	0,285
MPV (fL)	8,5 (7,9 - 9,1)	8,3 (8,2 - 8,6)	0,726

*Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ili kao medijan (interkvartilni raspon). Dob je izražena kao medijan i raspon. * Statistički značajna razlika između vrijednosti bolesnika sa SH i vrijednosti dobivene za kontrolnu skupinu. SH - supklinička hipotireoza. ITM - indeks tjelesne mase. TSH - tireotropin. FT4 - slobodni tiroksin. FT3 - slobodni trijodtironin. TGAt - protutijela na tireoglobulin. TPOAt - protutijela tireoidnu peroksidazu. LDL - lipoprotein niske gustoće. HDL - lipoprotein visoke gustoće. hs-CRP - visoko osjetljivi C-reaktivni protein. MPV - srednji volumen trombocita.*

Rezultati određivanja biljega endotelne disfunkcije (**Slika 8.**) pokazali su da su serumske koncentracije ADMA (248,00 (168,78 - 540,20) µg/L vs. 166,30 (140,60 – 243,40) µg/L, P = 0,002) i endokana (114,30 (63,45 – 194,65) ng/L vs. 67,26 (50,80 – 126,10) ng/L, P = 0,004) statistički značajno više u skupini bolesnika s blažim oblikom SH u usporedbi s kontrolnom skupinom. Nasuprot tome, nije bilo razlike u serumskoj koncentraciji ET-1 (1,24 (1,07 – 1,46)

ng/L vs. 1,36 (1,09 – 1,56) ng/L, $P = 0,287$) između skupine bolesnika sa SH i kontrolne skupine.



Slika 8. Biljezi endotelne disfunkcije u serumu kontrolnih ispitanika ($n = 30$) i bolesnici s dijagnozom blažeg oblika SH ($n = 61$): a) ADMA; b) endokan; c) ET-1. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Bijele točke iznad ručica predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 1,5 puta, dok crveni kvadratići predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 3 puta. SH - supklinička hipotireoza. ADMA - asimetrični dimetilarginin. ET-1 - endotelin-1.

4.2. Učinak levotiroksina na serumsku koncentraciju biljega endotelne disfunkcije i serumsku koncentraciju odabranih biokemijskih parametara u bolesnika s blažim oblikom SH

Na temelju odluke kliničara, terapija levotiroksinom propisana je u 29 bolesnika s dijagnozom blažeg oblika SH. Ovim bolesnicima nakon šest mjeseci uzimanja levotiroksina i prethodno utvrđene eutireoze ponovno su određeni biljezi endotelne disfunkcije i odabrani biokemijski parametri (**Tablica 3.**).

U skupini bolesnika sa SH kojima je propisana terapija levotiroksinom, nakon utvrđene eutireoze i šest mjeseci korištenja lijeka levotiroksina nakon toga, koncentracija TSH je bila značajno niža, a koncentracija FT4 značajno viša u odnosu na inicijalno mjerenje, što je očekivano s obzirom da je svrha terapije levotiroksinom da se TSH koncentracija održava unutar referentnog raspona. Međutim, serumske koncentracije TSH u bolesnika sa SH nakon šest mjeseci korištenja lijeka levotiroksina su ipak bile značajno više u usporedbi sa zdravim ispitanicima ($3,64 \pm 1,70$ mIU/L vs. $1,81 \pm 0,82$ mIU/L, $P < 0,001$). Kod tri je bolesnika sa SH izmjerena koncentracija TSH čija je vrijednost bila iznad referentnog raspona nakon šest mjeseci nadomjesne terapije levotiroksinom, iako je nakon uvođenja terapije prvotno postignuta eutireoza. S druge strane, koncentracija FT4 u bolesnika sa SH koji su uzimali levotiroksin dosegla je koncentraciju koja se više nije razlikovala od zdravih ispitanika ($17,0$ ($14,8 - 17,3$) pmol/L vs. $15,0$ ($14,0 - 16,0$) pmol/L, $P = 0,130$).

Nakon šest mjeseci terapije levotiroksinom i prethodno utvrđene eutireoze, bolesnici sa SH nisu pokazali značajne promjene u serumskim koncentracijama triglicerida, LDL kolesterola i ne-HDL kolesterola, ali su pokazali statistički značajno smanjenje koncentracije ukupnog i HDL kolesterola. Nadalje, nije bilo razlika u koncentracijama hs-CRP-a, broju trombocita i MPV-u, ali je došlo do statistički značajnog smanjenja broja leukocita.

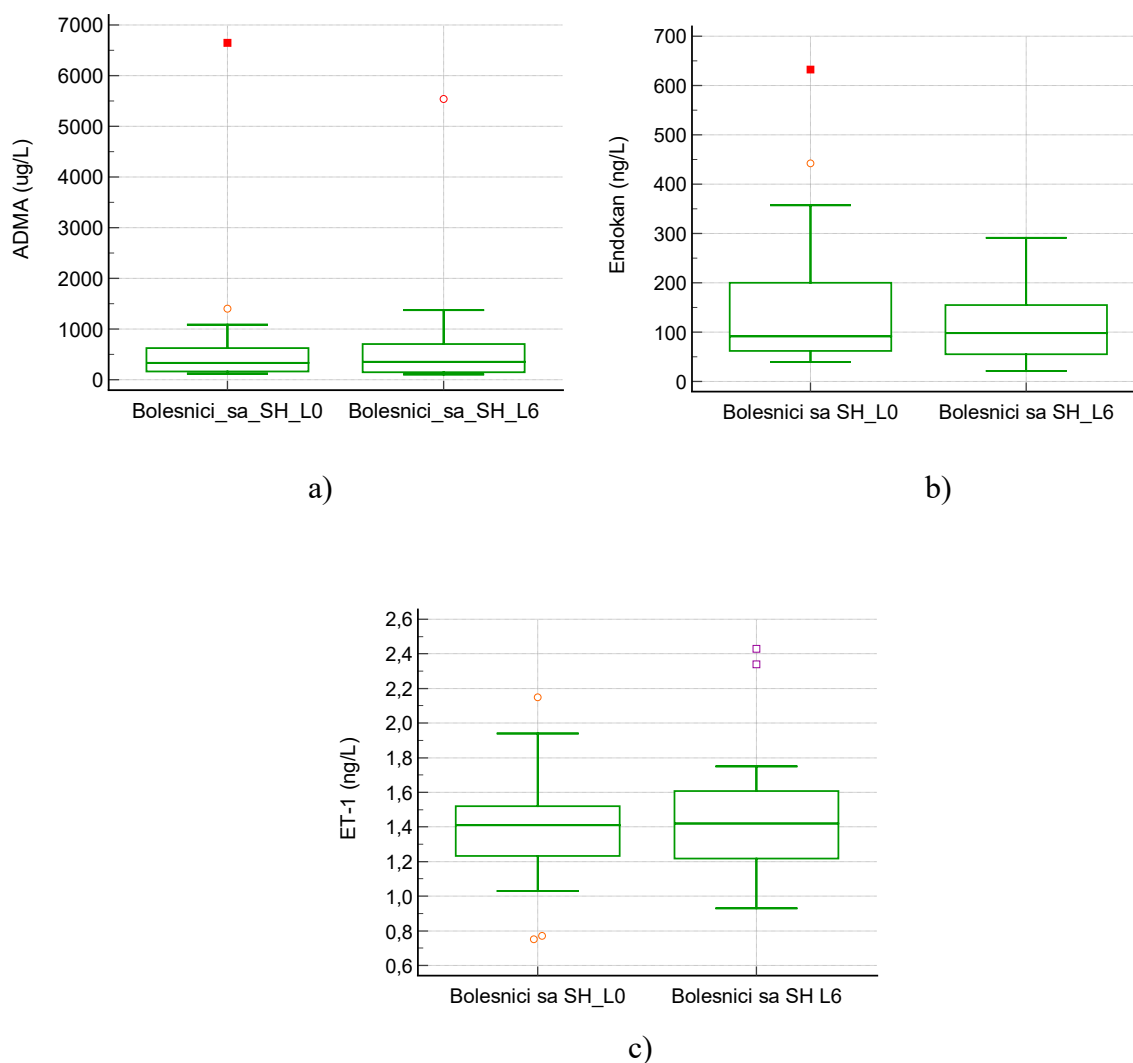
Tablica 3. Rezultati laboratorijskih pretraga bolesnika s dijagnozom blažeg oblika SH kojima je terapija levotiroksinom propisana, na početku ispitivanja (L0) i nakon šest mjeseci praćenja (L6) od uspostavljanja eutireoze

Parametar (jedinica)	Bolesnici sa SH – L0 (n = 29)	Bolesnici sa SH– L6 (n = 29)	P vrijednost
TSH (mIU/L)	7,60 ± 1,47	3,64 ± 1,70	< 0,001*
FT4 (pmol/L)	13,0 (12,8 – 14,3)	17,0 (14,8 – 17,3)	< 0,001*
FT3 (pmol/L)	5,09 ± 0,50	4,76 ± 0,437	0,001*
trigliceridi (mmol/L)	1,1 (0,8 – 1,5)	1,1 (0,9 – 1,4)	0,864
kolesterol (mmol/L)	6,2 ± 1,0	5,8 ± 1,0	0,039
LDL kolesterol (mmol/L)	3,9 ± 0,8	3,6 ± 0,8	0,107
HDL kolesterol	1,7 ± 0,4	1,6 ± 0,3	0,001*
ne-HDL kolesterol (mmol/L)	4,5 ± 1,0	4,2 ± 0,9	0,144
hs-CRP (mg/L)	1,3 (0,7 - 3,0)	1,3 (0,8 - 2,5)	0,873
leukociti (x 10 ⁹ /L)	6,1 (5,3 – 7,2)	5,5 (5,2 – 6,3)	0,049*
trombociti (x 10 ⁹ /L)	258 ± 47	267 ± 53	0,182
MPV (fL)	8,2 (7,6 – 9,1)	8,3 (7,6 – 9,7)	0,509

*Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ili kao medijan (interkvartilni raspon). * Statistički značajna razlika nakon uvođenja terapije levotiroksinom (L6) u odnosu na inicijalno mjerenje (L0). SH - supklinička hipotireoza. TSH - tireotropin. FT4 - slobodni tiroksin. FT3 - slobodni trijodtironin. LDL - lipoprotein niske gustoće. HDL - lipoprotein visoke gustoće. hs-CRP - visoko osjetljivi C-reaktivni protein. MPV - srednji volumen trombocita.*

Od biljega endotelne disfunkcije (**Slika 9.**), serumska koncentracija endokana u bolesnika sa SH koji su bili na terapiji levotiroksinom nakon šest mjeseci i postignute eutireoze bila je statistički značajno niža u odnosu na početnu vrijednost (91,47 (61,88 – 200,03) ng/L vs. 97,90 (55,18 – 154,88) ng/L, s Hodges-Lehmannovim medijanom razlika od -24,90 uz 95 %-tni interval pouzdanosti od -52,20 do -7,55 i P = 0,004). Nakon šest mjeseci izmjerena koncentracija endokana u bolesnika sa SH koji su bili na terapiji levotiroksinom nije se značajno razlikovala od kontrolne skupine (91,47 (61,88 – 200,03) ng/L vs. 67,26 (50,80 – 126,10) ng/L

P = 0,180). Nadalje, u bolesnika sa SH nakon šestomjesečne terapije levotiroksinom nisu nađene značajne promjene u serumskoj koncentraciji ADMA (332,60 (162,80 - 624,18) $\mu\text{g/L}$ vs. 353,20 (147,83 - 704,08) $\mu\text{g/L}$, P = 0,456) i ET-1 (1,41 (1,23 – 1,52) ng/L vs. 1,42 (1,22 – 1,61) ng/L, P = 0,681) u odnosu na početnu vrijednost.



Slika 9. Učinak terapije levotiroksinom na biljege endotelne disfunkcije u serumu bolesnika s dijagnozom blažeg oblika SH na početku ispitivanja (L0) i nakon šest mjeseci praćenja (L6) od uspostavljanja eutireoze: a) ADMA; b) endokan; c) ET-1. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Bijele točke iznad ručica predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 1,5 puta, dok crveni kvadratići predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 3 puta. SH - supklinička hipotireoza. ADMA - asimetrični dimetilarginin. ET-1 - endotelin-1.

4.3. Serumske koncentracije biljega endotelne disfunkcije i serumske koncentracije odabranih biokemijskih parametara u bolesnika s blažim oblikom SH kojima levotiroksin nije propisan

Na temelju odluke kliničara u 32 bolesnika s blažim oblikom SH nije bila propisana terapija levotiroksinom. Ovim bolesnicima su nakon šest mjeseci ponovno određeni biljezi endotelne disfunkcije i drugi biokemijski parametri što je prikazano u **Tablici 4.**

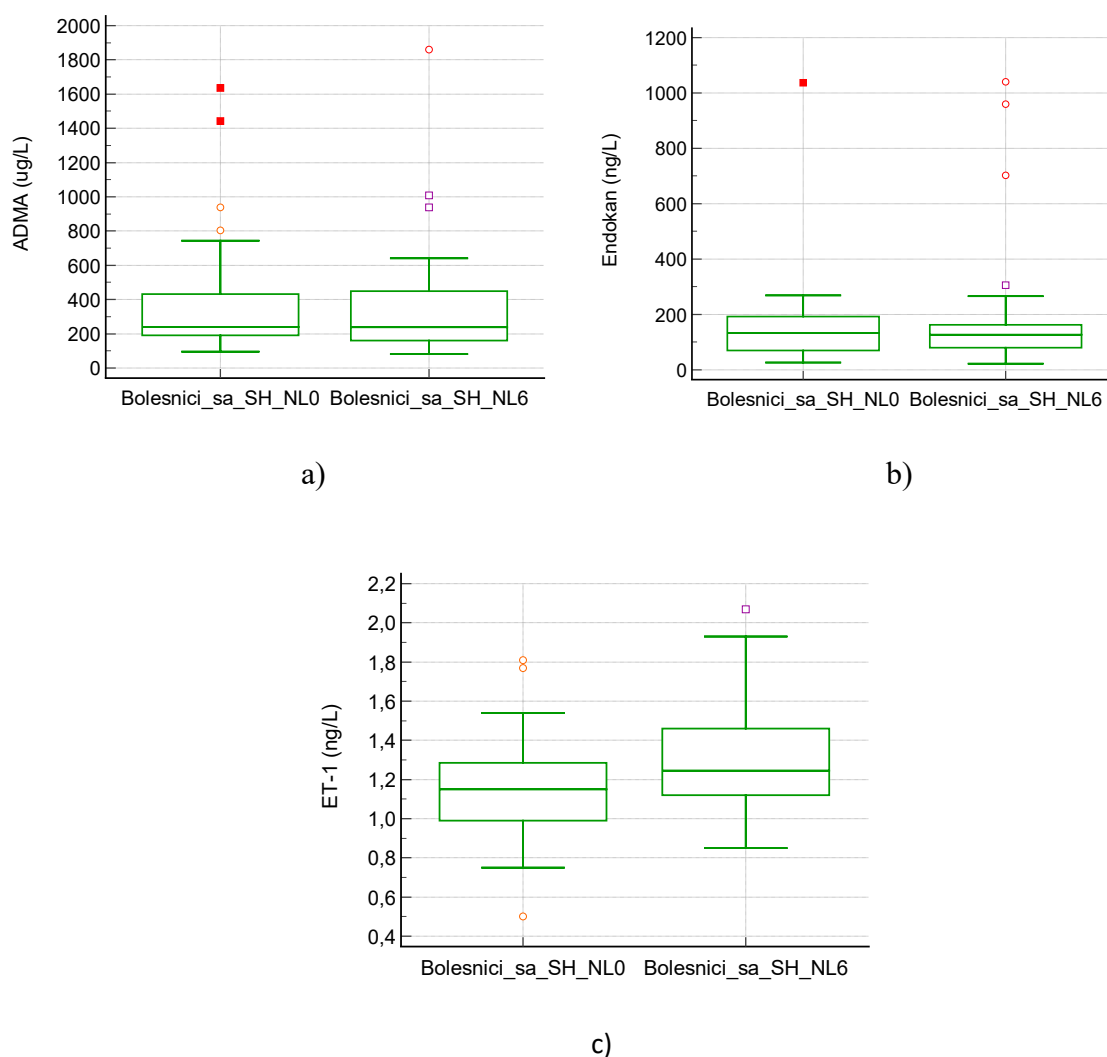
Bolesnici sa SH kojima terapija levotiroksinom nije propisana pokazali su značajno smanjenje koncentracije TSH nakon praćenja od šest mjeseci, no te koncentracije su i dalje bile izvan referentnog intervala i statistički značajno više od zdravih ispitanika ($P < 0,001$). Nije došlo do statistički značajnih promjena u koncentraciji FT4 tijekom šest mjeseci praćenja, dok je koncentracija FT3 pokazala statistički značajan pad. Nije došlo do značajnih promjena u parametrima dislipidemije (osim što se snizila koncentracija HDL kolesterola), hs-CRP-u, leukocitima, trombocitima i MPV-u.

Tablica 4. Rezultati laboratorijskih pretraga bolesnika s blažim oblikom SH kojima terapija levotiroksinom nije propisana na početku ispitivanja (NL0) i nakon šest mjeseci praćenja (NL6)

Parametar (jedinica)	SH bolesnici – NL0 (n = 32)	SH bolesnici – NL6 (n = 32)	P vrijednost
TSH (mIU/L)	6,81 ± 1,16	5,43 ± 2,16	0,002*
FT4 (pmol/L)	15,0 (13,7 - 17,0)	15,0 (13,0 - 16,0)	0,127
FT3 (pmol/L)	5,13 ± 0,66	4,87 ± 0,57	0,005
trigliceridi (mmol/L)	1,0 (0,8 - 1,5)	0,9 (0,7 - 1,1)	0,068
kolesterol (mmol/L)	5,7 ± 1,1	5,5 ± 0,9	0,102
LDL kolesterol (mmol/L)	3,4 ± 0,9	3,5 ± 0,7	0,635
HDL kolesterol	1,7 ± 0,4	1,5 ± 0,3	< 0,001*
ne-HDL kolesterol (mmol/L)	4,0 ± 1,03	3,9 ± 0,81	0,815
hs-CRP (mg/L)	0,9 (0,6 - 1,5)	1,0 (0,7 - 1,5)	0,652
leukociti (x 10 ⁹ /L)	6,2 (5,5 - 7,3)	5,9 (5,0 - 7,3)	0,104
trombociti (x 10 ⁹ /L)	248 ± 43	243 ± 45	0,265
MPV (fL)	8,3 (8,0 – 9,0)	8,3 (7,9 – 9,0)	0,601

*Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ili kao medijan (interkvartilni raspon). * Statistički značajna razlika nakon šest mjeseci (NL6) u odnosu na inicijalno mjerenje (NL0). SH - supklinička hipotireoza. TSH - tireotropin. FT4 - slobodni tiroksin. FT3 - slobodni trijodtironin. LDL - lipoprotein niske gustoće. HDL - lipoprotein visoke gustoće. hs-CRP - visoko osjetljivi C-reaktivni protein. MPV - srednji volumen trombocita.*

Među biljezima endotelne disfunkcije (**Slika 10.**) nakon šest mjeseci praćenja, u bolesnika sa SH koji nisu uzimali levotiroksin došlo je do statistički značajnog porasta serumske koncentracije ET-1 (1,15 (0,99 – 1,29) ng/L vs. 1,25 (1,12 – 1,46) ng/L, $P = 0,003$), dok promjene u serumskoj koncentraciji ADMA (239,80 (190,95 – 431,90) $\mu\text{g/L}$ vs. 238,40 (160,45 – 449,05) $\mu\text{g/L}$, $P = 0,411$) i endokana (133,70 (70,01 – 192,60) ng/L vs. 126,95 (80,10 – 162,70) ng/L, $P = 0,970$) nisu utvrđene.



Slika 10. Biljezi endotelne disfunkcije u serumu bolesnika s blažim oblikom SH kojima terapija levotiroksinom nije propisana, na početku ispitivanja (NL0) i nakon šest mjeseci praćenja (NL6): a) ADMA; b) endokan, c) ET-1. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Bijele točke iznad ručica predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 1,5 puta, dok crveni kvadratići predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 3 puta. SH - supklinička hipotireoza. ADMA - asimetrični dimetilarginin. ET-1 - endotelin-1.

4.4. Usporedba serumskih koncentracija biljega endotelne disfunkcije i serumskih koncentracija odabranih biokemijskih parametara u bolesnika s blažim oblikom SH kojima terapija levotiroksinom nije propisana i kojima je terapija levotiroksinom propisana

Usporedba rezultata laboratorijskih pretraga na početku istraživanja u bolesnika s blažim oblikom SH kojima terapija levotiroksinom nije propisana i kojima je propisana terapija levotiroksinom prikazana je u **Tablici 5**.

Bolesnici sa SH kojima je terapija levotiroksinom propisana inicijalno su imali statistički značajno više serumske koncentracije TSH i TPOAt te nižu serumsku koncentraciju FT4 u odnosu na bolesnike sa SH kojima terapija nije propisana. Bolesnici kojima je levotiroksin uveden imali su također značajno više vrijednosti LDL kolesterola i ne-HDL kolesterola, dok nije bilo značajne razlike u trigliceridima, ukupnom i HDL kolesterolu, hs-CRP-u i hematološkim parametrima.

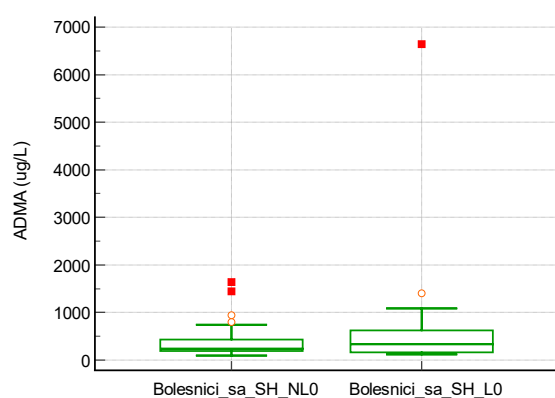
Tablica 5. Rezultati laboratorijskih pretraga bolesnika s blažim oblikom SH kojima terapija levotiroksinom nije propisana (NL0) i kojima je propisana terapija levotiroksinom (L0) na početku istraživanja

Parametar (jedinica)	SH bolesnici - NL0 (n = 32)	SH bolesnici - L0 (n = 29)	P vrijednost
TSH (mIU/L)	6,81 ± 1,16	7,60 ± 1,47	0,022*
FT4 (pmol/L)	15,0 (13,0 – 17,0)	13,0 (12,75 – 14,25)	0,010*
FT3 (pmol/L)	5,13 ± 0,66	5,09 ± 0,50	0,750
TGAt (kIU/L)	23,95 (13,45 – 372,40)	176,30 (13,73 – 406,50)	0,767
TPOAt (kIU/L)	6,85 (5,0– 132,5)	129,4 (8,6 – 344,6)	0,020*
trigliceridi (mmol/L)	1,0 (0,8 – 1,50)	1,1(0,8 – 1,5)	0,528
kolesterol (mmol/L)	5,7 ± 1,1	6,2 ± 1,0	0,528
LDL kolesterol (mmol/L)	3,4 ± 0,9	3,9 ± 0,8	0,034*
HDL kolesterol (mmol/L)	1,7 ± 0,4	1,7 ± 0,4	0,538
ne-HDL kolesterol (mmol/L)	3,9 ± 1,0	4,5± 1,0	0,044*
ITM (kg/m2)	25,1 ± 3,8	25,9 ± 4,0	0,479
hs-CRP (mg/L)	0,9 (0,6 - 1,5)	1,3 (0,7 – 3,0)	0,148
leukociti (x 10 ⁹ /L)	6,2 (5,5 – 7,3)	6,1 (5,3 - 7,2)	0,948
trombociti (x 10 ⁹ /L)	248 ± 43	258 ± 47	0,397
MPV (fL)	8,3 (8,0 – 9,0)	8,2 (7,6 – 9,1)	0,696

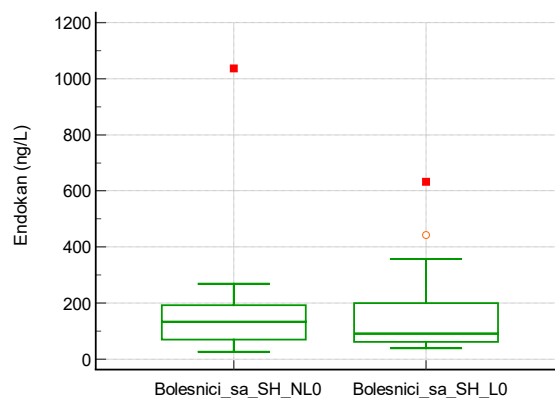
*Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija ili kao medijan (interkvartilni raspon). * Statistički značajna razlika u inicijalnom mjerenju između bolesnika sa SH kojima nije propisana terapija levotiroksinom (NL0) u odnosu na one kojima je propisana terapija (L0). SH - supklinička hipotireoza. TSH - tireotropin. FT4 - slobodni tiroksin. FT3 - slobodni trijodtironin. LDL - lipoprotein niske gustoće. HDL - lipoprotein visoke gustoće. ITM- indeks tjelesne mase. hs-CRP - visoko osjetljivi C-reaktivni protein. MPV - srednji volumen trombocita.*

Među biljezima endotelne disfunkcije (**Slika 11.**), bolesnici sa SH kojima je propisana terapija su na početku istraživanja pokazali statistički značajno više serumske koncentracije ET-1 u odnosu na bolesnike kojima terapija levotiroksinom nije propisana (1,41 (1,23- 1,52) vs. 1,15 (0,99 – 1,29) ng/L, P = 0,002), dok nije bilo značajnih razlika u serumskim koncentracijama ADMA (332,60 (162,80 – 624,18) µg/L vs. 239,80 (190,95 – 431,90) µg/L, P = 0,603) i endokana (91,47 (61,88-200,03) ng/L vs. 133,70 (70,01 -192,60) ng/ L, P = 0,588).

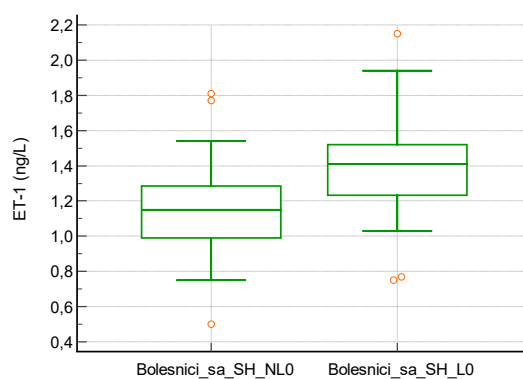
A)



a)



b)



c)

Slika 11. Biljezi endotelne disfunkcije u serumu bolesnika s blažim oblikom SH na početku istraživanja kojima terapija levotiroksinom nije propisana (NL0) i kojima je propisana terapija levotiroksinom (NL6): a) ADMA; b) endokan, c) ET-1; Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Bijeli kvadratići iznad ručica predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 1,5 puta, dok crveni kvadratići predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 3 puta. SH - supklinička hipotireoza. ADMA - asimetrični dimetilarginin. ET-1 - endotelin-1.

4.5. Povezanost serumskih koncentracija biljega endotelne disfunkcije, TSH i parametara dislipidemije u bolesnika s blažim oblikom SH

U **Tablici 6.** je prikazana međusobna korelacija parametara koji su pokazali statistički značajne više vrijednosti u bolesnika sa SH u odnosu na kontrolnu skupinu (biljezi endotelne disfunkcije, TSH i parametri dislipidemije). Nije utvrđena statistički značajna povezanost između ispitivanih parametara, osim između LDL kolesterola i ne-HDL kolesterola.

Tablica 6. Povezanost biljega endotelne disfunkcije s TSH i parametrima dislipidemije u bolesnika s blažim oblikom SH

Analit	TSH	ADMA	endokan	LDL kolesterol
TSH	-	r = -0,156 P = 0,229	r = -0,043 P = 0,744	r = 0,043 P = 0,742
ADMA	r = -0,156 P = 0,229	-	r = 0,232 P = 0,073	r = 0,119 P = 0,360
endokan	r = -0,043 P = 0,744	r = 0,232 P = 0,073	-	r = -0,0002 P = 0,999
LDL kolesterol	r = 0,043 P = 0,742	r = 0,119 P = 0,360	r = -0,0002 P = 0,999	-
ne-HDL kolesterol	r = 0,018 P = 0,090	r = 0,109 P = 0,404	r = 0,058 P = 0,655	r = 0,929 P = <0,001

SH - supklinička hipotireoza. TSH - tireotropin. ADMA - asimetrični dimetilarginin. LDL - lipoprotein niske gustoće. HDL - lipoprotein visoke gustoće. r - Spearmanov koeficijent korelacije.

5. RASPRAVA

Ova prospektivna studija obuhvatila je bolesnike s blažim oblikom supkliničke hipotireoze ($TSH \leq 10$ mIU/L) budući da su klinička važnost i liječenje ovih bolesnika još uvijek kontroverzni. Često se spominje da je bolest supklinička hipotireoza laboratorijska dijagnoza jer bolesnici sa SH uglavnom nemaju kliničke simptome bolesti, a dijagnoza se postavlja temeljem laboratorijskih pretraga te je pitanje koristi ranog otkrivanja i liječenja ove bolesti predmet čestih rasprava (15,149). Općenito je prihvaćen stav o liječenju svih trudnica i žena koje planiraju trudnoću, a imaju SH te bolesnika koji imaju $TSH > 10$ mIU/L (15,149,150). Radi navedenog, ovim istraživanjem praćena je skupina bolesnika s blažim oblikom SH kojima je terapija levotiroksinom propisana i skupina bolesnika s blažim oblikom SH kojima terapija levotiroksinom nije propisana. Uzimajući u obzir podatke dostupne široj znanstvenoj zajednici, ovo je prvo istraživanje koje se usredotočilo na potencijalne dobrobiti nadomjesne terapije levotiroksinom istovremeno na biljege endotelne disfunkcije i druge odabrane biokemijske kardiovaskularne čimbenike rizika u krvi u bolesnika s isključivo blažim oblikom SH.

Većina bolesnika sa SH nema kliničke simptome, ali SH može imati štetan učinak na kardiovaskularni sustav (smanjena dijasolička funkcija srca, oštećenje endotelne funkcije i napredovanje ateroskleroze, povećanje debljine intime-medije karotidne arterije, razvoj bolesti koronarne arterije i potencijalno mortalitet) (99). Kako bi se dodatno razumio temeljni molekularni mehanizam štetnih učinaka izazvanih SH-om, sve se veći broj istraživača i studija fokusira na ovu temu.

Predispozicija bolesnika sa SH za razvoj endotelne disfunkcije djelomično se objašnjava povišenim serumskim koncentracijama TSH. Smatra se da višak TSH, vezujući se za TSH receptore eksprimirane na endotelnim stanicama, dodatno doprinosi proangiogenom učinku (151). Važna uloga angiogeneze u aterosklerozi potvrđena je raznim istraživanjima (151, 153). Studije pokazuju da neovaskularizacija pridonosi rastu ateroskleroznih lezija i ključni je čimbenik u destabilizaciji plaka koja dovodi do rupture. Aterosklerozne su lezije vaskularizirane mrežom kapilara, fragilne su i sklone rupturi, a zbog upalnog mikrookruženja ove kapilare mogu biti važan regulator nestabilnosti plaka. Tian i suradnici (154) su pokazali da povišeni TSH prekomjernim vezanjem na eksprimirane TSH receptore može pridonijeti endotelnoj disfunkciji u endotelnim stanicama umbilikalne vene tako što smanjuje ekspresiju eNOS i PGI2.

Drugi mehanizam kojim se pojašnjava predispozicija bolesnika sa SH za razvoj kardiovaskularnih bolesti jesu čimbenici rizika, koji su često prisutni u bolesnika sa SH, kao što su dislipidemija, kronična upala, oksidacijski stres i inzulinska rezistencija. Smatra se da navedeni mehanizmi utječu na specifične molekularne puteve u endotelnim stanicama i dovode do smanjenog stvaranja najznačajnijeg vazodilatatora NO, ali i drugih molekularnih promjena, karakterističnih za endotelnu disfunkciju, što rezultira razvojem ateroskleroze i povećanjem rizika od nastanka kardiovaskularnih bolesti (155).

Čimbenici koji dovode do nastanka endotelne disfunkcije posljedično su važni rizični faktori za nastanak i razvoj kardiovaskularnih bolesti. Temeljna osobina endotelne disfunkcije je reverzibilnost. Procjena endotelne disfunkcije služi za procjenu i prevenciju kardiovaskularnog rizika (81).

U ovom istraživanju uz određene biljege endotelne disfunkcije u krvi bolesnika s blažim oblikom SH, ispitani su i drugi biokemijski kardiovaskularni čimbenici rizika. Rezultati su pokazali da bolesnici s blažim oblikom SH imaju značajno više koncentracije LDL kolesterola i ne-HDL kolesterola, no ne i koncentracije triglicerida i ukupnog kolesterola, u odnosu na kontrolnu skupinu. Kako hormoni štitnjače reguliraju metabolizam lipida, dislipidemija je najčešće stanje u bolesnika s hipotireozom. Povezanost povišenih vrijednosti TSH i aterogenog lipidnog profila (povišeni trigliceridi i LDL kolesterol) uočena je čak i kod blagog porasta TSH, osobito kod žena u postmenopauzi (156). Druge dvije studije (157,158) pokazale su značajno više koncentracije kolesterola i LDL kolesterola u bolesnika sa SH, zajedno s višim hs-CRP (157) i IL-6 (158). Slično tome, istraživanje Monzani i suradnika (159) pokazalo je značajno višu koncentraciju kolesterola, LDL kolesterola, apolipoproteina (Apo) B i vrijednosti mjerenja cIMT, metode za procjenu endotelne disfunkcije u kliničkoj praksi, u bolesnika sa SH. Parametar ne-HDL kolesterol predstavlja koncentraciju svih aterogenih frakcija kolesterola te nije podložan biološkoj varijabilnosti triglicerida u odnosu na LDL kolesterol koji se najčešće računa preko vrijednosti triglicerida. Radi navedenog, ne-HDL kolesterol se smatra biljekom za rizik razvoja ateroskleroze (160) i kardiovaskularnih bolesti (161). Dislipidemija utječe na specifične molekularne puteve u endotelnim stanicama i uzrokuje smanjenje NO, karakteristično obilježje endotelne disfunkcije, što rezultira razvojem ateroskleroze i povećanjem rizika od nastanka kardiovaskularnih bolesti (146).

Hiperlipidemija ometa sintezu NO povećanjem koncentracije ADMA, endogenog inhibitora NO sintetaze, vjerojatno smanjenjem aktivnosti DDAH, enzima razgradnje ADMA-e, što bi mogao biti glavni čimbenik razvoja i progresije kardiovaskularnih bolesti (162). U

ovom istraživanju utvrđeno je da je medijan serumskih koncentracija ADMA i endokana bio je značajno viši u skupini bolesnika s blažim oblikom SH u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Ranije provedeno istraživanje Arpac i suradnika (146) utvrdilo je također da su serumske koncentracije ADMA i endokana značajno više u bolesnika sa SH te su izvijestili i o značajno višim koncentracijama transformirajućeg faktora rasta beta (TGF- β) i hs-CRP-a u bolesnika sa SH. Značajno više serumske koncentracije endokana, kao proupalne molekule s izvrsnim karakteristikama biljega za aktivaciju i disfunkciju endotela (101), pokazala je studija i u bolesnika s hipotireozom (114). U endotelnim stanicama ekspresiju endokana reguliraju upalni okidači, kao što su citokini (TNF- α i IL-1 β) i lipopolisaharid (105), pa se povećane serumske koncentracije endokana očekuju kod autoimunih i sistemskih upalnih bolesti. Druge dvije studije (157, 158) pokazale su značajno više vrijednosti ADMA u bolesnika sa SH, a dodatno su Kumar i suradnici (157) zaključili da ADMA, kao inhibitor NO sintetaze, treba uzeti u obzir u dijagnostici kardiovaskularnih bolesti u bolesnika sa SH jer predstavlja čimbenik rizika za endotelnu disfunkciju povećavajući stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva i oksidacijski stres. Iz navedenoga je vidljivo kako je SH usko povezana sa endotelnom disfunkcijom i dislipidemijom u organizmu.

Ranije provedeno istraživanje Gao i suradnika (45) nije pokazalo značajnu razliku u serumskim koncentracijama ET-1 i adipokina visfatina u bolesnika sa SH kod kojih je serumska koncentracija TSH > 10,0 mIU/L, kao ni u bolesnika sa SH čija je serumska koncentracija TSH < 10,0 mIU/L, u odnosu na kontrolnu skupinu. Međutim, obje skupine bolesnika sa SH pokazale su značajno niže bazalne serumske koncentracije NO i omentina-1 u odnosu na zdrave ispitanike te značajan porast ovih biljega nakon šest mjeseci eutireoze u bolesnika na terapiji levotiroksinom, što upućuje na to da smanjeno lučenje NO igra ključnu ulogu u endotelnoj disfunkciji u bolesnika SH te da također snižene vrijednosti adipokina omentina-1 pridonose endotelnoj disfunkciji. U studiji Tilly i suradnika (163), koncentracija ET-1 u plazmi bolesnika s poremećajima štitnjače bila je značajno viša u bolesnika s Hashimotovim tireoiditisom i Gravesovom bolesti u odnosu na zdrave ispitanike, ali nisu se značajno razlikovale u bolesnika s endemskom gušom u usporedbi sa zdravim ispitanicima i bolesnicima s Gravesovom bolesti. U jednoj studiji je pokazano da je u 44 % bolesnika s metaboličkim sindromom prisutna i SH te je kod tih bolesnika bila prisutna značajno niža koncentracija NO i viša koncentracija ET-1 u odnosu na zdrave ispitanike, a porast serumske koncentracije TSH pokazao je pozitivnu korelaciju sa koncentracijom ET-1 te negativnu korelaciju sa koncentracijom NO (164). Premda se čini da su povišene koncentracije ET-1 česte u autoimunim i upalnim bolestima budući da

imunosti kompleksi stimuliraju endotelne stanice na otpuštanje ET-1 (165), rezultati se razlikuju između studija. Naše istraživanje nije pokazalo značajne razlike u koncentracijama ET-1 između bolesnika s blažim oblikom SH i kontrolnih ispitanika. Kao mogući razlog izostanka porasta serumskih koncentracija ET-1 u bolesnika sa SH smatramo da bi mogle biti izmjerene koncentracije ET-1 kod svih naših ispitanika u niskom koncentracijskom području s vrijednostima za kontrolne ispitanike od 1,24 (1,07 – 1,46) ng/L, a za bolesnike sa SH od 1,36 (1,09 – 1,56) ng/L. Nadalje, razlog bi mogao biti i potencijalno problematična predanalitička karakteristika ET-1, tj kratki poluživot ove molekule.

Kronična upala niskog stupnja dodatno potiče aterosklerozni proces u bolesnika sa SH. Ranije provedena klinička studija pokazala je značajno višu koncentraciju IL-6, TNF- α i CRP-a u bolesnika sa SH, kao i korelaciju spomenutih upalnih biljega s vrijednostima mjerenja FMD, kliničke metode za procjenu endotelne disfunkcije (166). CRP dovodi do disfunkcije endotela izravnim ometanjem regulacije eNOS-a i povećanjem koncentracije ET-1, snažnog vazokonstriktora i antagonista puta NO (167). Značajno višu koncentraciju CRP u bolesnika sa SH također su pokazala druga dva istraživanja (168, 169), ali bez značajnog poboljšanja nakon terapije levotiroksinom (168). Pored toga, pokazali su porast koncentracije CRP-a kod progresije disfunkcije štitnjače i time upozorili na CRP kao dodatni čimbenik rizika za razvoj koronarne bolesti srca u bolesnika s hipotireozom (168). U istraživanju Tuzcu i suradnika (170) pokazano je da bolesnici sa SH imaju više serumske koncentracije hs-CRP-a, inzulina, ukupnog i LDL kolesterola od zdravih ispitanika. Nadalje, utvrdili su pozitivnu korelaciju TSH i hs-CRP-a te pozitivnu korelaciju hs-CRP-a i inzulina. Time su zaključili da visoka koncentracija hs-CRP-a, a time i upala niskog stupnja, može biti povezana s hiperinzulinemijom natašte prije nego što inzulinska rezistencija postane očigledna u bolesnika sa SH. U našem istraživanju bolesnici s blažim oblikom SH nisu pokazali značajne promjene hs-CRP-a i leukocita u odnosu na zdrave ispitanike. Premda nismo pronašli značajne dokaze upale u bolesnika s blažim oblikom SH, kao ni povećanje ET-1, na prisutnost endotelne disfunkcije upućuju značajno više koncentracije ADMA i endokana. Budući da se naše istraživanje odnosi na blaži oblik SH, biljezi upalnih procesa poput hs-CRP-a i leukocita bi mogli biti nedovoljno osjetljivi.

U bolesnika sa SH uočene su također promijenjene vrijednosti trombocitnog indeksa MPV, iako su zabilježeni proturječni rezultati. Veći trombociti homeostatski su reaktivniji, imaju veću tromboznu aktivnost i kao takvi predstavljaju dodatni čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti. U istraživanju Erikci i suradnika (53) bolesnici sa SH nisu pokazali značajnu razliku u broju trombocita, ali je MPV bio značajno povišen u odnosu na zdrave

ispitanike te su zaključili kako bi MPV mogao biti biljeg predispozicije razvoja ateroskleroze i kardiovaskularnih bolesti u bolesnika sa SH. Slično tome, druga su dva istraživanja (171,172) pokazala značajno više vrijednosti MPV u bolesnika sa SH sugerirajući dodatnu predispoziciju razvoja kardiovaskularnih bolesti. Povišeni MPV zabilježen je kod raznih kardiovaskularnih bolesti, temeljem čega je je MPV predložen kao nezavisni čimbenik rizika za infarkt miokarda, ali ne i za koronarnu arterijsku bolest (54). U našem istraživanju nije bilo razlika u broju trombocita kao ni vrijednosti MPV indeksa između bolesnika s blagim oblikom SH i kontrolne skupine, što je u skladu s jednim drugim istraživanjem (173) koje nije pokazalo promjene u MPV-u i hs-CRP-u u bolesnika sa SH u odnosu na zdrave ispitanike, a također ni razliku u navedenim parametrima u njihovom istraživanju nisu pokazali ni bolesnici sa kliničkom hipotireozom.

Temeljem liječničkog pregleda, u našem istraživanju za 29 bolesnika s blažim oblikom SH je propisana terapija levotiroksinom, a za 32 bolesnika nije propisana terapija. U bolesnika sa SH nakon šest mjeseci terapije levotiroksinom od prethodno utvrđene eutireoze, serumska koncentracija TSH vratila se unutar referentnog raspona, ali je još uvijek bila značajno viša u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Optimizacija terapije prema koncentraciji TSH u serumu bolesnika ponekad može biti složena, budući da istraživanja pokazuju kako nije neuobičajeno da ispitanici koji uzimaju terapiju tijekom kliničkih studija imaju vrijednosti TSH izvan terapijski ciljanog raspona na kraju ispitivanja. Nadalje, idealne vrijednosti TSH za bolesnike koji primaju terapiju levotiroksinom su neizvjesne (150). Isto tako, rutinsko praćenje terapije najčešće ne obuhvaća kontrolu biokemijskih pokazatelja kardiovaskularnih rizika stoga promjene u funkciji endotela bilo u pozitivnom ili negativnom smjeru ostaju neprepoznate.

U našem istraživanju, bolesnici s blažim oblikom SH su imali značajno niže koncentracije FT4 od kontrolne skupine u trenutku uključivanja u studiju, a nakon šest mjeseci liječenja levotiroksinom od prethodno utvrđene eutireoze, vrijednosti FT4 značajno su se povećale. Povezanost i povoljan učinak hormona štitnjače na funkciju endotela dobro je poznat. Studije povezuju nadoknadu hormona štitnjače i posljedičnu normalizaciju funkcije štitnjače s reverzibilnošću endotelne disfunkcije. Hormoni štitnjače utječu na vaskularne endotelne stanice modulirajući ekspresiju adenilat ciklaze i Ca^{2+} -ATPaze, čime utječu na vazodilataciju (174).

Nakon šest mjeseci liječenja levotiroksinom od prethodno utvrđene eutireoze, u bolesnika s blažim oblikom SH uočene su statistički značajno manje koncentracije ukupnog kolesterola i HDL-kolesterola, no ne i statistički značajne promjene koncentracije triglicerida, LDL kolesterola i ne-HDL kolesterola. Sniženje koncentracije kolesterola smatramo važnim jer

bolesnici kojima terapija nije propisana nisu pokazali značajne promjene parametara statusa lipidograma. Učinkovitost nadomjesne terapije levotiroksinom na parametre lipidograma pokazuje neujednačene rezultate u prethodnim studijama. Istraživanje koje je analiziralo učinak jednomjesečnog uzimanja levotiroksina od trenutka uspostavljanja eutireoze, pokazalo je da nadomjesna terapija nema učinak na koncentraciju triglicerida, kolesterola i LDL kolesterola. To je istraživanje također pokazalo da nakon jednomjesečnog perioda terapije značajno pada koncentracija ADMA, a da koncentracija NO značajno raste u bolesnika sa SH te su zaključili da mehanizam putem kojega tiroksin utječe na serumsku koncentraciju ADMA još uvijek nije u potpunosti jasan (158). U istraživanju Gullu i suradnika (175) u bolesnika sa SH kojima je propisan levotiroksin, nakon tri mjeseca korištenja lijeka od prethodno utvrđene eutireoze, koncentracije triglicerida, kolesterola i LDL kolesterola također nisu pokazale značajne promjene, temeljem čega navode da nema potrebe za levotiroksinom u tih bolesnika, premda je koncentracija vWF bila značajno manja u bolesnika na terapiji. Nasuprot tome druga je skupina istraživača pokazala značajno smanjenje serumskih koncentracija kolesterola, LDL kolesterola i cITM nakon šest mjeseci uzimanja levotiroksina (159). Nedavno objavljeni pregledni članak (176) predstavio je najnovija istraživanja o učinku levotiroksina na lipidni status bolesnika sa SH te navodi meta-analizu iz 2017. godine (12 istraživanja, 940 bolesnika) koja je pokazala učinak levotiroksina na ukupni kolesterol kroz prosječno sniženje od -0,29 mmol/L i na LDL kolesterol kroz prosječno sniženje od -0,22 mmol/L, dok nije bilo učinka na HDL kolesterol i trigliceride (177). Druge meta analize, iz 2017. godine (178) i 2014. godine (179) pokazale su slične rezultate. U preglednom članku se također navode rezultati istraživanja vaskularne disfunkcije u bolesnika sa SH gdje su navedene meta-analize (180,181,182) koje upućuju na progresiju cIMT u bolesnika sa SH. Nadalje, druge meta-analize (183,184) pak navode regersiju vrijednosti cIMT u bolesnika sa SH koji su koristili levotiroksin, a učinak je bio značajniji što se terapija dulje koristila.

Nakon šest mjeseci terapije levotiroksinom od prethodno utvrđene eutireoze, bolesnici s blažim oblikom SH nisu pokazali značajne promjene u koncentracijama hs-CRP-a, broju trombocita i MPV-u, ali je došlo do statistički značajnog smanjenja broja leukocita, kojeg ovako izdvojenog u svojstvu biljega upale ne smatramo povezanim s učinkom terapije. Povoljan učinak levotiroksina na hs-CRP ipak su pokazala istraživanja od kojih je jedno pratilo učinak jednomjesečnog uzimanja levotiroksina od trenutka uspostavljanja eutireoze i utvrdilo značajno sniženje hs-CRP-a (158), a drugo nakon šestomjesečnog korištenja levotiroksina (45).

Uvidom u rezultate odabranih biljega endotelne disfunkcije u našem istraživanju vidljivo je da nema značajnih promjena serumske koncentracije ADMA i ET-1 nakon šest mjeseci od utvrđene eutireoze u bolesnika s blažim oblikom SH koji su koristili lijek levotiroksin u odnosu na početno stanje prije uvođenja terapije. Čini se da egzogeni hormon štitnjače nije imao povoljan učinak na funkciju endotela snižavanjem koncentracije ADMA u krvi. Nadalje, u našem istraživanju nije bilo značajnog smanjenja triglicerida i LDL kolesterola u serumu unatoč mjesecima terapije. Ovo bi mogao biti razlog izostanka značajnijeg smanjenja koncentracije ADMA zbog mehanizma kojim hiperlipidemija ometa sintezu NO i povećava koncentraciju ADMA. Rezultati našeg istraživanja u skladu su s ranije provedenim istraživanjem (45) koje nije pokazalo značajnu razliku u serumskom ET-1 između bolesnika sa SH (TSH > 10,0 mIU/L) i kontrolne skupine, kao niti između bolesnika sa SH (TSH < 10,0 mIU/L) i kontrolne skupine, gdje su jedino bolesnici sa SH s TSH > 10,0 mIU/L primali terapiju levotiroksinom te nisu pokazali značajne promjene koncentracije ET-1 nakon šest mjeseci, no kod njih je ipak uočeno značajno povećanje NO korištenjem terapije. S druge strane, u našem istraživanju serumska koncentracija endokana se značajno smanjila u bolesnika s blažim oblikom SH na terapiji nakon šest mjeseci liječenja levotiroksinom i prethodno utvrđene eutireoze. Analizirajući vrijednosti novih biomarkera za procjenu endotelne disfunkcije, nedavni pregledni rad posebno je istaknuo endokan i istaknuo njegove poželjne karakteristike kao biljega endotelne disfunkcije (visoka specifičnost i reproducibilnost, korelacija s funkcijom endotela i stanjem bolesti, stratifikacija kardiovaskularnog rizika) (101). Prema navedenome endokan možemo istaknuti kao biljeg velikog potencijala i poticaj na njegovo korištenje budućih istraživanja na ovom području.

Bolesnici s blažim oblikom SH kojima terapija levotiroksinom nije bila propisana pokazali su značajno smanjenje koncentracije TSH nakon šestomjesečnog praćenja, no to su bile i dalje koncentracije izvan referentnog intervala koje su pokazale samo statističku značajnost, no ne i klinički značaj. Poznato je da bolesnici sa SH obično imaju fluktuacije TSH tijekom vremena s obzirom na to da postoje mnogi vanjski čimbenici koji utječu na blaža povećanja i sniženja koncentracije TSH tijekom vremena (18). Statistička obrada podataka ujedno je pokazala i značajno sniženje koncentracije FT3 nakon šestomjesečnog perioda u bolesnika s blažim oblikom SH kojima terapija levotiroksinom nije bila propisana, no to smatramo da nema klinički značaj, budući da je istu fluktuaciju nakon šest mjeseci pokazala i skupina bolesnika na terapiji s levotiroksinom, a razlike u bazalnim vrijednostima FT3 na početku ispitivanja nije bilo između bolesnika kojima je lijek propisan i onima kojima nije.

Prema smjernicama za racionalnu dijagnostiku štitnjače određivanje ukupnog T3 i FT3 se najrjeđe primjenjuje u rutinskoj praksi. U stanju hipotireoze prisutna je povećana pretvorba FT4 u FT3, stoga se ukupni T3, tj. FT3, dugo zadržava u granicama referentnog intervala te će biti snižen tek u dugotrajnoj i teškoj hipotireozu. Zbog svoje niske osjetljivosti u otkrivanju hipotireoze, a posebice supkliničke hipotireoze nije ni potrebno njegovo određivanje. Nasuprot tome, upravo je razvoj osjetljivih analitičkih metoda treće generacije za određivanje TSH omogućio otkrivanje supkliničkih oblika bolesti (13).

U bolesnika s blažim oblikom SH kojima terapija levotiroksinom nije bila propisana pokazalo se statistički značajno povećanje koncentracije ET-1 nakon šest mjeseci praćenja, no ta je promjena vjerojatno posljedica niskih koncentracija izmjerenog ET-1 za koje vjerujemo da su samo statistički značajne, ali ne i klinički. Druga dva biljega endotelne disfunkcije, ADMA i endokan, nisu pokazali značajne promjene nakon šest mjeseci, kao niti koncentracije parametra dislipidemije, hs-CRP, leukociti, trombociti i MPV. U istraživanju Monzani i suradnika (159) placebo skupina bolesnika sa SH kojoj levotiroksin nije bio propisan također nije pokazala značajne promjene koncentracije triglicerida, kolesterola i LDL kolesterola nakon šest mjeseci praćenja, a osim toga nije niti pokazala značajne promjene u koncentracijama homocisteina, Apo B, Apo A i vrijednosti cIMT.

Uočili smo da su bolesnici sa SH kojima je terapija levotiroksinom propisana na početku našeg istraživanja imali značajno više koncentracije TSH i TPOAt te nižu koncentraciju FT4 u odnosu na bolesnike sa SH kojima terapija nije propisana. Smatramo da navedena razlika koja je uočena u laboratorijskim nalazima upućuje na opravdanost donošenja liječničke odluke o uvođenju lijeka kod tih bolesnika sa SH. Bolesnici kojima je levotiroksin uveden također su inicijalno imali značajno više vrijednosti LDL kolesterola i ne-HDL kolesterola u odnosu na bolesnika sa SH kojima nije uvedena terapija, što možemo smatrati dodatno većim čimbenikom rizika za razvoj endotelne disfunkcije, a uvođenje terapije potencijalno korisnim. Usporedba je također pokazala značajnu razliku između navedene dvije skupine ispitanika u serumskim koncentracijama ET-1 na početku istraživanja, no to je vjerojatno rezultat izmjerenih niskih koncentracija ET-1 zbog čega vjerujemo da je razlika samo statistički značajna, ali ne i klinički, te su potrebna daljnja istraživanja njegove korisnosti kao biljega endotelne disfunkcije. Obje podskupine SH bolesnika pojedinačno su na početku ispitivanja pokazale značajno višu koncentraciju endotelnih biljega ADMA i endokana u odnosu na kontrolnu skupinu. Temeljem svih ovih rezultata možemo pretpostaviti da bi uvođenje levotiroksina svim bolesnicima s blažim oblikom SH moglo imati potencijalnu korist u prevenciji kardiovaskularnog rizika.

Radi jasnijeg razumijevanja potencijalne povezanosti parametara koji su pokazali značajno više koncentracije u bolesnika s blažim oblikom SH u odnosu na kontrolnu skupinu, analizirana je korelacija biljega endotelne disfunkcije u krvi (ADMA i endokan) sa TSH i parametarima dislipidemije (LDL kolesterol i ne-HDL kolesterol) te nisu utvrđene statistički značajne povezanosti između navedenih parametara. Suprotno našem istraživanju, u jednoj studiji nađena je pozitivna korelacija TSH, ADMA i IL-6 s lipidnim profilom (kolesterol, trigliceridi, LDL kolesterol i VLDL kolesterol) u bolesnika sa SH (157). Do razlike u rezultatima moglo je doći zbog većeg broja ispitanika koji su bili uključeni u njihovo istraživanje (120 bolesnika sa SH) i obuhvaćali bolesnike sa SH neovisno o TSH vrijednosti ($9,58 \pm 6,84$ mIU/L). U drugoj studiji (159) utvrđena je pozitivna korelacija koncentracije TSH s kolesterolom i LDL kolesterolom te pozitivna korelacija između koncentracije TSH i srednje vrijednosti cIMT u bolesnika sa SH. Nadalje, utvrđena je pozitivna korelacija apsolutnog sniženja koncentracija TSH i srednje vrijednosti cIMT s koncentracijom kolesterola te LDL kolesterola u bolesnika sa SH na levotiroksinu (45 ispitanika, TSH 6,31 (3,65 – 15,00 mIU/L)). U istraživanju Arpaci i suradnika (146), premda su bolesnici sa SH ($n = 21$) pokazali značajno više koncentracije ADMA i endokana u krvi u odnosu na zdrave ispitanike, TSH je pokazao korelaciju samo s ADMA, no ne i s endokanom, a dodatno je ADMA pokazala korelaciju s endokanom i hs-CRP-om. Istraživanje provedeno na 240 bolesnika sa SH, pokazalo je da nema značajne razliku u serumskim koncentracijama ET-1 i visfatina, ali da su značajno niže bazalne koncentracije NO i omentina-1 u serumu bolesnika sa SH u odnosu na zdrave ispitanike te je pokazalo također negativnu korelaciju TSH s omentinom-1 i NO kao i pozitivnu korelaciju omentina-1 i NO (45).

Meta-analiza, koja je obuhvatila 27 istraživanja na području supkliničke hipotireoze gdje su se u procjeni endotelne disfunkcije koristili klinički parametri, pokazala je da bolesnici sa SH u odnosu na zdrave ispitanike imaju značajno povišene vrijednosti cIMT i PWV te sniženu vrijednost FMD čime je potvrđena značajna povezanost SH i kardiovaskularnog rizika sa zadebljanjem arterijske stijenke i endotelnom disfunkcijom (185). Prethodno provedeno istraživanje pokazalo je značajno niže vrijednosti FMD u bolesnika sa SH, koje su nakon šest mjeseci eutireoze uslijed uvođenja levotiroksina opet značajno porasle, upućujući na poboljšanje endotelne funkcije zahvaljujući terapiji (186). U nekim istraživanjima su vrijednosti za FMD pokazale negativnu korelaciju sa serumskom koncentracijom TSH u bolesnika sa SH (187, 188). Niknam i suradnici (189) su utvrdili u bolesnika sa SH značajno niže vrijednosti za FMD koje su uvođenjem levotiroksina pokazale značajni porast, dok

vrijednosti za cIMT nisu pokazale značajnu razliku između bolesnika sa SH i zdravih ispitanika, kao ni promjenu nakon uvođenja terapije. Međutim, u drugom istraživanju uvođenje levotiroksina je rezultiralo značajnim sniženjem vrijednosti cIMT-a koje su bile više u bolesnika sa SH u odnosu na zdrave ispitanike (190). Randomizirano kliničko istraživanje pokazalo je također povoljan utjecaj levotiroksina u bolesnika sa SH jer je bilo praćeno sniženjem koncentracije kolesterola, LDL kolesterola i povećanjem vrijednosti FMD te dodatno izostankom simptoma umora (191) zahvaljujući terapiji.

Prema svemu navedenom vidljivo je da rezultati analize biljega endotelne disfunkcije u krvi, status dislipidemije i upale, kao i vrijednosti kliničkih biljega procjene statusa endotela u bolesnika sa SH ne pokazuju apsolutnu ujednačenost i jednoznačnost rezultata. Daljnja nastojanja u razjašnjavanju korelacije supkliničke hipotireoze i funkcije endotela, važnosti otkrivanja same bolesti i pravovremenog liječenja trebala bi i dalje biti u fokusu istraživača ovog područja budući da SH predstavlja neovisni čimbenik rizika za razvoj kardiovaskularnih bolesti zbog narušavanja ravnoteže i funkcije endotela.

Jedno od ograničenja našeg istraživanja je mala veličina uzorka svih ispitanika koji su sudjelovali, što otežava jasno zaključivanje o razlikama u koncentraciji pojedinih ispitivanih parametara, kao i o prednostima liječenja levotiroksinom u bolesnika s blažim oblikom SH. Kako bi se problematika važnosti postavljanja dijagnoze blažeg oblika SH i njenog liječenja razjasnila, potrebna su dodatna istraživanja s većim brojem ispitanika.

Ukratko, naše istraživanje je pokazalo da bolesnicima blažim oblikom SH imaju značajno više koncentracije čimbenika rizika za kardiovaskularne bolesti, točnije serumske koncentracije endokana, ADMA, LDL kolesterola i ne-HDL kolesterola. Potencijalne dobrobiti pravovremenog postavljanja dijagnoze i liječenja SH levotiroksinom očituju se usporavanjem napredovanja do klinički manifestne hipotireoze te smanjenjem rizika od razvoja kardiovaskularnih bolesti kroz poboljšanje statusa endotela. Od odabranih biljega endotelne disfunkcije, endokan je pokazao značajno sniženje u serumu bolesnika s blažim oblikom SH koji su primali nadomjesnu terapiju levotiroksinom, što upućuje na potencijalno poboljšanje endotelnog statusa. Ukupni kolesterol, kao biokemijski kardiovaskularni čimbenik rizika, također je pokazao značajno sniženje i istaknuo korisnost terapije na aspekt dislipidemije. U daljnjim bi istraživanjima endokan mogao imati najveći potencijal kao biljeg endotelne disfunkcije u kliničkoj praksi. Ovakvi biljezi mogli bi pridonijeti budućim randomiziranim kontroliranim istraživanjima i pružiti dodatne dokaze o povezanosti nepovoljnih ishoda u bolesnika s blažim oblikom SH te korisnosti levotiroksina u njihovom liječenju.

6. ZAKLJUČCI

Slijedom provedenog istraživanja, dobiveni rezultati upućuju na sljedeće zaključke:

- značajno više serumske koncentracije biljega endotelne disfunkcije endokana i ADMA te LDL kolesterola i ne-HDL kolesterola u bolesnika s blažim oblikom SH u odnosu na zdrave ispitanike upućuju na prisutnost endotelne disfunkcije u bolesnika sa SH i potencijalan razvoj ateroskleroze što predstavlja rizik za nastanak kardiovaskularnih bolesti;
- liječnička odluka o uvođenju suspsitucijske terapije levotiroksinom određenim bolesnicima s blažim oblikom SH temeljem rutinskih laboratorijskih pretraga statusa štitnjače i dislipidemije se pokazala opravdanom, ukazujući na značajnost pravovremenog postavljanja dijagnoze, liječenja SH i smanjenja kardiovaskularnog rizika;
- biljeg endotelne disfunkcije ADMA nije pokazao povoljni učinak terapije levotiroksinom u bolesnika s blažim oblikom SH, a što bi vrijedilo dodatno istražiti na većoj skupini ispitanika uz dulji period praćenja;
- biljeg endotelne disfunkcije endokan je pokazao povoljni učinak terapije levotiroksinom u bolesnika s blažim oblikom SH te se tako predstavio kao biljeg s iznimnim potencijalom za procjenu i praćenje kardiovaskularnog rizika kod SH pacijenata.

7. POPIS LITERATURE

1. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. Zagreb, Medicinska naklada, 2007, str. 392-3.
2. Jukić T, Vidranski V, Franceschi M, Kusić Z. Poremećaj funkcije štitnjače i smjernice za racionalnu dijagnostiku. In: Vidranski V, urednik. Štitnjača-u lovu na leptira. Zagreb, Medicinska naklada, 2020, str. 9-22.
3. Khatawkar AV, Awati SM. Thyroid gland – Historical aspects, Embryology, Anatomy and Physiology. IAIM 2015;2:165–71.
4. Štraus B, Plavšić V. Hormoni. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čeplak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 354-60.
5. Koršić M. Endokrini sustav i bolesti metabolizma. U: Vrhovac i sur. (ur.). Interna medicina. Zagreb, Medicinska biblioteka, 2003, str. 1199-340.
6. Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2012, str. 907-20.
7. Sinha RA, Yen PM. Metabolic Messengers: Thyroid Hormones. Nat Metab 2024;6:639-50.
8. Goodman HM. Basic Medical Endocrinology. Academic Press, London, 2003.
9. Solter M. Bolesti štitnjače – klinička tireoidologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2007.
10. Kusić Z, Jukić T, Staničić J. Uvod u hipotireozu. In: Kusić Z, urednik. Hipotireoza. Zagreb, Medicinska naklada, 2014. str. 1-8.
11. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. J Clin Invest 2012; 122:3035-43.
12. Punda M. Primarna hipotireoza neautoimunosne etiologije. In: Kusić Z, urednik. Hipotireoza. Zagreb, Medicinska naklada, 2014. str. 22-31.
13. Kusić Z, Jukić T, Franceschi M, Dabelić N, Rončević S, Lukina Lj i sur. Smjernice Hrvatskog društva za štitnjaču za racionalnu dijagnostiku poremećaja funkcije štitnjače. Liječ Vjesn 2009;131:328-38.
14. Jukić T, Punda M, Granić R, Kusić Z. Supklinička hipotireoza. In: Kusić Z, urednik. Hipotireoza. Zagreb, Medicinska naklada, 2014. str. 43-52.
15. Surks MI, Ortiz E, Daniels GH, Sawin CT, Col NF, Cobin RH i sur: Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management. JAMA 2004;291:228-38.
16. Fatourechi V. Subclinical hypothyroidism: An update for primary care physicians. Mayo Clin Proc 2009;84:65-71.

17. Jukić T, Vidranski V, Franceschi M, Kusić Z. Poremećaj funkcije štitnjače i smjernice za racionalnu dijagnostiku. In: Vidranski V, urednik. Štitnjača-u lovu na leptira. Zagreb, Medicinska naklada, 2020. str. 51-8.
18. Hennessey JV, Espaillet R. Subclinical hypothyroidism: a historical view and shifting prevalence. *Int J Clin Pract* 2015;69:771–82.
19. Wardle CA, Fraser WD, Squire CR. Pitfalls in the use of thyrotropin concentration as a first-line thyroid-function test. *Lancet* 2001;357:1013–4.
20. Demers LM, Spencer CA i sur. Laboratory medicine practice guidelines: Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. National Academy of Clinical Biochemistry 2002 www.nacb.org/monograph/Thyroid_index.htm
21. Spencer CA, LoPresti JS, Patel A, Guttler RB, Eigen A, Shen D i sur. Applications of a new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurement. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:453–60.
22. Landensen PW, Singer PA, Ain KB, Bagchi N, Bigos ST, Lewy EG i sur. American Thyroid Association guidelines for detection of thyroid dysfunction. *Arch Intern Med* 2000;160:1573-5.
23. American Association of Clinical Endocrinologists. Medical Guidelines for Clinical Practice for the evaluation and treatment of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocr Pract* 2002;8:457–69.
24. American Association of Clinical Endocrinologists. Clinical practice guidelines for the evaluation and treatment of hyperthyroidism and hypothyroidism. Jacksonville, 1996: <http://www.aace.com/clinguideindex.htm>.
25. UK Guidelines for the Use of Thyroid Function Tests, July 2006. www.acb.org.uk
26. Vanderpump MPJ, Tunbridge WMG. Epidemiology and prevention of clinical and subclinical hypothyroidism. *Thyroid* 2002;10:839-47.
27. Huber G, Staub JJ, Meier C, Mitrache C, Guglielmetti M, Huber P i sur. Prospective study of the spontaneous course of subclinical hypothyroidism: prognostic value of thyrotropin, thyroid reserve, and thyroid antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3221-6.
28. Okosieme O, Gilbert J, Abraham P, Boelaert K, Dayan K, Gurnell M i sur. Management of primary hypothyroidism: statement by the British Thyroid Association Executive Committee. *Clin Endocrinol* 2016;84:799–808.
29. Cakmak H, Long RK. Endocrine drugs. U: Katzung BG, Trevor AJ. Basic & clinical pharmacology. New York, McGraw-Hill, 2015, str. 974-90.

30. Escobar-Morreale HF, Escobar del Rey, Morreale de Escobar FG. Replacement therapy for hypothyroidism with thyroxine alone does not ensure euthyroidism in all tissues, as studied in thyroidectomized rats. *J Clin Invest* 1995;96:2828-38.
31. Castagna MG, Dentice M, Cantara S, Ambrosio R, Maino F, Porcelli T i sur. DIO2 Thr92Ala reduces deiodinase-2 activity and serum-T3 levels in thyroid-deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;8:1623-30.
32. Wiersinga WM. T4+T3 combination therapy: is there a true effect? *Eur Thyroid J* 2017; 177:288-96.
33. Michaelsson LF, Borregaard MB, Lerche la Cour J, Selmer C, Røder M, Perrild H i sur. Treating Hypothyroidism with Thyroxine/Triiodothyronine Combination Therapy in Denmark: Following Guidelines or Following Trends? *Eur Thyroid J* 2015;5:175-9.
34. Duggal J, Singh S, Barasano CP, Arora R. Cardiovascular risk with subclinical hyperthyroidism and hypothyroidism: pathophysiology and managment. *J Cardiometab Syndr* 2007;2:198–206.
35. Ichiki T. Thyroid hormone and atherosclerosis. *Vascul Pharmacol* 2010;52:151–6.
36. Isumi Y, Shoji H, Sugo S, Tochimoto T, Yoshioka M, Kangawa K i sur. Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology* 1998;139:838–46.
37. Sato Y, Nakamura R, Satoh M, Fujishita K, Mori S, Ishida S i sur. Thyroid hormone targets matrix Gla protein gene associated with vascular smooth muscle calcification. *Circ. Res* 2002;597:550–7.
38. Zebboudj AF, Shin V, Bostrom K. Matrix GLA protein and BMP-2 regulate osteoinduction in calcifying vascular cells. *J Cell Biochem* 2003;90:756–65.
39. Tamajusuku AS, Carrillo-Sepulveda MA, Braganhol E, Wink MR, Sarkis JJ, Barreto-Chaves ML i sur. Activity and expression of ecto-5'- nucleotidase/CD73 are increased by thyroid hormones in vascular smooth muscle cells. *Mol. Cell Biochem* 2006;289: 65–72.
40. Vargas F, Moreno JM, Rodriguez-Gomez I, Wangenstein R, Osuna A, Alvarez-Guerra M i sur. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *Eur J Endocrinol* 2006;154:197–212.
41. Klein I, Danzi S. Thyroid disease and heart. *Circulation* 2007;116: 1725–35.
42. Hak EA, Pols HAP, Visser TJ, Drexhage HA, Hofman A, Witteman JCM. Subclinical hypothyroidism is an idependent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: the Rotterdam study. *Ann Intern Med* 2000;132:270-8.

43. 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 on the Whickham Survey. *Clin Endocrinol* 1995;43:55-68.
44. Parle JV, Maisonneuve P, Sheppard MC, Boyle P, Franklyn JA. Prediction of all-cause and cardiovascular mortality in elderly people from one low serum thyrotropin result: a 10-year cohort study. *Lancet* 2001;358:861-5.
45. Gao CX, Yang B, Guo Q, Liu J, Wei LH, Tian LM. High thyroid-stimulating hormone level is associated with the risk of developing atherosclerosis in subclinical hypothyroidism. *Horm Metab Res* 2015;47:220-4.
46. Rodondi N, Newman AB, Vittingoff E, Reckner N, Satterfield S, Harris BT. Subclinical hypothyroidism and the risk of heart failure, other cardiovascular events and death. *Arch Intern Med* 2005;165:2460-6.
47. Razvi S, Weaver JU, Vanderpump MP, Pearce HSS. The incidence of ischemic heart disease and mortality in people with subclinical hypothyroidism: reanalysis of Whickham Survey cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:1734-40.
48. Rodondi N, den Elzen WP, Bauer DC, Cappola AR, Razvi S, Walsh JP i sur. Subclinical hypothyroidism and the risk of coronary heart disease and mortality. *JAMA* 2010;304:1365-74.
49. Reiner Ž. Ateroskleroza. U: Vrhovac i sur. (ur.). *Interna medicina*. Zagreb, Naklada Ljevak, 2008, str.568–73.
50. Chute JP, Ross JR, McDonnell DP: Minireview: nuclear receptors, hematopoiesis, and stem cells. *Mol Endocrinol* 2010;24:1-10.
51. Gasparian AY, Ayvazyan L, Mikhailidis DP, Kitas GD. Mean platelet volume: a link between thrombosis and inflammation? *Curr Pharm Des* 2011;17:47–58.
52. Bath PM, Butterworth RJ. Platelet size: measurement, physiology and vascular disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996;7:157–61.
53. Erikci AA, Karagoz B, Ozturk A, Caglayan S, Gokhan O, Kaygusuz i sur. The effect of subclinical hypothyroidism on platelet parameters. *Hematology* 2009;14:115-7.
54. Endler G, Klimesch A, Sunder-Plassmann H, Schillinger M, Exner M, Mannhalter C i sur. Mean platelet volume is an independent risk factor for myocardial infarction but not for coronary artery disease. *Br J Haematol* 2002;117:399–404.
55. Chu SG, Becker RC, Berger PB, Bhatt DL, Eikelboom JW, Konkle B i sur. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost* 2010;8:148–56.

56. Papanas N, Symeonidis G, Maltezos E, Mavridis G, Karavageli E, Vosnakidis T i sur. Mean platelet volume in patients with type 2 diabetes mellitus. *Platelets* 2004;15:475-8.
57. Coban E, Ozdogan M, Yazicioglu G, Akcit F. The mean platelet volume in patients with obesity. *Int J Clin Pract* 2005;59:981–2.
58. Pathansali R, Smith N, Bath P. Altered megakaryocyteplatelet haemostatic axis in hypercholesterolemia. *Platelets* 2001;12:292–7.
59. Reiner Ž. Poremećaji metabolizma lipoproteina. U: Vrhovac i sur. (ur.) *Interna medicina*. 2008, Zagreb, Naklada Ljevak, str. 1286–93.
60. Muačević-Katanec D. Struktura i funkcija HDL čestica. U: *Prevenција ateroskleroze. Smanjeni HDL kolesterol kao čimbenik rizika. Zbornik radova sa Znanstvenog skupa. Zagreb. HAZU*. 2011.
61. Muačević-Katanec D. Mehanizam triglicerida i nastanak ateroskleroze. U: *Prevenција ateroskleroze. Smanjeni HDL kolesterol kao čimbenik rizika. Zbornik radova sa Znanstvenog skupa. Zagreb. HAZU*. 2011.
62. Tian L, Song Y, Xing M, Zhang W, Ning G, Li X i sur: A novel role for thyroid-stimulating hormone: Up-regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme a reductase expression through the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A/cyclic adenosine monophosphate-responsive element binding protein pathway. *Hepatology* 2010; 52:1401-9.
63. Antunes TT, Gagnon A, Bell A, Sorisky A: Thyroid-stimulating hormone stimulates interleukin-6 release from 3T3-L1 adipocytes through a cAMP-protein kinase A pathway. *Obes Res* 2005;13:2066-71.
64. Whetsell M, Bagriacik EU, Seetharamaiah GS, Prabhakar BS and Klein JR: Neuroendocrine-induced synthesis of bone marrow-derived cytokines with inflammatory immunomodulating properties. *Cell Immunol* 1999;192:159-66.
65. Blake GJ, Ridker PM. Novel clinical markers of vascular wall inflammation. *Circ Res* 2001;89:763-71.
66. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 2001; 103:1813–8.
67. Kuller LH, Tracy RP, Shaten J, Meilahn EN. Relation of Creactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. Multiple risk factor intervention trial. *Am J Epidemiol* 1996;144:537–47.

68. Torzewski M, Rist C, Mortensen RF, Zwaka TP, Bienek M, Waltenberger J i sur. C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:2094–9.
69. Bharadwaj D, Stein MP, Volzer M, Mold C, Du Clos TW. The major receptor for C-reactive protein on leukocytes is Fcγ receptor II. *J Exp Med* 1999;190:585–90.
70. Jaye DL, Waites KB. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:735–47.
71. Drenckhahn D, Ness W. The endothelial contractile cytoskeleton. U: Born VRG, Schwartz CJ, ur. *Vascular endothelium: physiology, pathology and therapeutic opportunities*. Stuttgart: Schattauer, 1997. str. 1-26.
72. Drexler H. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Pro Cardiovasc Dis*. 1997;39:287-324.
73. Davies PF, Spaan JA, Krams R. Shear stress biology of the endothelium. *Ann Biomed Eng* 2005;33:1714-8.
74. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-6.
75. Bhagat K, Moss R, Collier J, Vallance P. Endothelial “stunning” following a brief exposure to endotoxin: a mechanism to link infection and infarction? *Cardiovasc Res* 1996;32:822-9.
76. Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 1986;250:1145-9.
77. Lüscher TF, Yang Z, Tschudi M, von Segesser L, Stulz P, Boulanger C i sur. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ Res* 1990;66:1088-94.
78. Yoshizumi M, Kurihara H, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T i sur. Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:859-6.
79. Vierhapper H, Wagner O, Nowotny P, Waldhäusl W. Effect of endothelin-1 in man. *Circulation* 1990;81:1415-8.
80. Marwali MR, Mehta JL. COX-2 inhibitors and cardiovascular risk. Inferences based on biology and clinical studies. *Thromb Haemost* 2006;96:401-6.

81. Čavka A, Tadžić R, Grizelj I, Unfirer S, Mihaljević Z, Mihalj M i sur. Endotelna funkcija - funkcionalni pokazatelj kardiovaskularnih rizičnih čimbenika. *Med Vjesn* 2012;44:135-46.
82. Raitakari OT, Celermajer DS. Testing for endothelial dysfunction. *Ann Med* 2000;32:293-304.
83. Fleming I, Fisslthaler B, Dixit M, Busse R. Role of PECAM-1 in the shear-stress-induced activation of Akt and the endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in endothelial cells. *J Cell Sci* 2005;118:4103-11.
84. Tiefenbacher CP. Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:2484-8.
85. Celermajer DS, Sorensen KE, Gooch VM, Spiegelhalter DJ, Miller OI, Sullivan ID i sur. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet* 1992;340:1111-5.
86. Ross R. Atherosclerosis -- an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999;340:115-26.
87. Gokce N, Keaney JF Jr, Hunter LM, Watkins MT, Nedeljkovic ZS, Menzoian JO i sur. Predictive value of noninvasively determined endothelial dysfunction for long-term cardiovascular events in patients with peripheral vascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:1769-75.
88. Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ, Coleman SM, Dzau VJ, Cooke JP. L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1992;90:1248-53.
89. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003;42:1149-60.
90. Raza K, Carruthers DM, Stevens R, Filer AD, Townend JN, Bacon PA. Infliximab leads to a rapid but transient improvement in endothelial function in patients with primary systemic vasculitis. *Ann Rheum Dis* 2006;65:946-8.
91. Cracowski JL, Minson CT, Salvat-Melis M, Halliwill JR. Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans. *Trends Pharmacol Sci* 2006;27:503-8.
92. Sandoo A, van Zanten JJ, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The endothelium and its role in regulating vascular tone. *Open Cardiovasc Med J* 2010;4:302-12.

93. Drenjancevic-Peric I, Phillips SA, Falck JR, Lombard JH. Restoration of normal vascular relaxation mechanisms in cerebral arteries by chromosomal substitution in consomic SS.13BN rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:188-95.
94. Boo YC, Sorescu G, Boyd N, Shiojima I, Walsh K, Du J i sur. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *J Biol Chem* 2002;277:3388-96.
95. Wilkinson IB, Fuchs SA, Jansen IM, Spratt JC, Murray GD, Cockcroft JR i sur. Reproducibility of pulse wave velocity and augmentation index measured by pulse wave analysis. *J Hypertens* 1998;16:2079-84.
96. Corrado E, Rizzo M, Coppola G, Muratori I, Carella M, Novo S. Endothelial dysfunction and carotid lesions are strong predictors of clinical events in patients with early stages of atherosclerosis: a 24-month follow-up study. *Coron Artery Dis* 2008;19:139-44.
97. Balta S, Mikhailidis DP, Demirkol S, Ozturk C, Celik T, Iyisoy A. Endocan: a novel inflammatory indicator in cardiovascular disease? *Atherosclerosis* 2015;243:339-43.
98. Kuvin Jeffrey T, Karas Richard H. Clinical utility of endothelial function testing. *Circulation* 2003;107:3243-7.
99. Wang XS, Yang W, Luo T, Wang JM, Jing YY. Serum endocan levels are correlated with the presence and severity of coronary artery disease in patients with hypertension. *Genet Test Mol Biomarkers* 2015;19:124-7.
100. Blann AD. A reliable marker of vascular function: does it exist? *Trends Cardiovasc Med* 2015;25:588-91.
101. Leite AR, Borges-Canha M, Cardoso R, Neves JS, Castro-Ferreira R, Leite-Moreira A. Novel biomarkers for evaluation of endothelial dysfunction. *Angiology* 2020;71:397-410.
102. Zhang SM, Zuo L, Zhou Q i sur. Expression and distribution of endocan in human tissues. *Biotech Histochem* 2012;87:172-8.
103. Lassalle P, Molet S, Janin A, Heyden JV, Tavernier J, Fiers W i sur. ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem* 1996;271:20458-64.
104. Bechard D, Gentina T, Delehedde TM, Scherpereel A, Lyon M, M, Aumercier M i sur. Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity, *J. Biol. Chem* 2001;48341-9.

105. Sarrazin S, Adam E, Lyon M, Depontieu F, Motte V, Landolfi C i sur. Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 2006;1765:25-37.
106. Canpolat U, Kocyigit D, Yildirim A. Role of Endothelial Dysfunction and Endocan in Atherosclerosis: Point of Origin or End Point? *Angiology* 2020;71:477.
107. Bécharad D, Scherpereel A, Hammad H, Gentina T, Tsicopoulos A, Aumercier M i sur. Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 2001;167:3099-106.
108. Lee W, Ku SK, Kim SW, Bae JS. Endocan elicits severe vascular inflammatory responses in vitro and in vivo. *J Cell Physiol* 2014;229:620-30.
109. Sun H, Zhang H, Li K, Wu H, Zhan X, Fang F i sur. ESM-1 promotes adhesion between monocytes and endothelial cells under intermittent hypoxia. *J Cell Physiol* 2019;234:1512-21.
110. Rocha SF, Schiller M, Jing D, Li H, Butz S, Vestweber D i sur. ESM-1 modulates endothelial tip cell behavior and vascular permeability by enhancing VEGF bioavailability. *Circ Res* 2014;115:581-90.
111. Balta I, Balta S, Demirkol S, Mikhailidis DP, Celik T, Akhan M i sur. Elevated serum levels of endocan in patients with psoriasis vulgaris: correlations with cardiovascular risk and activity of disease. *Br J Dermatol* 2013;169:1066-70.
112. Balanescu P, Ladaru A, Balanescu E, Voiosu T, Baicus C, Dan GA. Endocan, novel potential biomarker for systemic sclerosis: results of a pilot study. *J Clin Lab Anal* 2016;30:368-73.
113. Mihajlovic DM, Lendak DF, Brkic SV, Draskovic BG, Mitic GP, Novakov Mikic AS i sur. Endocan is useful biomarker of survival and severity in sepsis. *Microvasc Res* 2014;93:92-7
114. Gungor A, Palabiyik SS, Bayraktutan Z, Dursun H, Gokkaya N, Bilen A i sur. Levels of endothelial cell-specific molecule-1 (ESM-1) in overt hypothyroidism. *Endocr Res* 2016;41:275-80.
115. Aparci M, Isilak Z, Uz O, Yalcin M, Kucuk U. Endocan and endothelial dysfunction. *Angiology* 2015;66:488-9.
116. Musialowska D, Zbroch E, Koc-Zorawska E, Musialowski P, Malyszko J. Endocan concentration in patients with primary hypertension. *Angiology*. 2018;69:483-9.

117. Balamir I, Ates I, Topcuoglu C, Turhan T. Association of endocan, ischemia-modified albumin, and hsCRP levels with endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Angiology* 2018;69:609-10.
118. Balta S, Mikhailidis DP, Demirkol S, Ozturk C, Celik T, Iyisoy A. Endocan: a novel inflammatory indicator in cardiovascular disease? *Atherosclerosis* 2015;243:339-43.
119. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of NO synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992;339:572-5.
120. Boger RH. The emerging role of ADMA as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003;59:824-33.
121. Gary JD, Clarke S. RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1998;61:65-131.
122. Bode-Boger SM, Scalera F, Kielstein JT, Martens-Lobenhoffer J, Breithardt G, Fobker M i sur. Symmetrical Dimethylarginine: A New Combined Parameter for Renal Function and Extent of Coronary Artery Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 2006;17:1128-34.
123. Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetric dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000;87:99-105.
124. Leiper J, Murray-Rust J, McDonald N, Vallance P. S-nitrosylation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase regulates enzyme activity: further interactions between nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:13527-32.
125. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, Frlich JC. Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997;95:2068-74.
126. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O i sur. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998;98:1842-7.
127. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boger RH, Bode-Boger SM i sur. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:652-8.

128. Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM, Schaffer J, BarbeyM, Koch KM i sur. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stagerenal disease: Relationship to treatment method and athero-sclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:594–600.
129. Abbasi F, Asagami T, Cooke JP, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM i sur. Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2001;88:1201–3.
130. Zoccali C, Bode-Boger SM, Mallamaci F, Benedetto FA, Tripepi G, Malatino L i sur. Asymmetric dimethylarginine(ADMA): An endogenous inhibitor of nitric oxide synthase predicts mortality in end-stage renal disease (ESRD). *Lancet* 2001;358:2113–7.
131. Nijveldt RJ, Teerlink T, van der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA i sur. Asymmetrical dimethylarginine(ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. *Clin Nutr* 2003;22:23–30.
132. Chnabel R, Blankenberg S, Lubos E, Lackner KJ, Rupprecht HJ, Espinola-Klein C i sur. Asymmetric dimethyl-arginine and the risk of cardiovascular events and death in patients with coronary artery disease: results from the AtheroGene Study. *Circ Res* 2005;97:53–9.
133. Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 2004;109:1813–8.
134. Arikan E, Karadag CH, Guldiken S. Asymmetric dimethylarginine levels in thyroid diseases. *J Endocrinol Invest* 2007;30:186-91.
135. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y i sur. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411-5.
136. Firth JD, Ratcliffe PJ. Organ distribution of the three rat endothelin messenger RNAs and the effects of ischemia on renal Gene expression. *J Clin Invest* 1992;90:1023-31.
137. Opgenorth TJ, Wu-Wong JR, Shiosaki K. Endothelin-converting enzymes in rat lung. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;171:1291-6.
138. Schini VB, Hendrickson H, Heublein DM, Burnett JC. Jr. Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 1989;165:333-4.

139. Nakaki T, Ohta M, Kato R. Inhibition by prostacyclin and carbacyclins of endothelin-induced DNA synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *PLEFA* 1991;44:237-9.
140. Lotersztajn S. Les endothelines. *Med Sci* 1993;9:1084-93.
141. Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR. Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ET_c receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem* 1993;268:19126-33.
142. Simonson MS, Dunn MJ. Cellular signaling by peptides of the endothelin gene family. *FASEB J* 1990;4:2989-3000.
143. Kawanabe Y, Nauli SM. Endothelin. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:195-203.
144. Roudrigez-Pascal F, Busnadiego O, Lagares D, Lamas S. Role of endothelin in the cardiovascular system. *Pharmacol Res* 2011; 63:463-72.
145. Simeone SM, Li MW, Paradis P, Schiff rin EL. Vascular gene expression in mice overexpressing human endothelin-1 targeted to the endothelium. *Physiol Genomics* 2011;43:148– 60.
146. Arpacı D, Karakece E, Tocoglu AG, Ergenc H, Gurol G, Ciftci IH i sur. Endocan, TGF-beta and ADMA as risk factors for endothelial dysfunction and possible vascular disease in patients with subclinical hypothyroidism. *Ann Clin Lab Sci* 2016;46:601-7.
147. Nikolac N, Šupak Smolčić V, Šimundić AM, Čelap I. Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine: National recommendations for venous blood sampling. *Biochem Med* 2013;23:242–54.
148. Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. What we need to know when calculating the coefficient of correlation? *Biochem Med* 2007;17:10–5.
149. Gharib H, Tuttle RM, Baskin JH, Fish LH, Singer PA, McDermott MT. Consensus statement: Subclinical Thyroid Dysfunction: A Joint Statement on Management from the American Association of Clinical Endocrinologists, the American Thyroid Association, and The Endocrine Society. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:581–5.
150. Biondi B, Cooper D. The clinical significance of subclinical thyroid dysfunction. *Endocrine Rev* 2008;29:76–131.
151. Balzan S, Del Carratore R, Nicolini G, Beffy P, Lubrano V, Forini F i sur: Proangiogenic effect of TSH in human microvascular endothelial cells through its membrane receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97:1763-70.
152. Khurana R, Simons M, Martin JF, Zachary IC. Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal. *Circulation* 2005;112:1813-24.

153. Herrmann J, Lerman LO, Mukhopadhyay D, Napoli C, Lerman A. Angiogenesis in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1948-57.
154. Tian L, Zhang L, Liu J, Guo T, Gao C, Ni J: Effects of TSH on the function of human umbilical vein endothelial cells. *J Mol Endocrinol* 2014;52:215-22.
155. Lu M, Yang CB, Gao L, Zhao JJ. Mechanism of subclinical hypothyroidism accelerating endothelial dysfunction (Review). *Exp Ther Med* 2015;9:3-10.
156. Geng H, Zhang X, Wang C, Zhao M, Yu C, Zhang B i sur. Even mildly elevated TSH is associated with an atherogenic lipid profile in postmenopausal women with subclinical hypothyroidism. *Endocr Res* 2015;40:1-7.
157. Kumar S, Masood T, Bhaskar N, Kumar Shah A, Tangri P, Priyanka M. Study of association of serum lipid profile, IL-6, & ADMA levels with subclinical hypothyroidism. *Journal of Pharmaceutical Negative Results* 2023;1:1430-4.
158. Ozcan O, Cakir E, Yaman H, Agkul EO, Erturk K, Beyhan Z i sur. The effects of thyroxine replacement on the levels of serum asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other biochemical cardiovascular risk markers in patients with subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol* 2005;63:203-6.
159. Monzani F, Caraccio N, Kozàkowà M, Dardano A, Vittone F, Virdis A i sur. Effect of levothyroxine replacement on lipid profile and intima-media thickness in subclinical hypothyroidism: a double-blind, placebo- controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:2099-106.
160. Packard CJ, Saito Y. Non-HDL cholesterol as a measure of atherosclerotic risk. *J Atheroscler Thromb* 2004;11:6-14.
161. Cui Y, Blumenthal RS, Flaws JA, Whiteman MK, Langenberg P, Bachorik PS i sur. Non-high-density lipoprotein cholesterol level as a predictor of cardiovascular disease mortality. *Arch Intern* 2001;161:1413-9.
162. Boger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the „L-arginine paradox” and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr* 2004;134:2842-7.
163. Tilly N, Schneider JG, Leidig-Bruckner G, Sommer U, Kasperk C. Endothelin-1 Levels in Patients with Disorders of the Thyroid Gland. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2003; 111:80-4.
164. Ahirwar AK, Singh A, Jain A, Singh A, Goswami B, Bhatnagar MK i sur. The study of markers of endothelial dysfunction in metabolic syndrome. *Horm Mol Biol Clin Invest* 2015;24:131–6.

165. Molet S, Furukawa K, Maghazechi A, Hamid Q, Giaid A. Chemokine- and cytokine-induced expression of endothelin-1 and endothelin-converting-enzyme 1 in endothelial cells. *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:333-8.
166. Turemen EE, Cetinarslan B, Sahin T, Canturk Z, Tarkun I. Endothelial dysfunction and low grade chronic inflammation in subclinical hypothyroidism due to autoimmune thyroiditis. *Endocr J* 2011;58:349-54.
167. Verma S, Li S-H, Badiwala MV, Weisel RD, Fedak PWM, Li R-K i sur. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein. *Circulation* 2002;105:1890-6.
168. Christ-Crain M, Meier C, Guglielmetti M, Huber PR, Riesen W, Staub JJ i sur. Elevated C reactive protein and homocysteine values: cardiovascular risk factors in hypothyroidism? A cross sectional and a double blind, placebo controlled trial. *Atherosclerosis* 2003;166:379-86.
169. Kvetny J, Heldgaard PE, Bladbjerg EM, Gram J: Subclinical hypothyroidism is associated with a low grade inflammation, increased triglyceride levels and predicts cardiovascular disease in males below 50 years. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61:232-8.
170. Tuzcu A, Bahceci M, Gokalp D, Tuzun Y, Gunes K: Subclinical hypothyroidism may be associated with elevated high sensitive c reactive protein (low grade inflammation) and fasting hyperinsulinemia. *Endocr J* 2005;52:89-94.
171. Findikli HA, Tutak AS. Evaluation of the Platelet Indices in Patients with Subclinical Hypothyroidism. *Archives of Clinical and Biomedical Research* 2018:199-204.
172. Coban E, Yazicioglu G, Ozdogan M. Platelet activation in subjects with subclinical hypothyroidism. *Medical science monitor: International medical journal of experimental and clinical research* 2007;13:211-21.
173. Torun AN, Uzun AK, Aksoy N. Overt and mild subclinical hypothyroidism do not influence mean platelet volume in premenopausal women having low cardiac risk. *Clin Appl Thromb Hemost* 2012;18:312-5.
174. Feng X, Zhao L, Jiang J, Ma W, Shang X, Zhou Q i sur.: Discriminatory value of carotid artery elasticity changes for the evaluation of thyroid dysfunction in patients with hashimoto's thyroiditis. *J Clin Ultrasound* 2016;44:298-304.
175. Gullu S, Sav H, Kamel N. Effects of levothyroxine treatment on biochemical and hemostasis parameters in patients with hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 2005;152:355-61.

176. Urgatz, B, Razvi S. Subclinical hypothyroidism, outcomes and management guidelines: a narrative review and update of recent literature. *Current Medical Research and Opinion* 2023;39:351–65.
177. Li X, Wang Y, Guan Q, Zhao J, Gao L. The lipid-lowering effect of levothyroxine in patients with subclinical hypothyroidism: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Endocrinol* 2017;87:1–9.
178. Liu XL, He S, Zhang SF, Wang J, Sun XF, Gong CM. Alteration of lipid profile in subclinical hypothyroidism: a meta-analysis. *Med Sci Monit* 2014;20:1432–41.
179. Abreu IM, Lau E, de Sousa Pinto B, Carvalho D. Subclinical hypothyroidism: to treat or not to treat, that is the question! a systematic review with meta-analysis on lipid profile. *Endocr Connect* 2017;6:188–99.
180. Willeit P, Tschiderer L, Allara E, Reuber K, Seekircher L, Gao L i sur. Carotid intima-media thickness progression as surrogate marker for cardiovascular risk: meta-analysis of 119 clinical trials involving 100,667 patients. *Circulation* 2020;142:621–642.
181. Gong N, Gao C, Chen X, Fang Y, Tian L. Endothelial function in patients with subclinical hypothyroidism: a meta-analysis. *Horm Metab Res* 2019;51:691–702.
182. Gao N, Zhang W, Zhang YZ, Yang Q, Chen SH. Carotid intima-media thickness in patients with subclinical hypothyroidism: a meta-analysis. *Atherosclerosis* 2013;227:18–25.
183. Zhao T, Chen B, Zhou Y, Wang X, Zhang Y, Wang H i sur. Effect of levothyroxine on the progression of carotid intima-media thickness in subclinical hypothyroidism patients: a meta-analysis. *BMJ Open* 2017;7:e016053.
184. Aziz M, Kandimalla Y, Machavarapu A. Effect of thyroxin treatment on carotid intima-media thickness (cIMT) reduction in patients with subclinical hypothyroidism (SCH): a meta-analysis of clinical trials. *J Atheroscler Thromb* 2017;24:643–59.
185. Yao K, Zhao T, Zeng L, Yang J, Liu Y, He Q i sur. Non-invasive markers of cardiovascular risk in patients with subclinical hypothyroidism: A systematic review and meta-analysis of 27 case control studies. *Sci Rep* 2018;8:4579.
186. Alibaz Oner F, Yurdakul S, Oner E, Kubat Uzun A, Erguney M. Evaluation of the effect of L-thyroxin therapy on endothelial functions in patients with subclinical hypothyroidism. *Endocrine*. 2011;40:280-4.
187. Dagre AG, Lekakis JP, Protogerou AD, Douridas GN, Papaioannou TG, Tryfonopoulos DJ i sur. Abnormal endothelial function in female patients with hypothyroidism and borderline thyroid function. *Int. J Cardiol* 2007;114:332–38.

188. Xiang GD, Pu J, Sun H, Zhao L, Yue L, Hou J. Regular aerobic exercise training improves endothelium-dependent arterial dilation in patients with subclinical hypothyroidism. *Eur J Endocrinol* 2009;161:755–61.
189. Niknam N, Khalili N, Khosravi E, Nourbakhsh M. Endothelial dysfunction in patients with subclinical hypothyroidism and the effects of treatment with levothyroxine. *Adv Biomed Res* 2016;5:38.
190. Kebapcilar L, Comlekci A, Tuncel P, Solak A, Secil M, Gencel O i sur. Effect of levothyroxine replacement therapy on paraoxonase-1 and carotid intima-media thickness in subclinical hypothyroidism. *Med Sci Monit* 2010;16:41-7.
191. Razvi S, Ingoe L, Keeka G, Oates C, McMillan C, Weaver JU. The Beneficial Effect of l-Thyroxine on Cardiovascular Risk Factors, Endothelial Function, and Quality of Life in Subclinical Hypothyroidism: Randomized, Crossover Trial, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007;5:1715–23.

8. POPIS KRATICA

AACE - Američko udruženje kliničkih endokrinologa (engl. *American Academy of Clinical Endocrinologists*)

ADMA - asimetrični dimetilarginin (engl. *asymmetric dimethylarginine*)

ATA - Američko društvo za štitnjaču (engl. *American Thyroid Association*)

ATP - adenzin trifosfat

ADP - adenzin difosfat

BTA - Britansko društvo za štitnjaču (engl. *British Thyroid Association*)

cAMP - ciklički adenzin monofosfat

CDC - Centar za kontrolu bolesti (engl. *Center for Disease Control*)

CETP - kolesterol ester transfer protein

cIMT - debljina intima-medie karotidne arterije (engl. *carotid intima-media thickness*)

CRP - C-reaktivni protein

CV - koeficijent varijacije (engl. *coefficient of variation*)

DDAH - dimetilarginin dimetilaminohidrolaza

DIT - dijodtirozin

ECE - endotelin-konvertirajući enzim (engl. *endothelin converting enzyme*)

EDHF - hiperpolarizirajući čimbenik porijeklom iz endotela (engl. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*)

EDCF - endotelne čimbenike kontrakcije (engl. *endothelial-derived constricting factors*)

EDRF - endotelni čimbenici relaksacije (engl. *endothelium-derived relaxing factors*)

ELISA - enzimimunoanaliza (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ET - endotelin

ET-1 - endotelin-1

ETA - Europsko društvo za štitnjaču (engl. *European Thyroid Association*)

ETR - endotelinski receptor

eNOS - endotelna NO sintetaza

FT3 - slobodni trijodtironin (engl. *free triiodothyronine*)

FT4 - slobodni tiroksin (engl. *free thyroxine*)

FMD - test protokolom posredovane dilatacije perifernih arterija (engl. *flow mediated dilation*)

HDL - lipoproteini visoke gustoće (engl. *high-density lipoprotein*)

hs-CRP - visokoosjetljivi C-reaktivni protein (engl. *high sensitivity C-reactive protein*)

H₂O₂ - vodikov peroksid

ICAM-1 - engl. *intercellular adhesion molecule 1*

IDL - lipoproteini srednje gustoće (engl. *intermediate-density lipoprotein*)

IDMS - engl. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*

IFCC - engl. *International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*

IL - interleukin

IRP - engl. *international reference preparation*

ITM - indeks tjelesne mase

KKS - kompletna krvna slika

LCAT - lecitin-kolesterol-aciltransferaza

LDL - lipoproteini niske gustoće (engl. *low-density lipoprotein*)

L-NMMA - monometil-L-arginin

LT3 - liotironinom

MCSF - faktor stimulacije kolonije makrofaga (engl. *macrophage colony stimulating factor*)

MCT - prijenosnik monokarboksilata (engl. *monocarboxylate transporter*)

MIT - monojodtirozin

MPV - srednji volumen trombocita

NADH - nikotinamid adenin dinukleotid

NCoR- Korepresor nuklearnog receptora (engl. *nuclear receptor corepressor*)

NO - dušikov monoksid

NTCP - natrijev/taurokolat polipeptidni kotransporter (engl. *Na⁺/taurocholate cotransporting polypeptide*)

OATP - polipeptidi koji prenose organske anione (engl. *organic anion transporting polypeptide*)

PAF-AH - aktivirajući faktor trombocita (engl. *platelet-activating factor-acetylhydrolase*)

PAI-1 - inhibitor plazminogen aktivatora-1

PDGF - trombocitni faktor rasta (engl. *platelet-derived growth factor*)

PGI₂ - prostaciklin (engl. *prostacyclin*)

PG - prostaglandin

PRMT - proteinska arginin-metiltransferaza tip 1 (engl. *protein arginine methyltransferases*)

PWV - brzina pulsnoga vala (engl. *pulse wave velocity*)

RXR - receptor za retinoid X (engl. *retinoid X receptor*)

SDMA - simetrični dimetilarginin

SH - supklinička hipotireoza

SMRT - posrednici utišavanja retinoične kiseline i receptora hormona štitnjače (engl. *silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*)

TBG - globulin koji veže tiroksin (engl. *thyroxine-binding globulin*)

TGAt - protutijela na tireoglobulin

TGF- β - transformirajući faktor rasta beta

TNF- α - faktor tumorske nekroze alfa (engl. *tumor necrosis factor alfa*)

TPOAt - protutijela na tireoidnu peroksidazu

TR - receptor hormona štitnjače (engl. *thyroid hormone receptor*)

TRE - elementi odgovora na tireoidni hormon (engl. *thyroid hormone response element*)

TRH - tireoslobađajući hormon

TSH - tireotropin

TXA - tromboksan (engl. *thromboxane*)

T3 - trijodtironin

T4 - tiroksin

VCAM-1 - engl. *vascular cell adhesion molecule 1*

VLDL - lipoproteini vrlo niske gustoće (engl. *very low-density lipoprotein*)

vWF - von Willebrandov faktor (engl. *von Willebrand factor*)

VEGF - faktor rasta vaskularnog endotela (engl. *vascular endothelial growth factor*)

WHO - Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)

9. ŽIVOTOPIS

Tihana Serdar Hiršl rođena je 16.02.1983. godine u Zagrebu gdje je pohađala osnovnu školu i XV. gimnaziju. Godine 2001. upisala je Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, smjer medicinska biokemija. Diplomirala je 2007. godine stekavši zvanje diplomiranog inženjera medicinske biokemije. Nakon pripravničkog staža u KB Dubrava, 2008. godine zaposlila se u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničke bolnice Dubrava. Specijalistički ispit iz medicinske biokemije i laboratorijske medicine položila je 2014. godine stekavši zvanje specijalista medicinske biokemije i laboratorijske medicine. Od 2019. do 2021. godine radila je u Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja Kliničkog bolničkog centra Zagreb, a od 2021. godine do danas radi u Synlab Poliklinici Hrvatska gdje obnaša funkciju voditelja kvalitete. Članica je Hrvatske komore medicinskih biokemičara i Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu.

Autor je i koautor sedam znanstvenih članaka objavljenih u časopisima indeksiranim u Current Contents i Web of Science Core Collection, dva stručna članka u ostalim časopisima te osam kongresnih priopćenja objavljenih u časopisima s međunarodnom recenzijom.

9.1. Popis objavljenih radova

1. Serdar Hiršl T , Đurić K ,Čepnija M , Zec I , Kraljević Šmalcelj M , Jukić T, Bobetić-Vranić T, Somborac-Baćura A. Levothyroxine therapy reduces endocan and total cholesterol concentrations in patients with subclinical hypothyroidism. *Biochem Medica* 2025;35:010703.
2. Bokulić A, Zec I, Goreta S, Nikolac Gabaj N, Kocijančić M, Serdar Hiršl T, Đuras A, Troha M, Stanišić L, Šupe-Domić D, Ćosić SJ, Đurić K, Marijančević D, Siter Kuprešanin M, Lukić I, Pezo A, Leniček Krleža J. Laboratory policies and practices for thyroid function tests in Croatia: survey on behalf of Working Group for Laboratory Endocrinology of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochem Med* 2022;32:030702
3. Nikolac N, Simundic AM, Kackov S, Serdar T, Dorotic A, Fumic K, Gudasic-Vrdoljak J, Klenkar K, Sambunjak J, Vidranski V. The quality and scope of information provided by medical laboratories to patients before laboratory testing: Survey of the Working Group for Patient Preparation of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Clinica chimica acta* 2015;450:104-9.
4. Serdar T, Đerek L, Unić A, Marijančević D, Marković Đ, Primorac A, Petrovečki M.. Occupational exposures in healthcare workers in University Hospital Dubrava : 10 year followup study. *Central European journal of public health*. 2013;21:150-154.
5. Unic A, Derek L, Hodak N, Marijancevic D, Cepnija M, Serdar T, Krhac M, Romić Z. Endothelins - clinical perspectives. *Biochem Med* 2011;21(3):231-42.
6. Juriček J, Đerek L, Unić A, Serdar T, Marijančević D, Živković M, Romić Ž. Analytical evaluation of the clinical chemistry analyzer Olympus AU2700 plus. *Biochem Med* 2010; 3:334-340.
7. Romić Ž, Derek L, Burek V, Unić A, Serdar T, Marijančević D, Morovic-Vergles J, Mitrovic J, Petrovecki M. Anti-cyclic citrullinated peptide and rheumatoid factor in HIV positive patients. *Rheumatol Int* 2010;12:1607-10.

9.2. Znanstveni radovi autorice iz područja teme doktorske disertacije

1. Serdar Hiršl T, Đurić K, Čepnja M, Zec I, Kraljević Šmalcelj M, Jukić T, Bobetić Vranić T, Somborac Bačura A. Levothyroxine therapy reduces endocan and total cholesterol concentrations in patients with subclinical hypothyroidism. *Biochemia Medica*. 2025;35(1):010703.
2. Bokulić A, Zec I, Goreta S, Nikolac Gabaj N, Kocijančić M, Serdar Hiršl T, Đuras A, Troha M, Stanišić L, Šupe-Domić D, Ćosić SJ, Đurić K, Marijančević D, Siter Kuprešanin M, Lukić I, Pezo A, Leniček Krleža J. Laboratory policies and practices for thyroid function tests in Croatia: survey on behalf of Working Group for Laboratory Endocrinology of the Croatian Society of Medical Biochemistry and Laboratory Medicine. *Biochem Med* 2022; 32(3):030702
3. Unic A, Derek L, Hodak N, Marijancevic D, Cepnja M, Serdar T, Krhac M, Romić Z. Endothelins - clinical perspectives. *Biochem Med* 2011;21(3):231-42.