

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mihael Plosnić

**STATUS KALCITONINA KOD PACIJENATA S HASHIMOTOVIM
TIREOIDITISOM**

Diplomski rad

Akadska godina 2018./2019.

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Vesna Boraska Perica

Split, lipanj 2019.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mihael Plosnić

**STATUS KALCITONINA KOD PACIJENATA S HASHIMOTOVIM
TIREOIDITISOM**

Diplomski rad

Akadska godina 2018./2019.

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Vesna Boraska Perica

Split, lipanj 2019.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1 Kalcitonin	2
1.2 Kalcitonin i kalcij	3
1.3 Kalcitonin, spol i godine	3
1.4 Kalcitonin i koštani sustav	4
1.5 Štitnjača	4
1.6 Hormoni štitnjače	5
1.7 Hashimotov tireoiditis	5
1.8 Terapija HT-a	6
1.9 Dosadašnja istraživanja utjecaja bolesti HT na proizvodnju kalcitonina	6
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	9
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1 Ispitivana skupina	12
3.2 Mjerenje vrijednosti kalcitonina, hormona štitnjače i protutijela štitnjače	12
3.3 Opis fenotipova ispitanika	12
3.4 Statističke analize	13
4. REZULTATI	15
5. RASPRAVA	19
6. ZAKLJUČCI	23
7. POPIS CITIRANE LITERATURE	25
8. SAŽETAK	33
9. SUMMARY	36
10. ŽIVOTOPIS	39

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Vesni Boraska Perica na prenesenom znanju i interesu za znanost te na ukazanom povjerenju, vodstvu i strpljenju u pisanju ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, pogotovo roditeljima, Damiru i Mirjani, što su me uvijek pomagali, podržavali i hrabрили da nikada ne odustanem.

Zahvaljujem se posebno svojim starijim sestrama i kolegicama, Gabrieli i Mariji Rafaeli što su me uvijek inspirirale i bile uzor.

Zahvaljujem se i svim prijateljima i kolegama što su mi uljepšali studentske dane.

1. UVOD

Kalcitonin (u daljnjem tekstu CT) je peptidni hormon kojeg proizvode i izlučuju parafolikularne (C-stanice) štitnjače (1,2). Glavna uloga CT-a je regulacija serumske razine kalcija, primarno modulacijom rada osteocita i osteoklasta, što ga čini važnim hormonom u metabolizmu kosti (3-6). Svoju kliničku primjenu, kalcitonin je pronašao u liječenju osteoporoze i dijagnozi i praćenju bolesnika liječenih od medularnog karcinoma štitnjače (7,8).

Hashimotov tireoiditis (u daljnjem tekstu HT) jedna je od najčešćih autoimunih bolesti. HT je kronični limfocitni tireoiditis obilježen ranom pojavom serumskih protutijela na dva važna proteina folikularnih stanica; tireoidnu preoksidazu i tireoglobulin (9). Oštećenja u Hashimotovom tireoiditisu nastaju preko dodatnih mehanizama; apoptoza uzrokovana T-staničnom citotoksičnošću, promjenama u međustaničnim spojevima i aktivacijom komplementa (10). Pacijenti koju boluju od HT-a imaju veća odstupanja volumena štitnjače od zdravih ispitanika; u početku bolesti je karakterističan postupni razvoj guše, a kako bolest napreduje, volumen štitnjače se smanjuje i ona postaje atrofična (11-13). Pacijenti s izraženijom atrofijom štitnjače imaju izraženije simptome hipotireoidizma (11). Uslijed autoimunog razaranja tkiva štitnjače, limfocitne infiltracije i fibroze koja nastaje, postoji mogućnost da i C-stanice budu oštećene, što bi potencijalno moglo ugroziti zalihe i izlučivanje kalcitonina.

1.1 Kalcitonin

Kalcitonin je peptidni hormon sastavljen od 32 aminokiseline koji proizvode C- stanice štitnjače (1,2). CT su 1962. godine otkrili Potts i suradnici perfuzijom preparata štitne i doštitnih žlijezda kod anesteziranog psa (3,4), a kasnije je Pearse dokazao njegovo porijeklo i prisustvo u C-stanicama štitnjače (3). Glavna uloga CT-a je regulacija serumske razine kalcija koja je suprotna djelovanju paratireoidnog hormona (u daljnjem tekstu PTH) (3,4). CT inhibira aktivnost osteoklasta i time smanjuje razgradnju kosti i otpuštanje kalcija u serum (5, 6). Istraživanja iz 1980-ih godina su dokazala da CT povećava produkciju 1,25- dihidroksi vitamina D u proksimalnom tubulu bubrega u stanjima povišene serumske razine kalcija (14,15), dok vitamin 1,25 D smanjuje produkciju CT-a u stanjima normokalcemije (16,17). Smatra se da CT podržava odlaganje kalcija i fosfata u kosti, osobito u postprandijalnom razdoblju (18). Uza sve ove funkcije, ipak se pokazalo da su PTH i 1,25- dihidroksi vitamin D mnogo potentniji regulatori serumske razine kalcija i njegovog odlaganja u kosti (18). Serumska razina CT-a je ipak našla vrlo važnu kliničku ulogu u dijagnozi i praćenju bolesnika liječenih od medularnog karcinoma štitnjače (7).

1.2 Kalcitonin i kalcij

Lučenje CT-a iz C-stanica regulirano je serumskom razinom kalcija (19). Slično PTH-u, odgovor CT-a na hiperkalcemiju tvori sigmoidalnu krivulju suprotno usmjerenu sigmoidalnoj krivulji odgovora PTH na hipokalcemiju. Više istraživanja je pokazalo kako serumska razina CT-a brzo poraste kao odgovor na akutno opterećenje kalcijem; u pokusu infuzije otopine kalcija kod hipokalcemičnih pacijenata, razine CT-a su porasle prije nego što se kod pacijenata razvila hiperkalcemija (20). U drugom istraživanju kod zdravih mladih muškaraca, peroralnim unošenjem kalcija su dokazane povišene razine CT-a koje su pozitivno korelirale s porastom vrijednosti serumskog kalcija (21). Genetskom obradom miševa kojima je “knock out” metodom uklonjen gen za receptor CT-a, izazivanje hiperkalcemije 1,25- dihidroksi vitaminom D također je rezultiralo povišenim razinama serumskog kalcija (22). Za razliku od prethodno opisanih ispitanika, istraživanja na animalnim modelima pokazala su kako kronična hiperkalcemija ima negativan utjecaj na brzinu odgovora CT-a na promjene kalcija u serumu i zalihe CT-a u C- stanicama štitnjače (23). Također, ponavljajućim opterećenjem C- stanica kalcijem *in-vitro*, zabilježen je pad sekrecije CT-a, no 2 sata nakon povratka kalcija na normalne vrijednosti sekrecija CT-a se postupno vratila na prijašnje vrijednosti (24). Kod paratireoidtomiranih štakora, 50 dana nakon intervencije pronađene su povišene zalihe CT-a u C- stanicama, što bi moglo objasniti pojačan odgovor CT-a na opterećenje kalcijem kod pacijenata s prolongiranom hipokalcemijom (20,25,26).

1.3 Kalcitonin, spol i godine

Postoje razlike u serumskim razinama CT-a između spolova i različitih dobnih skupina. Dojenčad i djeca imaju više vrijednosti serumskog CT-a od odraslih (27,28). Deftos i suradnici su zabilježili slične vrijednosti između muškaraca i žena, ali pad bazalne razine CT-a sa starenjem i njegov odgovor na infuzije kalcijem ili pentagastrinom bio je manje izražen kod žena nego muškaraca (29,30). Druga je studija pokazala niže vrijednosti bazalne i kalcijem stimulirane razine CT-a kod žena, bez opadanja vrijednosti sa starenjem (31). Jedno istraživanje je pokazalo kako bi primjena estrogena u postmenopauzalnih žena mogla povisiti razine CT-a u serumu (32). Kod žena u trudnoći i za vrijeme dojenja, serumske vrijednosti CT-a su povišene

(33,34,35). Klinička istraživanja su pokazala da žene izgube ~5-10% trabekularnog dijela kosti tijekom 6 mjeseci laktacije koje potpuno nadoknade u periodu nakon prestanka dojenja (36).

1.4 Kalcitonin i koštani sustav

Od otkrića kalcitonina u ranim 1960-im godinama, postojao je veliki interes za njegovu ulogu u zdravom funkcioniranju koštanog sustava. Poznato je da CT inhibira aktivnost osteoklasta (5,6), ali receptori za CT su također otkriveni na osteocitima, što upućuje na modulirajuću ulogu CT-a (37). Ipak, uz navedena obećavajuća otkrića, korištenje CT-a za liječenje osteoporoze nije dalo zadovoljavajuće rezultate (8). Štoviše, kod genetski modificiranih miševa (tzv. *knock-out* miš) bez gena za CT nisu se primijetili razvojni defekti (38). Nezadovoljavajući rezultati terapije osteoporoze CT-om pripisuju se činjenici da se osjetljivost osteoklasta na CT smanjuje kod prolongirane primjene istog (39,40). Pojačano formiranje kosti u odsustvu CT-a je teško objasniti, ali novija istraživanja upućuju na moguću modulirajuću ulogu CT-a. Naime, receptori za CT su pronađeni i u osteocitima što otvara mogućnost da je CT uključen u formiranje kosti preko osnovnih produkata osteocita, kao što su čimbenik rasta fibroblasta 23 i sklerozin (37).

1.5 Štitnjača

Štitnjača je jedan od najvećih endokrinih organa u ljudskom tijelu. Smještena je ispod grkljana, s objiju strana dušnika i ispred njega, na mjestu lako dostupnom palpaciji i ultrazvučnom pregledu. Luči tiroksin (T4) i trijodtironin (T3), hormone koji potiču metaboličke procese u tijelu. Lučenje tiroksina i trijodtironina primarno nadzire tireotropin (TSH) koji luči adenohipofiza. Osim navedenih, štitnjača proizvodi i luči kalcitonin (41). Štitnjača je prva endokrina žlijezda koja se pojavljuje u embrionalnom razvoju, a njezini hormoni se mogu otkriti u krvi već između 11 i 13 tjedna trudnoće (42). Histološki, štitnjača se sastoji od folikula koji sadrži koloid ispunjen pretežito tireoglobulinom i C- stanica koje se nalaze između folikula. Tireoglobulin je skladišni oblik hormona štitnjače. Štitnjača je jedina endokrina žlijezda koja proizvodi i skladišti svoje početne forme hormona te na podražaj pretvara u aktivne forme i ispušta u krvotok (43).

1.6 Hormoni štitnjače

Hormoni štitnjače, tiroksin (T4) i trijodtironin (T3), reguliraju procese ključne za normalan metabolizam u odraslih te rast i razvoj u djece (44,45,46). Status ovih hormona korelira s tjelesnom težinom osobe kao i s njezinom potrošnjom energije (47,48,49). Sukladno tome, hipertireoza, u kojoj nalazimo višak hormona štitnjače u krvi, potiče stanje ubrzanog metabolizma karakteriziranog povećanjem potrošnje energije u mirovanju, gubljenjem tjelesne mase, smanjenim razinama kolesterola, pojačanom lipolizom i glukoneogenezom (50,51). Suprotno tome, hipotireoza (pr. Hashimotov tireoiditis) podrazumijeva stanje smanjenog metabolizma koje karakterizira smanjena potrošnja energije u mirovanju, povećanje tjelesne mase, povišene razine kolesterola, smanjena lipoliza i glukoneogeneza (52). Iako T3 i T4 potiču i lipogenezu i lipolizu, neto učinak je ipak gubitak masti, a time i tjelesne mase (53). Kako bi organizam bio u stalnom stanju eutireoze, potrebno je koncentraciju navedenih hormona održavati u stalnom uskom koncentracijskom intervalu. Kontrolu koncentracije hormona T3 i T4 u krvi regulira negativnom povratnom spregom TSH i tireotropin- oslobađajući hormon (TRH- hormon hipotalamusa) (54,55). Nakon pretvorbe iz manje aktivnog T4 oblika u aktivniji T3 oblik, negativna povratna sprega i svi učinci ovih hormona u tkivima posredovani su unutarstaničnim hormonskim receptorima koji potiču gensku ekspresiju (56,57).

1.7 Hashimotov tireoiditis

Hashimotov tireoiditis ili limfocitni tireoiditis je najčešća autoimuna bolest štitnjače i jedna od najčešćih autoimunih bolesti općenito. Prvi ju je 1912. godine opisao Hakaro Hashimoto po kome je i dobila ime (58). Najčešće se javlja između 45. i 65. godine života i to pet do deset puta češće kod žena, no može biti dijagnosticirana i kod djece (59). Osnovna biokemijska karakteristika bolesti je prisutnost protutijela na dva glavna antigena štitnjače; tireoidne peroksidaze (TPO) i tireoglobulina (Tg). TPO antigen se nalazi na apikalnoj membrani tireocita i sudjeluje u važnim staničnim procesima; hormonskoj sintezi, kataliziranju oksidacije joda, jodiranje tirozinskih ostataka na molekuli tireoglobulina i spajanju jodotirozina u molekule T3 i T4. Hormoni štitnjače se sintetiziraju na molekulama Tg-a koji ujedno služi kao skladište hormona dok nema potrebe za njihovim otpuštanjem u krvotok (60). Mali dio Tg-a se otpušta u krvotok gdje mu je poluvijek trajanja otprilike 3 dana (61). Protutijela protiv TPO-a (TPOAt)

i Tg-a (TgAt) su klase IgG s visokim afinitetom za svoje antigene. TPOAt mogu aktivirati komplement i oštetiti stanicu protutijelom ovisnom citotoksičnošću (9).

Iako su protutijela prisutna, vrlo je izglednije da je oštećenje folikularnih stanica uzrokovano T-staničnom citotoksičnošću i aktivacijom mehanizama apoptoze, a protutijela služe kao korisni marker za utvrđivanje autoimune reakcije na štitnjaču. Smjernice Hrvatskog društva za štitnjaču i smjernice drugih nacionalnih društava predlažu određivanje TSH u serumu kao prvi test za otkrivanje hipotireoze. U HT-u, TPOAt su prisutna u više od 90%, a TgAt u 80% pacijenata (9,58). Godišnje 4,3% žena s pozitivnim TPOAt i blago povišenim TSH pređe u stanje hipotireoze, za razliku od 2.6% bolesnika s TPOAt negativnim nalazom. Klinička slika HT-a vrlo je varijabilna; od izolirane prisutnosti protutijela u serumu do svih prethodno navedenih znakova hipotireoze. Neki od bolesnika mogu pokazivati znakove blage tireotoksikoze koja obično prolazi spontano. Ipak, najčešće bolest započinje eutiroidnom fazom nakon koje se počinju javljati novi i pogoršavati stari simptomi i znakovi hipotireoze (62).

1.8 Terapija HT-a

Pacijenti s povišenim titrom TPOAt i normalnim testovima funkcije štitnjače (TSH i T4) ne trebaju primati terapiju. Pacijentima koji imaju povišen TSH i snižen T4 daje se zamjenska hormonska terapija sintetskim levotiroksinom. Sintetski levotiroksin se uzima peroralno, nije skup, vrlo je učinkovit u održavanju fizioloških vrijednosti hormona štitnjače i poboljšava simptome hipotireoze. Prikladno doziranje može zahtijevati provjeru vrijednosti TSH svakih 6-8 tjedana nakon promjene doze, sve dok se ne odredi prikladna doza. Jednom kad se prikladna doza uspostavi, dovoljno je provjeravati vrijednosti TSH jednom godišnje. Levotiroksin konzumiran u prikladnoj dozi nema nuspojave. Ukoliko je doza nedovoljna, pojavljuju se simptomi hipotireoze. Suprotno tome, ukoliko je doza prevelika, pojavljuju se simptomi hipertireoze (63).

1.9 Dosadašnja istraživanja utjecaja bolesti HT na proizvodnju kalcitonina

Napredovanjem HT-a s vremenom dolazi do nespecifičnog oštećenja folikularnih stanica limfocitnom infiltracijom i fibrozom, smanjenja serumske razine hormona štitnjače, izraženijih simptoma hipotireoidizma i smanjenja (atrofije) štitnjače, međutim utjecaj bolesti HT na

proizvodnju kalcitonina nije dobro istražen (11,12,13). Postoji dakle mogućnost da uslijed nespecifičnog oštećenja folikularnih stanica dolazi i do oštećenja C- stanica, koje bi se manifestiralo smanjenjem serumske razine CT-a. Nekoliko prijašnjih studija je ispitalo serumske razine CT-a u serumu pacijenata s HT-om i dalo nekonzistentne rezultate. Borges i suradnici su ispitali razine CT-a nakon istovremene i.v. infuzije kalcija i pentagastrina kod 30 zdravih ispitanika i 27 ispitanika oboljelih od HT-a, te zabilježili niže bazalne i stimulirane razine CT-a kod pacijenata oboljelih od HT-a upućujući na slabiji rad C-stanica u HT-ispitanika (64). U drugoj studiji, Jacques-Jean i suradnici podijelili su skupinu od 21 ispitanice oboljele od HT-a na dvije podskupine; 10 ispitanica u stanju hipotireoze i 11 ispitanica u stanju eutireoze koje su primale tiroidnu hormonsku nadomjesnu terapiju barem 4 mjeseca (65). Usporedivši razine CT-a između svih ispitanica oboljelih od HT-a s 24 zdrave ispitanice, također su pronađene više bazalne i stimulirane razine CT-a kod zdravih ispitanica, bez značajnih statističkih razlika između ispitanica u stanju hipotireoze i ispitanica u stanju eutireoze koje su već primale terapiju barem 4 mjeseca. U sljedećoj studiji, Poppe i suradnici podijelili su skupinu od 59 ispitanica na 4 podskupine, ovisno o ozbiljnosti bolesti, koja je definirana na osnovi bazalnog slobodnog T3, T4 i najvećih razina TSH nakon stimulacije peroralnim unosom 40 mg tireotropin oslobađajućeg hormona. Tom podjelom, ispitanicama u prvoj grupi zabilježene su vrijednosti gotovo iste kao i kontrolnoj skupini od 11 ispitanica, dok je ispitanicama u 4. skupini bila jasno izražena klinička slika hipotireoze (66). Kako bi se ispitala rezerva CT-a, nakon infuzije kalcija u jednu ruku, uzorci su se uzimali iz druge ruke u razmacima 0, 5 i 15 minuta nakon infuzije. Površinom ispod krivulje, koja se dobije spajanjem točaka vrijednosti CT-a izmjerenih u navedenim vremenskim razmacima, dobiva se numerička vrijednost koja odražava rezerve CT-a koji se izlučuje iz štitnjače stimulacijom infuzije kalcija. Ovom metodom, sukladno prethodnim studijama, zabilježene su niže rezerve CT-a kod bolesnica oboljelih od HT-a, s naglašenom razlikom među samim skupinama u kojoj je u 4. skupini zabilježen najmanji porast serumske razine CT-a, što nanovo sugerira smanjeno lučenje CT-a u HT ispitanica, a posebno u onih s izraženijom bolesti. Suprotno prethodno navedenim studijama, neke studije su zabilježile da su povišene bazalne razine CT-a mnogo češće kod ispitanika oboljelih od HT-a. Ispitivanjem skupine od 414 ispitanika sa sumnjom na postojanje bolesti štitnjače i 362 zdravih kontrolnih ispitanika, Karanikas i suradnici zabilježili su da pacijenti oboljeli od HT-a imaju značajno češće povišenu bazalnu razinu CT-a u serumu od zdravih ispitanika (67). Druga manja studija provedena na 24 pacijenta oboljela od HT-a zabilježila je više vrijednosti CT-a kod 3 ispitanika kojima je patohistološkom analizom potvrđena hiperplazija C- stanica uz prisutne histološke znakove HT-a (68). Uviđanjem mogućnosti da je

hiperplazija C- stanica prisutna kod pacijenata oboljelih od HT-a, Guyetant i suradnici proveli su retrospektivno kvantitativno istraživanje 112 slučajeva HT-a i 19 kontrola (69). Istraživanjem je zabilježena prisutnost C- stanične hiperplazije u 20% svih bolesnika oboljelih od HT-a, od kojih je njih 4 imalo povišene vrijednosti CT. Najveća dosadašnja studija provedena je na 492 pacijenta s prisutnom gušom i 583 pacijenta bez prisutnosti guše (70). Ispitivanjem razlike u serumskim razinama CT-a između TPOAt pozitivnih i negativnih ispitanika, s i bez prisutne nodozne guše, nije pronađena razlika u serumskim razinama CT-a između TPOAt pozitivnih i negativnih ispitanika, bez obzira na spol ili prisutnost nodozne guše. Većina navedenih studija, posebno onih u kojima su pronađene niže bazalne i stimulirane razine CT-a u HT ispitanika, provedena je na manjem uzorku, tako da bi se istraživanjem većeg uzorka pacijenata oboljelih od HT-a dobili pouzdaniji podaci. Stoga smo u naše istraživanje uključili 481 ispitanika oboljelih od HT-a s ciljem provođenja sveobuhvatne analize razine CT-a s HT srodnim fenotipovima u svrhu razjašnjenja uloge bolesti HT na proizvodnju, odnosno, održavanje serumskih razina CT-a.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Utvrditi postojanje razlike u serumskim razinama CT-a između pacijenata oboljelih od HT-a koji primaju terapiju LT4 i onih koji ne primaju terapiju.
2. Utvrditi postojanje razlike u serumskim razinama CT-a između muških i ženskih pacijenata oboljelih od HT-a
3. Utvrditi postojanje povezanosti između serumskih razina CT-a i kliničkih fenotipova specifičnih za štitnjaču prikupljenih od pacijenata oboljelih od HT-a (TSH, T3, T4, fT4, TgAt, TPOAt, volumen štitnjače, trajanje bolesti, dob, BMI, BSA, broj simptoma hipotireoze, sistolički i dijastolički krvni tlak)

Hipoteza

Pacijenti oboljeli od HT-a imaju niže serumske vrijednosti CT-a zbog autoimunog razaranja tkiva štitnjače i atrofije koja posljedično nastaje uslijed progresije bolesti

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitivana skupina

U ovo istraživanje uključen je ukupno 481 ispitanik s dijagnozom HT-a. Ispitanici su prikupljeni na Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu u Kliničkom bolničkom centru (KBC) Split. Istraživanje je provedeno u sklopu HRZZ projekta „Cjelogenomska analiza povezanosti Hashimotovog tireoiditisa“, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Vesne Boraske Perice. U okviru istog projekta formirana je Hrvatska biobanka ispitanika s Hashimotovim tireoiditisom (CRO-HT). Dijagnozu HT-a postavili su liječnici specijalisti nuklearne medicine na temelju fizikalnog pregleda, ultrazvuka štitnjače, serumskih koncentracija hormona štitnjače (T3, T4, TSH) i protutijela štitnjače (TgAt, TPOAt). Od ispitanika su prikupljeni uzorci krvi za DNA izolaciju i pohranu plazme i seruma. Svi ispitanici su potpisali pismeni informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju koje su odobrila dva etička povjerenstva; Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu i Etičko povjerenstvo KBC-a Split.

3.2 Mjerenje vrijednosti kalcitonina, hormona štitnjače i protutijela štitnjače

Serumi su se analizirali na Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu u Kliničkom bolničkom centru Split. Uzorci plazme i seruma dobiveni od ispitanika pohranjeni su na temperaturi -80 °C. Koncentracija kalcitonina u serumu određena je radioimunoesej (RIA) metodom, Dia Source ImmunoAssays (Louvain-la-Neuve, Belgija) koristeći reagens čiji je kataloški broj KIP 0429. Serumske koncentracije hormona i protutijela štitnjače određeni su uporabom imunotesta automatiziranog uređaja "Liaison Biomedica Chemiluminescence Analyzer" (DiaSorin, Saluggia, Italija) u laboratoriju istog kliničkog zavoda.

3.3 Opis fenotipova ispitanika

Od ispitanika su prikupljene dvije različite ankete, jedna koju su uz pacijente ispunjavali liječnici specijalisti nuklearne medicine i druga koji su ispitanici ispunjavali samostalno. Od ispitanika su prikupljeni, i upisani u liječnički upitnik, osnovni podaci (dob, spol), vrijednosti sistoličkog i dijastoličkog tlaka, tjelesna masa i visina. Indeks tjelesne mase (BMI) i ukupna površina tijela (BSA) su naknadno izračunati.

Izračun BMI se temelji na odnosu tjelesne težine i kvadrata visine osobe i izražen je u jedinici kg / m^2 . BMI je jedan od načina procjene uhranjenosti. Izračunom BMI-a, osobe se

kategoriziraju kao pothranjene, normalne ili pretili. Od svih poznatih indeksa, indeks tjelesne mase je najuže povezan s količinom prekomjernog masnog tkiva u ljudskom tijelu (71). Računa se prema sljedećoj formuli:

$$\text{BMI} = m(\text{kg}) / h^2(\text{m})$$

BSA je izmjerena ili izračunata površina ljudskog tijela i za mnoge kliničke svrhe je bolji pokazatelj metaboličke mase od tjelesne težine jer je manje zahvaćena abnormalnom masnom tjelesnom masom.

Računa se prema formuli: $\text{BSA} = m(\text{kg})^{0.425} \times H(\text{cm})^{0.725} \times 0,007184$; gdje je masa (m) ispitanika mjerena u kilogramima i visina (H) ispitanika mjerena u centimetrima.

U anketi koju su također ispunjavali liječnici prikupljeni su podaci o 16 simptoma povezanih s HT-om, odnosno hipotireozom, koje su ispitanici osjećali prije uvođenja terapije. Na pitanja o simptomima odgovaralo se s odgovorima da ili ne. Pitanja su se odnosila na sljedeće simptome: suha koža, blijeda koža, hladna koža, gubitak dlaka, periferni edemi, lomljivost kose, osjetljivost na hladnoću, slabost, otečenost očnih kapaka, porast tjelesne težine, opstipacija, edem lica, usporen govor, dispneja, promuklost i poremećaj pamćenja. Ispitali smo korelaciju zbroja prisutnih simptoma hipotireoze kod svakog ispitanika i serumskih razina CT-a.

3.4 Statističke analize

Usporedba serumskih razina CT-a između pacijenata oboljelih od HT-a koji primaju terapiju LT4 i onih koji ne primaju terapiju:

Medijan vrijednosti CT-a između grupa pacijenata oboljelih od HT-a koji primaju terapiju levotiroksinom i onih koji ne primaju terapiju (dijelom pacijenti kojima je tek dijagnosticiran HT, dijelom pacijenti kojima je očuvana funkcija štitnjače) uspoređen je korištenjem Mann-Whitney testa. Između navedenih dviju grupa je također uspoređen broj, odnosno udio, pacijenata s povišenim razinama CT-a iznad referentnih vrijednosti (>10pg/mL) korištenjem χ^2 -testa.

Usporedba serumskih razina CT-a između muških i ženskih pacijenata oboljelih od HT-a: Uspoređene su razlike u medijanima vrijednosti CT-a između muškaraca i žena korištenjem Mann-Whitney testa.

Analiza korelacija između serumskih razina CT-a i kliničkih fenotipova specifičnih za štitnjaču: Kod svih pacijenata oboljelih od HT-a te podijeljenih u dvije skupine ovisno o uzimanju terapije levotiroksinom, su ispitane i korelacije između razine CT-a i kliničkih fenotipova (hormoni

štitnjače, razine protutijela na proteine štitnjače, volumen štitnjače, trajanje bolesti, dob, BMI, BSA, broj simptoma hipotireoze, sistolički i dijastolički tlakovi) korištenjem Spearmanovog testa korelacije. Korištena je Bonferronijeva korekcija p-vrijednosti od 0,00357 (0,05/14) kao prag statističke značajnosti. Svi fenotipovi, osim dobi i spola, su prije korelacijske analize, prilagođeni na terapiju levotiroksinom, koristeći model linearne regresije. Sve navedene korelacijske analize su napravljene i u skupinama pacijenata podijeljenih po spolu (6 skupina: sve žene, svi muškarci, žene koje primaju terapiju, žene koje ne primaju terapiju, muškarci koji primaju terapiju, muškarci koji ne primaju terapiju). Sve statističke analize su napravljene koristeći program R.

4. REZULTATI

Usporedba serumskih razina CT-a između pacijenata oboljelih od HT-a koji primaju terapiju LT4 i onih koji ne primaju terapiju:

Nisu pronađene statistički značajne razlike u medijanima razine CT-a između grupe ispitanika oboljelih od HT-a koji primaju terapiju levotiroksinom (2 pg/mL, Q1-Q3=0,9-4,4) i grupe ispitanika oboljelih od HT-a koji je ne primaju (2,3 pg/mL, Q1-Q3=2,2-4,8, P=0,393). Medijani razine CT-a u obje skupine ispitanika se nalaze unutar referentnih vrijednosti za našu populaciju. Također, udio pacijenata s povišenim razinama CT-a u navedenim dvjema grupama se ne razlikuje statistički značajno (2,9%, odnosno 5 od 173, u usporedbi s 4.6%, odnosno 13 od 283, P=0,361).

Usporedba serumskih razina CT-a između muških i ženskih pacijenata oboljelih od HT-a:

Prikaz rezultata korelacijske analize po spolovima prikazan je u tablici 2. Muškarci su imali značajno više vrijednosti CT-a nego žene (medijani: 5,7 pg/mL, Q1-Q3=2,65-7,7 u usporedbi s 2,1 pg/mL, Q1-Q3=1-4,2, P<0,001).

Analiza korelacija između serumskih razina CT-a i kliničkih fenotipova specifičnih za štitnjaču:

Nisu otkrivene statistički značajne (P<0,001) korelacije između razine CT-a i ispitivanih kliničkih fenotipova, ali je otkriveno nekoliko nominalno značajnih korelacija (P<0,05) (Tablica 1). Dob je negativno povezana s razinama CT-a kod svih pacijenata oboljelih od HT-a ($r=-0,09$, P=0,047) i svih pacijenata oboljelih od HT-a koji ne primaju terapiju. Razine TgAt su negativno povezane s razinama CT-a kod svih pacijenata oboljelih od HT-a ($r=-0,1$, P=0,04). BSA je pozitivno povezana s razinama CT-a, ali samo kod pacijenata koji primaju terapiju levotiroksinom ($r=0,16$, P=0,042).

Iz Tablice 2 se vidi da duže vrijeme trajanja bolesti pozitivno korelira s vrijednostima CT-a kod muškaraca ($r=0,43$, P=0,011). Razine TSH su jako negativno povezane s razinama CT-a, ali samo u malom uzorku muškaraca (N=14) koji primaju terapiju levotiroksinom ($r=-0,64$, P=0,016). Također, zabilježena je negativna korelacija između BMI-a i razina CT-a u grupi žena oboljelih od HT-a koje ne primaju terapiju levotiroksinom ($r=-0,13$, P=0,044). Serumске razine TgAt su u negativnoj korelaciji s razinama CT-a kod žena ($r=-0,1$, P=0,049), dok su vrijednosti kod muškaraca na granici nominalne značajnosti ($r=-0,32$, P=0,066).

Tablica 1. Nominalne povezanosti kalcitonina i kliničkih fenotipova.

Fenotipovi		Svi (N=481)	LT (N=173)	nLT (N=283)
TSH	r	-0,07	0,06	-0,05
	P	0,1567	0,4836	0,4539
T3	r	-0,01	0,06	-0,03
	P	0,8216	0,4665	0,6206
T4	r	-0,06	-0,13	0,01
	P	0,2313	0,1109	0,8982
fT4	r	0,00	0,01	0,04
	P	0,9908	0,9079	0,5425
TgAt	r	-0,10	-0,04	-0,10
	P	0,0400	0,6169	0,1033
TPOAt	r	-0,01	0,04	-0,02
	P	0,7663	0,6299	0,7559
Volumen štitnjače	r	0,09	0,06	0,11
	P	0,0655	0,4819	0,0819
Trajanje bolesti	r	-0,05	-0,08	0,00
	P	0,2778	0,2810	0,9930
Dob	r	-0,09	-0,03	-0,13
	P	0,0469	0,7105	0,0398
BMI	r	-0,01	0,11	-0,10
	P	0,7773	0,1585	0,0929
BSA	r	0,08	0,16	0,03
	P	0,0812	0,0424	0,6485
Broj simptoma hipotireoze	r	0,02	0,00	0,03
	P	0,6752	0,9645	0,6673
Sistolički tlak	r	0,01	0,03	-0,02
	P	0,9245	0,7811	0,8181
Dijastolički tlak	r	-0,01	-0,11	0,05
	P	0,8172	0,2689	0,4924

Svi-Svi pacijenti oboljeli od HT-a, LT pacijenti koji primaju terapiju levotiroksinom, nLT pacijenti koji ne primaju terapiju levotiroksinom, r- Spearmanov faktor korelacije.

Tablica 2. Nominalne povezanosti kalcitonina i kliničkih fenotipova prikazane po spolovima.

Fenotipovi		Svi M (N=36)	Svi F (N=443)	LT M (N=14)	LT F (N=159)	nLT M (N=20)	nLT F (N=262)
TSH	r	0,01	-0,09	-0,64	0,04	-0,20	-0,04
	P	0,9672	0,0844	0,0163	0,5908	0,3867	0,5267
T3	r	-0,12	-0,01	0,37	0,02	-0,30	-0,01
	P	0,4844	0,8611	0,1917	0,8400	0,1962	0,8750
T4	r	0,05	-0,06	0,45	-0,14	-0,02	0,00
	P	0,7658	0,2485	0,1119	0,0920	0,9297	0,9527
ft4	r	0,11	-0,02	0,24	-0,02	0,12	0,02
	P	0,5281	0,6111	0,4128	0,8151	0,6286	0,7711
TgAb	r	-0,32	-0,10	-0,39	-0,08	-0,24	-0,07
	P	0,0662	0,0494	0,1651	0,3612	0,3047	0,2369
TPOAb	r	-0,20	-0,01	-0,25	0,00	-0,42	0,01
	P	0,2586	0,8418	0,3825	0,9934	0,0649	0,8211
Volumen štitnjače	r	0,18	0,06	0,13	-0,03	0,19	0,09
	P	0,3449	0,2707	0,6693	0,7570	0,4591	0,1476
Trajanje bolesti	r	0,43	-0,06	0,31	-0,07	0,22	0,00
	P	0,0105	0,1809	0,3063	0,3605	0,3623	0,9792
Dob	r	-0,10	-0,09	-0,03	-0,04	-0,25	-0,11
	P	0,5763	0,0530	0,9350	0,6431	0,2794	0,0772
BMI	r	0,20	-0,07	0,44	0,02	-0,11	-0,13
	P	0,2563	0,1609	0,1158	0,8529	0,6393	0,0438
BSA	r	0,05	-0,01	0,11	0,00	-0,20	-0,03
	P	0,7619	0,8508	0,7156	0,9794	0,4199	0,6980
Broj simptoma hipotireoze	r	-0,11	0,05	-0,47	0,06	0,54	0,02
	P	0,6304	0,3631	0,1275	0,5091	0,0887	0,7289
Sistolički tlak	r	0,17	-0,03	0,62	-0,06	-0,44	-0,02
	P	0,4722	0,6372	0,0602	0,5400	0,1730	0,8344
Dijastolički tlak	r	0,00	-0,06	-0,02	-0,17	-0,07	0,03
	P	1,0000	0,3569	0,9728	0,0939	0,8275	0,6741

Svi-Svi pacijenti oboljeli od HT-a, LT pacijenti koji primaju terapiju levotiroksinom, nLT pacijenti koji ne primaju terapiju levotiroksinom, M- muškarci, F- žene, r- Spearmanov faktor korelacije

5. RASPRAVA

Ovim istraživanjem nije utvrđena značajna razlika u serumskoj koncentraciji CT-a između pacijenata oboljelih od HT-a koji primaju nadomjesnu terapiju levotiroksinom i onih koji je ne primaju, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (72). Osnovna logička pozadina za podjelu HT ispitanika u dvije skupine ovisno o primanju terapije je distinkcija, odnosno razlikovanje, HT ispitanika prema ozbiljnosti bolesti. Oni HT ispitanici koji ne primaju terapiju levotiroksinom su u ranom stadiju bolesti te oni koji imaju očuvanu funkciju štitnjače. Ispitanici na terapiji su redom oni kojima je utvrđena manifestna hipotireoza, odnosno, oni koji su u progresivnijem stadiju bolesti. Također, ovim je istraživanjem pokazano da se medijani razina CT-a u obje skupine ispitanika nalaze unutar referentnih vrijednosti za našu populaciju. Stoga rezultati cilja 1, u kojima nismo pronašli razliku u serumskim razinama CT-a između ove dvije skupine HT ispitanika, upućuju da ne dolazi do pada u proizvodnji CT uslijed progresije bolesti.

Muškarci su imali značajno više vrijednosti CT-a nego žene, što je jednako i normalnom fiziološkom stanju pri kojem zdravi muškarci također imaju više vrijednosti CT-a od žena. To se objašnjava većom staničnom masom unutar štitnjače koja je prisutna kod muškaraca (69,73), te su rezultati naše studije sukladni očekivanjima cilja 2.

U našoj studiji smo otkrili nekoliko nominalno značajnih korelacija između razine CT-a s kliničkim fenotipovima izmjenjenih u HT ispitanika (Tablica 1).

Pronašli smo negativnu korelaciju između razina CT-a i dobi kod svih pacijenata oboljelih od HT-a te onih koji ne primaju terapiju, što bi upućivalo da starenjem dolazi do smanjenja proizvodnje CT-a. Istraživanjima provedenim na zdravim ispitanicima zabilježeni su različiti rezultati povezanosti dobi i bazalne razine CT-a. Neka istraživanja su zabilježila smanjenje funkcije C- stanica sa starenjem i značajnu negativnu korelaciju, naročito kod muškaraca (29, 74,75). Za razliku od navedenih studija, ostala istraživanja nisu zabilježila statističku značajnu povezanost (6,8). Ipak, jednom od studija koje nisu dokazale povezanost razine CT-a i dobi, dokazane su više bazalne razine CT-a kod premenopausalnih nego kod postmenopausalnih žena (8). Naši rezultati su prvi koji su istraživali povezanost dobi s razinama CT-a u ispitanika s HT-om te, iako se radi o nominalnoj povezanosti, govore u prilog teoriji da dolazi do blagog smanjenja proizvodnje CT uslijed starenja kod ispitanika s bolesti HT.

Drugu nominalno značajnu korelaciju smo pronašli između povišenih razina TgAt protutijela i smanjenih razina CT-a u svih HT ispitanika (Tablica 1) te kod svih ženskih ispitanika (Tablica 2). Ovo je jedan od najznačajnijih rezultata naše studije jer negativna korelacija između

serumske razine CT-a i serumskog titra TgAt predstavlja potencijalnu kliničku korisnost, posebno za ženski dio populacije ispitanica oboljelih od HT-a, a koje predstavljaju 92% svih ispitanika u našoj studiji. Prema većim epidemiološkim studijama, žene imaju otprilike 3 puta češće pozitivna TgAt u serumu od muškaraca u ukupnoj populaciji (76,77,78). Također, žene u kasnoj perimenopauzi imaju ubrzano gubljenje koštane mase, čija godišnja stopa za lumbalne kralješke iznosi 1,8- 2,3%, a za kuk 1,0- 1.4% (79). Ukoliko se žena nalazi u razdoblju kasne perimenopauze te boluje od HT-a praćenim visokim titrom TgAt-a i, posljedično, sniženom serumskom razinom CT-a, postoji mogućnost da bude izložena većem riziku patoloških fraktura u kuku i kralješcima. Kako bi se ovakva hipoteza potvrdila, ovo istraživanje bi se moglo proširiti izradom i usporedbom denzitometrijskih snimki žena oboljelih od HT-a s visokim titrom TgAt u perimenopauzi i zdravih kontrolnih ispitanica, također u perimenopauzi.

Kao treći najznačajniji rezultat, pronašli smo pozitivne korelacije između serumskih razina CT-a i BSA kod pacijenata koji primaju terapiju levotiroksinom (Tablica 1) te negativnu korelaciju CT-a s BMI u grupi žena oboljelih od HT-a koje ne primaju terapiju levotiroksinom. U prethodnim istraživanjima zabilježena je pozitivna korelacija nekih antropoloških parametara s CT-om, osobito BMI-a. (80,81,82). U skladu s tim, našim istraživanjem je potvrđena pozitivna korelacija između CT-a i BSA u pacijenata koji primaju terapiju, što govori u prilog da je povećanje proizvodnje CT-a uslijed povećanja mase (BSA) fiziološki normalno i ne razlikuje se između zdravih ljudi i onih s liječenim HT-om. Za razliku od BSA, ovim istraživanjem nije zabilježena povezanost BMI sa serumskim razinama CT-a. Štoviše, kod žena oboljelih od HT-a koje ne primaju hormonsku nadomjesnu terapiju levotiroksinom zabilježena je negativna korelacija BMI-a sa serumskom razinom CT-a, odnosno smanjenje razine CT-a s povećanjem BMI-a. Jedno od mogućih objašnjenja za pronađenu korelaciju je činjenica da je jedan od glavnih simptoma neliječnog HT-a (i na početku bolesti) povećanje tjelesne mase, što uslijed normalne produkcije CT-a, koja ne prati povećanje mase organizma, može dovesti do nerazmjera između razina CT-a i BMI (odnosno do uočene negativne korelacije). Uz navedeno objašnjenje, postoji mogućnost da se uslijed autoimunog oštećenja štitnjače C- stanice ne obnavljaju u mjeri dovoljnoj porastu BMI-a. Ovakvo tumačenje bi se moglo ispitati patohistološkim analizama bioptata štitnjače pacijenata oboljelih od HT-a s povišenim BMI-om i usporediti ih s bioptatima štitnjače zdravih ispitanika koji također imaju povišene vrijednosti BMI-a.

Od ostalih nominalno značajnih korelacija, pronašli smo negativnu korelaciju između razine TSH i CT-a kod muškaraca koji primaju terapiju levotiroksinom, ali uzimajući u obzir veličinu uzorka (N= 14), postoji mogućnost lažno pozitivnog rezultata. Također, iako je jedna od hipoteza ove studije ta da uslijed progresije bolesti, može doći do pada proizvodnje CT-a, nismo pronašli statistički značajnu povezanost serumske razine CT-a i duljine trajanja bolesti, osim nominalno pozitivne korelacije kod muškaraca. Uzimajući u obzir mali uzorak (N= 36), i ovdje snaga studije nije dovoljno velika da bi potvrdila pouzdanost pronalaska. Također, unatoč drugoj pretpostavci da proizvodnja CT-a može pasti uslijed smanjenja volumena štitnjače, koji je povezan s duljinom trajanja bolesti i razinom staničnog oštećenja (11, 83, 84), nisu pronađene statistički značajne korelacije između volumena štitnjače i serumskih razina CT-a.

Neke od patohistoloških studija su zabilježile postojanje C- stanične hiperplazije uz znakove HT-a (68). Jednim je istraživanjem dokazano da 20% pacijenata oboljelih od HT-a razvije hiperplaziju C- stanica, a od navedenih koji su razvili hiperplaziju njih 18% ima povišene vrijednosti CT-a što upućuje da dostatnu regulaciju serumske razine CT-a hiperplazijom C- stanica (69). Međutim, mi u našoj studiji, usporedbom između HT-ispitanika sa i bez terapije, nismo utvrdili razlike u razinama CT-a što bi uputilo na hiperplaziju C- stanica u naših ispitanika.

Ograničenje ove studije je mala snaga studije za analize korelacija u muških ispitanika. Naime, u našoj studiji je mnogo manji uzorak muških ispitanika oboljelih od HT-a (N=36) u odnosu na ženske ispitanice (N=443) što je rezultat specifičnosti bolesti i spolne distribucije.

Također, ograničenje ove studije je i nedostatak kontrolne skupine zdravih ispitanika s kojom bi se serumske razine CT-a pacijenata oboljelih od HT-a usporedile. Navedena skupina zdravih ispitanika se planira formirati u daljnjem istraživanju.

Zaključno, proveli smo najopsežniju evaluaciju statusa CT-a u velikoj kohorti ispitanika s HT-om. Nismo uočili veliki utjecaj bolesti HT na razine serumskog CT u našoj kohorti. Osim negativnog utjecaja dobi i pozitivnog utjecaja BSA na razine CT-a, kao najznačajniji rezultat s potencijalnom kliničkom važnošću, izdvajamo uočenu korelaciju između povišenja titra TgAt protutijela i smanjena razina CT-a. Rezultati ove studije uvelike doprinose razrješenju utjecaja bolesti HT na proizvodnju CT-a.

6. ZAKLJUČCI

1. Ne postoji razlika u razinama CT-a između pacijenata oboljelih od HT-a koji primaju terapiju levotiroksinom i onih koji je ne primaju te su medijani razina CT-a u obje skupine unutar referentnih vrijednosti za našu populaciju.
2. Muškarci oboljeli od HT-a imaju više serumske koncentracije CT-a od žena oboljelih od HT-a, što je jednako fiziološkom stanju
3. Pronađena je negativna korelacija između serumskih razina CT-a i dobi, odnosno pokazano je da razine CT-a blago opadaju starenjem
4. Kao najznačajniji rezultat ovog istraživanja, koji donosi nova i dosad neistražena saznanja, jest da kod bolesnika oboljelih od HT-a može doći do smanjene produkcije CT-a, ali samo u slučaju povišenog titra TgAt-a
5. U pacijenata oboljelih od HT-a koji primaju terapiju levotiroksinom povećanje BSA prati povećanje serumskih razina CT-a, što je jednako fiziološkom stanju. Nasuprot tome, u HT ispitanika bez terapije, povećanje BMI-a prati smanjenje serumskog CT-a
6. Unatoč očekivanjima na moguću povezanost atrofije štitnjače u kasnijim fazama HT-a s proizvodnjom CT-a, nisu pronađene statistički značajne korelacije između volumena štitnjače i serumskih razina CT-a

7. POPIS CITIRANE LITERATURE

1. Pearse AG. The cytochemistry of the thyroid C cells and their relationship to calcitonin. *Proc R Soc London B Bio Sci.* 1966;164:478-87.
2. Potts JT Jr. Chemistry of the calcitonins. *Bone Miner.* 1992;16:169-73.
3. Copp DH, Cheney B. Calcitonin—a hormone from the parathyroid which lowers the calcium-level of the blood. *Nature.* 1962;193:381-2.
4. Copp D, Cameron EC, Cheney BA, Davidson AG, Henze KG. Evidence for calcitonin—a new hormone from the parathyroid gland that lowers blood calcium. *Endocrinology.* 1962;70:638-49.
5. Chambers TJ, Moore A. The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983;57:819-24.
6. Nicholson GC, Moseley JM, Sexton PM, Mendelsohn FA, Martin TJ. Abundant calcitonin receptors in isolated rat osteoclasts. Biochemical and autoradiographic characterization. *J Clin Invest.* 1986;78:355-9.
7. Costante G, Meringolo D, Durante C, Bianchi D, Nocera M, Tumino S i sur. Predictive value of serum calcitonin levels for preoperative diagnosis of medullary thyroid carcinoma in a cohort of 5817 consecutive patients with thyroid nodules. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:450-5.
8. Gruber HE, Ivey JL, Baylink DJ, Matthews M, Nelp WB, Sisom K i sur. Long-term calcitonin therapy in postmenopausal osteoporosis. *Metabolism.* 1984;33:455-64.
9. McLachlan SM, Rapoport B. Why measure thyroglobulin autoantibodies rather than thyroid peroxidase autoantibodies? *Thyroid.* 2004;14:510-20.
10. Zaletel K, Gaberšček S. Hashimoto's Thyroiditis: From Genes to the Disease. *Curr Genomics.* 2011;12(8):576-88.
11. Carlé A, Pedersen IB, Knudsen N, Perrild H, Ovesen L, Jørgensen T i sur. Thyroid volume in hypothyroidism due to autoimmune disease follows a unimodal distribution: evidence against primary thyroid atrophy and autoimmune thyroiditis being distinct diseases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:833-839.
12. Nordmeyer JP, Shafeh TA, Heckmann C. Thyroid sonography in autoimmune thyroiditis. A prospective study on 123 patients. *Acta Endocrinol.* 1990;122:391-5.
13. Bülow Pedersen I, Laurberg P, Knudsen N, Jørgensen T, Perrild H, Ovesen L i sur. A population study of the association between thyroid autoantibodies in serum and abnormalities in thyroid function and structure. *Clin Endocrinol.* 2005;62:713-20.

14. Kawashima H, Torikai S, Kurokawa K. Calcitonin selectively stimulates 25-hydroxyvitamin D₃-1 alpha-hydroxylase in proximal straight tubule of rat kidney. *Nature*. 1981;291:327-9.
15. Jaeger P, Jones W, Clemens TL, Hayslett JP. Evidence that calcitonin stimulates 1,25-dihydroxyvitamin D production and intestinal absorption of calcium in vivo. *J Clin Invest*. 1986;78:456-61.
16. Naveh-Many T, Silver J. Regulation of calcitonin gene transcription by vitamin D metabolites in vivo in the rat. *J Clin Invest*. 1988;81:270-3.
17. Naveh-Many T, Raue F, Grauer A, Silver J. Regulation of calcitonin gene expression by hypocalcemia, hypercalcemia, and vitamin D in the rat. *J Bone Miner Res*. 1992;7:1233-7.
18. Talmage RV, Grubb SA, Norimatsu H, Vanderwiel CJ. Evidence for an important physiological role for calcitonin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980;77:609-13.
19. Felsenfeld AJ, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E. Dynamics of parathyroid hormone secretion in health and secondary hyperparathyroidism. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2007;2:1283-305.
20. Deftos LJ, Powell D, Parthemore JG, Potts JT Jr. Secretion of calcitonin in hypocalcemic states in man. *J Clin Invest*. 1973;52:3109-14.
21. Austin LA, Heath H, III, Go VLW. Regulation of calcitonin secretion in normal man by changes of serum calcium within the physiologic range. *J Clin Invest*. 1979;64:1721-4.
22. Davey RA, Turner AG, McManus JF, Chiu WS, Tjahjono F, Moore AJ i sur. Calcitonin receptor plays a physiological role to protect against hypercalcemia in mice. *J Bone Miner Res*. 2008;23:1182-93.
23. Raue F, Deutsche I, Küntzel C, Ziegler R. Reversible diminished calcitonin secretion in the rat during chronic hypercalcemia. *Endocrinology*. 1984;115:2362-7.
24. Scherübl H, Raue F, Zopf G, Hoffmann J, Ziegler R. Reversible desensitization of calcitonin secretion by repetitive stimulation with calcium. *Mol Cell Endocrinol*. 1989;63:263-6.
25. Peng T-C, Garner SC. Hypercalcitoninemia associated with return of serum calcium concentration toward normal in chronically parathyroidectomized rats. *Endocrinology*. 1979;104:1624-30.
26. Raue F, Wieland U, Weiler C, Ziegler R. Enhanced calcitonin secretion in the rat after parathyroidectomy and during chronic calcium deprivation. *Eur J Clin Invest*. 1988;18:284-9.

27. Klein GL, Wadlington EL, Collins ED, Catherwood BD, Deftos LJ. Calcitonin levels in sera of infants and children. Relations to age and periods. *Calcif Tissue Int.* 1984;36:635-8.
28. Body JJ, Chanoine JP, Dumon JC, Delange F. Circulating calcitonin levels in healthy children and subjects with congenital hypothyroidism from birth to adolescence. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77:565-7.
29. Deftos LJ, Weisman MH, Williams GW, Karpf DB, Frumar AM, Davidson BJ i sur. Influence of age and sex on plasma calcitonin in human beings. *N Engl J Med.* 1980;302:1351-3.
30. Parthemore JG, Deftos LJ. Calcitonin secretion in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1978;47:184-8.
31. Tiegs RD, Body JJ, Barta JM, Heath H 3rd. Secretion and metabolism of monomeric human calcitonin: effects of age, sex, and thyroid damage. *J Bone Miner Res.* 1986;1:339-9.
32. Stevenson JC, Abeyasekera G, Hillyard CJ, Phang KG, MacIntyre I, Campbell S i sur. Calcitonin and calcium-regulating hormones in postmenopausal women: effect of oestrogens. *Lancet.* 1981;317:693-5.
33. Kumar R, Cohen WR, Silva P, Epstein FH. Elevated 1,25-dihydroxyvitamin D plasma levels in normal human pregnancy and lactation. *J Clin Invest.* 1979;63:342-4.
34. Stevenson JC, Hillyard CJ, MacIntyre I, Cooper H, Whitehead MI. A physiological role for calcitonin: Protection of the maternal skeleton. *Lancet.* 1979;314:769-70.
35. Woodrow JP, Sharpe CJ, Fudge NJ, Hoff AO, Gagel RF, Kovacs CS. Calcitonin plays a critical role in regulating skeletal mineral metabolism during lactation. *Endocrinology.* 2006;147:4010-21.
36. Kovacs CS, Kronenberg HM. Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr Rev.* 1997;18:832-72.
37. Davey RA, Findlay DM. Calcitonin: physiology or fantasy? *J Bone Miner Res.* 2013;28:973-9.
38. Hoff AO, Catala-Lehnen P, Thomas PM, Priemel M, Rueger JM, Nasonkin I i sur. Increased bone mass is an unexpected phenotype associated with deletion of the calcitonin gene. *J Clin Invest.* 2002;110:1849-57.
39. Heersche JNM. Calcitonin effects on osteoclastic resorption: the 'escape phenomenon' revisited. *Bone Miner.* 1992;16:174-7.

40. Wada S, Udagawa N, Akatsu T, Nagata N, Martin TJ, Findlay DM. Regulation by calcitonin and glucocorticoids of calcitonin receptor gene expression in mouse osteoclasts. *Endocrinology*. 1997;138:521-9.
41. Guyton AC, Hall JE. Metabolički hormoni štitnjače. U: Guyton AC, Hall JE, urednici. *Medicinska fiziologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2006. str. 931-43.
42. Stathatos N. Thyroid physiology. *Med Clin North Am*. 2012;96:165-173.
43. Standring S. Neck and upper neurodigestive tract. U: Standring S, urednici. *Gray's anatomy: the anatomical basis of clinical practice*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005. str. 560-4.
44. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest*. 2012;122:3035-43.
45. Cheng SY, Leonard JL, Davis PJ. Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocr Rev*. 2010;31:139-70.
46. Oetting A, Yen PM. New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2007;21:193-208.
47. Fox CS, Pencina MJ, D'Agostino RB, Murabito JM, Seely EW, Pearce EN i sur. Relations of thyroid function to body weight: cross-sectional and longitudinal observations in a community-based sample. *Arch Intern Med*. 2008;168:587-92.
48. Iwen KA, Schroder E, Brabant G. Thyroid hormone and the metabolic syndrome. *Eur Thyroid J*. 2013;2:83-92.
49. Knudsen N, Laurberg P, Rasmussen LB, Bulow I, Perrild H, Ovesen L i sur. Small differences in thyroid function may be important for body mass index and the occurrence of obesity in the population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90:4019-24.
50. Brent GA. Clinical practice. Graves' disease. *N Engl J Med*. 2008;358:2594-605.
51. Motomura K, Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. Implications for the clinical manifestation of thyrotoxicosis. *Endocrinol Metab Clin N Am*. 1998;27:1-23.
52. Brent GA. Hypothyroidism and thyroiditis. U: Melmed SP, Larsen PR, Kronenberg HM, urednici. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: Elsevier; 2012. str. 416-49.
53. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Lane JT, Thompson MP. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J Clin Invest*. 1991;87:125-32.
54. Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology*. 2009;150:1091-6.

55. Nikrodhanond AA, Ortiga-Carvalho TM, Shibusawa N, Hashimoto K, Liao XH, Refetoff S i sur. Dominant role of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *J Biol Chem.* 2006;281:5000-7.
56. Gereben B, Zavacki AM, Ribich S, Kim BW, Huang SA, Simonides WS i sur. Cellular and molecular basis of deiodinase-regulated thyroid hormone signaling. *Endocr Rev.* 2008;29:898-938.
57. Bianco AC. Minireview: cracking the metabolic code for thyroid hormone signaling. *Endocrinology.* 2011;152:3306-11.
58. Rocchi R, Rose NR, Caturegli P. Hashimoto Thyreoiditis. U: Shoenfeld Y, Cervera R, Gershwin ME. *Diagnostic Criteria in Autoimmune Diseases.* New York: Humana press; 2010. str. 217-21.
59. Pyzik A, Grywalska E, Matyjaszek-Matuszek B, Roliński J. Immune disorders in Hashimotos thyroiditis: what do we know so far? *J Immunol Res.* 2015;2015:979167.
60. Zaletel K. Determinants of thyroid autoantibody production in Hashimoto's thyroiditis. *Expert Rev Clin Immunol.* 2007;3:217-23.
61. Hocevar M, Auersperg M, Stanovnik L. The dynamics of serum thyroglobulin elimination from the body after thyroid surgery. *Eur J Surg Oncol.* 1997;23:208-10.
62. Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F i sur. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin. Endocrinol.* 1995;43:55-68.
63. Žmire J, Solter M. Bolesti štitnjače. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. *Interna medicina.* Zagreb: Naklada Ljevak; 2008. str. 1196-209.
64. Borges MF, Abelin NM, Menezes FO, Dahia PL, Toledo SP. Calcitonin deficiency in early stages of chronic autoimmune thyroiditis. *Clinical Endocrinol.* 1998;49:69-75.
65. Jacques-Jean B, Demesster-Mirkine N, Borkowski A, Suciu S, Corvilain J. Calcitonin deficiency in primary hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;62(4):700-3.
66. Poppe K, Verbruggen LA, Velkeniers B, Finne E, Body JJ, Vanhaelst L. Calcitonin reserve in different stages of atrophic autoimmune thyroiditis. *Thyroid.* 1999;9(12):1211-4.
67. Karanikas G, Moameni A, Poetzi C, Zettinig G, Kaserer K, Bieglmayer C i sur. Frequency and relevance of elevated calcitonin levels in patients with neoplastic and

- nonneoplastic thyroid disease and in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(2):515-9.
68. Barbot N, Guyetant S, Beldent V, Akraas A, Cerf I, Perdrisot R i sur. Chronic autoimmune thyroiditis and C-cell hyperplasia. Study of calcitonin secretion in 24 patients. *Ann Endocrinol.* 1991;52(2):109-12.
69. Guyetant S, Wion-Barbot N, Rousselet M-C, Franc B, Bigorgne J-C, Saint-Andre J-P. C-cell hyperplasia associated with chronic lymphocytic thyroiditis: a retrospective quantitative study of 112 cases. *Hum Pathol.* 1994;25:514-21.
70. Rosario PW, Calsolari MR. Influence of chronic autoimmune thyroiditis and papillary thyroid cancer on serum calcitonin levels. *Thyroid.* 2013;23:671-4.
71. Barker JM. Clinical review: type 1 diabetes-associated autoimmunity:natural history, genetic associations, and screening. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(4):1210-7.
72. Body JJ, Demeester-Mirkin N, Borkowski A, Suciú S, Corvilain J. Calcitonin deficiency in primary hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1986;62(4):700-3.
73. Basuyau JP, Mallet E, Leroy M, Brunelle P. Reference intervals for serum calcitonin in men, women, and children. *Clin Chem.* 2004;50(10):1828-30.
74. Morita R, Yamamoto I, Fukunaga M, Dokoh S, Konishi J, Kousaka T i sur. Changes in sex hormones and calcium regulating hormones with reference to bone mass associated with aging. *Endocrinol Jpn.* 1979;26:15-22.
75. Spencer CA, Hollowell JG, Kazarosyan M, Braverman LE. National Health and Nutrition Examination Survey III thyroid-stimulating hormone (TSH)-thyroperoxidase antibody relationships demonstrate that TSH upper reference limits may be skewed by occult thyroid dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:4236-40.
76. Lucas A, Julián MT, Cantón A, Castell C, Casamitjana R, Martínez-Cáceres EM i sur. Undiagnosed thyroid dysfunction, thyroid antibodies, and iodine excretion in a Mediterranean population. *Endocrine.* 2010;38:391-6.
77. Knudsen N, Jorgensen T, Rasmussen S, Christiansen E, Perrild H. The prevalence of thyroid dysfunction in a population with borderline iodine deficiency. *Clin Endocrinol.* 1999;51(3):361-7.

78. Pedersen IB, Knudsen N, Jørgensen T, Perrild H, Ovesen L, Laurberg P. Thyroid peroxidase and thyroglobulin autoantibodies in a large survey of populations with mild and moderate iodine deficiency. *Clin Endocrinol*. 2003;58:36-42.
79. Finkelstein JS, Brockwell SE, Mehta V, Greendale GA, Sowers MR, Ettinger B i sur. Bone mineral density changes during the menopause transition in a multiethnic cohort of women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(3):861-8.
80. d`Herbomez M, Caron P, Bauters C, Do Cao C, Schlienger JL, Sapin R; French Group GTE (Groupe des Tumeurs Endocrines). Reference range of serum calcitonin levels in humans: influence of calcitonin assays, sex, age, and cigarette smoking. *Eur J Endocrinol*. 2007;157(6):749-55.
81. Garcia-Ameijeiras A, De La Torre W, Rodriguez-Espinosa J, Perez-Perez A, De Leiva A. Does testosterone influence the post-stimulatory levels of calcitonin in normal men? *Clin Endocrinol*. 1987;27(5):545-52.
82. Shiraki M, Ito H, Fujimaki H, Higuchi T. Relation between body size and bone mineral density with special reference to sex hormones and calcium regulating hormones in elderly females. *Endocrinol Jpn*. 1991;38(4):343-9.
83. Hayashi Y, Tamai H, Fukata S, Hirota Y, Katayama S, Kuma K i sur. A long term clinical, immunological, and histological follow-up study of patients with goitrous chronic lymphocytic thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985;61:1172-8.
84. Vickery AL, Hamlin Jr E. Struma lymphomatosa (Hashimoto's thyroiditis). Observations on repeated biopsies in sixteen patients. *N Engl J Med*. 1961;264:226-9.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Utvrđiti postoji li razlika u serumskim razinama kalcitonina između pacijenata oboljelih od Hashimotovog tireoiditisa koji primaju terapiju LT4 i onih koji ne primaju terapiju. Utvrđiti postoji li razlika u serumskim razinama kalcitonina između muških i ženskih pacijenata oboljelih od Hashimotovog tireoiditisa. Utvrđiti postoji li korelacija između serumskih razina kalcitonina i kliničkih fenotipova specifičnih za štitnjaču prikupljenih od pacijenata oboljelih od Hashimotovog tireoiditisa.

Materijali i metode:

Za izradu ovog diplomskog rada su korišteni podatci koji su dobiveni u okviru HRZZ Uspostavne potpore „Cjelogenomska analiza povezanosti Hashimotovog tireoiditisa“. Formirana je baza podataka o ispitanicima oboljelim od Hashimotovog tireoiditisa, koji su prikupljeni u KBC-u Split na Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu. Korišteni su podatci o medicinskom statusu ispitanika, terapiji te razinama hormona i protutijela štitnjače (TSH, T3, T4, fT4, TgAt, TPOAt). Koncentracija kalcitonina u serumu određena je radioimunoesej (RIA) metodom.

Rezultati:

Istraživanjem smo ispitali ukupno 481 ispitanika, uzimajući u obzir trajanje bolesti, razine hormona i protutijela štitnjače, antropometrijske karakteristike te serumske razine kalcitonina u krvi. Nije utvrđena značajna razlika u serumskoj koncentraciji CT-a između pacijenata oboljelih od Hashimotovog tireoiditisa koji primaju nadomjesnu terapiju levotiroksinom i onih koji je ne primaju (N=173 u usporedbi s N=283, P=0.393). Pronađena je negativna nominalna korelacija između razina kalcitonina i dobi kod svih pacijenata oboljelih od Hashimotovog tireoiditisa (N=481, P=0.047), što bi upućivalo da starenjem dolazi do smanjenja proizvodnje kalcitonina. Kao najznačajniju novu korelaciju koju smo pronašli, izdvajamo negativnu korelaciju između TgAt i serumske razine kalcitonina koja predstavlja potencijalnu kliničku korisnost (N=481, P=0.04). Kod pacijenata oboljelih od Hashimotovog tireoiditisa koje primaju hormonsku nadomjesnu terapiju levotiroksinom zabilježena je pozitivna nominalna korelacija ukupne površine tijela sa serumskom razinom kalcitonina (N=173, P=0.042). Kod žena oboljelih od Hashimotovog tireoiditisa koje ne primaju hormonsku nadomjesnu terapiju

levotiroksinom zabilježena je negativna nominalna korelacija indeksa tjelesne mase sa serumskom razinom kalcitonina (N=262, P=0.044). Unatoč očekivanjima, nisu pronađene statistički značajne korelacije između volumena štitnjače i serumskih razina kalcitonina (N=481, P=0,066). Ostali dobiveni rezultati su u skladu s literaturom.

Zaključak:

Dokazali smo da nema razlike u serumskim razinama kalcitonina kod pacijenata oboljelih od Hashimotovog tireoiditisa koji uzimaju terapiju levotiroksinom i onih koji ne uzimaju. Dokazali smo da se serumske razine kalcitonina blago smanjuju starenjem. Prvi smo ukazali na povezanost povišene vrijednosti titra TgAt sa smanjenim serumskim vrijednostima kalcitonina. Našim radom smo pridonijeli razumijevanju uloge Hashimotovog tireoiditisa u proizvodnji i lučenju kalcitonina.

9. SUMMARY

Title:

Calcitonin status in patients with Hashimoto`s thyreoidits

Objectives:

Evaluate whether there is a difference in calcitonin levels between Hashimoto`s thyreoidits patients which are treated with levothyroxine therapy and those who are not. Evaluate whether there is a difference in calcitonin levels between male and female Hashimoto`s thyreoidits patients. Evaluate whether there is a correlation between calcitonin levels and clinical phenotypes specific for a Hashimoto`s thyreoidits.

Materials and methods:

For the purposes of this graduate thesis we obtained the data from the HRZZ under the HRZZ Installation Grant „Genome-wide association analysis of Hashimoto;s thyreoiditis“. Hashimoto`s thyreoidits patients were recruited after examination in Outpatient clinic for thyroid disorders at Department of Nuclear Medicine, University Hospital of Split. The obtained data included medical status of the subjects, therapy, and levels of hormones and thyroid antibodies (TSH, T3, T4, fT4, TgAb, TPOAb). Calcitonine concentrations were determined by radioimmunoassay method.

Results:

We have characterized 481 subjects in this study, focusing on hormone levels, thyroid antibodies, anthropometric characteristics and calcitonin levels. We discovered no correlation between calcitonin levels in groups of patients which are treated with levothyroxine therapy and those who are not (N=173 compared to N=283, P=0.393). We revealed negative nominal correlation between calcitonin levels and age of our subjects (N=481, P=0.047), which indicates that calcitonin levels mildly decrease with ageing. The most important new correlation that we observed is nominally significant negative correlation between TgAb and calcitonin levels (N=481, P=0.04), which may have clinical benefit. Positive nominal correlation between

calcitonin levels and body surface area was discovered in Hashimoto`s thyreoidits patients that receive levothyroxine therapy (N=173, P=0.042). We also discovered negative nominal correlation between body mass index and calcitonin levels in women that are not treated with levothyroxine therapy (N=262, P=0.044). Despite the expectations, no correlation between calcitonin levels and thyroid volume was discovered (N=481, P=0,066). The rest of the obtained results are consistent with the literature.

Conclusion:

We observed no differences in calcitonin levels in Hashimoto`s thyreoidits patients which receive levothyroxine therapy to those who do not. We discovered a mild decrease of calcitonin levels correlating with ageing. Furthermore, we were the first to show a connection between high levels of TgAb and low levels of calcitonin. With our work we improved the understanding of the influence of Hashimoto`s thyreoidits in production and secretion of calcitonin.

10. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI:

Ime i prezime: Mihael Plosnić

Datum rođenja: 3. veljače 1995.

Adresa: Put mira 20, Solin

Mobitel: +385 95 384 7778

E-mail: plosnicmihael@gmail.com

OBRAZOVANJE

2001.- 2007. Osnovna škola don Lovre Katić, Solin

2007.- 2009. Osnovna škola Kraljice Jelene, Solin

2009.- 2013. Prirodoslovno matematička gimnazija Split

2013.- 2019. Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

OSTALE AKTIVNOSTI

2014.- 2017. Demonstrator na katedri za medicinsku biologiju Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

2015. Demonstrator na katedri za medicinsku kemiju i biokemiju Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

2016. Demonstrator na katedri za anatomiju Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet

01.8.2016.- 01.10.2016. Clinical Internship - Odjel za pedijatriju i hitni pedijatrijski prijem Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Rim

30.9.2016. La nutrizione difficile- kongres o otežanoj prehrani, Policlinico Agostino Gemelli

19.6.2017.- 24.6.2017. ISABS Conference on Forensic and Anthropologic Genetics and Mayo Clinic Lectures in Individualized Medicine ISABS, Mayo Clinic, St. Catherine hospital

1.8.2018.- 30.9.2018. Clinical Internship - Odjel za pedijatriju i hitni pedijatrijski prijem Policlinico Universitario Agostino Gemelli, Rim

2017.- 2019. Potpredsjednik „Studentske sekcije za hitnu medicinu“

23.3.2019. Objavljen znanstveni rad: Buonsenso D, Plosnic M, Bersani G, Monaco S, Ferrara P, Chiaretti A. Paroxysmal non-epileptic events in the pediatric emergency department. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019;23(5):2188-2193.

Strani jezici- Engleski (B2), Talijanski (B1), Španjolski (A1)