

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

MAJA CVEK

**ANALIZA VITAMINA D I KALCITONINA U ISPITANIK A IZ HRVATSKE
BIOBANKE PACIJENATA S HASHIMOTOVIM TIREOIDITISOM**

Doktorski rad

Split, 2025.

SVEUČILIŠTE U SPLITU

MEDICINSKI FAKULTET

MAJA CVEK

**ANALIZA VITAMINA D I KALCITONINA U ISPITANIKI IZ HRVATSKE
BIOBANKE PACIJENATA S HASHIMOTOVIM TIREOIDITISOM**

Doktorski rad

Split, 2025.

Istraživanja su provedena u okviru znanstveno-istraživačkog HRZZ projekta „Cjelogenomska analiza povezanosti Hashimotovog tireoiditisa“ (broj projekta: 4950). Osim tog, istraživanje o povezanosti vitamina D s HT-om provedeno je dijelom u sklopu HAZU projekta „Analiza uloge vitamina D s pojavnošću i manifestacijom Hashimotovog tireoiditisa“. Oba projekta su pod vodstvom prof. dr. sc. Vesne Boraske Perice. Prikupljanje i analiziranje podataka, realiziralo se na Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu KBC-a Split i na Katedri za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta u Splitu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Vesna Boraska Perica

Najveće hvala prof. dr. sc. Vesni Boraska Perici, mojoj mentorici, na ukazanom povjerenju, na motivaciji i na svim znanstvenim savjetima koje mi je pružala od samog početka ovog izazovnog, ali inspirativnog dijela mog znanstvenog puta.

Od srca zahvaljujem prof. dr. sc. Anti Pundi, predstojniku Kliničkog zavoda za nuklearnu medicinu, što je uvijek uz stručno, poticao i znanstveno usavršavanje i tako dao značajnu podršku mom radu.

Veliko hvala prof. dr. sc. Damiru Sapunaru i prof. dr. sc. Liviji Puljak, voditeljima doktorskog studija TRIBE, na pruženoj šansi, na velikoj podršci i na svim znanstvenim i stručnim savjetima.

Hvala svim suautorima i sudionicima u istraživanjima, a posebno doc. dr. sc. Ani Barić Žižić i dr. sc. Deanu Kaličaninu.

Zahvaljujem svim djelatnicima Kliničkog zavoda za nuklearnu medicinu na poticanju i podršci, a najviše na zajedničkim godinama uspješne suradnje.

I na kraju, neizmjereno hvala mojim roditeljima i bratu, osobito mojoj kćeri Mirni što su uvijek bili uz mene, puni ljubavi i podrške, beskrajno vjerujući u mene čak i kad sam sama sumnjala u uspjeh.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. ŠTITNJAJA.....	2
1.1.1. Anatomija i histologija štitnjače.....	2
1.1.2. Funkcija i fiziologija štitnjače	4
1.2. AUTOIMUNE BOLESTI ŠTITNJAJE	10
1.2.1. Etiologija i epidemiologija	10
1.2.2. Protutijela štitnjače	12
1.2.3. Gravesova bolest.....	13
1.3. HASHIMOTOV TIREOIDITIS.....	14
1.3.1. Etiologija	14
1.3.2. Epidemiologija	15
1.3.3. Klinička slika.....	15
1.3.4. Dijagnoza	16
1.3.5. Liječenje	17
1.4. VITAMIN D.....	18
1.4.1. Metaboliti vitamina D: kolekalciferol i ergokalciferol	18
1.4.2. Izvori vitamina D	18
1.4.3. Sinteza biološki aktivnog oblika vitamina D	20
1.4.3.1. 25-hidroksivitamin D (kalcidiol).....	20
1.4.3.2. 1 α ,25-dihidroksivitamin D (kalcitriol)	21
1.4.4. Status vitamina D.....	22
1.4.4.1. Indikator statusa vitamina D u organizmu	22
1.4.4.2. Metode mjerenja 25-hidroksivitamina D	23
1.4.4.3. Referentne vrijednosti	24
1.4.5. Mehanizam djelovanja vitamina D	25
1.4.6. Deficijencija vitamina D	27
1.5. VITAMIN D I HT	27
1.6. PREHRANA I VITAMIN D.....	30
1.7. KALCITONIN I HT.....	32
1.8. PROBLEMATIKA ISTRAŽIVANJA	35
1.8.1. Vitamin D i HT	35
1.8.2. Povezanost vitamina D i prehrambenih navika kod HT ispitanika	35

1.8.3. Kalcitonin i HT.....	36
2. CILJEVI I HIPOTEZE	37
2.1. VITAMIN D I HT	38
2.2. POVEZANOST VITAMINA D I PREHRAMBENIH NAVIKA KOD HT ISPITANIKA	38
2.3. KALCITONIN I HT.....	38
2.4. VITAMIN D I HT	38
2.5. POVEZANOST VITAMINA D I PREHRAMBENIH NAVIKA KOD HT ISPITANIKA	39
2.6. KALCITONIN I HT.....	39
3. ISPITANICI I POSTUPCI.....	40
3.1. ISPITANICI	41
3.1.1. Vitamin D i HT	42
3.1.2. Povezanost vitamina D i prehrambenih navika kod HT ispitanika	43
3.1.3. Kalcitonin i HT.....	43
3.2. MATERIJALI I POSTUPCI	43
3.2.1. Mjerenje vitamina D.....	44
3.2.2. Upitnik o prehrambenim navikama HT ispitanika	44
3.2.3. Mjerenje kalcitonina.....	44
3.2.4. Statistička analiza.....	44
3.2.4.1. Vitamin D i HT	44
3.2.4.2. Povezanost vitamina D i prehrambenih navika kod HT ispitanika.....	45
3.2.4.3. Kalcitonin i HT	46
4. REZULTATI	47
4.1. VITAMIN D I HT	49
4.2. POVEZANOST VITAMINA D I PREHRAMBENIH NAVIKA KOD HT ISPITANIKA	53
4.3. KALCITONIN I HT.....	57
5. RASPRAVA.....	61
5.1. VITAMIN D I HT	62
5.2. POVEZANOST VITAMINA D I PREHRAMBENIH NAVIKA KOD HT ISPITANIKA	66
5.3. KALCITONIN I HT.....	70
6. ZAKLJUČCI	72
7. SAŽETAK.....	75
8. LAIČKI SAŽETAK	78

9. SUMMARY	80
10. LAY SUMMARY	83
11. LITERATURA.....	85
12. ŽIVOTOPIS	104

POPIS KRATICA I OZNAKA

HT - Hashimotov tireoiditis

AITD – autoimune bolesti štitnjače (engl. *autoimmune thyroid disorders*)

TPOAt – protutijela na tireoidnu peroksidazu

TgAt – protutijela na tireoglobulin

TSH – tireotropin

TRH - hormon koji oslobađa tireotropin, tireoliberin

Tg - tireoglobulin

TPO – tireoidna preoksidaza

T3 – trijodtironin

T4 – tiroksin

fT3 – slobodni trijodtironin

fT4- slobodni tiroksin

rT3 – reverzni T3

MIT - monojodtirozin

DIT - dijudtirozin

NIS – natrij-jodid simporter

ATP – adenzin trifosfat

TBG – globulin koji veže tiroksin

TTR – transtiretin

TBPA – prealbumin koji veže tiroksin

TR – receptor za hormone štitnjače

RXR – receptor za retinoid X

TRE – tireoidni regulacijski elementi

cAMP – ciklički adenzin-monofosfat

LT4 - levotiroksin

GD – Gravesova bolest

TSH-R – receptor za tireotropin

TSHRA_t – protutijela na receptore za tireotropin

TSA_t – stimulirajuća protutijela na receptore za tireotropin

TBA_t – blokirajuća protutijela na receptore za tireotropin

25(OH)D – 25-hidroksivitamin D (kalcidiol)

1,25(OH)₂D – 1,25-dihidroksivitamin D (kalcitriol)

VDBP – protein koji veže vitamin D

VDR- receptor za vitamin D

VDRE – elementi koji reagiraju na vitamin D

CYP – citokrom P450 enzimi

CYP2R1 – vitamin D 25-hidroksilaza

CYP27A1 – vitamin D₃ 25-hidroksilaza

CYP27B1 – vitamin D 1 α -hidroksilaza

CYP24A1 – vitamin D 24-hidroksilaza

PTH – paratireoidni hormon

FGF-23 – faktor rasta fibroblasta 23

mRNA – glasnička ribonukleinska kiselina

LC-MS/MS – tekućinska kromatografija s masenom spektrometrijom

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

GS-MC – plinska kromatografija s masenom spektrometrijom

RIA – radioimunoesej

EIA – enzimski imunoesej

FFQ - upitnik o prehrambenim navikama (engl. *food frequency questionnaire*)

Ct - kalcitonin

MTC – medularni karcinom štitnjače

CROHT - Hrvatska biobanka ispitanika s Hashimotovim tireoiditisom

ETA - Europska udruga za štitnjaču (engl. *European Thyroid Association*)

ATA - Američka udruga za štitnjaču (engl. *American Thyroid Association*)

BSA – ukupna površina tijela (engl. *body surface area*)

BMI - indeks tjelesne težine (engl. *body mass index*)

1. UVOD

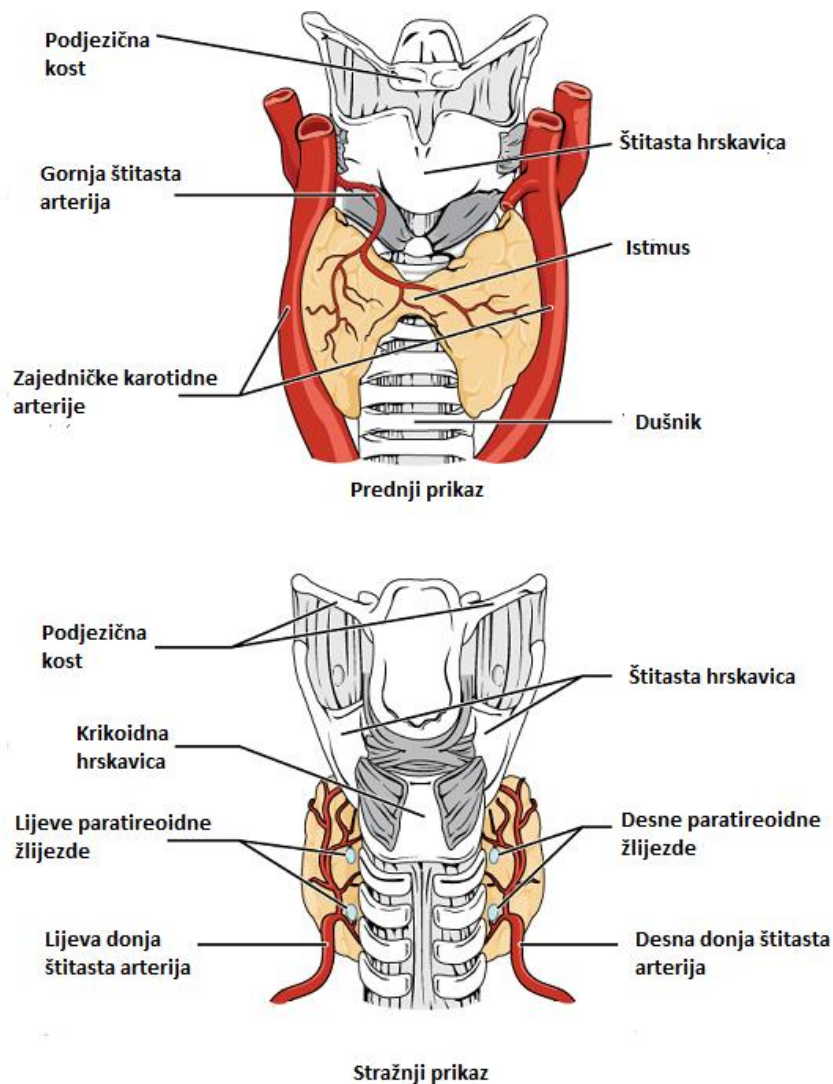
1.1. ŠTITNJAJA

1.1.1. Anatomija i histologija štitnjače

Štitnjača ili štitasta žlijezda (lat. *Glandula thyroidea*) je uz gušteraču, najveća žlijezda s endokrinim izlučivanjem u ljudskom organizmu. Smještena je u prednjem dijelu vrata (slika 1) s prosječnom težinom oko 20 g kod zdrave, odrasle osobe (1). Građena je od dva režnja: lijevog (lat. *Lobus sinister*) i desnog (lat. *Lobus dexter*) međusobno povezanih suženim dijelom, istmusom (lat. *isthmus glandulae thyroideae*) što štitnjači daje karakterističan oblik slova H (odnosno leptira) gdje okomiti krakovi odgovaraju režnjevima, a vodoravni dio istmusu (2). Režnjevi su ovalnog oblika s prosječnom duljinom od 4 cm, širinom 2.5 cm i debljinom 2-3 cm. Istmus prelazi preko prednje stijenke dušnika u razini između 2. i 4. hrskavice. Prosječna duljina i širina istmusa su otprilike 2 cm, a debljina 2-6 mm (3). Ponekad je u štitnjači prisutan i treći, piramidalni režanj (lat. *lobus pyramidalis*) koji se odvaja od istmusa kao uski tračak žljezdanog tkiva i pruža sve do jezične kosti (2).

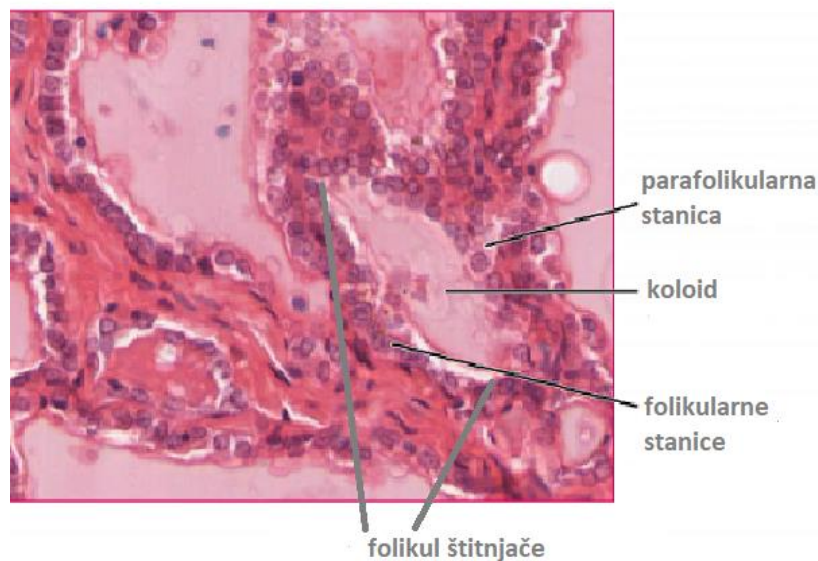
Površina štitnjače je obložena vanjskom i unutarnjom ovojnicom. Vanjska ovojnica (lat. *capsula fibrosa*) obavija žlijezdu s prednje i s lateralnih strana čvrsto je vezujući s grkljanom i dušnikom, dok sa okolnim tvorbama nije čvrsto vezana, pa neometano prati kretanje dušnika i grkljana (npr. kod gutanja). Unutarnja ovojnica je tanja, čvrsto prijanja uz štitnjaču obavijajući je sa svih strana, a tračci unutarnje ovojnice dijele ju u sitne režnjiće (4). U prostoru između vanjske i unutarnje ovojnice nalaze se krvne žile štitnjače i obično četiri doštitne žlijezde: dvije gornje (lat. *glandulae parathyroidea superior*) i dvije donje (lat. *glandulae parathyroidea inferior*) (3, 4).

Štitnjača je izrazito dobro prokrvljena, a krvlju je opskrbljuju dvije parne arterije, gornja (lat. *arteria thyroidea superior*) i donja (lat. *arteria thyroidea inferior*) štitasta arterija. Vensku krv odводе gornje (lat. *vena thyroidea superior*) i srednje (lat. *vena thyroidea media*) štitaste vene (4) koje se ulijevaju u unutarnju jugularnu venu (lat. *vena jugularis interna*) te donja štitasta vena (lat. *vena thyroidea inferior*) koja se ulijeva u lijevu brahiocefaličnu venu (lat. *v. brachiocephalica sin.*) (2).



Slika 1. Iliustracija prednje i stražnje strane štitnjače. Preuzeto i prilagođeno. Dostupno na: [File: 1811 The Thyroid Gland.jpg – Wikimedia Commons](#). Licenca CC BY 3.0

Tkivo štitnjače je građeno od velikog broja folikula (slika 2): okruglih, zatvorenih struktura različite veličine, promjera od 100–300 μm . Lumen folikula je ispunjen koloidom, a obložen je jednoslojnim epitelom koji se većim dijelom sastoji od folikularnih stanica. Glavni sastojak koloida je glikoprotein tireoglobulin (Tg) na kojem se sintetiziraju hormoni štitnjače (1). Folikularne stanice mogu biti pločaste, niske cilindrične i kubične. Izgled folikula ovisi o funkcionalnoj aktivnosti štitnjače. Kod aktivne štitnjače prevladavaju cilindrične stanice, a u slučaju smanjene aktivnosti žlijezde dominiraju folikuli izgrađeni pretežno od pločastih ili kubičnih stanica (5).



Slika 2. Prikaz mikroskopskog presjeka kroz tkivo štitnjače. Preuzeto i prilagođeno Dostupno na: File: 1811 The Thyroid Gland.jpg – Wikimedia Commons CC BY 3.0

U štitnjači se još nalaze parafolikularne ili C-stanice (slika 2) koje su prisutne unutar folikularnog epitela ili se mogu nalaziti kao nakupine između folikula. Ove stanice izlučuju kalcitonin, hormon o kojem se raspravlja u poglavlju 1.7. jer je tema doktorske disertacije (1).

1.1.2. Funkcija i fiziologija štitnjače

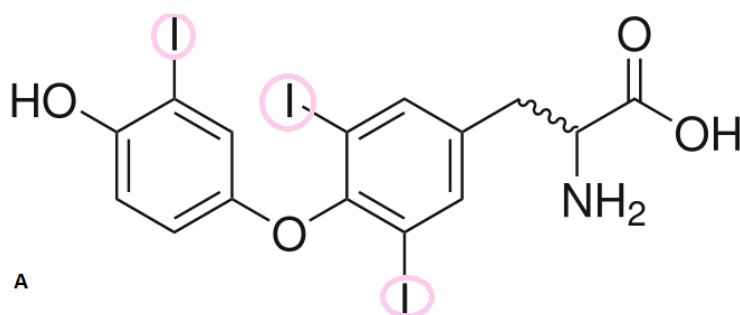
Glavna funkcija štitnjače je sinteza i izlučivanje hormona trijodtironina (T3) i tiroksina (T4) koji reguliraju metaboličke procese neophodne za rast i razvoj kao i metaboličku aktivnost u cijelom tijelu. Oba hormona štitnjače se nalaze u lumenu folikula, vezani na molekulu tireoglobulina (Tg), na kojoj se odvija i proces njihove biosinteze (6).

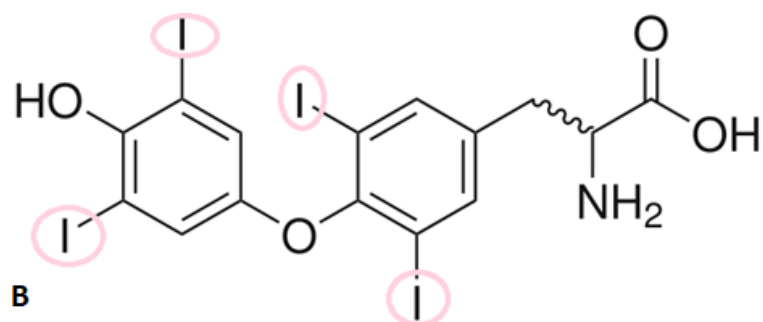
Tireoglobulin je veliki glikoprotein relativne molekularne mase 670 kDa (6) koji se sintetizira u folikularnim stanicama štitnjače, tireocitima. Sinteza započinje u endoplazmatskom retikulu, glikozilira se u Golgijevom aparatu te se, konačno, tireoglobulin iz sekretornih mjehurića izlučuje u lumen folikula (5). Na molekuli tireoglobulina nalazi se oko 70 molekula tirozina, aminokiseline na koje se vezuje jod, u obliku jodida (proces organifikacije) pri čemu nastaju monojodtirozin (MIT) i dijodtirozin (DIT) (1).

Jod je esencijalni element kojeg ljudski organizam ne može sintetizirati, a neophodan je za biosintezu hormona štitnjače, stoga se mora unijeti prehranom. Preporučena doza za odrasle je oko 200 µg joda dnevno, odnosno i do 250 µg za trudnice i dojilje (7). U tankom crijevu se

jod reducira u jodid, I^- , a svega 20% od ukupne količine jodida iz krvi apsorbira štitnjača, dok se 80% izluči bubrezima. U štitnjači je, u stanju ravnoteže, samo 1% od ukupnog joda u obliku jodida, I^- , a najveći udio odnosi se na frakciju koja je nastala dejodinacijom jod tirozina, MIT-a i DIT-a. Jodid iz krvi ulazi u tireocite kroz bazolateralnu membranu (slika 4). Unutarstanična koncentracija joda je 25-30 puta veća od koncentracije u plazmi. Prijenos joda, protivno koncentracijskom gradijentu odvija se aktivnim transportom pomoću simportera (engl. *sodium/iodide symporter*, NIS), kroz bazolateralnu membranu pri čemu se u unutrašnjost stanice prenose jedan ion joda i dva iona natrija. Energija potrebna za aktivni transport jodida dobiva se djelovanjem natrijsko-kalijske ATP crpke koja izbacivanjem natrija iz tireocita stvara koncentracijski gradijent natrija i tako olakšava njegov transport natrag u stanicu, sada u kotransportu s ionima joda (6). Prijenos jodida u lumen folikula štitnjače se odvija preko apikalne membrane uz pomoć molekule pendrin (slika 4) (1).

Biosinteza hormona štitnjače se događa na apikalnoj membrani tireocita uz prisustvo enzima tireoidne peroksidaze, TPO. Tireoidna peroksidaza je hemoprotein, sastavljen od 933 aminokiseline. Velika ekstracelularna domena, od 848 aminoiseline, okrenuta je prema lumenu folikula dok je citoplazmatska domena sastavljena od 64 aminkiseline. Ovaj enzim katalizira procese oksidacije joda i njegovog vezivanja na tirozilne ostatke na molekuli tireoglobulina, uz prisustvo oksidansa, vodikovog peroksida. Nastali jod tirozini na molekuli tireoglobulina nemaju biološku aktivnost, a prekursori su hormona štitnjače. Spajanjem jod tirozina, MIT-a i DIT-a nastaju djelatni hormoni štitnjače T_3 i T_4 (1). Oba hormona (slika 3) imaju karakterističnu, gotovo identičnu strukturu, a sastoje se od fenilnog prstena koji je eterskom vezom povezan s molekulom tirozina te dva atoma joda na prstenu tirozina. Jedina strukturna razlika između T_3 i T_4 je broj atoma joda na fenilnom prstenu; T_4 ima dva, dok T_3 ima samo jedan atom joda. Međutim, djelovanje T_3 je otprilike četiri puta jače i brže od T_4 (4). Sintetizirani hormoni štitnjače, vezani za molekule tireoglobulina, ostaju u lumenu folikula, u količini koja omogućuje normalno funkcioniranje organizma tijekom 2-3 mjeseca (1).

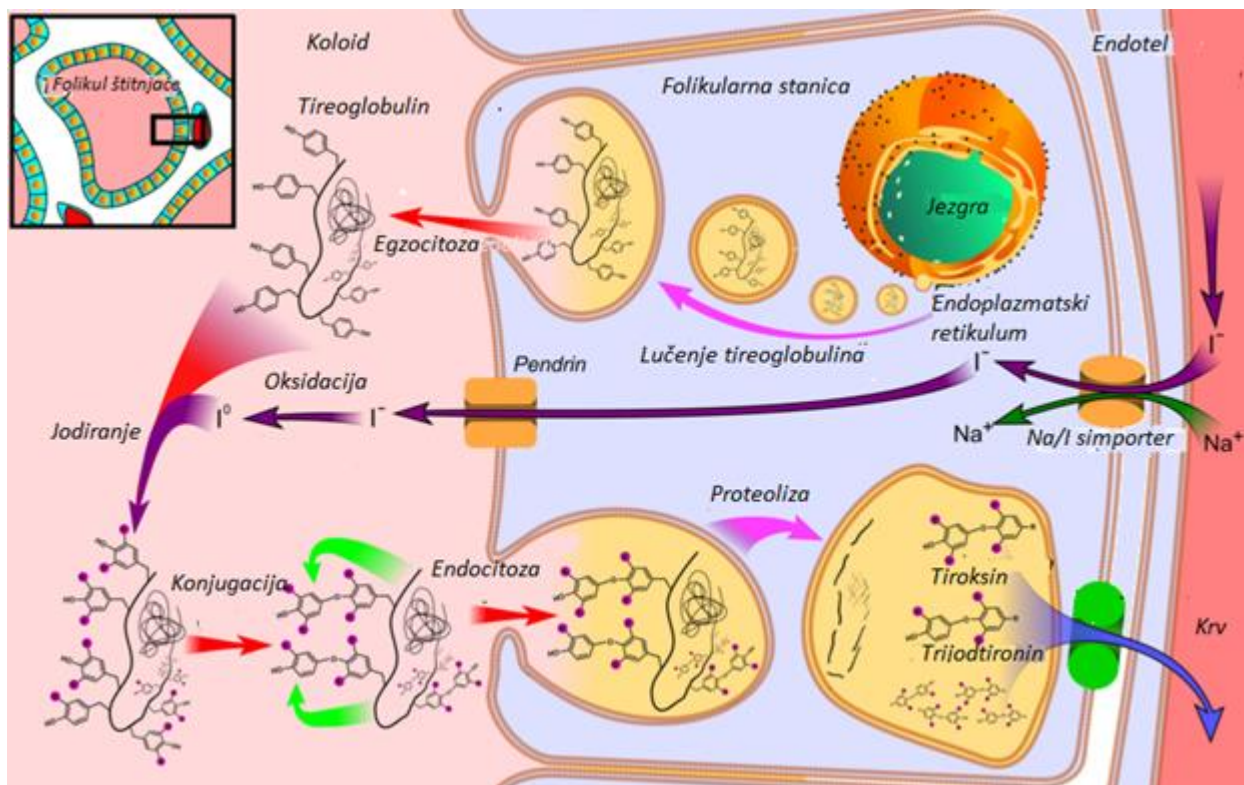




Slika 3. Strukturne formule hormona štitnjače T3 (A) i T4 (B). Preuzeto i prilagođeno. Dostupno na: <https://courses.lumenlearning.com/suny-nutrition/chapter/10-11-thyroid-hormone/> Licenca CC BY Attribution

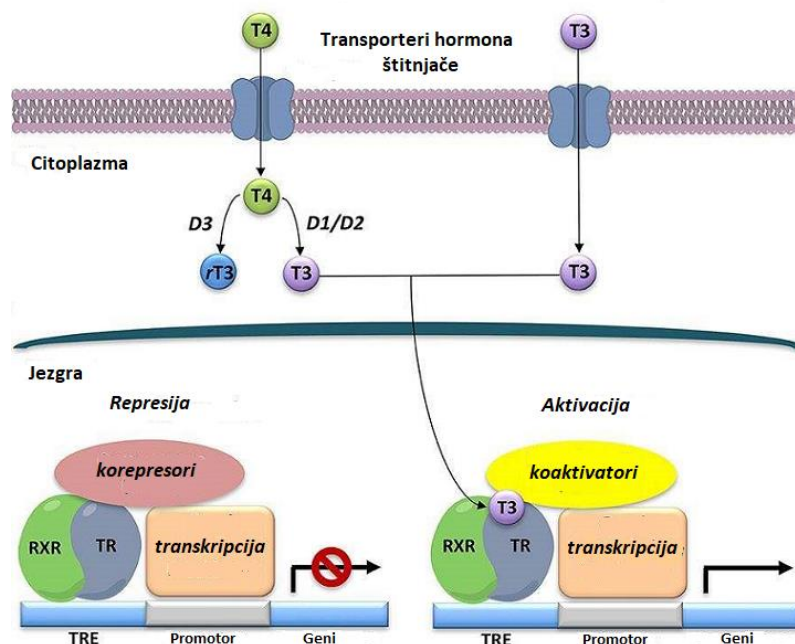
Vezivanje tireotropina (engl. *thyroid stimulating hormone*, TSH) na receptore na bazolateralnoj membrani folikularnih stanica stimulira lučenje hormona iz štitnjače. Tireotropin pinocitozom potiče unos malih dijelova koloida s apikalne strane membrane u citoplazmu folikularne stanice gdje se stapaju sa lizosomima. Sastavni dio lizosoma su enzimi proteaze čijim djelovanjem dolazi do postupne proteolize tireoglobulina (1). Hormoni T3 i T4 se odcijepi od molekula tireoglobulina i difuzijom kroz bazolateralnu membranu se otpuštaju u krv (slika 4) (1).

Od ukupne količine hormona štitnjače koji se otpuste u cirkulaciju, oko 93% je T4, a ostatak otpada na T3 (1). Veći dio T3 (oko 80%) nastaje perifernom konverzijom T4 kada se djelovanjem enzima dejodinaze uklanja jod sa vanjskog prstena T4 i dolazi do stvaranja aktivnog oblika T3. Kod uklanjanja joda s unutarnjeg prstena T4, stvara se inaktivni oblik rT3 (engl. *reverse T3*) (6). Tri su tipa dejodinaza, zastupljene u različitim tkivima i stanicama sa svrhom kontrole metaboličke aktivnosti hormona štitnjače u raznim stanjima. Osim hormona štitnjače, s molekula tireoglobulina se otpuštaju i MIT i DIT, ali za razliku od T3 i T4, oni ostaju u citoplazmi tireocita kao supstrat za enzim flavoproteinsku dejodinazu. Ovaj enzim uklanja jod s molekula jodtirozina kako bi se ponovo mogao iskoristiti u biosintezi hormona štitnjače (6).



Slika 4. Biosinteza hormona štitnjače. Preuzeto i prilagođeno: Mikael Häggström (25 July 2014). "[Medical gallery of Mikael Häggström 2014](#)". [WikiJournal of Medicine](#) **1** (2). doi:[10.15347/WJM/2014.008](#). [Wikidata Q44276778](#). ISSN [2002-4436](#). Licenca: CC0 1.0

U sistemskoj cirkulaciji su, T3 i T4, gotovo potpuno i reverzibilno vezani na različite proteinske nosače čija uloga je prijenos hormona štitnjače do ciljnih tkiva. Najznačajniji proteinski nosači su: globulin koji veže tiroksin (engl. *thyroxin byding globulin*, TBG), transtiretin (TTR) i albumin. Transtiretin je ranije bio poznat kao “prealbumin koji veže tiroksin” (TBPA). Najveći afinitet za vezanje hormona štitnjače ima TBG koji prenosi oko 65% T4 i 80% T3. Sveukupno, na proteinske nosače je vezano oko 99,7% T3 i 99,97% T4 što znači da slobodno, u nevezanom obliku, u cirkulaciji ostaje svega 0,3% T3 (engl. *free T3*, fT3) te 0,03% T4 (engl. *free T4*, fT4) koji predstavljaju fiziološki aktivne oblike hormona (6, 7). Visoki afinitet proteinskih nosača za hormone štitnjače, razlog je sporom otpuštanju T3 i T4 s proteinskih nosača u ciljne stanice. Hormoni štitnjače ulaze u ciljne stanice pomoću transmembranskih prijenosnih proteina koji posreduju i u prijenosu hormona preko stanične membrane prilikom njihovog izlaza iz stanica (8).



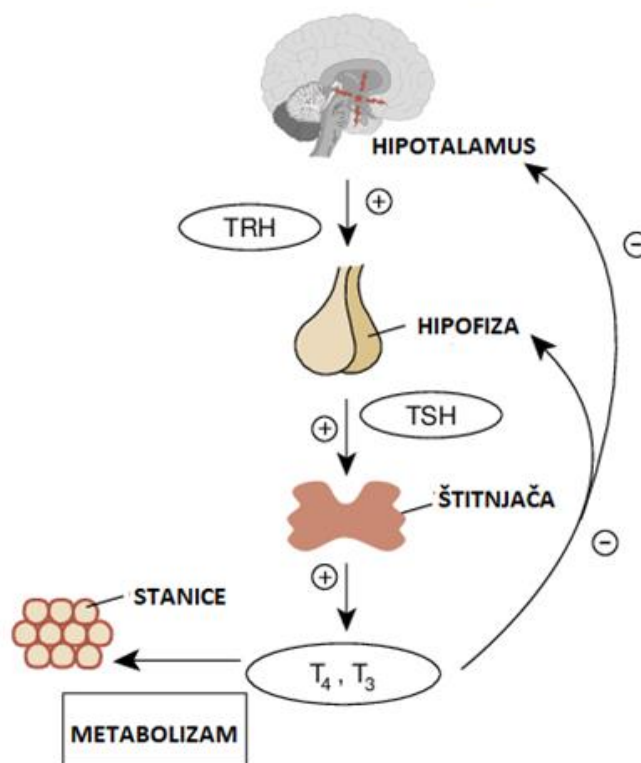
Slika 5. Genomsko djelovanje hormona štitnjače. Preuzeto i prilagođeno (9). Licenca CC BY

U ciljnim stanicama, hormoni štitnjače se vežu za nuklearne receptore regulirajući ekspresiju mnogih gena u jezgri gotovo svih stanica u ljudskom organizmu (slika 5). Iako postoji više izoformi, dva receptora hormona štitnjače su najzastupljenija, TR α i TR β (engl. *thyroid hormone receptor*), ovisno o vrsti stanica u kojima su eksprimirani. Imaju visoki afinitet za hormone štitnjače i to 10-tak puta veći za T3 u odnosu na T4 (10). Vezivanjem T3 na receptor za hormone štitnjače formira se heterodimer s receptorom za retinoid X (engl. *retinoid X receptor*, RXR). Nastali heterodimer se u staničnoj jezgri veže na tireoidne regulacijske elemente (TRE) na molekuli DNA što rezultira regulacijom ekspresije gena u ciljnim stanicama i predstavlja genomsko djelovanje hormona štitnjače (1). Negenomsko djelovanje hormona štitnjače (11), opisano još za steroidne hormone i vitamin D, nastaje vezivanjem hormona za citoplazmatske proteine povezane s aktivacijom drugog glasnika (cikličkog adenozin-monofosfata, cAMP, protein-kinaze) čiji učinci nastaju puno brže nego kod genomskog djelovanja.

Hormoni štitnjače imaju značajnu ulogu u ljudskom organizmu zbog utjecaja njihovog djelovanja od razine stanice do gotovo svih organskih sustava. Na staničnoj razini, utječu na sintezu proteina, na metabolizam ugljikohidrata, lipida i kolesterola. Povećavaju sintezu mnogih proteina, time i enzimsku aktivnost, kao i propusnost staničnih membrana za prijenos

iona što rezultira povećanom sintezom i potrošnjom ATP-a uz oslobađanje topline. Potiču metabolizam ugljikohidrata čime se povećava apsorpcija glukoze, a reguliraju koncentraciju triglicerida i kolesterola povećavajući njihovu sintezu i razgradnju. Djelovanjem na mitohondrijski metabolizam, stimulacijom staničnog disanja i oksidacijske fosforilacije, kontroliraju proizvodnju energije i kisika. Utječu na bazalni metabolizam, apetit, regulaciju tjelesne težine, održavanje tjelesne temperature i normalnu aktivnost centra za disanje. Hormoni štitnjače djeluju na rast i sazrijevanje tkiva, i što je posebno osjetljivo, potiču razvoj mozga u fetalnom razdoblju i u prvim godinama života. Povećavaju metaboličke aktivnosti u mnogim tkivima, utječu na razvoj i spolno sazrijevanje. Utječu na funkciju srca točnije srčanu frekvenciju i snagu njegove kontrakcije, na pokretljivost probavnog sustava, na središnji živčani sustav (1). Važnost hormona štitnjače u optimalnom funkcioniranju ljudskog organizma posebno dolazi do izražaja u stanjima njihove snižene (hipotireoza) ili povišene (hipertireoze) koncentracije. Tada su posljedice nepravilne aktivnosti štitnjače vidljive, a najčešće i mjerljive u radu svih gore navedenih organskih sustava. Stanje normalne funkcije štitnjače naziva se eutireoza (12).

Mehanizam negativne povratne sprege (slika 6) regulira lučenje hormona štitnjače, a djeluje preko hipotalamusa (luči tireoliberin, engl. *thyrotropin releasing hormone*, TRH) i adenohipofize (luči tireotropin, TSH). Aktivnost tireotropina (TSH) ima dominantnu ulogu u kontroli lučenja hormona štitnjače dok njegovo lučenje kontrolira TRH. Sinteza i izlučivanje TSH ovisi o aktualnoj koncentraciji T3 i T4. Pad koncentracije hormona štitnjače negativnom povratnom spregom potiče lučenje TSH, izravno na razini hipofize i neizravno potičući sintezu i izlučivanje TRH u hipotalamusu. Sintetizirani TRH se iz hipotalamusa prenosi i veže na receptore adenohipofize što rezultira povećanjem lučenja TSH. Na staničnoj razini, TSH potiče proteolizu tireoglobulina, povećava prijenos jodida u tireocite, potiče jodiranje tirozina te povećava broj i volumen stanica. Porast koncentracije hormona štitnjače koči lučenje hormona TSH što će rezultirati smanjenjem koncentracije T3 i T4, a u konačnici, održava koncentraciju hormona štitnjače stalnom (1, 6). Ove aktivnosti čine TSH osjetljivim parametrom za funkciju štitnjače što je prihvaćeno i u kliničkoj praksi (6, 12).



Slika 6. Negativna povratna sprega u kontroli lučenja hormona štitnjače.

Dostupno na: https://www.researchgate.net/figure/The-hypothalamic-pituitary-thyroid-axis-The-hypothalamus-produces-and-secretes_fig4_8025856 Preuzeto i prilagođeno.

Licenca CC PDM 1.0

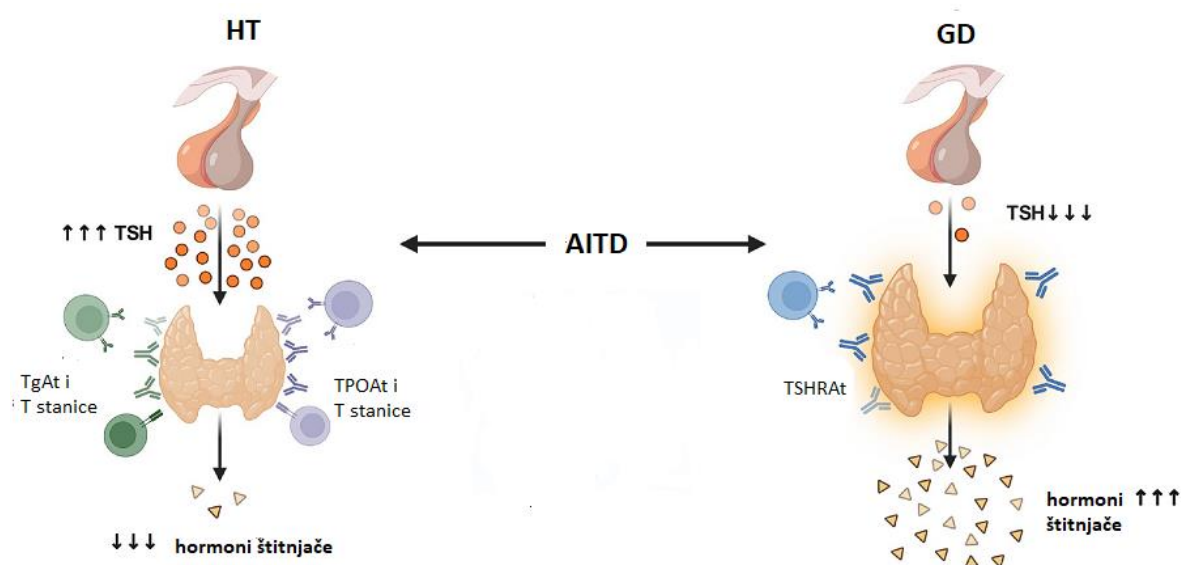
1.2. AUTOIMUNE BOLESTI ŠTITNJAČE

1.2.1. Etiologija i epidemiologija

Autoimune bolesti štitnjače (engl. *Autoimmune Thyroid Disorders*, AITD) definiraju se kao autoimuni napadi na tkivo žlijezde. Nastali su uslijed poremećene regulacije imunološkog sustava (13) odnosno gubitka imunološke tolerancije na antigene štitnjače što predstavlja temelj za razvoj AITD-a. Antigeni štitnjače su proteini čiji izražaj se odvija u samoj žlijezdi. Neophodni su za fiziološku funkciju štitnjače, a cilj su autoimunih napada kod AITD-a (13). Posljedica gubitka imunološke tolerancije je aktivacija T limfocita koji potiču sintezu medijatora upale te istodobno stimuliraju B limfocite na sintezu specifičnih protutijela na vlastito tkivo štitnjače (7). Dolazi do limfocitne infiltracije u tkivo žlijezde uz oslobađanje proupalnih citokina (13, 14) koji imaju odlučujuću ulogu u patofiziologiji AITD-a. U

konačnici, razvija se upala, postepeno dolazi do oštećenja i apoptoze folikularnih stanica, a time i do razaranja samog tkiva žlijezde, a u drugom slučaju dolazi do aktivacije receptora na tireocitima i hiperplazije štitnjače. U oba slučaja, rezultat je promjena funkcije štitnjače (13).

Ove bolesti obuhvaćaju čitav niz stanja od Gravesove bolesti (GD) na jednom kraju spektra do Hashimotovog tireoiditisa (HT) na drugom kraju (13, 15). Iako dijele sličnu etiologiju gubitka imunološke tolerancije na antigene štitnjače, klinička manifestacija im je posve suprotna; razvoj hipertireoze kod GD te hipotireoze u HT (16) (slika 7).



Slika 7. Hashimotov tireoiditis (HT), Gravesova bolest (GD). Preuzeto i prilagođeno (17).

(Slika je kreirana pomoću BioRendera) Licenca: CC BY

Autoimune bolesti štitnjače su složene odnosno multifaktorijalne bolesti koje se razvijaju kod genetski predisponiranih osoba izloženih djelovanju raznih čimbenika okoliša (18, 19) uključujući i nutritivne čimbenike (20-22). U novije vrijeme, značajan napredak je postignut u razumijevanju nastanka AITD-a, posebno uloge gena u (pato)etiologiji autoimunih bolesti štitnjače (16), ali je točan mehanizam djelovanja još uvijek nedovoljno razjašnjen (23). Stoga je ovo pitanje u fokusu mnogih istraživanja na molekularnoj i staničnoj razini (13, 24).

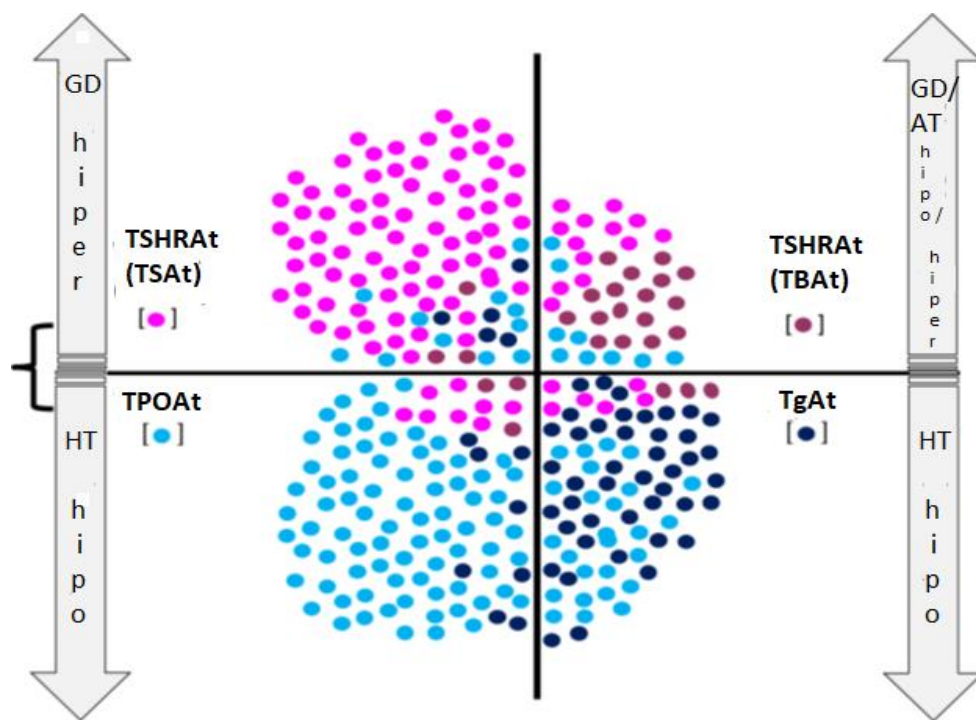
Autoimune bolesti štitnjače nisu samo najučestalije bolesti štitnjače, za koje se danas smatra da pogađaju oko 200 milijuna ljudi širom svijeta (25) već su i najučestalije autoimune bolesti općenito (15). Prevalencija AITD-a u populaciji je oko 1-5%, (26). Najviše obolijevaju žene u dobi od 30–50 god (27) i to u omjeru 4-10/1 u odnosu na muškarce (18).

1.2.2. Protutijela štitnjače

Prisutnost protutijela na antigene štitnjače u serumu pacijenata omogućuje detekciju autoimune bolesti štitnjače i prije pojave samih kliničkih simptoma (28). Glavni antigeni štitnjače na koje se u AITD-u razvijaju protutijela su: tireoidna peroksidaza TPO, tireoglobulin Tg i receptori za TSH (29) (slika 8). Protutijela na tireoidnu peroksidazu, TPOAt su prisutna kod gotovo svih bolesnika s HT-om dok povišene vrijednosti kod eutiroidnih osoba mogu biti pokazatelj rizika za razvoj bolesti štitnjače u budućnosti (18, 30, 31). Tg je glikoprotein i najzastupljeniji antigen u štitnjači. Služi kao matriks za sintezu hormona štitnjače i njihovo skladištenje. Protutijela na Tg, TgAt, mogu biti povišena kod bolesnika s AITD-om, ali su manje prediktivna u odnosu na TPOAt (13). TSH-R je receptor za tireotropin (TSH) i nepohodan je za njegovu funkciju: prijenos signala i sintezu hormona. Protutijela na TSH-R, TSHRAt, su uključena u patofiziologiju AITD-a te se njihovo mjerenje preporučuje kod bolesnika sa GD-om (32) budući da im je prevalencija 90-95% (33).

Osim navedenih, u štitnjači se još stvaraju i protutijela na transportere jodida, natrij-jodid simporter, NIS i pendrin (34, 35). NIS je glikoprotein koji posreduje u aktivnom transportu jodida duž bazolateralne membrane dok je pendrin, transmembranski protein aktivan na apikalnom dijelu membrane tireocita (34, 35). Prema dosadašnjim saznanjima, čini se da su protutijela na NIS povišena kod AITD-a, posebno kod pacijenata sa GD-om, a u usporedbi s njima, izgleda da je dijagnostička vrijednost protutijela na pendrin zanemariva (35).

Prisutnost protutijela u serumu pacijenata, važna je u dijagnostici autoimunih bolesti štitnjače (36, 37). U serumu pacijenata s HT-om prevalencija TPOAt je visoka, oko 90-95%, a TgAt oko 60-80% (29, 38). Međutim, ova protutijela ćemo pronaći i u 50-70% pacijenata s GD (39) kao što ćemo i protutijela na TSHR, glavno obilježje za GD, pronaći i u serumu 10-20% pacijenata s HT-om (37, 40). Ovisno o funkciji, razlikuju se tri podvrste protutijela na receptore za TSH, TSHRAt: stimulirajuća (TSAAt), blokirajuća (TBAAt) i neutralna protutijela (37). TSAAt djeluju kao agonisti na receptore za TSH stimulirajući nekontroliran rast štitnjače i sintezu hormona (13). Suprotno njima, TBAAt kao antagonisti blokiraju djelovanje TSH što posljedično može dovesti do HT-a (13) (slika 8). Neutralna protutijela su detektirana kod GD pacijenata, također se vezuju na receptore, ali bez utjecaja na njihovu aktivnost (41).



Slika 8. Glavna protutijela u autoimunim bolestima štitnjače. Preuzeto i prilagođeno (37).

Licenca: CC BY

Utvrđeno je da je kod nekih pojedinaca tijekom vremena došlo do promjene imunološkog odgovora kod kojeg su u početku dominirala stimulirajuća protutijela, a zatim je došlo do povećane sinteze blokirajućih i neutralnih što je rezultiralo promjenom kliničkih i biokemijskih karakteristika bolesti (42, 43). Zajednička genetska podloga pruža mogućnost međusobne konverzije GD i HT što i potvrđuju neka istraživanja (36, 44, 45).

1.2.3. Gravesova bolest

Gravesova (GD) ili Basedowljeva bolest i Hashimotov tireoiditis (HT) dvije su najučestalije autoimune bolesti štitnjače. Osim genetskih čimbenika, čimbenici okoliša igraju značajnu ulogu u patogenezi GD-a, pri čemu se kao značajan čimbenik rizika naglašava stres (46). Gravesovu bolest karakterizira povišena vrijednost protutijela TSHRAnt koja se vezuju na receptore za TSH te stimuliraju hipertrofiju folikula, hiperplaziju, povećavaju fiziološki učinak TSH odnosno sintezu hormona štitnjače (6) uz često prisutne TPOAnt i TgAnt. Žene obolijevaju do 10 puta češće od muškaraca, s najvećom učestalošću između 30. i 50. godine života (47).

Gravesova bolest je razlog nastanku hipertireoze u 60-80% slučajeva. Laboratorijski nalaz karakteriziraju niske vrijednosti TSH uz normalne ili povišene vrijednosti hormona trijodtironina, T3, i tiroksina, T4. Povišene vrijednosti TSHRA u serumu, potvrda su GD te se preporučuju u diferencijanoj dijagnostici hipertireoze (33). Ovisno o kliničkoj slici i o težini simptoma hipertireoza se može liječiti antitireoidnim lijekovima, radioaktivnim jodom ili kirurški, uklanjanjem dijela štitnjače (48).

Hashimotov tireoiditis ću izdvojiti u posebnom poglavlju, budući je tema doktorske disertacije.

1.3. HASHIMOTOV TIREOIDITIS

Hashimotov tireoiditis je najučestalija bolest štitne žlijezde i jedan od najučestalijih endokrinoloških poremećaja uopće. Uz ovaj službeni naziv, bolest je još poznata i kao autoimuni tireoiditis, kronični tireoiditis, limfocitni tireoiditis i limfomatozna struma (7).

Bolest je prvi put opisao japanski liječnik Hakaro Hashimoto, 1912. godine kada je u maloj skupini bolesnika s kroničnom bolešću štitnjače uočio, do tada, nepoznatu limfocitnu infiltraciju u štitnjači uz atrofiju žlijezde (46). Danas je jasno da je HT bolest složene etiologije, još uvijek nepotpuno razjašnjene (49).

1.3.1. Etiologija

Složenost patogeneze HT-a objašnjava se nastajanjem autoimune reakcije pod utjecajem više prisutnih čimbenika; genetska predispozicija doprinosi 70-80%, a čimbenici okoliša preostalih 20-30% (50). Smatra se da osobe sa genetskom predispozicijom imaju oko 4 puta veći rizik za razvoj HT-a dok čimbenici okoliša djeluju kao okidač za razvoj bolesti (7). Njihovo djelovanje uzrokuje gubitak imunološke tolerancije na vlastite antigene što potiče sintezu medijatora upale i citokina (51) te posljedično dolazi do infiltracije limfocita T i B u žlijezdano tkivo (7), aktivacije apoptoze tireocita i fibroze tkiva štitnjače (52). Mehanizam autoimune destrukcije uključuje smanjenje ili oštećenje supresorskih limfocita T što rezultira pojavom patoloških pomoćnih limfocita T. Ne može ih se uništiti, jer ih imunološki sustav više ne kontrolira. Sve ovo pogoduje nastanku limfocita B koji potiču izlučivanje specifičnih protutijela na vlastite antigene štitnjače razvijajući tako karakterističnu kliničku sliku bolesti (6). Posljedica autoimune upale je destrukcija tkiva štitnjače, poremećeno lučenje hormona štitnjače, najčešće uz razvoj hipotireoze. Porast pojavnosti HT-a nameće potrebu za točnom detekcijom okolišnih čimbenika koji doprinose njegovom nastanku i progresiji bolesti. Najpoznatiji i potvrđeni čimbenik okoliša je višak joda u prehrani (53). Kako bi se iskorijenila

endemska gušavost i kretinizam, provodilo se obvezno jodiranje soli, namirnice koju koristi cjelokupno stanovništvo. Profilaksa manjka joda je primjetno povećala autoimuni odgovor štitne žlijezde i prevalenciju HT-a (54, 55). Čitav niz okolišnih čimbenika predloženih kao rizični faktori za nastanak HT-a su infekcije (virusne, bakterijske) (56, 57), lijekovi (npr. interferon α , amiodaron) (58-60), kemikalije (61) (npr. poliaromatski ugljikovodici) (62, 63). Zadnjih godina, u fokusu znanstvenih istraživanja okolišnih čimbenika rizičnih za nastanak i/ili progresiju HT-a su mikronutrijenti, posebno gluten, selen i vitamin D (64, 65), mikrobiom (21, 22, 66) kao i prehrambene navike, ali i pušenje te konzumacija alkohola. Sve navedeno ističe potrebu za usvajanjem zdravog životnog stila, dokazujući njegovu važnost u prevenciju bolesti odnosno sprječavanju daljnje progresije bolesti ukoliko je ona već prisutna (67-71).

Vitamin D, kao okolišni čimbenik potencijalno povezan sa nastankom HT-a, izdvojen je u posebnom poglavlju, budući da je tema ove disertacije.

1.3.2. Epidemiologija

Procijenjuje se da danas u svijetu 1-2% populacije boluje od HT-a (27). Obolijevaju većinom žene kod kojih je bolest učestalija i to u omjeru (5-10):1, a najčešće se dijagnosticira u srednjoj životnoj dobi (7). Porastom životne dobi, raste incidencija HT-a koja je na godišnjoj razini 0,3-1,5 na 1000 ljudi (27).

Prema novijim podacima, prevalencija HT-a je 7,5% (72), ali ako gledamo po geografskim područjima odnosno kontinentima, u Europi, Južnoj i Sjevernoj Americi je od 7,8–8% dok je najniža u Aziji, 5,6% (72). Ako je pratimo prema spolu, tada je prevalencija za žene 17,5%, a muškarce 6,0%. Zanimljiva je podjela prevalencije prema socioekonomskom standardu pri čemu je bila najniža kod skupine sa srednjim do višim primanjima 5,6%, a nešto izraženija u skupini sa visokim primanjima, 8,4%. Najviša prevalencija je u skupini s niskim do srednjim primanjima, 11,4% (72). Ovi podaci mogu biti odraz životnih navika, prehrane, životnog stila i općenito informiranosti o zdravom stilu života. Prevalencija je povišena i kod HT pacijanta sa još nekim autoimunim poremećajem kao što su: sistemski eritematozni lupus, dijabetes tipa 1, Sjögrenov sindrom, reumatoidni artritis, perniciozna anemija, autoimune bolesti jetre, celijakija i multipla skleroza (73, 74).

1.3.3. Klinička slika

HT se često otkrije slučajno, na sistematskom pregledu, jer oboljeli nemaju nikakvih subjektivnih tegoba osim ponekad blagog pritiska u vratu. Najčešći simptom koji će ih odvesti

liječniku je struma tvrde, čvrstoelastične konzistencije nastala kao posljedica postepenog povećanja štitne žlijezde. Ponekad ipak štitnjača može biti bolno osjetljiva (6).

Klinička slika HT-a uključuje: a) eutireozu, kada još uvijek prevladava zdravo tkivo štitnjače te funkcionalno kompenzira oštećene tireocite; b) tireotoksikozu (prolazna), nastalu zbog oštećenja tireocita koje je dovelo do oslobađanja hormona štitnjače; c) hipotireozu zbog nedovoljne sinteze hormona štitnjače (75). Većina pacijenata je eutiroidna ili u supkliničkoj hipotireozu koja će prijeći u hipotireozu ako se ne liječi (6, 29). Široki spektar simptoma povezanih s hipotireozom podrazumijeva i utjecaj na metabolizam i na mnoge organske sustave (75).

1.3.4. Dijagnoza

Klinički pregled, laboratorijski nalazi i ultrazvučni pregled osnova su u dijagnosticiranju HT-a. Tijekom kliničkog pregleda, točnije palpacijom vrata, nalaz uvećane štitnjače, tvrde, elastične konzistencije, uglavnom bezbolne na dodir, dovoljan je razlog da se posumnja na autoimuni tireoiditis. Mogući je i nalaz smanjene štitne žlijezde zbog nastale fibroze tkiva uz kliničke znakove hipotireoze. Stoga je važna laboratorijska obrada koja uključuje mjerenje TSH, T4 (ukupni ili slobodni) radi diferencijacije subkliničke odnosno kliničke hipotireoze. Subkliničku hipotireozu karakteriziraju povišene vrijednosti TSH i uredne vrijednosti hormona štitnjače dok kod kliničke hipotireoze visoke vrijednosti TSH prate snižene vrijednosti hormona štitnjače (76).

Osim TSH i hormona štitnjače (ukupnih T3 i T4 ili slobodnih fT3 i fT4) potrebno je izmjeriti i koncentraciju protutijela TPOAt i TgAt u serumu. Oni su važno dijagnostičko obilježje autoimunog tireoiditisa uz napomenu da 5-10% pacijenata s HT-om imaju uredne vrijednosti protutijela (13, 75). Tada, a i u diferencijalnoj dijagnostici, važan je ultrazvučni pregled štitnjače. Štitnjača je najčešće normalne veličine odnosno smanjena kod već razvijene hipotireoze (75), a rjeđe povećana. Nalaz ultrazvuka karakterističan za HT pokazuje hipoehogene zone, zone odjeka nižih amplituda u odnosu na normalno tkivo štitnjače, uglavnom nehomogeno raspoređene. Konture režnjeva su neravne, s često prisutnim uvlačenjima zbog skvrčavanja parenhima, a vide se pojedinačno grubi tračci koji su glavno obilježje kroničnog autoimunog tireoiditisa. Nalaz ultrazvuka korelira sa patohistološkim gdje hipoehogena područja odgovaraju masivnoj limfocitnoj infiltraciji (7).

1.3.5. Liječenje

Liječenje HT-a ovisi o kliničkoj manifestaciji bolesti i o težini simptoma. Najvećim dijelom bolesnici s HT-om koji su eutireoidni, ne zahtijevaju liječenje, jer simptoma gotovo da i nema, struma je mala, štitnjača može funkcionirati uredno godinama, ali je obvezna redovita kontrola TSH i hormona štitnjače. Liječenje subkliničke hipotireoze nema preporučeni protokol te ovisi o razinama TSH, dobi i pozitivnosti protutijela na štitnjaču (6). Ukoliko je došlo do razvoja hipotireoze, pacijenti trebaju uzimati supstitucijsku hormonsku terapiju levotiroksinom (LT4), koji je sintetska zamjena za T4. LT4 predstavlja zlatni standard u liječenju hipotireoze zbog dugog poluživota, vrlo dobre apsorpcije, prihvatljivih nuspojava i niske cijene (77). Terapijska doza LT4 ovisi o laboratorijskim nalazima i kliničkoj slici bolesnika i najčešće se daje 1,6-1,8 µg/kg tjelesne težine dnevno (uglavnom između 100-150 µg) (75).

Posebnu pažnju, prilikom odluke o liječenju, treba obratiti na djecu, trudnice i starije osobe. Kod djece i mlađih osoba može doći do spontane remisije bolesti. Trudnicama, a posebno ženama koje žele zatrudnjeti, preporučuje se terapija LT4 dok liječenje LT4-om kod starijih osoba često nije tako efikasno zbog prisutnije fibroze tkiva i većeg broja nuspojava (6). Zanimljivo je da ponovna normalizacija TSH i postizanje eutireoze, ponekad kod pacijenata nije povezano sa njihovim subjektivnim dojmom o poboljšanju kvalitete života (75). Mnogi HT pacijenti u stanju eutireoze imaju povišeni indeks tjelesne težine, više masnog tkiva, povišeni omjer struk-bokovi, metaboličke poremećaje i lošiju kvalitetu života (67).

U posljednje vrijeme, sve veća pažnja posvećuje se lokalnim simptomima HT, kao što su: bol u vratu, promjena boje glasa, nelagoda u grlu, kratkoća daha, disfagija, simptomi povezani s gušavosti (ili gušom), apneja i opći kompresivni simptomi. Namjera je da se odredi njihova prevalencija, a one najučestalije među njima, definira kao kliničke simptome i uključi ih se u rano dijagnosticiranje HT-a. Do sada, kao najučestaliji lokalni simptomi su identificirani; bol u vratu, promjena boje glasa, nelagoda u grlu i disfagija (78).

1.4. VITAMIN D

1.4.1. Metaboliti vitamina D: kolekalciferol i ergokalciferol

Naziv vitamin D ne označava jedinstveni spoj već se odnosi na grupu od preko 50 metabolita dobivenih iz kolesterola tijekom složenih kaskadnih enzimskih i ne-enzimskih reakcija (79). Prema kemijskoj strukturi, oni su sekosteroidi s karakterističnim otvorenim B prstenom, a međusobno se jako razlikuju prema koncentraciji u plazmi i prema svojoj biološkoj aktivnosti (80).

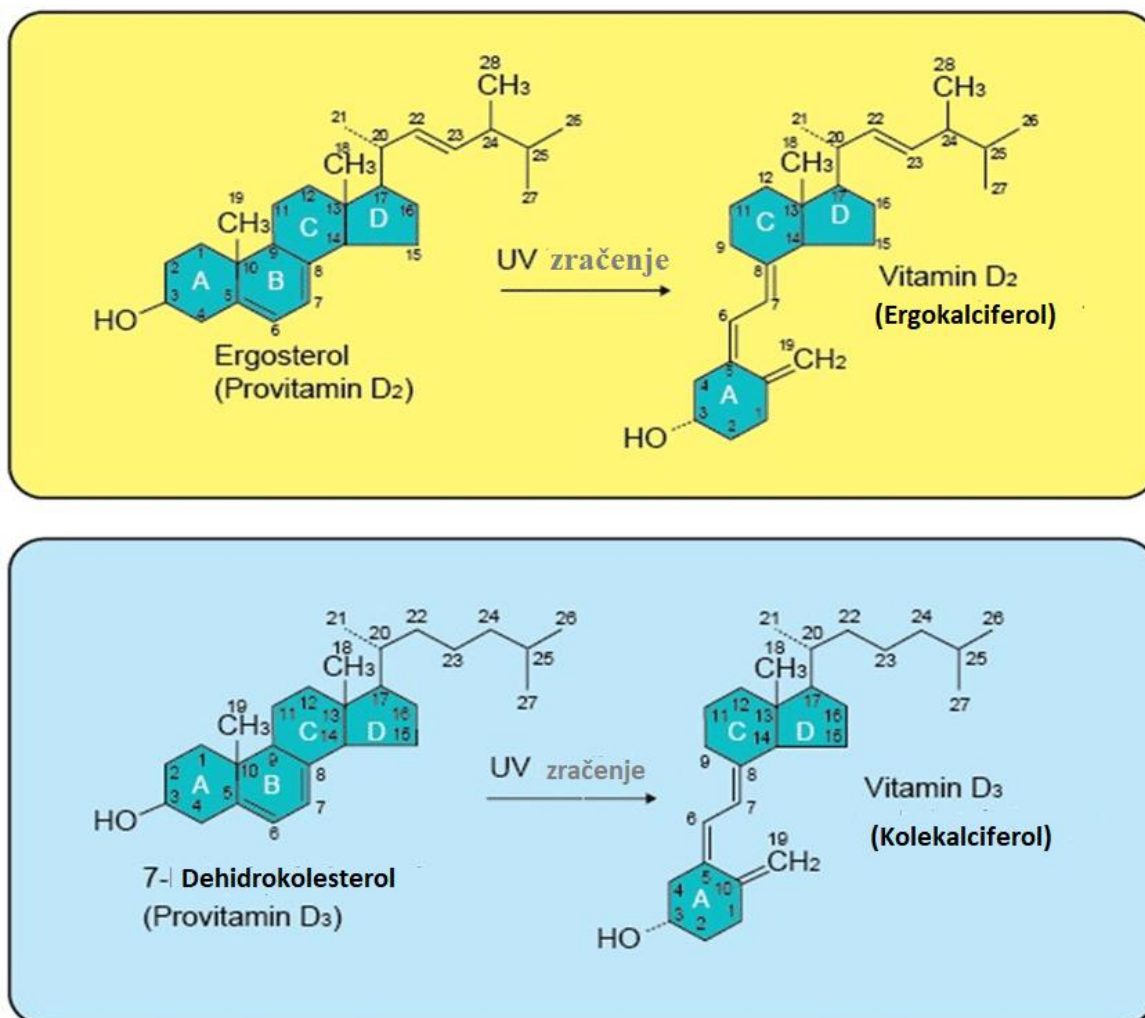
Dva glavna metabolita vitamina D su: vitamin D₂, ergokalciferol i vitamin D₃, kolekalciferol. Strukturna razlika između ergokalciferola i kolekalciferola je dodatna dvostruka veza između C₂₂ i C₂₃ atoma te metilna skupina na C₂₄ atomu bočnog lanca vitamina D₂ (slika 9) (81).

1.4.2. Izvori vitamina D

Najznačajniji izvor vitamina D je njegova endogena sinteza u koži. Iz 7-dehidrokolesterola, pro-vitamina D₃, spoja koji se normalno nalazi u koži, izlaganjem sunčevoj svjetlosti (UVB zrake, 280-320 nm) (82) nastaje termonestabilan previtamin D₃ koji brзом izomerizacijom prelazi u vitamin D₃, kolekalciferol (83).

Koncentracija sintetiziranog vitamina D₃ ovisi o čitavom nizu čimbenika vezanih uz godišnje doba, doba dana, vremenske prilike, broj sunčanih dana, dužinu izlaganja UVB zrakama, geografsku širinu i visinu na kojima se pojedinac nalazi. Osim ovih vanjskih čimbenika, na koncentraciju sintetiziranog vitamina D₃ utječu i karakteristike pojedinca kao što su njegova dob, spol, indeks tjelesne težine, pigmentacija kože te stil života često uvjetovan socio-ekonomskim, kulturološkim i religioznim statusom kao i stupnjem informiranosti o važnosti zdravog načina života (82, 84).

Vitamin D₃ kvantitativno je najzastupljeniji oblik vitamina D. Procjenjuje se da ga oko 80% od ukupnog vitamina D u organizmu, nastane nakon izlaganja sunčevoj svjetlosti (83).



Slika 9. Struktura vitamina D₂ (ergokalciferol) i D₃ (kolekalciferol) i njihovih prekursora. Preuzeto i prilagođeno (85). Licenca CC BY

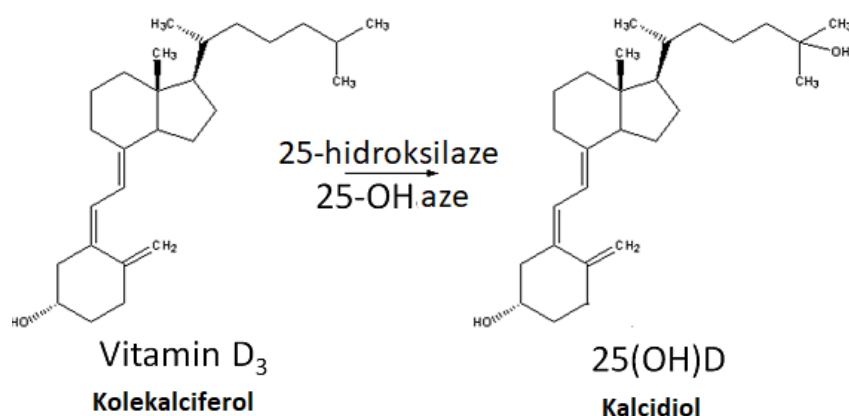
Kvantitativno manje izraženi izvor vitamina D je prehrana (oko 20%) kod koje namirnice biljnog porijekla (gljive, kvasci) sadrže ergokalciferol, a one životinjskog (losos, tuna, skuša, sardine, riblje ulje, mliječni proizvodi, žumanjci) kolekalciferol (86). Riblje ulje se stoljećima prihvaćalo kao odličan izvor vitamina D₃ (82).

Oba metabolita vitamina D, i kolekalciferol i ergokalciferol, su biološki inertni. U cirkulaciji se vezuju na vitamin D vezujući protein, VDBP, (engl. *Vitamin D Binding Protein*) (87) i transportiraju do jetre gdje započinje proces njihove biološke aktivacije.

1.4.3. Sinteza biološki aktivnog oblika vitamina D

1.4.3.1. 25-hidroksivitamin D (kalcidiol)

Za aktivaciju prohormona vitamina D potrebne su dvije reakcije hidroksilacije. Prva reakcija se odvija u jetri (slika 10) gdje se vitamin D₂ (ergokalciferol) i D₃ (kolekalciferol), hidroksiliraju u 25(OH)D₂ odnosno 25(OH)D₃ zajedno tvoreći 25(OH)D (88) (još znan kao 25-hidroksivitamin D ili 25-hidroksikolekalciferol). Ovaj oblik je poznat i kao kalcidiol odnosno kalcifediol (89).

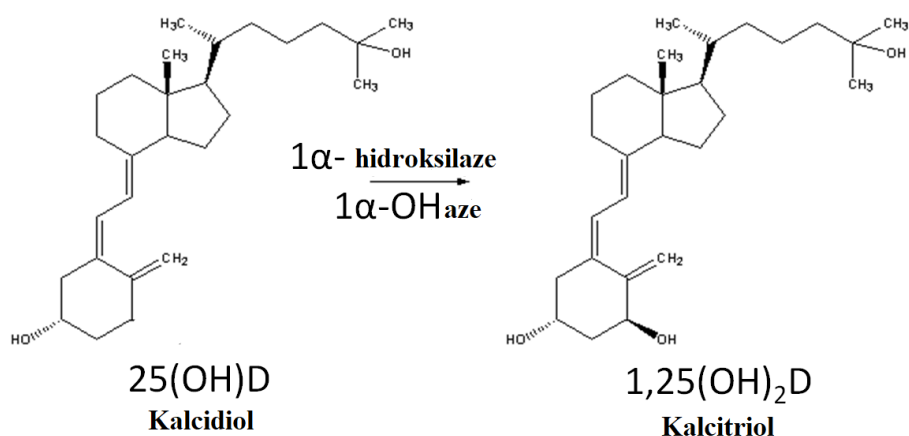


Slika 10. Sinteza kalcidiola u jetri djelovanjem enzima 25-hidroksilaze. Preuzeto i prilagođeno. Dostupno na: <https://courses.lumenlearning.com/suny-nutrition/chapter/12-1-vitamin-d/> Autor: Brian Lindshield, Kansas State University. Licenca CC BY: Attribution

25(OH)D povratnom spregom, inhibira reakciju pretvorbe što je važno iz dva razloga; mehanizam povratne sprege vrlo točno nadzire koncentraciju kalcidiola, a kontroliranom pretvorbom vitamina D₃ u 25(OH)D štedi se vitamin koji je pohranjen u jetri za buduću uporabu (1). Nadzor nad koncentracijom kalcidiola mehanizmom povratne sprege omogućuje da, u slučaju značajnih promjena u unosu vitamina D₃, razina kalcidiola ostane otprilike ista. Kad se vitamin D₃, jednom pretvori u 25(OH)D, u tijelu ostaje samo nekoliko tjedana dok u obliku vitamina D₃, u jetri, može ostati pohranjen više mjeseci (1). Reakciju kataliziraju enzimi 25-hidroksilaze, CYP2R1 (engl. *Cytochrome P450 2R1, vitamin D 25-hydroxylase*) (mikrosomalna) i CYP27A1 (engl. *Cytochrome P450 270A1, vitamin D(3) 25-hydroxylase*) (mitohondrijska) prisutne u stanicama jetre (90). Pri fiziološkim uvjetima, CYP2R1 je nešto značajniji od CYP27A1, jer je CYP2R1 visoko specifičan za hidroksilaciju i vitamina D₂ i vitamina D₃ (91) na poziciji C25, za razliku od CYP27A1 koji je aktivan samo za vitamin D₃, ali ne i za vitamin D₂ (90).

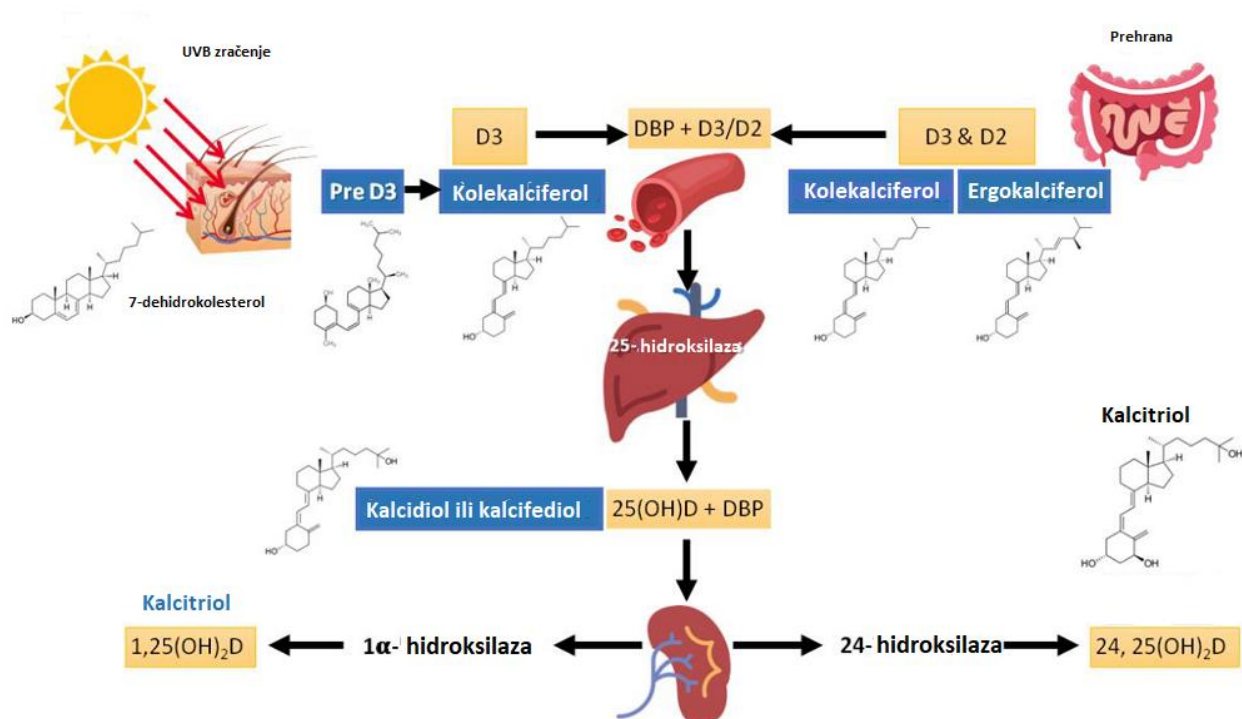
1.4.3.2. 1 α ,25-dihidroksivitamin D (kalcitriol)

Druga reakcija hidroksilacije odvija se u bubrezima (slika 11). Djelovanjem 1 α -hidroksilaze, CYP27B1 (engl. *Cytochrome P450 27B1*, *VD3 1A hydroxylase*), na poziciji C1, 25(OH)D se hidroksilira u 1 α ,25-dihidroksivitamin D (koji se još naziva 1 α ,25-dihidroksikolekalciferol odnosno 1 α ,25(OH)₂D ili kalcitriol), biološki aktivan oblik vitamina D. Ovaj najaktivniji oblik vitamina D gubi gotovo svu svoju djelotvornost kad nema bubrega (1).



Slika 11. Sinteza kalcitriola u bubrezima djelovanjem enzima 1 α -hidroksilaze. Preuzeto i prilagođeno. Dostupno na: <https://courses.lumenlearning.com/suny-nutrition/chapter/12-1-vitamin-d/> Autor: Brian Lindshield, Kansas State University. Licenca CC BY Attribution

Bubrežna aktivacija odnosno inaktivacija kalcitriola ovisi o potrebama za kalcijem i fosforom, a reguliraju je paratiroidni hormon, PTH, FGF-23 (engl. *Fibroblast Growth Factor-23*) i koncentracija samog kalcitriola. PTH potiče izražaj CYP27B1, dok ga kalcitriol reducira (92-94). FGF-23 i α -klotho (transmembranski protein koji djeluje kao koreceptor za FGF-23 (95)) suprimiraju izražaj CYP27B1, a potiču izražaj 24-hidroksilaze, CYP24A1 (engl. *Cytochrome P450 24A1*, *vitamin D 24-hydroxylase*), što rezultira razgradnjom kalcitriola (92). Uloga PTH u pretvorbi 25(OH)D u 1 α ,25(OH)₂D, čini da taj hormon ima snažan utjecaj na funkcionalne učinke vitamina D u organizmu, odnosno kad nema PTH, stvaranje 1 α ,25(OH)₂D gotovo potpuno prestaje (1). Koncentracija kalcija u plazmi, obrnuto proporcionalano utječe na plazmatsku koncentraciju kalcitriola. Porast koncentracije kalcija iznad 2,25 do 2,50 mmol/l značajno suprimira lučenje PTH uslijе čеga se 25-hidroksikolekalciferol pretvara u 24,25-dihidroksikolekalciferol koji nema učinak kao 1 α ,25-dihidroksikolekalciferol. Suprotno tome, pri koncentracijama kalcija manjim od 2,25 do 2,50 mmol/L, PTH pospješuje bubrežnu pretvorbu kalcidiola u kalcitriol (1).



Slika 12. Biosinteza kalcitriola. Preuzeto i prilagođeno (89). Licenca CC BY

Kalcitriol, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, svoju biološku aktivnost ostvaruje vezivanjem na VDR (engl. *Vitamin D* receptor) i tako regulira izražaj, aktivirajući ili suprimirajući transkripciju i do 1000 ciljanih gena (96) što je oko 5% ljudskog genoma (97, 98). Aktivirani geni potiču sintezu mRNA, translaciju u proteine, pa do konačnog fiziološkog odgovora prođe i nekoliko sati (99). Međutim, zapažanja brzog fiziološkog odgovora (u sekundama, minutama) kao posljedice stimulacije $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ postavljaju hipotezu i o mogućim membranskim receptorima/enzimima koji posreduju u tzv. ne-genomskom djelovanju kalcitriola (100).

1.4.4. Status vitamina D

1.4.4.1. Indikator statusa vitamina D u organizmu

Za analizu statusa vitamina D u organizmu, mjeri se koncentracija kalcidiola ($25(\text{OH})\text{D}$) u serumu. Ovaj metabolit vitamina D predstavlja glavni skladišni i transportni oblik u cirkulaciji (81, 101). Koncentracija kalcidiola je oko 1000 puta veća od koncentracije kalcitriola u serumu. Stabilnost kalcidiola pripisuje se visokom afinitetu njegovog vezivanja za VDBP (102) u cirkulaciji. Stoga je vrijeme poluraspada kalcidiola u serumu 2 do 3 tjedna dok je za kalcitriol svega 4 do 6 sati. Sinteza kalcitriola, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, je pod kontrolom PTH, ovisi o koncentraciji kalcija i nije odraz stvarnih rezervi vitamina D u cirkulaciji (103).

Posljedično tome, pojedinci s niskom koncentracijom 25(OH)D u serumu, imaju uredne ili čak povišene vrijednosti $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ kao rezultat kompenzacijskog djelovanja CYP27B1 (81, 104). Sve ove karakteristike čine kalcidiol poželjnim indikatorom za određivanje statusa vitamina D u organizmu što jednoglasno prihvaćaju sve važeće smjernice (105-107).

U kliničkoj praksi se još uvijek rutinski mjere samo kalcidiol (25(OH)D) i kalcitriol ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$). Mjerenje serumske koncentracije 25(OH)D preporuča se za dijagnosticiranje deficijencije vitamina D (101, 107). Osobe koje imaju povišeni rizik za deficijenciju vitamina D su oni sa: frakturama, kroničnom bubrežnom bolesti, malapsorpcijom i poremećajem metabolizma kalcija i fosfata (108). Određivanje 25(OH)D još je korisno i u diferencijalnoj dijagnozi rahitisa, osteomalacije, hipo i hiperparatireoze i u praćenju efikasnosti suplementacije vitaminom D (109-111). I na kraju, 25(OH)D je nužno odrediti kod osoba kod kojih se sumnja na hipervitaminozu D odnosno trovanje vitaminom D. Mjerenje koncentracije vitamina D kod različitih tzv. ne-koštanih bolesti još se uvijek ne preporučuje i trenutno je predmetom debate zbog nedefinirane uzročnosti između vitamina D i promatrane bolesti, zbog postojanja mogućih zbunjujućih čimbenika (81) zbog čega se jasno ne može reći je li eventualna deficijencija vitamina D uzrok ili posljedica promatrane bolesti. Danas se još uvijek nedovoljno zna o kliničkom značaju mjerenja kalcitriola što limitira njegovu kliničku upotrebu (81). Njegovo određivanje pomaže kod hiperkalcemije nerazjašnjenog porijekla, sarkoidoza, granulomatoznih poremećaja, pseudo-deficijencije vitamina D, rahitisa, tumora induciranog osteomalacijom, hiperparatireoze i deficijencije CYP24A1 (112).

1.4.4.2. Metode mjerenja 25-hidroksivitamina D

Izazovi kod mjerenja vitamina D su njegovo čvrsto vezivanje za VDBP (oko 85%), križne reakcije s kemijski sličnim molekulama te eventualna potreba za odvojenim mjerenjima $25(\text{OH})\text{D}_2$ i $25(\text{OH})\text{D}_3$ (79, 112). Metode koje se koriste za mjerenje kalcidiola, općenito se dijele na one koje u prijeanalitičkoj fazi koriste jaka organska otapala za potpuno odvajanje proteina i lipida iz uzorka i one kod kojih se to ne radi. U prvu grupu spadaju LC-MS/MS (engl. *Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry*), HPLC (engl. *High Performance Liquid Chromatography*) i RIA (engl. *Radioimmunoassay*), a u drugu automatizirani imunoeseji. RIA i HPLC koji su se koristili ranije, u novije vrijeme sve više ustupaju mjesto LC-MS/MS i automatiziranim imunoesejima (81).

LC-MS/MS predstavlja zlatni standard za mjerenje 25(OH) vitamina D zbog visoke specifičnosti, osjetljivosti i mogućnosti pouzdanog paralelnog mjerenja više različitih

metabolita vitamina D (113). Nedostatak ove metode je obavezna priprema uzorka koja traži skupu opremu i iskusno osoblje (114). Automatizirani imunoeseji ne traže prijeanalitičku pripremu uzorka. U rutinskom radu mogu izmjeriti koncentraciju vitamina D u velikom broju uzoraka u relativno kratkom vremenu što ih uz LC-MS/MS čini jednom od najkorištenijih metoda. Međutim, nedostatak im je varijacija u izmjerenom rezultatu između različitih, najčešće korištenih, imunoeseja. Kako bi se ovaj problem riješio, danas se provode sve uspješniji programi standardizacije imunoeseja (115-117), a jedan od prvih je Vitamin D Standardization Program (VDSP) čiji cilj je smanjiti utjecaj različitih analitičkih metoda na točnost rezultata mjerenja vitamina D u serumu i plazmi (118).

Mjerenje aktivnog oblika vitamina D, $1\alpha,25$ -dihidroksivitamina D, još je izazovnije od mjerenja 25-hidroksivitamina D, prvenstveno zbog njegove niske serumske koncentracije, a dodatno i zbog nepostojanja standardnog referentnog materijala odnosno referentne metode mjerenja (81). RIA je bila prva metoda za određivanje kalcitriola (119), a kasnije su se razvile EIA (engl. *Enzyme Immunoassay*) (120), HPLC (121), GS-MC (engl. *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) (122) i LC-MS/MS (123). Sve do nedavno, u kliničkim laboratorijima se koristila RIA za mjerenje $1,25$ -dihidroksivitamina D, dok su danas najzastupljeniji automatizirani imunoeseji (81).

1.4.4.3. Referentne vrijednosti

Prema preporuci Američkog društva endokrinologa, suficijencija (dostatnost) vitamina D u serumu definira se kada je 25(OH)D u intervalu od 30-100 ng/ml. Insuficijencija (nedovoljno) se smatra kada su vrijednosti izmjerenog 25(OH)D između 20 i 29 ng/mL, a deficijencija (nedostatak) kada je izmjerena koncentracija kalcidiola niža od 20 ng/mL (101, 124) (tablica 1). Iako neke druge smjernice preporučuju niže vrijednost kalcidiola kao donju granicu suficijencije vitamina D u serumu (20 ng/mL) odabrali smo one koje najbolje odgovaraju našoj populaciji (125).

Koncentracija 25(OH)D u cirkulaciji jako ovisi o godišnjem dobu. Sezonska varijacija koncentracije je 20-30% između najviših izmjerenih vrijednosti u ljetnom periodu (ljetno-jesen) i najnižih zabilježenih u zimskom dijelu godine (zima-proljeće) (126).

Koja je donja granica dostatnosti kalcidiola za optimalno funkcioniranje i koštanog i ne-koštanog metabolizma, te je li uopće ista u oba slučaja, još uvijek nije jasno utvrđeno i često je predmetom razilaženja među istraživačkim timovima u znanstvenoj zajednici (98). Preporuka je da se koncentracija vitamina D održava na razini od 30 ng/mL ili još bolje, na razini 40-60

ng/mL (127) čime bi se postigao optimalan učinak vitamina D na cjelokupno zdravlje. Predmet diskusije je i gornja dozvoljena granica kalcidiola u serumu, a najčešće se smatra da su vrijednosti vitamina D više od 150 ng/mL toksične (83) odnosno povezane s povišenim mortalitetom (128).

Tablica 1. Status vitamina D

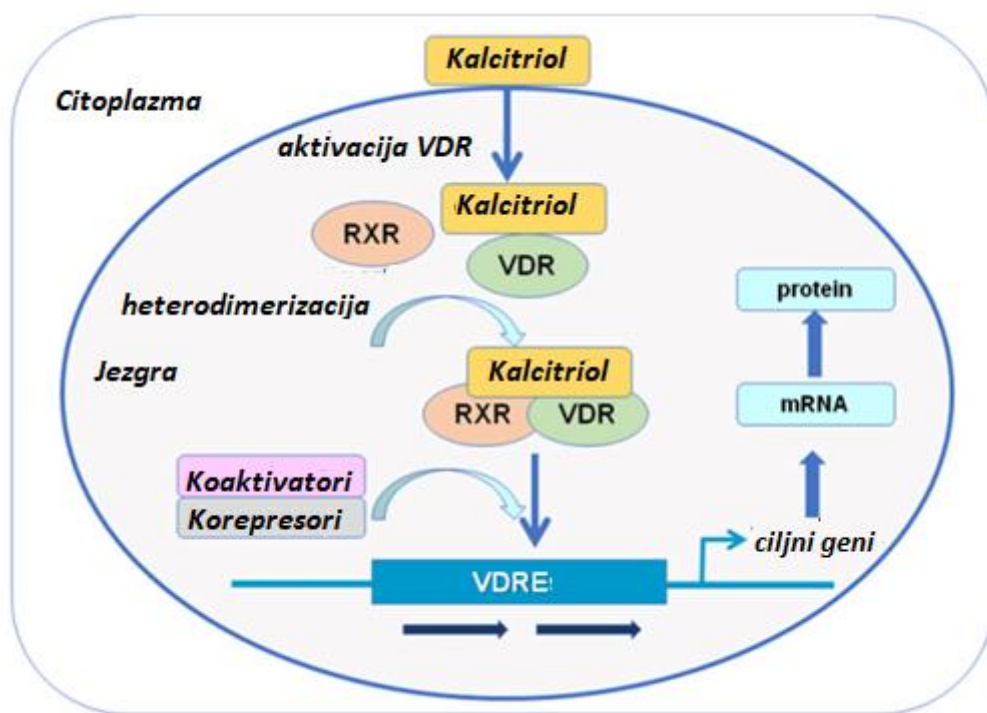
STATUS VITAMINA D		
deficijencija	< 20 ng/mL	< 50 nmol/L
insuficijencija	20-30 ng/mL	50-75 nmol/L
suficijencija	30-100 ng/mL	75-250 nmol/L
toksičnost	> 100 ng/mL	> 250nmol/L

1.4.5. Mehanizam djelovanja vitamina D

Glavna uloga vitamina D je regulacija homeostaze kalcija i fosfora čime pospješuje mineralizaciju kosti (129). Održavanje koncentracije kalcija i fosfora unutar referentnih vrijednosti postiže stimulacijom njihove apsorpcije iz crijeva, bubrežnom reapsorpcijom i mobilizacijom kalcija iz kosti (130). Hormonskim djelovanjem, kalcitriol pospješuje apsorpciju kalcija u crijevima tako što u stanicama crijeva pospješuje sintezu vezne bjelančevine za kalcij – kalbindina, s čijom količinom je upravo razmjerna veličina apsorpcije kalcija. Ova bjelančevina je prisutna u stanicama još nekoliko tjedana nakon što se kalcitriol ukloni iz organizma čime se produžava učinak na apsorpciju kalcija. Crijevna apsorpcija fosfata je razmjerno laka, ali se smatra da je vitamin D dodatno pospješuje (83). Vitamin D pospješuje bubrežnu apsorpciju kalcija i fosfata, pa se tako smanjuje njihovo izlučivanje mokraćom. Ipak, ovaj učinak je slab i vjerojatno nema osobitu važnost za nadzor nad koncentracijom kalcija i fosfata u izvanstaničnoj tekućini. Vitamin D ima važnu ulogu u koštanom metabolizmu, u manjim količinama potiče kalcifikaciju kosti povećanjem crijevne apsorpcije kalcija i fosfata dok primjena prekomjernih količina vitamina D izaziva resorpciju kosti (1).

Na staničnoj razini, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ djeluje kao hormon, veže se na VDR, modificira izražaj gena u tankom crijevu, bubrežima i kostima (89). Receptor za vitamin D sadrži dvije domene, od kojih jedna veže vitamin D, a druga DNA. VDR je transkripcijski faktor reguliran ligandom, kalcitriolom, koji vezivanjem na VDR formira heterodimer s drugim unutarstaničnim receptorom RXR (receptor za retinoid X) (slika 13). Nastali heterodimer se u

staničnoj jezgri veže na VDRE (engl. *Vitamin D Responsive Elements*) na molekuli DNA što rezultira regulacijom izražaja gena u ciljnim organima te predstavlja genomsko djelovanje vitamina D (131). Iako se različiti oblici kolekalciferola vežu za receptor vitamina D, afinitet receptora za $1\alpha,25$ -hidroksikolekalciferol je otprilike 1000 puta veći nego za 25-hidroksikolekalciferol (1).



Slika 13. Mehanizam djelovanja VDR-a na ciljne gene. Preuzeto i prilagođeno (89). Licenca: CC BY

Međutim, osim u navedenim stanicama, mnoge studije su potvrdile prisutnost VDR i enzima (25-hidroksilaze i 1α -hidroksilaze za aktivaciju, te 24-hidroksilaze za razgradnju vitamina D) (132) i u velikom broju stanica i tkiva koji nisu vezani uz mineralizaciju kosti (133). Tako su izražaj 1α -hidroksilaze i lokalna sposobnost sinteze biološki aktivnog kalcitriola utvrđene u stanicama kože, pluća, dojke, prostate, štitnjače (98, 132, 134, 135) kao i stanicama imunološkog sustava (97, 136); monocitima, makrofagima i dendritičnim stanicama (137) čime kalcitriol poprima ulogu imunomodulatora (138) koji kontrolira imunološki sustav na različitim razinama (139). Sve navedeno sugerira široki raspon utjecaja vitamina D na fiziološke procese u organizmu osim već utvrđenog u koštanom metabolizmu (140, 141). Kako bi se utvrdili točni molekularni mehanizmi uključeni u kontrolu izražaja vitamin D hidroksilaza u različitim tkivima i stanicama, potrebna su daljnja istraživanja (90).

1.4.6. Deficijencija vitamina D

Danas se deficijencija vitamina D smatra globalnim problemom koji pogađa pripadnike svih dobnih skupina (81, 142) pri čemu žene i do 1,3 puta više nego muškarce (143). Deficijencija vitamina D je učestalija u zimskom dijelu godine (zima-proljeće) u odnosu na ljetni (ljetno-jesen), pa je broj pojedinaca koji imaju $25(\text{OH})\text{D} < 20 \text{ ng/ml}$ 1,7 puta viši zimi nego ljeti (143).

Procijenjuje se da je prevalencija deficijencije u Europi oko 40% (142) dok je globalno nešto viša, oko 47,9% za $25(\text{OH})\text{D} < 20 \text{ ng/ml}$ i čak 76,6% za $25(\text{OH})\text{D} < 30 \text{ ng/ml}$ (143). Iako još uvijek nema jasnog dogovora među znanstvenicima koja je donja granica suficijencije vitamina D u cirkulaciji, svi su složni da koncentracija $25(\text{OH})\text{D} < 12 \text{ ng/ml}$ predstavlja vrlo ozbiljan nedostatak vitamina D (144), a njegova globalna prevalencija je 15,7% (143). Prevalencija manjka vitamina D najviša je kod starijih ljudi, posebno onih u staračkim domovima, hospitaliziranih pacijenata kao i kod pretilih ljudi (104, 144).

Moderan stil života koji uključuje boravak u zatvorenom, izbjegavanje sunca (kreme za sunčanje, odjeća) zbog kulturoloških i/ili religijskih poimanja kao i prehrana siromašna vitaminom D najčešći su uzrok manjka vitamina D u populaciji. Malapsorpcija, kronične bolesti jetre i bubrega povećavaju rizik za deficijenciju vitamina D kao i svi oni lijekovi koji potiču aktivaciju enzima te time ubrzavaju razgradnju vitamina D (fenobarbital, deksametazon, karbamazepin, klotrimazol, rifampin i drugi) (104).

Osim potvrđene uloge vitamina D u koštanom metabolizmu, veliki broj studija sugerira povezanost deficijencije vitamina D i čitavog niza bolesti kao što su autoimune i kardiovaskularne bolesti, astma, atopijski dermatitis, depresija i karcinomi (111, 145-148).

1.5. VITAMIN D I HT

Procijenjuje se da danas 5-8% ukupne svjetske populacije boluje od autoimunih bolesti (149). Njihova složena, ali još uvijek nepotpuno razjašnjena etiologija, podrazumijeva međudjelovanje genetskih i okolišnih čimbenika pri čemu se i vitamin D proučava kao jedan od čimbenika okoliša potencijalno važan u (pato)fiziologiji ovih bolesti (148).

Veći broj genetskih studija je pokazao da je predispozicija pojedinaca za autoimune bolesti povezana, među ostalim, i sa postojanjem nekoliko polimorfizama gena uključenih u sintezu proteina, kao što su VDR, DBP, CYP27B1, CYP2R1 i CYP24A1 (150, 151), značajnih za metabolizam, transport i funkciju vitamina D (151, 152). Aktivni oblik vitamina D, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, regulira i gene uključene u proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu stanica (83,

153, 154). Nadalje, mogućnost lokalne sinteze kalcitriola u stanicama imunološkog sustava dodjeljuju mu ulogu imunomodulatora (132). Kao takav, utječe na regulaciju aktivnosti T i B limfocita (155) koje se izdvaja kao glavne stanice autoimunih bolesti (156), a čija je infiltracija u tkivo štitnjače jedna od glavnih karakteristika bolesti (157). U fokusu su i ostale stanice imunološkog sustava, monociti, makrofagi, dendritične i NK stanice (eng. *Natural Killer cell*), također sposobne za lokalnu sintezu vitamina D i njihov potencijalno značajan utjecaj u nastajanju autoimunosti (156).

Moguća imunosupresivna uloga vitamina D kod HT-a, predlaže mehanizam djelovanja na imunološki sustav na više razina; vitamin D suprimira proliferaciju T limfocita te modulira sintezu citokina (158) inhibirajući sintezu proupalnih, a potičući nastajanje protuupalnih citokina, pa se smatra da mu je sveukupno djelovanje protuupalno (159). B stanice u HT-u sintetiziraju protutijela na antigene štitnjače, a vitamin D inhibira aktivaciju B stanica te inducira njihovu apoptozu (135). Smatra se da $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$ kontrolom aktivnosti B stanica doprinosi smanjenju sinteze protutijela te tako umanjuje rizik za razvoj autoimunih poremećaja posredovanih protutijelima (135). Posljedično, to bi značilo da je moguće da je manjak vitamina D povezan sa izraženijom proliferacijom B limfocita i njihovom diferencijacijom u plazma stanice što rezultira povećanim stvaranjem autoantitijela, posebno TPOAt i TgAt, a ovo vodi k oštećenju tireocita i mogućem razvoju HT-a (87, 160).

Brojna znanstvena istraživanja su utvrdila deficijenciju vitamina D u serumu pacijenata s AITD-om što je sugeriralo o mogućoj ulozi iste u razvoju bolesti (161). Tako je prvi rad o povezanosti vitamina D i AITD-a publiciran 2009. godine (162) pokazao negativnu korelaciju između koncentracije $25(\text{OH})\text{D}$ i TPOAt kod 642 ispitanika (nastavnici, studenti, osoblje). Od tada, pa do danas, čitav niz provedenih istraživanja, sa ciljem definiranja povezanosti serumskih razina vitamina D sa HT-om, koji su analizirali razlike u vrijednostima vitamina D između HT ispitanika i kontrolnih ispitanika, nije pružio jasan odgovor (163).

Sustavni prikaz radova, meta-analiza i meta-regresija opservacijskih studija (84) iz 2020. godine, utvrdili su značajnu povezanost statusa vitamina D i HT te pokazali da HT bolesnici imaju niže serumske vrijednosti $25(\text{OH})\text{D}$ u usporedbi sa ispitanicima bez HT-a. Ova meta-analiza je uključila 25 radova sa ukupno 2695 HT ispitanika i 2263 kontrola, a samo 4 rada među njima, imala su više od 200 ispitanika. Osim toga, uočena je značajna heterogenost među radovima, geografski svi radovi osim jednog su sa sjeverne zemljine polutke, ali ne i država smještenih oko ekvatora kao ni onih na velikim zemljopisnim širinama. Uglavnom nema ni podataka o individualnom izlaganju sunčevom zračenju, ni o unosu vitamina D kao ni o tipu kože. Izmjerene vrijednosti vitamina D, često nisu ni bile usporedive zbog nedostatka

standardiziranih metoda. Još treba naglasiti da u navedenoj meta-analizi nisu bili uključeni radovi koji nisu pronašli povezanost vitamina D i HT-a (164-168). U istraživanjima koja nisu pronašla povezanost vitamina D i HT-a bio je uključen manji broj ispitanika. Tako autori studije (164) iz 2018. godine opisuju slične koncentracije vitamina D između 88 HT ispitanika i 71 ispitanika iz kontrolne skupine. Da HT nije povezan sa deficijencijom vitamina D zaključak je studije (168) iz 2018. godine, Isto su zaključili i autori studije (166) iz 2016. godine u kojoj su usporedili vrijednosti vitamina D u muškoj populaciji između HT ispitanika i kontrola, ali su pronašli značajnu pozitivnu povezanost između vitamina D i TPOAt. Nedostatak statistički značajne razlike u koncentracijama kalcidiola između 58 ispitanika s hipotireozom i 58 zdravih, samo sada u ženskoj populaciji, opisan je u radu (167) iz 2017. godine. Spoznaja da deficijencija vitamina D može biti rizični faktor za autoimune bolesti kao što su dijabetes tipa 1 i multipla skleroza, još je 2012. godine potaknuo autore rada (165) da usporede koncentracije između 78 ispitanika sa AITD-om i 78 kontrolnih ispitanika, a rezultat opisane analize je pokazao da AITD u ranoj fazi nije povezan sa niskim vrijednostima vitamina D. Isti zaključak kako insuficijencija vitamina D nije povezana sa AITD-om u ranoj dijagnozi bolesti iznijeli su autori studije (169) iz 2023. godine nakon što nisu pronašli statistički značajne razlike u vrijednostima vitamina D između skupine s 57 ispitanica sa AITD-om i 41 ispitanicom iz kontrolne skupine. Niti studija (170) iz 2021. godine nije pronašla statistički značajne razlike koncentracije vitamina D, i ovaj put među ženskom populacijom, i to njih 56 s HT-om i 42 iz kontrolne skupine, a mjerenja su provedena korištenjem LC-MS/MS metode.

Novija meta-analiza (171) iz 2021. godine koja je uključila 12 radova i 2440 ispitanika od koji je 1375 oboljelih od HT-a i 1065 zdravih, rezultirala je pronalaskom značajno nižih vrijednosti vitamina D u serumu HT ispitanika u odnosu na zdrave, ali uz značajnu heterogenost među istraživanjima za koju i sami autori tvrde da je mogla utjecati na dobivene rezultate. Kao moguće razloge heterogenosti navode razlike o dobi, spolu, indeksu tjelesne težine među ispitanicima, ali i odabranim metodama mjerenja i korištenim reagensima, geografskim razlikama, godišnjem dobu provedenih uzorkovanja te same kvalitete istraživanja.

Zanimljivo je istraživanje (172) koje je pronašlo da su razine vitamina D niže kod 373 HT ispitanika u odnosu na 4889 kontrolnih ispitanika, međutim, nakon provedene multivarijantne logističke regresije zaključeno je da vitamin D nije povezan sa HT-om.

Osim toga, različite kliničke studije su pokazale da je prevalencija HT-a kod ispitanika sa hipovitaminozom D značajno viša u usporedbi sa ispitanicima sa dostatnim razinama vitamina D (173-175) uključujući i djecu i stariju populaciju. Još jedan od radova (176) u nizu koji je opisao izraženu negativnu povezanost između koncentracije serumskog vitamina D i

koncentracije TSH, pretpostavio je mogućnost da deficijencija vitamina D kod HT pacijenata vodi prema progresiji bolesti odnosno prema hipotireozi.

I konačno, u suprotnosti sa svim do sada navedenim istraživanjima, pregledom literature, pronašli smo rad (166) koji je čak pronašao više vrijednosti vitamina D u kohorti HT ispitanika u odnosu na ispitanike kontrolne skupine, i to samo u ženskom dijelu populacije, ali ne i kod muškaraca.

Utjecaj vitamina D na autoimune bolesti intenzivno se proučava zadnjih godina kako bi se utvrdilo predstavljaju li snižene vrijednosti vitamina D čimbenik rizika za razvoj AITD i/ili doprinose progresiji bolesti (132, 163, 177-179). Najveći broj opservacijskih studija na ljudskoj populaciji izvijestio je o povezanosti nižih vrijednosti vitamina D sa povećanim rizikom za dijagnosticiranje AITD-a, kao i ostalih autoimunih poremećaja (180-182). Usprkos velikom broju istraživanja i radova koji su se bavili ovim pitanjem, još uvijek ostaje nejasno je li insuficijencija vitamina D uzrok ili posljedica autoimune bolesti (177), pa ulogu vitamina D u smislu prevencije ili terapije kod autoimunih bolesti treba još razmotriti.

1.6. PREHRANA I VITAMIN D

Uz tradicionalne, prirodne izvore vitamina D odnosno njegovu endogenu sintezu u koži te prehrani kao egzogenom izvoru, sve veća pažnja se poklanja suplementaciji i fortifikaciji hrane i prehrambenih proizvoda vitaminom D (183).

Fortifikacija hrane je javnozdravstvena strategija obogaćivanja hrane vitaminom D s ciljem da se poveća njegov unos što bi trebalo rezultirati porastom koncentracije 25-hidroksivitamina D u cirkulaciji (184), a time i ublažavanjem nedostatka vitamina D sveprisutnog u populaciji, u svim dobnim skupinama, kod oba spola.

Važnost fortifikacije hrane vitaminom D odavno je prepoznata u državama sa smanjenim brojem sunčanih dana (Kanada, SAD, Finska, Švedska, Norveška) i provodi se kako bi se osigurala dostatnost vitamina D njihovom stanovništvu. Najčešće namirnice koje se obogaćuju vitaminom D su mlijeko (tekuće, u prahu, biljnog porijekla), margarin, sirevi, voćni sokovi, žitarice i kruh, a sve više se razvijaju i postupci obogaćivanja jaja, ribe i mesa (svinjetina, govedina, perad) (185). Mnoge studije su potvrdile pozitivan utjecaj konzumacije hrane koja sadrži ili je obogaćena vitaminom D na serumsku koncentraciju 25(OH)D (184, 186-189). Mediteranska prehrana, bogata polifenolima, vlaknima i nezasićenim masnim kiselinama, također je povezana s porastom koncentracije vitamina D (190, 191).

Intenzivna istraživanja pokazuju da bi neki dodaci prehrani možda mogli pozitivno utjecati na simptomatologiju HT-a zbog svog potencijalno protuupalnog i antidepresivnog djelovanja (192) tako se, osim već potvrđenih deficijencija mikronutrijenata (vitamina D, selen, glutena) pronađenih kod pacijenata s HT-om i njihovog mogućeg utjecaja na razvoj i/ili progresiju HT-a, sve veća pažnja posvećuje i vitaminima A, B i C, nezasićenim masnim kiselinama, antioksidansima i fitokemikalijama (193). Upravo zato sustavni prikaz radova iz 2023. godine (194) o utjecaju intervencije prehranom na liječenje HT-a točnije na biokemijske parametre (protutijela i hormone štitnjače) i na karakteristične simptome HT-a naglašava potrebu za analiziranjem utjecaja protuupalnih nutrijenata: vitamina D, antioksidanata, nezasićenih masnih kiselina, magnezija i cinka, zatim joda i selen koji su uključeni u sintezu i metabolizam hormona štitnjače, te željeza, folne kiseline i vitamina B12 zbog anemije i kardiovaskularnih bolesti čestih kod HT pacijenata. Od početnih 1350 studija, svega 9 je uključeno u navedeni sustavni prikaz radova, od kojih je tek jedna studija imala nešto više od 100 ispitanika tako da autori, usprkos pronađenom pozitivnom utjecaju eliminacije glutena, laktoze i energetske restrikcije na razinu protutijela štitnjače, TSH i fT4, napominju: da je mali broj sudionika bio uključen u studije, da je varijabilnost među ispitanicima bila visoka, da je izražena heterogenost bolesti štitnjače, ali da je izražena i različitost u prehranbenim navikama među ispitanicima. Istraživanja su se razlikovala i u odnosu na vrstu intervencije, njihovoj različitoj duljini trajanja (od 21 dana do 12 mjeseci) kao i o mjerenom ishodu, stoga zaključuju da su potrebna daljnja istraživanja kako bi se jasno definirao tip nutritivne intervencije s najboljim učinkom na oboljele od HT-a. Također, smatraju da će se intervencije nutrijentima razlikovati ovisno o dijelovima svijeta i populaciji odnosno dostupnim namirnicama i uvriježenim prehranbenim navikama.

Prehranbene navike HT pacijenata u našoj populaciji već su opisane u radu (195) iz 2020. godine, prvom koji je usporedio razlike u prehrani odnosno prehranbenim navikama između 491 HT ispitanika i 433 ispitanika iz kontrolne skupine korištenjem Upitnika o učestalosti konzumiranja namirnica (engl. *Food Frequency Questionnaire*, FFQ) za mjerenje prehranbenih navika ispitanika. Rezultati su pokazali povećanu konzumaciju masnoća životinjskog porijekla i prerađenog mesa kod HT ispitanika što je sugeriralo da HT ispitanici, usprkos dijagnozi, nisu mijenjali svoje prehranbene navike. Ispitanici iz kontrolne skupine više su konzumirali crveno meso, cjelovite žitarice, masnu ribu, biljno i maslinovo ulje, voće i bezalkoholna pića u odnosu na HT ispitanike.

Valja istaknuti još dva rada čija istraživanja su se temeljila na ispitanicima iz naše populacije, a slične su tematike. Tako su se u radu (196) analizirale kliničke karakteristike i

fenotipovi u bolesnika s HT-om i po prvi put ustanovljeno da je povećanje broja simptoma kod bolesnika s HT-om povezano s povišenom koncentracijom TgAt-a što upućuje na ulogu autoimunosti štitne žlijezde u kliničkoj manifestaciji bolesti. U drugom radu (197) se, između ostalog, istraživao utjecaj prehrane na razinu hormona štitnjače te je zaključeno da je učestalo konzumiranje hrane s visokim glikemijskim indeksom pozitivno povezano s razinama fT3 i fT4 i negativno povezano s razinama TSH, dok je konzumacija hrane bogate zasićenim masnim kiselinama i s visokom udjelom proteina negativno povezana s razinama fT3 i fT4.

U najnoviju presječnu studiju, iz 2024. godine (198) o utjecaju mediteranske prehrane na aktivnost štitnjače, bilo je uključeno 4620 ispitanika iz naše populacije s ciljem da se utvrdi (a) postoji li povezanost mediteranske prehrane, praćene kroz MDSS (engl. *Mediterranean Diet Serving Score*) s aktivnošću štitnjače, definiranu mjerenjem koncentracija TSH, fT3, fT4, i protutijela TgAt i TPOAt te (b) razlikuje li se MDSS među skupinama ispitanika u: eutireozi, eutireozi s pozitivnim protutijelima, hipotireozi i hipertireozi. Za određivanje MDSS-a koristio se FFQ, a vrijednost MDSS se nije razlikovala između ispitivanih skupina, ali je bila značajno viša kod žena te rasla sa životnom dobi ispitanika. Valja naglasiti da je u skupini ispitanika u subkliničkoj hipotireozi pronađena značajna pozitivna povezanost između MDSS-a i oba hormona štitnjače, fT3 i fT4, što bi, uz ostale rezultate ove studije moglo biti značajno u kreiranju prehrambenih smjernica.

Ipak, još uvijek ne postoje jasne smjernice za prehranu pacijenata s HT-om, osim preporuke za konzumaciju hrane bogate vitaminima, mineralima, sa smanjenim udjelom namirnica životinjskog porijekla (67), ograničenim unosom zasićenih masnih kiselina i rafiniranih ugljikohidrata (194) koja bi mogla smanjiti koncentraciju protutijela, poboljšati funkciju štitne žlijezde, usporiti upalne procese, održavati primjerenu tjelesnu težinu, umanjiti simptome bolesti, prevenirati deficijencije nutrijenata te pridonijeti poboljšanju kvalitete života (199).

1.7. KALCITONIN I HT

Kalcitonin (engl. *Calcitonin*, Ct) je polipeptidni hormon, sastavljen od 32 aminokiseline, a luče ga parafolikularne stanice ili C-stanice (1) koje se nalaze u međustaničnoj tekućini između folikula štitnjače (slika 2). Povećanje koncentracije kalcijevih iona u izvanstaničnoj tekućini je osnovni podražaj lučenju kalcitonina, suprotno djelovanju PTH čiju sekreciju potiče smanjena koncentracija kalcija. Kalcitonin, regulacijom apsorpcije osteoklasta, inhibira koštanu resorpciju uz neposredni učinak odlaganja kalcija u izmjenjive kalcijeve koštane soli (1). Dugotrajni učinak nastaje kad uslijed smanjenog broja osteoklasta dolazi do smanjenja

broja osteoblasta, a time i smanjenja aktivnosti i osteoklasta i osteoblasta čime je dugotrajni utjecaj na razinu kalcija vrlo slab i prolazan, a traje od samo nekoliko sati do najviše nekoliko dana. U usporedbi sa djelovanjem PTH, uloga kalcitonina u regulaciji koncentracije kalcija je manje značajna. Naime, smanjenje koncentracije kalcija djelovanjem kalcitonina potaknut će lučenje PTH koji će gotovo potpuno nadvladati djelovanje kalcitonina. Potvrda nadmoći PTH dolazi do izražaja kod uklonjene štitnjače, kada se kalcitonin više ne luči, a dugoročno nema mjerljive promjene koncentracije kalcija. Serumske koncentracije kalcitonina su visoke kod djece do treće godine života kada poprimaju vrijednosti kao i odrasle osobe (200, 201), a uspoređujući ih prema spolu, više su kod muškaraca u odnosu na žene (202).

Medularni karcinom štitnjače, MTC, je maligni tumor nastao iz C stanica štitne žlijezde i obično ga prate povišene vrijednosti bazalnog kalcitonina u serumu. Od svih karcinoma štitnjače, 6-8% otpada na MTC (203). Koncentracija kalcitonina uglavnom prilično dobro korelira sa proširenošću maligne bolesti, veličinom tumora te lokalnim i udaljenim metastazama (204). Stoga je mjerenje bazalnog kalcitonina važno u dijagnostici MTC i u praćenju liječenja ove maligne bolesti.

Međutim, povišene vrijednosti bazalnog kalcitonina nisu samo posljedica prisutnog medularnog karcinoma štitnjače već mogu biti povišene i kod karcinoma pluća, dojke, bubrega i jetre (204), neuroendokrinih tumora, leukemije i mijeloproliferativnih bolesti (205-207) kao i kod nekih ne-malignih bolesti kao što su kronična bolest bubrega, hiperparatireoza, plućne bolesti, perniciozne anemije, ali i u trudnoći. Osim toga, i neki lijekovi (npr. inhibitori protonske pumpe, glukokortikoidi, β – blokatori) povisuju vrijednosti kalcitonina (207, 208).

Utjecaj ostalih bolesti štitnjače na sintezu kalcitonina nije dovoljno istražen što posebno u fokus stavlja Hashimotov tireoiditis zbog njegove učestalosti i karakteristika same bolesti. Naime, infiltracija limfocita u žlijezdano tkivo uzrokuje destrukciju tireocita, a progresijom bolesti razara se tkivo štitnjače, postepeno gubi njena funkcija (29, 46) te dolazi do atrofije žlijezde (209), ali točan utjecaj bolesti na C stanice štitnjače i na lučenje kalcitonina nije podrobno istražen.

Pregledom literature nismo dobili jasan odgovor na ovo pitanje, dijelom iz razloga što su istraživanja provedena na malom uzorku. U istraživanje (210) u koje je bilo uključeno 27 HT ispitanika (11 u subkliničkoj hipotireozii, 16 u atrofičnoj hipotireozii) i 30 kontrolnih ispitanika, mjerene su bazalne i stimulirane koncentracije kalcitonina nakon simultane intravenozne infuzije kalcija i pentagastrina. Zapažene su značajno niže bazalne i stimulirane vrijednosti kalcitonina kod obje podskupine HT ispitanika u odnosu na kontrolne ispitanike ukazujući na mogućnost da pod utjecajem bolesti ne dolazi samo do oštećenja folikularnih stanica štitnjače

već da se razaraju i C stanice štitne žlijezde. Slični rezultati su opisani i u studiji (211) koja je analizirala vrijednosti bazalnog i stimuliranog kalcitonina između 21 ispitanice sa HT-om i 24 ispitanice iz kontrolne skupine. Među 21 ispitanicom s HT-om, 10 ih je bilo u hipotireozi, a 11 u eutireozi zbog terapije LT4. Nije bilo razlike u izmjeranim koncentracijama kalcitonina između dvije podskupine ispitanica sa HT-om, ali su obje podskupine imale značajno niže i bazalne i stimulirane vrijednosti kalcitonina u odnosu na kontrolnu skupinu što bi sugeriralo da isti procesi koji uzrokuju HT, uzrok su i deficijenciji kalcitonina. Još jedno istraživanje (212) je uspoređivalo bazalnu i stimuliranu koncentraciju kalcitonina u skupini od 59 pacijentica sa HT-om, dodatno razvrstanih u četiri podskupine ovisno o težini bolesti (od eutireoze do teškog oblika hipotireoze) sa vrijednostima kod 11 zdravih ispitanica. Kao i kod prethodna dva opisana istraživanja, bazalne i stimulirane vrijednosti kalcitonina bile su niže kod ispitanica sa HT-om u odnosu na kontrole. Dodatno, znatno niže vrijednosti kalcitonina su imali HT pacijenti sa težim oblikom hipotireoze što bi moglo značiti da je pad koncentracije kalcitonina izraženiji kod pacijenata sa uznapredovalom bolešću.

Međutim, neke studije su pronašle da HT ispitanici imaju više vrijednosti kalcitonina u usporedbi sa zdravim ispitanicima. Tako je studija (213) koja je uključila 414 ispitanika, pod sumnjom na bolest štitnjače, i 362 zdrava ispitanika, utvrdila značajno veću učestalost povišenih vrijednosti kalcitonina ($>10\text{pg/mL}$) kod ispitanika sa bolešću štitnjače, a posebno kod onih sa HT-om, u odnosu na zdrave ispitanike. Druga studija (214) na malom uzorku od svega 24 HT ispitanika, utvrdila je povišene vrijednosti kalcitonina kod 3 ispitanika nakon stimulacijskog testa pentagastrinom, a još jedna studija (215) je pronašla da su povišene vrijednosti kalcitonina proporcionalne s izraženijim autoimunim tireoiditisom.

Konačno, nekoliko istraživanja nije pronašlo promjene u vrijednosti koncentracija kalcitonina koje bi se mogle povezati sa HT-om. Jedna od njih (216) je analizirala vrijednosti kalcitonina kod 492 pacijenta sa nodularnom bolesti (od kojih su 130 imali povišene vrijednosti TPOAt, a 362 uredni TPOAt) i 583 pacijenta bez nodularne bolesti (od kojih su 102 imali povišeni TPOAt, a 481 uredni TPOAt). Nakon opsežnih analiza, dobiveni rezultati su pokazali da prisutnost HT-a nema utjecaja ni na koncentraciju kalcitonina niti na učestalost povišenog kalcitonina. Još jedna studija (217) koja nije pronašla razlike u vrijednostima kalcitonina između 174 eutireoidne ispitanice s urednim vrijednostima tireoidnih protutijela i 124 ispitanice sa pozitivnim protutijelima zaključila je da pozitivna protutijela nisu čimbenik rizika za razvoj hiperkalcitoninemije. Također, u istoj studiji (217) je opisano da 51 žena s hipotireozom i 40 zdravih ispitanica imaju slične vrijednosti kalcitonina. Studija slična prethodnoj (218), ali na znatno većem broju ispitanika, njih 1073, od kojih je 208 imalo

povišeni TPOAb, a njih 865 uredni, donijela je isti zaključak kako autoimunost nema utjecaja na vrijednosti bazalnog kalcitonina. Niti studija (219) koja je usporedila vrijednosti kalcitonina između 122 HT ispitanika i 121 zdravog ispitanika, nije pronašla razliku u vrijednostima izmjerenog, bazalnog kalcitonina. I na kraju, novija studija (220), koja je uključivala veliki broj ispitanika (njih 3250 sa čvorovima u štitnjači) smatra da autoimuni tireoiditis ne utječe na koncentraciju kalcitonina u serumu pacijenata.

1.8. PROBLEMATIKA ISTRAŽIVANJA

1.8.1. Vitamin D i HT

Iako je nedostatak vitamina D prepoznat kao mogući čimbenik odgovoran za nastanak i/ili progresiju HT-a, brojna provedena istraživanja još uvijek nisu dala jasan odgovor o njihovoj povezanosti. Stoga, u prvom istraživanju smo izmjerili i usporedili koncentraciju vitamina D u skupini svih ispitanika s HT-om i u skupini s kontrolnim ispitanicima. Dodatno, kako bi uzeli u obzir težinu bolesti, HT pacijente smo podijelili u dvije podskupine, s blažim (MILD) i težim (OVERT) oblikom bolesti te smo još u svim skupinama i podskupinama s HT pacijentima kao i u grupi s kontrolnim ispitanicima odredili i udio deficijencije vitamina D. Također, proveli smo opsežne analize radi utvrđivanja veze vitamina D s klinički značajnim fenotipovima za funkciju štitnjače (spol, dob, indeks tjelesne težine (BMI), TSH, T3, T4, FT4, TgAt, TPOAt, volumen štitnjače), s ostalim kliničkim fenotipovima (sistolički i dijastolički krvni tlak) te s prisutnošću/odsutnošću simptoma karakterističnih za bolest HT. Uz sve ovo gore navedeno, svim sudionicima smo zabilježili točan datum uzimanja uzorka krvi zbog uključenja utjecaja godišnjeg doba na koncentraciju vitamina D u analize.

Dodatno smo analizirali povezanost prehrambenih navika sa serumskom koncentracijom vitamina D kod pacijenata s HT-om.

1.8.2. Povezanost vitamina D i prehrambenih navika kod HT ispitanika

Visoka prevalencija nedostatka vitamina D nameće potrebu za rješavanjem ovog problema. Važno je definirati čimbenike koji utječu na njegovu koncentraciju. Posebno značajni bi bili oni na koje se može utjecati usvajanjem zdravog stila života s naglaskom na prehranu. Ovim istraživanjem smo htjeli utvrditi postoji li određena hrana i/ili prehrambene navike koje su povezane sa povišenjem ili sniženjem koncentracije vitamina D. Zato smo kod svih HT ispitanika, a zatim i u podskupinama (MILD) i (OVERT) analizirali povezanost prehrambenih navika sa serumskim koncentracijama vitamina D. Upitnik o učestalosti konzumiranja namirnica (engl. *Food Frequency Questionnaire*, FFQ) koristili smo za mjerenje

prehrambenih navika HT ispitanika. FFQ je najčešće korišten alat za mjerenje prehrambenih navika i dugoročnog unosa hrane (221). Ovim upitnikom se prati učestalost konzumiranja 51 namirnica korištenjem kategorija: svaki dan/uvijek, 2-3 puta tjedno, jednom tjedno/ponekad, jednom mjesečno, rijetko i nikad. Dodatni upitnik je bio o konzumaciji biljnog i maslinovog ulja te masnoća životinjskog porijekla, a učestalost njihove konzumacije podijeljena je u tri kategorije: uvijek, ponekad i nikad. Izračunali smo tjednu konzumaciju svih 54 namirnica podjeljenih u 24 prehrambene kategorije.

1.8.3. Kalcitonin i HT

Premda je broj istraživanja koji se bavio mogućim utjecajem HT na proizvodnju (lučenje) kalcitonina skroman, dobiveni zaključci su se značajno razlikovali. Zato smo u našem drugom istraživanju, slično kao i u prvom, samo sada s kalcitoninom u fokusu, izmjerili i usporedili koncentracije bazalnih vrijednosti kalcitonina u skupinama: svih ispitanika s HT, kontrolnih ispitanika kao i u podskupinama definiranim težinom bolesti, međutim u ovom istraživanju smo težinu bolesti definirali prema potrebi ispitanika za terapijom LT4. Drugim riječima, ispitanici koji nisu bili na terapiji (BT) su grupirani u skupinu koja predstavlja ispitanike s blažim oblikom bolesti, dok su ispitanici koji su bili na terapiji (NT) grupirani u skupinu koja predstavlja ispitanike s težim oblikom bolesti. Također, i ovdje smo proveli opsežne analize radi utvrđivanja veze kalcitonina s klinički značajnim fenotipovima za funkciju štitnjače (TSH, T3, T4, fT4, TPOAt, TgAt, BMI, BSA, volumen štitnjače, dob, trajanje bolesti), sistoličkim i dijastoličkim krvnim tlakom te s brojem prisutnih simptoma karakterističnih za HT.

2. CILJEVI I HIPOTEZE

2.1. VITAMIN D I HT

Glavni cilj

Utvrđiti razlikuju li se serumske koncentracije vitamina D između HT ispitanika u odnosu na kontrolne ispitanike te između podskupina HT ispitanika podijeljenih ovisno o težini bolesti. Provesti sveobuhvatan skup analiza kako bi ispitali povezanosti vitamina D s različitim fenotipovima i simptomima karakterističnim za HT.

Sporedni cilj

Odrediti udio deficijencije vitamina D za sve skupine (i podskupine) sudionika u istraživanju.

2.2. POVEZANOST VITAMINA D I PREHRAMBENIH NAVIKA KOD HT ISPITANIKA

Glavni cilj

Identificirati postoji li povezanost prehrambenih navika/namirnica sa koncentracijom vitamina D u serumu kod HT ispitanika.

2.3. KALCITONIN I HT

Glavni cilj

Utvrđiti razlikuju li se serumske koncentracije kalcitonina između HT ispitanika u odnosu na kontrolne ispitanike te između podskupina HT ispitanika podijeljenih ovisno o težini bolesti. Izvršiti sveobuhvatan niz analiza kako bi se ispitala povezanost kalcitonina s različitim fenotipovima i simptomima koji su karakteristični za HT.

2.4. VITAMIN D I HT

Hipoteza 1

Skupina pacijenata sa HT-om i skupina kontrolnih ispitanika neće se razlikovati u koncentraciji vitamina D. Ukoliko se pronađe razlika u koncentraciji vitamina D između svih ispitanika s HT-om u odnosu na kontrolne ispitanike, može se pretpostaviti da postoji povezanost vitamina D s bolešću. Ukoliko se utvrdi razlika koncentracije vitamina D između dvije podskupine HT pacijenata s lakšim i težim oblikom bolesti, može se pretpostaviti povezanost vitamina D s progresijom Hashimotovog tiroiditisa.

Hipoteza 2

Koncentracija vitamina D može korelirati s kliničkim fenotipovima i simptomima karakterističnim za bolest i/ili njenu progresiju.

2.5. POVEZANOST VITAMINA D I PREHRAMBENIH NAVIKA KOD HT ISPITANIKA

Hipoteza 3

Koncentracija vitamina D može korelirati sa prehrambenim navikama/namirnicama kod HT ispitanika.

2.6. KALCITONIN I HT

Hipoteza 4

Skupina pacijenata sa HT-om i skupina kontrolnih ispitanika se neće razlikovati u koncentraciji bazalnog kalcitonina. Ukoliko se pronađe razlika u koncentraciji kalcitonina između pacijenata s HT-om u odnosu na zdrave ispitanike, može se pretpostaviti da postoji povezanost bolesti HT-a s lučenjem kalcitonina. Ukoliko se utvrdi razlika koncentracije kalcitonina između dvije podskupine HT pacijenata s lakšim i težim oblikom bolesti, može se pretpostaviti povezanost progresije Hashimotovog tiroiditisa s lučenjem kalcitonina.

Hipoteza 5

Koncentracija kalcitonina može korelirati s kliničkim fenotipovima karakterističnim za bolest i/ili njenu progresiju.

3. ISPITANICI I POSTUPCI

3.1. ISPITANICI

Uzorci svih ispitanika (>700) uključenih u ova istraživanja sastavni su dio Hrvatske biobanke ispitanika sa Hashimotovim tireoiditisom (CROHT) (222, 223). CROHT biobanka nastala je 2013. godine, pri čemu je prikupljanje ispitanika kontinuirano sve do današnjeg dana, a sadrži biološke uzorke (DNA, seruma, plazme) čuvane na -80°C i više od 200 fenotipova te ostalih klinički značajnih podataka HT ispitanika kao i ispitanika iz kontrolne skupine, pohranjenih u digitalnoj bazi. Specijalisti nuklearne medicine su tijekom redovnih pregleda u ambulantni Kliničkog zavoda za nuklearnu medicinu, u KBC-u Split, uključili u studiju ispitanike koji su bili na kontrolnim pregledima zbog ranije dijagnosticiranog HT-a zajedno s novo dijagnosticiranim ispitanicima. Dijagnozu HT-a su postavili na temelju kliničkog pregleda, mjerenja protutijela na štitnjaču (TPOAt i TgAt) i hormona (TSH, T3, T4, fT4) te nalaza ultrazvuka štitnjače slijedeći preporuke i smjernice Europske udruge za štitnjaču (ETA), Američke udruge za štitnjaču (ATA) i Hrvatskog društva za štitnjaču. Potvrda dijagnoze HT-a kod ispitanika bili su: karakterističan nalaz ultrazvuka difuzne bolesti, povišene vrijednosti TSH i snižene ili uredne vrijednosti hormona štitnjače (T3, T4, fT4) i/ili povišene vrijednosti protutijela na štitnjaču (TPOAb, TgAb). Svim sudionicima kontrolne skupine specijalisti nuklearne medicine su, također, na osnovu kliničkog pregleda, urednog nalaza ultrazvučnog pregleda i urednih vrijednosti hormona i protutijela na štitnjaču, potvrdili odsustvo bolesti štitnjače.

Fenotipove značajne za ova istraživanja dobili smo ili direktnim mjerenjima ili putem upitnika koje su popunjavali svi ispitanici tijekom njihovog uključivanja u CROHT biobanku. Fenotipske i kliničke karakteristike ispitanika korištene u svim istraživanjima su: TSH, T3, T4, fT4, TPOAt, TgAt, volumen štitnjače, podaci o uzimanju terapije LT4, dob, indeks tjelesne težine (BMI), prisustvo/odsustvo 16 najčešćih simptoma hipotireoze te sistolički i dijastolički tlak. Pregledom podataka iz literature i liječničkom prosudbom kao najčešći simptomi hipotireoze navode se: slabost, porast tjelesne težine, konstipacija, osjetljivost na hladnoću, hladna koža, suha i hrapava koža, blijeda koža, gubitak dlaka, lomljivost kose, otečenost očnih kapaka, edem lica, periferni edemi, promuklost, usporen govor, dispneja i poremećaj pamćenja (196).

Referentne vrijednosti koje smo koristili za gore navedene hormone i protutijela koje odgovaraju vrijednostima u našoj populaciji su: TSH (0,3–3,6 mIU/L), T3 (1,3–3,6 nmol/L), T4 (57,3–161 nmol/L), fT4 (10,3–22,8 pmol/L), TPOAt (1–16 IU/mL), TgAt (5–100 IU/mL).

Dodatno, kako bi uzeli u obzir težinu bolesti, HT pacijente smo podijelili u dvije podgrupe, s blažim (MILD) i težim (OVERT) oblikom bolesti. U skupini s blažim oblikom bolesti (MILD) su bili eutireoidni (TSH unutar referentnog intervala, 0,3-3,6 mIU/L) ispitanici i oni u subkliničkoj hipotireozu (TSH u intervalu 3,6-10 mIU/L). U skupinu ispitanika s težim oblikom bolesti (OVERT) uvrstili smo one s visokim vrijednostima TSH (TSH > 10 mIU/L) i one koji primaju terapiju (LT4). Kriterij o definiranju podskupina s lakšim i težim oblikom bolesti HT za treću studiju o kalcitoninu i HT-u, opisan je u poglavlju 3.1.3..

Svi ispitanici su u trenutku uključanja u studiju bili stariji od 18 godina te su potpisali informirani pristanak za uključanje u istraživanja. Istraživanje su odobrili Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta u Splitu (Klas. br. 003-08/14-03/0001 i Reg. br. 2181-198-03-04-14-0028; Klas. br. 003-08/19-03/0003 i Reg. br. 2181-198-03-04-19-0019) i Etičko povjerenstvo KBC-a Split (Klas. br. 530-02/13-01/11 i Reg. br. 2181-147-01/06/J.B.-14-2; Klas. br. 500-03/18-01/80 i Reg. br. 2181-147-01/06/M.S.-18-2).

3.1.1. Vitamin D i HT

Za prvu presječnu studiju, iz CROHT biobanke iskoristili smo uzorke seruma za mjerenje koncentracije vitamina D te informacije o fenotipovima za ukupno 637 ispitanika, od koji je 461 (92,41% žene) ispitanik s HT-om i 176 (93,75% žene) ispitanika iz kontrolne skupine.

Među 461 ispitanikom s HT-om, 240 smo svrstali u skupinu s blažim oblikom bolesti (MILD), a u skupinu ispitanika s težim oblikom bolesti (OVERT) uvrstili smo 219 ispitanika, dok za 2 pacijenta nismo imali informacije o uzimanju terapije te nisu uključeni u usporedbu MILD vs OVERT. Prikupljanje ispitanika s HT-om bilo je ravnomjerno, tijekom sva četiri godišnja doba, dok su kontrolni ispitanici prikupljeni od prosinca 2018. do lipnja 2019. godine. u zimskom i proljetnom periodu.

U ovu studiju smo još iz CROHT biobanke iskoristili što je više moguće fenotipova za koje je poznato da imaju utjecaj na serumske koncentracije vitamina D (dob, spol, BMI, pušenje, sezonalnost uzorkovanja krvi).

Demografske i kliničke karakteristike ispitanika oboljelih od HT-a i kontrolnih ispitanika prikazane su u tablici 2.

3.1.2. Povezanost vitamina D i prehrambenih navika kod HT ispitanika

U ovaj dodatni dio istraživanja, iz CROHT biobanke uključili smo 459 HT ispitanika od kojih su 240 uvršteni u podskupinu MILD, a preostalih 219 u OVERT podskupinu.

Osim fenotipova karakterističnih za HT, kao i onih o antropometrijskim karakteristikama (opisanih u predhodnom poglavlju) u ovom istraživanju smo još upotrijebili podatke o koncentracijama vitamina D kod ispitanika sa HT-om, analiziranih u prvom istraživanju.

Za mjerenje prehrambenih navika HT ispitanika, koristili smo upitnik o učestalosti konzumiranja različitih namirnica (FFQ). Svi ispitanici su s istog geografskog područja (splitska regija) čime se osigurala izloženost istim namirnicama.

3.1.3. Kalcitonin i HT

U drugu presječnu studiju uključili smo 467 (92,7% žene) ispitanika s HT-om iz CROHT Biobanke i 184 (94% žene) ispitanika-dobrovoljaca kao kontrolnu skupinu. Ova studija je kronološki provedena dvije godine prije gore spomenute studije, pri čemu se koristio samo jedan kriterij za razdiobu HT pacijenata u dvije podskupine, a to je bilo uzimanje LT4 terapije. Stoga je podskupina BT (bez terapije) sadržavala 275 ispitanika s HT-om koji nisu uzimali terapiju LT4, a podskupina NT (na terapiji) 170 pacijenata na terapiji LT4 zbog ranije dijagnosticiranog težeg oblika HT-a. Za 22 HT ispitanika nismo imali podatke o uzimanju terapije te su isključeni iz usporedbe BT vs NT.

3.2. MATERIJALI I POSTUPCI

Serumske koncentracije hormona (TSH, T3, T4, fT4) i protutijela na štitnjaču (TPOAt, TgAt) u uzorcima ispitanika mjerena su na potpuno automatiziranom uređaju „Liaison Biomedica Chemiluminescence Analyzer“ (DiaSorin, Saluggia, Italy), u Laboratoriju za biokemiju Kliničkog zavoda za nuklearnu medicinu KBC-a Split. Referentne vrijednosti koje smo koristili za gore navedene hormone i protutijela odgovaraju vrijednostima u našoj populaciji.

Ultrazvučni pregled štitnjače je napravljen ultrazvučnim uređajem marke Medison Accuvix V10 (Samsung Medison Co. Ltd, Seoul 135-280, Korea), korištenjem visokofrekventne linearne sonde za površinska tkiva (8-12 MHz). Volumen štitnjače je izračunat kao zbroj volumena oba režnja, a volumen svakog režnja se računao kao duljina (cm) x širina (cm) x dubina (cm) x 0,47919.

3.2.1. Mjerenje vitamina D

Vitamin D smo mjerili u serumu ispitanika koristeći reagens LIAISON 25(OH) Vitamin D Total chemiluminescence immunoassay (DiaSorin, Saluggia, Italy) u Laboratoriju za biokemiju Kliničkog zavoda za nuklearnu medicinu KBC-a Split.

3.2.2. Upitnik o prehranbenim navikama HT ispitanika

Podaci o prehranbenim navikama u ispitanika s HT-om zabilježeni su s FFQ-om koji se sastojao od pitanja o učestalosti konzumacije 51 namirnica uključujući hranu i piće. Učestalost konzumacije svake namirnice se mjerila sa šest kategorija, kojoj je svakoj dodijeljen skor: svaki dan (dodijeljeno 7), 2-3 puta tjedno (dodijeljeno 2,5), jednom tjedno (dodijeljeno 1), jednom mjesečno (dodijeljeno 0,25), rijetko (dodijeljeno 0,125) i nikad (dodijeljeno 0). Upitnik je sadržavao i dodatno pitanje o učestalosti konzumacije raznih vrsta masnoća (biljno ulje, maslinovo ulje i masnoće životinjskog porijekla) s 3 kategorije: uvijek, ponekad i nikad. Izračunali smo tjednu konzumaciju svih 54 namirnica podjeljenih u 24 prehranbene kategorije. FFQ nije sadržavao informaciju o količini (porcijama) konzumirane hrane.

3.2.3. Mjerenje kalcitonina

Za mjerenje kalcitonina u serumu ispitanika koristili smo reagens Ct IRMA DiaSources ImmunoAssays (Louvain-la-Neuve, Belgium, catalog number KIP0429). Referentne vrijednosti za kalcitonin koje odgovaraju vrijednostima u našoj populaciji su: 0,9-10 pg/mL.

3.2.4. Statistička analiza

3.2.4.1. Vitamin D i HT

Kako bi detektirali moguću povezanost između vitamina D i bolesti HT, analizirali smo postoje li značajne razlike u koncentraciji vitamina D između ispitanika s HT-om i kontrolnih ispitanika. U tu svrhu koristili smo metodu logističke regresije gdje smo kao zavisnu varijablu uzeli status bolesti (ima HT/nema HT), a kao nezavisnu varijablu vitamin D uz kovarijante dob, spol, BMI, pušenje i godišnje doba uzorkovanja krvi. Dodatno smo, kao analizu osjetljivosti, ispitali povezanost vitamina D i HT-a u podgrupi od 303 ispitanika s HT-om čija krv je uzeta u istom periodu kao i kod kontrolnih ispitanika (zima-proljeće).

Istu metodu, uz iste zavisne i nezavisne varijable kao i kovarijante, koristili smo kod analize postojanja razlike u koncentraciji vitamina D između dviju podskupina ispitanika s HT-om u ovisnosti o težini bolesti (MILD i OVERT). Osim toga, usporedili smo vrijednosti vitamina D između MILD/OVERT s vrijednostima vitamina D u kontrolnoj skupini.

Izračunali smo udio pojedinaca s deficijencijom vitamina D (< 20 ng/mL) u svakoj skupini (svi HT ispitanici, kontrolni ispitanici) i podskupinama (MILD, OVERT), a zatim usporedili udio deficijencije vitamina D između HT ispitanika (svi HT, MILD, OVERT) sa kontrolnom skupinom koristeći χ^2 test. Za ove analize uključili smo samo one HT ispitanike koji odgovaraju kontrolnim ispitanicima prema godišnjem dobu uzorkovanja. Za usporedbu deficijencije između MILD i OVERT podgrupa koristili smo sve ispitanike iz ovih skupina budući da je njihovo uzorkovanje bilo ravnomjerno raspoređeno kroz godinu.

Konačno, ispitali smo korelaciju između vitamina D i kliničkih fenotipova svih HT ispitanika, kao i dvije podskupine HT ispitanika, uporabom Spearmanovog testa korelacije. Testirali smo 10 kliničkih fenotipova (TSH, T3, T4, fT4, TPOAt, TgAt, volumen štitnjače, broj prisutnih simptoma hipotireoze, sistolički i dijastolički tlak). Bonferronijevu korigiranu p -vrijednost za 10 testova, odnosno 10 analiziranih fenotipova ($p < 0,005$) uzeli smo kao prag statističke značajnosti. Prije testa korelacije, vrijednosti razine vitamina D smo korigirali za dob, spol, BMI, status pušenja i sezonu uzorkovanja koristeći model linearne regresije. Dodatno smo sve kliničke fenotipove korigirali za status LT4 terapije kod svih HT ispitanika i onih u OVERT podgrupi.

Sve gore navedene statističke analize obradile su se u programu SPSS (engl. Statistical Package for the Social Sciences 16.0; Chicago, Illinois, USA).

3.2.4.2. Povezanost vitamina D i prehrambenih navika kod HT ispitanika

Kako bi utvrdili postoji li povezanost prehrambenih navika/namirnica sa koncentracijom vitamina D u serumu kod HT ispitanika bilo je potrebno napraviti određene radnje prije same glavne analize. Tako smo učestalost konzumiranja 54 namirnica, iz FFQ-a, podijelili u 24 kategorije, što je detaljno već opisano u poglavlju 3.2.2. Sve kliničke karakteristike HT ispitanika, dodatno podijeljenih u podgrupe MILD (240) i OVERT (219), te razlike među njima, analizirane su pomoću Mann-Whitney i χ^2 testa. Učestalost tjedne konzumacije 24 skupine namirnica kod svih (SVI), (MILD) i (OVERT) ispitanika analizirana je t-testom.

Tada smo povezanost koncentracija vitamina D sa tjednim unosom 24 skupine namirnica kod svih navedenih skupina/podskupina HT ispitanika analizirali metodom linearne regresije

gdje je razina vitamina D uzeta kao zavisna varijabla, a 24 skupine namirnica kao nezavisne varijable. U svaki model linearne regresije smo kao kovarijante uključili dob, spol, BMI, skor tjelesne aktivnosti, pušenje i godišnje doba uzorkovanja. Dodatno, kod analiziranja za (SVI) i (OVERT) ispitanike, uključili smo i status terapije LT4, kao kovarijantu. Normalnost distribucije reziduala ispitana je Kolmogorov-Smirnovljevom testom dok je homogenost varijance testirana pomoću Levenova testa. Opisane statističke analize obradile su se u programu SPSS (engl. Statistical Package for the Social Sciences 16.0; Chicago, Illinois, USA).

3.2.4.3. Kalcitonin i HT

Kako bi ispitali ima li bolest HT utjecaj na lučenje kalcitonina analizirali smo postoje li značajne razlike medijana koncentracije kalcitonina između ispitanika s HT-om i kontrolnih ispitanika uporabom Mann-Whitney testa. Prethodno smo Kolmogorov-Smirnovljevom testom utvrdili da koncentracije kalcitonina nisu normalno distribuirane. Također, Mann-Whitney testom analizirali smo razlike medijana koncentracije kalcitonina između dviju podskupina ispitanika s HT-om u ovisnosti o težini bolesti (BT i NT) sa kontrolnom skupinom te između podskupina BT i NT. Istim testom smo ispitali i razliku medijana koncentracije kalcitonina između HT ispitanika podijeljenih prema spolu.

Korelaciju između kalcitonina i kliničkih fenotipova svih HT ispitanika, kao i dvije podgrupe HT ispitanika analizirali smo uporabom Spearmanovog testa korelacije. Testirali smo 14 kliničkih fenotipova (TSH, T3, T4, fT4, TPOAt, TgAt, BMI, BSA, volumen štitnjače, dob, trajanje bolesti, broj prisutnih simptoma hipotireoze, sistolički i dijastolički tlak). Bonferronijevu korigiranu p-vrijednost za 14 testova, odnosno 14 analiziranih fenotipova ($p < 0,00357$) uzeli smo kao prag statističke značajnosti. Prije korelacijske analize, modelom linearne regresije smo za sve HT ispitanike, sve fenotipove, osim dob i trajanje bolesti, korigirali za terapiju LT4. Sve navedene statističke analize obradili smo R statističkim programom.

4. REZULTATI

U tablici 2. prikazane su kliničke karakteristike: 459 ispitanika s HT-om, dodatno svrstanih u dvije podskupine ovisno o težini bolesti te 176 ispitanika iz kontrolne skupine. Najvećim dijelom su žene: 424 (92,37%) u skupini ispitanika s HT-om te 165 (93,75%) u kontrolnoj skupini.

Vrijednosti TSH i hormona štitnjače su usporedive kod svih ispitanika neovisno o težini bolesti što ukazuje na to da oni sa blažim oblikom, u ranoj fazi bolesti (MILD) još uvijek imaju očuvanu funkciju štitne žlijezde, dok kod bolesnika s težim oblikom (OVERT) za postizanje odnosno očuvanje eutireoze pomaže odgovarajuća terapija s levotiroksinom, LT4.

Međutim, ostale kliničke karakteristike prikazane u navedenoj tablici ukazuju na, očekivano, uznapredovali i teži oblik HT-a kod OVERT podskupine u odnosu na MILD, pa su tako kod njih izmjerene više vrijednosti medijana za indeks tjelesne težine i za serumsku koncentraciju protutijela te osjećaju više simptoma hipotireoze.

Osim toga, u prikazanoj tablici 2. uočljiva je značajna deficijencija vitamina D u svim navedenim skupinama i podskupinama, ali na taj dio ću se detaljnije osvrnuti u nastavku, točnije kod istraživanja o vitaminu D i HT-u.

Tablica 2. Kliničke karakteristike svih ispitanika iz prve i druge studije

FENOTIP	HT ISPITANICI			KONTROLE
	SVI	MILD	OVERT	
	(N=459)	(N=240)	(N=219)	
	Medijan (Q1-Q3)	Medijan (Q1-Q3)	Medijan (Q1-Q3)	Medijan (Q1-Q3)
Vitamin D, ng/mL	19,70 (14,40-25,20)	20,70 (14,90-25,80)	19,00 (13,95-24,55)	17,3 (13,2-22,7)
Vitamin D, ng/mL*	17,1 (13,2-22,2)	17,7 (14,0-22,6)	16,7 (12,1-21,7)	17,3 (13,2-22,7)
Vitamin D deficijencija, N (%)	238 (51,84)	115 (47,92)	123 (56,16)	107 (60,79)
Vitamin D insuficijencija, N (%)	172 (37,53)	97 (40,42)	75 (34,25)	52 (30,07)
Vitamin D suficijencija, N (%)	49 (10,63)	28 (11,66)	21 (9,59)	16 (9,14)
Dob, godine	38,02 (27,76-48,49)	35,81 (25,78-46,95)	40,28 (31,04-50,37)	35,17 (30,12-44,31)
Ženski spol, N(%)	424 (92,37)	226 (94,17)	198 (90,41)	165 (93,75)
BMI, kg/m ²	23,52 (20,76-26,85)	23,15 (20,72-26,59)	24,01 (21,02-26,99)	22,66 (20,96-25,24)
TSH, mIU/L	3,33 (1,74-5,68)	3,23 (1,82-4,74)	3,52 (1,67-12,30)	1,48 (1,14-1,95)
T3, nmol/L	1,60 (1,30-1,80)	1,70 (1,50-1,90)	1,50 (1,20-1,80)	1,50 (1,40-1,70)
T4, nmol/L	105 (89-118)	106 (91-117,25)	103 (84,85-121)	101 (89,37-116)
fT4, pmol/L	12,10 (10,20-13,20)	12,10 (10,90-13,10)	11,90 (9,90-13,70)	12,70 (11,90-13,70)
TgAt, IU/ml	135 (36,40-422,40)	121,50 (26,40-321,30)	192 (49,30-596,05)	10,75 (9,10-18,00)
TPOAt, IU/ml	212 (27,60-652,90)	161,50 (17,40-529,75)	273 (66,40-945,50)	3,40 (1,20-8,70)
Volumen štitnjače, cm ³	9,85 (7,30-13,91)	9,89 (7,72-13,26)	9,59 (6,82-14,90)	8,69 (6,63-10,60)
Broj simptoma	4 (1-7)	3 (1-6)	5 (2-8)	/
Sistolički tlak, mmHg	120 (110-130)	115 (110-130)	120 (110-130)	110 (100-120)
Dijastolički tlak, mmHg	70 (65-80)	70 (65-78,75)	70 (65-80)	65 (60-80)

Q1- prvi kvartil, Q3- treći kvartil, * uzorci iz perioda zima-proljeće.

4.1. VITAMIN D I HT

Logističkom regresijom nismo pronašli razlike u razinama vitamina D: između HT ispitanika i ispitanika u kontrolnoj skupini (OR=0,987 (0,958-1,017), $P=0,401$); između MILD podskupine i kontrolne skupine (OR=1,005 (0,970-1,041), $P=0,788$); kao niti između OVERT podskupine i kontrolne skupine (OR=0,971 (0,937-1,006), $P=0,105$). Jedinu razliku u koncentracijama vitamina D, nominalno značajnu, pronašli smo između MILD i OVERT podskupine HT ispitanika (OR=1,038 (1,005-1,071), $P=0,023$) (tablica 3).

Također, logističkom regresijom, ali ovaj put uključivši samo HT ispitanike čije uzorkovanje krvi je bilo u istom periodu (zima-proljeće) kao što je bilo i za ispitanike iz

kontrolne skupine, nismo pronašli razlike u razinama vitamina D: između HT ispitanika i ispitanika u kontrolnoj skupini (OR=0,983 (0,954-1,014), $P=0,277$); između MILD podskupine i kontrolne skupine (OR=1,002 (0,966-1,038), $P=0,927$); kao niti između OVERT podskupine i kontrolne skupine (OR=0,966 (0,930-1,002), $P=0,065$) (tablica 3).

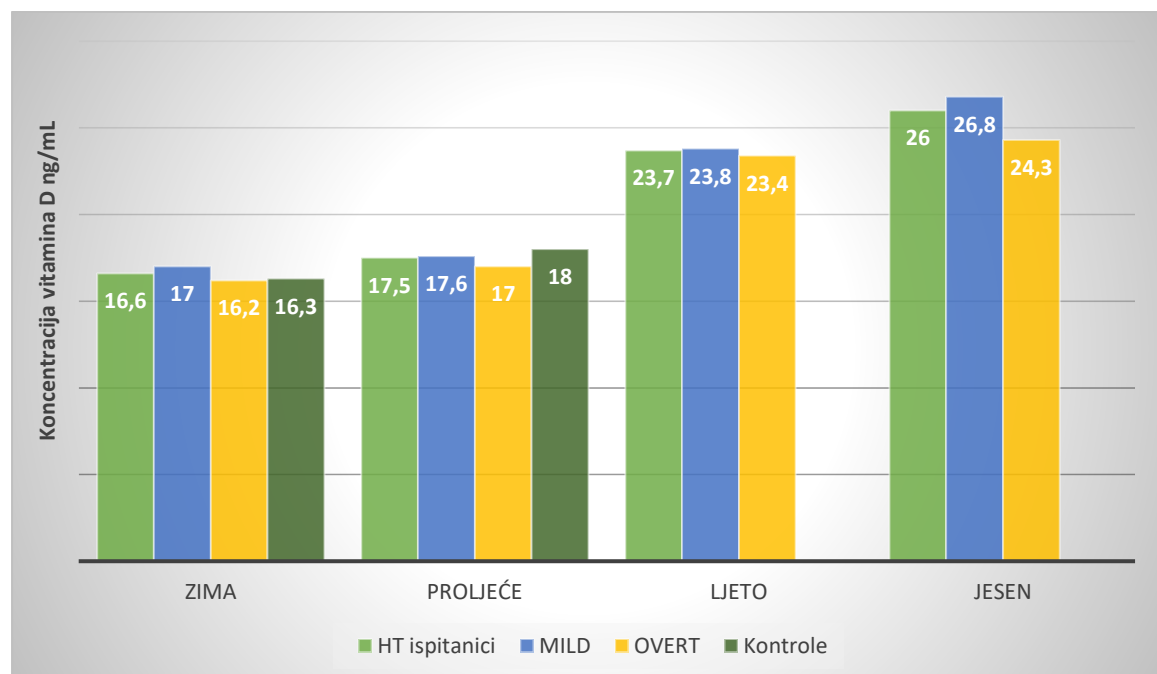
Tablica 3. Rezultati usporedbe koncentracija vitamina D između skupina

Skupine	N1	N2	Medijan 1 (Q1-Q3)	Medijan 2 (Q1-Q3)	OR (95% CI)	P - vrijednost
HT vs. kontrole	461	175 ^c	19,7 (14,4-25,2)	17,3 (13,2-22,7)	0,987 (0,958-1,017)	0,401
HT vs. kontrole *	303	175	17,1 (13,2-22,2)	17,3 (13,2-22,7)	0,983 (0,954-1,014)	0,277
MILD vs. kontrole	240	175	20,7 (14,9-25,8)	17,3 (13,2-22,7)	1,005 (0,970-1,041)	0,788
MILD vs. kontrole *	155	175	17,7 (14,0-22,6)	17,3 (13,2-22,7)	1,002 (0,966-1,038)	0,927
OVERT vs. kontrole	219	175	19 (13,9-24,5)	17,3 (13,2-22,7)	0,971 (0,937-1,006)	0,105
OVERT vs. kontrole *	147	175	16,7 (12,1-21,7)	17,3 (13,2-22,7)	0,966 (0,930-1,002)	0,065
MILD vs. OVERT	240	219	20,7 (14,9-25,8)	19 (13,9-24,5)	1,038 (1,005-1,071)	0,023

Koristili smo model logističke regresije uz status bolesti kao nezavisnu varijablu, a koncentraciju vitamina D (uz kovarijante dob, spol, BMI, status pušenja, sezonalnost uzorkovanja krvi) kao zavisnu varijablu.

* Uzorci iz perioda zima-proljeće.

N – broj ispitanika; OR – omjer izgleda sa 95% intervalom pouzdanosti; Q1- prvi kvartil, Q3- treći kvartil.



Slika 14. Distribucija vitamina D po skupinama ispitanika tijekom godine

Distribucija razina vitamina D tijekom godine, očekivano, najniža je u periodu zima-proljeće, a najviša tijekom perioda ljeto-jesen, prikazana na slici 14 za sve HT ispitanike, MILD i OVERT podskupinu te kontrolne ispitanike.

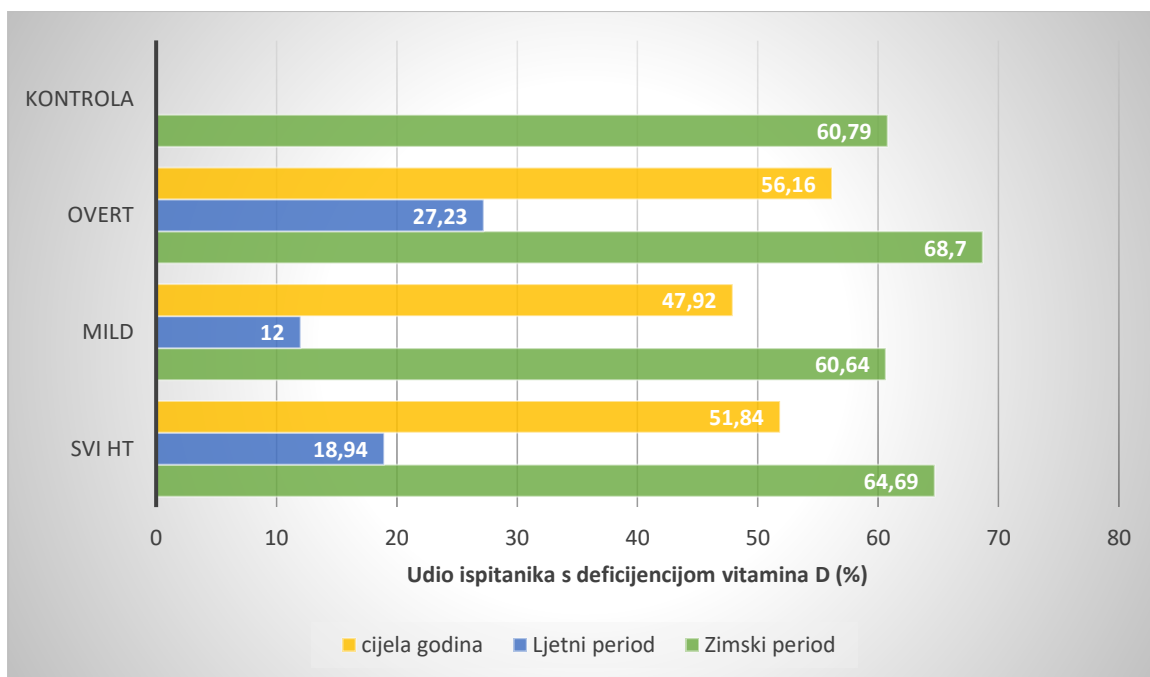
Značajan rezultat ovog istraživanja jest da je udio ispitanika s deficijencijom vitamina D pronađen u svim ispitivanim skupinama tijekom cijele godine: svi HT ispitanici, SVI (51,84%), MILD (47,92%) i OVERT (56,16%) (tablica 2) Točnije, samo 10,63% svih HT ispitanika ima dostatne serumske razine vitamina D, i to 11,66% njih iz MILD podgrupe, a svega 9,59% sa težim oblikom (OVERT). Izmjereni udio ispitanika s deficijencijom vitamina D, sada analiziran samo za HT ispitanike čije uzorkovanje krvi je bilo u istom periodu (zima-proljeće) kao što je bilo i za ispitanike iz kontrolne skupine, još je izraženiji: SVI (64,69%), MILD (60,64%), OVERT (68,70%) i kontrolni ispitanici (60,79%) (tablica 4).

Tablica 4. Usporedba udjela ispitanika sa deficijencijom vitamina D prema skupinama

Skupine	N1	N2	Udio 1 (%)	Udio 2 (%)	P- vrijednost (χ^2 -Test)
HT vs. kontrole *	196	107	64,69	60,79	0,394
MILD vs. kontrole *	94	107	60,64	60,79	0,977
OVERT vs. kontrole *	101	107	68,7	60,79	0,139
MILD vs. OVERT	115	123	47,92	56,16	0,077

* Uzorci iz perioda zima-proljeće. N-broj ispitanika

Za period ljeto-jesen, očekivano, udio ispitanika sa deficijencijom vitamina D (slika 15), u navedenim skupinama je bio niži: svi HT ispitanici, SVI (18,94%), MILD (12%) i OVERT (27,23%). Rezultati usporedbe udjela ispitanika s deficijencijom vitamina D između HT ispitanika, MILD i OVERT podskupina, čije uzorkovanje je bilo u istom periodu kao i za kontrolne ispitanike, i kontrolnih ispitanika, kao i između MILD i OVERT podskupine, prikazano je u tablici 3. Nismo pronašli statistički značajnu razliku u deficijenciji vitamina D između analiziranih skupina, međutim, vidi se trend povećanja deficijencije vitamina D od MILD prema OVERT HT ispitanicima.



Slika 15. *Udio ispitanika s deficijencijom vitamina D po skupinama*

Jedan od ciljeva ovog istraživanja, bio je i provesti sveouhvatn niz analiza kako bi testirali povezanost vitamina D s velikim brojem fenotipova i simptoma karakterističnih za HT. Rezultati ove korelacijske analize između serumske koncentracije vitamina D i kliničkih fenotipova kod svih HT ispitanika i podskupina MILD i OVERT, prikazani su u tablici 5. Nismo pronašli statistički značajnu korelaciju (Bonferroni korigirana P -vrijednost) između koncentracije vitamina D i klinički značajnih fenotipova. Pronađene su dvije, nominalno značajne korelacije; negativna između vitamina D i TSH kod svih HT ispitanika ($r = -0,113$, $P = 0,029$) te pozitivna korelacija između vitamina D i sistoličkog tlaka za OVERT ispitanike ($r = 0,205$, $P = 0,025$).

Tablica 5. Rezultati korelacijske analize između koncentracije vitamina D i kliničkih fenotipova karakterističnih za HT

Fenotip		SVI (N=461)	MILD (N=240)	OVERT (N=219)
TSH	r	-0,113	-0,092	-0,015
	P	0,029	0,2	0,837
T3	r	-0,008	-0,013	-0,135
	P	0,882	0,857	0,07
T4	r	0,026	-0,025	0,053
	P	0,622	0,73	0,478
fT4	r	0,011	-0,009	-0,006
	P	0,832	0,906	0,941
TgAt	r	-0,048	-0,002	-0,026
	P	0,357	0,979	0,724
TPOAt	r	-0,039	-0,058	0,047
	P	0,45	0,419	0,53
Volumen štitnjače	r	-0,004	0,009	0,013
	P	0,947	0,899	0,867
Broj simptoma hipotireoze	r	0,018	0,11	-0,032
	P	0,755	0,178	0,693
Sistolički tlak	r	0,073	-0,03	0,205
	P	0,249	0,731	0,025
Dijastolički tlak	r	-0,001	-0,04	0,112
	P	0,987	0,644	0,227

r- Spearmanov koeficijent korelacije

Nominalno značajne korelacije označene su podebljanim slovima u tablici.

4.2. POVEZANOST VITAMINA D I PREHRAMBENIH NAVIKA KOD HT ISPITANIKA

Učestalost tjedne konzumacije namirnica svrstanih u 24 kategorije prikazani su u tablici 6. Iz podatka u tablici 6. vidi se da su mlijeko i mliječni proizvodi namirnice koje se najučestalije konzumiraju kod svih HT ispitanika neovisno o stadiju bolesti, a slijedi ih konzumacija povrća. Navedene namirnice se konzumiraju gotovo 10 puta tijekom tjedna. Najrjeđe se konzumiraju, što opet vrijedi za sve HT ispitanike neovisno o težini bolesti, masna i bijela riba te plodovi mora, i to manje od jedanput tjedno.

Tablica 6. Učestalost tjedne konzumacije 24 prehrambene skupine kod HT ispitanika

Skupine namirnica	SVI (N=459) Tjedni unos (puta/tjedan)		MILD (N=240) Tjedni unos (puta/tjedan)		OVERT (N=219) Tjedni unos (puta/tjedan)		P*
	Srednja vrijednost	SD	Srednja vrijednost	SD	Srednja vrijednost	SD	
Mlijeko i mliječni proizvodi	9,83	5,52	10,00	5,74	9,63	5,28	0,497
Povrće	9,53	5,96	9,13	5,68	9,99	6,25	0,144
Rafinirane žitarice	6,12	3,66	6,21	3,76	6,01	3,57	0,566
Slatkiši	5,85	5,29	5,98	5,39	5,71	5,20	0,609
Kava	5,18	2,90	5,00	2,97	5,41	2,80	0,154
Voće	5,04	3,13	4,93	3,03	5,14	3,25	0,502
Biljno ulje	3,92	3,08	4,03	3,10	3,77	3,06	0,398
Maslinovo ulje	3,55	3,02	3,31	3,00	3,82	3,03	0,088
Krumpiri	2,91	2,10	2,90	2,07	2,90	2,11	0,974
Bijelo meso	2,76	1,95	2,75	1,84	2,78	2,06	0,863
Mesne prerađevine	2,72	2,61	2,71	2,61	2,73	2,62	0,939
Čaj	2,66	2,66	2,73	2,64	2,60	2,69	0,616
Crveno meso	2,54	2,10	2,31	1,99	2,80	2,20	0,017
Cjelovite žitarice	1,76	2,26	1,78	2,24	1,74	2,30	0,844
Jaja	1,56	1,28	1,57	1,29	1,56	1,28	0,946
Bezalkoholna pića	1,55	2,34	1,46	2,20	1,65	2,50	0,396
Orašasti plodovi	1,48	1,90	1,41	1,83	1,56	1,99	0,443
Likeri	1,42	2,63	1,26	2,39	1,61	2,88	0,184
Marmelade, džemovi	1,11	1,62	1,06	1,60	1,17	1,65	0,494
Slane grickalice	0,94	1,49	0,99	1,57	0,88	1,39	0,481
Životinjske masnoće	0,88	1,51	0,73	1,21	1,04	1,77	0,043
Masna riba	0,79	0,96	0,74	0,81	0,85	1,10	0,247
Bijela riba	0,69	0,87	0,65	0,84	0,73	0,90	0,327
Plodovi mora	0,60	1,20	0,57	1,15	0,64	1,26	0,596

Tjedni unos navedenih namirnica poredan je prema učestalosti konzumacije; od najvišeg prema najnižem (srednja vrijednost uz SD), SD – standardna devijacija.

*t-test za utvrđivanje razine značajnosti između MILD I OVERT podskupina.

Analiza povezanosti serumskih koncentracija vitamina D sa učestalošću konzumacije 24 skupine namirnica za sve HT ispitanika kao i MILD i OVERT podskupine (tablica 7), utvrdila je značajnu povezanost razina vitamina D sa tri skupine namirnica i to: (1) negativnu povezanost sa konzumacijom kave (SVI: $\beta=-0,433$, $P=0,005$; OVERT: $\beta=-0,62$, $P=0,008$); (2) negativnu povezanost s konzumacijom slatkiša (SVI: $\beta=-0,195$, $P=0,034$; OVERT: $\beta=-0,431$, $P=0,006$); (3) pozitivnu povezanost s konzumacijom povrća (SVI: $\beta=0,182$, $P=0,019$; OVERT: $\beta=0,311$, $P=0,009$). Osim navedenih, pronašli smo još tri pozitivne povezanosti, na graničnoj razini značajnosti, serumskih koncentracija vitamina D sa konzumacijom: (1) biljnog ulja (SVI: $\beta=0,265$, $P=0,060$); (2) mlijeka i mliječnih proizvoda (SVI: $\beta=0,145$, $P=0,081$); (3) bezalkoholnih pića (SVI: $\beta=0,333$, $P=0,091$; MILD: $\beta=0,529$, $P=0,088$) (tablica 7.).

Tablica 7. Rezultati analize povezanosti koncentracije vitamina D i konzumacije 24 prehrambene skupine kod SVIH HT ispitanika, u MILD i u OVERT podskupinama

Skupine namirnica	SVI (N=459)					MILD (N=240)					OVERT (N=219)				
	β	SE	P	95.0% CI		β	SE	P	95.0% CI		β	SE	P	95.0% CI	
				donji	gornji				donji	gornji				donji	gornji
Kava	-0,433	0,154	0,005	-0,736	-0,131	-0,211	0,239	0,379	-0,685	0,262	-0,620	0,229	0,008	-1,074	-0,166
Povrće	0,182	0,077	0,019	0,030	0,333	0,078	0,117	0,508	-0,154	0,309	0,311	0,117	0,009	0,079	0,543
Slatkiši	-0,195	0,092	0,034	-0,375	-0,015	-0,015	0,127	0,905	-0,266	0,236	-0,431	0,154	0,006	-0,735	-0,126
Biljno ulje	0,265	0,140	0,060	0,011	0,540	0,169	0,206	0,413	-0,239	0,577	0,294	0,211	0,167	-0,125	0,713
Mlijeko i mliječni proizvodi	0,145	0,083	0,081	-0,018	0,307	0,174	0,110	0,116	-0,044	0,392	0,035	0,143	0,806	-0,248	0,318
Bezalkoholna pića	0,333	0,196	0,091	-0,053	0,720	0,529	0,308	0,088	-0,081	1,138	0,329	0,275	0,235	-0,217	0,875
Rafinirane žitarice	-0,185	0,127	0,147	-0,436	0,065	-0,133	0,185	0,472	-0,499	0,232	-0,123	0,191	0,523	-0,502	0,257
Orašasti plodovi	0,334	0,246	0,176	-0,151	0,818	0,606	0,380	0,113	-0,146	1,358	0,447	0,368	0,227	-0,282	1,175
Likeri	0,191	0,162	0,239	-0,128	0,511	0,042	0,259	0,871	-0,470	0,555	0,374	0,250	0,137	-0,121	0,870
Bijelo meso	-0,274	0,235	0,245	-0,736	0,189	0,357	0,402	0,377	-0,439	1,153	-0,544	0,335	0,107	-1,207	0,119
Marmelade, džemovi	0,328	0,288	0,255	-0,239	0,895	0,489	0,449	0,278	-0,400	1,378	0,194	0,423	0,648	-0,645	1,032
Plodovi mora	-0,541	0,529	0,307	-1,582	0,500	0,120	1,071	0,911	-1,999	2,239	-0,281	0,760	0,713	-1,788	1,227
Čaj	-0,160	0,169	0,346	-0,494	0,174	-0,245	0,243	0,316	-0,727	0,236	0,029	0,252	0,909	-0,470	0,528
Masna riba	0,743	0,802	0,355	-0,835	2,322	2,067	1,347	0,127	-0,598	4,732	-0,077	1,113	0,945	-2,284	2,130
Mesne preradevine	0,157	0,187	0,400	-0,210	0,524	0,146	0,272	0,593	-0,392	0,683	0,434	0,306	0,158	-0,172	1,040
Krumpiri	0,186	0,225	0,409	-0,257	0,629	0,156	0,341	0,649	-0,519	0,831	0,239	0,319	0,456	-0,394	0,871
Slane grickalice	0,232	0,310	0,454	-0,378	0,842	-0,169	0,457	0,712	-1,074	0,736	0,386	0,503	0,445	-0,612	1,383
Životinjske masnoće	-0,172	0,274	0,529	-0,712	0,367	-0,043	0,512	0,932	-1,056	0,969	-0,331	0,331	0,320	-0,988	0,326
Cjelovite žitarice	-0,113	0,185	0,541	-0,478	0,251	-0,393	0,282	0,167	-0,951	0,166	0,148	0,299	0,622	-0,445	0,741
Bijela riba	-0,398	0,656	0,545	-1,689	0,894	0,092	1,090	0,933	-2,065	2,248	-0,721	0,944	0,446	-2,593	1,150
Jaja	-0,174	0,302	0,564	-0,769	0,420	-0,013	0,441	0,977	-0,884	0,859	-0,428	0,508	0,401	-1,435	0,579
Maslinovo ulje	0,036	0,156	0,817	-0,271	0,343	0,047	0,232	0,840	-0,412	0,505	-0,163	0,229	0,478	-0,618	0,291
Crveno meso	-0,038	0,251	0,880	-0,533	0,457	-0,044	0,401	0,914	-0,837	0,750	-0,196	0,356	0,582	-0,901	0,509
Voće	0,021	0,146	0,888	-0,267	0,308	0,179	0,217	0,410	-0,250	0,608	-0,136	0,207	0,513	-0,546	0,274

β – veličina učinka; SE – standardna greška; CI- interval pouzdanosti

Model linearne regresije uz razinu vitamina D kao zavisnu varijablu, a 24 skupine namirnica kao nezavisne varijable. Dob, spol, BMI, status pušenja, sezonalnost uzorkovanja, skor tjelesne aktivnosti tijekom svakodnevnog rada i skor vježbanja i bavljenja sportom su kovarijante uključene u sve analize. Status LT4 terapije, kao dodatna varijabla, uključen je kod SVIH HT ispitanika, kao i kod onih iz OVERT podskupine. Namirnice su poredane prema P-vrijednosti kod SVIH HT ispitanika, (statistički značajne vrijednosti su podebljane u tablici).

4.3. KALCITONIN I HT

Srednje vrijednosti koncentracije kalcitonina i kliničke karakteristike svih ispitanika prikazane su u tablici 8. Vrijednosti hormona štitnjače su usporedive kod svih ispitanika neovisno o težini bolesti dok su vrijednosti za TSH nešto više kod HT ispitanika u odnosu na kontrolnu skupinu. Točnije, HT ispitanicima iz podskupine sa težim oblikom bolesti, NT, za postizanje i očuvanje eutireoze pomaže odgovarajuća terapija s levotiroksinom, LT4, stoga im je vrijednost TSH unutar referentnog intervala za razliku od TSH kod podskupine HT ispitanika koji nisu na terapiji, BT, a koji, uz eutireoidne ispitanike, uključuju i one u subliničkoj hipotireozu. Svi HT ispitanici imaju, očekivano, znatno više serumske koncentracije protutijela TgAt i TPOAt u odnosu na kontrolnu skupinu. Ostale kliničke karakteristike prikazane u navedenoj tablici ukazuju na progresiju bolesti kod NT podskupine u odnosu na BT: bolest duže traje, osjećaju više simptoma hipotireoze i imaju manji volumen štitnjače.

Tablica 8. Kliničke karakteristike svih ispitanika iz treće studije

FENOTIP	HT ISPITANICI			KONTROLE (N=184)
	SVI (N=467)	BT (N=275)	NT (N=170)	
	Medijan (Q1-Q3)	Medijan (Q1-Q3)	Medijan (Q1-Q3)	Medijan (Q1-Q3)
Kalcitonin, pg/mL	2,2 (1-4,4)	2,3 (1,1-4,65)	1,9 (0,9-4,4)	2,35 (0,9-4,92)
Dob, godine	37,93 (28,21-48,45)	37,75 (27,74-47,77)	40,16 (29,94-50,93)	35,85 (30,19-44,94)
TSH, mIU/L	3,31 (1,77-5,63)	3,78 (2,08-6,36)	2,52 (1,31-4,30)	1,49 (1,14-1,95)
T3, nmol/L	1,60 (1,30-1,80)	1,60 (1,30-1,80)	1,60 (1,35-1,80)	1,50 (1,40-1,70)
T4, nmol/L	104,5 (88,9-118)	101 (84,4-115,0)	110,5 (92,57-125)	100,5 (88,34-116)
fT4, pmol/L	12,10 (10,20-13,20)	11,9 (9,90-12,8)	12,30 (10,90-13,90)	12,70 (11,90-13,70)
TgAt, IU/ml	133,7 (36,70-422,2)	127,90 (32,25-467)	136,3 (40,20-414,5)	10,75 (9,10-18,25)
TPOAt, IU/ml	212 (27,35-647,45)	225,0 (24,40-660,25)	168,3 (35,30-641)	3,20 (1,20-8,20)
BMI, kg/m ²	23,51 (20,8-26,65)	23,53 (20,98-27,11)	23,68 (20,85-26,37)	22,66 (20,92-25,46)
BSA, m ²	1,81 (1,7-1,94)	1,81 (1,70-1,94)	1,83 (1,70-1,94)	1,78 (1,69-1,92)
Trajanje bolesti, dani	161 (0-1785)	1 (0-168)	1739 (744-3314)	/
Volumen štitnjače, cm ³	10,0 (7,30-14,04)	10,46 (7,85-14,74)	8,84 (6,36-12,32)	8,69 (6,66-10,59)
Broj simptoma	4 (1-7)	3 (1-7)	5 (2-8)	/
Sistolčki tlak, mmHg	120 (110-130)	118 (110-130)	120 (110-130)	110 (100-120)
Dijastolički tlak, mmHg	70 (65-80)	70 (65-80)	70 (65-80)	67,5 (60-80)

Q1- prvi kvartil, Q3- treći kvartil, za 22 HT ispitanika nismo imali podatke o terapiji te su isključeni iz usporedbe BT vs NT

Nismo pronašli statistički značajnu razliku u vrijednostima koncentracije kalcitonina između: HT ispitanika (2,2 pg/mL) i kontrolnih ispitanika (2,35 pg/mL), $P=0,717$; podskupine HT ispitanika na terapiji (1,9 pg/ml) i kontrolnih ispitanika (2,35 pg/mL), $P=0,874$; kao niti između podskupine HT ispitanika bez terapije (2,3 pg/mL) u odnosu na kontrolnu skupinu (2,35 pg/mL), $P=0,528$. I na kraju, usporedbom vrijednosti koncentracije kalcitonina između dvije podskupine ispitanika s HT-om, onih na terapiji LT4-om i onih bez terapije, nismo našli statistički značajnu razliku ($P=0,347$) (tablica 9).

Tablica 9: Rezultati usporedbe vrijednosti koncentracije kalcitonina između skupina

Skupine	N1	N2	Kalcitonin 1 Medijan (Q1-Q3)	Kalcitonin 2 Medijan (Q1-Q3)	P- vrijednost
HT vs. kontrole	467	184	2,2 (1-4,4)	2,35 (0,9-4,92)	0,717
BT vs. kontrole	275	184	2,3 (1,1-4,65)	2,35 (0,9-4,92)	0,528
NT vs. kontrole	170	184	1,9 (0,9-4,4)	2,35 (0,9-4,92)	0,874
BT vs. NT	275	170	2,3 (1,1-4,65)	1,9 (0,9-4,4)	0,347

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

Mann–Whitney za analizu razlika u koncentracijama kalcitonina među svim skupinama i podskupinama.

Predhodno je Kolmogorov-Smirnovljevim testom utvrđeno da vrijednosti kalcitonina ne slijede normalnu raspodjelu,

Udio ispitanika sa povišenim vrijednostima kalcitonina ($Ct >10$ pg/mL) bio je: 17 (3,64%) kod svih HT ispitanika od koji je 5 (2,94%) bilo u podskupini HT ispitanika na terapiji LT4-om, a 12 (4,36%) u podskupini HT ispitanika bez terapije. U skupini kontrolnih ispitanika, 3 (1,63%) ispitanika su imali povišene vrijednosti kalcitonina. Statistički značajne razlike u udjelu ispitanika sa povišenim vrijednostima kalcitonina između svih HT ispitanika i ispitanika iz kontrolne skupine nije bilo ($P=0,181$), kao niti između dvije podskupine; ispitanika na terapiji (2,9%) i ispitanika bez terapije (4,36%), ($P=0,447$).

U skupini HT ispitanika je bilo uključeno 35 muškaraca (5,7 pg/mL), koji su imali značajno više vrijednosti izmjerenog kalcitonina u odnosu na 432 žene (2,0 pg/mL), $P=2,84 \times 10^{-6}$.

Rezultati korelacijske analize između koncentracije kalcitonina i kliničkih fenotipova svih HT ispitanika i dvije podskupine HT ispitanika (tablica 10) jasno pokazuju da nije bilo statistički značajne korelacije među navedenim parametrima.

Pronađene su tri nominalno značajne korelacije; slaba negativna korelacija kalcitonina sa koncentracijom protutijela TgAt kod svih HT ispitanika ($r=-0,1$, $P=0,04$); slaba negativna korelacija koncentracije kalcitonina sa životnom dobi kod svih HT ispitanika ($r=-0,09$, $P=0,047$) i u skupini HT ispitanika sa blažim oblikom bolesti ($r=-0,13$, $P=0,04$), slaba

pozitivna korelacija kalcitonina sa BSA (površinom tijela) u podskupni pacijenata koji uzimaju LT4 ($r=0,16$, $P=0,042$). Zatim smo testirali povezanost fenotipova (TgAt, dob, BSA i status terapije LT4) s koncentracijom kalcitonina metodom linearne regresije i svi su ostali statistički značajni, a statistički najznačajniji je bila dob (TgAt: $\beta = -0,111$ $P=0,023$; dob: $\beta = -0,134$, $P=0,008$; BSA: $\beta = 0,122$, $P=0,015$).

Tablica 10. Rezultati korelacijske analize kalcitonina sa karakterističnim kliničkim fenotipovima

Fenotip		Ct - SVI (N=467)	Ct - NT (N=170)	Ct - BT (N=275)
TSH	<i>r</i>	-0,07	0,06	-0,05
	<i>P</i>	0,157	0,484	0,454
T3	<i>r</i>	-0,01	0,06	-0,03
	<i>P</i>	0,822	0,467	0,621
T4	<i>r</i>	-0,06	-0,13	0,01
	<i>P</i>	0,231	0,111	0,898
fT4	<i>r</i>	0,001	0,01	0,04
	<i>P</i>	0,991	0,908	0,542
TgAt	<i>r</i>	-0,10	-0,04	-0,10
	<i>P</i>	0,040	0,617	0,103
TPOAt	<i>r</i>	-0,01	0,04	-0,02
	<i>P</i>	0,766	0,630	0,756
Volumen štitnjače	<i>r</i>	0,09	0,06	0,11
	<i>P</i>	0,066	0,482	0,082
Trajanje bolesti	<i>r</i>	-0,05	-0,08	0,001
	<i>P</i>	0,278	0,281	0,993
Dob	<i>r</i>	-0,09	-0,03	-0,13
	<i>P</i>	0,047	0,710	0,040
BMI	<i>r</i>	-0,01	0,11	-0,10
	<i>P</i>	0,777	0,159	0,093
BSA	<i>r</i>	0,08	0,16	0,03
	<i>P</i>	0,081	0,042	0,648
Broj simptoma hipotireoze	<i>r</i>	0,02	-0,004	0,03
	<i>P</i>	0,675	0,965	0,667
Sistolički tlak	<i>r</i>	0,01	0,03	-0,02
	<i>P</i>	0,924	0,781	0,818
Dijastolički tlak	<i>r</i>	-0,01	-0,11	0,05
	<i>P</i>	0,817	0,269	0,429

r- Spearmanov koeficijent korelacije. Nominalno značajne korelacije su prikazane podebljanim slovima. Svi fenotipovi (osim dobi i trajanja bolesti) korigirani su za status terapije LT4 (za skupinu SVI HT ispitanici, te za podskupinu NT).

5. RASPRAVA

5.1. VITAMIN D I HT

Smatra se da je genetska predispozicija uz čimbenike okoliša odgovorna za nastanak HT-a, pri čemu moguća uloga nedostatka vitamina D u tom procesu, još uvijek nije dovoljno razjašnjena. Stoga smo u ovom istraživanju proveli opsežne analize koristeći uzorke iz CROHT biobanke koja je trenutno jedina svjetska biobanka klinički dijagnosticiranih ispitanika s HT-om s pomno izmjerenim mnogobrojnim fenotipovima i kliničkim osobinama. Ovaj resurs nam je omogućio vjerodostojno provjeravanje povezanosti koncentracije vitamina D s prisutnošću i progresijom bolesti HT. Glavni rezultat ove presječne studije jest da ne postoji razlika u koncentraciji vitamina D između HT ispitanika, kao niti u podskupinama definiranim težinom bolesti, sa kontrolnim ispitanicima. Također, ni udio ispitanika sa deficijencijom vitamina D, nije se značajno razlikovao među svim ispitivanim skupinama i podskupinama. Jedinu, premda nominalno značajnu razliku u razinama vitamina D, pronašli smo između podskupina ispitanika sa blažim i onih sa težim oblikom bolesti.

Od prvog publiciranog rada iz 2009. godine (162) koji je analizirao odnos između vitamina D i autoimunih bolesti štitnjače, pa do radova novijeg datuma, najveći broj istraživanja opisivao je negativnu povezanost koncentracija vitamina D i HT-a. Ipak, autori naglašavaju da čitav niz čimbenika koji utječu na heterogenost ispitivane populacije, često nisu bili uključeni u analize. Važno je istaknuti i da je u studijama uglavnom bio uključen mali broj ispitanika. Prikaz radova iz 2015. godine (151) također navodi čitav niz čimbenika koji mogu doprinijeti nedosljednosti dobivenih rezultata različitih istraživanja o povezanosti koncentracija vitamina D sa HT, pa osim heterogenosti populacije, još ističe utjecaj godišnjeg doba vađenja krvi, različitih metoda analize serumskih koncentracija vitamina D kao i razlika u definiranju deficijencije vitamina D. Stoga, kako bi prevladali moguće nedostatke koji utječu na kvalitetu analize, uključili smo veliki broj ispitanika, 461 s HT-om i 176 kontrolnih ispitanika u naše istraživanje. Dodatna prednost ove studije je što smo naše analize prilagodili za čitav niz potencijalnih čimbenika s utjecajem na razine vitamina D (dob, spol, indeks tjelesne težine, godišnje doba uzorkovanja krvi). Navedeni podatci, koji su dostupni u digitalnoj bazi CROHT biobanke, vrlo su značajni u minimalizaciji utjecaja raznih čimbenika na koncentraciju vitamina D.

Sljedeći korak u smanjenju utjecaja heterogenosti populacije na rezultate, jest da smo u svim provedenim analizama, uzeli u obzir težinu bolesti, pa smo sve HT ispitanike podijelili u dvije podskupine; s blažim (MILD) i težim (OVERT) oblikom bolesti. Pronašli smo da je razlika u serumskim koncentracijama vitamina D između ispitanika sa blažim i težim oblikom

bolesti, nominalno značajna što bi moglo diskretno ukazivati da koncentracija vitamina D ovisi o težini bolesti. HT ispitanici koji su bili u uznapređovalom stadiju bolesti (imaju hipotireozu i/ili uzimaju terapiju LT4), pa su uvršteni u OVERT podskupinu pacijenata s težim oblikom bolesti, imali su niže vrijednosti vitamina D (medijan = 19 ng/mL) i veći udio deficijencije vitamina D (56,16%) nego ispitanici iz MILD podskupine (medijan vitamina D = 20,7 ng/mL; udio deficijencije vitamina D (47,92%) čija je bolest bila na početku te je stoga i funkcija štitne žlijezde očuvana (eutireoza/subklinička hipotireoza). Dobiveni rezultati potvrđuju da bi bilo značajno razlikovati HT ispitanike ovisno o težini /stadiju bolesti prilikom provođenja analiza, jer bi ove podskupine pacijenata mogle imati različitu fiziologiju.

Glavni kriterij za razvrstavanje svih naših HT pacijenata u OVERT (teži oblik) podskupinu bila je vrijednost TSH > 10 mIU/L ili potreba za terapijom LT4, a oba ukazuju na oslabljenu funkciju štitnjače. Premda obje podskupine pacijenata imaju slične vrijednosti medijana TSH i hormona štitnjače (tablica 2), štitnjača ispitanika iz MILD podskupine još uvijek je sposobna sintetizirati dovoljne količine hormona, dok je funkcionalnost štitnjače ispitanika iz OVERT podskupine narušena te je eutireoza rezultat uzimanja sintetskog T4 (terapija LT4-om). Usporedimo li ostale kliničke karakteristike ispitanika iz MILD i OVERT podskupina, jasno je da je onima iz OVERT podskupine bolest uznapređovala i u težem je obliku u odnosu na ispitanike iz MILD podskupine. Naime, OVERT ispitanici su starije životne dobi, vrijednost medijana za indeks tjelesne težine je viša, imaju više vrijednosti protutijela te veći broj simptoma hipotireoze. Sveukupno, ovo nam pokazuje da je vrlo vrijedno, ako ne i nužno, razvrstati HT ispitanike u odvojene podskupine ovisno o težini bolesti kako bi točnije pratili i/ili uspoređivali utjecaj progresije bolesti na neki određeni ishod.

Ovo istraživanje je ukazalo na postojanje značajne deficijencije vitamina D, posebno izražene tijekom sezone zima-proljeće, i to ne samo kod HT ispitanika već i kod ispitanika kontrolne skupine čime se, moguće, maskiraju odnosno ne dolaze do izražaja potencijalno značajne razlike u udjelu deficijencije među grupama. Udio deficijencije u skupinama odnosno podskupinama je: 64,69% kod svih HT ispitanika, 60,64% kod ispitanika sa blažim oblikom, a 68,7% kod ispitanika sa težim oblikom HT-a, te 60,79% kod ispitanika iz kontrolne skupine. Iz navedenog vidimo da oni ispitanici sa blažim oblikom bolesti, imaju vrlo slične vrijednosti deficijencije vitamina D kao i ispitanici iz kontrolne skupine dok je najveći udio deficijencije vitamina D u podskupini pacijenata sa težim oblikom bolesti (OVERT). Slični rezultati su pronađeni i u studiji (224) koja je detektirala da je 60 - 90% populacije u Europi insuficijentno/deficijentno vitaminom D tijekom zime točnije od studenog do ožujka.

Svi naši ispitanici su bili iz Splita i okolice, područje mediteranske klime koju karakteriziraju blage zime s velikim brojem sunčanih sati, više od 2600 godišnje, što odgovara broju od 108 (sunčanih) dana. Premda nismo imali podatke o dnevnom izlaganju sunčevoj svjetlosti naših ispitanika, kao ni o njihovom boravku odnosno aktivnostima na otvorenom, izražena insuficijencija/deficijencija vitamina D ukazuje na značajan utjecaj nekih faktora i vrlo vjerojatno životnog stila koji imaju važnu ulogu u definiranju koncentracije vitamina D. Između ostalog, moguće razloge za tako niske vrijednosti razina vitamina D, usprkos velikom broju sunčanih dana, moguće je objasniti upravo dugotrajnim boravkom u zatvorenim prostorima što naglašava pojačanu potrebu za promoviranjem zdravog životnog stila s naglaskom na dužem boravku na otvorenom, više aktivnosti na svježem zraku uz razvoj zdravih prehrambenih navika, o kojim ćemo više u opisu sljedećeg, dodatnog istraživanja, o povezanosti vitamina D sa prehrambenim navikama odnosno namirnicama kod ispitanika sa HT-om. Suprotno očekivanjima, da niske vrijednosti vitamina D nisu izuzetak u populaciji koja živi u sunčanim dijelovima svijeta, npr. Mediteranu, potvrđuje i petogodišnje istraživanje (225) koje je kod 8046 ispitanika s otoka Krete utvrdilo snižene serumske koncentracije vitamina D; $19,48 \pm 9,51$ (ng/mL + SD) za muškarce i $18,01 \pm 9,01$ (ng/ml + SD) za žene.

U skladu sa očekivanjima, serumske koncentracije vitamina D, na svom su vrhuncu tijekom sezone ljeto-jesen kada je udio ispitanika deficitarnih vitaminom D značajno niži u odnosu na zimsku sezonu (zima - proljeće), pa je tako i u našem istraživanju 18,94% svih ispitanika sa HT-om imalo niske koncentracije vitamina D, a ako ih definiramo prema težini bolesti, onda ih je 12% bilo iz MILD, a 27,23% iz OVERT podskupine (slika 15).

U našoj studiji smo još utvrdili nominalno značajnu negativnu povezanost vitamina D i TSH kod svih HT ispitanika (tablica 5). U velikoj većini dosadašnjih istraživanja, opažena je značajna povezanost između deficijencije vitamina D i TSH kod oboljelih od Hashimotovog tireoiditisa ili slaba negativna korelacija između vitamina D i vrijednosti TSH (172, 175, 226, 227). U istraživanju (226), najbližijem našem, prema broju ispitanika i dobivenim rezultatima, opažena je značajna negativna korelacija između serumskih razina vitamina D i TSH, u skupini od 369 ispitanika sa autoimunom bolesti štitnjače i kontrolnoj skupini od 407 ispitanika, nakon prilagodbe na dob, spol, indeks tjelesne težine i godišnje doba uzorkovanja krvi. Sličan rezultat našem, još je pronađen i u studiji (172) koja je analizirala 5230 ispitanika, od kojih su 373 bila s HT-om.

Također, slični rezultati negativne povezanosti koncentracije vitamina D i vrijednosti TSH, pronađeni su i kod zdrave populacije (228-231). Ipak, najveća presječna studija sa više od 8000 ispitanika (225) nakon prilagodbe za dob, spol i godišnje doba uzorkovanja seruma,

nije pronašla vezu između vitamina D i TSH. Pregledana literatura o ovoj temi, uključujući i naše dobivene rezultate, sugerira na fiziološku sličnost HT ispitanika i zdravih osoba u smislu blagog porasta TSH kod deficijencije vitaminom D. Međutim, za konačnu potvrdu gore navedenog, potrebno je ponoviti ovakvu studiju, ali na znatno većem broju ispitanika.

Drugu, nominalno značajnu korelaciju, opazili smo između koncentracije vitamina D i sistoličkog tlaka kod pacijenata sa težim oblikom autoimunog tireoditisa (OVERT podskupina) (tablica 5). Za razliku od većine istraživanja (232, 233) koji su istraživali utjecaj vitamina D na krvni tlak kod zdravih ispitanika te utvrdili da više serumske koncentracije vitamina D koreliraju sa nižim krvnim tlakom, mi smo našli pozitivnu povezanost među navedenim parametrima. Deficijencija vitamina D povezuje se sa hipertenzijom (233), a u našoj podskupini HT ispitanika sa težim oblikom HT-a bio je visoki udio ispitanika sa manjkom vitamina D što bi moglo pružiti objašnjenje za naše rezultate. Međutim, važno je naglasiti da je opaženi porast tlaka u našoj OVERT podskupini nije bio visok (medijan = 120 mmHg), pa nije jasno utvrđeno ima li opažena korelacija klinički značaj.

Nedostatak ovih analiza jest što su uzorci kontrolne skupine prikupljeni u periodu od prosinca do lipnja (zima – proljeće), kada su vrijednosti vitamina D najniže, tako da nismo imali podatke za preostali dio godine, uključujući kolovoz i rujan kada su koncentracije vitamina D najviše. Premda smo analize prilagodili na godišnja doba kao i izvršili dodatne analize u kojima smo uspoređivali samo HT ispitanika sa kontrolnim ispitanicima iz istog perioda uzorkovanja, nametnulo se pitanje o tome koliko brzo se vitamin D može pohraniti kod HT ispitanika u odnosu na kontrole, u najsunčanijem dijelu godine? Moguće je da HT ispitanici (OVERT) kod kojih je bolest uznapredovala ne mogu jednako efikasno pohraniti vitamin D kao kontrolni ispitanici ili kao ispitanici na samom početku razvoja bolesti? Razlog ovom promišljanju jest opažanje proizašlo iz rezultata samog istraživanja kako kontrole i ispitanici na početku bolesti (MILD) imaju više serumske koncentracije vitamina D te manji udio ispitanika s deficijencijom vitamina D u usporedbi sa ispitanicima sa težim i uznapredovalim oblikom HT-a. Osim toga, ispitanici iz OVERT podskupine imaju najveći udio ispitanika deficijentnih sa vitaminom D u usporedbi sa ispitanicima od svih ostalih skupina i podskupina. Stoga bi svakako u budućim istraživanjima trebalo ispitati razlikuju li se koncentracije vitamina D između HT ispitanika sa progresijom bolesti i zdravih ispitanika vodeći računa da uzorkovanje odnosno mjerenje vitamina D bude jednako raspodijeljeno tijekom cijele godine kako bi procijenili jesu li niže vrijednosti vitamina D povezane sa uznapredovalim HT-om. S druge strane, prednost ovog istraživanja je opsežna obrada svih ispitanika od strane specijalista nuklearne medicine koji su klinički jasno potvrdili prisutnost autoimunog tireoiditisa kod svih

HT ispitanika, odnosno odsustvo bolesti štitnjače kod ispitanika iz kontrolne skupine koja je bila brojčano nešto skromnija od kohortne skupine sa HT ispitanicima koja je, do tada, bila jedna od većih. Tijekom obrade svih ispitanika, prikupljeni su mnogi klinički važni fenotipovi kako za HT ispitanike tako i za zdrave ispitanike.

5.2. POVEZANOST VITAMINA D I PREHRAMBENIH NAVIKA KOD HT ISPITANIKA

Smatra se da autoimune bolesti prate niže razine vitamina D (148), a to se pokazalo točnim i u ovom istraživanju koje je pronašlo niže koncentracije vitamina D uz visok udio deficijencije vitamina D, posebno izražen u podskupini HT ispitanika sa težim oblikom bolesti (tablica 2). Međutim, deficijencija vitamina D, utvrđena u našem predhodnom radu, nije bila samo karakteristična za HT ispitanike, već je bila izražena i kod zdravih ispitanika usprkos velikom broju sunčanih dana na našem području, pa je iznjedrila potrebu za isticanjem zdravih životnih navika koje preporučuju što više aktivnosti na svježem zraku. Uz zdrav životni stili, neizostavna je zdrava prehrana što nas je zainteresiralo da istražimo postoje li neke, do sada još uvijek nepoznate prehrambene navike i/ili određene namirnice koje imaju utjecaj na koncentraciju vitamina D kod pacijenata sa HT-om. Poznato je da hormoni štitnjače utječu na bazalni metabolizam koji može biti funkcionalno izmjenjen kod pacijenata s HT-om s potencijalnim utjecajem na metabolizam vitamina D (67, 234). Stoga smo u ovom istraživanju testirali postoje li, uopće, određene namirnice odnosno prehrambene navike koje, bilo da povećavaju bilo da snižavaju, mijenjaju koncentraciju vitamina D kako kod svih HT ispitanika tako i kod podskupina HT ispitanika, (MILD i OVERT).

Najvažniji rezultat ovog dodatnog istraživanja je negativna povezanost serumskih koncentracija vitamina D s konzumacijom kave i slatkiša te pozitivna povezanost vrijednosti vitamina D sa konzumacijom povrća. Drugo važno opažanje našeg rada je da su, gore navedene, veze znatno izraženije kod HT ispitanika sa težim oblikom HT-a (OVERT).

KONZUMACIJA KAVE I VITAMIN D

U našoj kohorti HT ispitanika opazili smo relativno visoku učestalost konzumacije kave, u prosjeku 5 puta tjedno, posebno izraženu (5.4 puta na tjedan) kod ispitanika sa težim oblikom HT-a (tablica 6). Kava je bogata raznolikim spojevima, ugljikohidratima, lipidima, dušikovim spojevima, vitaminima, mineralima, alkaloidima i bioaktivnim fenolima (235, 236), a uglavnom se povezuje sa blagotvornim učinkom na cjelokupno zdravlje (235). Ipak, opažaju se i neki štetni efekti kave (235) te je posebno istaknuta povezanost sa rizikom od koštanih

fraktura kod žena, a koštani metabolizam je jako ovisan o koncentraciji vitamina D. Dosadašnje studije o povezanosti konzumacije kave i serumskih koncentracija vitamina D pružaju različite odgovore. Dvije opsežne opservacijske studije opisuju negativnu povezanost između razina vitamina D i konzumacije kave (237, 238), kao i treća (239) koju izdvajamo, jer je slična našoj prema dobi i spolu sudionika koja je uključivala 741 ženu. Ovo istraživanje je utvrdilo statistički značajnu povezanost između konzumacije pića bogatih kofeinom, analiziranih korištenjem FFQ, sa smanjenom koncentracijom vitamina D. Ostale studije o povezanosti kofeina i vitamina D, opisuju različite rezultate (240-242), a usprkos nedosljednosti među njima, rezultati naše studije se podudaraju sa dvjema najvećim studijama (237, 238) koje su ovu povezanost pratile kod zdravih ispitanika, a koja je, prema rezultatima našeg istraživanja, karakteristična i za pacijente sa HT-om. Moguće je postojanje zbunjujućeg (confounding) faktora koji je povezan sa naša dva analizirana parametra (kava i vitamin D), a koji je, možda, uzročnik opažene povezanosti među njima.

SLATKIŠI I VITAMIN D

Sljedeći značajan rezultat ovog istraživanja je negativna povezanost konzumacije slatkiša sa razinama vitamina D (tablica 7) kod svih ispitanika sa HT-om, a posebno izražena kod onih sa težim oblikom bolesti (OVERT). Slatkiši predstavljaju grupu namirnica sa visokim udjelom šećera u koju smo uključili kolače, čokolade, kekse i bombone. Rezultati su pokazali da naši HT ispitanici često konzumiraju slatkiše, šest puta tjedno, što ih svrstava na visoko četvrto mjesto najčešće konzumiranih namirnica (tablica 6), iza mlijeka i mliječnih proizvoda, povrća i rafiniranih žitarica. Pregledom literature, pronašli smo da opservacijske studije konzistentno povezuju korelaciju visokog unosa šećera/slatkiša sa niskim serumskim vrijednostima vitamina D. Tako su, rezultati slični našima o negativnoj poveznosti vitamina D i konzumiranja slatkiša, utvrđeni FFQ analizom, pronađeni kod 36 ispitanika u dobi od 13 do 25 god (243). Negativna povezanost vitamina D s koncentracijom glukoze, opažena je kod 129 zdravih dječaka (244), dok je negativnu povezanost koncentracije vitamina D s konzumacijom zaslađenih, bezalkoholnih pića prikazala studija (239), bez navođenja jasnog funkcionalnog objašnjenja detektirane veze među navedenim parametrima.

Ono što bismo mi istaknuli vezano uz rezultate našeg istraživanja jest moguća povezanost unosa kave i šećera, budući da se kava zaslađi tijekom pripreme što bi značilo da dodani šećer, uz standardne sastojke kave, može dodatno negativno utjecati na vrijednosti vitamina D.

POVRĆE I VITAMIN D

U našem istraživanju, opazili smo značajnu pozitivnu povezanost koncentracije vitamina D sa konzumiranjem povrća koje spada u jednu od grupa namirnica koju naši ispitanici

najčešće konzumiraju i to čak 9.53 puta tjedno (tablica 6). Do sada, više radova je opisalo pozitivni učinak konzumiranja hrane biljnog porijekla sa razinama vitamina D, pa je tako opisan (245) pozitivan učinak konzumiranja biljnih mikronutrijenata i fitokemikalija na koncentraciju vitamina D kod 73 ispitanika iz Australije. Sljedeća studija (246) na znatno većem uzorku, od 4372 ispitanika, također je pronašla pozitivan učinak prehrane temeljene na povrću i voću, a analizirane pomoću FFQ upitnika, na vitamin D. Korak dalje ide studija (247) koja, zbog značajne korelacije koju je opazila između prehrane povrćem na koncentraciju vitamina D, sugerira kako prehrana bogata povrćem može pomoći u održavanju dostatnih razina vitamina D kod djece. Mediteranska prehrana bogata povrćem i mliječnim proizvodima (248) pozitivno je povezana sa koncentracijom vitamina D (249), a slične rezultate je prikazalo istraživanje među ispitanicima iz Urugvaja kod kojih je prehrana bogata povrćem, orašastim plodovima i ribom, bila povezana sa sniženim rizikom za deficijenciju vitamina D (250). Premda se, općenito, smatra da povrće nije bogato vitaminom D (251), noviji podaci to opovrgavaju (252) naglašavajući da i biljke mogu biti izvor vitamina D, i to vitamina D3 i njegovih metabolita. Protuupalno djelovanje vitamina D, zajedno sa ostalim nutrijentima iz povrća ukazuje na potrebu za daljnjim istraživanjem.

BILJNA ULJA I VITAMIN D

Još jedna, iako granično značajna pozitivna povezanost konzumacije biljnih ulja i vitamina D, opažena je od naših ispitanika s HT-om, koju objašnjavamo konzumacijom ulja suncokreta koje se najčešće koristi u našim domaćinstvima, a može biti obogaćeno vitaminom D obzirom da biljna ulja spadaju u grupu namirnica koje se uobičajeno obogaćuju dodavanjem vitamina D (253).

MIJEKO I MLIJEČNI PROIZVODI I VITAMIN D

Također, pronašli smo i granično pozitivnu korelaciju između konzumacije mlijeka i mliječnih proizvoda i serumskih koncentracija vitamina D. Ova skupina namirnica najučestalije se konzumira među našim ispitanicima sa autoimunim tireoiditisom i to prosječno 9,83 puta tijekom tjedna. Kako naš upitnik o učestalosti konzumacije pojedinih namirnica, FFQ, nije diferencirao radi li se o namirnicama koje su obogaćene vitaminom D ili ne, ovaj rezultat možemo, barem dijelom, objasniti fortifikacijom navedenih namirnica vitaminom D.

BEZALKOHOLNA PIĆA I VITAMIN D

Još jednu granično pozitivnu povezanost koju opisuju naši rezultati, pronašli smo, pomalo neočekivano, između konzumacije bezalkoholnih pića sa vitaminom D. Budući su bezalkoholna pića jako zaslađena, uglavnom je njihova konzumacija negativno korelirana sa razinama vitamina D (254, 255). Možda bismo naše rezultate mogli objasniti konzumacijom

Cedevite, napitka voćnog okusa koji je obogaćen vitaminima (C, E i B kompleks) i jako je popularan među našom populacijom. Ipak, ove dobivene rezultate treba pratiti i tumačiti s oprezom, iako je blagotvoran utjecaj Cedevite na opće zdravlje već opisan (195).

IZOSTANAK POVEZANOSTI VITAMINA D S NAMIRNICAMA BOGATIM VITAMINOM D

Naši rezultati nisu pronašli povezanost vitamina D sa dvjema namirnicama poznatim kao značajnim izvorima vitamina D; masna riba i jaja. Objašnjene za gore opisanim izostankom povezanosti možemo protumačiti rijetkom (jaja: 1,56 puta tjedno) odnosno vrlo rijetkom (masna riba: 0.79 puta tjedno) konzumacijom navedenih namirnica, pa je, stoga, udio vitamina D kojim ove dvije namirnice mogu doprinjeti ukupnoj koncentraciji vitamina D kod naših HT-ispitanika, nizak. Uz ovo, svega 8,6% naših HT ispitanika izjašnjava se da se hrani po principima mediteranske prehrane koja se bazira na povrću i ribi. Najznačajniji izvor vitamin D je sunčanje i endogena sinteza vitamina D, oko 80%, dok prehrana doprinosi svega 20%. Danas, osim ova dva tradicionalno poznata izvora vitamina D, razlikujemo i nove kao što su fortifikacija (obogaćivanje) i biofortifikacija hrane te suplementacija (251, 256, 257). Brojna randomizirana i opservacijska istraživanja su dokazala pozitivan utjecaj fortificirane hrane i suplementacije na serumske koncentracije vitamina D (184, 186). Među prvim državama koje su prepoznale važnost obogaćivanja hrane vitaminom D, bile su one sa smanjenim godišnjim brojem sunčanih dana, kao SAD, Kanada, Švedska, Finska i Norveška, dok u Hrvatskoj, kao i velikoj većini drugih država, još uvijek nema sustavne fortifikacije namirnica.

Valja naglasiti da naš FFQ upitnik nije sadržavao podatke o kvantitativnom unosu namirnica kao ni o njihovom sastojcima što je posebno bitno kod namirnica složenog sastava. Ova studija je opservacijska tako da ne daje podatke o uzročnim vezama između opaženih značajnih namirnica i koncentracije vitamina D.

Prednost ove studije je, osim velikog broja ispitanika kod kojih su specijalisti opsežnom obradom potvrdili HT te ih dodatno razvrstali u dvije podskupine ovisno o težini bolesti, što je u trenutku nastanka, a prema našim saznanjima, bilo prvo istraživanje koje se bavilo utjecajem prehrambenih navika/namirnica na serumske koncentracije vitamina D kod pacijenata s HT-om.

Naše presječno istraživanje i dobiveni rezultati mogu biti indikativni i dobar temelj za nova istraživanja o utvrđivanju moguće uzročno-posljedične veze vitamina D s prehranom i prehrambenim navikama oboljelih od HT-a, odnosno veze sa ostalim metaboličkim parametrima povezanih sa koncentracijom vitamina D.

5.3. KALCITONIN I HT

Sva dosadašnja istraživanja o utjecaju bolesti HT-a na sintezu kalcitonina, još uvijek nisu pružila jasan odgovor. Stoga smo mi proveli čitav niz opsežnih analiza na dobro fenotipiziranim HT pacijentima i zdravim ispitanicima kako bi utvrdili postoji li povezanost između bolesti HT-a i bazalne koncentracije kalcitonina. Kao i u predhodna dva opisana istraživanja, i ovdje smo skupinu HT ispitanika dodatno razvrstali u dvije podskupine ovisno o težini bolesti. Međutim, u ovom istraživanju smo se za podjelu ispitanika u skupine vodili isključivo podatkom o uzimanju terapije, stoga su ispitanici bili podijeljeni u skupinu bez terapije (BT) (predstavljaju skupinu na početku bolesti) te na skupinu ispitanika koji su na terapiji (NT) (predstavljaju ispitanike u uznapređenoj fazi bolesti). Kliničke karakteristike svih ispitanika (tablica 8) jasno prikazuju kako se mjereni parametri značajni za štitnjaču, odnosno HT razlikuju kod ispitanika u opisanim podskupinama. Ipak, vrijednosti kalcitonina nisu se razlikovale niti između HT ispitanika (ni u dvjema podskupinama) u odnosu na kontrole, kao niti one uspoređene između dvije podskupine HT ispitanika. Dobiveni rezultati sugeriraju da uznapređovali HT kojeg karakteriziraju oštećene folikularne stanice i fibroza tkiva, nema utjecaja na sintezu kalcitonina, a u prilog ovim rezultatima ide i prikazan izostanak korelacije kalcitonina sa svim značajnim kliničkim fenotipovima HT ispitanika uključujući volumen štitnjače i trajanje bolesti usprkos činjenici da uznapređovali HT korelira sa ovim fenotipovima (tablica 10). Uz to, koncentracije kalcitonina su bile u referentnom intervalu kod svih HT ispitanika, kao i kod HT ispitanika iz dvije podskupine. Glavni rezultat našeg rada jest da se sinteza kalcitonina kod HT ispitanika ne razlikuje u odnosu na kontrolne ispitanike niti ne ovisi o uzimanju terapije levotiroksinom, odnosno, da ne dolazi do oštećenja C stanica koje proizvode kalcitonin uslijed HT-a. Naši rezultati se podudaraju sa rezultatima novijih studija koje su temeljene na većem uzorku premda su koristile različite kriterije za postavljanje dijagnoze autoimunog tireoiditisa, najčešće povišene vrijednosti TPOAt i/ili nalaz ultrazvuka štitnjače (216-220).

U našoj studiji, HT ispitanici, muškarci, su imali značajno više vrijednosti koncentracije kalcitonina u usporedbi sa HT ispitanicama što je očekivano i u skladu sa zdravim ispitanicima (202, 258).

Statistički značajnu korelaciju između kalcitonina i kliničkih fenotipova HT ispitanika nismo pronašli. Vrijedi spomenuti, ali s oprezom, da smo detektirali četiri nominalno slabe korelacije kalcitonina sa TgAt, dobi i BSA (tablica 10). Prema našim saznanjima, ovo je prva analiza ovakvog tipa i prvo izvješće o negativnoj korelaciji između kalcitonina i TgAt kod

ispitanika sa HT-om. Dobiveni rezultati ove negativne asocijacije upućuju na to da bi porast vrijednosti TgAt korelirao sa suptilnim padom koncentracije kalcitonina. Vrijedilo bi dodatno ispitati težinu opisane korelacije i njene, eventualne, kliničke važnosti.

Druga nominalno značajna negativna korelacija je između kalcitonina i dobi HT ispitanika koja je bila još izraženija u podskupini HT ispitanika koji nisu uzimali terapiju LT4, a značila bi da je blagi pad koncentracije kalcitonina povezan sa starenjem HT ispitanika, posebno izražen kod onih koji nisu na terapiji LT4-om. Ovu korelaciju nismo zapazili kod HT ispitanika koji uzimaju terapiju LT4 što bi moglo značiti da terapija LT4-om održava stabilnijom funkciju štitnjače, a time i lučenje kalcitonina. Rezultati dosadašnjih studija o utjecaju životne dobi na vrijednosti kalcitonina, provedenih kod zdravih ispitanika, bili su proturječni. Rezultate slične našima, smanjenje vrijednosti kalcitonina s porastom životne dobi, posebno kod muškaraca, opisano je u studiji u koju je bilo uključeno 54 ispitanika (259) dok istraživanje na većem uzorku, 287 ispitanika, izvješćuje o pozitivnoj korelaciji kalcitonina sa starenjem, opet izraženije kod muškaraca (260). Međutim, ostale studije (261-263) ne pronalaze povezanost kalcitonina sa životnom dobi kod zdravih ispitanika. Stoga bi, za točno definiranje povezanosti kalcitonina sa životnom dobi bilo nužno provesti istraživanje na velikom broju HT ispitanika.

Treći nominalno značajan rezultat ove studije je pozitivna korelacija između kalcitonina i BSA (mjere za površinu tijela) u podskupini HT ispitanika na terapiji LT4-om (tablica 10). Dosadašnje studije su pronašle pozitivnu povezanost koncentracije kalcitonina sa sličnim antropometrijskim parametrom, (BMI) kod zdravih ispitanika (262), kod muškaraca (260) i kod pretilih starijih žena (264). Iako naše analize nisu pronašle korelaciju između koncentracije kalcitonina sa BMI, svakako ukazuju na pozitivnu korelaciju između parametara tjelesne težine i vrijednosti kalcitonina te sugeriraju da je kod HT ispitanika na terapiji LT4-om slabi porast koncentracije kalcitonina povezan sa porastom BSA što je slično kao i kod zdravih ispitanika. Nedostatak ove studije je što su opisane korelacije slabe i nominalno značajne, pa ih je potrebno tumačiti s oprezom odnosno testirati na većem broju HT ispitanika. Iako je kontrolna skupina bila umjerene veličine, prednost studije je uključenje, do tada, najviše HT ispitanika (467) za analizu kalcitonina, što ovo istraživanje svrstava u jedno od najvećih do sada, o ovoj temi.

6. ZAKLJUČCI

Rezultati našeg istraživanja upućuju da nema povezanosti između koncentracije vitamina D i bolesti HT, niti sa težim oblikom ove bolesti. Blagi pad koncentracije vitamina D kod HT ispitanika sa težim oblikom bolesti u usporedbi sa ispitanicima sa lakšim oblikom bolesti sugerira na moguću povezanost vitamina D s težim oblikom HT-a.

Utvdili smo visoki udio deficijencije vitamina D kod svih ispitanika našeg istraživanja uključujući i ispitanike iz kontrolne skupine što ukazuje da globalno prepoznati problem nedostatka vitamina D pogađa i zdravu populaciju kao i oboljele pojedince, stoga ni bolesnici s HT-om nisu iznimka, a posebno ne oni s težim oblikom bolesti.

Istaknuta je potreba za usvajanjem zdravih životnih navika koje uključuju duži boravak na otvorenom odnosno sunčevoj svjetlosti uz pravilno uravnoteženu prehranu, bogatu ili obogaćenu vitaminom D, kako bi se prevladao ili barem umanjio nedostatak vitamina D u općoj populaciji.

Kod pacijenata sa HT-om, predmet debate među znanstvenicima je može li se utjecati na promjenjive čimbenike kako bi se utjecalo na razine vitamina D te se proučava utjecaj prehrane kao jednog od njih, a naš rad je ukazao na potrebu za izbjegavanjem kave i konzumacije slatkiša, barem tijekom zimskog perioda te povećanim unosom povrća.

Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se precizno utvrdila funkcionalna i uzročno-posljedična veza između konzumacije navedenih namirnica s koncentracijom vitamina D u serumu.

Hrana može imati znatan utjecaj na razinu vitamina D posebno kod pacijenata sa težim oblikom HT-a.

Potvrda da hrana može imati utjecaj na kvalitetu života bolesnika sa HT-om, da može poboljšati njihovo zdravlje i smanjiti incidenciju komplikacija, ističe potrebu za definiranjem prehrambenih smjernica za oboljele od HT-a.

Utvdili smo da su svi ispitanici sa HT-om sintetizirali kalcitonin jednako kao i zdravi ispitanici.

Opisane nominalno značajne veze, u našim istraživanjima, između kliničkih fenotipova karakterističnih za HT sa vitaminom D odnosno kalcitoninom potrebno je detaljnije analizirati u novim studijama kako bi se eventualno potvrdile te se onda ispitao njihov potencijalni klinički značaj.

Za buduća istraživanja je potrebna detaljnija kategorizacija HT ispitanika u ovisnosti o težini njihove bolesti kako bi se izbjegla heterogenost populacije.

7. SAŽETAK

Hashimotov tireoiditis (HT) je najučestalija autoimuna bolest štitnjače čijem nastanku i razvoju doprinosi međudjelovanje genetskih čimbenika i čimbenika okoliša. Jedan od predloženih čimbenika okoliša potencijalno značajan za patofiziologiju HT-a je vitamin D. Dosadašnja znanja o povezanosti HT-a i vitamina D nisu jasna i jednoznačna usprkos velikom broju provedenih istraživanja na ovu temu. Cilj našeg prvog istraživanja bio je ispitati povezanost vitamina D s HT-om odnosno težinom bolesti te provesti sveouhvatne analize radi testiranja korelacije vitamina D s različitim fenotipovima i simptomima karakterističnim za HT. Dodatno smo HT ispitanike podijelili u dvije skupine MILD i OVERT kako bi uzeli u obzir težinu bolesti. Usporedili smo serumske koncentracije 25(OH)D (u daljnjem tekstu vitamin D) i udio deficijencije vitamina D između 461 ispitanika s HT-om, u svim stadijima bolesti, i 176 zdravih ispitanika. Spearmanovim testom korelacije analizirali smo povezanost vitamina D i 10 kliničkih fenotipova za skupinu HT ispitanika kao i za dvije podskupine HT ispitanika. Sve naše analize smo prilagodili za dob, spol, BMI, pušenje i datum uzorkovanja krvi. Naše analize nisu pokazale statistički značajnu razliku ni u koncentraciji vitamina D niti u udjelu deficijencije vitamina D između HT ispitanika, u svim fazama bolesti, i ispitanika iz kontrolne skupine. Jedino je pronađena nominalno značajna razlika u koncentraciji vitamina D između podskupina MILD i OVERT ($OR=1,038$, $P=0,023$) koja ukazuje na blagi pad koncentracije vitamina D kod HT ispitanika s težim oblikom bolesti. Važan rezultat ovog istraživanja jest da je udio ispitanika sa deficijencijom vitamina D u periodu zima-proljeće bio visok kod svih skupina: SVI HT (64,69%), MILD (60,64%), OVERT (68,7%), kontrole (60,79%).

Visoki udio insuficijencije/deficijencije vitamina D u populaciji pokušava se umanjiti suplementacijom i obogaćivanjem prehrambenih namirnica vitaminom D. Cilj našeg drugog istraživanja bio je identificirati postoje li prehrambene navike/namirnice koje mogu utjecati na koncentraciju vitamina D u serumu kod HT ispitanika, u svim fazama bolesti. Modelom linearne regresije analizirali smo povezanost koncentracije vitamina D sa tjednim unosom 24 namirnice kod HT ispitanika, koristeći FFQ. Glavni rezultat ovog istraživanja jest negativna povezanost: vitamina D s konzumacijom kave (SVI: $\beta = -0,433$, $P=0,005$; OVERT: $\beta = -0,620$, $P=0,008$), vitamina D s konzumacijom slatkiša (SVI: $\beta = -0,195$, $P=0,034$; OVERT: $\beta = -0,431$, $P=0,006$), te pozitivna povezanost vitamina D s konzumacijom povrća (SVI: $\beta = 0,182$, $P=0,019$; OVERT: $\beta = 0,311$, $P=0,009$). Važno je istaknuti da su opisane povezanosti bile izraženije kod HT ispitanika s težim oblikom bolesti (OVERT).

Utjecaj HT-a na sintezu i lučenje kalcitonina, do sada, još nije pružio jasan odgovor. Stoga je cilj naše treće studije bio istražiti povezanost HT-a i težine same bolesti s

koncentracijom kalcitonina u serumu. Izmjerene vrijednosti kalcitonina između 467 HT ispitanika i 184 zdrava ispitanika, usporedili smo koristeći Mann-Whitney test, jednako tako i za dvije podskupine, BT i NT. Najznačajniji rezultat ove studije je nepostojanje statistički značajne povezanosti koncentracije kalcitonina između HT ispitanika i kontrola (2,2 vs 2,35 pg/mL, $P=0,717$) kao niti između dvije podskupine HT ispitanika ($P=0,347$).

Među našim rezultatima, kao jednog od glavnih, izdvajamo onaj o nepostojanju statistički značajnih korelacija između vitamina D odnosno kalcitonina s klinički važnim fenotipovima za HT osim tri slabe, nominalno značajne negativne korelacije između: vitamina D i TSH kod HT ispitanika ($r = -0,113$, $P=0,029$), kalcitonina i TgAt kod HT ispitanika ($r = -0,1$, $P=0,040$), te između kalcitonina i dobi kod HT ispitanika s blažim oblikom bolesti ($r = -0,13$, $P=0,040$). Dvije nominalno značajne pozitivne korelacije smo pronašli kod HT ispitanika s težim oblikom bolesti i to između: vitamina D i sistoličkog tlaka ($r=0,205$, $P=0,025$) i kalcitonina i BSA ($r=0,16$, $P=0,042$).

Svjetski zdravstveni problem nedostatka vitamina D utvrđen je kod zdrave populacije, ali i kod bolesnih osoba. Našim istraživanjem smo pokazali da ni pacijenti s HT-om nisu izuzetak. Dobiveni rezultati sugeriraju da HT pacijenti trebaju biti oprezni u konzumiranju kave, slatkiša i šećera te direktno potvrđuju da hrana odnosno prehrambene navike mogu imati značajan utjecaj na koncentraciju vitamina D, posebno kod osoba s težim oblikom ove bolesti. Značajno je stoga, da naši rezultati mogu doprinijeti u razvijanju prehrambenih smjernica za pacijente s HT-om. Osim toga, dobiveni rezultati opisanih istraživanja pokazuju da je za buduća istraživanja neophodna detaljnija kategorizacija HT ispitanika ovisno o težini bolesti.

8. LAIČKI SAŽETAK

Hashimotov tireoiditis je autoimuna bolest štitnjače koja bilježi stalni porast broja oboljelih. Ipak, još uvijek nisu jasno utvrđeni svi mogući čimbenici odgovorni za nastajanje odnosno pogoršanje tijekom ove bolesti. Jedan od predloženih čimbenika čiji nedostatak može imati utjecaj na navedenu bolest je vitamin D. Rezultati našeg prvog istraživanja nisu pronašli razlike u koncentraciji vitamina D između oboljelih i zdravih ispitanika. Međutim, utvrđen je nedostatak vitamina D u serumu i kod oboljelih i kod zdravih ispitanika. Stoga smo u drugom istraživanju htjeli provjeriti postoje li neke namirnice odnosno prehrambene navike koje utječu na vitamin D kod ispitanika s Hashimotovim tireoiditisom. I pronašli smo; učestala konzumacija kave i slatkiša smanjuje koncentraciju vitamina D, pa savjetujemo izbjegavanje istih, posebno u zimskom dijelu godine kada su boravak na otvorenom i izlaganje sunčevoj svjetlosti, nužni za sintezu vitamina D, ionako već rijetki. Ali, preporučujemo što češću konzumaciju povrća zbog njegovog pozitivnog utjecaja na vitamin D. Potvrda da hrana ima utjecaj na razine vitamina D ističe potrebu za definiranjem preporuka o prehrani za oboljele od Hashimotovog tireoiditisa. Ova bolest utječe na funkciju štitnjače i, ako se ne liječi, uzrokuje njezin usporeni rad. Razlog tomu je propadanje tkiva same žlijezde, pa tako razorena štitnjača ne luči dovoljno svojih hormona, T3 i T4, značajnih za optimalno funkcioniranje cijelog organizma. Osim njih, štitnjača luči još jedan hormon, kalcitonin. Dosadašnja istraživanja nisu jasno utvrdila utječe li Hashimotov tireoiditis na sintezu i lučenje kalcitonina, odnosno razara li navedena bolest stanice odgovorne za kalcitonin kao što razara one odgovorne za sintezu i lučenje T3 i T4? Zato smo proveli treće istraživanje koje je pokazalo da ispitanici s Hashimotovim tireoiditisom sintetiziraju i luče kalcitonin jednako kao i zdravi ispitanici. I na kraju, za sva buduća istraživanja o Hashimotovom tireoiditisu, nužno je pacijente podijeliti u skupine ovisno o težini bolesti radi dobivanja još kvalitetnijih rezultata.

9. SUMMARY

Analysis of vitamin D and Calcitonin in Participants from the Croatian Bioank of Patients with Hashimoto`s Thyroiditis

Hashimoto`s thyroiditis is the most frequent autoimmune thyroid disorder whose presence and progression occur due to interplay between genetic predisposition and environmental factors. One of the suggested environmental factors, possibly important in HT pathophysiology, is vitamin D. Despite the large number of studies on this topic, the association between HT and vitamin D remains inconclusive. The aim of our first study was to evaluate the relationship between vitamin D and the presence and/or the severity of HT and to perform a great number of analyses to assess correlations of vitamin D with thyroid related phenotypes and symptoms of the HT. HT patients were further stratified into two subgroups: MILD and OVERT, in regard to the severity of the disease. Vitamin D (calcidiol) levels and the proportion of patients with calcidiol deficiency were compared between 461 HT patients across all stages of the disease and 176 healthy individuals. The Spearman correlation test was used to analyze the association between calcidiol and ten thyroid-related phenotypes in all patients with aforementioned disease, as well as in the MILD and OVERT subgroups. The adjustments for unmodifiable factors like age and gender and modifiable factors like BMI, smoking status and seasonality of blood sampling were performed. The absence of significant differences in 25OHD levels or proportion of 25OHD deficiency, were observed between HT patients at all stages of the disease and the healthy individuals. Still, marginally significant difference in 25OHD levels was observed between two subgroups, MILD and OVERT, ($OR = 1.038$, $p = 0.023$) which may indicate a slight decrease in 25OHD levels in HT patients with more severe disease. The major outcome of this research is that percentage of individuals with 25OHD deficiency during winter-spring was high: ALL HT (64.69%), MILD (60.64%), OVERT (68.7%), controls (60.79%).

The reduction of the high prevalence of 25OHD insufficiency and deficiency in the global population can be achieved through the use of vitamin D supplements and the consumption of foods high in vitamin D or those that have been fortified with it. The aim of the second study was to identify dietary factors that may affect vitamin D levels of HT patients across all disease stages. We performed linear regression analysis between vitamin D levels and the weekly intake of 24 food groups in ALL HT patients as well as in two disease severity groups: MILD and OVERT, using the FFQ. The most important results of this research include the following observations: an inverse association between calcidiol levels and coffee consumption (ALL: $\beta = -0.433$, $P = 0.005$; OVERT: $\beta = -0.620$, $P = 0.008$), a negative association between calcidiol

levels and sweet consumption (ALL: $\beta = -0.195$, $P=0.034$; OVERT: $\beta = -0.431$, $P=0.006$) and positive association between vitamin D levels and vegetable consumption (ALL: $\beta=0.182$, $P=0.019$; OVERT: $\beta=0.311$, $P=0.009$). It should be emphasized that the effect size of the associations being discussed is greater in patients who are in the more severe stage of the disease (OVERT).

The impact of HT on calcitonin production is not fully understood. The aim of the third study was to explore whether the presence and severity of HT have an impact on calcitonin (Ct) production. Calcitonin concentrations were compared between 467 HT patients and 184 healthy participants using Mann-Whitney test. Additionally, comparisons were made within the HT patient subgroups: BT and NT. The key finding of the study is the lack of significant differences in calcitonin levels between patients with Hashimoto's thyroiditis and healthy participants (2.2 vs 2.35 pg/mL, $P=0.717$) as well as between the two subgroups of HT patients ($P=0.347$).

Our main finding indicates that there is no statistically significant correlation between vitamin D or calcitonin and clinically relevant HT phenotypes, with the exception of three weak, nominal, inverse correlations between: vitamin D and TSH in all HT patients ($r = -0.113$, $P=0.029$), between calcitonin and TgAt in all HT patients ($r = -0.1$, $P=0.04$) and between calcitonin and age in the BT subgroup of HT patients ($r = -0.13$, $P=0.04$). Two nominally significant positive correlations were identified in the subgroup of HT patients with more severe form of the disease between: vitamin D and systolic blood pressure ($r=0.205$, $P=0.025$) and between calcitonin and BSA ($r=0.16$, $P=0.042$).

Vitamin D insufficiency and deficiency represent a globally significant health concern affecting individuals regardless of their health status. Our research showed that HT patients are no exception. Our results suggest that HT patients should avoid coffee, sweets and sugar due to their negative impact on vitamin D levels. These findings confirm that food and dietary habits can significantly affect vitamin D concentrations, especially for HT individuals in more severe stage of the disease. The importance of these research is that our results may contribute to the development of dietary recommendations for patients with HT. Furthermore, the findings from all the aforementioned research indicated the need for a more detailed categorization of patients based on disease severity in future scientific studies.

10. LAY SUMMARY

Hashimoto's thyroiditis is an autoimmune thyroid disease with a continuously increasing number of diagnosed cases, but its causes are not fully understood. One suspected factor is vitamin D deficiency. The results of our analysis performed to explore the relationship between Hashimoto's thyroiditis and vitamin D show similar vitamin D levels in patients and healthy participants. However, vitamin D deficiency was observed in both groups. Therefore, in a second study, we aimed to determine whether certain foods or dietary habits affect vitamin D in individuals with Hashimoto's thyroiditis. We found some associations: frequent consumption of coffee and sweets decreases vitamin D, so we recommend avoiding them, especially during the winter months when outdoor activity and exposure to sunlight are already limited. On the other hand, we recommend frequent consumption of vegetables due to their positive effect on vitamin D. This suggests that diet influences vitamin D levels and highlights the need for nutritional guidelines for patients. This disease affects thyroid function by damaging thyroid tissue, which leads to insufficient production of the hormones, T3 and T4. In addition to these, the thyroid also secretes another hormone: calcitonin. It is not yet clear whether Hashimoto's thyroiditis affects the synthesis of calcitonin, specifically whether the disease damages the cells responsible for producing calcitonin in the same way it damages those responsible for producing T3 and T4. Our third study found that calcitonin levels in patients were similar to those in healthy participants. Finally, for future research on Hashimoto's thyroiditis, it is essential to classify patients by disease severity to obtain more accurate and meaningful results.

11. LITERATURA

1. Guyton A, Hall J. Medicinska fiziologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2022.
2. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.
3. Benvenga S, Tuccari G, Ieni A, Vita R. Thyroid Gland. Anatomy and Physiology: Elsevier; 2018.
4. Bumber Ž, Katić V, Nikšić Ivančić M, Pegan B, Petrić V, N. Š. Otorinolaringologija. Zagreb: Naklada Ljevak; 2004.
5. Bradamante Ž, Kostović-Knežević L. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 2005.
6. Solter M. Bolesti štitnjače: Klinička tireoidologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2007.
7. Kusić Z. Hipotireoza. Zagreb: Medicinska naklada; 2014.
8. Braun D, Schweizer U. Thyroid Hormone Transport and Transporters. Vitamins and hormones. 2018;106:19-44. .
9. Saponaro F, Sestito S, Runfola M, Rapposelli S, Chiellini G. Selective thyroid hormone receptor-beta (TRbeta) agonists: New perspectives for the treatment of metabolic and neurodegenerative disorders. Frontiers in medicine. 2020;7:331.
10. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. The Journal of clinical investigation. 2012;122:3035-43.
11. Davis PJ, Leonard JL, Davis FB. Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. Frontiers in neuroendocrinology. 2008;29:211-8.
12. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova Medicinska Biokemije. Zagreb: Medicinska naklada; 2009.
13. Boguslawska J, Godlewska M, Gajda E, Piekietko-Witkowska A. Cellular and molecular basis of thyroid autoimmunity. European thyroid journal. 2022;11.
14. Kravchenko V, Zakharchenko T. Thyroid hormones and minerals in immunocorrection of disorders in autoimmune thyroid diseases. Frontiers in endocrinology. 2023;14:1225494.
15. McLachlan SM, Rapoport B. Discoveries in thyroid autoimmunity in the past century. Thyroid : official journal of the American Thyroid Association. 2023;33:278-86.
16. Lee HJ, Stefan-Lifshitz M, Li CW, Tomer Y. Genetics and epigenetics of autoimmune thyroid diseases: Translational implications. Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism. 2023;37:101661.
17. Milo T, Korem Kohanim Y, Toledano Y, Alon U. Autoimmune thyroid diseases as a cost of physiological autoimmune surveillance. Trends in immunology. 2023;44:365-71.
18. Effraimidis G, Wiersinga WM. Mechanisms in endocrinology: autoimmune thyroid disease: old and new players. European journal of endocrinology. 2014;170:R:241-52.
19. Burek CL, Talor MV. Environmental triggers of autoimmune thyroiditis. Journal of autoimmunity. 2009;33:183-9.

20. Rayman MP. Multiple nutritional factors and thyroid disease, with particular reference to autoimmune thyroid disease. *The Proceedings of the Nutrition Society*. 2019;78:34-44.
21. Frohlich E, Wahl R. Microbiota and thyroid interaction in health and disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2019;30:479-90.
22. Virili C, Stramazzo I, Centanni M. Gut microbiome and thyroid autoimmunity. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2021;35:101506.
23. Ferrari SM, Paparo SR, Ragusa F, Elia G, Mazzi V, Patrizio A, et al. Chemokines in thyroidautoimmunity. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2023;37:101773.
24. Eschler DC, Hasham A, Tomer Y. Cutting edge: the etiology of autoimmune thyroid diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2011;41:190-7.
25. Aversano L, Bernardi ML, Cimitile M, Maiellaro A, Pecori R. A systematic review on artificial intelligence techniques for detecting thyroid diseases. *PeerJ Computer science*. 2023;9:e1394.
26. Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Di Domenicantonio A, Fallahi P. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmunity reviews*. 2015;14:174-80.
27. Ralli M, Angeletti D, Fiore M, D'Aguanno V, Lambiase A, Artico M, et al. Hashimoto's thyroiditis: An update on pathogenic mechanisms, diagnostic protocols, therapeutic strategies, and potential malignant transformation. *Autoimmunity reviews*. 2020;19:102649.
28. Bergemann N, Jonsdottir B, Nilsson AL, Lantz M, Lind A. Prevalence of thyroid peroxidase and thyroglobulin autoantibodies in the Swedish population. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2023;131:456-62.
29. Caturegli P, De Remigis A, Rose NR. Hashimoto thyroiditis: clinical and diagnostic criteria. *Autoimmunity reviews*. 2014;13:391-7.
30. Godlewska M, Gawel D, Buckle AM, Banga JP. Thyroid peroxidase revisited - What's new? *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme*. 2019;51:765-9.
31. Antonelli A, Ferrari SM, Ragusa F, Elia G, Paparo SR, Ruffilli I, et al. Graves' disease: Epidemiology, genetic and environmental risk factors and viruses. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2020;34:101387.
32. Kahaly GJ, Diana T, Olivo PD. Tsh receptor antibodies: Relevance & Utility. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2020;26:97-106.
33. Ehlers M, Allelein S, Schott M. TSH-receptor autoantibodies: pathophysiology, assay methods, and clinical applications. *Minerva endocrinologica*. 2018;43:323-32.
34. Frohlich E, Wahl R. Thyroid autoimmunity: Role of anti-thyroid antibodies in thyroid and extra-thyroidal diseases. *Frontiers in immunology*. 2017;8:521.
35. Eleftheriadou AM, Mehl S, Renko K, Kasim RH, Schaefer JA, Minich WB, et al. Re-visiting autoimmunity to sodium-iodide symporter and pendrin in thyroid disease. *European journal of endocrinology*. 2020;183:571-80.

36. Liu Y, Liu X, Wu N. A Review of testing for distinguishing Hashimoto's thyroiditis in the hyperthyroid stage and Grave's disease. *International journal of general medicine*. 2023;16:2355-63.
37. Vargas-Uricoechea H, Nogueira JP, Pinzon-Fernandez MV, Schwarzstein D. The usefulness of thyroid antibodies in the diagnostic approach to autoimmune thyroid disease. *Antibodies (Basel)*. 2023;12.
38. McLachlan SM, Rapoport B. Why measure thyroglobulin autoantibodies rather than thyroid peroxidase autoantibodies? *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2004;14:510-20.
39. Daramjav N, Takagi J, Iwayama H, Uchino K, Inukai D, Otake K, et al. Autoimmune thyroiditis shifting from Hashimoto's thyroiditis to Graves' disease. *Medicina (Kaunas)*. 2023;59.
40. Kamijo K. TSH-receptor antibody measurement in patients with various thyrotoxicosis and Hashimoto's thyroiditis: a comparison of two two-step assays, coated plate ELISA using porcine TSH-receptor and coated tube radioassay using human recombinant TSH-receptor. *Endocrine journal*. 2003;50:113-6.
41. Morshed SA, Ando T, Latif R, Davies TF. Neutral antibodies to the TSH receptor are present in Graves' disease and regulate selective signaling cascades. *Endocrinology*. 2010;151:5537-49.
42. Arshad I, Zahra T, Vargas-Jerez J. New-onset Graves' disease in the background of Hashimoto's thyroiditis: Spectrums of the same disease with changing autoantibodies. *Cureus*. 2022;14:e28296.
43. Kotwal A, Stan M. Thyrotropin receptor antibodies-An overview. *Ophthalmic plastic and reconstructive surgery*. 2018;34:S20-S7.
44. Diana T, Krause J, Olivo PD, Konig J, Kanitz M, Decallonne B, et al. Prevalence and clinical relevance of thyroid stimulating hormone receptor-blocking antibodies in autoimmune thyroid disease. *Clinical and experimental immunology*. 2017;189:304-9.
45. Kahaly GJ, Diana T, Glang J, Kanitz M, Pitz S, Konig J. Thyroid stimulating antibodies are highly prevalent in Hashimoto's thyroiditis and associated orbitopathy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101:1998-2004.
46. Weetman AP. The immunopathogenesis of chronic autoimmune thyroiditis one century after hashimoto. *European thyroid journal*. 2013;1:243-50.
47. Kusić Z. Hipertireoza. Zagreb: Medicinska naklada; 2016.
48. Seiwerth S, Krušlin B, Kos M, Galešić Ljubanović D. Patologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2023.
49. Cyna W, Wojciechowska A, Szybiak-Skora W, Lacka K. The impact of environmental factors on the development of autoimmune thyroiditis-Review. *Biomedicines*. 2024;12.
50. Wiersinga WM. Clinical relevance of environmental factors in the pathogenesis of autoimmune thyroid disease. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2016;31:213-22.

51. Kubiak K, Szmidt MK, Kaluza J, Zylka A, Sicinska E. Do dietary supplements affect inflammation, Oxidative stress, and antioxidant status in adults with hypothyroidism or Hashimoto's disease?-A systematic review of controlled trials. *Antioxidants (Basel)*. 2023;12.
52. Giordano C, Stassi G, De Maria R, Todaro M, Richiusa P, Papoff G, et al. Potential involvement of Fas and its ligand in the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science*. 1997;275:960-3.
53. Luo Y, Kawashima A, Ishido Y, Yoshihara A, Oda K, Hiroi N, et al. Iodine excess as an environmental risk factor for autoimmune thyroid disease. *International journal of molecular sciences*. 2014;15:12895-912.
54. Bjergved L, Jorgensen T, Perrild H, Carle A, Cerqueira C, Krejbjerg A, et al. Predictors of change in serum TSH after iodine fortification: an 11-year follow-up to the DanThyr study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97:4022-9.
55. Miranda DM, Massom JN, Catarino RM, Santos RT, Toyoda SS, Marone MM, et al. Impact of nutritional iodine optimization on rates of thyroid hypoechogenicity and autoimmune thyroiditis: a cross-sectional, comparative study. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2015;25:118-24.
56. Desailoud R, Hober D. Viruses and thyroiditis: an update. *Virology journal*. 2009;6:5.
57. Tatal E, Ozaras R, Leblebicioglu H. Systematic review of COVID-19 and autoimmune thyroiditis. *Travel medicine and infectious disease*. 2022;47:102314.
58. Tomer Y, Menconi F. Interferon induced thyroiditis. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2009;23:703-12.
59. Akeno N, Smith EP, Stefan M, Huber AK, Zhang W, Keddache M, et al. IFN-alpha mediates the development of autoimmunity both by direct tissue toxicity and through immune cell recruitment mechanisms. *J Immunol*. 2011;186:4693-706.
60. Bogazzi F, Bartalena L, Martino E. Approach to the patient with amiodarone-induced thyrotoxicosis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95:2529-35.
61. Lindsay RH, Hill JB, Gaitan E, Cooksey RC, Jolley RL. Antithyroid effects of coal-derived pollutants. *Journal of toxicology and environmental health*. 1992;37:467-81.
62. Kolypetri P, King J, Larijani M, Carayanniotis G. Genes and environment as predisposing factors in autoimmunity: acceleration of spontaneous thyroiditis by dietary iodide in NOD.H2(h4) mice. *International reviews of immunology*. 2015;34:542-56.
63. Wu L, Yu JC, Kang WM, Ma ZQ. [Iodine nutrition and thyroid diseases]. *Zhongguo yi xue ke xue yuan xue bao Acta Academiae Medicinae Sinicae*. 2013;35:363-8.
64. Tamer G, Arik S, Tamer I, Coksert D. Relative vitamin D insufficiency in Hashimoto's thyroiditis. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2011;21:891-6.
65. Ventura M, Melo M, Carrilho F. Selenium and thyroid disease: From pathophysiology to treatment. *International journal of endocrinology*. 2017;2017:1297658.
66. Liu J, Qin X, Lin B, Cui J, Liao J, Zhang F, et al. Analysis of gut microbiota diversity in Hashimoto's thyroiditis patients. *BMC microbiology*. 2022;22:318.

67. Mikulska AA, Karazniewicz-Lada M, Filipowicz D, Ruchala M, Glowka FK. Metabolic characteristics of Hashimoto's thyroiditis patients and the role of microelements and diet in the disease management-An overview. *International journal of molecular sciences*. 2022;23.
68. Mogire RM, Mutua A, Kimita W, Kamau A, Bejon P, Pettifor JM, et al. Prevalence of vitamin D deficiency in Africa: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global health*. 2020;8:e134-e42.
69. Markomanolaki ZS, Tigani X, Siamatras T, Bacopoulou F, Tsartsalis A, Artemiadis A, et al. Stress management in women with Hashimoto's thyroiditis: A randomized controlled trial. *Journal of molecular biochemistry*. 2019;8:3-12.
70. Krysiak R, Szkrobka W, Okopien B. The effect of vitamin D on thyroid autoimmunity in levothyroxine-treated women with Hashimoto's thyroiditis and normal vitamin D status. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2017;125:229-33.
71. Krysiak R, Szkrobka W, Okopien B. The effect of gluten-free diet on thyroid autoimmunity in drug-naïve women with Hashimoto's thyroiditis: A pilot study. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2019;127:417-22.
72. Hu X, Chen Y, Shen Y, Tian R, Sheng Y, Que H. Global prevalence and epidemiological trends of Hashimoto's thyroiditis in adults: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in public health*. 2022;10:1020709.
73. Ajjan RA, Weetman AP. The pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis: Further developments in our understanding. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 2015;47:702-10.
74. Fallahi P, Ferrari SM, Ruffilli I, Elia G, Biricotti M, Vita R, et al. The association of other autoimmune diseases in patients with autoimmune thyroiditis: Review of the literature and report of a large series of patients. *Autoimmunity reviews*. 2016;15:1125-8.
75. Klubo-Gwiedzinska J, Wartofsky L. Hashimoto thyroiditis: an evidence-based guide to etiology, diagnosis and treatment. *Polish archives of internal medicine*. 2022;132.
76. Biondi B, Cappola AR, Cooper DS. Subclinical hypothyroidism: A review. *Jama*. 2019;322:153-60.
77. Jonklaas J, Bianco AC, Bauer AJ, Burman KD, Cappola AR, Celi FS, et al. Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the american thyroid association task force on thyroid hormone replacement. *Thyroid: official journal of the American Thyroid Association*. 2014;24:1670-751.
78. Yuan J, Qi S, Zhang X, Lai H, Li X, Xiaoheng C, et al. Local symptoms of Hashimoto's thyroiditis: A systematic review. *Frontiers in endocrinology*. 2022;13:1076793.
79. Herrmann M, Farrell CL, Pusceddu I, Fabregat-Cabello N, Cavalier E. Assessment of vitamin D status - a changing landscape. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2017;55:3-26.
80. Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;87:1087S-91S.

81. Alonso N, Zelzer S, Eibinger G, Herrmann M. Vitamin D metabolites: Analytical challenges and clinical relevance. *Calcified tissue international*. 2023;112:158-77.
82. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80:1678S-88S.
83. Holick MF. Vitamin D deficiency. *The New England journal of medicine*. 2007;357:266-81.
84. Stefanic M, Tokic S. Serum 25-hydroxyvitamin D concentrations in relation to Hashimoto's thyroiditis: a systematic review, meta-analysis and meta-regression of observational studies. *European journal of nutrition*. 2020;59:859-72.
85. Sirajudeen S, Shah I, Al Menhali A. A narrative role of vitamin D and its receptor: With current evidence on the gastric tissues. *International journal of molecular sciences*. 2019;20.
86. Chang SW, Lee HC. Vitamin D and health - The missing vitamin in humans. *Pediatrics and neonatology*. 2019;60:237-44.
87. Zhao R, Zhang W, Ma C, Zhao Y, Xiong R, Wang H, et al. Immunomodulatory function of vitamin D and its role in autoimmune thyroid disease. *Frontiers in immunology*. 2021;12:574967.
88. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry & biology*. 2014;21:319-29.
89. Dominguez LJ, Farruggia M, Veronese N, Barbagallo M. Vitamin D sources, metabolism, and deficiency: Available compounds and guidelines for its treatment. *Metabolites*. 2021;11.
90. Norlin M, Wikvall K. Enzymatic activation in vitamin D signaling - Past, present and future. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2023;742:109639.
91. Cheng JB, Motola DL, Mangelsdorf DJ, Russell DW. De-orphanization of cytochrome P450 2R1: a microsomal vitamin D 25-hydroxylase. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278:38084-93.
92. Meyer MB, Pike JW. Mechanistic homeostasis of vitamin D metabolism in the kidney through reciprocal modulation of Cyp27b1 and Cyp24a1 expression. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2020;196:105500.
93. Brenza HL, Kimmel-Jehan C, Jehan F, Shinki T, Wakino S, Anazawa H, et al. Parathyroid hormone activation of the 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95:1387-91.
94. Kong XF, Zhu XH, Pei YL, Jackson DM, Holick MF. Molecular cloning, characterization, and promoter analysis of the human 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96:6988-93.
95. Martin A, David V, Quarles LD. Regulation and function of the FGF23/klotho endocrine pathways. *Physiological reviews*. 2012;92:131-55.
96. Carlberg C. Vitamin D and its target genes. *Nutrients*. 2022;14.

97. Pike JW, Christakos S. Biology and mechanisms of action of the vitamin D hormone. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 2017;46:815-43.
98. Vondra K, Starka L, Hampl R. Vitamin D and thyroid diseases. *Physiological research*. 2015;64:S95-S100.
99. Hanel A, Carlberg C. Time-resolved gene expression analysis monitors the regulation of inflammatory mediators and attenuation of adaptive immune response by vitamin D. *International journal of molecular sciences*. 2022;23.
100. Trevino LS, Gorelick DA. The interface of nuclear and membrane steroid signaling. *Endocrinology*. 2021;162.
101. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96:1911-30.
102. Ramasamy I. Vitamin D metabolism and guidelines for vitamin D supplementation. *The clinical biochemist reviews*. 2020;41:103-26.
103. Seamans KM, Cashman KD. Existing and potentially novel functional markers of vitamin D status: a systematic review. *The American journal of clinical nutrition*. 2009;89:1997S-2008S.
104. Matsui MS. Vitamin D update. *Current dermatology reports*. 2020;9:323-30.
105. Munns CF, Shaw N, Kiely M, Specker BL, Thacher TD, Ozono K, et al. Global consensus recommendations on prevention and management of nutritional rickets. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2016;101:394-415.
106. Zeng S, Chu C, Doebis C, von Baehr V, Hoher B. Reference values for free 25-hydroxy-vitamin D based on established total 25-hydroxy-vitamin D reference values. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2021;210:105877.
107. Pludowski P, Karczmarewicz E, Bayer M, Carter G, Chlebna-Sokol D, Czech-Kowalska J, et al. Practical guidelines for the supplementation of vitamin D and the treatment of deficits in Central Europe - recommended vitamin D intakes in the general population and groups at risk of vitamin D deficiency. *Endokrynologia Polska*. 2013;64:319-27.
108. Souberbielle JC, Deschenes G, Fouque D, Groussin L, Guggenbuhl P, Jean G, et al. [Recommendations for the measurement of blood 25-OH vitamin D]. *Annales de biologie clinique*. 2016;74:7-19. Indications du dosage de la 25-hydroxyvitamine D.
109. LeFevre ML. Screening for vitamin D deficiency in adults: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Annals of internal medicine*. 2015;162:133-40.
110. Rockwell M, Kraak V, Hulver M, Epling J. Clinical management of low vitamin D: A scoping review of physicians' practices. *Nutrients*. 2018;10.
111. Pilz S, Zittermann A, Trummer C, Theiler-Schwetz V, Lerchbaum E, Keppel MH, et al. Vitamin D testing and treatment: a narrative review of current evidence. *Endocrine connections*. 2019;8:R27-R43.
112. Altieri B, Cavalier E, Bhattoa HP, Perez-Lopez FR, Lopez-Baena MT, Perez-Roncero GR, et al. Vitamin D testing: advantages and limits of the current assays. *European journal of clinical nutrition*. 2020;74:231-47.

113. Volmer DA, Mendes LR, Stokes CS. Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: current techniques, limitations of the "gold standard" method, and anticipated future directions. *Mass spectrometry reviews*. 2015;34:2-23.
114. Bischoff-Ferrari HA, Dietrich T, Orav EJ, Dawson-Hughes B. Positive association between 25-hydroxy vitamin D levels and bone mineral density: a population-based study of younger and older adults. *The American journal of medicine*. 2004;116:634-9.
115. Tai SS, Bedner M, Phinney KW. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2010;82:1942-8.
116. Binkley N, Dawson-Hughes B, Durazo-Arvizu R, Thamm M, Tian L, Merkel JM, et al. Vitamin D measurement standardization: The way out of the chaos. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2017;173:117-21.
117. Phinney KW, Bedner M, Tai SS, Vamathevan VV, Sander LC, Sharpless KE, et al. Development and certification of a standard reference material for vitamin D metabolites in human serum. *Analytical chemistry*. 2012;84:956-62.
118. Sempos CT, Vesper HW, Phinney KW, Thienpont LM, Coates PM. Vitamin D status as an international issue: national surveys and the problem of standardization. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation Supplementum*. 2012;243:32-40.
119. Peacock M, Taylor GA, Brown W. Plasma 1,25(OH)₂ vitamin D measured by radioimmunoassay and cytosol radioreceptor assay in normal subjects and patients with primary hyperparathyroidism and renal failure. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1980;101:93-101.
120. Hussein H, Ibrahim F, Boudou P. Evaluation of a new automated assay for the measurement of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D levels in daily practice. *Clinical biochemistry*. 2015;48:1160-2.
121. Dabek JT, Harkonen M, Wahlroos O, Adlercreutz H. Assay for plasma 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 by "high-performance" liquid chromatography. *Clinical chemistry*. 1981;27:1346-51.
122. Oftebro H, Falch JA, Holmberg I, Haug E. Validation of a radioreceptor assay for 1,25-dihydroxyvitamin D using selected ion monitoring GC-MS. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1988;176:157-68.
123. Maunsell Z, Wright DJ, Rainbow SJ. Routine isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of the 25-hydroxy metabolites of vitamins D2 and D3. *Clinical chemistry*. 2005;51:1683-90.
124. Pludowski P, Holick MF, Pilz S, Wagner CL, Hollis BW, Grant WB, et al. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-a review of recent evidence. *Autoimmunity reviews*. 2013;12:976-89.
125. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96:53-8.

126. Giuliani S, Barbieri V, Di Pierro AM, Rossi F, Widmann T, Lucchiari M, et al. LC-MS/MS based 25(OH)D status in a large Southern European outpatient cohort: gender- and age-specific differences. *European journal of nutrition*. 2019;58:2511-20.
127. Sirbe C, Rednic S, Grama A, Pop TL. An update on the effects of vitamin D on the immune system and autoimmune diseases. *International journal of molecular sciences*. 2022;23.
128. Amrein K, Quraishi SA, Litonjua AA, Gibbons FK, Pieber TR, Camargo CA, Jr., et al. Evidence for a U-shaped relationship between prehospital vitamin D status and mortality: a cohort study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99:1461-9.
129. DeLuca HF. Vitamin D: Historical overview. *Vitamins and hormones*. 2016;100:1-20.
130. Saponaro F, Saba A, Zucchi R. An update on vitamin D metabolism. *International journal of molecular sciences*. 2020;21.
131. Rebelos E, Tentolouris N, Jude E. The role of vitamin D in health and disease: A narrative review on the mechanisms linking vitamin D with disease and the effects of supplementation. *drugs*. 2023;83:665-85.
132. Gallo D, Mortara L, Gariboldi MB, Cattaneo SAM, Rosetti S, Gentile L, et al. Immunomodulatory effect of vitamin D and its potential role in the prevention and treatment of thyroid autoimmunity: a narrative review. *Journal of endocrinological investigation*. 2020;43:413-29.
133. Jones G. Extrarenal vitamin D activation and interactions between vitamin D(2), vitamin D(3), and vitamin D analogs. *Annual review of nutrition*. 2013;33:23-44.
134. Stocklin E, Eggersdorfer M. Vitamin D, an essential nutrient with versatile functions in nearly all organs. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*. 2013;83:92-100.
135. Charoenngam N, Holick MF. Immunologic effects of vitamin D on human health and disease. *Nutrients*. 2020;12.
136. Walters MR. Newly identified actions of the vitamin D endocrine system. *Endocrine reviews*. 1992;13:719-64.
137. Hewison M, Burke F, Evans KN, Lammas DA, Sansom DM, Liu P, et al. Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase in human health and disease. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007;103:316-21.
138. Aribi M, Mennechet FJD, Touil-Boukoffa C. Editorial: The role of vitamin D as an immunomodulator. *Frontiers in immunology*. 2023;14:1186635.
139. Sassi F, Tamone C, D'Amelio P. Vitamin D: Nutrient, hormone, and immunomodulator. *Nutrients*. 2018;10.
140. Christakos S, Li S, De La Cruz J, Bikle DD. New developments in our understanding of vitamin metabolism, action and treatment. *Metabolism: clinical and experimental*. 2019;98:112-20.
141. Malmberg HR, Hanel A, Taipale M, Heikkinen S, Carlberg C. Vitamin D treatment sequence is critical for transcriptome modulation of immune challenged primary human cells. *Frontiers in immunology*. 2021;12:754056.

142. Cashman KD, Dowling KG, Skrabakova Z, Gonzalez-Gross M, Valtuena J, De Henauw S, et al. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *The American journal of clinical nutrition*. 2016;103:1033-44.
143. Cui A, Zhang T, Xiao P, Fan Z, Wang H, Zhuang Y. Global and regional prevalence of vitamin D deficiency in population-based studies from 2000 to 2022: A pooled analysis of 7.9 million participants. *Frontiers in nutrition*. 2023;10:1070808.
144. Amrein K, Scherkl M, Hoffmann M, Neuwersch-Sommeregger S, Kostenberger M, Tmava Berisha A, et al. Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide. *European journal of clinical nutrition*. 2020;74:1498-513.
145. Harrison SR, Li D, Jeffery LE, Raza K, Hewison M. Vitamin D, autoimmune disease and rheumatoid arthritis. *Calcified tissue international*. 2020;106:58-75.
146. Ponsonby AL, Lucas RM, van der Mei IA. UVR, vitamin D and three autoimmune diseases--multiple sclerosis, type 1 diabetes, rheumatoid arthritis. *Photochemistry and photobiology*. 2005;81:1267-75.
147. Manson JE, Cook NR, Lee IM, Christen W, Bassuk SS, Mora S, et al. Vitamin D supplements and prevention of cancer and cardiovascular disease. *The New England journal of medicine*. 2019;380:33-44.
148. Kowalowka M, Glowka AK, Karazniewicz-Lada M, Kosewski G. Clinical significance of analysis of vitamin D status in various diseases. *Nutrients*. 2020;12.
149. Hayter SM, Cook MC. Updated assessment of the prevalence, spectrum and case definition of autoimmune disease. *Autoimmunity reviews*. 2012;11:754-65.
150. Kmiec P, Sworczak K. Vitamin D in thyroid disorders. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 2015;123:386-93.
151. D'Aurizio F, Villalta D, Metus P, Doretto P, Tozzoli R. Is vitamin D a player or not in the pathophysiology of autoimmune thyroid diseases? *Autoimmunity reviews*. 2015;14:363-9.
152. Xu Y, He B, Pan Y, Deng Q, Sun H, Li R, et al. Systematic review and meta-analysis on vitamin D receptor polymorphisms and cancer risk. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2014;35:4153-69.
153. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80:1689S-96S.
154. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocrine reviews*. 2005;26:662-87.
155. Vanherwegen AS, Gysemans C, Mathieu C. Vitamin D endocrinology on the cross-road between immunity and metabolism. *Molecular and cellular endocrinology*. 2017;453:52-67.
156. Gallo D, Baci D, Kustrimovic N, Lanzo N, Patera B, Tanda ML, et al. How does vitamin D affect immune cells crosstalk in autoimmune aiseases? *International journal of molecular sciences*. 2023;24.
157. Orgiazzi J. Thyroid autoimmunity. *Presse Med*. 2012;41:e611-25.

158. Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L. Vitamin D and 1,25(OH)₂D regulation of T cells. *Nutrients*. 2015;7:3011-21.
159. Bui L, Zhu Z, Hawkins S, Cortez-Resendiz A, Bellon A. Vitamin D regulation of the immune system and its implications for COVID-19: A mini review. *SAGE open medicine*. 2021;9:20503121211014073.
160. Lebiedzinski F, Lisowska KA. Impact of vitamin D on immunopathology of Hashimoto's Thyroiditis: From theory to practice. *Nutrients*. 2023;15.
161. Czarnywojtek A, Florek E, Pietronczyk K, Sawicka-Gutaj N, Ruchala M, Ronen O, et al. The role of vitamin D in autoimmune thyroid diseases: A narrative review. *Journal of clinical medicine*. 2023;12.
162. Goswami R, Marwaha RK, Gupta N, Tandon N, Sreenivas V, Tomar N, et al. Prevalence of vitamin D deficiency and its relationship with thyroid autoimmunity in Asian Indians: a community-based survey. *The British journal of nutrition*. 2009;102:382-6.
163. Babic Leko M, Juresko I, Rozic I, Pleic N, Gunjaca I, Zemunik T. Vitamin D and the thyroid: A critical review of the current evidence. *International journal of molecular sciences*. 2023;24.
164. Botelho IMB, Moura Neto A, Silva CA, Tambascia MA, Alegre SM, Zantut-Wittmann DE. Vitamin D in Hashimoto's thyroiditis and its relationship with thyroid function and inflammatory status. *Endocrine journal*. 2018;65:1029-37.
165. Effraimidis G, Badenhop K, Tijssen JG, Wiersinga WM. Vitamin D deficiency is not associated with early stages of thyroid autoimmunity. *European journal of endocrinology*. 2012;167:43-8.
166. Yasmeh J, Farpour F, Rizzo V, Kheradnam S, Sachmechi I. Hashimoto Thyroiditis Not associated with vitamin D deficiency. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2016;22:809-13.
167. Musa IR, Gasim GI, Khan S, Ibrahim IA, Abo-Alazm H, Adam I. No Association between 25 (OH) vitamin D level and hypothyroidism among females. *Open access Macedonian journal of medical sciences*. 2017;5:126-30.
168. Yavuzer H, Işık S, Cengiz M, Bolayırılı İM, Döventaş A, Erdiçler DS. The relationship between vitamin D levels and receptor activator of nuclear factor ligand in Hashimoto's Thyroiditis. *Haseki Tıp Bülteni*. 2018;55:261-8.
169. Filipova L, Lazurova Z, Fulop P, Lazurova I. Vitamin D insufficiency is not associated with thyroid autoimmunity in Slovak women with Hashimoto s disease. *Bratislavske lekarske listy*. 2023;124:182-6.
170. Rola R, Trusewicz E, Bieńkowski T, Studzińska S. Application of dried blood spots and serum samples for the determination of vitamin D metabolites in the group of healthy women and with Hashimoto's thyroiditis. *Chromatographia*. 2021;84:695-701.
171. Taheriniya S, Arab A, Hadi A, Fadel A, Askari G. Vitamin D and thyroid disorders: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *BMC endocrine disorders*. 2021;21:171.

172. Chao G, Zhu Y, Fang L. Correlation between Hashimoto's thyroiditis-related thyroid hormone levels and 25-Hydroxyvitamin D. *Frontiers in endocrinology*. 2020;11:4.
173. Camurdan OM, Doger E, Bideci A, Celik N, Cinaz P. Vitamin D status in children with Hashimoto thyroiditis. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM*. 2012;25:467-70.
174. Choi YM, Kim WG, Kim TY, Bae SJ, Kim HK, Jang EK, et al. Low levels of serum vitamin D3 are associated with autoimmune thyroid disease in pre-menopausal women. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2014;24:655-61.
175. Evliyaoglu O, Acar M, Ozcabi B, Erginoz E, Bucak F, Ercan O, et al. Vitamin D deficiency and Hashimoto's thyroiditis in children and adolescents: a critical vitamin D level for this association? *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*. 2015;7:128-33.
176. Mackawy AM, Al-Ayed BM, Al-Rashidi BM. Vitamin d deficiency and its association with thyroid disease. *International journal of health sciences*. 2013;7:267-75.
177. Dipasquale V, Lo Presti G, Milani GP, Corsello A, Agostoni C, Romano C. Vitamin D in prevention of autoimmune diseases. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022;27:288.
178. Zhang J, Chen Y, Li H. Effects of vitamin D on thyroid autoimmunity markers in Hashimoto's thyroiditis: systematic review and meta-analysis. *The Journal of international medical research*. 2021;49:3000605211060675.
179. Yu Y, Yang X, Wu J, Shangguan X, Bai S, Yu R. A Mendelian randomization study of the effect of serum 25-hydroxyvitamin D levels on autoimmune thyroid disease. *Frontiers in immunology*. 2023;14:1298708.
180. Kim D. The Role of Vitamin D in Thyroid Diseases. *International journal of molecular sciences*. 2017;18.
181. Altieri B, Muscogiuri G, Barrea L, Mathieu C, Vallone CV, Mascitelli L, et al. Does vitamin D play a role in autoimmune endocrine disorders? A proof of concept. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2017;18:335-46.
182. Muscogiuri G, Tirabassi G, Bizzaro G, Orio F, Paschou SA, Vryonidou A, et al. Vitamin D and thyroid disease: to D or not to D? *European journal of clinical nutrition*. 2015;69:291-6.
183. Burgaz A, Akesson A, Oster A, Michaelsson K, Wolk A. Associations of diet, supplement use, and ultraviolet B radiation exposure with vitamin D status in Swedish women during winter. *The American journal of clinical nutrition*. 2007;86:1399-404.
184. Black LJ, Seamans KM, Cashman KD, Kiely M. An updated systematic review and meta-analysis of the efficacy of vitamin D food fortification. *The Journal of nutrition*. 2012;142:1102-8.
185. Neill HR, Gill CIR, McDonald EJ, McRoberts WC, Pourshahidi LK. The future is bright: Biofortification of common foods can improve vitamin D status. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2023;63:505-21.
186. Itkonen ST, Erkkola M, Lamberg-Allardt CJE. Vitamin D fortification of fluid milk products and their contribution to vitamin D intake and vitamin D status in observational studies-A review. *Nutrients*. 2018;10.

187. Macdonald HM. Contributions of sunlight and diet to vitamin D status. *Calcified tissue international*. 2013;92:163-76.
188. Rodriguez-Rodriguez E, Aparicio Vizuete A, Sanchez-Rodriguez P, Lorenzo Mora AM, Lopez-Sobaler AM, Ortega RM. [Vitamin D deficiency in Spanish population. Importance of egg on nutritional improvement]. *Nutricion hospitalaria*. 2019;36:3-7. Deficiencia en vitamina D de la poblacion espanola. Importancia del huevo en la mejora nutricional.
189. Brock K, Cant R, Clemson L, Mason RS, Fraser DR. Effects of diet and exercise on plasma vitamin D (25(OH)D) levels in Vietnamese immigrant elderly in Sydney, Australia. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007;103:786-92.
190. Bonaccio M, Pounis G, Cerletti C, Donati MB, Iacoviello L, de Gaetano G. Mediterranean diet, dietary polyphenols and low grade inflammation: results from the MOLI-SANI study. *British journal of clinical pharmacology*. 2017;83:107-13.
191. Zupo R, Lampignano L, Lattanzio A, Mariano F, Osella AR, Bonfiglio C, et al. Association between adherence to the Mediterranean Diet and circulating Vitamin D levels. *International journal of food sciences and nutrition*. 2020;71:884-90.
192. Ihnatowicz P, Drywien M, Wator P, Wojsiat J. The importance of nutritional factors and dietary management of Hashimoto's thyroiditis. *Annals of agricultural and environmental medicine : AAEM*. 2020;27:184-93.
193. Benvenga S, Ferrari SM, Elia G, Ragusa F, Patrizio A, Paparo SR, et al. Nutraceuticals in thyroidology: A review of in vitro, and in vivo animal studies. *Nutrients*. 2020;12.
194. Osowiecka K, Myszkowska-Ryciak J. The influence of nutritional intervention in the treatment of Hashimoto's thyroiditis-A systematic review. *Nutrients*. 2023;15.
195. Kalicanin D, Brcic L, Ljubetic K, Baric A, Gracan S, Brekalo M, et al. Differences in food consumption between patients with Hashimoto's thyroiditis and healthy individuals. *Scientific reports*. 2020;10:10670.
196. Baric A, Brcic L, Gracan S, Skrabic V, Brekalo M, Simunac M, et al. Thyroglobulin antibodies are associated with symptom burden in patients with Hashimoto's thyroiditis: A cross-sectional study. *Immunological investigations*. 2019;48:198-209.
197. Brdar D, Gunjaca I, Pleic N, Torlak V, Knezevic P, Punda A, et al. The effect of food groups and nutrients on thyroid hormone levels in healthy individuals. *Nutrition*. 2021;91-92:111394.
198. Juresko I, Pleic N, Gunjaca I, Torlak V, Brdar D, Punda A, et al. The effect of Mediterranean diet on thyroid gland activity. *International journal of molecular sciences*. 2024;25.
199. Danailova Y, Velikova T, Nikolaev G, Mitova Z, Shinkov A, Gagov H, et al. Nutritional management of thyroiditis of Hashimoto. *International journal of molecular sciences*. 2022;23.
200. Castagna MG, Fugazzola L, Maino F, Covelli D, Memmo S, Sestini F, et al. Reference range of serum calcitonin in pediatric population. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2015;100:1780-4.
201. Basuyau JP, Mallet E, Leroy M, Brunelle P. Reference intervals for serum calcitonin in men, women, and children. *Clinical chemistry*. 2004;50:1828-30.

202. Suzuki H. Calcitonin levels in normal individuals with new highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay. *Journal of clinical laboratory analysis*. 1998;12:218-22.
203. Schneider DF, Chen H. New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2013;63:374-94.
204. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Fundamentals of clinical chemistry*. St. Louis, Missouri 63146: Saunders ELSEVIER; 2008.
205. Yiakoumakis E, Proukakis C, Raptis K, Korres A, Dondas N, Samaras V. Calcitonin concentrations in lung cancer and non-malignant pulmonary diseases. *Oncology*. 1987;44:145-9.
206. Giannetta E, Gianfrilli D, Pozza C, Lauretta R, Graziadio C, Sbardella E, et al. Extrathyroidal calcitonin secreting tumors: Pancreatic neuroendocrine tumors in patients with multinodular goiter: Two case reports. *Medicine*. 2016;95:e2419.
207. Toledo SP, Lourenco DM, Jr., Santos MA, Tavares MR, Toledo RA, Correia-Deur JE. Hypercalcitoninemia is not pathognomonic of medullary thyroid carcinoma. *Clinics (Sao Paulo)*. 2009;64:699-706.
208. Erdogan MF, Gursoy A, Kulaksizoglu M. Long-term effects of elevated gastrin levels on calcitonin secretion. *Journal of endocrinological investigation*. 2006;29:771-5.
209. Bulow Pedersen I, Laurberg P, Knudsen N, Jorgensen T, Perrild H, Ovesen L, et al. A population study of the association between thyroid autoantibodies in serum and abnormalities in thyroid function and structure. *Clinical endocrinology*. 2005;62:713-20.
210. Borges MF, Abelin NM, Menezes FO, Dahia PL, Toledo SP. Calcitonin deficiency in early stages of chronic autoimmune thyroiditis. *Clinical endocrinology*. 1998;49:69-75.
211. Body JJ, Demeester-Mirkin N, Borkowski A, Suciu S, Corvilain J. Calcitonin deficiency in primary hypothyroidism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1986;62:700-3.
212. Poppe K, Verbruggen LA, Velkeniers B, Finne E, Body JJ, Vanhaelst L. Calcitonin reserve in different stages of atrophic autoimmune thyroiditis. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 1999;9:1211-4.
213. Karanikas G, Moameni A, Poetzi C, Zettinig G, Kaserer K, Bieglmayer C, et al. Frequency and relevance of elevated calcitonin levels in patients with neoplastic and nonneoplastic thyroid disease and in healthy subjects. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89:515-9.
214. Barbot N, Guyetant S, Beldent V, Akkrass A, Cerf I, Perdrisot R, et al. [Chronic autoimmune thyroiditis and C-cell hyperplasia. Study of calcitonin secretion in 24 patients]. *Annales d'endocrinologie*. 1991;52:109-12. Thyroidite chronique auto-immune et hyperplasie des cellules C. Etude de la secretion de calcitonine chez 24 patients.
215. Urbanavichius V, Starkova NT, Nekrasova LV, Konnova EV. [Immunoreactive parathyroid hormone and calcitonin in patients with autoimmune thyroiditis]. *Problemy endokrinologii*. 1986;32:21-4. Immunoreaktivnye paratogormon i kal'tsitonin u bol'nykh autoimmunnym tireoiditom.

216. Rosario PW, Calsolari MR. Influence of chronic autoimmune thyroiditis and papillary thyroid cancer on serum calcitonin levels. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2013;23:671-4.
217. Pantazi H, Papapetrou PD. Calcitonin levels are similar in goitrous euthyroid patients with or without thyroid antibodies, as well as in hypothyroid patients. *European journal of endocrinology*. 1998;138:530-5.
218. Grani G, Nesca A, Del Sordo M, Calvanese A, Carbotta G, Bianchini M, et al. Interpretation of serum calcitonin in patients with chronic autoimmune thyroiditis. *Endocrine-related cancer*. 2012;19:345-9.
219. Guesgen C, Willms A, Zwad A, Waldeck S, Wieler H, Schwab R. Investigation of factors potentially influencing calcitonin levels in the screening and follow-up for medullary thyroid carcinoma: a cautionary note. *BMC clinical pathology*. 2013;13:27.
220. Maino F, Dalmiglio C, Benenati N, Campanile M, Pilli T, Forleo R, et al. Calcitonin levels in thyroid disease are not affected by autoimmune thyroiditis or differentiated thyroid carcinoma. *European thyroid journal*. 2021;10:295-305.
221. Garcia-Larsen V, Luczynska M, Kowalski ML, Voutilainen H, Ahlstrom M, Haahtela T, et al. Use of a common food frequency questionnaire (FFQ) to assess dietary patterns and their relation to allergy and asthma in Europe: pilot study of the GA2LEN FFQ. *European journal of clinical nutrition*. 2011;65:750-6.
222. Brcic L, Baric A, Gracan S, Brekalo M, Kalicanin D, Gunjaca I, et al. Genome-wide association analysis suggests novel loci for Hashimoto's thyroiditis. *Journal of endocrinological investigation*. 2019;42:567-76.
223. Brcic L, Baric A, Benzon B, Brekalo M, Gracan S, Kalicanin D, et al. AATF and SMARCA2 are associated with thyroid volume in Hashimoto's thyroiditis patients. *Scientific reports*. 2020;10:1754.
224. Ferrari D, Lombardi G, Strollo M, Pontillo M, Motta A, Locatelli M. Association between solar ultraviolet doses and vitamin D clinical routine data in European mid-latitude population between 2006 and 2018. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. 2019;18:2696-706.
225. Katrinaki M, Kampa M, Margioris A, Castanas E, Malliaraki N. Vitamin D levels in a large Mediterranean cohort: reconsidering normal cut-off values. *Hormones (Athens)*. 2016;15:205-23.
226. Kim D. Low vitamin D status is associated with hypothyroid Hashimoto's thyroiditis. *Hormones (Athens)*. 2016;15:385-93.
227. Kivity S, Agmon-Levin N, Zisappl M, Shapira Y, Nagy EV, Danko K, et al. Vitamin D and autoimmune thyroid diseases. *Cellular & molecular immunology*. 2011;8:243-7.
228. Chailurkit LO, Aekplakorn W, Ongphiphadhanakul B. High vitamin D status in younger individuals is associated with low circulating thyrotropin. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. 2013;23:25-30.

229. Zhang Q, Wang Z, Sun M, Cao M, Zhu Z, Fu Q, et al. Association of high vitamin d status with low circulating thyroid-stimulating hormone independent of thyroid hormone levels in middle-aged and elderly males. *International journal of endocrinology*. 2014;2014:631819.
230. Barchetta I, Baroni MG, Leonetti F, De Bernardinis M, Bertoccini L, Fontana M, et al. TSH levels are associated with vitamin D status and seasonality in an adult population of euthyroid adults. *Clinical and experimental medicine*. 2015;15:389-96.
231. Das G, Taylor PN, Javaid H, Tennant BP, Geen J, Aldridge A, et al. Seasonal variation of vitamin D and serum thyrotropin levels and its relationship in a euthyroid Caucasian population. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. 2018;24:53-9.
232. Fonseca Valle D, Giannini DT. Correlation between vitamin D and blood pressure in adolescents. *International journal of adolescent medicine and health*. 2019;32.
233. Lin L, Zhang L, Li C, Gai Z, Li Y. Vitamin D and vitamin D receptor: New insights in the treatment of hypertension. *Current protein & peptide science*. 2019;20:984-95.
234. Fang F, Chai Y, Wei H, Wang K, Tan L, Zhang W, et al. Vitamin D deficiency is associated with thyroid autoimmunity: results from an epidemiological survey in Tianjin, China. *Endocrine*. 2021;73:447-54.
235. Poole R, Kennedy OJ, Roderick P, Fallowfield JA, Hayes PC, Parkes J. Coffee consumption and health: umbrella review of meta-analyses of multiple health outcomes. *BMJ*. 2017;359:j5024.
236. Saud S, Salamatullah AM. Relationship between the chemical composition and the biological functions of coffee. *Molecules*. 2021;26.
237. Chen Q, Kord-Varkaneh H, Santos HO, Genario R, Dang M. Higher intakes of dietary caffeine are associated with 25-hydroxyvitamin D deficiency. *International journal for vitamin and nutrition research Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung Journal international de vitaminologie et de nutrition*. 2022;92:85-90.
238. Nakamura K, Kitamura K, Takachi R, Saito T, Kobayashi R, Oshiki R, et al. Impact of demographic, environmental, and lifestyle factors on vitamin D sufficiency in 9084 Japanese adults. *Bone*. 2015;74:10-7.
239. Duchaine CS, Diorio C. Association between intake of sugar-sweetened beverages and circulating 25-hydroxyvitamin D concentration among premenopausal women. *Nutrients*. 2014;6:2987-99.
240. Lee MJ, Hsu HJ, Wu IW, Sun CY, Ting MK, Lee CC. Vitamin D deficiency in northern Taiwan: a community-based cohort study. *BMC public health*. 2019;19:337.
241. Al-Othman A, Al-Musharaf S, Al-Daghri NM, Yakout S, Alkharfy KM, Al-Saleh Y, et al. Tea and coffee consumption in relation to vitamin D and calcium levels in Saudi adolescents. *Nutrition journal*. 2012;11:56.
242. Al-Raddadi R, Bahijri S, Borai A, AlRaddadi Z. Prevalence of lifestyle practices that might affect bone health in relation to vitamin D status among female Saudi adolescents. *Nutrition*. 2018;45:108-13.

243. Mutti DO, Marks AR. Blood levels of vitamin D in teens and young adults with myopia. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry*. 2011;88:377-82.
244. Hirschler V, Maccallini G, Aranda C, Fernando S, Molinari C. Association of vitamin D with glucose levels in indigenous and mixed population Argentinean boys. *Clinical biochemistry*. 2013;46:197-201.
245. Berg J, Seyedsadjadi N, Grant R. Increased consumption of plant foods is associated with increased bone mineral density. *The journal of nutrition, health & aging*. 2020;24:388-97.
246. Marques-Vidal P, Waeber G, Vollenweider P, Guessous I. Socio-demographic and lifestyle determinants of dietary patterns in French-speaking Switzerland, 2009-2012. *BMC public health*. 2018;18:131.
247. Oh HY, Lee SY, Yoon J, Cho HJ, Kim YH, Suh DI, et al. Vegetable dietary pattern may protect mild and persistent allergic rhinitis phenotype depending on genetic risk in school children. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*. 2020;31:920-9.
248. Bach-Faig A, Berry EM, Lairon D, Reguant J, Trichopoulou A, Dernini S, et al. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public health nutrition*. 2011;14:2274-84.
249. Barrea L, Muscogiuri G, Laudisio D, Pugliese G, de Alteriis G, Colao A, et al. Influence of the Mediterranean diet on 25- Hydroxyvitamin D levels in adults. *Nutrients*. 2020;12.
250. Moliterno P, Donangelo CM, Borgarello L, Pecora M, Olascoaga A, Noboa O, et al. Association of dietary patterns with cardiovascular and kidney phenotypes in an Uruguayan population cohort. *Nutrients*. 2021;13.
251. In: Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB, editors. *Dietary reference intakes for calcium and vitamin D*. Washington (DC)2011.
252. Black LJ, Lucas RM, Sherriff JL, Bjorn LO, Bornman JF. In Pursuit of vitamin D in plants. *Nutrients*. 2017;9.
253. Yang Z, Laillou A, Smith G, Schofield D, Moench-Pfanner R. A review of vitamin D fortification: implications for nutrition programming in Southeast Asia. *Food and nutrition bulletin*. 2013;34:S81-9.
254. Olson ML, Maalouf NM, Oden JD, White PC, Hutchison MR. Vitamin D deficiency in obese children and its relationship to glucose homeostasis. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2012;97:279-85.
255. Garcia-Contreras F, Paniagua R, Avila-Diaz M, Cabrera-Munoz L, Martinez-Muniz I, Foyo-Niembro E, et al. Cola beverage consumption induces bone mineralization reduction in ovariectomized rats. *Archives of medical research*. 2000;31:360-5.
256. Calvo MS, Whiting SJ, Barton CN. Vitamin D fortification in the United States and Canada: current status and data needs. *The American journal of clinical nutrition*. 2004;80:1710S-6S.
257. Yetley EA. Assessing the vitamin D status of the US population. *The American journal of clinical nutrition*. 2008;88:558S-64S.

258. Song E, Jeon MJ, Yoo HJ, Bae SJ, Kim TY, Kim WB, et al. Gender-dependent reference range of serum calcitonin levels in healthy Korean adults. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2021;36:365-73.
259. Deftos LJ, Weisman MH, Williams GW, Karpf DB, Frumar AM, Davidson BJ, et al. Influence of age and sex on plasma calcitonin in human beings. *The New England journal of medicine*. 1980;302:1351-3.
260. d'Herbomez M, Caron P, Bauters C, Do Cao C, Schlienger JL, Sapin R, et al. Reference range of serum calcitonin levels in humans: influence of calcitonin assays, sex, age, and cigarette smoking. *European journal of endocrinology*. 2007;157:749-55.
261. Tieggs RD, Body JJ, Barta JM, Heath H, 3rd. Secretion and metabolism of monomeric human calcitonin: effects of age, sex, and thyroid damage. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1986;1:339-49.
262. Topping O, Bucht E, Sjöberg HE. Plasma calcitonin response to a calcium clamp. Influence of sex and age. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme*. 1985;17:536-9.
263. Lore F, Galli M, Franci B, Martorelli MT. Calcitonin levels in normal subjects according to age and sex. *Biomedicine & pharmacotherapy , Biomedecine & pharmacotherapie*. 1984;38:261-3.
264. 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. *Endocrinologia japonica*. 1991;38:343-9.

12. ŽIVOTOPIS

OSOBNÉ INFORMACIJE

Ime i prezime:	Maja Cvek
Datum/mjesto rođenja:	26. studenog 1971. Split
Mjesto stanovanja:	Split
Državljanstvo:	hrvatsko

OBRAZOVANJE

2021 – 2025	Doktorski studij „Translacijska istraživanja u biomedicini“ (TRIBE), Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet
1998 – 2008	Magistar prirodnih znanosti Poslijediplomski studij prirodnih znanosti, znanstveno područje kemija - biokemija. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno- matematički fakultet
1990 – 1995	Diplomirani inženjer kemijske tehnologije Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet

RADNO ISKUSTVO

08/96 – danas	Klinički zavod za nuklearnu medicinu, KBC Split
01/96 – 08/96	Hrvatski zavod za javno zdravstvo, Split

NASTAVNE AKTIVNOSTI

Medicinski fakultet Split, vanjski suradnik
Sveučilišni Odjel zdravstvenih studija, naslovni asistent

ISTRAŽIVAČKI PROJEKTI

Otkrivanje biomarkera za bolest Hashimotov tireoiditis koristeći multi-omics pristup
Projekt Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ)

Genome wide association analysis of Hashimoto`s thyroiditis
Projekt Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ)

Analiza uloge vitamina D s pojavom i kliničkom manifestacijom bolesti Hashimotov
tireoiditis

Projekt Zaklade HAZU

PUBLIKACIJE

1. Vuletić M, Kaličanin D, Barić Žižić A, **Cvek M**, Sladić S, Škrabić V i sur. *Occupational physical activity and regular exercise are inversely correlated with thyroid function in patients with Hashimoto's thyroiditis.* Diseases. 2024;12:281
2. Kaličanin D, **Cvek M**, Barić A, Škrabić V, Punda A, Boraska Perica V. *Associations between vitamin D levels and dietary patterns in patients with Hashimoto's thyroiditis.* Front Nutr.2023;10:1188612
3. **Cvek M**, Punda A, Brekalo M, Plosnić M, Barić A, Kaličanin D i sur. *Presence or severity of Hashimoto's thyroiditis does not influence basal calcitonin levels: observations from CROHT biobank.* J Endocrinol Invest. 2021 Oct 6. Epub 2021, 2022;45:597-605.
4. **Cvek M**, Kaličanin D, Barić A, Vuletić M, Gunjača I, Torlak Lovrić V i sur. *Vitamin D and Hashimoto's Thyroiditis: Observations from CROHT Biobank.* Nutrients. 2021; 13:2793.
5. Kokić V, Martinović Kaliterna D, Radić M, Perković D, **Cvek M**, Čapkun V. *Relationship between vitamin D, IFN- γ , and E2 levels in systemic lupus erythematosus.* Lupus, 2016; 25: 202-8.