



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Bajkin

**Uticaj estara ftalne kiseline na tiroidnu funkciju**

doktorska disertacija

Mentori:

Prof. dr Milica Medić-Stojanoska

Prof. dr Nataša Milić

Novi Sad, 2016. godine

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**KLJUČNADOKUMENTACIJSKAINFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualništampanimaterijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Ivana Bajkin
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Prof. dr Milica Medić-Stojanoska Prof. dr Nataša Milić
Naslov rada: NR	Uticaj estara ftalne kiseline na tiroidnu funkciju
Jezik publikacije: JP	srpski
Jezik izvoda: JI	srp. / eng.
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2016.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	21 000 Novi Sad, Hajduk Veljkova 3

Fizički opis rada: FO	(broj poglavlja 9/ stranica 135 / slika 8/ grafikona 8/tabela 71/ referenci 251/ priloga 4)
Naučna oblast: NO	Medicina
Naučna disciplina: ND	Endokrinologija
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Endokrini disruptori; Ftalne kiseline; Dietilheksil ftalat; Dibutil ftalat; Tiroidna žlezda; Gojaznost; Faktori vezani za pol; Izloženost spoljšnjim faktorima; Testovi tiroidne funkcije; Tirotropin; Tiroksin
UDK	616.441-008:547.584
Čuva se: ČU	U biblioteci Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, Hajduk Veljkova 3
Važna napomena: VN	

<p>Izvod: IZ</p>	<p>Uvod: Poslednjih godina u fokusu istraživača je efekat sintetskih jednjenja na endokrini sistem. Estri ftalne kiseline se koriste u procesu plastifikacije, kao industrijski rastvarači, lubrikanti, aditivi u tekstilnoj industriji, u pesticidima, kozmetičkim proizvodima. Raste broj dokaza da je tiroidna žlezda podložna dejstvu endokrinih disruptora. Tiroidni hormoni imaju važnu ulogu u regulaciji rasta, tkivne diferencijacije, energetskog metabolizma, reprodukcije i formiranja centralnog nervnog sistema. Brojna istraživanja ukazala su da ftalati deluju kao EDs. Ciljevi istraživanja: 1. Procena izloženosti populacije mono-etilheksil-ftalatu (MEHP) i mono-etil-ftalatu (MEP). 2. Evaluacija razlika u nivou pokazatelja tirodine funkcije između ftalat pozitivnih i ftalat negativnih ispitanika i između gojaznih i normalno uhranjenih ftalat pozitivnih ispitanika. 3. Utvrđivanje razlika u serumskom nivou leptina gojaznih ispitanika sa i bez pozitivnih ftalatnih metabolita i procena povezanosti leptina sa MEP i MEHP i pokazateljima tiroidne funkcije. Izbor ispitanika i metod rada: Istraživanje je sprovedeno kao studija preseka, obuhvatilo je 201 ispitanika. Ispitanici su podeljeni u grupu MEP/MEHP pozitivnih i negativnih i na podgrupe normalno uhranjenih i gojaznih. Od antropometrijskih mera određena je telesna visina, telesna masa, obim struka i indeks telesn mase. Laboratorijske analize: jutarnji uzorak urina za određivanje MEP i MEHP; našte uzet uzorka venske krvi za FT4, FT3, TSH i leptin. Statistička analiza sprovedena je na softverskom paketu SPSS. Rezultati: Polovina stanovništva je izložena</p>
----------------------	--

	<p>ftalatima. MEP dovodi do povišenja FT4 samo u subpopulaciji gojaznih. Nije utvrđen statistički značajan uticaj MEP na FT3. Kod gojaznih MEP pozitivnih osoba ženskog pola povišen je TSH. MEHP uzrokuje sniženje FT4 kod normalno uhranjenih ispitanika, a kod normalno uhranjenih muškaraca snižava FT3. Nije utvrđen uticaj MEHP na tirotropin. U gojaznih nije ustanovljen uticaj DEHP i DEP na leptinsku sekreciju. Uočena je tendencija negativne korelacije leptina i FT4 kod gojaznih, dok uticaja na FT3 i TSH nema. Zaključak: Naša populacija je u velikoj meri izložena ftalatima. Potvrđeno je da MEP i MEHP imaju uticaj na pojedine indikatore tiroidne funkcije. Ftalati u našem istraživanju ne uzrokuju poremećaj leptinske sekrecije, a leptin ima blag uticaj jedino na FT4.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	17.11.2015.
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<p>predsednik: član: član: član: član:</p>
---	--

University of NoviSad  
ACIMSI  
Key word documentation

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD thesis
Author: AU	Ivana Bajkin
Mentor: MN	Prof. dr Milica Medić-Stojanoska Prof. dr Nataša Milić
Title: TI	The influence of phthalic acid esters on thyroid function
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	eng. / srp.
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2016.
Publisher: PU	Author`s reprint
Publication place: PP	21 000 Novi Sad, Serbia, Hajduk Veljka 3

Physical description: PD	(number of chapters 9/ pages 135/ pictures 8/ tables 71/ graphs 8/ citations 251/ supplements 4)
Scientific field SF	Medicine
Scientific discipline SD	Endocrinology
Subject, Key words SKW	Endocrine Disruptors; Phthalic Acids; Diethylhexyl Phthalate; Dibutyl Phthalate; Thyroid Gland; Obesity; Sex Factors; EnvironmentalExposure; Thyroid Function Tests; Thyrotropin; Thyroxine
UC	616.441-008:547.584
Holding data: HD	Library of Medical Faculty Novi Sad, Hajduk Veljkova 3
Note: N	
Abstract: AB	<p>Introduction: Effects of synthesized chemicals on endocrine system has been in the focus in the last years. Phthalates are used in plasticization, as industrial solvents, lubricants, textile industry additives, in pesticides and cosmetic products. Evidence for thyroid disruption is growing. Thyroid hormones (TH) have an important role in regulation of growth, tissue differentiation, energy metabolism, reproduction and central nervous system formation. Studies show phthalates can cause endocrine disruption.</p> <p>Aims: 1. Estimation of burden of monoethyl phthalate (MEP) and di-2-ethylheksyl phthalate(MEHP) in the population. 2. Evaluation of differences in TH and TSH in MEP/MEHP positive and negative participants, as in obese and lean MEP/MEHP positive participants. 3. Evaluation of differences in leptin in obese MEP/MEHP positive and negative subjects and evaluation of the connection between leptin, MEP, MEHP and thyroid indicators. Patients and methods: This was a cross-</p>



	<p>sectional study that comprised 201 subjects divided into MEP/MEHP positive and negative group, further subdivided in obese and lean. Anthropometric parameters done: body height, body weight, waist and body mass index. Laboratory tests done: morning urine sample analysis for MEP/MEHP and venous sample analysis for free thyroxine (FT4), free tri-iodothyronine (FT3), thyroid stimulating hormone (TSH) and leptin. Statistical analysis was done in SPSS. Results: Half of subjects were exposed to phthalates. MEP induced an increase in FT4 in obese participants and had no influence on FT3. TSH was increased in obese MEP positive female subjects. MEHP induced a decrease in FT4 in lean participants and a decrease of FT3 in lean males. There was no correlation between MEHP and TSH. Influence of MEP/MEHP on leptin secretion. A tendency for negative correlation between leptin and FT4 was seen. There was no influence of leptin on FT3 and TSH. Conclusion: Our population is greatly exposed to phthalates. MEP and MEHP influence certain thyroid indicators i.e. cause thyroid disruption. Phthalates do not influence leptin secretion in our study. There is a mild effect of leptin on FT4.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	November 17 <sup>th</sup> 2015
Defended: DE	

Thesis Defend Board:  
DB

president:  
member:  
member:  
member:  
member:

*Beskrajno se zahvaljujem svojim mentorima, **profesorki Milici Medić-Stojanoski i profesorki Nataši Milić**, na pomoći u vezi sa izborom teme istraživanja i izradom doktorske disertacije, na velikoj podršci, bodrenju, nesebično podeljenom znanju i strpljenju.*

*Zahvaljujem se **lekarskom i sestrinskom kolektivu** Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma na pomoći i razumevanju. Posebno se zahvaljujem **profesorki Branki Kovačev-Zavišić** na podršci koju mi je pružala od mog prvog radnog dana, na znanju koje je nesebično prenela na mene i na slobodi izbora koju mi je dozvolila. Želela bih da se zahvalim i sestrama **Driti Škrbić i Zorici Farago** na trudu koji su uložile prilikom obrade ispitanika za naše istraživanje.*

*Zahvaljujem se **docentu Petru Čoloviću** na velikoj pomoći i strpljenju prilikom statističke obrade podataka.*

*Zahvaljujem se **MamiiTati** jer su mi dali krila i naučili me da stremim ka zvezdama. Zahvaljujem se **mojoj Duški** jer me čini boljim čovekom.*

*Zahvaljujem se svojoj porodici, **Hani, Petri i Banetu**, jer mi svakodnevno iznova pokazuju da je moguće živeti u bajci.*

*Autor*

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Tiroidna funkcija.....	1
1.1.1. Hipotalamo-hipofizno-tiroidosovina.....	1
1.1.2. Tiroidni hormoni.....	1
1.1.3. Uloga tiroidnih hormona.....	2
1.1.4. Tiroidni hormoni i energetska homeostaza.....	2
1.1.5. Uloga leptina u funkcionisanju hipotalamo-hipofizno-tiroidne osovine..	4
1.1.6. Tiroidna disfunkcija.....	5
1.1.7. Etiologija tiroidne disfunkcije.....	5
1.2. Endokrina disrupcija.....	6
1.2.1. Definicija endokrine disrupcije.....	6
1.2.2. Endokrini disruptori.....	7
1.2.3. Mehanizam dejstva endokrinih disruptora.....	8
1.2.4. Karakteristike dejstva Eds.....	11
1.2.5. Toksikološki aspekti endokrine disrupcije.....	12
1.2.6. Klinički aspekti.....	12
1.2.7. Tiroidna disfunkcija i Eds.....	12
1.2.7.1. Uticaj ftalata na tiroidnu funkciju.....	13
1.2.8. Uticaj EDs na serumski nivo leptina.....	15
1.3. Estri ftalne kiseline (ftalati).....	15
1.3.1. Najčešće zastupljeni ftalati.....	15
1.3.2. Industrijska proizvodnja ftalata.....	16
1.3.3. Fizičko-hemijske karakteristike ftalata.....	16
1.3.4. Metabolizam ftalata.....	18
1.3.5. Dietil-heksil-ftalat.....	20
1.3.6. Di-iso-nonil-ftalat.....	21
1.3.7. Prisustvo ftalata u biološkim uzorcima.....	22
1.3.8. Putevi izloženosti ftalatima.....	24

1.3.8.1.	Ingestija.....	24
1.3.8.2.	Inhalacija.....	24
1.3.8.3.	Intravenski.....	25
1.3.8.4.	Transdermalno.....	25
1.3.9	Uticaj ftalata na zdravlje.....	26
2.	CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA.....	28
2.1.	Ciljevi istraživanja.....	28
2.2.	Hipoteze istraživanja.....	29
3.	NAUČNA I DRUŠTVENA OPRAVDANOST ISTRAŽIVANJA.....	30
4.	MATERIJAL I METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA.....	31
4.1.	Izbor ispitanika.....	31
4.2.	Kriterijumi za uključivanje u ispitivanje.....	31
4.3.	Kriterijumi za isključivanje iz ispitivanja.....	31
4.4.	Podela ispitanika po grupama.....	32
4.5.	Plan istraživanja.....	32
4.6.	Laboratorijske analize.....	33
4.6.1.	Uzorak urina.....	33
4.6.2.	Određivanje serumskog nivoa FT4, FT3, TSH.....	34
4.6.3.	Određivanje serumskog nivoa leptina.....	34
4.7.	Statistička obrada podataka.....	35
5.	REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	36
5.1.	Polna i starosna struktura ispitanika.....	36
5.2.	Prisutnost monoestar ftalatnih metabolita u urinu.....	36
5.3.	Antropometrijski parametri u ispitivanim grupama.....	40
5.3.1.	Antropometrijski parametri u grupama MEP i MEHP pozitivnih i negativnih ispitanika.....	40
5.3.2.	Antropometrijski parametri u podgrupama normalno uhranjenih i gojaznih MEP pozitivnih i negativnih ispitanika.....	41
5.3.3.	Antropometrijski parametri u podgrupama normalno uhranjenih i gojaznih MEHP pozitivnih i negativnih ispitanika.....	41
5.4.	Polna raspodela i koncentracija MEP i MEHP.....	42

5.4.1.	Koncentracija MEP/MEHP u urinu na celokupnom uzorku.....	43
5.4.2.	Koncentracija MEP/MEHP u urinu u podgrupama muškaraca i žena.....	43
5.5.	Razlike u serumskom nivou FT4, FT3 i TSH u kategorijama MEP pozitivnih i negativnih ispitanika.....	44
5.5.1.	Vrednosti FT4, FT3 i TSH u grupama MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika.....	45
5.5.2.	Serumski nivo FT4, FT3 i TSH u grupama MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika.....	46
5.6.	Razlike u serumskom nivou FT4, FT3 i TSH u ukrštenim kategorijama gojaznih i normalno uhranjenih MEP pozitivnih i negativnih ispitanika.....	48
5.6.1.	T-test za nezavisne uzorke u ukrštenim kategorijama gojaznih i normalno uhranjenih MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika.....	48
5.6.2.	Neparametrijski testovi u ukrštenim kategorijama gojaznih i normalno uhranjenih MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika.....	49
5.7.	Razlike u serumskom nivou FT4, FT3 i TSH u podgrupama gojaznih i normalno uhranjenih MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika.....	51
5.7.1.	T-testovi za nezavisne uzorke u ukrštenim kategorijama gojaznih i normalno uhranjenih MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika...	51
5.7.2.	Neparametrijski testovi u ukrštenim kategorijama gojaznih i normalno uhranjenih MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika.....	52
5.8.	Relacije ftalata, pola, BMI, FT3, FT4 i TSH: složeniji modeli odnosa.....	54
5.8.1.	Relacije MEP, pola, BMI i pokazatelja tiroidne funkcije.....	54
5.8.1.1.	Relacije MEP, pola, BMI i FT4.....	54
5.8.1.2.	Relacije MEP, pola, BMI i FT3.....	57
5.8.1.3.	Relacije MEP, pola, indeksa telesne mase i TSH.....	59
5.8.1.4.	Nivo TSH u odnosu na interakciju pola, BMI i MEP.....	61
5.8.2.	Relacije MEHP, pola, BMI i pokazatelja tiroidne funkcije.....	63
5.8.2.1.	Relacije MEHP, pola, BMI i FT4.....	63
5.8.2.2.	Interakcija MEHP i indeksa telesne mase: Pirsonov i neparametrijski koeficijenti korelacije između MEHP i FT4 u kategorijama gojaznih i normalno uhranjenih ispitanika.....	65

5.8.2.3.	Relacije MEHP, pola, BMI i FT3.....	66
5.8.2.4.	Relacije MEHP, pola, BMI i TSH.....	69
5.9.	Korelacije leptina sa estrima ftalne kiseline i pokazateljima tiroidne funkcije.....	72
5.9.1.	Razlike u serumskom nivou leptina između MEP pozitivnih i MEP negativnih gojaznih ispitanika.....	72
5.9.2.	Razlike u serumskom nivou leptina između MEHP pozitivnih i MEHP negativnih gojaznih ispitanika.....	73
5.9.3.	Uticaj leptina na serumski nivo FT4, FT3 i TSH kod gojaznih MEP pozitivnih ispitanika.....	75
5.9.4.	Uticaj leptina na serumski nivo FT4, FT3 i TSH kod gojaznih MEHP pozitivnih ispitanika.....	76
6.	DISKUSIJA.....	77
6.1.	Uvod u problem.....	77
6.1.1.	Ekonomski aspekt dejstva EDs.....	78
6.1.2.	Estri ftalne kiseline.....	78
6.2.	Diskusija materijala i metoda.....	79
6.2.1.	Biološki materijal.....	79
6.2.2.	Pojedinačni uzorak urina nasuprot ukupnog 24h uzorka urina.....	79
6.2.3.	Ukupne nasuprot slobodnih frakcija ftalatnih metabolita.....	80
6.2.4.	Monoestar i oksidovani DEHP metaboliti.....	81
6.2.5.	Diskusija statističkih metoda.....	81
6.2.5.1.	Normalizacija statističkih podataka po Rankitovoj formuli u pripremi za t-testove.....	81
6.2.5.2.	Dodatni statistički testovi: hijerarhijske linearne multiple regresione analize: relacije ftalata, pola, BMI, FT3, FT4 i TSH: složeniji modeli odnosa.....	82
6.3.	Diskusija rezultata istraživanja.....	83
6.3.1.	Pozitivnost ftalatnih metabolita u urinu.....	83
6.3.2.	MEP i antropometrijski parametri.....	86
6.3.3.	MEHP i antropometrijski parametri.....	86
6.3.3.1.	Ftalati i gojaznost.....	87

6.4.	Ispitivanje uticaja estara ftalne kiseline na FT4, FT3 i TSH.....	89
6.4.1.	Serumski nivo FT4, FT3 i TSH u grupama MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika.....	89
6.4.2.	Serumski nivo FT4, FT3 i TSH u grupama MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika.....	90
6.5.	Uticaj indikatora tiroidne funkcije i ftalata na leptinsku sekreciju.....	95
6.5.1.	Uticaj FT4, FT3 i TSH na leptinsku sekreciju.....	95
6.5.2.	Uticaj ftalata na leptinsku skereciju.....	97
7.	ZAKLJUČAK.....	99
8.	LITERATURA.....	101
9.	PRILOZI.....	122
9.1.	Prilog 1.....	124
9.2.	Prilog 2.....	127
9.3.	Prilog 3.....	132
9.4.	Prilog 4.....	134



## 1. UVOD

### 1.1. Tiroidna funkcija

U poslednjih dvadesetak godina u fokusu istraživača je efekat sintetskih jedinjenja na endokrini sistem, posebno na homeostazu estrogena i androgena. Međutim, značajno se u savremenoj literaturi povećava broj dokaza, posebno na osnovu studija na životinjama i *in vitro* studija, da je i tiroidna žlezda podložna dejstvu endokrinih disruptora (EDs).

#### 1.1.1. Hipotalamo-hipofizno-tiroidna osovina

Funkciju tiroidnog sistema reguliše hipotalamusno-hipofizna jedinica (1). Tirotropin rilizing hormon (TRH) proizvode hipofizeotropni neuroni hipotalamusa, lokalizovani u medijalnim i periventrikularnim parvocelularnim subdivizijama paraventrikularnih jedara hipotalamusa (2). TRH kontroliše sintezu i sekreciju tirostimulišućeg hormona-tirotropina (TSH) iz hipofize (1, 2). TSH preko svojih receptora na štitastoj žlezdi dovodi do produkcije i oslobađanja tiroidnih hormona (TH), T4 i T3, koji svoj uticaj na hipotalamus i hipofizu u regulaciji sekrecije ispoljavaju preko negativne povratne sprege (1, 3, 4).

#### 1.1.2. Tiroidni hormoni

Oko 80% T3 nastaje perifernom konverzijom T4 pod dejstvom jodotironin dejodinaza (DIOs) koje time dobijaju presudnu ulogu u modifikovanju fizioloških efekata TH (1). Sama tiroidna žlezda odgovorna je za oko 20% produkcije T3 (5). Poluživot T4 je 7–10 dana, što je značajno duže u odnosu na T3 i posledica je vezanosti T4 u serumu za albumin i specifične proteine: tiroksin-vezujući globulin (TBG) i transtiretin (TTR) (1). TH se kroz plazmatsku membranu transportuju visokospecifičnim transporterima: monokarboksilat transporter 8 (MCT8) monokarboksilat transporter 10 (MCT10) i organski anjon-transportujući peptid 1c1 (OATP 1c1) (6). Eliminacija TH odigrava se preko konjugacije sa glukuronskom kiselinom (7). Pri ulasku u ćeliju, TH se vezuju za tiroidni receptor (1, 7, 8). Nuklearni tiroidni receptor, transkripcioni

faktor koji se vezuje za specifičnu sekvencu nukleotida poznatu kao TSH reagujući element (TRE) i pojavljuje se kao homo ili heterodimer sa retinoidnim X-receptorom, vezuje se za specifičnu proteinsku sekvencu (korepresori ili ko-aktivatori) i reguliše transkripciju ciljnih gena (7, 8). Tipično za tiroidne hormone je uglavnom konstantna serumska koncentracija, što održava metaboličke procese na adekvatnom nivou (9). Ipak, postoji fiziološka regulacija nivoa TH prilikom prelaska iz stanja sitosti u stanje gladi uz posledično smanjenje upotrebe depoa energije (9).

### *1.1.3. Uloga tiroidnih hormona*

Zdravlje svakog organa i tkiva zahteva očuvanu optimalnu funkciju hipotalamo-hipofizno-tiroidne osovine, a ometanje ove funkcije ima negativan uticaj na neurološki i na fizički razvoj dece, kao i na homeostazu celokupnog organizma kod odraslih (1). TH imaju presudnu ulogu u regulaciji rasta, tkivne diferencijacije, energetskog metabolizma, reprodukcije i formiranja centralnog nervnog sistema (1, 5, 9).

### *1.1.4. Tiroidni hormoni i energetska homeostaza*

Tiroidni hormoni učestvuju u održavanju energetske homeostaze u smislu regulacije unosa i potrošnje energije, međutim, vrlo malo se zna o mehanizmima koji su za to odgovorni (10). Dobro je poznato da hipertiroidizam dovodi do gubitka, a hipotiroidizam do povećanja telesne mase, ali je sama tiroidna funkcija u gojaznosti nedovoljno rasvetljena (5). Kako raste prevalencija gojaznosti širom sveta, tako rastu i saznanja u vezi sa patogeneom i metaboličkim komplikacijama gojaznosti (5). Pokazano je da belo masno tkivo, za koje se dugo mislilo da je najveći, ali inertni depo energije, aktivno produkuje hormone, citokine i hemokine koji utiču na homeostazu tiroidnih hormona (11, 12). Telesna masa je posledica odnosa unosa energije i njene potrošnje, dok je potrošnja energije zavisna od fizičke aktivnosti i potrošnje energije u stanju mirovanja (5). Tiroidni hormoni mogu da moduliraju mnoge metaboličke puteve važne za bazalni nivo metabolizma: sintezu adenzin-tri-fosfata (ATP), fluks jona pri potrošnji ATP-a, nivo aktivnosti kinaza i efikasnost metaboličkih procesa niže od mitohondrija (13). Najbolje rasvetljen primer uticaja nivoa tiroidnih hormona na potrošnju energije je adaptivna termogeneza (13, 14).

Na studijama sprovedenim na malim sisarima pokazano je da simpatička adrenergička stimulacija smeđeg masnog tkiva indukuje proizvodnju specifičnog proteina: *uncoupling protein -1 (UCP-1)*, koji odvaja mitohondrijalni protonski gradijent od sinteze ATP-a i time stimuliše stvaranje toplote (14). Ključnu ulogu ima DIO2, tako što promoviše lokalnu intraćelijsku proizvodnju T3 od T4, pa se pri izlaganju hladnoći saturacija tiroidnog receptora povećava sa oko 70% na skoro 100%, a da istovremeno nema značajne promene u serumskom nivou T3 (5, 15). Ovaj mehanizam oslikava i molekularne odnose između adrenergičke signalne kaskade i dejstva TH, koji su važni i za termogene i za netermogene efekte TH (16, 17). Pretpostavka je da je ekvivalent smeđem masnom tkivu kod malih sisara skeletni sistem kod ljudi, kao tkivo sa dovoljnom masom, inervacijom i metaboličkom aktivnošću (5). Nekoliko studija je pokazalo da je za varijacije u stepenu bazalnog metabolizma kod zdravih ljudi odgovorno gotovo samo skeletno mišićno tkivo, a istovremeno postoje i nezanemarljivi podaci koji ukazuju na značajnu ulogu T3 u obligatornoj termogenezi u skeletnoj muskulaturi (18). Značajni su i T3 zavisni procesi u drugim tkivima. Denfort i Burger su dokazali da je za rad srca potrebno oko 15% ukupne potrošnje energije u mirovanju (19). Takođe, značajan deo energije mirovanja troši se na T3 posredovan metabolizam masnih kiselina i T3 posredovan utrošak energije u jetri, bubregu i drugim tkivima (13, 19, 20).

S obzirom na navedene dokaze o ulozi TH na potrošnju energije u mirovanju, ne iznenađuje činjenica da pacijenti sa tiroidnom disfunkcijom ispoljavaju promene u telesnoj masi, termogenezi i lipolizi i masnom tkivu: hipotiroidizam dovodi do uvećanja telesne mase, slabljenja termogeneze i smanjenja nivoa bazalnog metabolizma, a hipertiroidizam je praćen gubitkom na telesnoj masi uprkos pojačanom apetitu (5). Iako je kod većine gojaznih pacijenata tiroidna funkcija uredna, dokazana je pozitivna korelacija indeksa telesne uhranjenosti (BMI) i TSH, a nekoliko studija je jasno isključilo klinički relevantan hipotiroidizam kod gojaznih pacijenata sa umereno povišenim TSH (21, 22). Postoji više pretpostavki za umereno povišen nivo TSH u gojaznosti (5):

- a) supklinički hipotiroidizam,
- b) poremećaj u funkciji hipotalamo-hipofizno-tiroidne osovine,
- c) rezistencija na tiroidne hormone i
- d) adaptivni proces radi povećanja potrošnje energije.

Umereno povišen nivo TSH u gojaznosti nije praćen promenama u serumskom nivou slobodnog T4 (FT4) i ukupnog T4 (TT4) i nivo FT4 i TT4 kod gojaznih pacijenata je komparabilan sa nivoom kod normalno uhranjenih (22, 23). Objavljena je i studija de Pergole i saradnika čiji rezultati govore za snižen nivo FT4 u populaciji gojaznih ispitanika tj. za negativnu korelaciju BMI i obima struka, najverovatnije zbog promena u aktivnosti DIOs (22–24). Međutim, nivo slobodnog (FT3) i ukunog T3 (TT3) raste u gojaznosti paralelno sa promenama u nivou TSH (22, 25, 26). Serumski nivo FT3 je kod gojaznih osoba povišen zbog promena u monodejodaciji, jer je smanjena produkcija reverznog T3 (rT3) (27, 28). Navedene promene imaju za posledicu povišenje nivoa FT3 i TT3 na gornju granicu referentnih vrednosti ili tek nešto malo iznad normale, što ipak dovodi do povećanja potrošnje energije (5, 27). Nivo bazalnog metabolizma, ukupna potrošnja energije i potrošnja energije u snu pozitivno koreliraju sa nivoom TT3 i FT3, te se smatra da su promene u nivou TSH, TT3 i FT3 u gojaznosti adaptacija na povećanu telesnu masu, jer povećanje potrošnje energije redukuje raspoloživost energije za konverziju u masno tkivo (5, 29). Smanjenje serumske koncentracije TSH za 1 IU/l u okviru referentnih vrednosti, dovodi do smanjenja potrošnje energije za oko  $75 \pm 150$  kcal/dan, što korelira sa  $8 \pm 17$  g deponovane masti, tj. nekoliko kilograma tokom godinu dana (30).

#### *1.1.5. Uloga leptina u funkcionisanju hipotalamo-hipofizno-tiroidne osovine*

Fiziološki mehanizmi koji povezuju gojaznost i promene u serumskom nivou pokazatelja tiroidne funkcije nisu u potpunosti rasvetljeni. Smatra se da bi leptin mogao biti veza između telesne uhranjenosti i TH (5). Leptin je hormon od 16 kDa koga uglavnom produkuju adipociti, a cirkulišući nivo leptina proporcionalan je ukupnoj masnoj masi tela (5). Nivo leptina menja se u skladu sa telesnom uhranjenosti isto kao i TSH: nivo leptina povišen je u gojaznih osoba (31). Neki autori navode da leptin utiče na hipotalamusnu produkciju TSH (32). Takođe, dokazano je da leptin i TSH imaju gotovo identičan cirkadijalni ritam i da je deficijencija leptina povezana sa disregulacijom pulsatilnih i cirkadijalnih ritmova TSH sekrecije, što takođe ukazuje da bi leptin mogao biti jedan od faktora koji regulišu sekreciju TSH (32,33). U zavisnosti od energetskeg statusa, leptin može i da modifikuje aktivnost DIOs u raznim tkivima (34, 35). Pokazano je da leptin deluje stimulatorno na hipotalamo-hipofizno-tiroidnu osovinu jer injekciono davanje leptina može da poništi efekte koje redukcija telesne mase ima na tiroidni status (23).

### 1.1.6. Tiroidna disfunkcija

Tiroidna disfunkcija je vrlo česta. Incidencija i hiper i hipotiroidizma povećava se sa starenjem, a žene oboljevaju dva do osam puta češće (36). Epidemiološki podaci Flina i saradnika za Škotsku, koji su primenjivi na opštu populaciju, ukazuju na incidenciju primarnog hipotiroidizma od 4.98 na 1 000 osoba ženskog pola godišnje i 0.88 na 1 000 osoba godišnje kod osoba muškog pola (36). Kombinovana incidencija primarnog hipotiroidizma za oba pola u ovoj studiji je 2.97/1 000 osoba godišnje (36). Vikam (*Wickham*) studija prijavljuje incidenciju primarnog hipotiroidizma od 3.5/1 000 osoba ženskog pola godišnje i 0.6/1 000 osoba godišnje kod muškaraca (37). Za primarni hipertiroidizam incidencije su prema Flinu i saradnicima 0.77/1 000 osoba godišnje kod žena i 0.14/1 000 osoba godišnje kod muškaraca (36). Centralni hipotiroidizam je redak uzrok tiroidne hipofunkcije sa incidencijom 1:80 000 do 1:120 000 (38). TSH sekretujućí tumori hipofize koji dovode do centralnog hipertiroidizma su izuzetno retki (sveukupna incidencija hipofiznih tumora je, u zavisnosti od godina života i pola, 0.5–7.4 na 100 000 stanovnika godišnje) (39). Autoimuna tiroidna bolest je najčešći autoimuni poremećaj (40). U najvećem broju slučajeva manifestuje se kao Hašimotov tiroiditis sa procenjenom godišnjom incidencijom širom sveta na 0.3–1.5/1 000 osoba godišnje (40).

### 1.1.7. Etiologija tiroidne disfunkcije

Hipertiroidizam nastaje ili kao posledica endogene hiperprodukcije TH ili jatrogeno, tj. primenom levotiroksina u okviru supstitucione terapije ili primenom lekova sa potencijalom da izazovu tiroiditis (amiodaron, litijum itd.) (36). Najčešći endogeni uzrok je Grejvsova bolest (autoimuna tiroidna bolest (AITD)), toksična multinodusa struma, toksični adenom i tiroiditis (36, 39). Centralni hipertiroidizam zbog TSH sekretujućeg adenoma hipofize izuzetno je redak (39). Jatrogena pojačana funkcija štitaste žlezde u supkliničkoj ili manifestnoj formi javlja se zbog prekomerne doze levotiroksina kod pacijenata sa hipotiroidizmom, ili u okviru lečenja pacijenata sa karcinomom ili nodusom tiroidee (36, 39).

Hašimotov limfocitni tiroiditis je vodeći uzrok primarnog hipotiroidizma (39, 40). Centralno uzrokovana hipofunkcija je značajno ređa i posledica je lezije hipofize ili hipotalamusa (39). Kao i hipertiroidizam, hipotiroidizam može nastati jatrogeno: nakon terapije radioaktivnim jodom, primenom lekova tipa litijuma ili amiodarona. (39, 41).

## **1.2. Endokrina disrupcija**

### *1.2.1. Definicija endokrine disrupcije*

Endokrini sistem podrazumeva nekoliko različitih hormonskih sistema u organizmu sisara: tiroidne hormone, hormone pankreasa, jajnika, testisa, adrenalnih žlezda i mozga (42). Interferencija egzogene supstance sa endokrinim sistemom je poznata kao endokrina disrupcija, a same supstance koje imaju mogućnost da remete funkciju endokrinog sistema nazivaju se endokrinim disruptorima (EDs) (42, 43). Nijedan endokrini sistem nije imun na dejstvo EDs, jer EDs imaju sličnu hemijsku strukturu, receptore i enzime kao i hormoni (42).

Prema Evropskom društvu endokrinologa (ESE), EDs su supstance, prirodne ili sintetske, koje mogu, ukoliko im je jedinka izložena, da menjaju i remete hormonske homeostatske sisteme (44). Postoji više definicija EDs, od kojih su neke sveobuhvatnije od prethodno navedene:

Weybridge 1996, Evropska Agencija za Bezbednost Hrane (EFSA 2013):

EDs su egzogene supstance koje uzrokuju neželjene efekte po zdravljes promenama u endokrinom sistemu u intaktnom organizmu ili njegovom potomstvu (45, 46).

Internacionalni program za hemijsku bezbednost Svetske zdravstvene organizacije (WHO/IPCS, 2002):

Endokrini disruptor je egzogena supstanca ili smeša supstanci koje menjaju funkciju endokrinog sistema i izazivaju neželjene efekte na zdravlje u intaktnim organizmima i/ili potomstvu ili (sub)populaciji (47).

Agencija za zaštitu okoline Sjedinjenih Američkih država (US EPA), 2012:

EDs su egzogene supstance koje ometaju produkciju, oslobađanje, metabolizam, vezivanje, dejstvo i/ili eliminaciju hormona koji su odgovorni za održavanje homeostaze i razvojnih procesa (48).

Neželjenim efektom na zdravlje smatra se toksičnost tj. patomorfološki ili funkcionalni poremećaj (47,49). Prava EDs je samo ona supstanca koja uzrokuje toksičnost u intaktnom organizmu, a preko mehanizama sličnih hormonskim homeostatskim mehanizmima (49).

### 1.2.2. Endokrini disruptori

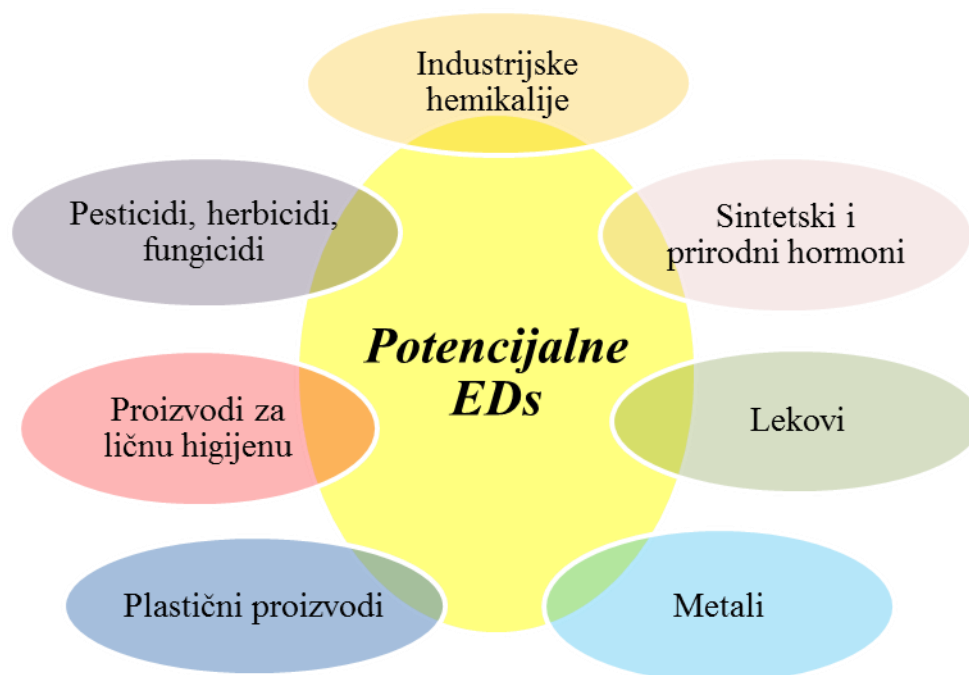
U Uvodu u Specijalno izdanje časopisa *General and Comparative Endocrinology* iz 2015. godine navodi se da se prilikom pretraživanja *Web of Science* indeksa od 1986. do kraja 2014. godine nalazi 15.959 publikacija na temu endokrine disrupcije (50). Ovaj podatak ukazuje na veliko interesovanje autora za oblast endokrine disrupcije. Masovna proizvodnja različitih supstanci koja prati industrijalizaciju dovela je do pojave hemijskih jedinjenja koja remete funkciju endokrinog sistema (51, 52-54). Kao EDs mogu da deluju i prirodna i veštački sintetisana jedinjenja iz okoline (prisutna u hrani, lekovima, građevinskom materijalu, kozmetičkim proizvodima, odeći, igračkama itd.), a obuhvataju široki spektar jedinjenja, od organohlornih pesticida, omekšivača plastike i same plastike, goriva, lubrikanata, rastvarača, fungicida, ftalata i mnogih drugih (Slika 1) (46-48, 51, 55). Zbog sveprisutnosti EDs i još neprepoznatih svih potencijalnih neželjenih efekata na zdravlje, kao i činjenice da mnogo supstanci sa svojstvom endokrine disrupcije još uvek nije otkriveno, pre desetak godina je sa radom započela NORMAN mreža tj. skup refrentnih laboratorija, istraživačkih centara i srodnih organizacija za monitoring emergentnih supstanci (56). Emergentne supstance su supstance detektovane u čovekovoј okolini čije ponašanje i toksikološki efekti nisu još rasvetljeni i koje trenutno nisu obuhvaćene programima rutinskog monitoringa na nivou Evropske unije, a ideja za ovakvo udruženje proizašla je iz potrebe za poboljšanjem razmene informacija u vezi sa emergentnim supstancama i postupcima za njihovo prepoznavanje i merenje (56, 57). Aktivnosti NORMAN mreže podrazumevaju identifikaciju potencijalne nove emergentne supstance i njenih efekata na ekosistem i ljudsko zdravlje (57). NORMAN lista emergentnih supstanci revidira se periodično (poslednji put u februaru mesecu 2016. godine) i, ukoliko postoje dokazi da određena supstanca izaziva neželjene efekte prevashodno poljudsko zdravlje, ali i na čitav ekosistem, svrstava se u grupu „prioritetnih supstanci“ što za sobom povlači postupke predviđene NORMAN Radnom grupom za prioritizaciju (56, 57).

Po svojoj strukturi supstance sa svojstvom endokrine disrupcije su različite. Uopšteno govoreći, postoje tri tipa (43, 58):

1. sintetski hormoni

(kojima se namerno remeti endokrini sistem, npr.  $17\alpha$ -etinil-estradiol);

2. prirodne supstance  
(npr. fitoestrogeni: genistein, kumesterol);
3. sintetska jedinjenja sintetisana u različite svrhe, koja nenamerno utiču na humani i životinjski endokrini sistem;



Slika 1. Izvori potencijalnih EDs (preuzeto i prilagođeno sa: [www.dnr.metrokc.gov/WTD/community.edc](http://www.dnr.metrokc.gov/WTD/community.edc))

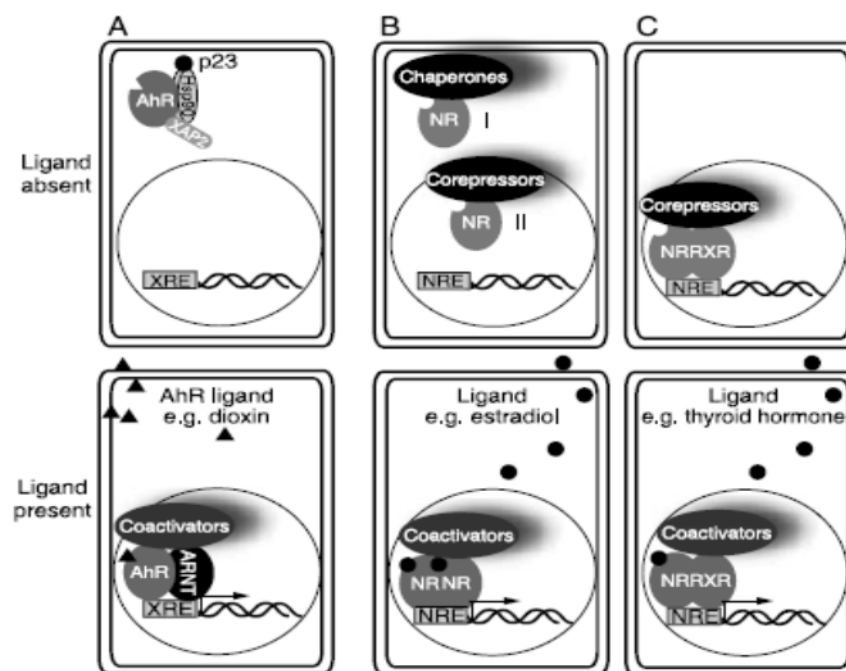
### 1.2.3. Mehanizam dejstva endokrinih disruptora

Savremena literatura navodi velik broj dokaza da EDs imaju nepovoljan uticaj na reproduktivni sistem, tiroidnu i neuroendokrinu funkciju, gojaznost i metabolizam, kao i na sekreciju insulina i homeostazu glukoze (59–62). EDs deluju, između ostalog, proestrogeno, antiandrogeno, zatim preko tiroidnog, retinoidnog, PPAR $\alpha$  i drugih nuklearnih receptora, steroidogenih enzima, receptora za neurotransmitere (58, 63, 64). Najviše informacija u vezi sa dejstvom EDs postoji za delovanje preko familije nuklearnih receptora (NRs), iako je uticaj EDs



na endokrini sistem moguće preko svakog postojećeg ćelijskog hormonskog puta (Slika 2 i 3) (63). NRs predstavljaju familiju strukturno povezanih transkripcionih faktora (65). U humanom svetu opisano je 48 NRs sa mogućnošću uticaja na sve vitalne funkcije: fetalni razvoj, homeostazu, reprodukciju, metabolizam, odgovor organizma na ksenobiotike (65). Hormonski receptori ove familije su steroidni, androgeni, progesteronski, glukokortikoidni, mineralokortikoidni i tiroidni hormonski receptori (63).

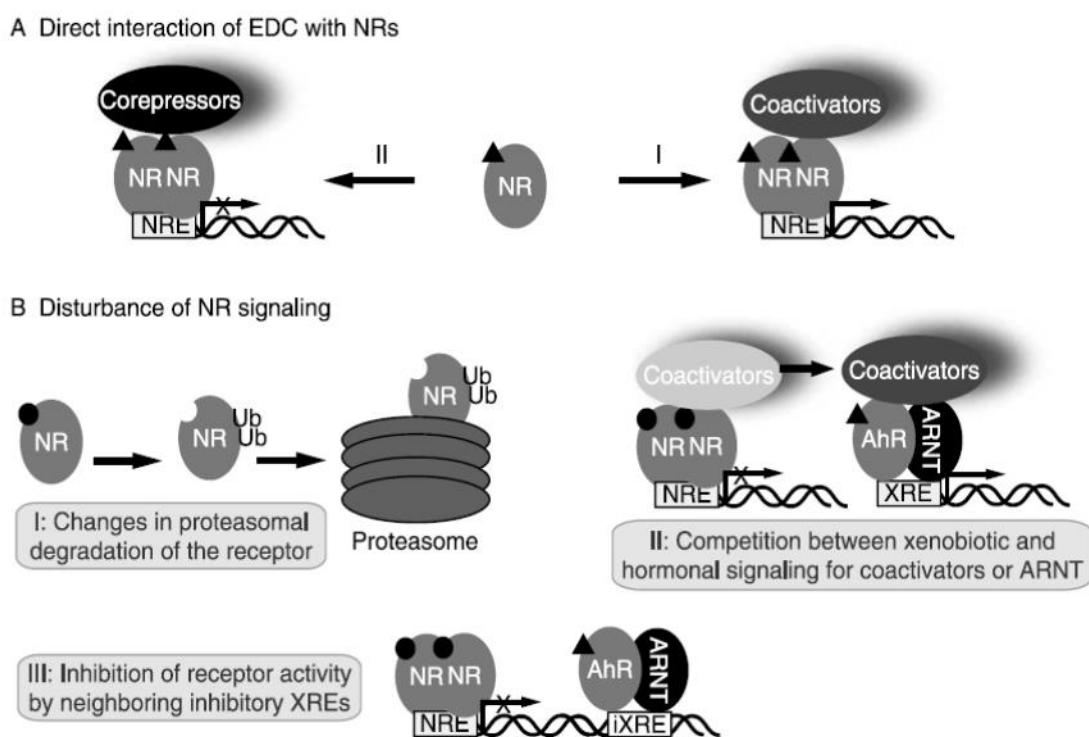
Pojedini EDs se vezuju direktno za ove NRs i deluju kao agonisti ili antagonisti tj. pojačavaju ili inhibišu hormonski efekat (58, 63, 65). Međutim, opisani su i drugi mehanizmi uticaja na endokrinu funkciju, a među njima je najvažniji mehanizam preko aril-hidrokarbonskog receptora (AhR) (66). Ovaj receptor pripada familiji bHLH-PAS proteina, a kao aktivatori AhR opisani su i endogeni faktori, ali i brojne EDs (63, 66).



Slika 2. Signalni putevi AhR i NRs; preuzeto od Svedenborga i saradnika 2009.(63)

Transkripciona aktivacija AhR i NRs su vrlo slične (Slika 2) (63). U koloni A Slike 2 prikazano je da je AhR u odsustvu liganda lokalizovan u citoplazmi u kompleksu sa pratećim molekulima. Nakon vezivanja liganda, AhR se translocira u nukleus gde formira kompleks sa

AhR nuklearnim translokatorom i koaktivatorima, vezuje se sa elementima ksenobiotika na DNA i indukuje transkripciju ciljnih gena (63, 67, 68). U koloni B Slike 2 opisana je aktivacija NRs. Naime, u odsustvu liganda NRs su ili u citoplazmi ili u nukleusu, vezani za prateće molekule ili korepresore (63). Vezivanje liganda dovodi do translokacije u nukleus i prevođenja korepresora u koaktivatore i vezivanja za NREs (*nuclear receptor response elements*) što dovodi do genske transkripcije (63). U koloni C iste slike može se uočiti da je tiroidni receptor vezan za DNA i u odsustvu liganda i tako sprečava ekspresiju ciljnog gena. Vezivanje liganda aktivira koaktivatore i gensku transkripciju (63).



Slika 3. Mehanizmi endokrine disrupcije; preuzeto od Svedenborga i saradnika 2009. (63)

A) Mnoge EDS imaju strukturu sličnu ligandima za NRs i direktno se vezuju za ove receptore, delujući kao agonisti ili antagonisti. (B) EDs mogu da utiču na receptorsku funkciju I: dovodeći do degradacije receptora, II: indukujući AhR signalni odgovor, III: vezujući se za AhR koji može da se veže za inhibitorni XRE u blizini NRE. (C) enzimi aktivirani AhR učestvuju u metabolizmu ksenobiotika, ali i u degradaciji npr. steroidnih hormona, pa indukcija ovih enzima dovodi da smanjene bioraspoloživosti endogenih hormona.

#### 1.2.4. Karakteristike dejstva EDs

Interesantna je činjenica da EDs ne moraju da imaju ništa slično međusobno u hemijskoj strukturi, do vrlo male molekulske mase, ispod 1000 Daltona, te je vrlo teško samo na osnovu hemijske strukture pretpostaviti da li će neko jedinjenje ispoljiti osobinu da remeti funkciju endokrinog sistema (43, 63).

Za delovanja EDs važno je sledeće:

a) uzrast prilikom izlaganja EDs

(posledice izlaganja odrasle jedinke dejstvu EDs se razlikuju u odnosu na posledice kod izlaganja fetusa ili deteta ovim supstancama, tako da su nastali termini „fetalna osnova adultne bolesti“ i „razvojna osnova adultne bolesti“ (43));

b) latentni period od momenta izlaganja

(kod EDs postoji značajan vremenski period između momenta delovanja i momenta manifestacije poremećaja (43));

c) značaj kombinacije EDs

(individue su, uglavnom, istovremeno izložene većem broju EDs iz okoline, čije dejstvo je najčešće aditivno ili sinergističko (43));

d) dinamika „doze i odgovora“

(i najmanja koncentracija EDs može uzrokovati poremećaj u radu endokrinog sistema, naročito ako deluje u kritičnom momentu razvoja organizma (69); kriva „doze i odgovora“ može imati nespecifičan oblik (70)) i

e) transgeneracijski, epigenetski efekti

(EDs utiču kako na samu izloženu inividuu, tako i na sledeće generacije; mehanizmi transmisije uključuju germinativne ćelije (71) i mogu biti i negonomske, tj. efekti se mogu prenositi ne preko mutacije DNA sekvence, nego modifikacijom faktora koji regulišu gensku ekspresiju tipa DNA metilacije ili acetilacije histona).

### 1.2.5. Toksikološki aspekti endokrine disrupcije

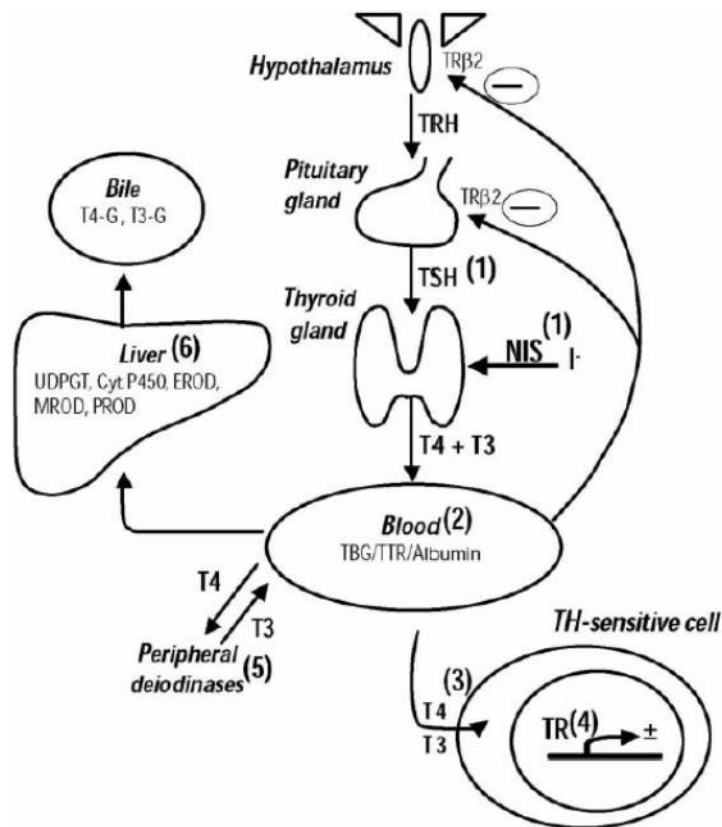
Istraživanja koja se bave endokrinom disrupcijom već desetinama godina dovode u pitanje tradicionalne koncepte toksikologije, posebno dogmu da „doza čini otrov“, jer EDs u malim dozama imaju efekte koje nije moguće predvideti poznatim efektima pri velikim dozama (72). Studije o EDs su pokazale da kriva „doza-odgovor“ nije linearna i da, najčešće, ima oblik slova U ili obrnutog slova U, kao i da može biti multifazna (72). Na osnovu ovakvih kriva, jasno je da poznavanje efekta pri jednoj dozi ne dozvoljava bilo kakve pretpostavke o efektu pri drugoj, manjoj ili većoj dozi (72).

### 1.2.6. Klinički aspekti

Sa kliničkog aspekta, endokrinolog se sreće sa mnogobrojnim izazovima u utvrđivanju uloge EDs kod endokrinoloških oboljenja jer je svaki pacijent izložen dejstvu specifične kombinacije poznatih i nepoznatih EDs (73). Dodatni problem se javlja jer postoje individualne razlike u metabolizmu i telesnom sastavu pacijenta, što utiče na poluživot, degradaciju i eliminaciju EDs iz organizma (43, 74). Podložnost dejstvu pojedinih EDs zavisi od genskog polimorfizma (43). Nekoliko epigenetskih mehanizama, uključujući metilaciju DNA, modifikaciju histona i ekspresiju mikroRNA, može da utiče na funkciju genoma pod egzogenim uticajima, a postoje i indikacije da epigenetske alteracije posreduju u toksičnosti EDs (43). Problem u utvrđivanju uzročno-posledične veze između EDs i endokrinološkog oboljenja stvara i latentni period od momenta dejstva EDs do pojave poremećaja (43, 74).

### 1.2.7. Tiroidna disfunkcija i EDs

Savremena literatura navodi sve više dokaza da tiroidna disfunkcija može biti posledica i dejstva EDs, između ostalih i ftalata (1, 43, 44, 50, 59). EDs mogu na različite načine uticati na tiroidnu homeostazu: na receptorskom nivou, vezivanjem za transportne proteine, preko modifikacije mehanizama ćelijskog preuzimanja ili metabolizma TH – Slika 4 (59).



Slika 4. Mogući mehanizmi dejstva EDs na hipotalamo-hipofizno-tiroidnu osovinu; preuzeto od Boasove i saradnika 2006. (59): (1) delovanje na natrijum-jod simporter (NIS), tiroidnu peroksidazu (TPO) ili tirotropin (TSH) receptor; (2) transportni proteini; (3) ćelijski mehanizmi preuzimanja; (4) TSH receptor; (5) jodotironin dejodinaze; (6) metabolizam TSH u jetri; TRH – tirotropin rilizing hormon

#### 1.2.7.1. Uticaj ftalata na tiroidnu funkciju

Izloženost ftalatima iz okoline je neizbežna i u stalnom porastu. U određenim populacijama, tipa hospitalizovanih neonatusa, izloženost je masivna i, pošto se javlja u vulnerabilnom periodu, može da izazove trajna oštećenja (75). Stručni paneli navode štetne reproduktivne i razvojne efekte pet ftalata (di-iso-decil-ftalat (DIDP), di-n-oktil-ftalat (DnOP),

di-n-heksil-ftalat (DnHP), di-iso-nonil-ftalat i di-2-etil-heksil-ftalat (DEHP)), međutim, malo studija se bavilo tiroidnom disrupcijom te, za sada, nije moguće izvući čvrste zaključke (76–82).

Dokazana je i antagonistička aktivnost ftalata u odnosu na tiroidne hormone kod vertebrata. Dodatno, ftalati inhibišu metamorfozu amfibija koja je posredovana tiroidnim hormonima (83). Studije na životinjama pokazuju i da ftalati indukuju oksidativni stres i peroksidaciju lipidne membrane kod embriona kao i da aktiviraju kompenzatorne antioksidativne mehanizme (54,84).

Studije na glodarima ukazuju na histopatološke promene na štitastoj žlezdi koje korespondiraju sa hiperaktivnošću nakon izlaganja DEHP, DnOP i DnHP (85–89). Nakon dugotrajne izloženosti DEHP u tiroidnoj žlezdi se pojavljuju bazofilni depoziti u koloidu uz povećanje lizozoma (85). Oralna primena DEHP kod pacova nije dovela do promene u nivou cirkulišućih TH, ali je intravenska izloženost DEHP u količini koja je prisutna u kesama za transfuzije krvnih derivata kod ljudi dovela do značajnog povišenja serumskog nivoa T3 i T4, što se normalizovalo nakon sedam dana (59, 85). Nasuprot ovome, di-n-butyl-ftalat (DBP) doznno zavisno snižava nivo T3 i T4 kod pacova (90).

Istraživanja na ovu temu na humanoj populaciji su malobrojna. Praćenje 19 adolescenata koji su u neonatalnom periodu bili izloženi vrlo visokim koncentracijama ftalata (ekstrakorporalna membranska oksigenacija (ECMO)) pokazalo je uredan nivo TH, mada je ovo rezultat koji nije reprezentativan jer se radi o vrlo kratkotrajnom izlaganju velikoj dozi ftalata (91, 92). Promene u nivou TH kao posledica izlaganja EDs mogu biti prolazne, ali su efekti na razvoj centralnog nervnog sistema trajni (1). Miker i saradnici pratili su urinarni nivo mono-etilheksil-ftalata (MEHP) i serumski nivo TSH, ukupnog T3 (TT3) i FT4 kod osoba muškog pola. Zaključak navedene studije ukazuje na postojanje negativne korelacije MEHP, TT3 i FT4 (93).

Veoma je važno napomenuti da deficijencija joda olakšava pojavu negativnih efekata EDs na tiroidnoj žlezdi, posebno u periodima vulnerabilnosti jedinke tokom rasta i razvoja ili oporavka od netiroidne bolesti (1).

### 1.2.8. Uticaoj EDs na serumski nivo leptina

EDs uticu i na nivo leptina što indirektno može dovesti do promena u tiroidnoj funkciji (9, 10, 23, 33–35). Boberg i saradnici su dokazali da prenatalna izloženost DiBP kao agonisti peroksizom proliferator aktivisanih receptora (PPARs) dovodi do značajnog sniženja nivoa leptina kod fetusa pacova (94). Takođe delujući preko PPARs, MEHP menja serumski nivo leptina i stimuliše adipogenezu (95).

## 1.3. Estri ftalne kiseline (ftalati)

### 1.3.1. Najčešće zastupljeni ftalati

Ftalati su dialkil ili alkil-aril estri 1,2-benzendikarboksilne kiseline (51). DEHP je glavni predstavnik ftalata i ujedno je i najbolje proučen (Slika 5). Ftalati se uglavnom koriste u procesu plastifikacije, kao industrijski rastvarači, lubrikanti, aditivi u tekstilnoj industriji, u pesticidima, u kozmetičkim proizvodima (dezodoransi, lakovi za kosu i nokte itd.) (51,96).

Najčešće upotrebljavani diestri ftalne kiseline i njihovi metaboliti su (74):

- |                                 |  |
|---------------------------------|--|
| ❖ Dimetil ftalat (DMP)          | Monometil ftalat (MMP)                         |
| ❖ Dietil ftalat (DEP)           | Monoetil ftalat (MEP)                          |
| ❖ Di-n-butil ftalat (DBP)       | Mono-n-butil ftalat (MBP)                      |
| ❖ Di-iso-butil ftalat (DiBP)    | Mono-iso-butil ftalat (MiBP)                   |
| ❖ Butil-benzil ftalat (BBzP)    | Mono-benzil ftalat (MBzP)                      |
| ❖ Di-2-etilheksil ftalat (DEHP) | Mono-2-etilheksil ftalat (MEHP)                |
|                                 | Mono-2-etil-5 hidroksiheksil ftalat (MEHHP)    |
|                                 | Mono2-etil-5-oksoheksil ftalat (MEOHP)         |
|                                 | Mono-2-etil-5-karboksipentil ftalat (5cx-MEPP) |
|                                 | Mono-2-karboksiheksil ftalat (2cx-MMHP)        |
| ❖ Di-isononil ftalat (DiNP)     | Mono-isononil ftalat (MiNP)                    |
|                                 | Mono-hidroksi-isononil ftalat (OH-MiNP)        |
|                                 | Mono-okso-isononil ftalat (oxo-MiNP)           |
|                                 | Mono-karboksi-isononil ftalat (cx-MiNP)        |
| ❖ Di-n-propil ftalat (DPP)      | Mono-n-propil ftalat (MPP)                     |

### 1.3.2. Industrijska proizvodnja ftalata

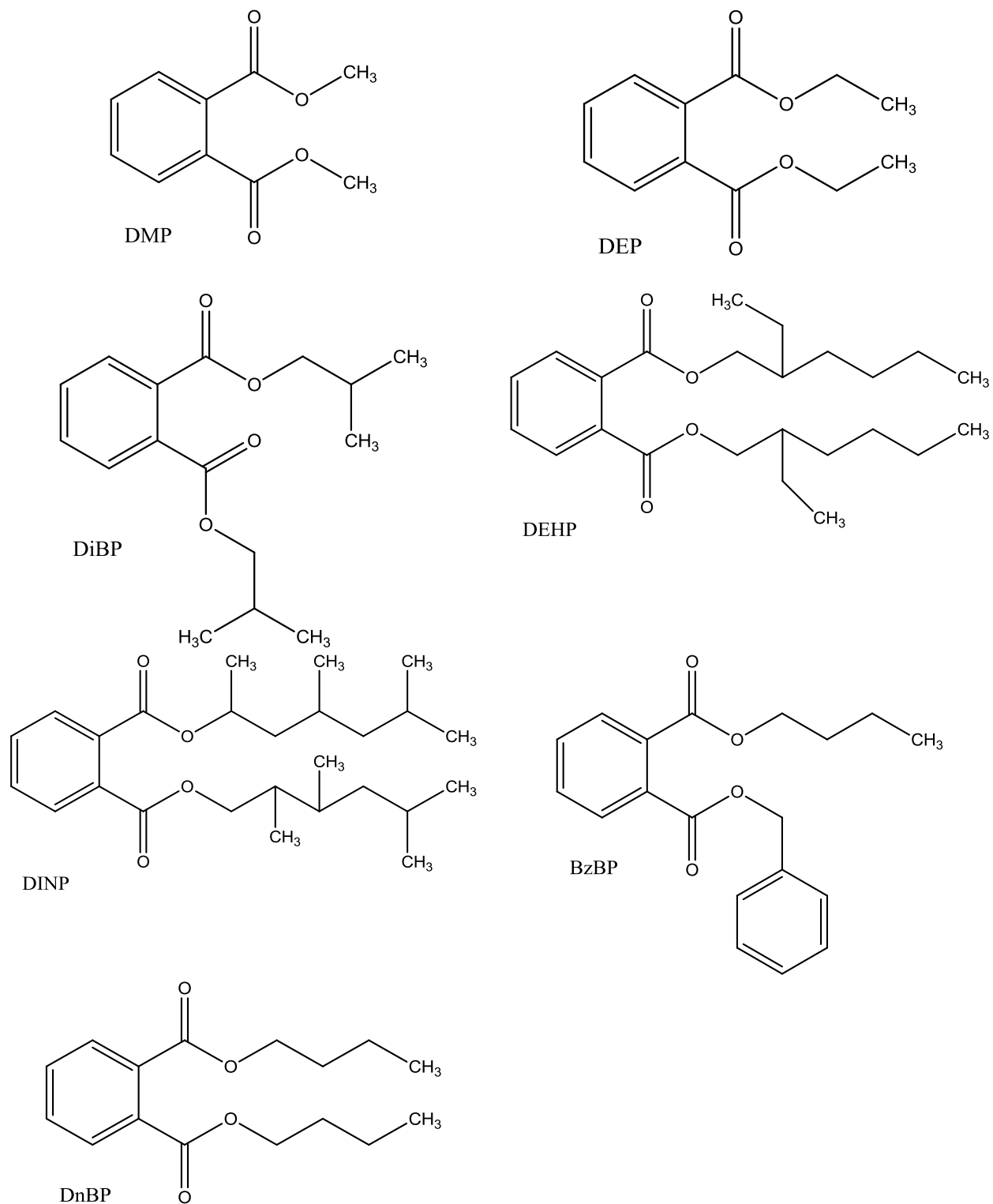
Industrijska proizvodnja ftalata započeta je dvadesetih godina prošlog veka, a DEHP je u upotrebi od 1933. godine (74). Širom sveta je godišnja proizvodnja ftalata u stalnom porastu: sa tri miliona tona 2000. na 5 miliona tona 2006. godine (97, 98). Godišnje se proizvede više od dva miliona tona DEHP (51). Oko 250 000 tona ili 60% nemačke proizvodnje ftalata uključuje DEHP, a procenjeno je da se još oko 100 000 tona DEHP emituje u spoljašnju sredinu kroz razne otpade koji su kontaminirani DEHP (51). U periodu od 2001. do 2010. godine izloženost primarnom metabolitu DEP, MEP, pala je za 42%, uz napomenu da je veći pad u izloženosti MEP viđen kod odraslih nego kod dece, najverovatnije, zbog manje upotrebe kozmetičkih proizvoda u dečjem dobu (99). Biomonitoring studije prijavljuju i pad koncentracija metabolita DEHP, dok je u Nemačkoj ustanovljena savršena korelacija između dnevnog unosa DEHP i industrijske proizvodnje ovog ftalata u periodu od 1988. do 2003. godine (99, 100). Osobina ftalata da se nekovalentno, reverzibilno, vezuju za matriks proizvoda i mogućnost migracije, tj. otpuštanja u spoljašnju sredinu, dovela je do njihove velike rasprostranjenosti (101). Danas se DEHP sve više zamenjuje DiNP-om, koji je postao najviše korišćen ftalat u plastifikaciji u Evropi (74).

### 1.3.3. Fizičko-hemijske karakteristike ftalata

Upotreba različitih ftalata zavisi delimično od njihove molekulske mase. Ftalati velike molekulske mase, kao što su DEHP, DiNP, DiDP koriste se u velikoj meri u proizvodnji nameštaja, odeće, građevinskog materijala, dok najveću primenu imaju u poboljšavanju fleksibilnosti polivinil hlorida (74). Ftalati male molekulske mase, DEP, DMP, DBP, koriste se kao rastvarači, u adhezivima, voskovima, mastilu, kozmetičkim proizvodima, lekovima, insekticidima (74, 102).

Fizičko-hemijske osobine ftalata variraju u odnosu na hemijski oblik i uključuju i gasovito stanje, iako su pritisci isparavanja vrlo niski (100–102). Lipofilni su i to svojstvo olakšava njihovu migraciju u spoljašnju sredinu (101).





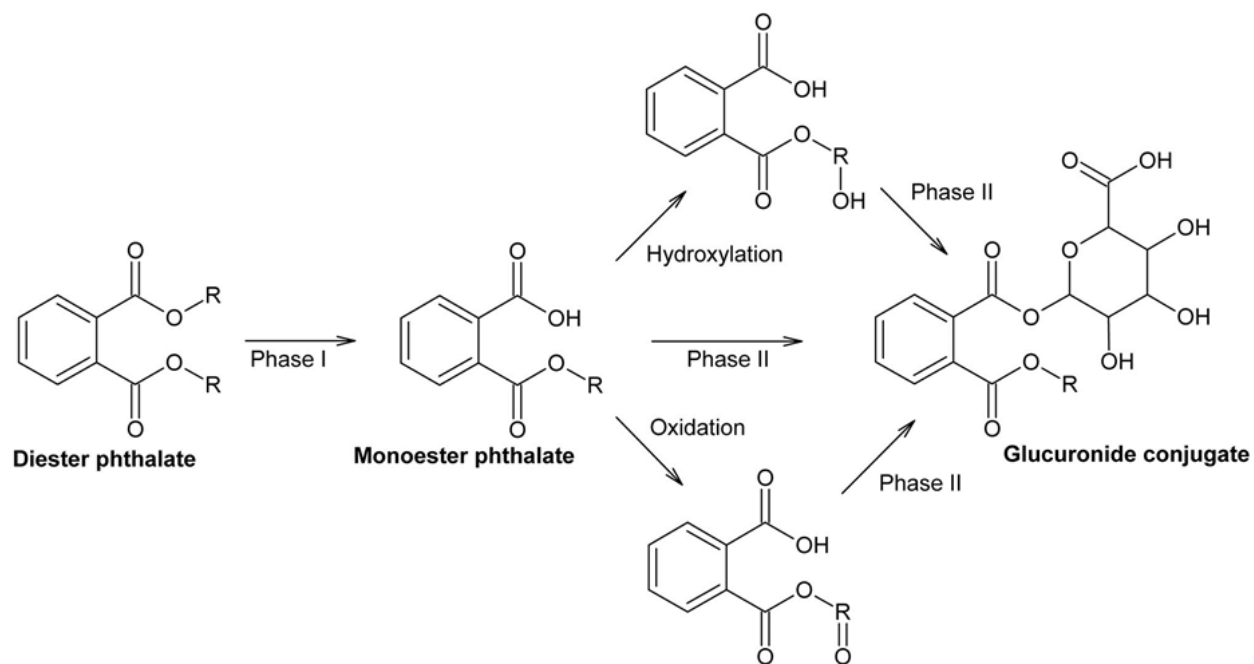
Slika 5. Hemijska struktura najčešće korišćenih ftalata u Evropi:

#### 1.3.4. Metabolizam ftalata

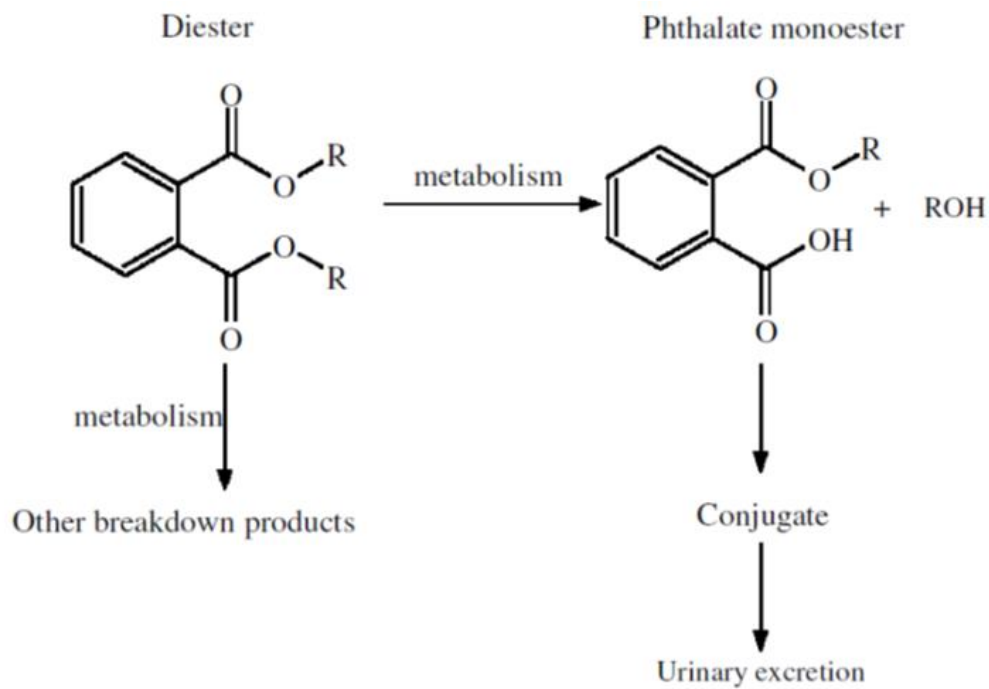
Uopšteno govoreći, metabolizam ksenobiotika bi trebalo da rezultira detoksikacijom i facilitacijom ekskrecije, što i jeste slučaj za većinu, ali ne i za ftalate (103, 104).

Metabolizam ftalata odigrava se u ljudskom organizmu u dva koraka: faza I biotransformacije – hidroliza, faza II biotransformacije – konjugacija (Slika 6). Pod katalizirajućim dejstvom lipaza i esteraza iz creva i parenhimtoznih organa, u fazi I hidrolizom nastaje primarni metabolit, monoestar ftalat (105, 106). *In vitro* i *in vivo* studije ukazuju na veću biološku aktivnost monoestara u odnosu na diestre (107). Ovako nastali monoestri ftalata mogu da se izluče iz organizma nepromenjeni ili da budu podvrgnuti fazi II biotransformacije (104). Fazu II katalizuje 5'-difosfo-glukuronil-transferaza (UGT) i nastaje hidrofilni glukuronizovani konjugat monoestra, koji se lako izlučuje urinom (74, 104).

Alternativa ovome je nastajanje hidrofilnijih oksidativnih metabolita daljim metabolizmom (51, 52, 108). Ftalatni monoestri su odlični biomarkeri izloženosti jedinke ftalatima (109–112). Ftalati male molekulske mase (DMP, DEP itd) izlučuju se urinom kao monoestri (74). Ftalati velike molekulske mase (BBzP, DEHP, DBP itd.) podležu daljoj hidroksilaciji i oksidaciji nakon čega se izlučuju urinom i fecesom kao konjugati faze II biotransformacije Slika (7) (74).



Slika 6. Metabolizam ftalata; preuzeto iz Frederiksen i saradnici 2007.(74)



Slika 7. Ekskrecija ftalata; preuzeto iz Anderson i saradnici 2001. (113)

DMP i DEP se izlučuju urinom kao nekonjugovani monoestri, MMP i MEP (74, 108–111). Istraživači navode da je u ljudskom urinu oko 70% MEP izlučeno kao nekonjugovani metabolit, a sličan model glukuronizacije dokazan je i za plazmu (103, 114).

Nakon jedne oralne doze DBP date glodaru (pacovu), 80–90% DBP se izmetaboliše i izluči urinom u roku od 48h, dok se dodatnih 5% izluči fecesom (114, 115). U urinu je pronađeno 88% glavnog metabolita tj. MBP, međutim, dokazani su i sporedni metaboliti: mono-3-hidroksibutil ftalat 8%, mono-4-hidroksibutil-ftalat 2%, ftalna kiselina 2% (115). MBP je glavni metabolit i kod pacova i kod hrčaka i pronađen je u svim tkivima, uključujući i placentu, fetus i amnionsku tečnost kod gravidnih ženki pacova, već trideset minuta nakon izlaganja DBP (115–117). Nemetabolisan DBP dokazan je u svega 1% (118). Studija na ljudskoj populaciji dokazala je da je samo oko 6% MBP izlučeno urinom u nekonjugovanoj formi, dok je veći deo izlučen kao glukuronizovani konjugat (103). Zbog svega navedenog, većina istraživača koristi MBP kao meru stepena izloženosti DBP.

DiBP i BBzP imaju metabolizam vrlo sličan DBP: u urinu čoveka je svega 7% od ukupne količine MBzP izlučeno u nekonjugovanoj formi (103). Interesantna je činjenica da izlaganje BBzP može da rezultira, između ostalih monoestara i malim količinama MBP u urinu (113).

#### *1.3.5. Dietil-heksil-ftalat*

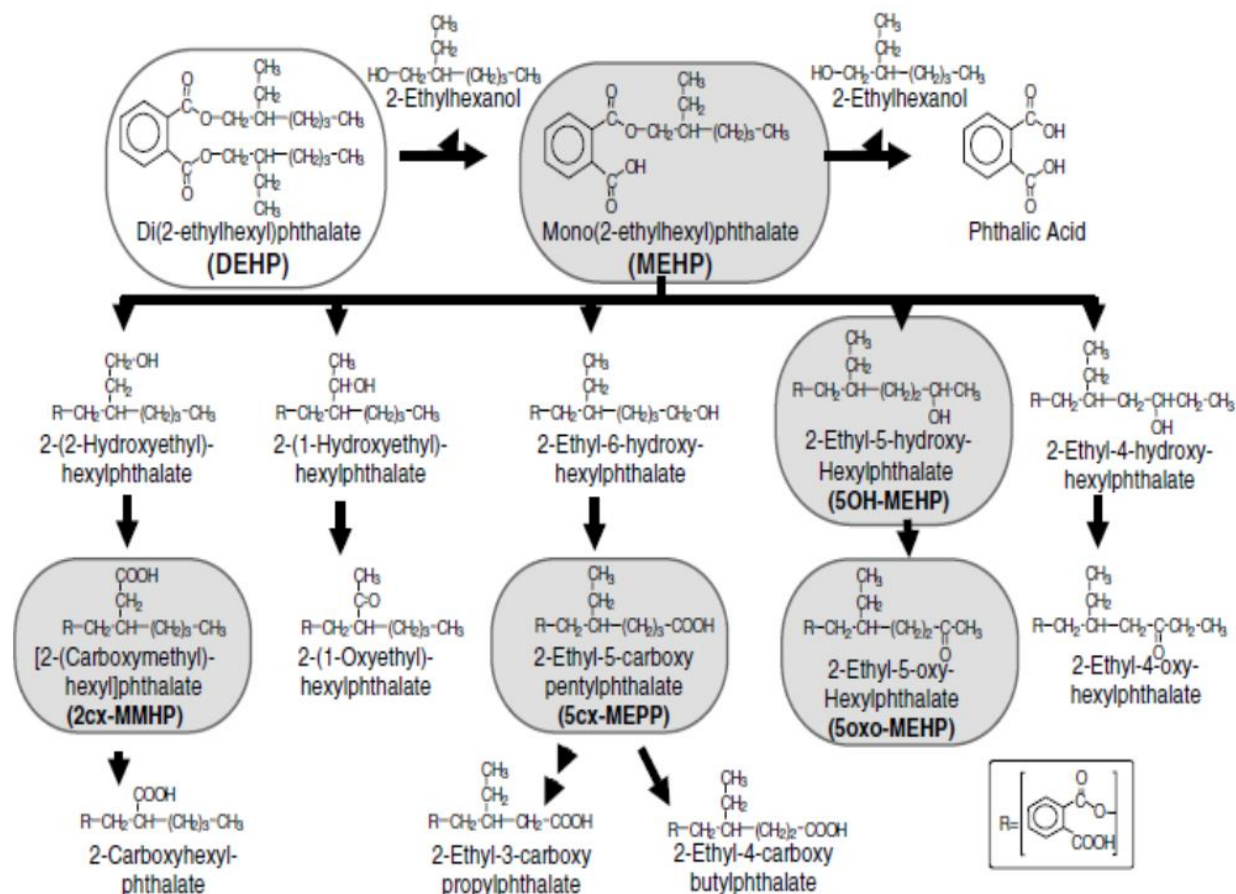
Do sada najviše korišćen u industriji, ali i najbolje proučen je DEHP. Tačna procena izloženosti jedinice DEHP je teška, jer je sveprisutan u okolini, pa tako i u laboratorijama, te treba uzeti u obzir i kontaminacije uzoraka (74, 119). MEHP, glavni proučavani metabolit, nastaje vrlo lako pH zavisnom hidrolizom diestra, tako da i sam može da bude kontaminant (120). Metabolizam DEHP je vrlo složen zbog hemijske strukture ovog diestra, tj. zbog razgranatog lanca (Slika 8). Prvi korak u biotransformaciji je vrlo brza hidroliza DEHP na MEHP, koja je katalizovana nespecifičnim lipazama (121). Kod glodara se MEHP dalje metaboliše u veliki broj sekundarnih metabolita, diacida i ketoacida, koji se kod miševa primarno izlučuju urinom kao glukuronizovani konjugati, a kod pacova kao nekonjugovani metaboliti (108). Primećena je i različita metabolička distribucija sekundarnih metabolita kod miševa i pacova i kod mladih i starih životinja (107, 108, 122, 123). U humanoju populaciji identifikovano je preko petnaest DEHP metabolita (120, 124). Utvrđeno je da se nakon jedne oralne doze DEHP oko 71% doze

izluči urinom posle 24h i još 4% izluči se u narednih 20 sati, a u urinu je identifikovano i 19% date doze izlučeno kao 2cx-MMHP, a 4% kao 2cx-MMHP (104, 120, 125). U uzorcima urina identifikovani su i MEHP (6%), 5OH-MEHP (23%), 5oxo-MEHP (15%) (104, 120, 125). Najviša koncentracija MEHP u urinu bila je dva sata nakon oralno datog DEHP (125). Maksimalne koncentracije za 5OHMEHP, 2cx-MMHP, 5cx-MEHP ustanovljene su nakon četiri sata, a za 5cx-MMHP nakon više od osam sati (120, 125). U studijama u Nemačkoj i Americi kao glavni metaboliti DEHP izdvojili su se: 5cx-MEHP, 5OHMEHP, 5oxo-MEHP, 2cx-MMHP (52, 126). Količine MEHP bile su vrlo niske, 4,5% u nemačkoj populaciji i 6,9% u američkoj populaciji (52, 126). Metaboliti iz urina dokazani su i u serumu (62, 104). Najzastupljeniji metabolit nakon dva sata od izlaganja bio je MEHP u koncentraciji od 5µg/ml, dok su koncentracije ostalih metabolita procenjene na 0,05–0,6 µg/ml (104, 125). Najviša koncentracija u serumu ustanovljena je za MEHP, 5OHMEHP, 5oxo-MEHP, 5cx-MEHP nakon dva sata a za 2cx-MMHP nakon četiri sata (104, 125). Istraživači iz novijih studija metabolizma DEHP navode da su sekundarni metaboliti tipa 2cx-MEOHP u plazmi i MEHHP u urinu bolji biomarkeri izloženosti DEHP u odnosu na MEHP (99, 126, 127).

### 1.3.6. *Di-iso-nonil-ftalat*

DiNP je grupa izomernih formi dinonil ftalata sa različitom dužinom i grananjem nonil lanaca (74). Kao i drugi ftalati velike molekulske mase, metaboliše se u nekoliko sekundarnih metabolita nakon čega se izlučuje urinom (74, 128, 129). U urinu pacova kojima je data jedna doza komercijalnog preparata DiNP oko 0,4% metabolita je bilo u formi monestar ftalata-MiNP, a 81% u formi sekundarnog metabolita cx-MiNP (129). U urinu pacova identifikovani su i drugi sekundarni metaboliti: 8% OH-MiNP, 3% oxo-MiNP, 5% mono-karboksi-isoheptil ftalat (MCiHPP) (129). I studije na ljudskoj populaciji dokazuju da se DiNP izlučuje urinom preko sekundarnih metabolita (130). U studiji na 129 uzoraka urina zdravih dobrovoljaca sa nepoznatom izloženošću DiNPu urinu nije pronađen MiNP, dok su u svim uzorcima pronađeni cx-MiNP, oxo-MiNP, OH-MiNP (130). U urinu je bilo 38% Cx-MiNP koji se primarno ekskretuje u nekonjugovanoj formi, 6% oxo-MiNP koji se izlučuje dominantno u konjugovanoj formi i 55% OH-MiNP (55%) koji se izlučuje u oba navedena oblika (130). Studija sprovedena u Nemačkoj potvrdila je prisustvo ova tri metabolita DiNP u urinu (131). Studije i na

eksperimentalnim životinjama i na ljudskoj populaciji pokazuju da MiNP kao primarni metabolit nije najbolji urinarni biomarker stepena izloženosti DiNP, te da bi upotrebom samo ovog metabolita nivo prisustva DiNP bio potcenjen (128–131).



Slika 8. Metabolizam DEHP; preuzeto od Koha i saradnika 2005. (104)

### 1.3.7. Prisustvo ftalata u biološkim uzorcima

Razvijene su metode za analizu nivoa ftalatih metabolita u više različitih bioloških materijala, ali još uvek nema dovoljno sprovedenih istraživanja da bi se mogli izvući čvrsti zaključci. Jedna od studija dokazala je da je distribucija monestara ftalata slična u urinu i serumu i

da je količina u urinu ipak značajno veća (103). Na primer, MBzP nije bio detektabilan u humanom serumu, a dokazan je u urinu; vrlo male količine MEP dokazane su u serumu u poređenju sa onima u urinu (103). U istoj studiji je pokazano i da su količine MEHP u serumu i urinu slične (103).

Pokušalo se i sa određivanjem nivoa ftalatnih metabolita u pljuvački, mekonijumu i spermi (101). Svega sedam od ukupno četrnaest najčešćih metabolita dokazano je u pljuvački i to u vrlo maloj količini (101). Takođe, u mekonijumu je potvrđeno prisustvo samo 5cx-MEPP i još svega nekoliko DEHP metabolita, a u spermi samo 5cx-MEPP (132, 133). Navedeno upućuje na zaključak da se preko pljuvačke, sperme i mekonijuma ekskretuje vrlo mala količina ftalatnih metabolita, te da ovo nisu korisni uzorci za procenu izloženosti ovim EDs.

Nivo ftalatnih metabolita u amnionskoj tečnosti određivan je kod eksperimentalnih životinja (glodari) i kod ljudi (116). Kod gravidnih ženki pacova kojima je dat DBP, ustanovljeno je prisustvo MBP i glukuronida i u fetalnoj i u plazmi gravidne ženke, kao i u amnionskoj tečnosti (134). Kod ljudi je testiran nivo primarnih ftalatnih metabolita i dva sekundarna DEHP metabolita (135). MBP je detektovan u oko 93% uzoraka, MEP u 39%, MEHP u 24%, dok je nivo ostalih metabolita bio ispod mernog praga (135). Nivo MBP u amnionskoj tečnosti bio je dva do tri puta niži nego u serumu (135).

Nedvosmisleno je dokazano da kod ljudi mleko sadrži ftalatne metabolite (101, 136). Glavni kontaminant je DEHP i njegov nivo fluktuirao (136). Za razliku od seruma, monoestar ftalati u mleku su nekonjugovani (137). Sadržaj ftalata u humanom mleku ukazuje na činjenicu da se ftalati velike molekulske mase (DBP, DEHP, DiNP) ekskretuju mlekom nemetabolisani ili kao primarni metaboliti (74).

### 1.3.8. Putevi izloženosti ftalatima

#### 1.3.8.1. Ingestija

Ftalati se peroralno mogu uneti hranom, bilo da je ona kontaminirana u procesu proizvodnje ili preko ambalaže (138, 139). Količina ftalata u hrani je veoma raznolika. Procenjene količine su 0.48  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{die}$  za DBP, 4.9–18  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{die}$  za DEHP, 0.11–0.29  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{die}$  za BBP (140, 141). Medicinske ambalaže za transfuzije krvnih derivata, zagasove, intravenske rastvore i nutrijente sadrže DEHP jer se time poboljšavaju svojstva same ambalaže (97, 142). Ukoliko je rastvor lipofilan, „curenje“ DEHP je veće, tj. veća je izloženost ljudi ftalatu (142). Rastvorom za enteralnu ishranu koji je pakovan u PVC/DEHP ambalažu adultni pacijent unosi 9.5 mg/die ili 0.14  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{die}$  DEHP, dok pedijatrijski pacijent ovako unese 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{die}$  dnevno (142). Lekovi tipa nekih antibiotika, antihistaminika i laksativa često su obloženi supstancama koje sadrže ftalate, naročito DEHP, jer se tako reguliše nivo otpuštanja aktivne supstance u digestivnom traktu (143). Ftalate sadrže i patentirani biljni lekovi i nutritivni suplementi od kojih se neki koriste i tokom graviditeta (97). Različite dečje igračke mogu biti kontaminirane ftalatima, jer oni, kao što je navedeno, poboljšavaju svojstva tj. fleksibilnost plastike (102). Evropska unija je zabranila upotrebu igračaka i drugih proizvoda za decu ukoliko sadrže DEHP, BBP, DBP, DnOP, DiNP, DiDP u količini većoj od 0.1% težine (144). Pretpostavlja se da deca kroz igračke namenjene za stavljanje u usta, tipa cucli i grickalice, mogu dnevno uneti i 5.7–44  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{die}$  (76–82).

#### 1.3.8.2. Inhalacija

Ftalati mogu biti uneti u organizam inhalacijom medicinskih gasova kroz polivinilhloridne tubuse. Na osnovu eksperimentalnog modela, procenjeno je da se ovako dnevno može uneti u organizam 28.4–94.6  $\mu\text{g}$  (97).

Ranije je dokazano da su ftalati prisutni i u kućnoj prašini (43, 44, 97, 100). Studija Rudela i saradnika navodi koncentracije ftalata u kancelarijama i domovima od 0.3–524  $\mu\text{g}/\text{g}$  prašine (145). Beker i saradnici merili su nivo DEHP u kućnoj prašini, ali i urinarni nivo DEHP metabolita kod dece (146). Pokazano je da je prosečan nivo DEHP u prašini bio 508  $\mu\text{g}/\text{g}$ , ali da nije postojala korelacija sa nivoom DEHP metabolita u urinu (146). Značajna korelacija nivoa



DBP, DEP i BBP u udahnutom vazduhu sa nivoom njihovih metabolita u urinu ukazuje na činjenicu da je inhalacija verovatno najvažniji put izlaganja ftalatima male molekulske mase (147). Oi i saradnici su sprovedli istraživanje u 38 domova u Norveškoj, a rezultati pokazuju prosečnu ukupnu količinu ftalata u kućnoj prašini od 960  $\mu\text{g}$  (130–2920  $\mu\text{g/g}$  kućne prašine) (148). Najzastupljeniji je DEHP (640  $\mu\text{g/g}$  prašine) (148). Isti autori procenjuju prosečnu dnevnu izloženost DEHP iz kućne prašine za osobu u adultnom dobu na 0,76  $\mu\text{g/die}$  (148).

Modelovanjem gline se takođe inhaliraju ftalati (DnOP, Di-n-heksil ftalat, DDP, DEHP i tereftalna kiselina) jer se dodaju da bi se olakšalo modelovanje (97).

#### 1.3.8.3. Intravenski

Direktno intravenski DEHP može biti unet preko medicinske opreme od polivinil hlorida koja je plastificirana DEHP-om: intravenske kanile i infuzioni sistemi, kese za transfuziju krvnih derivata, sistemi za hemodijalizu i ekstrakorporalnu membransku oksigenaciju (91, 92, 142). Količina rastvorenog DEHP-a u sadržaju navedene medicinske opreme varira u zavisnosti od sadržaja lipida, temperature i trajanja skladištenja (142). Karle i saradnici su pokazali da se izlaganje DEHP tokom ekstrakorporalne membranske oksigenacije može značajno smanjiti upotrebom hepariniziranih PVC/DEHP sistema (149). Prema *National health and nutrition examination study* NHANES studiji nivo MEHP, DEHP metabolita, u urinu prematurnih neonatusa u jedinicama intenzivne nege je značajno viši u odnosu na nivo u opštoj populaciji: 129 ng/ml nasuprot 2.07 ng/ml (150). Nivo DEHP metabolita raste sa stepenom intenzivne nege, tj. viši je kod neonatusa koji zahtevaju viši stepen terapije (75).

#### 1.3.8.4. Transdermalno

Primena kozmetičkih proizvodakao što su krema, maskara, zatim upotreba strunjača tokom vežbanja, igračkaka, voskova, produkata za čišćenje itd., dovodi do transdermalnog unošenja ftalata u ljudski organizam (97). Apsorpcija preko kože zavisi od koncentracije, hemijske strukture i rastvorljivosti (48). Značajno se razlikuju apsorpcije u odnosu na deo tela: apsorpcija sa kože lica, aksilarne regije i skrotuma je deset puta veća u odnosu na apsorpciju sa kože ruke (97). Studije na glodarima ukazuju na sporu apsorpciju preko kože, dok je u *in*

*vitrouslovima* dokazano da je ljudska koža manje permeabilna za ftalate u odnosu na kožu glodara (151, 152). Sistemska apsorpcija DEP i DBP iz kreme nanošene na celo telo je mala i ne utiče na nivo reproduktivnih i tiroidnih hormona kod muškaraca (153).

### 1.3.9. Uticaj ftalata na zdravlje

Uticaj ftalata na reprodukciju i razvoj je kod vertebrata nedvosmisleno dokazan (154, 155). Na primer, pacovi izloženi ftalatima pokazuju alteraciju polno determinisane genske ekspresije, sniženu produkciju 17 $\beta$ -estradiola, smanjenu sintezu testosterona, povećan metabolizam testosterona, nizak luteinizirajući hormon (LH) i nosač za polne hormone (*sex hormone binding globulin* (SHBG)) (154–159). Data je i definicija „ftalatnog sindroma“ za koji su karakteristične malformacije epididimisa, vas deferensa i seminalnih vezikula, hipospadija i kriptorhizam (160). Podataka o reproduktivnoj toksičnosti ftalata kod ljudi je daleko manje (79). Utvrđena je korelacija nivoa ftalata i komplikacija u trudnoći tipa anemije i preeklampsije sa prevremenim porođajem (161–163). Nixsomolekularni ftalati povezani su sa nižom gestacijskom starošću i obimom glave neonatusa, kao i sa smanjenom anogenitalnom distancom (164, 165). Kod muškaraca u adultnom dobu ftalati dovode do smanjenja broja i pokretljivosti spermatozoida (166–169). Devojčice sa povišenim nivoom DEHP imaju povećane ovarijume i uterus, a javlja se i prerani pubertet (170). MEP je povezan sa pojavom karcinoma dojke, posebno u kod žena u premenopauzi (171, 172).

Vord i saradnici su u svom istraživanju potvrdili i mogućnost lezije hepatocita kao posledicu izloženosti DEHP, a mehanizam oštećenja je preko MEHP posredovane aktivacije PPAR $\alpha$  (173). Oksidovani metaboliti DEHP (5OHMEHP i 5oxo-MEHP) dokazani su u urinu dece sa autizmom, kao i kod hiperaktivne dece (*Attention Deficit Hyperactivity Disorder* (ADHD)) (174, 175).

Povišen nivo ftalata pokazan je i kod dece sa simptomima od strane respiratornog sistema, posebno kod dece sa astmom i rinitisom (176–178).

Pre nešto manje od deset godina, predložena je obesogena hipoteza koja pretpostavlja ulogu ftalata na razvoj gojaznosti i metaboličkih poremećaja u vidu insulinske rezistencije (94, 176). Navedeno je posledica interakcije EDs sa nuklearnim receptorima tipa retinoidnog X

receptora (RXR) i PPARs (176). Nadalje, promena u nivou leptina tokom gestacije može dovesti do kasnijeg razvoja gojaznosti i insulinske rezistencije, ali definitivne posledice prenatalne promene u koncentraciji leptina nisu dovoljno proučene(179).

## 2. CILJEVI I HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Ciljevi istraživanja

1. Utvrditi da li su primarni monoestari metaboliti DEHP i DEP prisutni u urinu ispitanika.
2. Utvrditi da li postoje razlike u nivou slobodnih tiroidnih hormona i tirotropina između ispitanika sa prisutnim ftalatnim metabolitima i onih bez prisutnih ftalatnih metabolita u urinu, kao i između gojaznih i normalno uhranjenih ispitanika sa ftalatnim metabolitima.
3. Utvrditi da li postoji razlika u serumskom nivou leptina u gojaznih ispitanika sa i bez pozitivnih ftalatnih metabolita, kao i moguću povezanost leptina sa MEP i MEHP i tiroidnim hormonima i TSH.

## **2.2. Hipoteze istraživanja**

1. U 30% naše populacije postoji izloženost DEHP i DEP.
2. Prisustvo urinarnih metabolita DEHP (MEHP) i DEP (MEP) dovodi do značajne promene nivoa tiroidnih hormona i tirotropina, ali u okviru referentnih vrednosti, bez manifestnih poremećaja tiroidne funkcije i kod gojaznih i kod normalno uhranjenih ispitanikasa pozitivnim ftalatnim metabolitima.
3. Leptin je kod gojaznih ispitanika povezan sa nivoom tiroidnih hormona i TSH, a prisutna je i povezanost leptina sa MEHP i MEP kod gojaznih ispitanika.

### 3. NAUČNA I DRUŠTVENA OPRAVDANOST ISTRAŽIVANJA

Interes za temu endokrine disrupcije je u poslednjih dvadesetak godina u stalnom porastu. Rezultati *in vivo* i *in vitro* studija ukazuju da je endokrina disrupcija moguća u svakom segmentu endokrinog sistema i da ima brojne neželjene efekte po humano zdravlje. Grupi endokrinih disruptora pripadaju i estri ftalne kiseline za koje je na osnovu *in vitro studija*, ali i studija na eksperimentalnim životinjama i ljudskoj populaciji pokazano da, između ostalog, uzrokuju i poremećaj u funkciji tiroidne žlezde. Dobijeni rezultati nisu uvek bili konzistentni, a do danas je sprovedeno vrlo malo istraživanja na ljudskoj populaciji.

Izloženost ftalatima u našoj zemlji je do sada ispitana samo pilot studijom na malom uzorku, te je ovo istraživanje aktuelno i interesantno u smislu povećanja ispitivane populacije tj. dobijanja čvršćih dokaza za izloženost naše populacije ftalatima.

Istraživanje je deo projekta "Ftalati kao hemijske supstance koje remete rad endokrinog sistema" čiji je nosilac Medicinski fakultet Univerziteta u Novom Sadu, a rukovodilac prof.dr Milica Medić-Stojanoska. Realizacija projekta omogućena je od strane Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj Vojvodine. Predviđeno trajanje projekta je četiri godine.

Istraživanjem ćemo proceniti izloženost naše populacije ftaltnim metabolitima i utvrditi da li postoji i kakve je prirode veza između ftaltnih metabolita i tiroidne funkcije, kao i da li se ona razlikuje u odnosu na uhranjenost učesnika ispitivanja. Takođe, utvrdićemo i odnos leptina sa tiroidnom funkcijom i ispitati sposobnost ftalata da utiču na leptinsku sekreciju i time, indirektno, na hipotalamo-hipofizno-tiroidnu osovinu.

Smatramo da bi rezultati istraživanja mogli da doprinesu boljem razumevanju uticaja ftalata na humano zdravlje, a time i pravovremenoj dijagnostici i prevenciji oboljenja tiroidne žlezde koja u osnovi imaju endokrinu disrupciju.

Smanjenjem izloženosti estrima ftalne kiseline posebno u najvulnerabilnijim kategorijama stanovništva (deca, adolescenti, trudnice) i uređenjem i zaštitom životne sredine omogućila bi se adekvatna prevencija navedenih poremećaja.

## 4. MATERIJAL I METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA

### 4.1. Izbor ispitanika

Istraživanje je urađeno kao studija preseka, na 201 ispitaniku oba pola, starosti između 18 i 65 godina, bez tiroidne disfunkcije ili drugih manifestnih oboljenja. Rekrutovanje ispitanika izvršeno je metodom slučajnog izbora prilikom sistematskih pregleda u Zavodu za zdravstvenu zaštitu radnika u Novom Sadu. Svaki pojedinačni ispitanik potpisao je Informisani pristanak za uključivanje u ispitivanje. Od svakog ispitanika uzeti su detaljni anamnestički podaci o ranijim bolestima i lekovima koje uzima.

### 4.2. Kriterijumi za uključivanje u ispitivanje

1. Odsustvo primarne tiroidne bolesti
2. Odsustvo poremećaja hipotalamo-hipofizno-tiroidne osovine
3. Odsustvo primene lekova koji imaju uticaja na tiroidnu funkciju
4. Odsustvo metaboličkih poremećaja, osim gojaznosti, koji imaju uticaja na tiroidnu funkciju
5. Potpisana saglasnost za učestvovanje u ispitivanju

### 4.3. Kriterijumi za isključivanje iz ispitivanja

1. Žene u periodu trudnoće i laktacije
2. Prisustvo hroničnih bolesti: oboljenja jetre, oboljenja bubrega, dijabetes melitus tip 1 ili tip 2, autoimune bolesti, prethodno dijagnostikovana hipertenzija, prisustvo ranije

dijagnostikovanih drugih endokrinoloških oboljenja (Kušingov sindrom, akromegalija, hiperprolaktinemija)

3. Vegetarijanski ili veganski tip ishrane
4. Ispitanici koji ne potpišu Informisani pristanak
5. Ispitanici koji u bilo kojoj fazi žele da prekinu učešće u ispitivanju
6. Prisustvo infekcije i/ili primena antibiotika
7. Primena kortikosteroida, imunosupresivnih lekova, oralnih kontraceptiva, lekova koji imaju uticaja na tiroidnu funkciju
8. Ispitanici mlađji od 18 i stariji od 65 godina

#### **4.4. Podela ispitanika po grupama**

Radi ispitivanja hipoteza ovog istraživanja, ispitanici su prvo podeljeni u grupe na osnovu prisustva MEHP i MEP u urinu: MEHP pozitivni, MEP pozitivni, MEHP negativni i MEP negativni. Potom je vršeno dalje odvajanje ispitanika u podgrupe na osnovu telesne uhranjenosti:

- I. -grupa gojaznih bez pozitivnih ftalata u urinu,
- II. -grupa gojaznih sa pozitivnim ftalatima u urinu,
- III. -grupa normalno uhranjenih bez pozitivnih ftalata u urinu i
- IV. -grupa normalno uhranjenih sa pozitivnim ftalatima u urinu.

#### **4.5. Plan istraživanja**

Na početku ispitivanja ispitanici su obavešteni o vrsti ispitivanja, a zatim su uzeti anamnestički podaci o prethodnim bolestima, upotrebi medikamenata, navikama u ishrani. Nakon konstatovanja da ispunjava sve kriterijume za uključivanje i nijedan kriterijum za isključivanje iz ispitivanja, svaki ispitanik je potpisao Informisani pristanak za uključivanje u ispitivanje.



U drugoj fazi su izvršena antropometrijska merenja učesnika ispitivanja: obim struka, telesna visina, telesna masa uz izračunavanje indeksa telesne uhranjenosti (*bodymassindex* – BMI). Obim struka je meren na sredini linije koja spaja prednju gornju spinu ilijaku bedrene kosti sa donjom ivicom rebarnog kaveza. Izračunavanje BMI je urađeno na osnovu sledeće formule:

$$\text{BMI} = \text{telesna masa (kg)} / \text{telesna visina (m}^2\text{)}.$$

Svakom ispitaniku je iz prvog jutarnjeg uzorka urina određen nivo MEHP i MEP, a iz uzorka periferne krvi uzete našte određen je nivo FT4, FT3, TSH.

Ispitanici su grupisani na gojazne i normalno uhranjene, a potomje vršeno dalje grupisanje na sledeće podgrupe: MEHP pozitivni i MEHP negativni ispitanici i MEP pozitivni i MEP negativni ispitanici.

Kod gojaznih ispitanika određen je i serumski nivo leptina iz uzorka periferne krvi uzete našte.

#### **4.6. Laboratorijske analize**

##### **4.6.1. Uzorak urina**

Nivo ftalatnihmetabolita određivan je iz prvog jutarnjeg uzorka urina, sakupljenog u sterilne polipropilenske bočice zaurin zapremine 50ml, koje su čuvane zamrznutena temperaturi od -20°C do momenta analize. Celokupno ispitivanje urina sprovedeno je u laboratoriji Zavoda za zdravstvenu zaštitu radnika, Novi Sad.

Sve bočice su prethodno testirane u smislu određivanja nivoa MEP i MEHP gasnom hromatografijom/masenomspektrometrijom (GC/MS) u Zavodu za zdravstvenu zaštitu radnika, Novi Sad i dobijene vrednosti označene kao nulte. U epruvetu za centrifugu stavljeno je 2ml urina i dodato je 0.5 ml amonijum acetata. Nakon dodavanja  $\beta$ -glukuronidaze (30  $\mu$ L, 50 J/mL) vršena je inkubacija uzorka na 37°C 60 minuta. Zatim je urađenaacidifikacija uzorka na pH 2 primenom 10% sumporne kiseline. Nakon dodavanja rastvora metil-tert-butil-etra (5mL) i natrijum hlorida (1g), rastvor je tri minuta ekstrahovan snažnim mućkanjem, zatim centrifugiran na 3000 obrtaja/min u trajanju od 5 minuta. Sloj metil-tert-butil-etra odvojenje i osušen pod mlazom azota

na 35°C. Diazometan je pripremljen dodavanjem 0.5g N-metil- N'-nitro-N- nitrozogvanidina u 3mL 20% rastvora natrijum hlorida; tako nastao diazometan gas je rastvoren u 10ml ledenog metil-tert-butil etra. Diazometan (0.5mL) je dodat ostatku i smeša je ostavljena na sobnoj temperaturi 30 minuta. Rastvor je osušen pod mlazom azota na 35°C.

Određivanje MEP i MEHP u uzorcima urina urađene su na GC-MS (Agilent GC 7890A, 5975C VL MSD) opremljenom sa kapilarnom silika kolonom(30 m, 0,25 mm i.d. i 0,25 µm debljine; *J&W Scientific, Folsom, CA, USA*).

#### 4.6.2. Određivanje serumskog nivoa FT4, FT3, TSH

Uzorci periferne krvi za određivanje FT4, FT3 i TSH analizirani su u laboratoriji Centra za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog centra Vojvodine. Korišćen je automatizovani sistem *Architect i2000SR*, hemiluminiscentno imuno određivanje, CMIA metoda (*carbonyl-metallo-immunoassay, Abbott*).

- TSH: dvostepeni imunotest za kvantitativno određivanje TSH u serumu koristeći CMIA tehnologiju; referentna vrednost za TSH: 0.35–4.94 µIU/mL; granica funkcionalne osetljivosti: <0.01 µIU/mL; ukupna preciznost, ukupni koeficijent varijacije (CV%) < 5%;
- FT4: dvostepeni imunotest za kvantitativno određivanje slobodnog T4 u serumu koristeći CMIA tehnologiju; referentna vrednost za FT4: 7.7–15.4 pmol/L; granica funkcionalne osetljivosti: < 5.1 pmol/L; ukupna preciznost, ukupni CV% < 7.8%;
- FT3: dvostepeni imunotest za kvantitativno određivanje slobodnog T3 u serumu koristeći CMIA tehnologiju; referentna vrednost za FT3: 2.6 – 5.7 pmol/L; granica funkcionalne osetljivosti: < 1.5 pmol/L; ukupna preciznost, ukupni CV% < 5.0 %

#### 4.6.3. Određivanje serumskog nivoa leptina

Uzorci periferne krvi za određivanje leptina analizirani su u laboratoriji Centra za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog centra Vojvodine. Korišćena je ELISA- *enzyme-linked immunosorbent assay metodologija*(*Mediagnost GmbH, Nemačka*). Svi uzorci su diluirani u odnosu 1:10 i 1:20, u zavisnosti od vrednosti BMI. Granica osetljivosti je <0.01 ng/mL, a CV

unutar (*intra assay* CV serije 4.35% i 2.63 %) i između serija (*inter assay* CV: 7.2 %, 6.1 % i 7.5 %) su <10 %.

#### **4.7. Statistička obrada podataka**

Softver korišćen za statističku obradu podataka je SPSS. Podaci su obrađeni parametrijskim i neparametrijskim statističkim testovima. Za potrebe sprovođenja parametrijskih testova, varijable čije su distribucije odstupale od normalnih normalizovane su Rankit postupkom u okviru paketa SPSS.

Deskriptivna statistika obuhvata prikaz mera centralne tendencije (aritmetička sredina (AS), medijana) i mera disperzije (standardna devijacija (SD), opseg vrednosti).

Razlike između grupa ispitivane su t-testom za nezavisne uzorke i Man-Vitnijevim U testom. Za dodatno ispitivanje potencijalnih interakcija ispitivanih parametara sprovedena je hijerarhijska multipla linearna regresiona analiza, koja je uključivala četirimodela:

- *Model 1* predstavlja model samostalnih efekata MEP/MEHP, pola i BMI;
- *Model 2*, pored ovih efekata, uključuje efekat interakcije MEP, odnosno MEHP i pola,
- *Model 3*, uz prethodno navedene, uključuje efekat interakcije MEP/MEHP i BMI,
- *Model 4*, uz sve prethodne, uključuje efekat interakcije MEP/MEHP pola i BMI.

Povezanost između vrednosti pojedinih varijabli proveravane su Pirsonovim koeficijentima korelacije. Od neparametrijskih testova korelacije izračunati su Kendalov (Tau B i C), Spirmanov i Gama koeficijent.

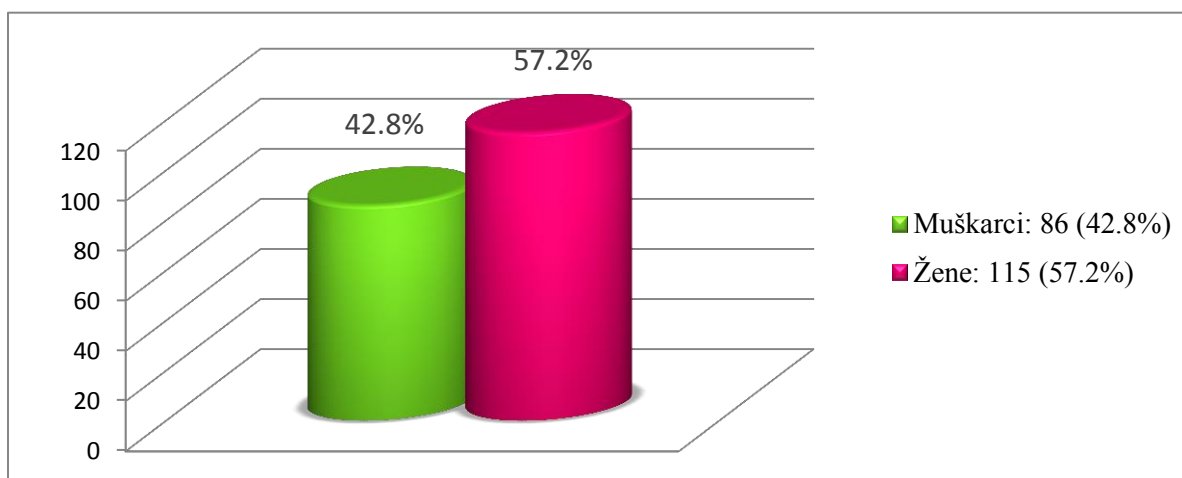
Pri testiranju hipoteza korištena je kritična vrednost p kao rizik zaključivanja prema sledećim vrednostima:

- a)  $p > 0.100$ : nema značajne razlike testiranih varijabli,
- b)  $0.10 > p > 0.05$  postoji razlika između ispitivanih varijabli, ali je povećan rizik zaključivanja i
- c)  $p < 0.05$ : postoji statistički značajna razlika između ispitivanih varijabli.

## 5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

### 5.1. Polna i starosna struktura ispitanika

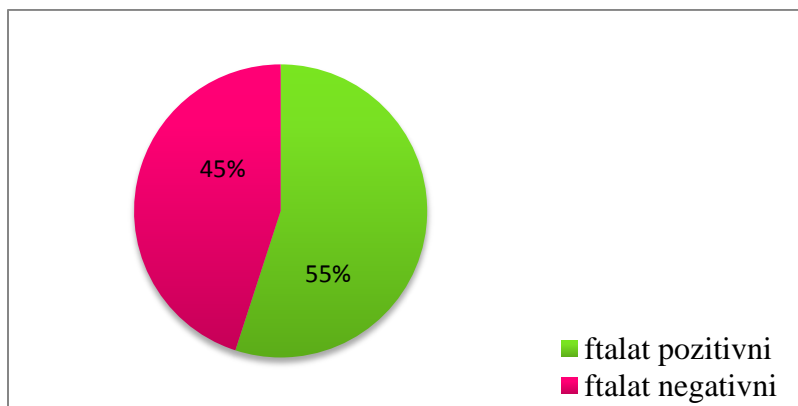
Istraživanje je sprovedeno kao studija preseka. Ispitanici su regrutovani tokom redovnog sistematskog pregleda u Zavodu za zdravstvenu zaštitu radnika Novi Sad. Istraživanje je obuhvatilo 201 ispitanika, prosečne starosti 36.74 ( $\pm$  8.55) godina. Uzorak je činilo 86 (42.8%) osoba muškog pola i 115 (57.2%) osoba ženskog pola (Grafikon 5.1).



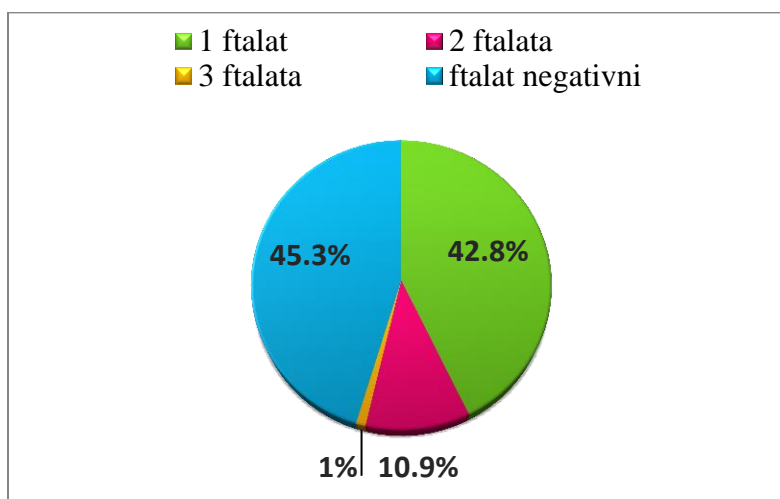
Grafikon 5.1. Polna raspodela ispitanika

### 5.2. Prisutnost monoestar ftalatnih metabolita u urinu

U ispitivanom uzorku 110 (55%) ispitanika imalo je pozitivne ftalate u urinu gdje je limit detekcije bio 0.5 $\mu$ g/l. Kod 86 (42.8%) ispitanika dokazan jedan ftalat, kod 22 (10.9%) dva ftalata, a kod 2 (1%) ispitanika tri ftalata u urinu (Grafikoni 5.2. i 5.3.).

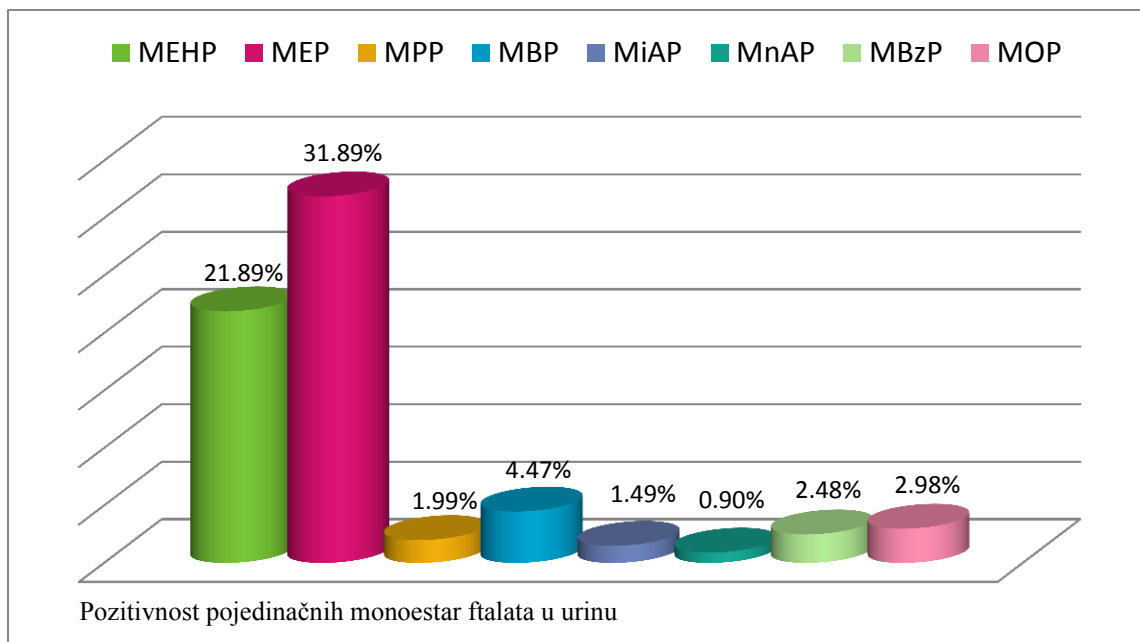


Grafikon 5.2. Prisutnost monestar ftalatnih metabolita



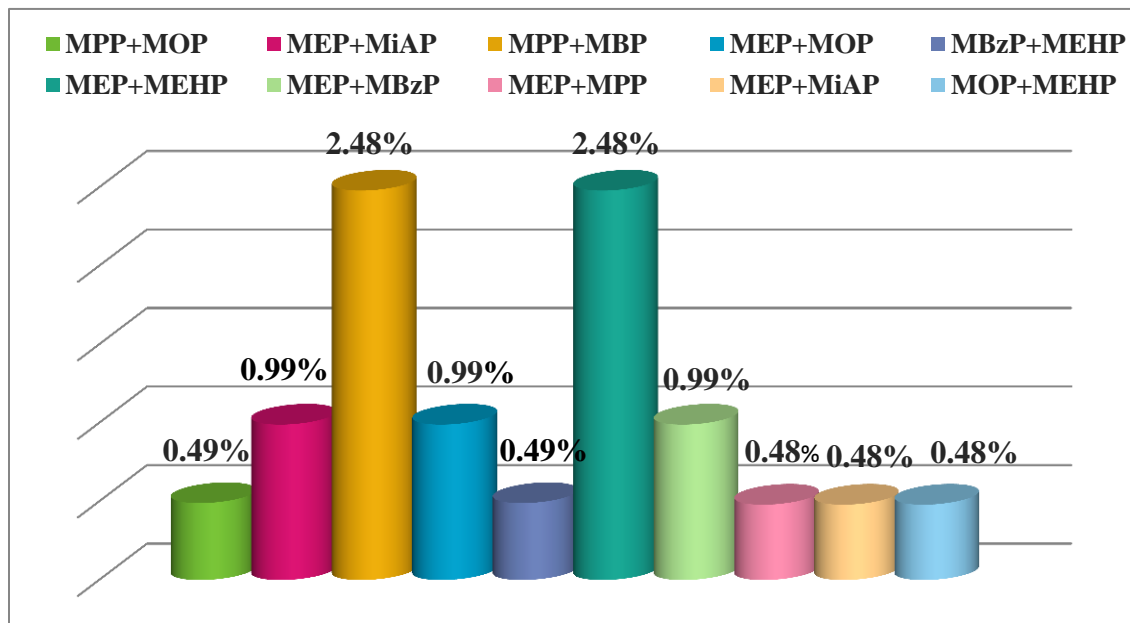
Grafikon 5.3. Zastupljenost jednog ili više monestar ftalatnih metabolita

Na Grafikonu 5.4 prikazana je raspodela pojedinačno zastupljenih monoestar metabolita. Najčešće su u urinu ispitanika dokazani MEP (31.89%) i MEHP (21.89%).



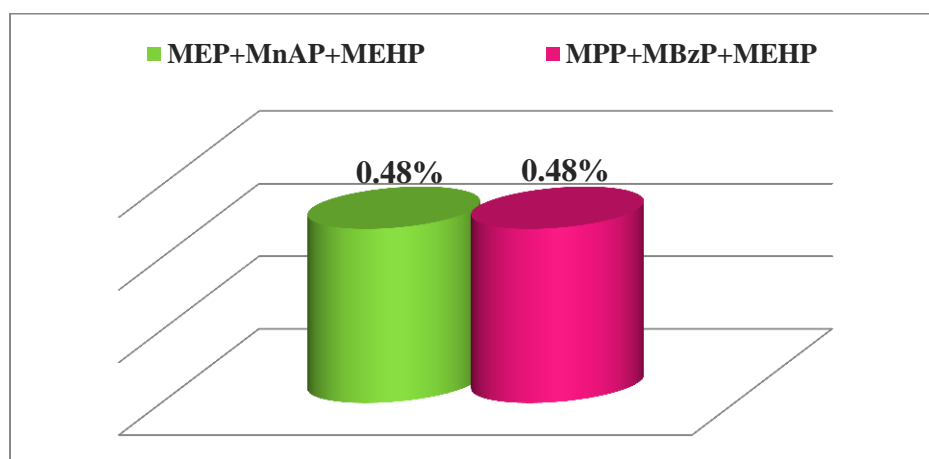
Grafikon 5.4. Pojedinačna zastupljenost ftalatnih metabolita urinu ispitanika

U urinu 22 ispitanika (10.94%) istovremeno su bila pozitivna dva ftalatna metabolita. Kao najzastupljeniji izdvojili su se MEP+MEHP (2.48%) i MPP+ MBP (2.48%). Na Grafikonu 5.5. su prikazani detektovani monoestri:



Grafikon 5.5. Istovremeno prisustvo dva ftalatna metabolita u urinu

Dva (0.99%) ispitanika imalo je istovremeno pozitivna tri monoestar ftalatna metabolita u urinu, kod jednog ispitanika istovremeno su detektovani MEP, MnAP i MEHP, a kod drugog MPP, MBzP i MEHP (Grafikon 5.6).



Grafikon 5.6. Istovremeno prisustvo tri ftalatna metabolita u urinu

S obzirom na vrlo mali broj ispitanika koji su imali pozitivan bilo koji drugi ftalatni metabolit osim MEHP i MEP, u daljem istraživanju tj. statističkoj obradi podataka uzimani su u obzir samo MEP i MEHP pozitivni ispitanici.

### 5.3. Antropometrijski parametri u ispitivanim grupama

#### 5.3.1. Antropometrijski parametri u grupama MEP i MEHP pozitivnih i negativnih ispitanika

Između grupa MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika nije bilo statistički značajnih razlika u antropometrijskim karakteristikama (Tabela 5.1.).

Poređenje MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika ukazalo je na statistički značajno veće vrednosti BMI ( $30.64 \pm 7.04$  nasuprot  $27.39 \pm 8.08$ ;  $p < 0.02$ ) i obima struka ( $97.54 \pm 16.21$  nasuprot  $89.39 \pm 19.91$ ;  $p < 0.02$ ) u grupi MEHP pozitivnih ispitanika (Tabela 5.1.).

Tabela 5.1. Antropometrijski parametri MEP i MEHP pozitivnih i negativnih ispitanika

Karakteristike	MEP- (n=137)	MEP+ (n=64)	p	MEHP- (n=157)	MEHP+ (n=44)	p
Starost	36.90±8.42	36.39±8.88	0.69	36.37±8.71	38.07±7.89	0.24
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.90±7.93	28.51±8.06	0.61	<b>27.39±8.08</b>	<b>30.64±7.04</b>	<b>0.02</b>
OS (cm)	90.56±19.04	92.40±20.30	0.53	<b>89.39±19.91</b>	<b>97.54±16.21</b>	<b>0.01</b>

Napomena: obim struka: OS



### 5.3.2. Antropometrijski parametri u podgrupama normalno uhranjenih i gojaznih MEP pozitivnih i negativnih ispitanika

U vrednostima ispitivanih antropometrijskih parametara u podgrupama normalno uhranjenih i gojaznih ispitanika podeljenih na podgrupe MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika, nema statistički značajnih razlika (Tabela 5.2).

*Tabela 5.2. Antropometrijski parametri u podgrupama normalno uhranjenih i gojaznih MEP pozitivnih i negativnih ispitanika*

Karakteristike	Normalno uhranjeni			Gojazni		
	MEP- (n=79)	MEP+ (n=29)	p	MEP- (n=58)	MEP+ (n=35)	p
Starost	35.05±7.76	34.80±8.48	0.88	39.43±8.68	37.71±9.10	0.37
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.70±2.03	22.14±2.14	0.22	35.00±7.45	33.80±7.30	0.45
Obimstruka(cm)	78.06±7.60	76.21±8.59	0.28	107.59±16.57	105.83±17.14	0.62

### 5.3.3. Antropometrijski parametri u podgrupama normalno uhranjenih i gojaznih MEHP pozitivnih i negativnih ispitanika

U vrednostima ispitivanih antropometrijskih parametara u grupama normalno uhranjenih i gojaznih ispitanika podeljenih na podgrupe MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika, uočava se statistička značajnost za razlike u BMI i obimu struka. Naime, normalno uhranjeni MEHP pozitivni ispitanici imaju statistički značajno veći BMI (23.51±1.85 nasuprot 22.39±2.07;  $p < 0.05$ ). U istoj podgrupi ispitanika zabeležen je i statistički značajno veći obim struka (81.27±5.28 nasuprot 76.81±8.09;  $p < 0.05$ ) ((Tabela 5.3.)).

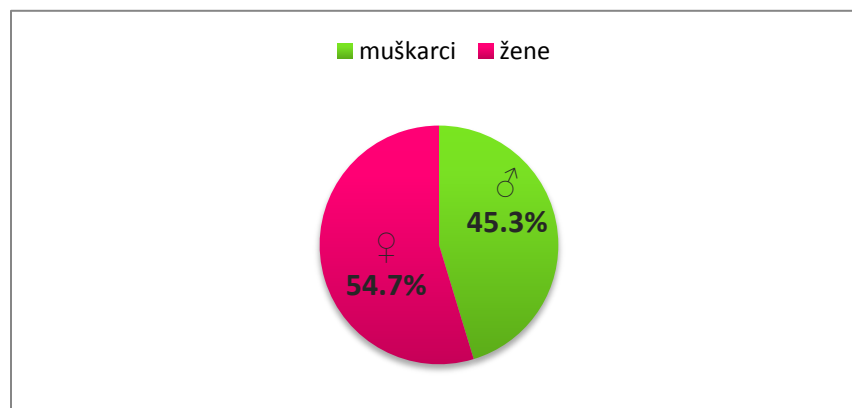
Tabela 5.3. Antropometrijski parametri u podgrupama normalno uhranjenih i gojaznih MEHP pozitivnih i negativnih ispitanika

Karakteristike	Normalno uhranjeni			Gojazni		
	MEHP - (n=93)	MEHP+ (n=15)	p	MEHP - (n=64)	MEHP+ (n=29)	p
Starost	34.76±8.02	36.33±7.41	0.47	38.70±9.20	38.96±8.10	0.89
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	<b>22.39±2.07</b>	<b>23.51±1.85</b>	<b>0.05</b>	34.65±8.05	34.32±5.76	0.84
OS (cm)	<b>76.81±8.09</b>	<b>81.27±5.28</b>	<b>0.05</b>	107.37±18.16	105.96±13.20	0.71

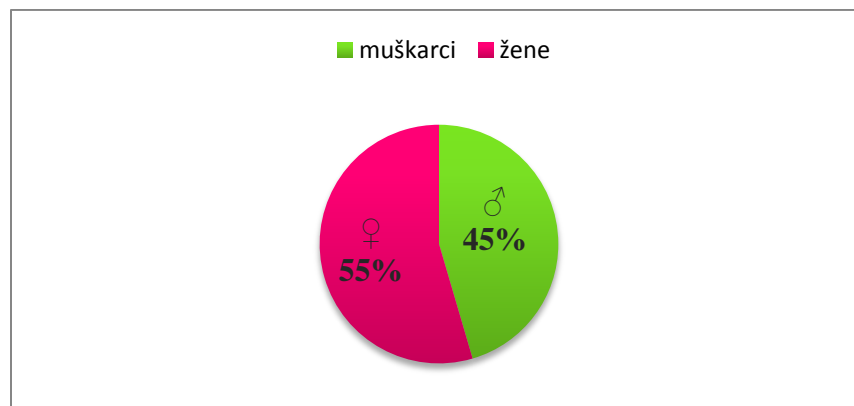
Napomena: obim struma: OS

#### 5.4. Polna raspodela i koncentracija MEP i MEHP

U grupi MEP pozitivnih ispitanika bilo je 35 (54.7%) osoba ženskog pola i 29 (45.3%) osoba muškog pola (Grafikon 5.7.). U grupi MEHP pozitivnih ispitanika bilo je 24 (54.54%) osobe ženskog, odnosno 20 (45.45%) osoba muškog pola (Grafikon 5.8.).



Grafikon 5.7. Polna distribucija MEP pozitivnih ispitanika



Grafikon 5.8. Polna distribucija MEHP pozitivnih ispitanika

#### 5.4.1. Koncentracija MEP/MEHP u urinu na celokupnom uzorku

Deskriptivni pokazatelji za MEP i MEHP dati su u Tabeli 5.4.:

Tabela 5.4. Deskriptivni pokazatelji za MEP i MEHP

	<u>MEP(μg/l)</u>		<u>MEHP(μg/l)</u>			
	AS	Medijana	SD	AS	Medijana	SD
	113.6070	62.4650	±15.81994	92.1789	59.7250	±90.93315

AS: aritmetička sredina

#### 5.4.2. Koncentracija MEP/MEHP u urinu u podgrupama muškaraca i žena

MEP je češće detektovan u urinu osoba ženskog pola. Kod ispitanika ženskog pola više su i srednje vrednosti za MEP, međutim nije dostignuta statistička značajnost ( $123.67 \pm 180.83$  nasuprot  $105.27 \pm 135.95$ ;  $p < 0.64$ ).

U grupi MEHP pozitivnih ispitanika, gde je, kao i kod MEP, bilo više ispitanika ženskog pola, statistički značajno više vrednosti MEHP imaju osobe muškog pola ( $139.57 \pm 99.78$  nasuprot  $52.69 \pm 60.43$ ;  $p < 0.01$ ).

Tabela 5.5. Urinarna koncentracija MEP/MEHP po polu

	Pol	n	Srednja vrednost $\pm$ SD ( $\mu\text{g/l}$ )	p
MEP	♂	29	123.67 $\pm$ 180.83	0.64
	♀	35	105.27 $\pm$ 135.95	
MEHP	♂	20	139.57 $\pm$ 99.78	0.001
	♀	24	52.69 $\pm$ 60.43	

### **5.5. Razlike u serumskom nivou FT4, FT3 i TSH u kategorijama MEP pozitivnih i negativnih ispitanika**

Razlike u vrednostima FT4, FT3 i TSH u ukrštenim kategorijama MEP pozitivnih i negativnih ispitanika ispitane su t-testom za nezavisne uzorke i Man-Vitnijevim testom. U svim analizama, grupišuće varijable bile su kategorije vrednosti MEP, a „zavisne“ (kvantitativne) varijable bile su vrednosti FT4, FT3 i TSH. Kod svih ispitanika vrednosti tiroidnih hormona i tirotropina bile su u granicama referentnog opsega. Za potrebe sprovođenja t-testa, vrednosti FT4, FT3 i TSH su bile normalizovane Rankit postupkom u okviru statističkog programskog paketa SPSS, dok je Man-Vitnijev test sproveden uz korišćenje sirovih vrednosti zavisnih varijabli.

Deskriptivni pokazatelji za FT4, FT3 i TSH dati su u Tabeli 5.6.

Tabela 5.6. Deskriptivni pokazatelji za tiroidne hormone i tirotropin

<i>n=201</i>	AS	Medijana	SD
FT4(pmol/L)	13.20	13.40	$\pm$ 2.6078
FT3(pmol/L)	4.77	4.70	$\pm$ 1.23969
TSH( $\mu$ IU/mL)	1.97	1.81	$\pm$ 1.03507

### 5.5.1. Vrednosti FT4, FT3 i TSH u grupama MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika

Rezultati t-testa ukazuju na to da u pogledu vrednosti FT4, FT3 i TSH nema značajnih razlika između grupa MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika (Tabela 5.7.). Tabele t-testa za nezavisne uzorke sa deskriptivnim pokazateljima za grupe, Levinovim testom homogenosti varijanse i 95% intervalom poverenja date su u Prilogu 1 (Tabela 8.1.-8.3.). Rezultati Man-Vitnijevog testa ukazuju da postoji marginalno statistički značajna razlika u pogledu vrednosti FT4, pri čemu MEP pozitivni ispitanici imaju više vrednosti ( $p < 0.069$ ).

Tabela 5.7. T-test za nezavisne uzorke po grupama MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika

	t	df	p	Razlika AS
NFT4 T test za homogene varijanse	-1.584	199	0.115	-0.2385175
T test za nehomogene varijanse	-1.622	130.884	0.107	-0.2385175
NFT3 T test za homogene varijanse	-0.838	199	0.403	-0.1265802
T test za nehomogene varijanse	-0.891	144.020	0.375	-0.1265802
NTSH T test za homogene varijanse	-0.811	199	0.418	-0.1227743
T test za nehomogene varijanse	-0.779	111.891	0.437	-0.1227743

Napomena: grupišuća varijabla: MEP.kat

Tabela 5.8. Man-Vitnijev test / Vrednosti rangova po grupama MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika

	MEP.kat	N	Prosečni rang	Suma rangova
FT4	.00 negativni	137	95.91	13,139.50
	1.00 pozitivni	64	111.90	7,161.50
	Total	201		
FT3	.00 negativni	137	99.31	13,606.00
	1.00 pozitivni	64	104.61	6,695.00
	Total	201		
TSH	.00 negativni	137	97.15	13,309.50
	1.00 pozitivni	64	109.24	6,991.50
	Total	201		

Tabela 5.9. *Neparametrijski test za grupe MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika*

	FT4	FT3	TSH
Mann-Whitney U	3,686.500	4,153.000	3,856.500
Wilcoxon W	13,139.500	13,606.000	13,309.500
Z	-1.816	-0.602	-1.373
P	0.069	0.547	0.170

Napomena: grupišuća varijabla: MEP.kat

#### 5.5.2. Serumski nivo FT4, FT3 i TSH u grupama MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika

Rezultati t-testa i neparametrijskog Man-Vitnijevog testa ukazuju na to da u pogledu serumskog nivoa FT4, FT3 i TSH nema značajnih razlika između grupa MEHP pozitivnih i negativnih ispitanika (Tabele 5.10.-5.12.). Tabele t-testa sa deskriptivnim karakteristikama, Levinovim testom homogenosti varijansi, 95% intervalom poverenja date su u Prilogu 1 (Tabela 8.4.-8.6.).

Tabela 5.10. *T-test za nezavisne uzorke za grupe MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika*

	t	df	p	Razlika AS
NFT4 T test za homogene varijanse	0.819	199	0.414	0.1396064
T test za nehomogene varijanse	0.756	62.325	0.452	0.1396064
NFT3 T test za homogene varijanse	0.699	199	0.486	0.1190140
T test za nehomogene varijanse	0.750	76.856	0.455	0.1190140
NTSH T test za homogene varijanse	0.563	199	0.574	0.0962022
T test za nehomogene varijanse	0.588	73.447	0.558	0.0962022

Napomena: grupišuća varijabla: MEHP.kat

Tabela 5.11. Man-Vitnjev test / Vrednosti rangova za grupe MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika

	MEHP.kat	N	Prosečni rang	Suma rangova
FT4	.00 negativni	157	102.28	16,058.00
	1.00 pozitivni	44	96.43	4,243.00
	Total	201		
FT3	.00 negativni	157	101.74	15,973.50
	1.00 pozitivni	44	98.35	4,327.50
	Total	201		
TSH	.00 negativni	157	102.54	16,099.00
	1.00 pozitivni	44	95.50	4,202.00
	Total	201		

Tabela 5.12. Neparametrijski testovi za grupe MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika

	FT4	FT3	TSH
Mann-Whitney U	3,253.000	3,337.500	3,212.000
Wilcoxon W	4,243.000	4,327.500	4,202.000
Z	-0.590	-0.342	-0.710
P	0.555	0.732	0.478

Napomena: grupišuća varijabla: MEHP.kat

### **5.6. Razlike u serumskom nivou FT4, FT3 i TSH u ukrštenim kategorijama gojaznih i normalno uhranjenih MEP pozitivnih i negativnih ispitanika**

Razlike u serumskom nivou FT4, FT3 i TSH u ukrštenim kategorijama gojaznih i normalno uhranjenih MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika ispitane su t-testom za nezavisne uzorke i Man-Vitnijevim testom. U svim testovima, grupišuće varijable bile su kategorije uhranjenosti i vrednosti MEP, a „zavisne“ (kvantitativne) varijable bile su vrednosti FT4, FT3 i TSH. Za potrebe sprovođenja t-testa, vrednosti FT4, FT3 i TSH bile su normalizovane Rankit postupkom u okviru statističkog programskog paketa SPSS, dok je Man-Vitnijev test sproveden uz korišćenje sirovih vrednosti zavisnih varijabli.

#### **5.6.1. T-test za nezavisne uzorke u ukrštenim kategorijama gojaznih i normalno uhranjenih MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika**

Levinov test homogenosti varijansi ukazuje da su varijanse homogene u svim grupama (Prilog2, Tabela8.8.). U Prilogu 2date su i tabele t-testa za nezavisne uzorke sa deskriptivnim pokazateljima i 95% intervalom poverenja za grupe MEP pozitivnih i MEP negativnih gojaznih i normalno uhranjenih ispitanika (Tabela 8.7.-8.10.).

Rezultati t-testa sugerišu da postoji značajna razlika ( $p < 0.047$ ) u pogledu vrednosti FT4 između MEP pozitivnih i MEP negativnih gojaznih ispitanika, pri čemu MEP pozitivni ispitanici imaju više vrednosti FT4 (Tabela 5.13.).



Tabela 5.13. T-test za nezavisne uzorke za podgrupe normalno uhranjenih i gojaznih MEP pozitivnih ispitanika

Uhranjenost			t	df	p
.00 Normalno uhranjeni	NFT4	T-test za hom.var.	0.387	106	0.699
		T-test za nehom. var.	0.409	55.753	0.684
	NFT3	T-test za hom.var	-1.000	106	0.320
		T-test za nehom. var.	-1.130	64.842	0.263
	NTSH	T-test za hom. var.	-0.080	106	0.936
		T-test za nehom. var.	-0.072	41.734	0.943
1.00 Gojazni	NFT4	<b>T-test za hom.var.</b>	<b>-2.013</b>	<b>91</b>	<b>0.047</b>
		T-test za nehom. var.	-2.113	82.567	0.038
	NFT3	T-test za hom. var.	-0.522	91	0.603
		T-test za nehom. var.	-0.541	79.955	0.590
	NTSH	T-test za hom. var.	-1.075	91	0.285
		T-test za nehom. Var.	-1.079	72.701	0.284

Napomena: hom. var.: homogene varijanse; nehom. var.: nehomogene varijanse; Grupišuća varijabla: MEP.kat

### 5.6.2. Neparametrijski testovi u ukrštenim kategorijama gojaznih i normalno uhranjenih MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika

Rezultati Man-Vitnijevog testa potvrđuju rezultat t-testa za nezavisne uzorke: razlike u podgrupama su statistički značajne, pri čemu gojazni MEP pozitivni ispitanici imaju više vrednosti FT4 od normalno uhranjenih MEP pozitivnih ( $p < 0.053$ ) (Tabela 5.14.i 5.15).

Tabela 5.14. *Neparametrijski testovi za podgrupe normalno uhranjenih i gojaznih MEP pozitivnih i negativnih ispitanika; Vrednosti rangova po grupama*

Uhranjenost	MEP. at	Prosečni rang	Suma rangova		
.00 nisu gojazni	FT4	.00 negativni	79	54.41	4.298.50
		1.00 pozitivni	29	54.74	1.587.50
	FT3	.00 negativni	79	52.99	4.186.00
		1.00 pozitivni	29	58.62	1.700.00
	TSH	0 negativni	79	54.07	4.271.50
		1.00 pozitivni	2	55 67	1.614.50
1.00 gojazni	FT4	.00 negativni	58	42.79	2.482.00
		1.00 pozitivni	35	53.97	1.889.00
	FT3	.00 negativni	58	46.23	2.681.50
		1.00 pozitivni	35	48.27	1.689.50
	TSH	.00 negativni	58	43.46	2.520.50
		1.00 pozitivni	35	52.87	1.850.50

Tabela 5.15. *Neparametrijski testovi za podgrupe normalno uhranjenih i gojaznih MEP pozitivnih ispitanika*

Uhranjenost	FT4	FT3	TSH	
.00 normalno uhranjeni	Mann-Whitney U	1,138.500	1,026.000	1,111.500
	Wilcoxon W	4,298.500	4,186.000	4,271.500
	Z	-0.049	-0.830	-0.236
	p	0.961	0.407	0.814
1.00 gojazni	Mann-Whitney U	<b>771.000</b>	970.500	809.500
	Wilcoxon W	<b>2,482.000</b>	2,681.500	2,520.500
	Z	<b>-1.936</b>	-0.353	-1.630
	p	<b>0.053</b>	0.724	0.103

Napomena: grupišuća varijabla: MEP.kat

### **5.7. Razlike u serumskom nivou FT4, FT3 i TSH u podgrupama gojaznih i normalno uhranjenih MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika**

Razlike u serumskom nivou FT3, FT4 i TSH između gojaznih i normalno uhranjenih MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika ispitane su t-testom za nezavisne uzorke i Man-Vitnijevim testom. U svim analizama, grubišuce varijable bile su kategorije uhranjenosti i vrednosti MEHP, a „zavisne“ (kvantitativne) varijable bile su vrednosti FT4, FT3 i TSH. Za potrebe sprovođenja t-testa, vrednosti FT4, FT3 i TSH su bile normalizovane Rankit postupkom u okviru statističkog programskog paketa SPSS, dok je Man-Vitnijev test sproveden uz korišćenje sirovih vrednosti zavisnih varijabli.

#### **5.7.1. T-testovi za nezavisne uzorke u ukrštenim kategorijama gojaznih i normalno uhranjenih MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika**

Levinovi testovi homogenosti varijansi ukazuju da su varijanse homogene u svim grupama, izuzev kod MEHP pozitivnih / negativnih u grupi negojaznih (Prilog 2, Tabela 8.12.). Rezultati t-testa ukazuju na to da je jedina značajna razlika u pogledu vrednosti FT4 između MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika u grupi normalno uhranjenih, pri čemu MEHP pozitivni ispitanici imaju niže vrednosti FT4 (Tabela 5.16.). U Prilogu 2 date su tabele t-testa za nezavisne uzorke sa deskriptivnim karakteristikama grupe i 95% intervalom poverenja (8.11.-8.14.).

Tabela 5.16. T-test za nezavisne uzorke za podgrupe normalno uhranjenih i gojaznih MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika

uhranjenost			t	df	p
.00 Normalno uhranjeni	NFT4	<b>T-test za hom. var.</b>	<b>2.202</b>	<b>106</b>	<b>0.030</b>
		T-test za nehom.var	2.392	20.115	0.027
	NFT3	T-test za hom. var.	-0.557	106	0.578
		T-test za nehom. var.	-0.890	35.748	0.379
	NTSH	T-test za hom.var.	0.188	106	0.851
		T-test za nehom. var.	0.201	19.860	0.842
1.00 Gojazni	NFT4	T-test za hom.var	0.330	91	0.742
		T-test za nehom. var.	0.314	48.323	0.755
	NFT3	T-test za hom.var.	0.803	91	0.424
		T-test za nehom. var.	0.818	56.605	0.417
	NTSH	T-test za hom.var.	0.899	91	0.371
		T-test za nehom. var.	0.872	50.409	0.388

Napomena: grupišuća varijabla: MEHP.kat

### 5.7.2. Neparametrijski testovi u ukrštenim kategorijama gojaznih i normalno uhranjenih MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika

Rezultati Man-Vitnjevog testa potvrđuju rezultat t-testa za nezavisne uzorke - razlike su statistički značajne, pri čemu normalno uhranjeni MEHP pozitivni ispitanici imaju niže vrednosti FT4 od normalno uhranjenih MEHP negativnih (Tabela 5.17. i 5.18.).

Tabela 5.17. *Neparametrijski testovi; Vrednosti rangova za podgrupe normalno uhranjenih i gojaznih MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika*

Uhranjenost		MEHP.kat	N	Prosečni rang	Suma rangova
.00 Normalno uhranjeni	FT4	.00 negativni	93	57.21	5.320.50
		1.00 pozitivni	15	37.70	565.50
	FT3	.00 negativni	93	53.81	5.004.50
		1.00 pozitivni	1	58.77	881.50
	TSH	.00 negativni	93	54.68	5,085.00
		1.00 pozitivni	15	53.40	801.00
1.00 gojazni	FT4	.00 negativni	64	47.20	3,021.00
		1.00 pozitivni	29	46.55	1,350.00
	FT3	.00 negativni	64	47.84	3,061.50
		1.00 pozitivni	29	45.16	1,309.50
	TSH	.00 negativni	64	49.48	3,167.00
		1.00 pozitivni	29	41.52	1,204.00

Tabela 5.18. *Neparametrijski testovi za podgrupe normalno uhranjenih i gojaznih MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika*

Uhranjenost			FT4	FT3	TSH
.00 Normalno uhranjeni		Mann-Whitney U	<b>445.500</b>	633.500	681.000
		Wilcoxon W	<b>565.500</b>	5,004.500	801.000
		Z	<b>-2.241</b>	-0.569	-0.147
		p	<b>0.025</b>	0.569	0.883
1.00 gojazni		Mann-Whitney U	915.000	874.500	769.000
		Wilcoxon W	1,350.000	1,309.500	1,204.000
		Z	-0.108	-0.444	-1.319
		p	0.914	0.657	0.187

Napomena. grupišuća varijabla: MEHP.kat

### **5.8. Relacije ftalata, pola, BMI, FT3, FT4 i TSH: složeniji modeli odnosa**

Rezultati ranijih istraživanja, iako inkonzistentni, sugerišu da je, pored jednostavnih veza između ftalata i hormona, neophodno ispitati i složenije veze, tj. potencijalne efekte interakcije između ftalata i indeksa telesne mase, ftalata i pola, kao i efekte trostruke interakcije. Hijerarhijske linearne multiple regresione analize sprovedene su na celokupnom uzorku od 201 ispitanika da bi se, zbog veličine uzorka, očuvala statistička snaga testa. Naime, sprovođenjem regresionih analiza na poduzorcima ispitanika formiranim prema kategorijama određenih varijabli, povećao bi se rizik od greške tipa I.

Nakon utvrđivanja bivarijatnih relacija između MEP, odnosno MEHP i FT3, FT4 i TSH, ispitani su složeniji modeli relacija primenom hijerarhijskih linearnih multiplih regresionih analiza. Vrednosti hormona su u svim analizama bile kriterijske („zavisne“) varijable, dok su prediktorske („nezavisne“) varijable predstavljali samostalni efekti ftalata, pola i indeksa telesne mase, kao i efekti interakcije. Efekti interakcije su, prema standardnoj proceduri, uvođeni u regresione modele u posebnim koracima. Najpre su uvođeni jednostavniji efekti interakcije (MEP, odnosno MEHP i pol; MEP, odnosno MEHP i BMI), a u poslednjem koraku regresione analize najsloženiji efekti interakcije (MEP, odnosno MEHP, pol i BMI). Tako u svakoj analizi *Model 1* predstavlja model "glavnih", odnosno samostalnih efekata MEP/MEHP, pola i BMI; *Model 2*, pored ovih efekata, uključuje efekat interakcije MEP, odnosno MEHP i pola, *Model 3*, uz prethodno navedene, i efekat interakcije MEP/MEHP i BMI, a *Model 4*, uz sve prethodne, i efekat interakcije MEP/MEHP, pola i BMI.

#### **5.8.1. Relacije MEP, pola, BMI i pokazatelja tiroidne funkcije**

##### **5.8.1.1. Relacije MEP, pola, BMI i FT4**

Regresioni modeli su značajni u sva četiri koraka analize (Tabela 5.20), ali efekti interakcije nemaju značajan doprinos (Tabela 5.19.) tj. značajni su samo efekti dobijeni na celom uzorku, a u podgrupama nema razlika u pogledu veze između MEP i FT4. Prediktorske varijable objašnjavaju približno 4% varijanse FT4.

Tabela 5.19. Koeficijenti multiple korelacije za regresione modele

Model	R	Koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )	Korigovani koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )	Standardna greška procene	Promena koeficijenta determinacije ( $\Delta R^2$ )	$\Delta F$	df1	df2	Nivo značajnosti $\Delta F$
1	0.257	0.066	0.052	0.9721585	0.066	4.657	3	197	0.004
2	0.257	0.066	0.047	0.9746347	0	0	1	196	0.987
3	0.262	0.069	0.045	0.9757961	0.003	0.534	1	1 5	0.466
4	0.264	0.07	0.041	0.9778158	0.001	0.195	1	194	0.659

Legenda: Model 1: MEP, pol, BMI; Model 2: MEP, pol, BMI, MEP\*pol; Model 3: MEP, pol, BMI, MEP\*pol, MEP\*BMI; Model 4: MEP, pol, BMI, MEP\*pol, MEP\*BMI, MEP\*pol\*BMI; Kriterijska varijabla: FT4

Tabela 5.20. Značajnost regresionih modela

Model		Suma kvadrata	df	Prosečni kvadrat	F	p
1	Regresija	13.203	3	4.401	4.657	<b>0.004</b>
	Rezidual	186.183	197	0.945		
	Ukupno	199.386	200			
2	Regresija	13.203	4	3.301	3.475	<b>0.009</b>
	Rezidual	186.183	196	0.950		
	Ukupno	199.386	200			
3	Regresija	13.712	5	2.742	2.880	<b>0.016</b>
	Rezidual	185.675	195	0.952		
	Ukupno	199.386	200			
4	Regresija	13.898	6	2.316	2.423	<b>0.028</b>
	Rezidual	185.488	194	0.956		
	Ukupno	199.386	200			

Parcijalni doprinosi prediktora (Tabela 5.21.) u prvom koraku analize ukazuju da značajne parcijalne doprinose predikciji vrednosti FT4 daju MEP i BMI u pozitivnom smeru - rezultati sugerišu da više vrednosti MEP i BMI korespondiraju sa višim vrednostima FT4. Drugim rečima,

ispitanici sa visokim vrednostima MEP će imati viši FT4 i kada se gojaznost kontroliše tj. kod ljudi sa istom telesnom masom oni sa višim MEP imaće i viši FT4 i kod ljudi sa istim vrednostima MEP, gojazniji će imati viši FT4. Uočava se tendencija ka pojavi značajnog efekata pola (predznak koeficijenta je negativan što ukazuje na to da su kod muškaraca zabeležene više vrednosti FT4), ali nije dostignuta statistička značajnost. Uvođenjem efekata interakcije, samostalni efekti prediktora gube značajnost, te u poslednjem koraku analize, jedini marginalno značajan parcijalni doprinos predikciji ima indeks telesne mase, u pozitivnom smeru ( $p < 0.072$ ); ispitanici sa višim BMI imaju viši nivo FT4).

Tabela 5.21. Parcijalni doprinosi prediktora

	Model	Beta	t	p
1	Konstanta		1.674	0.096
	M P	<b>0.155</b>	<b>2.248</b>	<b>0.026</b>
	Pol	-0.122	-1.754	0.081
	BMI	<b>0.140</b>	<b>2.013</b>	<b>0.045</b>
2	Konstanta		1.670	0.097
	MEP	0.152	0.674	0.501
	Pol	-0.122	-1.749	0.082
	BMI	<b>0.140</b>	<b>1.991</b>	<b>0.048</b>
	MEP*pol	0.004	0.016	0.987
3	Konstanta		1.551	0.123
	MEP	0.104	0.444	0.658
	Pol	-0.115	-1.625	0.106
	BMI	<b>0.141</b>	<b>2.000</b>	<b>0.047</b>
	MEP*pol	0.052	0.220	0.826
	MEP*BMI	0.053	0.731	0.466
4	Konstanta		1.511	0.132
	MEP	0.085	0.356	0.722
	Pol	-0.114	-1.608	0.110
	BMI	0.132	1.801	0.073
	MEP*pol	0.062	0.261	0.795
	MEP*BMI	0.167	0.624	0.533
	MEP*BMI*pol	-0.117	-0.442	0.659

Zavisna varijabla FT4; kod varijable pola: 1.00 muškarci, 2.00 žene;



5.8.1.2. Relacije MEP, pola, BMI i FT3

Regresioni modeli su značajni u sva četiri koraka analize (Tabela 5.23.), ali efekti interakcije nemaju značajan doprinos (Tabela 5.22.) tj. značajni su samo glavni efekti. Prediktorski skup objašnjava približno 5% varijanse FT3.

Tabela 5.22. Koeficijenti multiple korelacije za regresione modele

Model	R	Koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )	Korigovani koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )	Standardna greška procene	Promena koeficijenta determinacije ( $\Delta R^2$ )	$\Delta F$	df1	df2	Nivo značajnosti $\Delta F$
1	0.255	0.065	0.051	0.9715935	0.065	4.564	3	197	0.004
2	0.271	0.073	0.054	0.9697546	0.008	1.748	1	196	0.188
3	0.290	0.084	0.061	0.966572	0.011	2.293	1	95	0.32
4	0.290	0.084	0.056	0.9689465	0	0.045	1	194	0.831

Napomena: Model 1: MEP, pol, BMI; Model 2: MEP, pol, BMI, MEP\*pol; Model 3: MEP, pol, BMI, MEP\*pol, MEP\*BMI; Model 4: MEP, pol, BMI, MEP\*pol, MEP\*BMI, MEP\*pol\*BMI; Kriterijska varijabla: FT3

Tabela 5.23. Značajnost regresionih modela

	Model	Suma kvadrata	df	Prosečni kvadrat	F	p
1	Regresija	12.926	3	4.309	4.564	0.004
	Rezidual	185.967	197	0.944		
	Ukupno	198.892	200			
2	Regresija	14.569	4	3.642	3.873	0.005
	Rezidual	184.323	196	0.940		
	Ukupno	198.892	200			
3	Regresija	16.711	5	3.342	3.577	0.004
	Rezidual	182.181	195	0.934		
	Ukupno	198.892	200			
4	Regresija	16.754	6	2.792	2.974	0.008
	Rezidual	182.138	194	0.939		
	Ukupno	198.892	200			

U svim regresionim modelima, jedini značajan efekat ima pol, sa negativnim predznakom, što ukazuje na to da su u grupi muškaraca zabeležene više vrednosti FT3. Iako je dostignuta statistička značajnost, efekat bi trebalo oprezno tumačiti, jer je dobijen uz kontrolu svih drugih relevantnih varijabli (Tabela 5.24.).

Tabela 5.24. Parcijalni doprinosi prediktora

	Model	Beta	t	p
1	Konstanta		3.313	0.001
	MEP	0.022	0.325	0.746
	<b>Pol</b>	<b>-0.242</b>	<b>-3.470</b>	<b>0.001</b>
	BMI	-0.116	-1.665	0.098
2	Konstanta		3.329	0.001
	MEP	-0.260	-1.158	0.248
	<b>Pol</b>	<b>-0.241</b>	<b>-3.465</b>	<b>0.001</b>
	BMI	-0.103	-1.467	0.144
	MEP*pol	0.296	1.322	0.188
3	Konstanta		3.517	0.001
	MEP	-0.162	-0.697	0.487
	<b>Pol</b>	<b>-0.256</b>	<b>-3.657</b>	<b>0.000</b>
	BMI	-0.105	-1.496	0.136
	MEP*pol	0.197	0.848	0.397
	MEP*BMI	-0.109	-1.514	0.132
4	Konstanta		3.515	0.001
	MEP	-0.153	-0.645	0.520
	<b>Pol</b>	<b>-0.257</b>	<b>-3.652</b>	<b>0.000</b>
	BMI	-0.100	-1.379	0.170
	MEP*pol	0.193	0.822	0.412
	MEP*BMI	-0.164	-0.618	0.537
	MEP*BMI*pol	0.056	0.213	0.831

Zavisna varijabla: FT3; kod varijable pola: 1.00 muškarci, 2.00 žene

5.8.1.3. Relacije MEP, pola, indeksa telesne mase i TSH

Regresioni model nije statistički značajan u prva tri koraka tj. modela (Tabela 5.26). To znači da nisu zabeleženi samostalni efekti MEP i BMI na serumski nivo TSH, dok je efekat pola statistički značajan u svim modelima (Tabela 5.27.) u smislu postojanja višeg serumskog nivoa TSH kod ispitanika ženskog pola. Pošto se radi o malom doprinosu i verovatno malim polnim razlikama, Modeli 1, 2 i 3 ipak nisu statistički značajni, Takođe nisu značajne ni interakcije MEP\*BMI, MEP\*pol. Regresioni model je statistički značajan jedino u poslednjem koraku (tabela 5.25). U ovom koraku značajan je doprinos interakcije MEP, pola i BMI objašnjenju varijanse TSH ( $p < 0.036$ ), iako navedene varijable samostalno nemaju efekat (Tabela 5.27.). Prediktorske varijable objašnjavaju približno 2,5% varijanse TSH.

Tabela 5.25. Koeficijenti multiple korelacije za regresione modele

Model	R	Koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )	Korigovani koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )	Standardna greška p ocene	Promena koeficijenta determinacije ( $\Delta R^2$ )	$\Delta F$	df1	df2	Nivo značajnosti $\Delta F$	
1	0.174	0.03	0.016	0.9913551	0.03	2.057	3	197	0.107	
2	0.175	0.03	0.011	0.9938219	0	0.023	1	196	0.879	
3	0.179	0.032	0.007	0.9956302	0.001	0.289	1	195	0.592	
<b>4</b>	<b>0.232</b>	<b>0.054</b>	<b>0.025</b>	<b>0.98686</b>	<b>4</b>	<b>0.022</b>	<b>4.479</b>	<b>1</b>	<b>194</b>	<b>0.036</b>

Napomena: Model 1: MEP, pol, BMI; Model 2: MEP, pol, BMI, MEP\*pol; Model 3: MEP, pol, BMI, MEP\*pol, MEP\*BMI; Model 4: MEP, pol, BMI, MEP\*pol, MEP\*BMI, MEP\*pol\*BMI; Kriterijska varijabla: TSH

Tabela 5.26. Značaj regresionih modela

	Model	Suma kvadrata	df	Prosečni kvadrat	F	p
1	Regresija	6.064	3	2.021	2.057	0.107
	Rezidual	193.609	197	0.983		
	Ukupno	199.673	200			
2	Regresija	6.087	4	1.522	1.541	0.192
	Rezidual	193.586	196	0.988		
	Ukupno	199.673	200			
3	Regresija	0.374	5	1.275	1.286	0.271
	Rezidual	193.299	195	0.991		
	Ukupno	199.673	200			
4	Regresija	10.736	6	1.789	1.837	0.094
	Rezidual	188.937	194	0.974		
	Ukupno	199.673	200			

U poslednjem koraku analize, značajne doprinose predikciji daju pol i efekat interakcije MEP, BMI i pola, dok interakcija MEP i BMI ima marginalno značajan doprinos. Imajući u vidu da je najkompleksniji efekat interakcije značajan ( $p < 0.036$ ), može se pretpostaviti da on daje najmanje pristrasnu sliku o relacijama između MEP, BMI, pola i TSH.

Radi ilustracije delovanja interakcije sprovedeni su Pirsonov i neparametrijski testovi korelacije koji potvrđuju da niska pozitivna korelacija između MEP i TSH postoji jedino u grupi gojaznih žena.

Tabela 5.27. *Parcijalni doprinosi prediktora*

Model	Beta	t	p
1 Konstanta		-2.143	0.033
MEP	0.06	0.848	0.397
<b>Pol</b>	<b>0.159</b>	<b>2.245</b>	<b>0.026</b>
BMI	-0.033	-0.464	0.643
2 Konstanta		-2.137	0.034
MEP	0.026	0.115	0.909
<b>Pol</b>	<b>0.159</b>	<b>2.24</b>	<b>0.026</b>
BMI	-0.031	-0.437	0.662
MEP*pol	0.035	0.152	0.879
3 Konstanta		-2.187	0.03
MEP	-0.009	-0.039	0.969
<b>Pol</b>	<b>0.165</b>	<b>2.29</b>	<b>0.023</b>
BMI	-0.031	-0.428	0.669
MEP*pol	0.071	0.297	0.767
MEP*BMI	0.04	0.537	0.592
4 Konstanta		-2.045	0.042
MEP	0.083	0.344	0.731
<b>Pol</b>	<b>0.161</b>	<b>2.248</b>	<b>0.026</b>
BMI	0.012	0.158	0.875
MEP*pol	0.024	0.1	0.921
MEP*BMI	-0.508	-1.888	0.061
<b>MEP*BMI*pol</b>	<b>0.563</b>	<b>2.116</b>	<b>0.036</b>

Napomena: Zavisna varijabla: TSH; kod varijable pola: 1.00 muškarci, 2.00 žene

#### 5.8.1.4. Nivo TSH u odnosu na interakciju pola, BMI i MEP

Radi ilustracije delovanja prethodno navedene interakcije sprovedeni su Pirsonovi i neparametrijski testovi korelacije koji ukazuju da niska pozitivna korelacija između MEP i TSH postoji jedino u grupi gojaznih žena (Kendalov Tau B 0.268;  $p < 0.012$ , Tau C 0.194;  $p < 0.012$ , Gama koeficijent 0.390;  $p < 0.012$ ; za Spirmanov koeficijent 0.333;  $p < 0.017$ ; Pirsonov r 0.289;  $p < 0.04$ ) (Tabela 5.28.).

Tabela 5.28. Interakcija pola, BMI i MEP: kriterijum TSH

Pol	Uhranjenost		Koeficijent	p
1.00 Muškarci	.00 Normalno uhranjeni	Kendalov Tau - B	0.026	0.864
		Kendalov Tau - C	0.016	0.864
		Gama	0.044	0.864
		Spirmanov koeficijent	0.044	0.777
		Pirsonov r	0.092	0.551
		N	44	
	1.00 Gojazni	Kendalov Tau - B	0.003	0.980
		Kendalov Tau - C	0.002	0.980
		Gama	0.003	0.980
		Spirmanov koeficijent	0.009	0.955
Pirsonov r		-0.045	0.780	
2.00 Žene	.00 Normalno uhranjene	Kendalov Tau - B	-0.036	0.678
		Kendalov Tau - C	-0.027	0.678
		Gama	-0.050	0.678
		Spirmanov koeficijent	-0.044	0.728
		Pirsonov r	-0.068	0.596
		N	4	
	1.00 Gojazne	<b>Kendalov Tau - B</b>	<b>0.268</b>	<b>0.012</b>
		<b>Kendalov Tau - C</b>	<b>0.194</b>	<b>0.012</b>
		<b>Gama</b>	<b>0.390</b>	<b>0.012</b>
		<b>Spirmanov koeficijent</b>	<b>0.333</b>	<b>0.017</b>
		<b>Pirsonov r</b>	<b>0.289</b>	<b>0.040</b>
	N	51		

### 5.8.2. Relacije MEHP, pola, BMI i pokazatelja tiroidne funkcije

#### 5.8.2.1. Relacije MEHP, pola, BMI i FT4

Regresioni modeli značajni su u svim koracima (Tabela 5.30.), pri čemu interakcija između MEHP i indeksa telesne mase daje značajan doprinos objašnjenju varijanse FT4 u trećem koraku analize (Tabela 5.31.). Prediktorski skup objašnjava približno 7% varijanse FT4.

Tabela 5.29. Koeficijenti multiple korelacije za regresione modele

Model	R	Koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )	Korigovani koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )	Standardna greška procene	Promena koeficijenta determinacije (ΔR <sup>2</sup> )	ΔF	df1	df2	Nivo značajnosti ΔF
1	0.25	0.055	0.041	0.9778932	0.055	3.834	3	197	0.011
2	0.236	0.056	0.037	0.9800597	0.001	0.13	1	196	0.719
<b>3</b>	<b>0.296</b>	<b>0.088</b>	<b>0.065</b>	<b>0.9657147</b>	<b>0.032</b>	<b>6.866</b>	<b>1</b>	<b>195</b>	<b>0.009</b>
4	0.305	0.093	0.065	0.9655397	0.005	1.071	1	194	0.302

Legenda: Model 1: MEHP, pol, BMI; Model 2: MEHP, pol, BMI, MEHP\*pol; Model 3: MEHP, pol, BMI, MEHP\*pol, MEHP\*BMI; Model 4: MEHP, pol, BMI, MEHP\*pol, MEHP\*BMI, MEHP\*pol\*BMI; Kriterijska varijabla: FT4

Tabela 5.30. Značajnost regresionih modela

	Model	Suma kvadrata	df	Prosečni kvadrat	F	p
1	Regresija	11.000	3	3.667	3.834	<b>0.011</b>
	Rezidual	188.386	197	0.956		
	Ukupno	199.386	200			
2	Regresija	11.125	4	2.781	2.896	<b>0.023</b>
	Rezidual	188.261	196	0.961		
	Ukupno	199.386	200			
3	Regresija	17.528	5	3.506	3.759	<b>0.003</b>
	Rezidual	181.858	195	0.933		
	Ukupno	199.386	200			
4	Regresija	18.527	6	3.088	3.312	<b>0.004</b>
	Rezidual	180.860	194	0.932		
	Ukupno	199.386	200			

Značajne parcijalne doprinose predikciji FT4 u trećem koraku analize imaju pol (muškarci postižu više vrednosti), BMI i interakcija između BMI i pola. Uvođenjem kompleksnijeg efekta interakcije, značajnost interakcije između MEHP i BMI se gubi (Tabela 5.31.).

Efekat interakcije MEHP i BMI uočen u trećem koraku analize ( $p < 0.009$ ) sugerije da je niska negativna korelacija između MEHP i FT4 prisutna samo u podgrupi normalno uhranjenih ispitanika - u ovoj grupi, više vrednosti MEHP korespondiraju sa nižim vrednostima FT4. U podgrupi gojaznih ispitanika nema značajne korelacije.



Tabela 5.31. Parcijalni doprinosi prediktora

		Beta	t	p
1	Konstanta		1.880	0.062
	MEHP	-0.116	-1.641	0.102
	Pol	-0.138	-1.970	0.050
	BMI	0.164	2.302	0.022
2	Konstanta		1.859	0.065
	MEHP	-0.044	-0.207	0.836
	Pol	-0.138	-1.960	0.051
	BMI	0.168	2.325	0.021
	MEHP*pol	-0.077	-0.361	0.719
3	Konstanta		1.964	0.051
	MEHP	-0.115	-0.545	0.586
	<b>Pol</b>	<b>-0.157</b>	<b>-2.256</b>	<b>0.025</b>
	<b>BMI</b>	<b>0.204</b>	<b>2.813</b>	<b>0.005</b>
	MEHP*pol	-0.077	-0.366	0.714
	<b>MEHP*BMI</b>	<b>0.194</b>	<b>2.620</b>	<b>0.009</b>
4	Konstanta		2.087	0.038
	MEHP	-0.029	-0.129	0.898
	<b>Pol</b>	<b>-0.170</b>	<b>-2.404</b>	<b>0.017</b>
	<b>BMI</b>	<b>0.209</b>	<b>2.877</b>	<b>0.004</b>
	MEHP*pol	-0.157	-0.697	0.486
	MEHP*BMI	-0.054	-0.216	0.829
	MEHP*BMI*pol	0.258	1.035	0.302

Napomena: zavisna varijabla FT4; kod varijable pola: 1.00-muškarci; 2.00-žene;

5.8.2.2. Interakcija MEHP i indeksa telesne mase: Pirsonov i neparametrijski koeficijenti korelacije između MEHP i FT4 u kategorijama gojaznih i normalno uhranjenih ispitanika

Prethodno navedena interakcija MEHP i BMI proverena je i Pirsonovim i neparametrijskim testovima korelacija (Tabela 5.32.). Rezultati neparametrijskih testova potvrđuju statistički značajno niže vrednosti FT4 u podgrupi normalno uhranjenih MEHP

pozitivnih ispitanika (Kendal Tau-B -0.168;  $p < 0.04$ ; Kendalov Tau-C -0.089;  $p < 0.04$ , Gama -0.331;  $p < 0.04$ , Spirmanov koeficijent -0.207;  $p < 0.03$ ). Rezultat Pirsonove korelacije je na samoj granici statističke značajnosti:  $r = -0.185$ ;  $p < 0.056$ .

Tabela 5.32. Pirsonovi i neparametrijski koeficijenti korelacije MEHP i FT4

	Uhranjenost	Koeficijent	p
.00 Normalno uhranjeni	Kendalov Tau - B	<b>-0.168</b>	<b>0.040</b>
	Kendalov Tau - C	<b>-0.089</b>	<b>0.040</b>
	Gama	<b>-0.331</b>	<b>0.040</b>
	Spirmanov koeficijent	<b>-0.207</b>	<b>0.031</b>
	Pirsonov r	<b>-0.185</b>	<b>0.056</b>
	N	108	
1.00 Gojazni	Kendalov Tau - B	-0.026	0.749
	Kendalov Tau - C	-0.019	0.749
	Gama	-0.036	0.749
	Spirmanov koeficijent	-0.032	0.761
	Pirsonov r	-0.057	0.587
	N	93	

### 5.8.2.3. Relacije MEHP, pola, BMI i FT3

Regresioni modeli su značajni u svim koracima analize, pri čemu najkompleksniji efekat interakcije ima značajan doprinos u posljednjem koraku analize (Tabela 5.33., 5.34 i 5.35). Regresioni model objašnjava približno 7% varijanse FT3.

Tabela 5.33. Koeficijenti multiple korelacije za regresione analize

Model	R	Koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )	Korigovani koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )	Standardna greška procene	Promena koeficijenta determinacije ( $\Delta R^2$ )	$\Delta F$	df1	df2	Nivo značajnosti $\Delta F$
1	0.256	0.066	0.052	0.9711938	0.066	4.622	3	197	0.004
2	0.256	0.066	0.047	0.9736588	0	0.004	1	196	0.951
3	0.270	0.073	0.049	0.9723464	0.007	1.529	1	195	0.218
4	0.315	0.099	0.071	0.9609874	0.026	5.637	1	194	0.019

Napomena: Model 1: MEHP, pol, BMI; Model 2: MEHP, pol, BMI, MEHP\*pol; Model 3: MEHP, pol, BMI, MEHP\*pol, MEHP\*BMI; Model 4: MEHP, pol, BMI, MEHP\*pol, MEHP\*BMI, MEHP\*pol\*BMI; Kriterijska varijabla: FT3

Tabela 5.34. Značajnost regresionih modela

	Model	Suma kvadrata	df	Prosečni kvadrat	F	p
1	Regresija	13.079	3	4.360	4.622	<b>0.004</b>
	Rezidual	185.814	197	0.943		
	Ukupno	198.892	200			
2	Regresija	13.082	4	3.271	3.450	<b>0.009</b>
	Rezidual	185.810	196	0.948		
	Ukupno	198.892	200			
3	Regresija	14.528	5	2.906	3.073	<b>0.011</b>
	Rezidual	184.364	195	0.945		
	Ukupno	198.892	200			
4	Regresija	19.734	6	3.289	3.561	<b>0.002</b>
	Rezidual	179.158	194	0.923		
	Ukupno	198.892	200			

U poslednjem koraku analize, najkompleksniji efekat interakcije (MEHP\*BMI\*pol) ima značajan efekat ( $p < 0.019$ ) (Tabela 5.35.). Neparametrijski koeficijenti korelacije izračunati radi

ilustracije interakcije ukazuju na marginalno statistički značajnu negativnu korelaciju između MEHP i FT3 samo u grupi normalno uhranjenih muškaraca tj. uočava se tendencija da u podgrupi normalno uhranjenih MEHP pozitivnih muškaraca opada serumski nivo FT3 (Kendalov Tau B -0.164;  $p < 0.093$ , Kendalov Tau C -0.106;  $p < 0.093$ , Gama -0.277;  $p < 0.093$ ) (tabela 5.36.). Ovaj efekat je uzet u obzir zbog statističke značajnosti interakcije MEHP\*BMI\*pol ( $p < 0.019$ ). (Tabela 5.35.i Tabela 5.36.).

Tabela 5.35. Parcijalni doprinosi prediktora

	Model	Beta	t	p
1	Konstanta		3.361	0.001
	MEHP	-0.036	-0.517	0.605
	<b>Pol</b>	<b>-0.245</b>	<b>-3.52</b>	<b>0.001</b>
	BMI	-0.109	-1.535	0.126
2	Konstanta		3.352	0.001
	MEHP	-0.049	-0.23	0.818
	<b>Pol</b>	<b>-0.245</b>	<b>-3.511</b>	<b>0.001</b>
	BMI	-0.109	-1.523	0.129
	MEHP*pol	0.013	0.062	0.951
3	Konstanta		3.318	0.001
	MEHP	-0.015	-0.07	0.944
	<b>Pol</b>	<b>-0.236</b>	<b>-3.365</b>	<b>0.001</b>
	BMI	-0.126	-1.732	0.085
	MEHP*pol	0.013	0.062	0.951
	MEHP*BMI	-0.092	-1.237	0.218
4	Konstanta		3.003	0.003
	MEHP	-0.211	-0.935	0.351
	<b>Pol</b>	<b>-0.207</b>	<b>-2.931</b>	<b>0.004</b>
	<i>BMI</i>	<i>-0.138</i>	<i>-1.908</i>	<i>0.058</i>
	MEHP*pol	0.194	0.869	0.386
	<i>MEHP*BMI</i>	<i>0.476</i>	<i>1.9</i>	<i>0.059</i>
	<b>MEHP*BMI*pol</b>	<b>-0.59</b>	<b>-2.374</b>	<b>0.019</b>

Napomena: zavisna varijabla FT3; kod varijable pola: 1.00-muškarci; 2.00-žene;

Tabela 5.36. Efekat interakcije: korelacije između MEHP, pola i BMI: kriterijum FT3

Pol	Uhranjenost		Koeficijent	p		
1.00 muški	.00 Normalno uhranjeni	Kendalov Tau - B	-0.164	0.093		
		Kendalov Tau – C	-0.106	0.093		
		Gama	-0.277	0.093		
		Spirmanov koeficijent	-0.202	0.189		
		Pirsonov r	-0.221	0.149		
		N	44			
	1.00 gojazni	Kendalov Tau – B	0.082	0.408		
		Kendalov Tau – C	0.058	0.408		
		Gama	0.125	0.408		
		Spirmanov koeficijent	0.100	0.529		
		Pirsonov r	0.088	0.579		
		N	42			
		2.00 ženski	.00 Normalno uhranjeni	Kendalov Tau – B	0.118	0.160
				Kendalov Tau – C	0.056	0.160
Gama	0.284			0.160		
Spirmanov koeficijent	0.143			0.261		
Pirsonov r	0.140			0.269		
N	64					
1.00 gojazni	Kendalov Tau – B		-0.159	0.170		
	Kendalov Tau – C		0.123	0.170		
	Gama		-0.211	0.170		
	Spirmanov koeficijent		-0.208	0.143		
		Pirsonov r	-0.222	0.117		
		N	51			

#### 5.8.2.4. Relacije MEHP, pola, BMI i TSH

Dobijeni rezultati sprovedenih hijerarhijskih linearnih multiplih regresionih analiza ukazuju na to da nijedan od regresionih modela nije statistički značajan, tj. da nema samostalnih efekata MEHP, BMI i pola, kao ni efekata interakcija na serumski nivo TSH (Tabele 5.37-5.39.).

Tabela 5.37. Koeficijenti multiple korelacije za regresione analize

Model	R	Koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )	Korigovani koeficijent determinacije (R <sup>2</sup> )	Standardna greška procene	Promena koeficijenta determinacije ( $\Delta R^2$ )	$\Delta F$	df1	df2	Nivo značajnosti $\Delta F$
1	0.164 <sup>a</sup>	0.027	0.012	0.9931091	0.027	1.818	3	197	0.145
2	0.168 <sup>b</sup>	0.028	0.008	0.994967	0.001	0.265	1	196	0.607
3	0.171 <sup>c</sup>	0.029	0.004	0.9970668	0.001	0.175	1	195	0.676
4	0.188 <sup>d</sup>	0.035	0.005	0.9964663	0.006	1.235	1	194	0.268

Napomena: Model 1: MEHP, pol, BMI; Model 2: MEHP, pol, BMI, MEHP\*pol; Model 3: MEHP, pol, BMI, MEHP\*pol, MEHP\*BMI; Model 4: MEHP, pol, BMI, MEHP\*pol, MEHP\*BMI, MEHP\*pol\*BMI; Kriterijska varijabla: TSH

Tabela 5.38. Značajnost regresionih modela

Model	Suma kvadrata	df	Prosečni kvadrat	F	p	
1	Regresija	5.379	3	1.793	1.818	0.145
	Rezidual	194.294	197	0.986		
	Ukupno	199.673	200			
2	Regresija	5.641	4	1.410	1.425	0.227
	Rezidual	194.032	196	0.990		
	kupno	199.673	200			
3	Regresija	5.815	5	1.163	1.170	0.325
	Rezidual	193.858	195	0.994		
	Ukupno	199.673	200			
4	Regresija	7.042	6	1.174	1.182	0.317
	Rezidual	192.631	194	0.993		
	Ukupno	199.673	200			

Tabela 5.39. Parcijalni doprinosi prediktora

Model		Beta	t	p
1	Konstanta		-2.106	0.036
	MEHP	0.011	0.147	0.883
	Pol	0.157	2.205	0.029
	BMI	-0.034	-0.473	0.637
2	Konstanta		-2.122	0.035
	MEHP	0.115	0.534	0.594
	Pol	0.157	2.209	0.028
	BMI	-0.028	-0.389	0.698
	MEHP*pol	-0.112	-0.515	0.607
3	Konstanta		-2.129	0.034
	MEHP	0.127	0.582	0.561
	Pol	0.161	2.236	0.026
	BMI	-0.034	-0.46	0.646
	MEHP*pol	-0.112	-0.514	0.608
	MEHP*BMI	-0.032	-0.419	0.676
4	Konstanta		-2.262	0.025
	MEHP	0.032	0.136	0.892
	Pol	0.175	2.399	0.017
	BMI	-0.04	-0.535	0.594
	MEHP*pol	-0.024	-0.104	0.917
	MEHP*BMI	0.243	0.938	0.349
	MEHP*BMI*pol	-0.286	-1.111	0.268

Napomena; zavisna varijabla FT4; kod varijable pola: 1.00-muškarci; 2.00-žene;

### 5.9. Korelacije leptina sa estrima ftalne kiseline i pokazateljima tiroidne funkcije

Serumski nivo leptina određivan je kod gojaznih ispitanika kojih je bilo 93 (46.3%) u celokupnom uzorku.

#### 5.9.1. Razlike u serumskom nivou leptina između MEP pozitivnih i MEP negativnih gojaznih ispitanika

Razlike u serumskom nivou leptina u kategorijama MEP pozitivnih i MEP negativnih gojaznih ispitanika ispitane su t-testom za nezavisne uzorke i Man-Vitnijevim testom. U svim analizama, grupišuće varijable bile su kategorije vrednosti MEP, a „zavisne“ (kvantitativne) varijable bile su vrednosti leptina. Za potrebe sprovođenja t-testa, vrednosti leptina su bile normalizovane Rankit postupkom u okviru statističkog programskog paketa SPSS, dok je Man-Vitnijev test urađen uz korišćenje sirovih vrednosti zavisne varijable.

Rezultati sprovedenih statističkih analiza ukazuju da nema statistički značajnih razlika u serumskom nivou leptina između podgrupa MEP pozitivnih i MEP negativnih gojaznih ispitanika (Tabela 5.40. - 5.42.).

Tabelarni prikaz aritmetičke sredine, razlike aritmetičke sredine, standardne devijacije, Levinovog testa homogenosti varijansi i 95% intervala poverenja nalazi se u Prilogu 3 (Tabela 8.15. - 8.18).

Tabela 5.40. T-test za nezavisne uzorke

		t	df	p
Normal.skor leptina po Rankit formuli	T test za hom.var.	-0.316	91	0.753
	T test za nehom. var.	-0.317	72.776	0.752

Napomena hom.var.: homogene varijanse; nehom.var: nehomogene varijanse; grupišuća varijabla: MEP.kat

Man-Vitnijev test za razlike u serumskom nivou leptina između MEP pozitivnih i MEP negativnih gojaznih ispitanika (Tabela 5.41.).



Tabela 5.41. Man-Vitnijev test / Vrednosti rangova po grupama MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika

MEP.kat	N	Prosečni rang	Suma rangova
Negativni	58	46.47	2,695.50
Pozitivni	35	47.87	1,675.50
Total	93		

Tabela 5.42. Neparametrijski testovi za serumski nivo leptina kod MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika

	leptin
Mann-Whitney U	984.500
Wilcoxon W	2,695.500
Z	-0.242
p	0.809

Grupišuća varijabla: MEP.kat

### 5.9.2. Razlike u serumskom nivou leptina između MEHP pozitivnih i MEHP negativnih gojaznih ispitanika

Razlike u serumskom nivou leptina u kategorijama MEHP pozitivnih i MEHP negativnih gojaznih ispitanika ispitane su t-testom za nezavisne uzorke i Man-Vitnijevim testovima. U svim analizama, grupišuće varijable bile su kategorije vrednosti MEHP, a „zavisne“ (kvantitativne) varijable bile su vrednosti leptina. Za potrebe sprovođenja t-testa, vrednosti leptina su bile normalizovane Rankit postupkom u okviru statističkog programskog paketa SPSS, dok je Man-Vitnijev test urađen uz korišćenje sirovih vrednosti zavisne varijable. Tabela prikaz aritmetičke sredine, razlike aritmetičke sredine, standardne devijacije, Levinovog testa homogenosti varijansi i 95% intervala poverenja nalazi se u Prilogu 4 (Tabela 8.19.-8.22).

Rezultati sprovedenih analiza ukazuju da nema statistički značajnih razlika u serumskom nivou leptina između podgrupa MEHP pozitivnih i MEHP negativnih gojaznih ispitanika (Tabele 5.43. - 5.45.)

Tabela 5.43. T-test za nezavisne uzorke po grupama MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika

		t	df	p
Normal. skor leptinapo Rankit formuli	T test za homogene varijanse	-1.049	91	0.297
	T test za nehomogene varijanse	-1.003	48.797	0.321

Tabela 5.44. Man-Vitnijev test /Vrednosti rangova po grupama MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika

	MEHP.kat	N	Prosečni rang	Suma rangova
leptin	.00 negativni	64	44.41	2,842.00
	1.00 pozitivni	29	52.72	1,529.00
	Total	93		

Tabela 5.45. Neparametrijski testovi za serumske nivoe leptina kod MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika:

		leptin
Mann-Whitne U		762.000
Wilcoxon W		2,842.000
Z		-1.377
p		0.169

Grupišuća varijabla: MEHP.kat

5.9.3. Uticaj leptina na serumski nivo FT4, FT3 i TSH kod gojaznih MEP pozitivnih ispitanika

Korelacije između vrednosti leptina, FT4, FT3 i TSH ispitane su na poduzorku gojaznih MEP pozitivnih ispitanika Pirsonovim koeficijentima (pri čemu su korišćene normalizovane vrednosti) i neparametrijskim koeficijentima (Spirmanov i Kendalov Tau-B koeficijent, pri čemu su korišćene sirove vrednosti).

Pirsonov koeficijent korelacije između leptina i FT4 je statistički značajan, negativan i nizak, što ukazuje da više vrednosti leptina korespondiraju s nižim vrednostima FT4 ( $r=-0.347$ ;  $p < 0.041$ ) (Tabela 5.46.). Međutim, neparametrijski koeficijenti nisu statistički značajni (Tabela 5.47.).

Tabela 5.46. Pirsonova korelacija između vrednosti leptina, FT4, FT3 i TSH kod MEP pozitivnih ispitanika

		NFT4	NF 3	NTSH
Leptin	Pirsonov koeficijent korelacije	-0.347	-0.123	0.078
	p	<b>0.041</b>	0.483	0.655
	N	35	35	35

Tabela 5.47. Neparametrijski koeficijenti korelacije između vrednosti leptina, FT4, FT3 i TSH kod MEP pozitivnih ispitanika

			FT4	FT3	TSH	
Kendalov	Tau B	leptin	koeficijent korelacije	-0.127	-0.178	-0.020
			p	0.286	0.139	0.865
			N	35	35	35
Spirmanov	leptin	koeficijent korelacije	-0.187	-0.208	-0.061	
			p	0.283	0.231	0.728
			N	35	35	35

5.9.4. Uticaj leptina na serumski nivo FT4, FT3 i TSH kod gojaznih MEHP pozitivnih ispitanika

Korelacije između vrednosti leptina, FT4, FT3 i TSH ispitane su na poduzorku gojaznih MEHP pozitivnih ispitanika Pirsonovim koeficijentima (pri čemu su korišćene normalizovane vrednosti) i neparametrijskim koeficijentima (Spirmanov i Kendalov Tau-B koeficijent, pri čemu su korišćene sirove vrednosti).

Rezultati ukazuju da nema statistički značajnih koeficijenata korelacije tj. da leptin nema uticaj na serumski nivo FT4, FT3, TSH (Tabela 5.48. i 5.49.).

*Tabela 5.48. Pirsonov koeficijent korelacije između vrednosti leptina, FT4, FT3 i TSH kod MEHP pozitivnih ispitanika)*

			NFT4	NFT3	NTSH
Leptin	Pirsonov	koeficijent korelacije	0.189	-0.025	0.017
		p	0.325	0.897	0.928
		N	29	29	29

*Tabela 5.49. Neparametrijski koeficijenti korelacije FT4, FT3 i TSH sa MEHP*

			T4	FT3	TSH
Kendalov tau B	leptin	koeficijent korelacije	0.176	0.023	0.062
		p	0.182	0.866	0.639
		N	29	29	29
Spirmanov koeficijent	leptin	koeficijent korelacije	0.273	0.031	0.107
		p	0.151	0.873	0.579
		N	29	29	29

## 6. DISKUSIJA

### 6.1. Uvod u problem

Tokom 20. veka sintetisan je velik broj hemijskih jedinjenja za potrebe industrijske i poljoprivredne proizvodnje u naučne i medicinske svrhe (180). Ove supstance su obezbedile i socijalni i ekonomski napredak, ali se pojavio problem zagađenja čovekove okoline (181).

Interesovanje naučne i stručne javnosti za problem endokrine disrupcije je značajno poraslo u poslednjih nekoliko desetina godina. U endokrinom sistemu postoji više potencijalnih meta za dejstvo različitih klasa EDs (46). Uopšteno govoreći, mehanizmi endokrine disrupcije podrazumevaju agonističko ili antagonističko dejstvo EDs na nivou receptora, kao i promenu metaboličkih puteva, tako da pokretanje ili zaustavljanje i modifikacija određenih hormonskih signala dovodi do sniženog fertiliteta, defekata na rođenju, promene seksualne ekspresije i nekih tipova karcinoma (55). Pokazano je da je endokrina disrupcija moguća i na nivou tiroidnog receptora, transportnih proteina za TH iDIOs (59, 182, 183).

U biološkom sistemu hormoni kontrolišu aktivnost gena i ciljnih ćelija preko nuklearnih receptora i aktivnih elemenata ciljnih gena (180). Poremećaj aktivacije receptora nastaje jer EDs imitiraju endogene hormone i dovode do konformacionih i funkcionalnih promena genske ekspresije (184). Pored navedenog, EDs imaju sposobnost da modifikuju transkripcione signale kroz inhibiciju ili promovisanje sinteze novih proteina (180). Iako je sprovedeno mnogo studija koje su se bavile putevima izloženosti EDs, načinom bioakumulacije i neželjenim efektima, sami mehanizmi odgovorni za ovaj fenomen i dalje su nejasni, najvećim delom zbog postojanja značajne razlike u odgovoru na EDs na nivou vrste, tj. između invertebrata i sisara (180). Napredak u boljem razumevanju čitavog koncepta endokrine disrupcije postoji najviše zahvaljujući studijama iz razvijenih zemalja.

### 6.1.1. Ekonomski aspekt dejstva EDs

Uticao koji izlaganje EDs imaju na zdravlje je vrlo teško proceniti, jer ne postoje sveobuhvatna saznanja o tome kako industrijske hemikalije kojima smo svakodnevno izloženi preko hrane, vode, vazduha, kozmetičkih proizvoda, deluju u organizmu čoveka (138). Dokazi o bolesti i invalidnosti kao posledice dejstva EDs se rapidno nagomilavaju, pa se pojavila i potreba da se kvantifikuju i zdravstveni, ali i ekonomski aspekti dejstva EDs (185). Paneli stručnjaka Evropske unije postigli su konsenzus o verovatnoj (>20%) uzročno-posledičnoj vezi između EDs i opadanja koeficijenta inteligencije i pridružene intelektualne nesposobnosti, hiperaktivnog poremećaja sa nedostatkom pažnje (ADHD), autizma, gojaznosti u pedijatrijskoj i u adultnoj populaciji, dijabetesa, kriptorhizma, muškog steriliteta i mortaliteta udruženog sa sniženim nivoom testosterona (185-188). Sveukupni troškovi u vezi sa EDs i navedenim oboljenjima u Evropskoj uniji su oko 157 milijardi evra godišnje (185). Međutim, ova procena troškova je sasvim sigurno niža od realne, jer proračunima nisu obuhvaćene sve klase EDs, kao ni sve potencijalne posledice po zdravlje, uključujući i nedvosmisleno dokazanu tiroidnu disfunkciju.

### 6.1.2. Estri ftalne kiseline

Ftalati su estri benzen-1,2-dikarboksilne kiseline, ftalne kiseline. Dodaju se polimernim materijalima tipa PVC-a radi poboljšanja elastičnosti i čine i do 20 - 40% težine plastike (76).

Ftalatima kratkog bočnog lanca tj. male molekulske mase (DEP, DMP, DiBP, DnBP) izloženi smo uglavnom preko kozmetičkih proizvoda, suplemenata u ishrani, lekova, mastila za štampanje i pisanje, adheziva (139).

BBzP, DEHP, DiNP, DiDP su ftalati dugog bočnog lanca, tj. velike molekulske mase i prisutni su u PVC-u koji se koristi u pakovanjima za hranu, oblogama za pod i drugom građevinskom materijalu, ali i u medicinskoj opremi (189, 190). Biomonitoring studijama pokazano je da su ftalati zajedno sa bisfenolom A prisutni u oko 95% uzoraka urina širom sveta (191). Smatra se da je u opštoj populaciji hrana glavni vid izloženosti ftalatima (192).

Stepen do koga će se hidrolizovani monoestri dalje oksidisati u sekundarne metabolite zavisi od dužine alkil lanca diestra: kod ftalata kratkog lanca (DEP, DBP, DiBP itd.) 70-80%

oralno unete doze izlučiće se urinom kao prosti monoestar metaboliti, dok je taj procenat za DEHP manji od 10%, a za DniP oko 2% (99).

## **6.2. Diskusija materijala i metoda**

### **6.2.1. Biološki materijal**

U našem istraživanju koncentracije monoestar ftalatnih metabolita (MEP, MEHP) određivane su u urinu.

U studijama koje su se bavile procenom stepena izloženosti ftalatima istraživači su koristili različit biološki materijal. Pokušano je sa određivanjem ftalata i njihovih metabolita u urinu, serumu, plazmi, pljuvački, spermiji, mleku, znoju, amnionskoj tečnosti i krvi iz pupčane vrpce(99, 132, 133).Urin se izdvojio kao najadekvatniji, jer je u ostalim materijalima bilo mnogo manje uzoraka sa uopšte detektovanim ftalatima, a i izmerene koncentracije su bile niže nego u urinu (99). Prednosti upotrebe urina kao biološkog materijala za određivanje nivoa ftalata su: dostupnost i veća zapremina uzorka, više koncentracije metabolita, manja mogućnost kontaminacije uzorka dijetom, kao i odsustvo enzima koji bi ga izmetabolisali i time da li lažno visoku koncentraciju monoestra u uzorku (119).

### **6.2.2. Pojedinačni uzorak urina nasuprot ukupnog 24h uzorka urina**

Za potrebe našeg istraživanja od ispitanika je uziman prvi jutarnji urin.

Ftalati se vrlo brzo metabolišu i izlučuju, pa koncentracija u pojedinačnom uzorku urina oslikava izloženost dijetu ili samom monoestru ftalata u poslednjih nekoliko sati ili dana (u zavisnosti od konkretnog ftalata) (99). Postoje fluktuacije u nivou ftalatnih metabolita u pojedinačnom uzorku urina u odnosu na doba dana, a takođe su prisutne razlike u nivou pri uzorkovanju urina različitim danima (193). Novije studije su pokazale da se nivo metabolita DEHP povećava tokom dana tj. od jutra prema večeri, dok podaci za MEP nisu konzistentni (193-196).S obzirom na kratak poluživot ftalatnih metabolita, moglo bi se pretpostaviti da su najviše koncentracije u urinu prisutne neposredno nakon izlaganja ovim EDs i da vrlo brzo

opadaju (52, 197, 198). Zbog svega navedenog, postavilo se pitanje da li su koncentracije dobijene iz pojedinačnog uzorka urina komparabilne sa koncentracijama u 24h urinu tj. da li istraživanja u kojima je sakupljan pojedinačni uzorak urina daju adekvatne procene. Kristensen i saradnici su 2012. godine sprovedli studiju u kojoj su komparirali serije pojedinačnih uzoraka urina i 24h uzoraka urina u različitim populacijama (199). Zaključak navedene studije jeste da su na populacionom nivou pojedinačni uzorci komparabilni sa 24h uzorcima urina (199). Procena prosečnog dnevnog unosa ftalata na osnovu pojedinačnog uzorka urina slična je proceni koja se dobija analizom 24h uzorka urina, ali sa nešto većom varijabilnošću na repu distribucije (dalje od središnjeg dela) tj. kod ispitanika sa izrazito visokim vrednostima ftalata (199). Frederiksen i saradnici su 2013. godine ispitivali varijabilnost ftalatnih metabolita kod 33 muškarca starosti od 18 do 22 godine u pojedinačnim uzorcima urina tokom dana, prvom jutarnjem urinu i 24h urinu: sa izuzetkom MEP, metaboliti ftalata u jutarnjem i pojedinačnom uzorku urina tokom dana bili su viši u poređenju sa 24h urinom (200). U ponavljanim uzorcima u navedenoj grupi uočena je neznatna varijacija koncentracije ftalatnih metabolita u jutarnjem i pojedinačnom uzorku tokom dana u poređenju sa 24h uzorkom, te su autori zaključili da nema opravdanja za korišćenje 24h uzorka urina, posebno kada se u obzir uzme činjenica da je takav uzorak teže i skuplje sakupiti i obraditi (200).

### 6.2.3. Ukupne nasuprot slobodnih frakcija ftalatnih metabolita

U našem istraživanju su iz uzorka prvog jutarnjeg urina određivane koncentracije ukupnih monoestara ftalatnih metabolita.

Pošto je dokazano da su metaboliti tj. monoestri ftalne kiseline biološki aktivniji od svojih odgovarajućih diestara, pretpostavljeno je i da bi koncentracija slobodne forme monoestra u poređenju sa ukupnom koncentracijom mogle biti bolja mera biološki efikasne doze (104). U svom istraživanju Miker i saradnici su 2012. godine određivali procenat ukupne koncentracije ftalatnog metabolita prisutnog u slobodnoj formi (195). Ovaj procenat bio je najviši za MEP (77%), što je i očekivano, jer se radi o hidrofilnom ftalatnom metabolitu koji se izlučuje urinom pre nego što podlegne II fazi metabolizma (195). S druge strane, slobodne frakcije MEHP, MBzP i MnBP su retko detektovane, te je zaključeno da, za sada, određivanje i slobodnih i ukupnih frakcija ftalatnih metabolita u urinu nema opravdanja jer dodatno i komplikuje i poskupljuje



istraživanja (195). Potrebne su dodatne studije na velikim uzorcima kako bi se, eventualno, dokazala superiornost slobodnih frakcija ftalatnih metabolita u proceni efektivne biološke doze ftalata (99).

#### 6.2.4. Monoestar i oksidovani DEHP metaboliti

U našem istraživanju meren je urinarni nivo MEHP kao primarnog DEHP metabolita i nivo MEP kao primarnog DEP metabolita.

Nekoliko autora je ranije objavilo i metode za merenje DEHP u biološkom materijalu, međutim, kako je DEHP sveprisutan i jedan od glavnih laboratorijskih kontaminanata, uočeno je da su koncentracije u biološkom materijalu slične onima u laboratorijskom uzorcima (201, 202). Merenje primarnog metabolita umesto diestra daje tačnije podatke u proceni izloženosti ftalatima (202). Koncentracije MEHP koje prijavljuju različite studije niže su u odnosu na koncentracije metabolita ostalih ftalata, posebno onih sa kraćim alkil bočnim lancima (109, 111, 203). Nekoliko je razloga koji objašnjavaju navedene rezultate: razlike u izloženosti pojedinim ftalatima, metabolizam, sistemska apsorpcija iz gastrointestinalnog trakta i ekskrecija (204, 205). Ftalati dugog alkil bočnog lanca podložniji su oksidativnom metabolizmu, tako da se urinom ekskretuju niže koncentracije primarnih metabolita, tipa MEHP, a veći deo podleže daljem metabolizmu i stvaranju oksidovanih metabolita (108, 206). Oksidovani metaboliti DEHP čije su koncentracije merene u nekoliko istraživanja su MEHHP i MEOHP. Kato i saradnici su uočili da su koncentracije MEHHP i MEOHP u urinu deset puta veće od koncentracije MEHP, što ukazuje da su ovo senzitivniji markeri izloženosti DEHP (202). Isti autori, međutim, navode i da je MEHP odgovoran za biološku aktivnost koja se pripisuje DEHP, te da su u studijama koje se bave ispitivanjem uticaja ftalata na zdravlje ljudi koncentracije MEHP, ipak, relevantnije (202).

#### 6.2.5. Diskusija statističkih metoda

##### 6.2.5.1. Normalizacija statističkih podataka po Rankitovoj formuli u pripremi za t-testove

Standardizacija i normalizacija su dva načina definisanja referentnog okvira za distribuciju rezultata t-testa (207). Oba navedena načina konverzije ili transformacije matematički

modifikuju rezultate sirovih podataka (207). Ako se distribucije standardnih skorova ne normalizuju, rezultati će zadržati oblik originalne distribucije rezultata (208). Iz navedenog proizilazi da standardizacija dozvoljava efektivnu analizu individualnih rezultata u okviru pojedinačnog testa, ali da je normalizacija neophodna za smislenu komparaciju testova (207). Postoji potreba da se definiše najbolji metod normalizacije podataka, iako sam uticaj veličine uzorka i distribucija mogu učiniti da se i najgori metod normalizacije pokaže boljim (207). U radu Solomonove i Savilovskog poređeno je nekoliko postupaka normalizacije: Blumov, Tukijev. Van der Verdenov i Rankitov (207). Eksperiment je pokazao da je Rankitov metod normalizacije parametara najtačniji kada se u obzir ne uzimaju veličina uzorka i distribucija tj. najtačniji je metod i u radu sa malim i u radu sa velikim uzorcima.

6.2.5.2. Dodatni statistički testovi: hijerarhijske linearne multiple regresione analize: relacije ftalata, pola, BMI, FT3, FT4 i TSH: složeniji modeli odnosa

Hijerarhijske linearne multiple regresione analize sprovedene su jer su rezultati dosadašnjih istraživanja na polju ftalata i tiroidne disfunkcije inkonzistentni i ukazuju na činjenicu da ftalati imaju vrlo blage efekte koje je teško dokazati, ali koji mogu imati ozbiljan uticaj na zdravlje (93, 209, 210). Podaci iz istraživanja navedenih studija ukazuju na to da bi, pored jednostavnih veza između ftalata i hormona, trebalo ispitati i složenije veze, tj. potencijalne efekte interakcije između ftalata i drugih varijabli. Mi smo proverili potencijalne efekte interakcije između BMI, ftalata i pola, kao i efekte trostruke interakcije primenom hijerarhijskih linearnih multiplih regresionih analiza. Analize su sprovedene na celokupnom uzorku od 201 ispitanika da bi se, zbog veličine uzorka, očuvala statistička snaga testa. Naime, sprovođenjem regresionih analiza na poduzorcima ispitanika formiranim prema kategorijama određenih varijabli, povećao bi se rizik od greške tipa I (211, 212).

### **6.3. Diskusija rezultata istraživanja**

#### **6.3.1. Pozitivnost ftalatnih metabolita u urinu**

U našem ispitivanom uzorku pozitivne ftalate u urinu sa limitom detekcije (LOD) 0.5µg/l imalo je 110 (55%) ispitanika. MEHP je bio pozitivan u urinu 44 (21.89%) ispitanika, a MEP kod 64 (31.89%) ispitanika. Medijana koncentracije MEP kod pozitivnih ispitanika bila je 62.465µg/l, aritmetička sredina (AS) 113.60±156.819µg/l. Za MEHP je medijana koncentracije u urinu pozitivnih ispitanika bila 59.72µg/l, a AS 92.19±90.33µg/l.

U grupi MEP pozitivnih ispitanika bilo je 35 (54.7%) osoba ženskog pola i 29 (45.3%) osoba muškog pola. U grupi MEHP pozitivnih ispitanika bilo je 24 (54.54%) osobe ženskog, odnosno 20 (45.45%) osoba muškog pola. Uočava se veći procenat MEP i MEHP pozitivnih osoba ženskog pola. Takođe, kod osoba ženskog pola više su i srednje vrednosti za MEP, međutim nije dostignuta statistička značajnost (123.67±180.83 nasuprot 105.27±135.95; p<0.64). U grupi MEHP pozitivnih ispitanika statistički značajno veće vrednosti MEHP imaju osobe muškog pola (139.57±99.78 nasuprot 52.69±60.43; p<0.01).

Određivanjem koncentracije primarnih metabolita DEHP i DEP, MEHP i MEPu urinu radi procene opterećenosti opšte populacije ovim EDs, bavilo se nekoliko studija (51, 109, 146, 209). Procenat urina pozitivnih na MEP i MEHP u navedenim studijama kretao se od 78-100%. Istraživanje prethodno sprovedeno u našoj zemlji ukazuje da su ftalati detektovani u urinu 38.83% ispitanika, MEP kod 24.27%, a MEHP kod 16.50% (213).

Rezultati naše studije su u korelaciji sa prethodno objavljenim podacima za našu zemlju. Međutim, pokazuju manji procenat pozitivnih urina u odnosu na razvijene zemlje iz prethodno navedenih istraživanja, što se može objasniti činjenicom da smo u obzir uzimali samo one urine u kojima je bilo moguće kvantifikovati MEP i MEHP. Nadalje, izloženost ftalatima razlikuje se i u odnosu na geografske i demografske karakteristike (51, 109, 146). Istraživanja koja se bave neželjenim efektima EDs, pa time i ftalata, na zdravlje ljudi sprovedena su u razvijenim zemljama, dok su podaci iz nerazvijenih zemalja, za sada, malobrojni (213).

Blant i saradnici su 2000. godine objavili podatke nakon analize 289 uzoraka urina sakupljenih od 1988. do 1994. godine u okviru *Third National Health and Nutrition and*

*Examination Study* (NHANESIII)(109). NHANES je populaciona studija koju sprovodi američki Nacionalni centar za zdravstvenu statistiku Centra za kontrolu i prevenciju bolesti, a dizajnirana je tako da dobijeni rezultati budu primenjivi na celokupnu američku populaciju (2014). Rezultati Blantove studije: medijana koncentracije MEP 305.0  $\mu\text{g/l}$ , a za MEHP 2.7 $\mu\text{g/l}$  (109). Koh i saradnici na osnovu obrade 85 urina sakupljenih tokom 2002. godine od ispitanika starosti od 7 - 65 godina objavljuju sledeće podatke primenjive na nemačku populaciju: medijana koncentracije MEP 90.2 $\mu\text{g/l}$ , a za MEHP 10.3 $\mu\text{g/l}$  (51). Američki Centar za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC) je 2015. godine objavio i Četvrti izveštaj o izloženosti hemikalijama iz životne sredine, u kome su nivoi i MEP i MEHP niži kada se uporede sa nivoima NHANES III koje je objavio Blant (109, 215). Za ispitanike starije od 20 godina aritmetička sredina za MEP je 40.2  $\mu\text{g/l}$ , dok je za MEHP 1.3  $\mu\text{g/l}$ , anavedeni podaci su rezultat obrade 1705 urina sakupljenih tokom 2011. i 2012. godine (215).

Rezultati studije Koha i saradnika na nemačkoj populaciji objavljene 2003. godine pokazala je da kod ispitanika ženskog pola postoji statistički značajno viši nivo MEP ( $p < 0.002$ ) (51). U ovom istraživanju određivani su pored MEHP i oksidovani sekundarni metaboliti MEOHP i MEHHP: nema statistički značajne razlike među polovima za sva tri DEHP metabolita. (51). Četvrti izveštaj o nacionalnoj izloženosti CDC objavljen je u februaru mesecu 2015: aritmetička sredina koncentracije MEHP više su kod osoba muškog pola, ali u ovom izveštaju nema procene statističke značajnosti (215).

Navedena istraživanja potvrđuju razlike u opterećenosti populacija MEHP i MEP tj. ukazuju da geografske i demografske karakteristike doprinose drugačijem profilu izloženosti ftalatima.

Rezultati naše studije ukazuju na veću izloženost našeg stanovništva MEP u odnosu na američku populaciju prema NHANES IV izveštaju, međutim, u poređenju sa NHANES III podacima nivo MEP je kod stanovništva Srbije okopet puta niži. Poređenjem naših rezultata sa vrednostima MEP u nemačkoj populaciji iz 2003. godine, uočava se da je nivo MEP među našim stanovništvom niži.

DEP je ftalat kratkog bočnog lanca tj. male molekulske mase i koristi se najviše u proizvodima za ličnu higijenu i kozmetici (102). Pretpostavljamo da su u našoj zemlji prisutni manje kvalitetni proizvodi za ličnu higijenu i drugi kozmetički proizvodi, te da je, pored

demografskih i geografskih osobnosti populacije, to razlog višeg nivoa MEP u Srbiji u odnosu na američku populaciju. U narednim ispitivanjima trebalo bi u obzir uzeti i zanimanje ispitanika, s obzirom da neka zanimanja (kozmetičar, frizer itd.) nose sa sobom veći rizik za izlaganje MEPu (102, 202). Viši nivo MEP u Nemačkoj u odnosu na našu zemlju je, verovatno, posledica činjenice da je studija koja se bavila procenom nivoa MEP u Nemačkoj sprovedena 2002. godine, a od tada su se značajno promenili propisi za ograničavanje upotrebe pojedinih ftalata, te je razumna pretpostavka da su i nivoi MEP sada niži i, najverovatnije komparabilni sa američkom populacijom.

Nismo dobili statistički značajnu razliku u nivou MEP između osoba muškog i ženskog pola, iako žene imaju više vrednosti, tako da pretpostavljamo da bismo na većem uzorku dostigli statističku značajnost koja bi potvrdila viši nivo MEP kod žena, zbog ekstenzivnije upotrebe kozmetičkih proizvoda. Podaci koji govore da je naša vrednost MEP niža u odnosu na NHANES III su ohrabrujući, jer bi mogli govoriti u prilog ograničenja upotrebe MEP i u našoj zemlji u poslednjih nekoliko godina.

Kada je reč o MEHP, ovoistraživanje ukazuje navišestruko više koncentracije ovog primarnog monoestar DEHP metabolita u urinu u odnosu na koncentracije zabeležene u navedenim studijama koje se tiču američke i nemačke populacije (51, 109, 146, 209, 215).

DEHP je ftalat dugog bočnog lanca tj. velike molekulske mase i izloženi smo mu svakodnevno preko građevinskog i dekorativnog materijala (tapete, kablovska izolacija itd), proizvoda za automobile (sedišta, vinil presvlake i drugo), odeće (kabanice i drugo) i obuće, dečjih igračaka (posebno cucli, „grickalica“ i ostalih igračaka koje bebe stavljaju u usta) i medicinskih instrumenata (102).

Pretpostavljamo da bi, pored razlike u geografskim i demografskim karakteristikama naše populacije, razlog veće izloženost naše populacije DEHP, i postojanje različitih propisa o dozvoljenim koncentracijama DEHP u navedenim proizvodima među zemljama. Naime, dozvoljeni dnevni unos (TDI) je za DEHP ograničen na 0.020mg/kg/TM dnevno u Evropskoj uniji i Americi (44-48). Postoji i preporuka da se DEHP sve više zamenjuje sa DiNP koji je postao najviše upotrebljavan ftalat za plastifikaciju u razvijenim zemljama Evrope (216). Evropska unija je zabranila upotrebu igračaka i drugih proizvoda za decu ukoliko sadrže DEHP u količini većoj od 0,1% težine (144). U Službenom glasniku Republike Srbije objavljen je

Pravilnik o ograničenjima, zabranama proizvodnje, stavljanja u promet i korišćenje hemikalija koje predstavljaju neprihvatljiv rizik po zdravlje ljudi i životnu sredinu, kao i Uredba o graničnim vrednostima prioriternih i hazardnih prioriternih supstanci koje zagađuju površinske vode kojim se zabranjuje i ograničava upotreba određenih ftalata (217, 218). U našoj zemlji su propisi o ograničenju količine DEHP u postupku plastificiranja i njegovom prisustvu u površinskim vodama zemljištu stupile na snagu znatno kasnije, te pretpostavljamo da je to osnovni razlog za ovako visok nivo MEHP u našoj populaciji, ali ne treba zanemariti ni geografske i demografske specifičnosti. Ovim istraživanjem pokazano je da osobe muškog pola imaju statistički značajno veći nivo DEHP u odnosu na žene, što je, verovatno, posledica veće izloženosti muškaraca DEHP na radnom mestu zbog polno specifične raspodele poslova, kao i razlike u ishrani među polovima i činjenice da muškarci unose veću količinu hrane po kilogramu telesne mase.

Naši rezultati nedvosmisleno ukazuju da je opterećenost našeg stanovništva DEHP mnogo veća nego što smo pretpostavljali. Ovakav nalaz je zabrinjavajući jer su zbog upotrebe PVC igračaka, cucli i grickalica najugroženije kategorije bebe tj. mala deca. Nadalje, zbog velikog unosa hrane po kilogramu telesne mase karakterističnog za doba adolescencije ugrožena je i ova kategorija stanovništva. Potrebno je skrenuti pažnju stručne javnosti na ove podatke, jer je DEHP sa jedne strane ftalat koji se najviše proizvodi, a sa druge je to ftalat sa najvećom sposobnošću endokrine disrupcije (51, 104, 125).

### *6.3.2. MEP i antropometrijski parametri*

U vrednostima ispitivanih antropometrijskih parametara u grupama MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika nema statistički značajnih razlika. Statistički značajne razlike nisu potvrđene ni nakon dodatne podele na podgrupe normalno uhranjenih i gojaznih MEP pozitivnih i negativnih ispitanika.

### *6.3.3. MEHP i antropometrijski parametri*

U vrednostima ispitivanih antropometrijskih parametara u grupama MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika utvrđene su statistički značajne razlike u vrednostima BMI i obima struka. Statistički značajno više vrednosti BMI imaju ispitanici sa pozitivnim MEHP u urinu

(30.64±7.04 nasuprot 27.39±8.08;  $p<0.02$ ). Takođe u grupi MEHP pozitivnih zabeležena je statistički značajno veća vrednost obima struka (97.54±16.21 nasuprot 89.39±19.91;  $p<0.02$ ). Nakon dodatne podele na podgrupe normalno uhranjenih i gojaznih MEHP pozitivnih i negativnih ispitanika održava se statistička značajnost za razlike u BMI i obimu struka. Naime, normalno uhranjeni MEHP pozitivni ispitanici imaju statistički značajno veći BMI (23.51±1.85 nasuprot 22.39±2.07;  $p<0.05$ ). U istoj podgrupi ispitanika zabeležen je i statistički značajno veći obim struka (81.27±5.28 nasuprot 76.81±8.09;  $p<0.05$ ).

### 6.3.3.1. Ftalati i gojaznost

Svetska zdravstvena organizacija prijavljuje da se incidencija gojaznosti skoro duplirala od 1980. godine (44). U 2008. godini je u svetu bilo 10% gojaznih muškaraca i 14% gojaznih žena, dok je 1980. godine gojazno bilo 5% muškaraca i 8% žena (44). Gojaznost je u oko 44% slučajeva direktno povezana sa dijabetes melitusom tip 2 (T2D), od koga u svetu boluje 347 miliona ljudi, a 2004. godine je bilo 3.4 miliona smrtnih ishoda u vezi sa ovom bolešću (44). Imajući sve navedeno na umu, jasno je da je od velike važnosti prepoznavanje i razumevanje svih etioloških faktora gojaznosti, kao i mehanizama koji gojaznost povezuju sa T2D.

Grun i Blumberg su 2006. godine uveli termin “obesogene supstance” u oblast endokrine disrupcije i pod njim podrazumevaju ksenobiotike koji dovode do poremećaja normalne razvojne i homeostatske kontrole adipogeneze i balansa energije (178). Mehanizam kojim EDs utiču na metaboličke procese je direktna ili indirektna aktivnost na nivou nuklearnih receptora (60). Funkcija nuklearnih receptora u ćeliji je prilagođavanje genske ekspresije prema signalima u formi specifičnih liganda, a EDs imaju osobine karakteristične za ligande nuklearnih receptora: mala veličina i lipofilnost (60).

Na osnovu sposobnosti za vezivanje specifičnih liganda, nuklearni receptori mogu se podeliti u tri kategorije: prva kategorija je karakteristična za klasične hormonske receptore i sa velikim afinitetom prepoznaje samo nekoliko molekula (tiroidni, mineralokortikoidni, glukokortikoidni, progesteronski, estrogenski, vitamin D receptori itd.); druga kategorija nuklearnih receptora podrazumeva tzv. „receptore siročiće“ (*orphan receptors*) koji imaju strukturne karakteristike nuklearnih receptora, ali do sada nije poznat ni jedan ligand za ove receptore; treći tip nuklearnih receptora vezuje jako velik broj liganda, ali sa vrlo malim

afinitetom: PPARs, pregnan X receptor (PXR), konstitutivni androstan receptor (CAR), farnezooid X receptor (FXR) i jetreni X receptor (LXR) (60, 219). Za PPARs, PXR i CAR je dokazano da deluju kao ksenobiotički senzori, da pokreću adaptivne transkripcione odgovore u vezi sa metabolizmom ksenobiotika koji mogu da utiču i na endogene metaboličke puteve (60, 219).

U zavisnosti od biološke vrste, tipa ćelije i receptora, PPARs izotipovi mogu biti aktivirani nižim ili višim koncentracijama ftalata (60). MEHP, za razliku od svog diestra, ima sposobnost da direktno aktivira PPAR $\alpha$  i PPAR $\gamma$  (60).

Povišeni nivoi ftalata povezani su sa većim BMI i obimom struka kod dece i u adultnoj populaciji (44). Analiza NHANES podataka ukazala je povezanost MBzP, MEOHP, MEHHP i MEP sa povišenjem BMI i obima struka kod odraslih muškaraca (61, 62). I BMI i obim struka bili su značajno viši kod MEP pozitivnih adolescentkinja i žena starosti od 20 - 59 godina (62). Neke studije prijavljuju pozitivnu korelaciju ftalata, BMI i obima struka samo u grupi gojazne, ali ne i normalno uhranjene dece (220). Ftalati male molekulske mase, među kojima je i MEP, pozitivno koreliraju sa BMI i obimom struka kod dece crne rase, nehispano porekla, te ovo ukazuje da etnička pripadnost i rasa mogu doprineti vulnerabilnosti na dejstvo ftalata (221). Ovakva povezanost nije dobijena za ftalate velike molekulske mase, između ostalog i DEHP (221). Rezultati studije koja je ispitivala uticaj ftalata na obim struka i HOMA indeks, ukazuju da su statistički značajno u pozitivnoj korelaciji sa obimom struka sekundarni DEHP metaboliti, MEOHP i MEHHP, ali ne i MEHP (61). Navedena studija dokazala je i vezu MEP sa abdominalnim tipom gojaznosti (61).

Naši rezultati u grupi MEP pozitivnih ispitanika nisu u korelaciji sa gore navedenim studijama. Pretpostavljamo da je razlog izostanka pozitivne korelacije MEP sa BMI i obimom struka mali broj ispitanika i ovom istraživanju. Još jedan razlog za izostanak statistički značajne pozitivne korelacije MEP sa BMI i obimom struka može biti i činjenica da ova veza, barem delom, zavisi i od rasne i etničke pripadnosti (221).

Za DEHP, naši rezultati su ukorelaciji sa svetskim podacima, uz napomenu da je uočena pozitivna korelacija primarnog metabolita DEHP, tj. MEHP sa BMI i obimom struka, što je, verovatno, posledica višestruko viših vrednosti koncentracija MEHP u našoj populaciji. Studije koje su prijavile pozitivnu značajnu korelaciju oksidovani DEHP metabolita, ali ne i MEHP, sa antropometrijskim parametrima sprovedene su u zemljama u kojima je izloženost DEHP, pa time



i njegova prisutnost u organizmu, mnogo manja u odnosu na Srbiju (61). Održavanje statistički značajne pozitivne korelacije MEHP i BMI i obima struka samo u podgrupi normalno uhranjenih MEHP pozitivnih ispitanika bi mogla da govori da su obesogeni efekti DEHP blagi, te da se uočavaju samo u podgrupi gde inicijalno ne postoji patološka vrednost BMI ili obima struka.

#### **6.4. Ispitivanje uticaja estara ftalne kiseline na FT4, FT3 i TSH**

##### **6.4.1. Serumski nivo FT4, FT3 i TSH u grupama MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika**

Rezultati t-testa sugerišu da u pogledu vrednosti FT4, FT3 i TSH nema značajnih razlika između grupa MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika. Rezultati Man-Vitnjevog testa ukazuju da postoji marginalno značajna razlika u pogledu vrednosti FT4, pri čemu MEP pozitivni ispitanici imaju više vrednosti ( $p < 0.069$ ). Nakon podele ispitanika na podgrupe normalno uhranjenih i gojaznih MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika, rezultati t-testa govore o statistički značajnu razliku ( $p < 0.047$ ) u pogledu vrednosti FT4 između MEP pozitivnih i MEP negativnih gojaznih ispitanika, pri čemu MEP pozitivni gojazni ispitanici imaju više vrednosti FT4. Ovo je potvrđeno i rezultatom Man-Vitnjevog testa: gojazni MEP pozitivni ispitanici imaju više vrednosti FT4 od normalno uhranjenih MEP pozitivnih ( $p < 0.053$ ).

Hijerarhijske linearne multiple regresione analize govore da značajne parcijalne doprinose predikciji vrednosti FT4 daju MEP ( $p < 0.026$ ) i BMI ( $p < 0.045$ ) u pozitivnom smeru: više vrednosti MEP i BMI korespondiraju sa višim vrednostima FT4. Drugim rečima, ispitanici sa visokim vrednostima MEP će imati viši FT4 i kada se gojaznost kontroliše tj. kod ljudi sa istom telesnom masom oni sa višim MEP imaju i viši FT4 i kod ljudi sa istim vrednostima MEP, gojazniji će imati viši FT4. Ovakvi rezultati su u saglasnosti sa navedenim rezultatima t-testa i Man-Vitnjevog testa.

Nije dokazan statistički značajan uticaj MEP na serumski nivo FT3.

Nisu zabeleženi samostalni efekti MEP i BMI na serumski nivo TSH, dok je efekat pola statistički značajan u svim modelima hijerarhijskih linearnih multiplih regresionih analiza u smislu postojanja višeg serumskog nivoa TSH kod ispitanika ženskog pola (Model 1  $p < 0.026$ ;

Model 2  $p < 0.026$ ; Model 3  $p < 0.023$ ; Model 4  $p < 0.026$ ). Pošto se radi o malom doprinosu i verovatno malim polnim razlikama, Modeli 1, 2 i 3 ipak nisu statistički značajni, a uočeni statistički značajno viši nivo TSH kod žena treba tumačiti sa oprezom. U poslednjem koraku regresione analize značajan je doprinos interakcije MEP, pola i BMI u objašnjenju varijanse TSH ( $p < 0.036$ ). Imajući u vidu da je najkompleksniji efekat interakcije značajan ( $p < 0.036$ ), može se pretpostaviti da on daje najmanje pristrasnu sliku o relacijama između MEP, BMI, pola i TSH. Radi ilustracije delovanja navedene interakcije sprovedeni su Pirsonovi i neparametrijski testovi korelacije koji potvrđuju da niska pozitivna korelacija između MEP i TSH postoji jedino u grupi gojaznih žena (Kendalov Tau B 0.268;  $p < 0.012$ , Tau C 0.194;  $p < 0.012$ , Gama koeficijent 0.390;  $p < 0.012$ ; za Spirmanov koeficijent 0.333;  $p < 0.017$ ; Pirsonov  $r$  0.289;  $p < 0.04$ ).

#### 6.4.2. Serumski nivo FT4, FT3 i TSH u grupama MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika

Rezultati t-testa i Man-Vitnjevog testa, ukazuju na to da u pogledu serumskog nivoa FT4, FT3 i TSH nema značajnih razlika na celokupnom uzorku MEHP pozitivnih i negativnih ispitanika. Međutim, uočena je statistički značajna razlika ( $p < 0.03$ ) u pogledu vrednosti FT4 između MEHP pozitivnih i MEHP negativnih u podgrupi normalno uhranjenih, pri čemu MEHP pozitivni ispitanici imaju niže vrednosti FT4. Statistički značajno niži nivo FT4 u podgrupi normalno uhranjenih MEHP pozitivnih ispitanika potvrđen je Man-Vitnjevim testom ( $p < 0.025$ ).

Regresionim analizama potvrđena je negativna korelacija između MEHP i FT4 u podgrupi normalno uhranjenih ispitanika ( $p < 0.009$ ): u podgrupi MEHP pozitivnih normalno uhranjenih ispitanika više vrednosti MEHP korespondiraju sa nižim vrednostima FT4. I neparametrijski testovi govore u prilog statistički značajno niže vrednosti FT4 u podgrupi normalno uhranjenih MEHP pozitivnih ispitanika (Kendal Tau-B -0.168;  $p < 0.04$ ; Kendalov Tau-C -0.089;  $p < 0.04$ , Gama -0.331;  $p < 0.04$ , Spirmanov koeficijent -0.207;  $p < 0.03$ ). Rezultat Pirsonove korelacije je na samoj granici statističke značajnosti:  $r$  -0.185;  $p < 0.056$ .

Kod ispitivanja efekta MEHP na FT3 najkompleksniji efekat interakcije (MEHP\*BMI\*pol) je statistički značajan ( $p < 0.019$ ). Neparametrijski koeficijenti korelacije izračunati radi ilustracije interakcije ukazuju na marginalno statistički značajnu negativnu korelaciju između MEHP i FT3 samo u grupi normalno uhranjenih muškaraca tj. uočava se

tendencija da u podgrupi normalno uhranjenih MEHP pozitivnih muškaraca opada serumski nivo FT3 (Kendalov Tau B -0.164;  $p < 0.093$ , Kendalov Tau C -0.106;  $p < 0.093$ , Gama -0.277;  $p < 0.093$ ). Ovaj efekat je mali i potreban je oprez pri tumačenju, međutim uzet je u obzir zbog statističke značajnosti interakcije MEHP\*BMI\*pol ( $p < 0.019$ ).

Nisu ustanovljeni samostalni efekti MEHP, BMI i pola, kao ni efekti interakcija na serumski nivo TSH.

Do danas je objavljeno svega nekoliko studija koje su ispitivale uticaj estara ftalne kiseline na tiroidnu funkciju u ljudskoj populaciji (93, 209, 210). Miker i saradnici su 2005. godine objavili rezultate ispitivanja uticaja ftalata (MEP, MEHP, MBzP, MBP) na FT4, TT3 i TSH kod muškaraca čiji je urinarni nivo monoestar metabolit bio komparabilan sa američkom populacijom (93). Ispitanici su regrutovani iz grupe muškaraca koji su ispitivani zbog infertiliteta i koji su već učestvovali u studiji o uticaju EDs na reproduktivno zdravlje (93). Navedena studija ukazuje na negativnu povezanost MEHP sa FT4 tj. na značajno niže nivoe FT4 kod ispitanika sa povišenim vrednostima MEHP, a kada su u statističkoj obradi koncentracije ftalata postavljene kao kontinuirane varijable uočena je i negativna korelacija MEHP sa TT3 (93). Statistički značajna promena serumskog nivoa TSH nije zabeležena u ovom istraživanju (93).

Boasova i saradnici su sprovedeli studiju na pedijatrijskoj populaciji 2010. godine i objavili sledeće rezultate: za FT3 i TT3 statistički značajno niže koncentracije postoje kod MEP i MEHP pozitivnih ispitanika u grupi devojčica; kod dečaka rezultati nisu bili statistički značajni, ali je sveukupni trend bio takođe negativan; za TSH, FT4 i ukupnog T4 (TT4) nije bilo konzistentnih odnosa sa ftalnim metabolitima (209). Studija Huang i saradnika objavljena 2007. godine, procenjivala je povezanost urinarnog nivoa pet ftalnih monoestara (MEP, MEHP, MBP, MMP, MBzP) i tiroidnih hormona kod gravidnih tajvanskih žena (210). Istraživanje je sprovedeno na 76 ispitanika. Rezultati su pokazali postojanje negativne korelacije urinarnog nivoa MBP i TT4 ( $r = -0.248$ ;  $p < 0.05$ ) i FT4 ( $r = -0.368$ ;  $p < 0.05$ ) kod trudnih žena (210). Za ostale navedene monoestar metabolite nisu ustanovljene statistički značajne korelacije sa tiroidnim statusom (210).

Miker i Fergusonova su 2011. godine objavili rezultate još jedne studije koji podržavaju teoriju da ftalati remete tiroidnu funkciju (222). Analizirani su podaci NHANES iz 2007.-2008. godine, a obuhvaćeno je 1346 odraslih ( $\geq 20$  godina starosti) i 29 adolescenata (12-19 godina) (222). Autori navode statistički značajnu negativnu korelaciju DEHP sa TT4, FT4 i

tiroglobulinom, a pozitivnu sa TSH u kategoriji odraslih, dok je kod adolescenata uočena statistički značajna pozitivna korelacija DEHP i TT3, što objašnjavaju od ranije poznatim promenama nivoa TT3 u odnosu na uzrast (222).

U studijama sprovedenim na laboratorijskim životinjama dobijeni su slični rezultati. Istraživanja u kojima je pacovima u hranu dodavan DEHP ukazuju na niže vrednosti T4 u poređenju sa kontrolnom grupom, dok promena u vrednostima T3 nije bilo (86, 88, 89). Međutim, studija Bernala i saradnika u kojoj su pacovi takođe izlagani DEHP kontaminiranoj hrani nije pronašla statistički značajnu razliku u vrednostima T4 između ispitivane i kontrolne grupe, a razlog bi mogao biti vrlo mali ispitivani uzorak (12 pacova u ispitivanoj i 7 u kontrolnoj grupi) (223). Nasuprot navedenom, kod pacova kojima je intravenski davan DEHP u količini koja odgovara koncentraciji DEHP u kesama za transfuziju krvi, primećen je povišen nivo TT4 i TT3, što bi moglo da ukazuje da toksikokinetika zavisi od načina izloženosti ftalatima (ingestija, intravenski, dermalno itd. (224). Promene u nivou tiroidnih hormona nakon dermalnog izlaganja ftalatima, između ostalog i DEP, ali ne i DEHP, pratili su Janjuja i saradnici: nije uočena statistički značajna promena u nivou tiroidnih hormona nakon dvonedeljnog nanošenja kreme sa kontrolisanim sadržajem ftalata na čitavo telo, sa izuzetkom kapilicijuma i genitalnog područja (152). Ishihara i saradnici ukazuju na kompetetivno vezivanje ftalata za transtiretin kod ptica i posledičnu promenu u nivou TH (225). *In vitro* studije ukazuju na mogućnost promene u preuzimanju jodida od strane folikularnih ćelija zbog izmena u transkripcionoj aktivnosti NIS (226).

U našem istraživanju dokazana je pozitivna korelacija MEP sa FT4 u podgrupi gojaznih ispitanika. Ovakav rezultat nije u saglasnosti sa rezultatima navedenih studija na ljudskoj populaciji (152, 209, 210, 222). Pretpostavljamo da postoji nekoliko razloga koji bi mogli da objasne ovu diskrepancu. Nedostatak naše studije je to što je određivan serumski nivo samo FT4, ali ne i TT4, što bi moglo biti korisno pri interpretaciji rezultata. Zatim, nismo u obzir uzimali eventualno prisustvo autoimune tiroidne bolesti (AITD). U podgrupi gojaznih ispitanika već samo prisustvo gojaznostimenja tiroidnu funkciju (5). Smatra se da je promena nivoa TH i tirotropina kod gojaznih ljudi posledica adaptivnog procesa: uočen je porast TSH, TT3 i FT3 na gornju granicu referentnog opsega ili vrlo malo iznad nje, što dovodi do promena u nivou potrošnje energije u stanju mirovanja i time ograničava raspoloživost akumulirane energije za konverziju u

masno tkivo (5). Negativnu korelaciju FT4 i TT4 sa BMI i obimom strukaprijavili su De Pergola i saradnici 2007. i Knudsen i saradnici 2005. godine (24, 227). Studija De Pergole i saradnika potvrdila je postojanje negativne korelacije FT4 sa HOMA-IR i insulinemijom našte, ali uočena tendencija ka negativnoj korelaciji FT4 sa BMI i obimom struka nije dostigla statistički značajan nivo (24). Moguće je da se u gojaznosti povećava aktivnost dejodinaza, ali ovakva tvrdnja, za sada, nije čvrsto utemeljena (24). Autori dosadašnjih istraživanja navode da mehanizmi u osnovi promene tiroidnog statusa u gojaznosti nisu u potpunosti rasvetljeni, pa samim tim i opisane promene u nivou tiroidnih hormona i TSH možda nisu definitivne (5). Smatra se da je povišenje nivoa FT3 posledica promena u monodejodinaciji, na račun sniženja produkcije r T3, a povišenja produkcije TT3 (28, 228). Ipak, podaci o vezi gojaznosti i TSH nisu konzistentni i razlikuju se u odnosu na stepen gojaznosti, prisustvo antiTPO antitela, naviku pušenja (229).

Mišljenja smo da je povišen nivo u podgrupi gojaznih FT4 u našem istraživanjuposledica dejstva MEP, iako i sama gojaznost doprinosi značajnim promenama tiroidnog statusa preko mehanizama koji nisu u potpunosti jasni. Činjenica je da su EDs sveprisutne i da dok ispitujemo dejstvo jedne grupe ovih supstanci, u ovom slučaju ftalata, na organski sistem ne možemo zaboraviti da u samom efektu postoji i posledica dejstva drugih supstanci, dokazanih (bisfenol A, polibrominovani dietil estri, perhlorat itd.) ili još uvek nedokazanih endokrinih disruptora. Uticaj ftalata na tiroidnu funkciju je višestruk i teško se registruje samo određivanjem serumskog nivoa tiroidnih hormona(59, 63, 93, 222). EDs mogu na različite načine uticati na tiroidnu homeostazu: na receptorskom nivou, vezivanjem za transportne proteine, preko modifikacije mehanizama ćelijskog preuzimanja ili metabolizma TH (59). Zbog slabih i teško dokazivih dejstava EDs na tiroidnu funkciju, postoji nekoliko preporuka Evropskog društva endokrinologa za dalje studije koje će proučavati dejstvo EDs na funkciju štitaste žlezde: identifikacija biomarkera dejstva TH na nivou tkiva da bi se otkrili dodatni mehanizmi dejstva čak i u slučaju kada nema promena u serumskom nivou TH; procena eventualnog sinergističkog dejstva EDs sa različitim mehanizmima delovanja na tiroidnu funkciju; identifikacija visoko efikasnih analiza kojima bi se mogla predvideti tiroidna disrupcija (44). Neophodne su dalje studije na većem uzorku, sa uzimanjem u obzir, između ostalog i zanimanja ispitanika da bi se definitivno potvrdila veza MEP i FT4.

Analize odnosa MEHP i FT4 pokazale su da postoji negativna korelacija ova dva parametra u podgrupi normalno uhranjenih ispitanika. Postojanje negativne korelacije MEHP i FT4 je ustanovljeno i u drugim istraživanjima (59, 93, 209, 210, 222). Činjenica da smo ovakav odnos MEHP i FT4 dobili kod normalno uhranjenih ispitanika ukazuje da se radi o samom efektu MEHP, bez potencijalnog uticaja gojaznosti. Nadalje, uočena je i niska negativna korelacija MEHP i FT3 u podgrupi normalno uhranjenih muškaraca među našim ispitanicima. Boasova i saradnici su ovakav odnos MEHP i FT3 ustanovili samo u grupi devojčica, a Miker i saradnici su dobili isti rezultat, a svi ispitanici su bili muškog pola, što potvrđuje opadanje nivoa FT3 kod ispitanika izloženih DEHP bez obzira na pol (93, 209).

Naši rezultati ukazuju i na nisku pozitivnu korelaciju MEP i TSH u grupi gojaznih žena. Ovakvi podaci MEP do sada nisu objavljeni, iako je uočena je pozitivna korelacija MEHP sa TSH u adultnoj populaciji (210). Pretpostavljamo da se i kod ovog efekta, kao i kod efekta pozitivne korelacije MEP sa FT4 u kategoriji gojaznih ispitanika, istovremeno ispoljava i dejstvo samog monestara fetalnog metabolita i gojaznosti, te još jednom napominjemo da su neophodne dalje studije, bolje stratifikovane i na većem uzorku da bi se doneli definitivni zaključci.

Obradom naših podataka došli smo do podatka da postoji tendencija ka značajnom efektu pola na nivo FT4 nezavisno od MEP ili MEHP i drugih varijabli: kod ispitanika muškog pola zabeležene su više vrednosti FT4 ( $p < 0.081$ ). Dobijen je i značajno viši nivo FT3 kod ispitanika muškog pola ( $p < 0.000$ ).

Raspon referentnog opsega za serumski nivo TH je vrlo širok, jer u populaciji zdravih postoje velike interindividualne razlike vrednostima TT3 i TT4 (230). U američkoj studiji iz 2009. godine zaključeno je postojanje značajne razlike u vrednostima TSH među rasama i u odnosu na starost, te da bilo dobro postaviti posebne granice referentnog opsega, međutim iste razlike nisu dokazane za FT4 (230, 231). Za sada ne postoji konsenzus o uvođenju referentnih vrednosti za testove tiroidne funkcije u specifičnim kategorijama, iako su uočene razlike u nivou TH u odnosu i na pol i na starost, prevažodno zbog toga što su razlike vrlo male, posebno po polovima (37, 227, 232, 233). Naime, poznato je da estrogene povećavaju nivo tiroglobulina preko smanjenja hepatičkog klirensa, dok androgeni snižavaju cirkulišući nivo tiroglobulina (238). Međutim, ovo su samo farmakološki efekti kada se estrogene i androgeni unose egzogeno, te su potrebna

dodatna istraživanja kako bi se, eventualno, pokazalo da su polne razlike u indikatorima tiroidne funkcije značajne (238). Naše rezultate u pogledu polnih razlika (viši FT4 ( $p < 0.081$ ) i viši FT3 ( $p < 0.000$ ) kod ispitanika muškog pola) bi trebalo tumačiti sa velikim oprezom, jer su dobijeni uz kontrolu svih drugih relevantnih varijabli.

## **6.5. Uticaj indikatora tiroidne funkcije i ftalata na leptinsku sekreciju**

### **6.5.1. Uticaj FT4, FT3 i TSH na leptinsku sekreciju**

Leptin reguliše telesnu masupreko inhibicije unosa hrane i stimulacije potrošnje energije i lokomotorne aktivnosti (235, 236). Između ostalog, leptinski receptori dokazani su i u hipofizi i na TRH sekretujućim neuronima periventrikularnog nukleusa (237). Kod zdravih normalno uhranjenih ispitanika cirkadijalni ritmovi leptinske i TSH sekrecije se poklapaju, a supkutana primena leptina značajno slabi pad u TSH sekreciji koji nastaje pri gladovanju (238, 239). Takođe, primena leptina može delom da poništi i pad cirkulišućeg nivoa TH u gladovanju (240). Navedeno implicira da smanjenje serumskog nivoa leptina može da bude signal koji direktno inhibiše hipotalamo-pituitarno-tiroidnu osovину (235). *In vivo* leptin stimuliše hipofiznu TSH sekreciju (241). Pokazano je da leptin može da reguliše TSH ekspresiju i sekreciju delujući preko nukleus arkuatusa na TRH neurone u paraventrikularnim neuronima (242). Nadalje, hipotalamo-hipofizno-tiroidnu osovину reguliše i dejstvo leptina preko melanokortinskog puta (243). Zbog postojanja TSH receptora na adipocitima i činjenice da *in vivo* davanje rekombinantnog humanog TSH u suprafiziološkim dozama dovodi do oslobađanja značajne količine leptina proporcionalno masnoj masi, smatra se da je odnos parametara tiroidne funkcije i leptina bidirekcion (235, 241).

U prilog povezanosti leptina i hipotalamo-hipofizno-tiroidne osovine ide i činjenica da tiroidna disfunkcija postoji kod osoba sa deficijencijom leptina i poremećajem na nivou leptinskog receptora (244).

Potencijalni efekat minimalnih promena u tiroidnoj funkciji kod eutiroidnih pacijenata na antropometrijske karakteristike je često ispitan. Pošto su TH direktno uključeni u energetske homeostazu, pokušano je da se evaluiira tiroidna funkcija kod gojaznih ispitanika (5).

Kod gojaznih ispitanika odgovor TSH na TRH stimulaciju je pojačan, što je verovatno posledica promene u neuroendokrinoj kontroli TSH sekrecije, a ne smanjene raspoloživosti tiroidnih hormona na hipofiznom nivou (13).

Rezultati analize NHANES ispitanika iz 2008. i 2009. godine ukazuju na signifikantnu pozitivnu korelaciju TSH i FT3 sa BMI i obimom struka (36). Primećeno je da se nakon redukcije telesne mase, bilo nakon samo hipoenergetske ishrane ili barijatrijske hirurgije serumski nivo TSH normalizuje, te se pretpostavlja da je povišenje tirotropina u gojzosti adaptivni mehanizam hipotalamo-hipofizno-tiroidne osovine (245, 246). Tačni mehanizmi i fiziološki značaj u osnovi prethodno navedenog nisu u potpunosti rasvetljeni, a neki autori sugerišu da bi leptin mogao biti karika koja povezuje povišen TSH i gojaznost (247).

Studija Betrija i saradnika potvrđuje da je serumski nivo TSH u signifikantnoj pozitivnoj linearnoj korelaciji sa BMI u gojaznoj populaciji (235). Promene u nivou TSH autori su objasnili preko leptina, nezavisno od BMI, sugerišući vezu hipotalamo-hipofizno-tiroidne osovine i masnog tkiva (235). Pozitivna korelacija TSH i BMI dobijena je i u danskoj studiji koja je uključila 4082 eutiroidna gojazna ispitanika (227). Pozitivnu korelaciju TSH i FT3 sa BMI prijavljuju i autori studije sprovedene u Grčkoj na 78 morbidno gojaznih i 77 normalno uhranjenih ispitanika (248). De Pergola i saradnici su 2007. godine objavili tendenciju ka negativnoj korelaciji FT4 sa obimom struka i BMI ali bez dostizanja statističke značajnosti, uz statistički značajnu pozitivnu korelaciju FT4/FT3 indeksa sa obimom struka i BMI, što ukazuje na veću konverziju FT4 u FT3 kod pacijenata sa centralnim nakupljanjem masnog tkiva (24). Autori spekuliraju da bi se centralni tip gojzosti mogao karakterisati povišenom aktivnošću dejodinaza, ali da ovakva hipoteza još uvek nije potvrđena (24). U navedenoj studiji uočena je i pozitivna korelacija obima struka i TSH. Na osnovu promena u serumskom nivou TSH i FT3 koje ukazuju da su oba parametra tiroidne funkcije u pozitivnoj korelaciji sa centralnim tipom gojzosti, izgleda da su gojazni ispitanici manje osetljivi na cirkulišući nivo FT3 tj. nameće se zaključak da je u populaciji gojaznih resetovan centralni tirostat (24).

Meta-analiza iz 2011. godine obuhvatila je 29 studija na temu procene odnosa tiroidne funkcije i antropometrijskih karakteristika: pozitivna korelacija TSH sa antropometrijskim karakteristikama utvrđena je u 17 studija, a pozitivna korelacija BMI i telesne mase u još dve longitudinalne populacione studije (229). Rotondi i saradnici su objavili statistički značajno više



vrednosti serumskog nivoa TSH kod morbidno gojaznih eutiroidnih ispitanika, uz pretpostavku da promene u nivou TSH kod morbidne gojaznosti mogle biti nezavisne od tiroidne funkcije (21).

Ovakvo velik broj studija u kojima je izostala statistički značajna korelacija TSH i antropometrijskih karakteristika delom bi mogao da se objasni i pretpostavkom da se efekti gojaznosti na funkciju štitaste žlezde razlikuju u zavisnosti od stepena gojaznosti (229). U ovim studijama razlikovale su se i maksimalne referentne vrednosti za TSH (od 3.5 do 5.5 mU/l), a adekvatna gornja granica referentnih vrednosti za tirotropin je poslednjih nekoliko godina predmet debate, a podaci govore da je u 18 od 29 studija gornja granica referentnih vrednosti bila 4 mU/l (229, 249). Dvorakova i saradnici su utvrdili signifikantnu povezanost TSH i BMI samo među osobama ženskog pola (250). Sledeći razlog za ovakvu diskrepancu u rezultatima može biti i činjenica da većina studija nije uzimala u obzir naviku pušenja. Smatra se da pušenjesnižava serumski nivo TSH i leptina (229). Norveška studija prijavljuje pozitivnu korelaciju BMI i TSH samo među nepušačima (248).

#### 6.5.2. *Uticaj ftalata na leptinsku skereciju*

Na osnovu savremene literature poznato je da EDs mogu da utiču na adipogenezu, energetska ravnotežu i metabolizam lipida i da tim svojim dejstvom dovode do povećanja incidencije gojaznosti (95, 178). Smatra se da EDs ovakve efekte ostvaruju preko peroksizom proliferator aktivisanih receptora (95, 251). Familija PPARs je obligatorni heterodimer sa retinoidnom X receptorom i ponaša se kao metabolički senzor za različite lipofilne ligande, masne kiseline i njihove metabolite, a dokazano je da aktivacija RXR-PPAR $\gamma$  heterodimera promoviše biosintezu i deponovanje lipida i indukuje diferencijaciju adipocita (178, 251). Taksivig i saradnici su potvrdili da je leptin, zajedno sa adiponektinom, dobar marker diferencijacije adipocita (95). U istoj studiji utvrdili su i da MEHP ima snažnu sposobnost da aktivira PPAR $\gamma$  i time promoviše diferencijaciju adipocita i adipogenezu (95). Nasuprot ovome, Boberg i saradnici pokazali su da DiBP ima dejstvo slično rosiglitazonu tj. da dovodi do sniženja serumskog nivoa leptina i insulina kod fetusa gravidnih pacova, što može da ima vrlo značajne implikacije na metabolički sistem kasnije u životu (94).

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da nema statistički značajnih razlika u serumskom nivou leptina između podgrupa MEP/MEHP pozitivnih i MEP/MEHP negativnih gojaznih

ispitanika. Pri ispitivanju korelacija leptina i FT4 kod gojaznih MEP pozitivnih ispitanika dobijen je značajan, negativan i nizak Pearsonov koeficijent korelacije ( $r = -0.347$ ;  $p < 0.041$ ), što ukazuje da više vrednosti leptina korespondiraju s nižim vrednostima FT4. Međutim, pošto su neparametrijski koeficijenti neznačajni, ovakav rezultat treba tumačiti s velikim oprezom. Nismo dobili značajne korelacije sa TSH i FT3 u ovoj podgrupi ispitanika. Na uzorku gojaznih MEHP pozitivnih ispitanika nisu dobijene značajne korelacije leptina i parametara tiroidne funkcije.

Nismo uočili bilo kakvu povezanost serumskog nivoa leptina i ispitivanih monoestara ftalatnih metabolita (MEP i MEHP), što je delom posledica vrlo malog uzorka u ispitivanim podgrupama, a potom i vrlo blagih efekata koje ftalati imaju na leptinsku sekreciju i koji su, kako je već navedeno, za određene ftalate u suprotnosti. Potrebno je prilikom ispitivanja ovih odnosa u narednim studijama u obzir uzeti i druge laboratorijske parametre gojaznosti, prvenstveno lipidski status, HOMA-IRI i adiponektin.

Izostanak pozitivne korelacije TSH i FT3 kod naših gojaznih ispitanika sa leptinom bi, kao prvo, mogao biti u činjenici da je gornja granica referentnih vrednosti TSH veće od 4 mU/l (4.94 mU/L) dok autori navode potrebu da se koriguju referentne vrednosti za TSH tj. da se gornja granica spusti, ali definitivne preporuke, za sada, nema (249). Kao drugo, mali broj ispitanika sa morbidnom gojaznošću našoj ispitivanoj grupi, a u ovoj subpopulaciji promene parametara tiroidne funkcije su najveće, ali i malog uzorka gojaznih MEP/MEHP pozitivnih ispitanika, izostavljanje navika u vezi sa pušenjem iz analiza.

Neophodne su dalje randomizovane prospektivne studije na velikom uzorku, kako bi se rasvetlila uloga ftalata u etiopatogenezi gojaznosti.

## 7. ZAKLJUČAK

1. Polovina našeg stanovništva je izložena estrima ftalne kiseline, dominantno DEHP i DEP. Više vrednosti koncentracije oba navedena monoestar ftalatna metabolita u urinu imaju osobe ženskog pola. Urinarne koncentracije MEP i MEHP u našoj populaciji su mnogostruko više u odnosu na razvijene zemlje.
2. Potvrđeno je obesogeno dejstvo DEHP kroz postojanje statistički značajno viših vrednosti BMI i obima struka u grupi MEHP pozitivnih normalno uhranjenih ispitanika.
3. MEP dovodi do povišenja serumskog nivoa FT4 samo u subpopulaciji gojaznih ispitanika, ali u granicama referentnog opsega. Ovakva promena vrednosti FT4 bi delom mogla biti uzrokovana i promenama tiroidne funkcije na terenu gojaznosti.
4. Nije utvrđeno postojanje uticaja MEP na serumski nivo FT3.
5. Kod gojaznih MEP pozitivnih osoba ženskog pola povišen je serumski nivo TSH, što je efekat i same gojaznosti i MEP uzrokovane endokrine disrupcije. Vrednosti TSH ostaju u granicama referentnog opsega.
6. MEHP uzrokuje sniženje nivoa FT4 u okviru referentnih vrednosti kod normalno uhranjenih ispitanika.
7. Kod normalno uhranjenih muškaraca MEHP snižava serumski nivo FT3, ali u okviru referentnih vrednosti.
8. Nije utvrđen uticaj MEHP na serumski nivo tirotropina.
9. Ovim istraživanjem potvrđena je pretpostavka da DEHP i DEP imaju sposobnost da uzrokuju endokrinu disrupciju kod ljudi.

10. Potrebne su dalje studije koje će se baviti istraživanjem uticaja estara ftalne kiseline na ljudsko zdravlje, da bi se rasvetlili svi patofiziološki mehanizmi dejstva ftalata na, između ostalog, i tiroidnu funkciju.
11. U populaciji gojaznih ispitanika nije ustanovljen uticaj DEHP i DEP na leptinsku sekreciju.
12. Sa povećanim rizikom zaključivanja može se tvrditi da postoji negativna korelacija leptina i FT4 kod gojaznih ispitanika.
13. Leptin u našem ispitivanju nema uticaj na serumski nivo FT3 i FT4 u subpopulaciji gojaznih.
14. Neohodne su dalja istraživanja odnosa leptina i hipotalamo-hipofizno-tiroidne osovine da bi se u potpunosti rasvetlio njihov odnos. Takođe, potrebna su dalja istraživanja i na temu uticaja EDs, time i estara ftalne kiseline, na leptinsku sekreciju i tiroidnu funkciju, kao i njihovu spregu u održavanju energetske homeostaze.

## 8. LITERATURA

1. Duntas LH. Chemical contamination and the thyroid. *Endocrine* 2015;48:53-64.
2. Lechan RM, Fekete C. The TRH neuron: a hypothalamic integrator of energy metabolism. *Prog. Brain Res.* 2006;153:209-35.
3. Duntas LH, Emerson C. On the fortieth anniversary of thyrotropin-releasing hormone: the hormone that launched a new era. *Thyroid* 2009;19:1299-1301.
4. Lania A, Persani L, Beck-Peccoz P. Central hypothyroidism. *Pituitary* 2008;11:181–186.
5. Reinehr T. Obesity and thyroid function. *Mol Cell Endocrinol* 2010;316:165–71.
6. Visser WE, Friesema EC, Jansen J, Visser TJ. Thyroid hormone transport in and out of cells. *Trends Endocrinol Metab* 2008;19:50-6.
7. Lazar MA. Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities. *Endocr Rev* 1993;14:184-93.
8. Koibuchi N. Mechanism of chemical disruptors of thyroid function. *Hot Thyroidology* 2010;12.
9. Zimmermann-Belsing T, Brabant G, Holst JJ, Feldt-Rasmussen U. Circulating leptin and thyroid dysfunction. *Eur J Endocrinol* 2003;149:257-71.
10. Kokkinos A, Mourouzis J, Kyriaki D, Pantos C, Katsilambros N et al. Possible implications of leptin, adiponectin and ghrelin in the regulation of energy homeostasis by thyroid hormone. *Endocrine* 2007;32:30-2.
11. Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 2006;444:847-53.
12. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11:327-32.
13. Roti E, Minelli R, Salvi M. Thyroid hormone metabolism in obesity. *Int J Obesity* 2000;24: Suppl 2, S113-S115.
14. Ricquier D, Miroux B, Larose M, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F. Endocrine regulation of uncoupling proteins and energy expenditure. *Int J Obesity* 2000;24: Suppl 2:S86-S88.

- 
15. Bianco AC, Silva JE. Nuclear 3,5,3-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue: receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. *Endocrinology* 1987;120:55-62.
  16. Silva EJ. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev* 2006;86:435-64.
  17. Ojamaa K, Klein I, Sabet A, Steinberg SF. Changes in adenylyl cyclase isoforms as a mechanism for thyroid hormone modulation of cardiac beta-adrenergic receptor responsiveness. *Metabolism* 2000;49:275-9.
  18. Sims EA, Danforth Jr E. Expenditure and storage of energy in man. *J Clin Invest* 1987;79:1019-25.
  19. Danforth Jr E, Burger A. The role of thyroid hormones in the control of energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;13:581-95.
  20. Oppenheimer JH, Schwartz HL, Lane JT, Thompson MP. Functional relationship of thyroid hormone-induced lipogenesis, lipolysis, and thermogenesis in the rat. *J Clin Invest* 1991;87:125-32.
  21. Rotondi M, Leporati P, La Manna A, Pirali B, Mondello T et al. Raised serum TSH levels in patients with morbid obesity: is it enough to diagnose subclinical hypothyroidism? *Eur J Endocrinol* 2009;160:(3)403-8.
  22. Reinehr T, de Sousa G, Andler W. Hyperthyrotropinemia in obese children is reversible after weight loss and is not related to lipids. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:3088-91.
  23. Kozłowska L, Rosołowska-Huszcz D. Leptin, Thyrotropin, and Thyroid Hormones in Obese/Overweight Women Before and After Two Levels of Energy Deficit. *Endocrine* 2004;24(2):147-53.
  24. De Pergola G, Ciampolillo A, Paolotti S, Trerotoli P, Giorgino R. Free triiodothyronine and thyroid stimulating hormone are directly associated with waist circumference, independently of insulin resistance, metabolic parameters and blood pressure in overweight and obese women. *Clin Endocrinol* 2007;67:265-9.
  25. Reinehr T, Andler W. Thyroid hormones before and after weight loss in obesity. *Arch Dis Child* 2002;87:320-23.
  26. Moulin de Moraes CM, Mancini MC, de Melo ME, Figueiredo DA, Villares SM. Prevalence of subclinical hypothyroidism in a morbidly obese population and

- 
- improvement after weight loss induced by Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg* 2005;15:1287-91.
27. Kiortis DN, Durack I, Turpin G. Effects of a low-calorie diet on resting metabolic rate and serum triiodothyronine levels in obese children. *Eur J Pediatr* 1999;158:446-50.
28. Davidson MB, Chopra IJ. Effect of carbohydrate and noncarbohydrate sources of calories on plasma 3,5,3H-triiodothyronine concentrations in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1979;48:577-81.
29. Astrup A, Buemann B, Christensen NJ, Madsen J, Gluud C, Bennet P, Svenstrup B. The contribution of body composition, substrates, and hormones to the variability in energy expenditure and substrate utilization in premenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:279-86.
30. Al-Adsani H, Hoffer LJ, Silva JE. Resting energy expenditure is sensitive to small dose changes in patients on chronic thyroid hormone replacement. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1118-25.
31. Reinehr T, Kratzsch J, Kiess W, Andler W. Circulating soluble leptin receptor, leptin, and insulin resistance before and after weight loss in obese children. *Int J Obes* 2005;29:1230-35.
32. Lloyd RV, Jin L, Tsumanuma I, Vidal S, Kovacs K, Horvath E. Leptin and leptin receptor in anterior pituitary function. *Pituitary* 2001;4:33-47.
33. Mantzoros CS, Ozata M, Negro AB, Suchard MA, Ziotopoulou M, et al. Synchronicity of frequently sampled thyrotropin (TSH) and leptin concentrations in healthy adults and leptin-deficient subjects: evidence for possible partial TSH regulation by leptin in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3284-91.
34. Cabanelas A, Lisboa PC, Moura EG, Pazos-Moura CC. Leptin acute modulation of the 5-deiodinase activities in hypothalamus, pituitary and brown adipose tissue of fed rats. *Horm Metab Res* 2006;38:481-5.
35. Guo F, Bakal K, Minokoshi Y, Hollenberg AN. Leptin signaling targets the thyrotropin-releasing hormone gene promoter in vivo. *Endocrinology* 2004;145:2221-7.
36. Flynn RW, Macdonald TM, Morris AD, Jung RT, Leese GP. The thyroid epidemiology, audit, and research study: thyroid dysfunction in the general population. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(8):3879-84.
-

- 
37. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F, Evans JG, Zpung E, Bird T, Smith PA. The spectrum of thyroid disease in a community: the Whickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1977;7:481-93.
  38. Lania A, Persani L, Beck-Peccoz P. Central hypothyroidism. *Pituitary* (2008);11:181-6.
  39. Castro MR, Gharib H. Thyroid disorders. In: Camacho PM, Gharib H, Sizemore G, editors. *Evidence based endocrinology*. 3rd ed. Lippincot, Williams and Wilkins 2012. P43-81.
  40. Ehlers M, Schott M. Hashimoto's thyroiditis and papillary thyroid cancer: are they immunologically linked? *Trends Endocrin Met* 2014;25(12):656-64.
  41. Kirova G, Tredgeta J, Johnb R, Owena MJ, Lazarus JH. A cross-sectional and a prospective study of thyroid disorders in lithium-treated patients. *J Affect Disorders* 2005;(87):313-7.
  42. Nohynek GJ, Borgert CJ, Dietrich D, Rozman KK. Endocrine disruption: Fact or urban legend? *Toxicology Letters* 2013;223:295– 305.
  43. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P., Giudice L., Hauser R., Prins G., Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-Disrupting Chemicals Scientific Statement. *Endocr Rev* 2009; 30(4):293–342.
  44. Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins ES, Toppari J, Zoeller RT. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev* 2015;36:593-602.
  45. Weybridge, 1996. European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife. Report of Proceedings. EUR 17549.
  46. European Food Safety Agency (EFSA), 2013. Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment. *EFSA J.* 11(3),3132.
  47. WHO/IPCS, 2002. International Program on Chemical Safety. Global Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. Available at: <http://www.who.int/ipcs/>
  48. EPA, 2012. US Environmental Protection Agency. 13 September, 2012. Endocrine Disruptors Research. Available at: <http://www.epa.gov/endocrine/>



- 
49. Lewis RW, Billington R, Debruyne E, Gamer A, Lang B, Carpanini F. 2002. Recognition of adverse and nonadverse effects in toxicity studies. *Toxicol Pathol* 2002;30(1):66–74
  50. Editorial: Introduction to special issue: disruption of thyroid, sex steroid, and adrenal hormone systems and their crosstalk in aquatic wildlife. *Gen Comp Endocrinol* 2015;219:1-5.
  51. Koch HM, Rossbach B, Drexler H, Angerera J. Internal exposure of the general population to DEHP and other phthalates - determination of secondary and primary phthalatemonoester metabolites in urine. *Environ Res* 2003;93:177-85.
  52. Preuss R, Koch HM, Angere, J. Biological monitoring of the five major metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine using column-switching liquid chromatography- tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;816:269-80.
  53. D. Helm. Correlation between production amounts of DEHP and daily intake. *Sci Total Environ* 2007;388:389-91.
  54. Mathieu-Denoncourt J, de Solla SR, Langlois VS. Chronic exposures to monomethyl phthalate in Western clawed frogs. *Gen Comp Endocrinol* 2015;219: 53-63.
  55. United Nations Environment Programme, World Health Organization (UNEP/WHO): State of the science of endocrine disrupting chemicals — 2012: Summary for decision makers. In: Bergman A, Heindel JJ, Jobling S, Kidd KA, Zoeller RT. (Eds.) 2013;pp. 1–30 (Geneva).
  56. [www.norman-network.net](http://www.norman-network.net)
  57. Brack W, Dulio V, Slobodnik J. The NORMAN Network and its activities on emerging environmental substances with a focus on effect-directed analysis of complex environmental contamination. *Environmental Sciences Europe* 2012;24:29.
  58. Baker VA. Endocrine disrupters - testing strategies to assess human hazard. *Toxicol in Vitro* 2001;15:413-9.
  59. Boas M, Feldt-Rasmussen U, Skakkebek NE, Main KM. Environmental chemicals and thyroid function. *Eur J Endocrinol* 2006;154:599–611.
  60. Desvergne B, Feige JN, Casals-Casas C. PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic? *Mol Cell Endocrinol* 2009;304: 43-8.

- 
61. Stahlhut RW, van Wijngaarden E, Dye TD, Cook S, Swan SH. Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect* 2000;115:876–82.
  62. Hatch EE, Nelson JW, Qureshi MM, Weinberg J, Moore LL et al. Association of urinary phthalate metabolite concentrations with body mass index and waist circumference: a cross-sectional study of NHANES data, 1999–2002. *Environ Health* 2008;7:27.
  63. Swedenborg E, Ruegg J, Makela S, Pongratz I. Endocrine disruptive chemicals: mechanism of action and involvement in metabolic disorders. *J Mol Endocrinol*. 2009;43:1-10.
  64. Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Makoto E. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: A review of recent studies on reproduction. *Regul Toxicol Pharm* 2008;50:37–49.
  65. Gronemeyer H, Gustafsson JA and Laudet V. Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:950–64.
  66. Poland A, Knutson JC. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1982;22:517–54.
  67. Swanson HI. DNA binding and protein interactions of the AHR/ARNT heterodimer that facilitate gene activation. *Chem Biol Interact* 2002;141:63–76.
  68. Claessens F, Gewirth DT. DNA recognition by nuclear receptors. *Essays Biochem* 2004;40:59–72.
  69. Sheehan DM, Willingham EJ, Bergeron JM, Osborn CT, Crews D. No threshold dose for estradiol-induced sex reversal of turtle embryos: how little is too much? *Environ Health Perspect* 1999;107:155–9.
  70. vom Saal FS, Akingbemi BT, Belcher SM, Birnbaum LS, Crain DA et al. Chapel Hill Bisphenol A Expert Panel Consensus Statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol* 2007;24:131–8.
  71. Anway MD, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology* 2006;147:S43–S49.

- 
72. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR Jr, Lee DH, Shioda T, Soto AM, vom Saal FS, Welshons WV, Zoeller RT, Myers JP. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev.* 2012;33(3):378-455.
73. Kortenkamp A. Ten Years of Mixing Cocktails: A Review of Combination Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals. *Environ Health Perspect* 2007;115: Suppl2, S98-S105.
74. Fredericksen H, Niels E, Skakkebek NE, Andersson AM. Metabolism of phthalates in humans. *Mol Nutr Food Res* 2007;51:899–911.
75. Green R, Hauser R, Calafat A, Weuve J, Schettler T, et al. Use of Di(2-ethylhexyl) Phthalate containing medical products and urinary levels of Mono(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal intensive care unit infants. *Environ Health Persp* 2005;113:1222–25.
76. Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster P, Golub M, Henderson R, Hinberg I, Little R, Seed J, Shea K, Tabacova S, Tyl R, Williams P, Zaharewski T. NTP center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-isodecyl phthalate. *Reprod Toxicol* 2002;16:655–78.
77. Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster P, Golub M, Henderson R, Hinberg I, Little R, Seed J, Shea K, Tabacova S, Tyl R, Williams P, Zaharewski T. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate. *Reprod Toxicol* 2002;16:489–527.
78. Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster P, Golub M, Henderson R, Hinberg I, Little R, Seed J, Shea K, Tabacova S, Tyl R, Williams P, Zaharewski T. NTP Center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of butyl benzyl phthalate. *Reprod Toxicol* 2002;16:453–87.
79. Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster P, Golub M, Henderson R, Hinberg I, Little R, Seed J, Shea K, Tabacova S, Tyl R, Williams P, Zaharewski T. NTP center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates

- expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-octyl phthalate. *Reprod Toxicol* 2002;16:721–34.
80. Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster P, Golub M, Henderson R, Hinberg I, Little R, Seed J, Shea K, Tabacova S, Tyl R, Williams P, Zaharewski T. NTP center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-hexyl phthalate. *Reprod Toxicol* 2002;16:709–19.
81. Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster P, Golub M, Henderson R, Hinberg I, Little R, Seed J, Shea K, Tabacova S, Tyl R, Williams P, Zaharewski T. NTP center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-isononyl phthalate. *Reprod Toxicol* 2002;16:679–708.
82. Kavlock R, Boekelheide K, Chapin R, Cunningham M, Faustman E, Foster P, Golub M, Henderson R, Hinberg I, Little R, Seed J, Shea K, Tabacova S, Tyl R, Williams P, Zaharewski T. NTP center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 2002;16:529–653.
83. Shen O, Wu W, Du G, Liu R, Yu L et al. Thyroid disruption by d-n-butyl phthalate (DBP) and mono-n-butyl phthalate (MBP) in *Xenopus laevis*. 2011. *PLoS ONE* 6, e19159.
84. Mankidy R., Wiseman S, Ma H, Giesy JP. Biological impact of phthalates. *Toxicol Lett* 2013;217:50–8.
85. Mitchell FE, Price SC, Hinton RH, Grasso P, Bridges JW. Time and dose-response study of the effects on rats of the plasticizer di (2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol App Pharmacol* 1985;81:371–92.
86. Hinton RH, Mitchell FE, Mann A, Chescoe D, Price SC, Nunn A, Grasso P, Bridges JW. Effects of phthalic acid esters on the liver and thyroid. *Environ Health Perspect* 1986;70:195–210.
87. Price SC, Chescoe D, Grasso P, Wright M, Hinton RH. Alterations in the thyroids of rats treated for long periods with di-(2-ethylhexyl) phthalate or with hypolipidaemic agents. *Toxicology Letters* 1988;40:37–46.

- 
88. Poon R, Lecavalier P, Mueller R, Valli VE, Procter BG, Chu I. Subchronic oral toxicity of di-n-octyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Food Chem Toxicol* 1997;35:225–39.
  89. Howarth JA, Price SC, Dobrota M, Kentish PA, Hinton RH. Effects on male rats of di-(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-hexylphthalate administered alone or in combination. *Toxicol Lett* 2001;121:35–43.
  90. O'Connor JC, Frame SR, Ladics GS. Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens. *Toxicol Sci* 2002;69:92–108.
  91. Rais-Bahrami K, Nunez S, Revenis ME, Luban NL & Short BL. Follow-up study of adolescents exposed to di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) as neonates on extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) support. *Environ Health Perspect* 2004;112:1339–40.
  92. Tickner JA, Schettler T, Guidotti T, McCally M & Rossi M. Health risks posed by use of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical review. *Am J Ind Med* 2001;39:100–11.
  93. Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. Di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites may alter thyroid hormone levels in men. *Environ Health Persp* 2007;115(7):1029-34.
  94. Boberg J, Metzdorff S, Wortziger R, Axelstad M, Brokken L, Vinggaard AM, Delgaard M, Nellemann C. Impact of di-isobutyl phthalate and other PPAR agonists on steroidogenesis and plasma insulin and leptin levels in fetal rats. *Toxicology* 2008;250:75–81.
  95. Taxvig C, Dreisig K, Boberg J, Nellemann C, Schelde AB, Pedersen D, Boergesen M, Mandrup S, Vinggaard AM. Differential effects of environmental chemicals and food contaminants on adipogenesis, biomarker release and PPARc activation. *Mol Cell Endocrinol* 2012;361:106–15.
  96. IARC International Agency for Research on Cancer: Some industrial chemicals and dyestuffs. Vol. 29. In: *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, p. 416. Lyon 1982.
  97. Schettler T. Human exposure to phthalates via consumer products. *Int J Androl* 2006;29:134-9.
  98. Mackintosh CE, Maldonado JA, Ikonomou MG, Gobas F. Absorption of phthalate esters and PCBs in a marine ecosystem. *Environ Sci Technol* 2006;40:3481–88.

- 
99. Johns LE, Cooper GS, Galizia A, Meeker JD. Exposure assessment issues in epidemiology studies of phthalates. *Environ Int* 2015;85:27–39.
  100. Wittassek M, Angerer J. Phthalates: metabolism and exposure. *Int J Androl* 2008;31:131-38.
  101. Hogberg J, Hangberg A, Berglund M, Skerfving S, Remberger M, Calafat AM, Filipsson AF, Johansson N, Apelgren M, Hakansson H. Phthalate diesters and their metabolites in human breast milk, blood or serum, and urine as biomarkers of exposure in vulnerable populations, *Environ Health Perspect* 2008;116:334-9.
  102. Heudorf U, Mersch-Sundermann V, Angerer J. Phthalates: Toxicology and exposure. *Int J Hyg Environ Health* 2007;210:623–34.
  103. Silva M J, Barr D B, Reidy J A, Kato K, Malek NA et al. Glucuronidation patterns of common urinary and serum monoester phthalate metabolites. *Arch. Toxicol.* 2003;77:561–7.
  104. Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J. New metabolites of di (2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* 2005;79:367–76.
  105. Calafat A M, Ye X, Silva M J, Kuklenyik Z, Needham LL. Human exposure assessment to environmental chemicals using biomonitoring. *Int. J. Androl.* 2006;29:166-71.
  106. Rusyn I, Peters JM, Cunningham ML. Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver. *Crit Rev Toxicol* 2006;36:459 –79.
  107. Heindel J J, Powell C J. Phthalate ester effects on rat Sertoli cell function in vitro: Effects of phthalate side chain and age of animal. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;115:116-23.
  108. Albro PW. Absorption, metabolism, and excretion of di(2- ethylhexyl) phthalate by rats and mice. *Environ Health Perspect* 1986;65:293–8.
  109. Blount BC, Silva MJ, Caudil SP, Needham LL, Pirkle JL, Sampson EJ et al. Levels of seven urinary phthalate metabolites in human reference population. *Environ Health Perspect* 2000;108:979-82.
  110. Blount BC, Milgram KE, Silva MJ, Malek NA, Reidy JA, Needham LL, Brock JW. Quantitative detection of eight phthalate metabolites in human urine using HPLC-APCI-MS/MS. *Anal Chem* 2000;72:4127–34.

- 
111. Brock JW, Caudill SP, Silva MJ, Needham LL, Hilborn ED. Phthalate monoesters levels in the urine of young children. *Bull Environ Contamin Toxicol* 2002;68:309–14.
  112. Duty SM, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Chen Z, Herrick RF, Christiani D, Hauser R. Urinary phthalate monoesters at general population exposure levels are associated with altered semen quality. *Epidemiology* 2002;13:657.
  113. Anderson WAC, Castle L, Scotter MJ, Massey MC, Springal C. A biomarker approach to measuring human dietary exposure to certain phthalate diesters. *Food Additives and Contaminants* 2001;18(2):1068-74.
  114. Albro PW, Moore B. Identification of the metabolites of simple phthalate diesters in rat urine. *J Chromatogr* 1974;94:209–18.
  115. Williams DT, Blanchfield BJ. The retention, distribution, excretion, and metabolism of dibutyl phthalate-7-14 C in the rat, *J Agric Food Chem* 1975;23:854-8.
  116. Calafat AM, Brock JW, Silva MJ, Gray LE Jr, Reidy JA et al. Urinary and amniotic fluid levels of phthalate monoesters in rats after the oral administration of di(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-butyl phthalate. *Toxicology* 2006;217:22–30.
  117. Foster PM, Cook MW, Thomas LV, Walters DG, Gangolli SD. Differences in urinary metabolic profile from di-n-butyl phthalate-treated rats and hamsters. A possible explanation for species differences in susceptibility to testicular atrophy. *Drug Metab Dispos* 1983;11:59–61.
  118. Saillenfait AM, Payan JP, Fabry JP, Beydon D, Langonne I, Gallissot F, Sabate JF. Assessment of the developmental toxicity, metabolism, and placental transfer of Di-n-butyl phthalate administered to pregnant rats. *Toxicol Sci* 1998;45:212–24.
  119. Koch HM, Calafat AM. Human body burdens of chemicals used in plastic manufacture. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci* 2009;364(1526):2063–78.
  120. Koch HM, Preuss R, Angerer J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): Human metabolism and internal exposure – an update and latest results. *Int J Androl* 2006;29:155-65.
  121. Albro PW, Corbett JT, Schroeder JL, Jordan S, Matthews HB. Pharmacokinetics, interactions with macromolecules and species differences in metabolism of DEHP. *Environ Health Perspect* 1982;45:19–25.
  122. Albro PW, Tondeur I, Marbury D, Jordan S, Corbett JT. Polar metabolites of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1983;760:283-92.
-

- 
123. Gollamudi R, Prasanna HR, Rao RH, LawrenceWH, Autian J. Impaired metabolism of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in old rats – an in vitro study. *J Toxicol EnvironHealth* 1983;12:623-32.
  124. Silva MJ, Samandar E, Preau JL Jr, Needham LL, Calafat AM. Urinary oxidative metabolites of di (2-ethylhexyl) phthalate in humans, *Toxicology* 2006;219:22–32.
  125. KochHM, Bolt HM, Angerer J. Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Arch. Toxicol.* 2004;78:123–30.
  126. Silva MJ, Reidy JA, Preau JL, Samandar E, Needham LL et al. Measurement of eight urinary metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment. *Biomarkers* 2006;11:1–13.
  127. Christensen K, Sobus J, Phillips M, Blessinger T, Lorber M, Tan Z.M. Changes in epidemiologic associations with different exposure metrics: A case study of phthalate exposure associations with body mass index and waist circumference. *Environ Int* 2014;73:66–76.
  128. Dewalque L, Pirard C, Vandepaer S, Charlier C. Temporal variability of urinary concentration of phthalate metabolites, parabens and benzophenone-3 in a Belgian adult population. *Environ Res* 2015;142:414-23.
  129. Silva MJ, Kato K, Wolf C, Samandar E, Silva SS et al. Urinary biomarkers of di-isooctyl phthalate in rats. *Toxicology* 2006;223:101–12.
  130. Silva MJ, Reidy JA, Preau JL Jr, Needham LL, Calafat AM. Oxidative metabolites of diisooctyl phthalate as biomarkers for human exposure assessment. *Environ Health Perspect.* 2006;114:1158-61.
  131. Koch H M, Muller J. Angerer J. Determination of secondary, oxidised di-isooctylphthalate (DINP) metabolites in human urine representative for the exposure to commercial DINP plasticizers. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;847:114-25.
  132. Kato K, Silva MJ, Needham LL, Calafat AM. Quantifying phthalate metabolites in human meconium and semen using automated off-line solid-phase extraction coupled with on-line SPE and isotope-dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2006;78:6651-55.



- 
133. Silva MJ, Reidy JA, Samandar E, Herbert AR, Needham LL et al. Detection of phthalate metabolites in human saliva. *Arch Toxicol* 2005;79:647-52.
134. Fennell TR, Krol WL, Sumner S C, Snyder RW. Pharmacokinetics of dibutylphthalate in pregnant rats. *Toxicol Sci* 2004;82:407-18.
135. Silva MJ, Reidy JA, Herbert AR, Preau JL Jr, Needham LL, Calafat AM. Detection of phthalate metabolites in human amniotic fluid. *Bull Environ Contam Toxicol* 2004;72:1226-31.
136. Zhu J, Phillips SP, Feng YL, Yang X. Phthalate esters in human milk: Concentration variations over a 6-month postpartum time. *Environ Sci Technol* 2006;40:5276-81.
137. Calafat AM, Slakman AR, Silva MJ, Herbert AR, Needham LL. Automated solid phase extraction and quantitative analysis of human milk for 13 phthalate metabolites, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;805:49-56.
138. Woodruff TJ. Making It Real - The Environmental Burden of Disease. What Does It Take to Make People Pay Attention to the Environment and Health? Editorial. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100(4):1241-44.
139. Sakhi AK, Lillegaard ITL, Voorspoels S, Carlsen MH, Loken EB et al. Concentrations of phthalates and bisphenol A in Norwegian foods and beverages and estimated dietary exposure in adults. *Environ Int* 2014;73:259-69.
140. MAFF (1996) Food Surveillance Information Sheet – Phthalates in Food. Joint Food Safety and Standards Group, Vol. 1999. MAFF, UK.
141. Meek M, Chan P. Bis(2-ethylhexyl)phthalate: evaluation of risks to health from environmental exposure in Canada. *J Environ Sci Heal C* 1994;179-94.
142. FDA (2001) Safety Assessment of di (2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Released from Medical Devices. US Food and Drug Administration, Washington DC: <http://www.fda.gov/cdrh/ost/dehp-pvc.pdf>.
143. Chourasia M, Jain S. Pharmaceutical approaches to colon targeted drug delivery systems. *J Pharm Pharm Sci* 2003;6:33-66.
144. Official Journal of the European Union. (2005/845/EC) 2005.
145. Rudel R, Brody J, Spengler J, Vallarino J, Geno P, Sun G, Yau A. Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples. *J Air Waste Manag Assoc* 2001;51:499-513.
-

- 
146. Becker K, Seiwert M, Angerer J, Heger W, Koch H, nagorka R, Rosskamp E, Schluter C, Seifert B, Ullrich D. DEHP metabolites in urine of children and DEHP in house dust. *Int J Hyg Envir Heal* 2004;207:409–17.
147. Adibi J, Perera F, Jedrychowski W, Camann D, Barr D, Yacek R, Whyatt RM. Prenatal exposures to mpthalates among women in New York City and Krakow, Poland. *Environ Health Persp* 2003;111:1719-22.
148. Oie L, Hersoug L, Madsen J. Residential exposure to plasticizers and its possible role in the pathogenesis of asthma. *Environ Health Persp* 1997;105:972–78.
149. Karle V, Short B, Martin G, Bulas D, Getson P et al. Extracorporeal membrane oxygenation exposes infants to the plasticizer, di(2-ethylhexyl) phthalate. *Crit Care Med* 1997;25: 696-703.
150. Calafat A, Needham L, Silva M, Lambert G. Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit. *Pediatrics* 2004;113:429-34.
151. Elsisi A, Carter D, Sipes I. Dermal absorption of phthalate diesters in rats. *Fund Appl Toxicol* 1989;12:7077.
152. Janjua NZ, Mortensen GK, Anderson AM, Kongshoj B, Skakabek NE, Wulf HK. Systemic uptake of diethyl phthalate, dibutyl phthalate, and butyl paraben following whole-body topical application and reproductive and thyroid hormone levels in humans. *Environ Sci Technol* 2007;41:5564-70.
153. Foster PMD, Lake BG, Thomas LV, Cook MW, Gangolli SD. Studies on the testicular effects and zinc excretion produced by various isomers of monobutyl-o-phthalate in the rat. *Chem Biol Interact* 1981;34:233-8.
154. Saillenfait AM, Lagonni I, Leheup B. Effects of mono-n-butyl phthalate on the development of rat embryos: in vivo and in vitro observations. *Pharmacol Toxicol* 2001;89:104-12.
155. Barlow NJ, Phillips SL, Wallace DG, Sar M, Gaido KW, Foster PMD. Quantitative changes in gene expression in fetal rat testes following exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 2003;73:431–51.
156. Borch J, Metzdorff SB, Vinggaard AM, Brokken L, Dalgaard, M. Mechanisms underlying the anti-androgenic effects of diethylhexyl phthalate in fetal rat testis. *Toxicology* 2006;223:144–55.
-

- 
157. Xu C, Chen JA, Qiu Z, Zhao Q, Luo J et al. Ovotoxicity and PPAR-mediated aromatase downregulation in female Sprague–Dawley rats following combined oral exposure to benzo[a]pyrene and di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Lett* 2010;199:323–32.
158. Fujii S, Yabe K, Furukawa M, Hirata M, Kiguchi M, Ikka T. A two-generation reproductive toxicity study on diethyl phthalate (DEP) in rats. *J Toxicol Sci* 2005;30:97–116.
159. Foster PM. Disruption of reproductive development in male rat offspring following in utero exposure to phthalate esters. *Int J Androl* 2006;29:140–7.
160. Tabacova S, Balabaeva L, Little RE. Maternal exposure to exogenous nitrogen compounds and complications of pregnancy. *Arch Environ Health* 1997;52:341–7.
161. Gladen BC, Tabacova S, Baird DD, Little RE, Balabaeva L. Variability of lipid hydroperoxides in pregnant and nonpregnant women. *Reprod Toxicol* 1999;13:41–4.
162. Latini G, Felice CD, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect* 2003;111:1783–5.
163. Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse SL, Calafat AM, Mao CS, Redmon JB, Ternand CL, Sullivan S, Teaque JL, Study for future families research team. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. *Environ Health Perspect* 2005;113:1056–61.
164. Wolff MS, Engel SM, Berkowitz GS, Ye X, Silva MJ, Zhu C, Wetmur J, Calafat AM. Prenatal phenol and phthalate exposures and birth outcomes. *Environ Health Perspect* 2008;116:1092–7.
165. Duty SM, Calafat AM, Silva MJ, Ryan L, Hauser R. Phthalate exposure and reproductive hormones in adult men. *Hum Reprod* 2005;20(3):604–10.
166. Hauser R, Meeker JD, Duty S, Silva MJ, Calafat AM. Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Epidemiology* 2006;17:682–91.
167. Duty SM, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Chen Z, Herrick RF, Christiani DC, Hauser R. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology* 2003;14:269–77.

- 
168. Wirth JJ, Rossano MG, Potter R, Puscheck E, Daly DC, Paneth N, Krawetz SA, Protas BM, Diamond BP. A pilot study associating urinary concentrations of phthalate metabolites and semen quality. *Sys Biol Reprod Med* 2008;54(3):143–54.
169. Lomenick JP, Calafat AM, Melguizo Castro MS, Mier R, Stenger P, Foster MB, Wintergest F. Phthalate exposure and precociouspuberty in females. *J Pediatr* 2010;156(2):221–5.
170. Lopez-Carillo L, Hernandez-Ramirez RU, Calafat AM, Tores-Sanches L, Galvan-Portillo M, Needham LL, Ruiz-Ramos R, Cebrian E. Exposure to phthalates and breast cancer risk in Northern Mexico. *Environ Health Perspect* 2010;118(4):539–44.
171. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol* 2001;2:133–40.
172. Ward JM, Rice JM, Creasia D, Lynch P, and Riggs C. Dissimilar patterns of promotion by di (2-ethylhexyl)phthalate and phenobarbital of hepatocellular neoplasia initiated by diethylnitrosamine in B6C3F1 mice. *Carcinogenesis* 1983;4(8):1021–29.
173. Kim BN, Cho SC, Kim Y, Shin MS, Yoo HJ, Kim JW, Yang YH, Kim HW, Bhang SY, Hong YC. Phthalates exposure and attention-deficit/hyperactivity disorder in school-age children. *Biol Psychiatry* 2009;66(10):958–63.
174. Testa C, Nuti F, Hayek J, De Felice C, Chelli M, Rovero P, Latini G and Papini AM (2012) Di-(2-ethylhexyl) phthalate and autism spectrum disorders. *ASN NEURO* 4(4):223-9.
175. Selgrade MK, Lemanske RF Jr, Gilmour MI, Neas LM, Ward MD, Henneberger PK, Weissman DN, Hoppin JA, Dietert JJ, Sly PD, Geller AM, Enright PL, Backus GS, Bromberg PA, Germolec GR, Yeatts KB. Induction of asthma and the environment: what we know and need to know. *Environ Health Perspect* 2006;114:615–9.
176. Jaakkola JJ, Parise H, Kislitsin V, Lebedeva NI, Spengler JD. Asthma, wheezing, and allergies in Russian schoolchildren in relation to new surface materials in the home. *Am J Pub Health* 2004;94:560–2.
177. Bornehag CG, Sundell J, Hagerhed-Engman L, Sigsgaard T, Janson S, Aberg N, DBH study group. “Dampness” at home and its association with airway, nose and skin symptoms among 10 851 preschool children in Sweden: A cross sectional study. *Indoor Air* 2005;15:48–55.
-

- 
178. Grun F, Blumberg B. Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signalling. *Endocrinology* 2006;147(6):S50–S55.
179. Vickers MH. Developmental programming and adult obesity: the role of leptin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007;14(1):17–22.
180. Annamalai J, Namasivayam V. Endocrine disrupting chemicals in the atmosphere: their effects on humans and wildlife. *Environ Int* 2015;76:78–97.
181. UNEP (United Nations Environment Programme). The chemical industry and international cooperation to manage chemical risks: facts and figures. *Ind Environ* 2004;27(2-3):4–6.
182. Zoeller R.T. Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: New studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals? *Mol Cell Endocrinology* 2005;242:10–15.
183. Shimada N, Yamauchi K. Characteristics of 3, 5, 3'-tri-iodothyronine (T3)-uptake system of tadpole red blood cell: effect of endocrine-disrupting chemicals on cellular T3 response. *J Endocrinol* 2004;183:627–37.
184. Vijayanathan V, Greenfield NJ, Thomas TJ, Ivanova MM, Tyulmenkov VV, Klinge CM et al. Effects of estradiol and 4-hydroxytamoxifen on the conformation, thermal stability and DNA recognition of estrogen receptor  $\beta$ . *Biochem. Cell Biol* 2007;85(1):110.
185. Trasande L, Zoeller T.R., Hass U, Kortenkamp A, Grandjean P, Myers JP, DiGangi J, Bellanger M, Hauser R, Legler J, Skakkebaek NE, Heindl JJ. Estimating burden and disease costs of exposure to endocrine-disrupting chemicals in the European Union. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100(4):1245–55.
186. Legler J, Fletcher T, Govarts E, Porta M, Blumberg B, Heindel JJ, trasande L. Obesity, diabetes and associated costs of exposure to endocrine disrupting chemicals in the European Union. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:1278-89.
187. Bellanger M, Demeneix B, Grandjean P, Zoeller RT, Bertollini R, Trasande L. Neurobehavioral deficits, diseases and associated costs of exposure to endocrine disrupting chemicals in the European Union. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:1256-66.
188. Hauser RH, Skakkebaek NE, Hass U, Kortenkamp A, Grandjean P, Andersson AM, Kortenkamp A, Heindel JJ, Trasande L. Male reproductive disorders, diseases and costs of

- exposure to endocrine disrupting chemicals in the European Union. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:1267-78.
189. Cao XL. Phthalate esters in foods: sources, occurrence, and analytical methods. *Compar Rev Food Sci Food Saf* 2010;9(1):21–43.
190. Wormuth M, Scheringer M, Vollenweider M, Hungerbühler K. What are the sources of exposure to eight frequently used phthalic acid esters in Europeans? *Risk Anal* 2006;26(3):803–24.
191. Koch HM, Haller A, Weiss T, Käfferlein HU, Stork J, Brüning T. Phthalate exposure during cold plastisol application — a human biomonitoring study. *Toxicol Lett* 2012;213(1):100–6.
192. Koch HM, Lorber M, Christensen KL, Pälme C, Koslitz S, Brüning T. Identifying sources of phthalate exposure with human biomonitoring: results of a 48 h fasting study with urine collection and personal activity patterns. *Int J Hy Environ Health* 2013;216(6): 672–81.
193. Preau Jr JL, Wong LY, Silva MJ, Needham LL, Calafat AM. Variability over 1 week in the urinary concentrations of metabolites of diethyl phthalate and di (2-ethylhexyl) phthalate among eight adults: an observational study. *Environ. Health Perspect* 2010;118:1748–54.
194. Cantonwine DE, Cordero JF, Rivera-Gonzalez LO, Anzalota Del Toro LV, Ferguson KK. Urinary phthalate metabolite concentrations among pregnant women in northern Puerto Rico: distribution, temporal variability, and predictors. *Environ Int* 2014;62:1–11.
195. Meeker JD, Calafat AM, Hauser R. Urinary phthalate metabolites and their biotransformation products: predictors and temporal variability among men and women. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2012;22:376–85.
196. Fisher M, Arbuckle TE, Mallick R, LeBlanc A, Hauser R et al. Bisphenol A and phthalate metabolite urinary concentrations: daily and across pregnancy variability. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2015;25(3):231-9
197. Kluwe WM. Overview of phthalate ester pharmacokinetics in mammalian-species. *Environ Health Perspect* 1982;45:3–10.

- 
198. Taylor JA, Vom Saal FS, Welshons WV, Drury B, Rottinghaus G, Hunt PA et al. Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesusmonkeys and mice: relevance for human exposure. *Environ Health Perspect* 2011;119:422–30
199. Christensen KY, Lorber M, Koch H, Kolossa-Gehring M, Morgan MK. Population variability of phthalates metabolites and bisphenol A concentrations in spot urine samples versus 24- or 48-hour collections. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2012;22(6):632–40.
200. Frederiksen H, Kranich SK, Jorgensen N, Taboureau O, Petersen JH, Anderson AM. Temporal variability in urinary phthalate metabolite excretion based on spot, morning, and 24-h urine samples: considerations for epidemiological studies. *Environ Sci Technol* 2013;47:958–67.
201. Albro PW, Jordan S, Corbett JT, Schroeder J L. Determination of total phthalate in urine by gas chromatography. *Anal Chem* 1984;56:247-50.
202. Kato K, Manori JS, Reidy JA, Hurtz D, Malek NA, Needham LL, Nakazawa H, Barr DB and Calafat AM. Mono (2-Ethyl-5-Hydroxyhexyl) phthalate and mono-(2-ethyl-5-oxohexyl) phthalate as biomarkers for human exposure assessment to di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect* 2004;112(3):327-30.
203. CDC 2003. Second National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta GA: Center for Disease Control and Prevention. [www.cdc.gov/exposurereport](http://www.cdc.gov/exposurereport)
204. White RD, Carter DE, Earnest D, Mueller J. Absorption and metabolism of 3 phthalate diesters by the rat small intestine. *Food Cosmet Toxicol* 1983;18:383-3.
205. Williams DT, Blanchfield BJ. Retention, excretion and metabolism of di-(2-ethylhexyl) phthalate administered orally to the rat. *Bull Environ Contam Toxicol* 1974;11:371-8.
206. Albro P W, Thomas R, Fishbein L. Metabolism of di-ethylhexyl phthalate by rats. Isolation and characterization of the urinary metabolites. *J Chromatogr* 1973;76:321-30.
207. Solomon S, Sawilowsky S. Impact of Rank-Based Normalizing Transformations on the Accuracy of Test Scores. *Journal of Modern Applied Statistical Methods* 2009;8(2):448-62.
208. Angoff, W. H. Scales, norms, and equivalent scores. 1984. Princeton, NJ: Educational Testing Service.

- 
209. Boas M, Frederiksen H, Feldt-Rasmussen U, Skakkebaek NE, Hegedus L, Childhood exposure to phthalates: associations with thyroid function, insulin-like growth factor I, and growth. *Environ Health Perspect* 2010;118(10):1458-64.
210. Huang PC, Kuo PL, Guo YL, Liao PC, Lee CC. Associations between urinary phthalate monoesters and thyroid hormones in pregnant women. *Hum Reprod* 2007;22(10):2715–22.
211. Keselman, H.J., Cribbie, R. and Holland, B. Controlling the rate of Type I error over a large set of statistical tests. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology* 2002;55:27–39.
212. Rice WR. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 1989;(43)1:223-5.
213. Medić Stojanoska M, Milankov A, Vuković B, Vukcevic D, Sudji J, Bajkin I, Ćurić N, Ičin T, Kovačev-Zavišić B, Milić N. Do diethyl phthalate (DEP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) influence the metabolic syndrome parameters? Pilot study. *Environ Monit Assess* 2015;187:526.
214. Center for disease control and prevention.([www.cdc.gov/](http://www.cdc.gov/))
215. Fourth national report on exposure to environmental chemicals, updated tables 2015.([www.cdc.gov/biomonitoring/](http://www.cdc.gov/biomonitoring/))
216. AgPU, PVC product information No. 1, Usefull information about PVC, PVCplus Kommunikation GmbH, Bonn 2005, pp. 1–20, <http://www.agpu.de/index.php>
217. Pravilnik o ograničenjima i zabranama proizvodnje, stavljanja u promet i korišćenjav hemikalija koje predstavljaju neprihvatljiv rizik po zdravlje ljudi i životnu sredinu. 2011; <http://www.cis.org.rs/propisi>
218. Službeni glasnik Republike srbije br 24/2014
219. Desvergne B,Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20(5):649–88.
220. Teitelbaum SL, Mervish N, Moshier EL, Vangeepuram N, Galvez MP et al. Associations between phthalate metabolite urinary concentrations and body size measures in New York City children. *Environ Res* 2012;112:186–93.
221. Trasande L, Attina TM, Sathyanarayana S, Spanier AJ, Blustein J. Race/ethnicity-specific associations of urinaryphthalates with childhood body mass in a nationally representativesample. *Environ Health Perspect* 2013;121:501–6.
-



- 
222. Meeker JD, Ferguson KK. Relationship between Urinary Phthalate and Bisphenol A Concentrations and Serum Thyroid Measures in U.S. Adults and Adolescents from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2007–2008. *Environ Health Perspect* 2011;119(10):1396-402.
223. Bernal CA, Martinelli MI, Mocchiutti NO. Effect of the dietary exposure of rat to di (2-ethyl hexyl) phthalate on their metabolic efficiency. *Food Addit Contam* 2002;19:1091–6.
224. Gayathri NS, Dhanya CR, Indu AR, Kurup PA. Changes in some hormones by low doses of di (2-ethyl hexyl) phthalate (DEHP), a commonly used plasticizer in PVC blood storage bags and medical tubing. *Indian J Med Res* 2004;119:139–44.
225. Ishihara A, Nishiyama N, Sugiyama S, Yamauchi K. 2003. The effect of endocrine disrupting chemicals on thyroid hormone binding to Japanese quail transthyretin and thyroid hormone receptor. *Gen Comp Endocrinol* 134:36–43.
226. Wenzel A, Franz C, Breous E, Loos U. Modulation of iodide uptake by dialkyl phthalate plasticisers in FRTL-5 rat thyroid follicular cells. *Mol Cell Endocrinol* 2005;244:63–71.
227. Knudsen N, Laurberg P, Rasmussen LB, Bulow I, Perrild H et al. Small differences in thyroid function may be important for body mass index and the occurrence of obesity in the population. *J Clin Endocrinol Metab*;90:4019–24.
228. Kiortis DN, Durack I, Turpin G. Effects of a low-calorie diet on resting metabolic rate and serum triiodothyronine levels in obese children. *Eur J Pediatr* 1999;158:446–450.
229. De Moura Souza A, Sichieri R. Association between serum TSH concentration within the normal range and adiposity. *Eur J Endocrinol* 2011;165:11–5.
230. Andersen S, Pedersen KM, Bruun NH, Laurberg P. Narrow Individual Variations in Serum T4 and T3 in Normal Subjects: A Clue to the Understanding of Subclinical Thyroid Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(3):1068–72.
231. Boucai L, Surks MI. Reference limits of serum TSH and free T4 are significantly influenced by race and age in an urban outpatient medical practice. *Clin Endocrinol* 2009;70:788–93.
232. Estaquio C, Valeix P, Leenhardt L, Modigliani E, Boutron-Ruault MC. Serum thyrotropin and free thyroxine reference ranges as defined in a disease-free sample of French middle-aged adults. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(12):1497–505.
-

- 
233. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, et al. Serum TSH, T4, and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:489–99.
234. Fisher DA. Physiological variations in thyroid hormones: physiological and pathophysiological considerations. *Clin Chem* 1996;43(1):135-9.
235. Santini F, Marzullo P, Rotondi M, Ceccarini M, Pagano L et al. The crosstalk between thyroid gland and adipose tissue: signal integration in health and disease. *Eur J Endocrinol* 2014;171:R137–R152.
236. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1985;395:763–70.
237. Nilni EA. Regulation of the hypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) neuron by neuronal and peripheral inputs. *Front Endocrinol* 2010;31:134–156.
238. Mantzoros CS, Ozata M, Negrao AB, Suchard MA, Ziotopoulou M, Caglayan S, Elashoff RM, Coqswell RJ, Negro P, Liberty V, Wong ML, Veldhuis J, Ozdemir IC, Gold PW, Filer JS; Licinio J. Synchronicity of frequently sampled thyrotropin (TSH) and leptin concentrations in healthy adults and leptin-deficient subjects: evidence for possible partial TSH regulation by leptin in humans. *J Clin Endocr and Metab.* 2001;86:3284–91.
239. Chan JL, Heist K, DePaoli AM, Veldhuis JD, Mantzoros CS. 2003. The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *J Clin Invest* 2003;111:1409–21.
240. Rosenbaum M, Goldsmith R, Bloomfield D, Magnano A, Weimer L, Heysmield S, Gallagher D, Mayer L, Murphy E, Leibel RL. Low-dose leptin reverses skeletal muscle, autonomic, and neuroendocrine adaptations to maintenance of reduced weight. *J Clin Invest* 2005;115:3579–86.
241. Santini F, Galli G, Maffei M, Fierabracci P, Pelosini C, Marsili A, Giannetti M, Castagna MG, Molinaro E, Piaggi P, Pacini F, Elisei R, Vitti P, Pinchera A. Acute exogenous TSH administration stimulates leptin secretion in vivo. *Eur J Endocrinol* 2010;163(1):63–7.

242. Legradi G, Emerson CH, Ahima RS, Rand WM, Flier JS, Lechan RM. Arcuate nucleus ablation prevents fasting-induced suppression of pro-TRHmRNA in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 1998;68:89–97.
243. Kim MS, Small CJ, Stanley SA, Morgan DG, Seal LJ, Kong WM, Edvards CM, Abusnana S, Sunter D, ghatei MA, Bloom SR. The central melanocortin system affects the hypothalamo-pituitary thy-roid axis and may mediate the effect of leptin. *J Clin Invest* 2005;105:1005–11.
244. Korbonitz M. Leptin and the thyroid - the puzzle with missing pieces. *Clin Endocrinol* 1998;49;569–72.
245. Kok P, Roelfsema F, Langendonk JG, Frolich M, Burggraaf J, et al. High circulating thyrotropin levels in obese women are reduced after body weight loss induced by caloric restriction. *J Clin Endocr Metab* 2005;90:4659–63.
246. Moulin de Moraes CM, Mancini MC, de Melo ME, Figueiredo DA, Villares SM, Prevalence of subclinical hypothyroidism in a morbidly obese population and improvement after weight loss induced by Roux-en-Y gastric bypass. *Obes Surg* 2005;15:1287–91.
247. Biondi B. Thyroid and obesity: an intriguing relationship. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:3614–7.
248. Nyrmes A, Jorde R, Sundsfjord J. Serum TSH is positively associated with BMI. *Int J Obesity* 2006;30:100–105.
249. Žarković M, Ćirić J, Beleslin B, Topalov D, Trbojević B, Serbian thyroid study group. Further studies on delineating thyroid-stimulating hormone (TSH) reference range. *Horm Metab Res* 2011;43:970-6.
250. Dvorakova M, Hill M, Cerovska J, Pobisova Z, Bilek R et al. Relationship between pituitary–thyroid axis hormones and anthropometric parameters in Czech adult population. *Physiol Res* 2008; 57: (Suppl 1) S127–S134.
251. Ferre, P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors:relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes* 2004;53(Suppl 1): S43–S50.

## 9. PRILOZI

### 9.1. Prilog 1:

Razlike u serumskom nivou FT4, FT3 i TSH u ukrštenim kategorijama MEP/MEHP pozitivnih i MEP/MEHP negativnih ispitanika:

*Tabela 9.1. Deskriptivni statistički pokazatelji za grupe MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika*

	MEP.kat	N	AS	SD	Std. greška AS
NFT4	.00 negativni	137	-0.076133	1.0148773	0.0867068
	1.00 pozitivni	64	0.162385	0.9497533	0.1187192
NFT3	.00 negativni	137	-0.040282	1.0467518	0.0894300
	1.00 pozitivni	64	0.086298	0.8835333	0.1104417
NTSH	.00 negativni	137	-0.039065	0.9635179	0.0823189
	1.00 pozitivni	64	0.083709	1.0746549	0.1343319

*Tabela 9.2. T-test za nezavisne uzorke (za grupe MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika)*

		Levinov test homogenosti varijansi	
		F	p
NFT4	T test za homogene varijanse	0.153	0.696
	T test za nehomogene varijanse		
NFT3	T test za homogene varijanse	2.156	0.144
	T test za nehomogene varijanse		
NTSH	T test za homogene varijanse	1.087	0.298
	T test za nehomogene varijanse		

Tabela 9.3. T-test za nezavisne uzorke (za grupe MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika)

		Std. greška razlike	95% interval poverenja za razliku	
			Donja granica	Gornja granica
NFT4	T test za homogene varijanse	0.1506084	-0.5355108	0.0584757
	T test za nehomogene varijanse	0.1470113	-0.5293433	0.0523082
NFT3	T test za homogene varijanse	0.1511005	-0.4245439	0.1713834
	T test za nehomogene varijanse	0.1421094	-0.4074699	0.1543094
NTSH	T test za homogene varijanse	0.1514135	-0.4213552	0.1758066
	T test za nehomogene varijanse	0.1575482	-0.4349392	0.1893907

Tabela 9.4. Deskriptivni statistički pokazatelji za grupe MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika

	MEHP.kat	N	AS	SD	Std. greška AS
NFT4	.00 negativni	157	0.030374	0.9658209	0.0770809
	1.00 pozitivni	44	-0.109233	1.1122803	0.1676826
NFT3	.00 negativni	157	0.026075	1.0234662	0.0816815
	1.00 pozitivni	44	-0.092939	0.9021716	0.1360075
NTSH	.00 negativni	157	0.021086	1.0163975	0.0811174
	1.00 pozitivni	44	-0.075116	0.9424979	0.1420869

Tabela 9.5. T-test za nezavisne uzorke (za grupe MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika)

		Levinov test homogenosti varijansi	
		F	p
NFT4	T test za homogene varijanse	1.839	0.177
	T test za nehomogene varijanse		
NFT3	T test za homogene varijanse	1.615	0.205
	T test za nehomogene varijanse		
NTSH	T test za homogene varijanse	0.370	0.544
	T test za nehomogene varijanse		

Tabela 9.6. T-test za nezavisne uzorke (za grupe MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika)

		Std. greška razlike	95% interval poverenja za razliku	
			Donja granica	Gornja granica
NFT4	T test za homogene varijanse	0.1704560	-0.1965255	0.4757383
	T test za nehomogene varijanse	0.1845506	-0.2292666	0.5084794
NFT3	T test za homogene varijanse	0.1703226	-0.2168549	0.4548828
	T test za nehomogene varijanse	0.1586503	-0.1969085	0.4349364
NTSH	T test za homogene varijanse	0.1707296	-0.2404691	0.4328736
	T test za nehomogene varijanse	0.1636115	-0.2298415	0.4222460

**9.2. Prilog 2:**

Razlike u serumskom nivou FT4, FT3 i TSH u ukrštenim kategorijama gojaznih i normalno uhranjenih MEP/MEHP pozitivnih i MEP/MEHP negativnih ispitanika:

*Tabela 9.7. Deskriptivni statistički pokazatelji za grupe gojaznih i normalno uhranjenih MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika*

Uhranjenost	MEP.kat	Br.ispitanika (n)	AS	SD	Std. greška AS	
.00 normalno uhranjeni	NFT4	.00 negativni	79	-0.186342	0.9456000	0.1063883
		1.00 pozitivni	29	-0.263573	0.8403594	0.1560508
	NFT3	.00 negativni	79	0.063205	0.9941064	0.1118457
		1.00 pozitivni	29	0.266970	0.7618938	0.1414801
	NTSH	.00 negativni	79	-0.055298	1.0295114	0.1158291
		1.00 pozitivni	29	-0.036023	1.2931578	0.2401334
1.00 gojazni	NFT4	.00 negativni	58	0.073980	1.0927658	0.1434872
		1.00 pozitivni	35	0.515321	0.8982457	0.1518312
	NFT3	.00 negativni	58	-0.181239	1.1076449	0.1454409
		1.00 pozitivni	35	-0.063401	0.9578667	0.1619090
	NTSH	.00 negativni	58	-0.016956	0.8739605	0.1147566
		1.00 pozitivni	35	0.182915	0.8604758	0.1454470

Tabela 9.8. T-test za nezavisne uzorke (za grupe gojaznih i normalno uhranjenih MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika)

		Levinov test homogenosti varijansi		
		F	P	
.00 Normalno uhranjeni	NFT4	T-test za hom. var.	0.084	0.773
		T-test za nehom. var.		
	NFT3	T-test za hom. var.	2.789	0.098
		T-test za nehom. var.		
	NTSH	T-test za hom. var.	3.211	0.076
		T-test za nehom. var.		
1.00 Gojazni	NFT4	T-test za hom. var.	1.688	0.197
		T-test za nehom. var.		
	NFT3	T-test za hom. var.	0.656	0.420
		T-test za nehom. var.		
	NTSH	T-test za hom. var.	0.013	0.908
		T-test za nehom. var.		

Tabela 9.9. T-test za nezavisne uzorke (za grupe gojaznih i normalno uhranjenih MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika)

Uhranjenost		Razlika AS	Std. greška razlike	
.00 Normalno uhranjeni	NFT4	T-test za hom. var.	0.0772313	0.1995271
		T-test za nehom. var.	0.0772313	0.1888659
	NFT3	T-test za hom. var.	-0.2037645	0.2037384
		T-test za nehom. var.	-0.2037645	0.1803499
	NTSH	T-test za hom. var.	-0.0192744	0.2399787
		T-test za nehom. var.	-0.0192744	0.2666091
1.00 Gojazni	NFT4	T-test za hom. var.	-0.4413416	0.2192659
		T-test za nehom. var.	-0.4413416	0.2089050
	NFT3	T-test za hom. var.	-0.1178378	0.2256352
		T-test za nehom. var.	-0.1178378	0.2176410
	NTSH	T-test za hom. var.	-0.1998715	0.1859887
		T-test za nehom. var.	-0.1998715	0.1852671

Napomena: hom. var : homogene varijanse; nehom. var: nehomogene varijanse;



Tabela 9.10. T-test za nezavisne uzorke (za grupe gojaznih i normalno uhranjenih MEP pozitivnih i MEP negativnih ispitanika)

Uhranjenost		95% interval poverenja za razliku		
			Donja granica	Gornja granica
.00 Normalno uhranjeni	NFT4	T-test za hom. var.	-0.3183506	0.4728132
		T-test za nehom. var.	-0.3011495	0.4556121
	NFT3	T-test za hom. var.	-0.6076957	0.2001667
		T-test za nehom. var.	-0.5639648	0.1564358
	NTSH	T-test za hom. var.	-0.4950556	0.4565068
		T-test za nehom. var.	-0.5574150	0.5188662
1.00 Gojazni	NFT4	T-test za hom. var.	-0.8768865	-0.0057968
		T-test za nehom. var.	-0.8568775	-0.0258058
	NFT3	T-test za hom. var.	-0.5660345	0.3303589
		T-test za nehom. var.	-0.5509608	0.3152853
	NTSH	T-test za hom. var.	-0.5693152	0.1695723
		T-test za nehom. var.	-0.5691339	0.1693909

Tabela 9.11. Deskriptivni statistički pokazatelji (za grupe gojaznih i normalno uhranjenih MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika)

Uhranjenost		MEHP.kat	N	AS	SD	Std. greška AS
.00 Normalno uhranjeni	NFT4	.00 negativni	93	-0.130548	0.9115906	0.0945275
		1.00 pozitivni	15	-0.681578	0.8137643	0.2101130
	NFT3	.00 negativni	93	0.097638	0.9918965	0.1028549
		1.00 pozitivni	15	0.243668	0.4947673	0.1277484
	NTSH	.00 negativni	93	-0.042085	1.1177961	0.1159101
		1.00 pozitivni	15	-0.099952	1.0179980	0.2628460
1.00 Gojazni	NFT4	.00 negativni	64	0.264213	1.0012587	0.1251573
		1.00 pozitivni	29	0.186808	1.1413024	0.2119345
	NFT3	.00 negativni	64	-0.077915	1.0669940	0.1333743
		1.00 pozitivni	29	-0.267046	1.0175690	0.1889578
	NTSH	.00 negativni	64	0.112881	0.8479340	0.1059918
		1.00 pozitivni	29	-0.062270	0.9195201	0.1707506

Tabela 9.12. T-test za nezavisne uzorke (za grupe gojaznih i normalno uhranjenih MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika)

Uhranjenost		Levinov test homogenosti varijansi		
		F	p	
.00 Normalno uhranjeni	NFT4	T-test za hom. var.	0.181	0.671
		T-test za nehom. var.		
	NFT3	T-test za hom. var.	6.074	0.015
		T-test za nehom. var.		
	NTSH	T-test za hom. var.	0.071	0.790
		T-test za nehom. var.		
1.00 Gojazni	NFT4	T-test za hom. var.	0.255	0.615
		T-test za nehom. var.		
	NFT3	T-test za hom. var.	0.108	0.743
		T-test za nehom. var.		
	NTSH	T-test za hom. var.	0.036	0.850
		T-test za nehom. var.		

Tabela 9.13. T-test za nezavisne uzorke (za grupe gojaznih i normalno uhranjenih MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika)

		Razlika AS	Std. greška razlike	
.00 Normalno uhranjeni	NFT4	T-test za hom. var.	0.5510293	0.2502187
		T-test za nehom. var.	0.5510293	0.2303974
	NFT3	T-test za hom. var.	-0.1460302	0.2619401
		T-test za nehom. var.	-0.1460302	0.1640084
	NTSH	T-test za hom. var.	0.0578673	0.3074956
		T-test za nehom. var.	0.0578673	0.2872684
1.00 Gojazni	NFT4	T-test za hom. var.	0.0774056	0.2342224
		T-test za nehom. var.	0.0774056	0.2461313
	NFT3	T-test za hom. var.	0.1891312	0.2354952
		T-test za nehom. var.	0.1891312	0.2312872
	NTSH	T-test za hom. var.	0.1751514	0.1948790
		T-test za nehom. var.	0.1751514	0.2009727

Tabela 9.14. T-test za nezavisne uzorke (za grupe gojaznih i normalno uhranjenih MEHP pozitivnih i MEHP negativnih ispitanika)

		95% CI za razliku		
		Donja granica	Gornja granica	
.00 Normalno uhranjeni	NFT4	T-test za hom.var.	0.0549464	1.0471123
		T-test za nehom. var.	0.0706055	1.0314532
	NFT3	T-test za hom.var.	-0.6653520	0.3732916
		T-test za nehom. var.	-0.4787362	0.1866758
	NTSH	T-test za hom.var.	-0.5517726	0.6675072
		T-test za nehom. var.	-0.5416348	0.6573693
1.00 Gojazni	NFT4	T-test za hom.var.	-0.3878484	0.5426595
		T-test za nehom. var.	-0.4173890	0.5722002
	NFT3	T-test za hom.var.	-0.2786512	0.6569136
		T-test za nehom. var.	-0.2740834	0.6523457
	NTSH	T-test za hom.var.	-0.2119518	0.5622546
		T-test za nehom. var.	-0.2284331	0.5787358

**9.3. Prilog 3:**

Deskriptivni pokazatelji za odnos serumskog nivoa leptina kod MEP pozitivnih i MEP negativnih gojaznih ispitanika:

Tabela 9.15. Deskriptivni pokazatelji

	MEP. kat	N	AS	SD	Std. greška AS
Normal.skor leptina po Rankit formuli	negativni	58	-0.025510	1.0097012	0.1325803
	pozitivni	35	0.042283	0.9928228	0.1678177

Tabela 9.16. Levinov test homogenosti varijansi

		Levinov test homogenosti varijansi	
		F	p
Normal.skore leptin po Rankit formuli	T test za hom. var.	0.014	0.904
	T test za nehom. var.		

Hom.var.: homogene varijanse; nehom.var: nehomogene varijanse; grupišuća varijabla: MEP

Tabela 9.17. T test za nezavisne uzorke (deskriptivni pokazatelji)

		Razlika AS	Std.greška razlike
Normal.skore leptina po Rankit formuli	T test za hom. var.	-0.0677934	0.2147730
	T test za nehom. var	-0.0677934	0.2138698

Hom.var.: homogene varijanse; nehom.var: nehomogene varijanse; grupišuća varijabla: MEP

Tabela 9.18. T-test za nezavisne uzorke (deskriptivni pokazatelji)

		95% CI za razliku	
		Minimum	Maksimum
Normal skore	T test za hom.var.	-0.4944136	0.3588269
leptinapoRankit formuli	T test za nehom.var.	-0.4940574	0.3584707

Hom.var.: homogene varijanse; nehom.var.: nehomogene varijanse; grupišuća varijabla: MEP

**9.4. Prilog 4.**

Deskriptivni pokazatelji za odnos serumskog nivoa leptina kod MEHP pozitivnih i MEHP negativnih gojaznih ispitanika:

*Tabela 9.19. Deskriptivna statistika za grupe MEHP pozitivnih i negativnih*

	MEHP.kat	N	AS	SD	Std. greška AS
Normal skor leptina po Rankit formuli	00 negativni	64	-0.073094	0.9590221	0.1198778
	1.00 pozitivni	29	0.161323	1.0804444	0.2006335

*Tabela 9.20. T-test za nezavisne uzorke (Levinov test homogenosti varijansi)*

		Levinov test homogenosti varijansi	
		F	p
Normal skore leptina po Rankit formuli	T test za hom. varijanse	0.469	0.495
	T test za nehom. varijanse		

*Tabela 9.21. T-test za nezavisne uzorke (deskriptivni pokazatelji)*

		Razlika AS	Std. greška razlike
Normal.Skor leptinapo Rankit formuli	T test za homogene varijanse	-0.2344166	0.2233904
	T test za nehomogene varijanse	-0.2344166	0.2337188

Tabela 9.22. T-test za nezavisne uzorke (deskriptivni pokazatelji)

---

		95% interval poverenja za razliku	
		Donja granica	Gornja granica
Normal skor leptinapo Rankit formuli	T test za homogene varijanse	-0.6781543	0.2093210
	T test za nehomogene varijanse	-0.7041416	0.2353084

---