

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Zoran M. Gluvić

**KONCENTRACIJA NITRITA U KRVI KOD  
OBOLELIH OD HIPOTIREOZE KAO  
PARAMETAR ZA UVOĐENJE  
SUPSTITUCIONE TERAPIJE**

Doktorska disertacija

Beograd, 2015.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Zoran M. Gluvić

**THE NITRITE CONCENTRATION IN THE  
BLOOD IN PATIENTS WITH  
HYPOTHYROIDISM AS A PARAMETER FOR  
THE INTRODUCTION OF SUBSTITUTION  
THERAPY**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2015.

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ

МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ

Зоран М. Глувић

**Концентрација нитрита у крви код оболелих од  
хипотиреозе као параметар за увођење  
супституционе терапије**

Докторска дисертација

Београд, 2015.

**MENTOR:**

**Prof. dr Miloš Žarković**, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

**KOMENTOR:**

**Prof. dr Biljana Putniković-Tošić**, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu

**Komisija za pregled, ocenu i odbranu doktorske disertacije** kandidata mr sci. med. Zorana Gluvića, izabrana je u sastavu:

1. **Prof. dr Jasmina Ćirić**, vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
2. **Prof. dr Aleksandar N. Nešković**, redovni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
3. **Prof. dr Mirjana Šumarac-Dumanović**, vanredni profesor Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu
4. **Prof. dr Božo Trbojević**, redovni profesor Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, u penziji
5. **Prim. dr sci. med. Zorica Rašić-Milutinović**, naučni savetnik, u penziji

na redovnoj sednici Naučnog veća Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, održanoj 23/10/2015.

DATUM ODBRANE: \_\_\_\_\_

## Zahvalnica

*Zahvaljujem se kolektivu Klinike za internu medicinu, posebno Službi za endokrinologiju i dijabetes, Odeljenju intenzivne nege, Službi laboratorijske dijagnostike i Službi transfuzije za svesrdnu pomoć u realizaciji teze.*

*Zahvaljujem se Laboratoriji za molekularnu genetiku i radiobiologiju Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, posebno Dr Esmi Isenović, Dr Milanu Obradoviću i Dr Emini Sudar, bez čije pomoći ništa od ovog rada ne bi ugledalo svetlost dana.*

*Zahvaljujem se mentoru, Prof. dr Milošu Žarkoviću, kao i komentorki, Prof. dr Biljani Putniković-Tošić, na korisnim sugestijama tokom izrade teze.*

*Zahvaljujem se članovima Komisije, na korisnim savetima i korekcijama.*

*Zahvaljujem se Doc. dr Nataši Milić na idejama i pomoći u obradi podataka.*

*Ipak, najveću zahvalnost dugujem porodici, jer sa njima nešto uvek ima smisla.*

*Stani, Marku i Mirosi,*

*posvećujem ovaj rad sa zahvalnošću i ljubavlju.*

# KONCENTRACIJA NITRITA U KRVI KOD OBOLELIH OD HIPOTIREOZE KAO PARAMETAR ZA UVOĐENJE SUPSTITUCIONE TERAPIJE

Zoran Gluvić

## REZIME

**Uvod:** Primarni hipotireoidizam je klinički sindrom uzrokovan nedostatkom ili neadekvatnim efektima tireoidnih hormona. Povećan rizik od nastanka ubrzane ateroskleroze kao i njene ispoljenosti kod obolelih od primarnog hipotireoidizma može se objasniti prisustvom dislipidemije, dijastolne hipertenzije, povećane arterijske krutosti, endotelne disfunkcije, kao i stanjem hiperkoagulabilnosti i inflamacije niskog stepena. Kardiovaskularno ispoljavanje ubrzane ateroskleroze kod obolelih od primarne hipotireoze se ogleda kroz povećan rizik od koronarne bolesti i srčane insuficijencije, koje su opisane kod različitog stepena ispoljenosti hipotireoidizma i starosne dobi, prevashodno kada je nivo TSH >10mIU/ml. Smanjena produkcija azot oksida (NO) se smatra potencijalno reverzibilnim uzrokom endotelne disfunkcije u supkliničkom i kliničkom hipotireoidizmu. Sve promene u kardiovaskularnom sistemu u stanjima hipotireoidizma se registruju u nelečenom primarnom hipotireoidizmu, a vraćaju se delimično ili potpuno na prethodno stanje nakon adekvatne supstitucije levotiroksinom. Nakon dijagnostikovanja kliničkog primarnog hipotireoidizma, odmah se pristupa tretmanu levotiroksinom, dok je u slučajevima supkliničkog hipotireoidizma tretman nedvosmislen kod onih kod kojih se očekuje korist (mlade osobe, planiranje trudnoće, trudnoća), kao i kod onih sa nivoom TSH >10mIU/ml. Kod obolelih sa nivoom TSH između 4 i 10mIU/ml, individualnim pristupom se određuje da li osobu treba tretirati ili ne, privremeno ili trajno. Prisustvo dislipidemije može biti jedan od razloga za uvođenje terapije levotiroksinom.

**Cilj** ove doktorske disertacije je bio da se ispita da li koncentracija nitrata (NO<sub>2</sub>), stabilnog i jednostavno merljivog metabolita NO, može biti potencijalni dodatni parametar za uvođenje terapije levotiroksinom kod hipotireoidnih, prevashodno supkliničkih ispitanika. Radna hipoteza ove doktorske disertacije je bila: da li promena u koncentraciji NO<sub>2</sub>, kao pokazatelja ateroskleroze, može biti pouzdan dodatni kriterijum za uvođenje supstitucione terapije levotiroksinom kod hipotireoidnih ispitanika. Stoga je u okviru ove doktorske disertacije merena koncentracija NO<sub>2</sub> u krvi obolelih od supkliničke i kliničke hipotireoze, kao i kod eutireoidnih

kontrola, a takođe je analizirano da li postoji korelacija između koncentracija NO<sub>2</sub> i nivoa TSH i fT<sub>4</sub>, nakon čega je određivan i uticaj supstitucione terapije kod tretiranih ispitanika sa primarnom hipotireozom na koncentraciju NO<sub>2</sub> u krvi.

**Materijal i metode:** Studija preseka je sprovedena u KBC Zemun, Klinici za endokrinologiju, dijabetes i poremećaje metabolizma, kao i na Institutu za nuklearne nauke „Vinča” tokom 2013.-2014. godine. Poštujući inkluzione i ekskluzione kriterijume, u studiju su uključene 82 ispitanice, podeljene u dve grupe: hipotireoidna (44 ispitanice) i eutireodna (38 ispitanica). Grupa hipotireoidnih ispitanica je podeljena na supkliničku i kliničku hipotireoidnu grupu, u svakoj grupi su uključene 22 ispitanice. Rekrutovane ispitanice su podvrgnute antropometrijskim (telesna težina, telesna visina, indeks telesne mase), kliničkim (sistolna i dijastolna arterijska tenzija), a nakon jednodnevne pripreme, i laboratorijskim (TSH, fT<sub>4</sub>, lipidogram, glikemija, HbA<sub>1c</sub>, C-reaktivni protein, NO<sub>2</sub>) merenjima. U grupi hipotireoidnih koje su podvrgnute tretmanu levotiroksinom, po uspostavljanju laboratorijski eutireoidnog ranga TSH, ponovo je određivana koncentracija NO<sub>2</sub> u krvi. Za potrebe procene kardiometaboličkog rizika i korelacije sa koncentracijama NO<sub>2</sub>, definisan je indeks metaboličkog opterećenja (IMO), predstavljen sledećim varijablama: BMI >25kg/m<sup>2</sup>, sistolni krvni pritisak ≥130mmHg ili dijastolni krvni pritisak ≥90mmHg, HbA<sub>1c</sub> ≥5,7% i trigliceridi ≥1,7mmol/L. Prisustvo makar dve od ukupno četiri moguće varijable, smatrano je postojanjem povećanog kardiometaboličkog rizika u ispitivanoj populaciji.

U obradi podataka korišćene su adekvatne metode deskriptivne i analitičke statistike (za procenu značajnosti razlike i povezanosti). Ispitivanje prediktivnosti antropometrijskih, biohemijskih i hormonskih varijabli za koncentraciju NO<sub>2</sub> određivano je multivarijantnom linearnom regresionom analizom. Nivo statističke značajnosti je p<0,05.

**Rezultati:** U analizi praćenih antropometrijskih i kliničkih parametara u ispitivanoj populaciji, uočena je statistički značajna razlika u prosečnim godinama života među ispitivanim grupama (p=0,007), kao i indeksu telesne mase (p=0,006), dok statistička značajnost nije detektovana u vrednostima za sistolni/dijastolni krvni pritisak. Među praćenim biohemijskim parametrima, statistička značajnost je uočena za nivoe glikemije (p<0,001), ukupnog holesterola (p=0,005), HDL- holesterola (p<0,001) i LDL-holesterola (p<0,001), dok se nivoi HbA<sub>1c</sub> i triglicerida nisu razlikovali između ispitivanih grupa. Nivoi glikemije, HDL- i LDL-holesterola su statistički



značajno viši u grupama supkliničke i kliničke hipotireoze u odnosu na kontrole. Nivoi TSH i fT4 se očekivano razlikuju između ispitivanih grupa ( $p < 0,001$ ), pri čemu su nivoi TSH statistički značajno viši, a nivoi fT4 značajno niži kod ispitanica sa supkliničkom i kliničkom hipotireozom u poređenju sa ispitanicima kontrolne grupe. Takođe, nivo TSH je statistički značajno viši, a nivo fT4 značajno niži kod ispitanica u grupi sa kliničkom hipotireozom u poređenju sa supkliničkom hipotireoidnom grupom. Nije detektovana statistički značajna razlika u koncentracijama NO<sub>2</sub> i CRP između ispitivanih grupa. Regstruje se statistički značajna korelacija koncentracija NO<sub>2</sub> sa indeksom telesne mase ( $p = 0,011$ ), nivoom HbA1c ( $p = 0,036$ ), kao i nivoom triglicerida ( $p < 0,001$ ). Multivarijantnom linearnom regresionom analizom antropometrijskih, biohemijskih i hormonskih prediktora koncentracije NO<sub>2</sub> u ispitivanoj populaciji, nivo triglicerida je izdvojen kao jedini nezavisni prediktor ( $p < 0,001$ ).

Povećan kardiometabolički rizik u ispitivanoj populaciji, definisan kao IMO, je prisutan kod 21 ispitanice (20%), i to kod 9, 8 i 4 ispitanice u klinički hipotireoidnoj, supklinički hipotireoidnoj i kontrolnoj grupi i statistički se razlikovao među grupama ( $p < 0,001$ ). Kod ispitanica sa povećanim metaboličkim rizikom koncentracije NO<sub>2</sub> su značajno više nego kod onih bez naglašenog metaboličkog rizika ( $p = 0,01$ ). Prilagođavanjem koncentracije NO<sub>2</sub> za IMO i godine života, pokazana je statistički značajna razlika u koncentracijama NO<sub>2</sub> između populacije obolelih od hipotireoze (supklinička i klinička hipotireoidna grupa) i populacije zdravih (kontrolna grupa) ( $p = 0,021$ ).

Prosečna dužina vremena primene levotiroksina do uspostavljanja laboratorijskog eutireoidizma je bila 3 meseca u obe grupe i nije se statistički značajno razlikovala. Prosečna nedeljna doza levotiroksina se razlikuje među grupama tretiranih ( $p < 0,001$ ) i iznosila je 175 $\mu$ g u grupi supkliničke hipotireoze, odnosno 525 $\mu$ g u kliničkoj hipotireoidnoj grupi. Prosečne koncentracije NO<sub>2</sub> po uspostavljanju eutireoidnog nivoa TSH primenom levotiroksina se nisu statistički razlikovale u supkliničkoj i kliničkoj hipotireoidnoj grupi u odnosu na inicijalne preterapijske vrednosti.

**Zaključak:** Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju na uticaj hipotireoidnih stanja na biohemijske i inflamatorne aterosklerotske markere, kao i rane efekte supstitucije levotiroksinom na koncentracije NO<sub>2</sub>, kao parametra endotelne funkcije u hipotireoidnim stanjima.

**KLJUČNE REČI:**

hipotireoidizam, levotiroksin, azot oksid, trigliceridi

# THE NITRITE CONCENTRATION IN THE BLOOD IN PATIENTS WITH HYPOTHYROIDISM AS A PARAMETER FOR THE INTRODUCTION OF SUBSTITUTION THERAPY

Zoran Gluvić

## SUMMARY

**Introduction:** Primary hypothyroidism is a clinical syndrome caused by insufficiency or inefficacy of thyroid hormones. Higher risk of atherosclerosis acceleration and extension could be explained through the presence of dyslipidemia, diastolic hypertension, increased arterial stiffness, endothelial dysfunction, as well with procoagulant and low-grade inflammation state. Cardiovascular presentation of accelerated atherosclerosis in patients suffered of primary hypothyroidism is coronary artery disease and heart failure independently of thyroid disease severity and patients age, described especially in those with level of TSH >10mIU/ml. Decreased nitric oxide (NO) production could be potentially reversible cause of endothelial dysfunction in subclinical and clinical hypothyroidism.

Cardiovascular changes in treatment-naïve hypothyroid patients are partially or completely restored to previous condition after achievement of thyroxin-induced euthyroid TSH level. When the overt hypothyroidism is diagnosed, thyroxin replacement therapy is immediately started. In the cases of latent hypothyroidism, there is no doubt regarding the treatment of ones with expected benefit (youngsters, pregnancy) and with levels of TSH >10mIU/ml. When the TSH is 4-10mIU/ml, individual patient approach is advised whether to treat or not, either temporary or permanent. Co-existence of dyslipidemia can alleviate initiation of thyroxin treatment decision.

**The aim** of this doctoral dissertation is to examine reliability of blood nitrite (NO<sub>2</sub>) concentration, a stable and simply measurable of NO metabolite and marker of atherosclerosis, as an additional parameter for thyroxin substitution initiation in hypothyroid patients, especially latent ones. Thus, it is necessary to determine whether blood NO<sub>2</sub> concentrations change can be reliable additional parameter for thyroxin replacement initiation in hypothyroid patients. Hence, blood NO<sub>2</sub> concentration is measured in patients suffered from latent and overt hypothyroidism, and euthyroid controls, then correlation between NO<sub>2</sub> concentration and TSH and fT<sub>4</sub> levels is evaluated. Furthermore, an influence of thyroxin replacement on blood NO<sub>2</sub> concentration in primary hypothyroid patients is determined, too.

**Material and methods:** Cross-sectional study was performed in Clinical Hospital Centre Zemun, Clinic of endocrinology, diabetes and metabolism disorders, and Institute “Vinca” during 2013.-2014. According to inclusion and exclusion criteria, 82 female participants were recruited and divided into two groups: hypothyroid, and euthyroid, consisted of 44, and 38 participants, respectively. Furthermore, hypothyroid group is subdivided into two subgroups- latent (TSH 4-10mIU/ml, fT4 in reference range) and overt (TSH >10mIU/ml, fT4 <7,8pmol/L), with 22 participants in both subgroups. Recruited participants were then undergone to some anthropometric (body height, body weight, body mass index-BMI), clinical (systolic and diastolic blood pressure) and laboratory measurements (blood TSH, fT4, lipids, glycaemia, HbA1c, CRP, NO<sub>2</sub>). After thyroxin-induced euthyroid TSH level, blood NO<sub>2</sub> levels were repeatedly measured. For the cardiometabolic risk assessment and correlations with blood NO<sub>2</sub> levels, index of metabolic burden (IMB) is defined. The IMB is consisted of: BMI >25kg/m<sup>2</sup>, systolic blood pressure ≥130mmHg or diastolic blood pressure ≥90mmHg, HbA1c ≥5,7% and triglyceride level ≥1,7mmol/L, where the presence of >2 indicated increased cardiometabolic risk in observed population.

Obtained data were analyzed with appropriate methods of descriptive and analytical statistics. The prediction value of anthropometric, biochemical and hormonal variables for blood NO<sub>2</sub> concentrations was determined by using multivariate linear regression analysis model. Level of statistical significance was set at  $p < 0,05$ .

**Results:** The analyses of anthropometric and clinical parameters, show a statistically significant difference in the mean age ( $p=0,007$ ) as well as in BMI ( $p=0,006$ ), but not in the values for systolic and diastolic blood pressure between observed groups. Regarding to biochemical parameters, statistically significant difference between groups was observed for glycaemia ( $p < 0,001$ ), total cholesterol ( $p=0,005$ ), HDL-cholesterol ( $p < 0,001$ ) and LDL-cholesterol levels ( $p < 0,001$ ), but not in the cases of HbA1c and triglyceride levels.

The levels of glycaemia, HDL- and LDL-cholesterol were significantly higher in the hypothyroid groups compared with controls. TSH and fT4 levels differed between groups ( $p < 0,001$ ), with higher TSH and lower fT4 levels in hypothyroid groups compared with controls. Also, TSH levels were significantly higher and fT4 levels significantly lower in overt hypothyroid group in the comparison with latent hypothyroid group. There were no significant differences in the NO<sub>2</sub> concentrations and CRP levels between groups. Statistically significant correlations were

detected between NO<sub>2</sub> concentrations and BMI ( $p=0,011$ ), HbA1c ( $p=0,036$ ), and triglycerides ( $p<0,001$ ). The levels of triglycerides were designated as an independent predictor for NO<sub>2</sub> concentrations by multivariate regression analysis model ( $p<0,001$ ).

Increased metabolic risk, expressed through IMB, was registered in 21 (20%) participant: 9, 8 and 4 in overt hypothyroid, latent hypothyroid and control group respectively, and differed between groups ( $p<0,001$ ). NO<sub>2</sub> concentrations were higher in the population with increased cardiometabolic risk than in ones with no metabolic risk ( $p=0,01$ ). After adjustment of NO<sub>2</sub> concentrations for IMB and age, significant difference in NO<sub>2</sub> concentrations between hypothyroid patients and euthyroid controls was shown ( $p=0,021$ ).

An average length of time for achievement of thyroxin induced euthyroid TSH range was 3 months, with no difference between treated groups. An average weekly dose of thyroxin was 175 $\mu$ g in latent hypothyroid and 525 $\mu$ g in overt hypothyroid group and differed between groups ( $p<0,001$ ). Mean NO<sub>2</sub> concentrations measured after thyroxin induced achievement of euthyroid TSH levels did not differ from initial, treatment-naïve NO<sub>2</sub> concentrations in latent and overt hypothyroid group.

**Conclusion:** Results from this doctoral dissertation point out to the influence of hypothyroid conditions on biochemical and inflammatory atherosclerotic parameters, and also determine early effects of thyroxin replacement on NO<sub>2</sub> concentration, as an endothelial function parameter in hypothyroid conditions.

**KEY WORDS:** hypothyroidism, thyroxin, nitric oxide, triglyceride

# Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1.1. Definicija, podela i epidemiologija hipotireoze.....	1
1.1.2. Etiologija i dijagnostika supkliničke i kliničke hipotireoze.....	2
1.1.3. Fiziološki efekti tireoidnih hormona na kardiovaskularni sistem.....	3
1.1.4. Kliničko ispoljavanje ateroskleroze u supkliničkoj i kliničkoj hipotireozi (dislipidemija, cerebro/kardiovaskularna bolest).....	4
1.1.4.1. Supklinička hipotireoza i kardiovaskularne bolesti.....	5
1.1.4.2. Klinička hipotireoza i kardiovaskularne bolesti.....	9
1.2.1. Sintetaze NO.....	11
1.2.1.2. Produkcija i mehanizam delovanja NO.....	12
1.2.1.3. Fiziološke uloge NO.....	15
1.2.1.4. Hipotireoidizam i NO.....	17
1.2.2. NO <sub>3</sub> i NO <sub>2</sub> /NO.....	18
1.2.3. Endotelna disfunkcija, ateroskleroza i hipotireoza.....	20
1.3.1. Farmakologija levotiroksina.....	22
1.3.2. Supklinička hipotireoza i stavovi o započinjanju supstitucije levotiroksinom.....	24
1.3.3. Uspostavljanje eutireoidnog stanja levotiroksinom i uticaj na aterosklerozu .....	25
2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....	28

3. MATERIJAL I METODE.....	29
3.1. Protokol.....	29
3.2. Određivanje biohemijskih parametara.....	29
3.3. Određivanje antropometrijskih parametara.....	30
3.4. Izračunavanje indeksa metaboličkog opterećenja.....	30
3.5. Određivanje koncentracije NO <sub>2</sub> .....	30
3.6. Statistika.....	31
4. REZULTATI.....	33
4.1. Antropometrijski i klinički parametri u ispitivanoj populaciji.....	33
4.2. Biohemijski parametri u ispitivanoj populaciji.....	35
4.2.1. Parametri glukoze i lipidne homeostaze u ispitivanoj populaciji.....	35
4.2.2. Hormonski parametri u ispitivanoj populaciji.....	38
4.2.3. Markeri inflamacije, NO <sub>2</sub> i CRP, u ispitivanoj populaciji.....	39
4.3. Korelacije koncentracije NO <sub>2</sub> sa antropometrijskim, hormonskim i lipidnim parametrima u ispitivanoj populaciji. ....	41
4.4. Indeks metaboličkog opterećenja kod supkliničke i kliničke hipotireoidne grupe i kontrolnih ispitanica.....	43
4.5. Dužina primene i nedeljna doza LT <sub>4</sub> kojom je uspostavljen laboratorijski eutireoidizam.....	44
4.6. Efekat levotiroksina na nivo TSH i NO <sub>2</sub> u populaciji tretiranih.....	45
4.6.1. Efekat levotiroksina na nivo TSH i NO <sub>2</sub> u populaciji supkliničke hipotireoze.....	45

4.6.2. Efekat levotiroksina na nivo TSH i NO <sub>2</sub> u populaciji kliničke hipotireoze.....	46
5. DISKUSIJA.....	47
6. ZAKLJUČCI.....	59
7. LITERATURA.....	61
8. SPISAK KORIŠĆENIH SKRAĆENICA .....	100



# 1. UVOD

## 1.1.1. Definicija, podela i epidemiologija hipotireoze

Hipotireoidizam je klinički sindrom uzrokovan nedostatkom ili neadekvatnim dejstvom tireoidnih hormona. Osnovna patofiziološka karakteristika je usporavanje prevashodno oksidativnih metaboličkih procesa. Hipotireoidizam se može klasifikovati na osnovu *vremena nastanka* (urođen i stečen), *nivoa lezije* (primarni, sekundarni, tercijarni i rezistencija na dejstvo tireoidnih hormona), kao i *kliničkog ispoljavanja* (supklinička i klinička). Takođe, hipotireoidizam može biti reverzibilan i permanentan, što je od značaja sa aspekta lečenja, jer samo permanentni podleže supstituciji (1-5).

Supklinički hipotireoidizam (skH) se definiše kao prisustvo povišenog nivoa tireostimulišućeg hormona (TSH) sa normalnim nivoom perifernih tireoidnih hormona (6, 7). Prevalencija skH u opštoj populaciji je od 1 do 20% prema različitim studijama (8-11). On je prevashodno bolest žena, a u odnosu na godine života, bolest sredovećnijih i starijih žena. U Vikamskoj studiji prevalencija skH je bila 10% u grupi žena starosti od 55 do 64 godine uz nivo TSH >6mIU/ml (12), u Framingamskoj studiji 13,6% kod žena preko 60 godina života uz TSH >5mIU/ml (8), dok je u Kolorado studiji prevalencija iznosila oko 9% (9). Prevalencija skH u reproduktivnom dobu je 0,5-5% (13). Uopšteno uzevši, kod žena starosti >60 godina prevalencija iznosi oko 15% (14). U odnosu na godine života, prevalencija skH je oko 4% u populaciji dvadesetogodišnjakinja, odnosno oko 17% kod žena u 65. godini života. Kod muškaraca u istim starosnim grupama, prevalencija je značajno niža i iznosi 2%, odnosno 7%

(12, 15). Prevalencija skH u SAD je 4,3% prema NHANES III studiji (10), veća je kod crnaca nego kod belaca, što ukazuje na ulogu nasleđa i rase u pogledu sekrecije TSH. Razlog za ovako širok raspon prevalencija treba tražiti u razlikama u godinama života, polu, indeksu telesne mase, rasi, unosu joda hranom, ali takođe i u različitim graničnim vrednostima nivoa TSH (10).

Klinički hipotireoidizam (kH) se karakteriše povišenim nivoom TSH i sniženim nivoima perifernih tireoidnih hormona. Prevalencija kH u neendemskim područjima je <1%, dok je u endemskim >5% u odnosu na ukupan broj stanovnika. Zastupljenost kH u adultnoj populaciji iznosi oko 2% kod žena, odnosno 0,1-0,2% kod muškaraca (9, 16).

### **1.1.2. Etiologija i dijagnostika skH i kH**

Uzroci nastanka skH i kH su identični. Oko 60-80% obolelih kako od skH, tako i kH, ima pozitivna antitireoidna antitela, koja predstavljaju marker Hashimoto tireoiditisa. Relativno čest uzrok perzistentnog skH/kH je nedovoljno supstituisan kH, bilo zbog neadekvatne doze levotiroksina (LT4), slabe komplijanse, interakcije sa lekovima ili usled neadekvatnog praćenja lečenih (10). Ostali češći uzroci primarnog skH/kH su: radioablativna terapija autoimune difuzne strume, subtotalna tireoidektomija u lečenju difuzne ili nodozne strume, prekomerno unošenje jodida, perzistentno povišen nivo TSH nakon subakutnog/bezbolnog/postpartalnog tireoiditisa, stanja po zračenju vrata (malignomi ORL regije i hematološke bolesti). Ređi uzroci su: nedostatak jodida, genski poremećaji sinteze tireoidnih hormona, kao i infiltrativne bolesti štitaste žlezde (14).

SkH se mora razlikovati od ostalih uzroka povišenog TSH: fizioloških, tranzitornih, ali i laboratorijskih (greška u merenju). Upravo zbog toga se savetuje ponovno određivanje nivoa TSH u krvi 3-6 meseci nakon inicijalnog merenja (14, 17, 18). Termin supklinički označava prisustvo bolesti bez kliničkih simptoma, što bi moglo odgovarati inicijalnoj fazi bolesti (14). U takvim slučajevima, dijagnoza je prevashodno biohemijska i bazira se na izuzetnoj osetljivosti hipotalamo-hipofizno-tireoidne osovine. Promene serumskog TSH su logaritamske, dok su promene slobodnog tiroksina (fT4 od engl. free thyroxine) semiaritmetičke. Svaka individua ima specifičan "setpoint" za hipotalamo-hipofizno-tireoidnu osovinu, koji je najvećim delom genetski predodređen (19). U odnosu na nivo TSH, formirane su dve podgrupe u okviru skH: skH sa blago povišenim TSH (TSH <10mIU/ml, tj. 4,1-9,9mIU/ml), kao i skH sa značajno

povišenim TSH (TSH  $\geq 10$  mIU/ml), pri čemu 75% obolelih od skH pripada podgrupi sa blago povišenim TSH (20).

Po svom toku skH može biti progresivan i reverzibilan. Oboleli od ne-autoimunskog tireoiditisa mogu ponekad imati povišen TSH, pri čemu se normalizacija njegovog nivoa, ukoliko se desi, najčešća javlja kod obolelih sa nivoom TSH od 4 do 8 mIU/ml (21). Godišnja stopa progresije u kH je oko 4%, prevashodno kod osoba ženskog pola koje imaju pozitivna antitireoidna antitela (22). Kod obolelih kod kojih je povišen samo nivo TSH, ona iznosi 2 do 4%, odnosno 1 do 3% kod obolelih kod kojih je povišen samo nivo antitireoidnih antitela (23). Slična stopa progresije skH u kH, od 3 do 6% godišnje se registruje kod obolelih od skH uzrokovanog hirurškom ili radioablacijom štitaste žlezde (22), dok je najveći rizik od progresije prisutan kod trudnica sa autoimunskim hroničnim tireoiditisom (13).

Dijagnoza hipotireoidizma se postavlja laboratorijski, određivanjem nivoa TSH i perifernih tireoidnih hormona, a nakon toga se detektuje njegova etiologija. Inicijalni dijagnostički test za detekciju tireoidne disfunkcije je određivanje nivoa TSH. Ukoliko je nivo TSH povišen, pristupa se određivanju nivoa perifernih tireoidnih hormona (najčešće fT4), koji može biti niskog, normalnog ili povišenog nivoa. Ukoliko je nivo fT4 nizak, onda govorimo u primarnom kH, dok ukoliko je nivo fT4 u referentnom opsegu, onda se govori o primarnom skH. Povišen nivo fT4 ide u prilog sekundarnom/tercijernom hipotireoidizmu ili rezistenciji prema tireoidnim hormonima. Nakon što je definisan nivo lezije, sprovode se dodatne metode u cilju utvrđivanja uzroka nastanka hipotireoidizma (24, 25).

### **1.1.3. Fiziološki efekti tireoidnih hormona na kardiovaskularni sistem (KVS)**

Jedna od glavnih „meta“ aktivnosti tireoidnih hormona je KVS (26). Tireoidni hormoni ostvaruju efekte na srce i krvne sudove klasičnim (genomskim) i negenomskim mehanizmima. Nakon vezivanja trijodtironina (T3) za tireoidni nukleusni receptor indukuje se transkripcija gena, koji enkodiraju strukturne i regulatorne proteine u brojnim ćelijama, uključujući kardiomiocite i glatke mišićne ćelije krvnih sudova (27). Tabelom 1 prikazani su genomski efekti tireoidnih hormona (28, 29).

Tireoidni hormoni direktno utiču na kontraktilnost miokarda preko transporta jona kalcijuma ( $\text{Ca}^{2+}$ ) kroz  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aza sarkoplazmatski retikulum/fosfolamban sistem. T3

stimuliše produkciju  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aze sarkoplazmatskog retikuluma, dok istovremeno inhibira ekspresiju fosfolambana. Sistolna kontraktilnost i dijastolna relaksacija zavise od količine oslobođenog  $\text{Ca}^{2+}$  i njegovog preuzimanja u sarkoplazmatskom retikulumu (28, 30).

**Tabela 1.** Genomski efekti tireoidnih hormona

POZITIVNA REGULACIJA	NEGATIVNA REGULACIJA
Laki lanac $\alpha$ miozina	Težak lanac $\beta$ miozina
$\text{Ca}^{2+}$ -ATP-aza sarkoplazmatskog retikuluma	Fosfolamban
$\beta 1$ adrenergički receptor	Adenilil-ciklaza V i VI
Guanin-nukleotid-regulatorni proteini	$\alpha 1$ T3 receptor
$\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATP-aza	$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ izmenjivač
Voltažno-zavisni $\text{K}^+$ kanali	

Negenomski efekti tireoidnih hormona ne zahtevaju vezivanje T3 za nukleusne receptore, a obuhvataju transport jona ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), aminokiselina i glukoze preko ćelijske membrane, kao i uticaj na funkciju mitohondrija i različite signalne puteve u ćeliji (26, 29, 31). Ovi negenomski efekti su odgovorni za akutnu promenu kardiovaskularnih (KV) parametara (27, 32). Takođe, T3 direktno deluje na glatke mišićne ćelije krvnih sudova u cilju promocije relaksacije (33).

Rezultanta genomskih i negenomskih efekata tireoidnih hormona na KVS takođe je i povećanje udarnog volumena i srčane frekvencije, kao i relaksacija vaskularnog korita (26).

#### **1.1.4. Kliničko ispoljavanje ateroskleroze (A) u skH i kH (dislipidemija, kardio/cerebrovaskularne bolesti)**

Normalni nivoi tireoidnih hormona su neophodni za održavanje normalne funkcije KVS (34, 35). Značajne promene u funkciji i strukturi srca su detektovane kako u kH, tako i u skH (20) i ispoljenost tih promena zavisi od težine i trajanja tireoidne disfunkcije (26, 36-38).

Najvažnije KV promene kod hipotireoidnih bolesnika su:

- a) povećana sistemska vaskularna rezistencija,
- b) dijastolna disfunkcija,
- c) smanjena sistolna funkcija i
- d) smanjenje predopterećenja- dijastolnog opterećenja (engl. "preload") (27).

Sistolna i dijastolna funkcija su smanjene u naporu i miru, što značajno smanjuje kvalitet života obolelih (26, 36, 39). Jedan od najranijih odgovora KVS na primenu tireoidnih hormona je smanjenje periferne vaskularne rezistencije, što se registruje kod eutireoidnih eksperimentalnih životinja nakon akutne primene LT<sub>4</sub>, a kod obolelih od hipotireoidizma nakon hronične supstitucije (27).

Povećan KV rizik je opisan kod obolelih sa različitim stepenima ispoljenosti hipotireoidizma (14). On može biti povezan sa povećanim rizikom od koronarne bolesti (KB) i srčane insuficijencije (SI) (40, 41). Povećan rizik i mortalitet od KB opisani su i kod mladih ljudi, prevashodno kod kojih je nivo TSH >10mIU/ml (41, 42). Što se tiče SI, povećan rizik je registrovan kod obolelih od kH, kao i kod starijih bolesnika sa skH, kod kojih je TSH >10mIU/ml (34-36).

Povećan rizik od ubrzanja i izraženosti A kod obolelih od skH i kH može se objasniti dislipidemijom, dijastolnom hipertenzijom, povećanom arterijskom krutošću, endotelnom disfunkcijom (ED), kao i izmenjenom koagulabilnošću krvi i povišenim nivoom C-reaktivnog proteina (CRP) (20, 43). Smanjena produkcija azot oksida (NO) se smatra uzrokom ED u skH i kH, koja je reverzibilna (44).

Sve promene koje se javljaju u KVS u sklopu nelečenog hipotireoidizma, vraćaju se delimično ili potpuno na pređašnje stanje nakon supstitucije sa LT<sub>4</sub> (28).

#### **1.1.4.1. Supklinička hipotireoza i kardiovaskularne bolesti (KVB)**

Povezanost skH i KVB je jedna od najaktuelnijih tireoidoloških tema. Uprkos interesovanju, kontroverze i dalje postoje, kako u pogledu uticaja skH na KVB, tako i u pogledu započinjanja supstitucije LT<sub>4</sub> (45). Od posebnog značaja je činjenica da je povećan rizik od KV

morbiditeta i mortaliteta zabeležen kod mladih osoba sa skH, tj. onih kod koji je nivo TSH >10mIU/ml (41).

Studije koje su ispitivale vezu između hipotireoidizma i različitih pokazatelja A su najvećim delom vezane za skH, obzirom na njegovu veću prevalenciju u odnosu na kH, što je ujedno i najveći limitirajući faktor ovih studija. Veliki broj ovih studija ukazuje na povećan rizik od A i KB kod obolelih od skH (46-48). S druge strane, postoje i one koje na to ne ukazuju (12, 49). Aktuelno, postoje tri gledišta u pogledu povezanosti skH i KB: da povezanosti nema (50, 51), da povezanost postoji i da je posredovana dislipidemijom (52-55), odnosno, po trećem gledištu, faktorima koji su nezavisni od dislipidemije (47, 56).

Vikamska studija (engl. Whickham) je kohortna studija iz 1977. godine, koja je obuhvatila 2779 muškaraca i žena u Engleskoj i predstavlja prvu studiju koja je ispitivala vezu između tireoidnog statusa i KVB. Od ukupnog broja ispitanika, 132 su imala skH i upravo su oni i analizirani. Na inicijalnoj evaluaciji nije detektovana povezanost između skH i ishemijske bolesti srca ili „velikih elektrokardiografskih promena” kod ispitanika oba pola, ali je uočena slaba povezanost sa „minor elektrokardiografskim promenama” kod žena (57). Nakon dvadesetogodišnjeg praćenja, nije nađena povezanost između inicijalne autoimunske hipotireoidne bolesti (pozitivna antitireoperoksidazna (ATPO) antitela i TSH >6mIU/ml) i ishemijske bolesti srca kao i mortaliteta među ispitanicima oba pola (51). Međutim, reanalizom ove studije, ukazano je na značajno više inicijalne vrednosti arterijskog pritiska, ukupnog holesterola, LDL-holesterola (LDL-H) i homocisteina kod žena sa skH, sa nivoima TSH 6-15mIU/ml u odnosu na eutireoidne kontrole, kao i da skH, ipak, predstavlja značajan rizik za nastanak ishemijske bolesti srca (58).

Roterdamska studija (47) je sprovedena je 2000. godine, a obuhvatila 1149 žena starosne dobi >55 godina života. Ova studija preseka pokazala je da su ispitanice, nakon prilagođavanja po godinama života, indeksu telesne mase, nivou HDL holesterola (HDL-H), arterijskom pritisku i pušačkom statusu, imale veću prevalenciju radiološki potvrđene A aorte (OR=1,9; 95%CI=1,2-3,1) i infarkta miokarda (OR=2,3; 95%CI=1,3-4,2) u odnosu na eutireoidne kontrole. Prisustvo ATPO antitela dodatno je povećavalo odnos šansi kako u pogledu aortne A (OR=2,2; 95%CI=1,1-4,3), tako i infarkta miokarda (OR=3,5; 95%CI=1,7-7,4). Pored toga su ispitanice sa pozitivnim ATPO antitelima, ali bez izmena u tireoidnoj funkciji, imale sličnu prevalenciju za

aortnu A i infarkta miokarda u odnosu na eutireoidne kontrole sa negativnim ATPO antitelima. Ova studija ukazuje da je izraženost A prevashodno pod uticajem manjka tiroksina, a ne imunske disfunkcije (59). Takođe je i Roterdamska studija ukazala na održavanje povezanosti skH i miokardnog infarkta po uspostavljanju kontrole nad rizičnim faktorima za KB (47), što druge studije nisu potvrdile (49, 51).

U studiji Imaizumija i sar. (6), koja je sprovedena na kohorti 2856 preživelih od napada atomskom bombom na Nagasaki, dokazana je povezanost skH i ishemijske bolesti srca, nezavisno od rizičnih faktora za KB. Isto tako, nađena je povezanost skH sa blago povišenim TSH ( $TSH \leq 10 \text{ mIU/ml}$ ), kao i porast ukupnog mortaliteta u šestogodišnjem praćenju. To govori u prilog direktnom ili indirektnom uticaju nelečenog, čak i veoma blago povišenog TSH, na nastanak fatalnog ishoda. Ova studija nije ukazala na postojanje veze između skH i cerebrovaskularne bolesti. Poput longitudinalne analize Roterdamske studije, tako i analizom studije Imaizumija i sar., ipak nije pokazana povezanost skH i KVB, ali je ukazano na povećan rizik od KB u populaciji, prevashodno muškaraca, srednje životne dobi (6, 47, 60).

HUNT studija (engl. Nord-Trondelag Health Study) (61) je Norveška kohortna studija, koja je obuhvatila 25000 ispitanika, je pokazala da je nivo TSH linearno i pozitivno korelisao sa mortalitetom od KVB kod žena, ali ne i kod muškaraca.

Baselton studija (engl. Busselton) (62), koja se sprovodi i dalje u Australiji, pokazala je da sredovečni ispitanici sa skH, prosečne starosti 50 godina, imaju povećan rizik od KB tokom dvadesetogodišnjeg praćenja, nezavisno od prisustva ili odsustva autoantitela.

S' druge strane, Studija KV zdravlja (63), sprovedena 1994. godine, a koja je obuhvatila 3678 ispitanika oba pola, nije pokazala razlike u prevalenci angine pektoris, miokardnog infarkta, tranzitornih ishemijskih ataka, cerebrovaskularnog insulta ili periferne arterijske bolesti između grupe obolelih od skH i eutireoidnih kontrola.

EPIC studija (engl. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) (64), koja je sprovedena u Velikoj Britaniji, nije pokazala povećan rizik od KB kod obolelih od skH.

Mehanizmi koji objašnjavaju povećan rizik od KVB kod obolelih od skH su tireoidna autoimunost, dislipidemija i ED. Smatra se da kod obolelih od skH tireoidna autoimunost

uzrokuje inflamaciju, koja je uzrok koronarne stenozе (46, 65, 66). Među najranijim neinvazivnim pokazateljima zahvaćenosti vaskularnog korita kod obolelih od skH, izdvaja se povećanje brzine pulsnoг talasa (67).

Pojedini autori smatraju da postoji relativno jasna povezanost između skH i aterosklerotske KVB, nezavisno od prisustva tradicionalnih faktora rizika (41). Takođe, postoje studije koje nisu našle vezu između dislipidemije i ishemijske bolesti srca kod obolelih od skH (68, 69). Ipak, iako najveći broj studija povezuje dislipidemiju sa skH, nedoumice postoje da li je ta povezanost rezultat dislipidemije uzrokovane skH ili nekim drugim faktorima (7).

Uprkos nepostojanju konsenzusa u pogledu povezanosti skH i dislipidemije, najveći broj istraživača smatra da ona postoji (70-72). U prilog tome govore i rezultati metaanaliza, kojima je pokazano značajno smanjenje ukupnog i LDL-H kod obolelih od skH koji su tretirani LT4 (68, 70).

Iako neki autori smatraju Lp(a) najvažnijim faktorom akceleracije A u skH (73, 74), čini se da su povišeni nivoi Lp(a), kao posebno aterogene varijante LDL-H, više pod uticajem nasleđa nego samog skH, i ove povišene vredosti zajedno sa ostalim proaterogenim faktorima, značajno povećavaju rizik od KVB. Studijom Monzaniya i sar. (77), koja je istraživala vezu između skH i nivoa Lp(a), detektovani su povišeni nivoi Lp(a) kod 33% obolelih od skH u odnosu na 7% eutireoidnih kontrola. Ove povišene vredosti nisu bile korigovane po uspostavljanju eutireoidnog ranga TSH pod uticajem LT4 supstitucije. Slične zaključke su dale i druge studije (75, 76, 78), dok je studijom Yildirimkaya i sar. (74) dokazan pozitivan uticaj LT4 na nivo Lp(a).

Nestabilnost A plaka u skH, kao markera ubrzane A, može uzrokovati prekomerna aktivnost elemenata urođene imunosti. U prilog toj hipotezi su značajno prisustvo makrofaga u A plakovima obolelih od skH, povećana ekspresija NFkB, kao i povišeni nivoi TNF $\alpha$  i matriksne metaloproteinaze (MMP) 9, uz smanjenu zastupljenost intersticijalnog kolagena, što sve zajedno stvara uslove za inflamacijom uzrokovanu rupturu plaka. Supstitucija LT4 može doprineti stabilizaciji plaka, najverovatnije putem inhibicije elemenata urođene imunosti (79).

Neinvazivni pokazatelj ispoljenosti A je debljina intima-medija kompleksa (DIMK) na karotidnim arterijama (80, 81), ali i drugim arterijama, npr. femoralnim (82). Najčešći pristup



evaluaciji DIMK su karotidne arterije, zbog njihove lakše dostupnosti i interpretacije nalaza. Pokazano je da je DIMK značajno veća kod obolelih od skH u odnosu na eutireoidne kontrole. Nivo TSH dobro koreliše sa DIMK i predstavlja značajan prediktor varijacije prosečne DIMK. U već ranije pomenutoj studiji Monzaniya i sar. (77), šest meseci nakon uspostavljanja stabilnog laboratorijskog eutireoidnog stanja, DIMK je redukovana za oko 10%, a zavisila je od apsolutnog smanjenja nivoa TSH i nivoa ukupnog holesterola. Prosečna DIMK je dobro korelisala sa lipidnim parametrima (ukupni i LDL-H, trigliceridi i Apo B), kao i godinama života. Mizuma i sar. (83) su detektovali prisustvo jodotironin dejodinaze u humanim glatkim mišićnim ćelijama zida krvnih sudova (KS). Ovo ukazuje da glatke mišićne ćelije, koje su u kontaktu sa endotelnim ćelijama, mogu biti target za delovanje tireoidnih hormona što podržava hipotezu o direktnom uticaju nedostatka tireoidnih hormona na DIMK.

#### **1.1.4.2. Klinička hipotireoza i kardiovaskularne bolesti**

U ranim autopsijskim studijama, prvo Vanhaelsta i sar. (84), a potom i Steinberga i sar. (85), ukazano je na veću izraženost A promena na koronarnim arterijama kod obolelih od miksedema, posebno onih koji su uz to bili i hipertenzivni.

Klinički hipotireoidizam je opšteprihvaćen kao faktor rizika za aterosklerotsku KVB i SI i on je sa KVB povezan prevashodno preko dislipidemije, hipertenzije i povećanja arterijske krutosti (43, 86-88). Međutim, nedvosmislen dokaz o povezanosti kH i KVB, kao i u slučajevima skH, nedostaje (27). Ipak, PET studije, kojima je ispitivana potrošnja kiseonika od strane miokarda kod obolelih od kH, su pokazale smanjenu miokardnu efikasnost u odnosu na eutireoidne kontrole (89).

KH i tradicionalni KV faktori rizika. Postoje brojni dokazi koji potvrđuju povezanost kH sa tradicionalnim faktorima za nastanak i razvoj KVB, prevashodno u smislu akceleracije A. Među njima se izdvajaju izmene lipidnog profila (povišen nivo LDL-H), dijastolna hipertenzija, izmena koagulabilnosti krvi i direktan efekat na glatke mišićne krvnih sudova. Rizik se dodatno povećava navikom pušenja i insulinskom rezistencijom, koji se sinergizuju sa postojećim rizičnim faktorima (43).

**A. Lipidi.** Povišen nivo ukupnog holesterola, LDL-H i apo B su dokazani u kH (59). Produžen poluživot LDL-H je rezultat smanjenog i usporenog metabolizma i ovaj mehanizam je

reverzibilan delovanjem LT4 (90). Uz to, porast razgradnje LDL-H dejstvom LT4 posredovan je povećanjem broja LDL receptora. Genetskim studijama na hipotireoidnim pacovima pokazano je smanjenje nivoa mRNA za LDL receptor za oko 50%, dok su molekularnim mapiranjem locirani funkcionalnih TRE (od engl. Thyroid Horone Response Elements) u promoterskom regionu LDL receptora (91, 92).

Verovatan mehanizam kako kH dovodi do povećanja aterogenosti cirkulišućih lipoproteina je uslovljavanje njihovih kvalitativnih promena. Pokazano je da je LDL-H prijemčiviji za oksidaciju kod obolelih od kH, pri čemu se po uspostavljanju eutireoidnog stanja pod uticajem LT4, to stanje normalizuje (93, 94). U odnosu na eutireoidne kontrole, kod obolelih od kH su prisutni povišeni nivoi Lp(a). Pojedine studije su pokazale pozitivan uticaj LT4 supstitucije na smanjenje nivoa Lp(a) (95, 96), ali ima i onih koje to nisu (78).

Povezanost kH i sniženih nivoa HDL-H i sledstveno povećanog rizika od A je kontroverzna. Korekcija nivoa HDL-H pod uticajem LT4- po nekim autorima nije značajna (76), dok po drugima jeste (97).

Proaterogeni uticaj kH dodatno ostvaruje preko redukcije klirensa hilomikronskih ostataka (98), potom redukcije reverznog transporta holestrola smanjenjem aktivnosti holesteril-ester transportnog proteina (99), kao i smanjenjem aktivnosti hepaticne- i lipoproteinske lipaze (100).

**B. Hipertenzija.** Uzrokujući dijastonu hipertenziju, kH povećava rizik od KVB, čija je prevalenca u kH oko tri puta veća nego kod eutireoidnih kontrola (14,5/5,5%) (101). Verovatan mehanizam nastanka arterijske hipertenzije, kako dijastolne tako i sistolne, je porast periferne vaskularne rezistencije, kao i arterijske krutosti (41, 101).

**C. Pušenje.** Poznat je sinergistički efekat duvana i kH. Pušači koji boluju od kH imaju povišene nivoe ukupnog i LDL-H, veće skorove na upitnicima za ispitivanje ispoljenosti kliničkih simptoma H, kao i povišene nivoe kreatin-kinaze u odnosu na nepušače sa kH (102).

**D. Ostali faktori rizika za KVB.** Povišeni nivoi homocisteina i CRP se često povezuju sa kH (103, 104). Povišene vrednosti homocisteina se normalizuju po uspostavljanju eutireoidnog ranga TSH (105), dok se povišen nivo CRP normalizuje u obolelih od kH (104), ali ne i kod

obolelih od skH (66). Hiperhomocistinemija doprinosi A stimulacijom oksidacije LDL-H, favorizovanjem ED i vaskularnim oštećenjem endotelnih ćelija (106). U pogledu prokoagulacionih uticaja kH, rezultati su kontradiktorni. Čini se da u skH postoji sklonost ka trombofiliji i sledstvenom povećanju rizika od tromboze koronarnih arterija i AIM, dok u kH postoji povećana tendencija nastanka hemoragijskog sindroma (107, 108).

### **1.2.1. Sintetaze azot oksida (NOS od engl. Nitric Oxide Synthase)**

NO produkuju familije enzima koje se zovu NOS, prvobitno otkrivene 1989. godine. Između 1991. i 1994. godine klonirane su tri izoforme NOS-a: neuronalna, endotelna i inducibilna, koje predstavljaju produkte najmanje tri različita gena (109-112). Postoji 51-57% homologije između NOS sisara i ljudi. NOS može proizvoditi NO, superoksid anjon ili peroksinitrit (113). Sve tri izoforme NOS su ekspimirane u KV tkivu, a međusobno se razlikuju po svojoj ekspresiji i aktivnosti, kao i u zavisnosti od kalcijuma (114-117).

NOS se mogu podeliti na dve funkcionalne klase:

- a) konstitutivne NOS (neuronalna NOS – nNOS i endotelna NOS – eNOS)
- b) inducibilna NOS (iNOS)

Aktivnost konstitutivnih NOS je zavisna od intraćelijske koncentracije kalcijuma, za razliku od iNOS koji je čvrsto vezan za kalmodulin (K) i tako stalno aktivan, nezavisno od koncentracije kalcijuma u ćeliji (118-120).

**nNOS** (neuronalna ili tip 1 NOS) je NOS vezana za neurone centralnog i enternalnog nervnog sistema.

**iNOS** (inducibilna ili tip 2 NOS) je ekspimirana u endotelu, epitelu, hepatocitima, hondrocitima i zapaljenskim ćelijama. iNOS je jedan od od glavnih medijatora inflamacije. U fiziološkim uslovima iNOS nije ekspimiran u srcu (114). Prisutan je u brojnim patofiziološkim stanjima, gde različiti faktori indukuju njegovu ekspresiju, poput citokina, gojaznosti (121), slobodnih masnih kiselina (122), hiperglikemije, endotoksina i oksidativnog stresa (114, 123). iNOS je predominantno lokalizovana u citosolu. Njen afinitet za  $Ca^{2+}$  je veoma visok, te je aktivna i pri bazalnim nivoima intraćelijskog kalcijuma (114, 124). Kada je iNOS ekspimirana u

KVS, može biti lokalizovana u kardiomiocitima (125), makrofagima (125), kao i endotelnim i glatkim mišićnim ćelijama krvnih sudova (126).

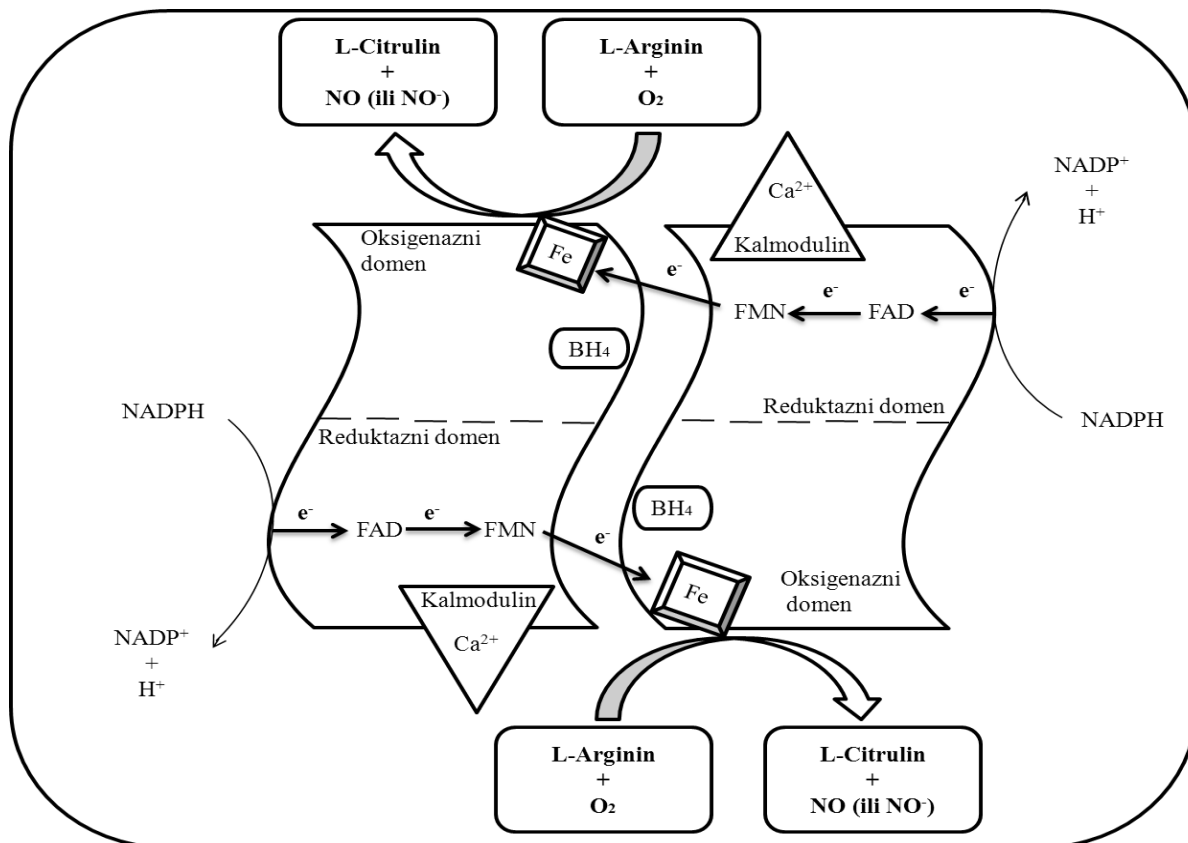
Za razliku od eNOS, iNOS je prevashodno transkripciono regulisana, te se normalno ne proizvodi u većini ćelija (127). Aktivnost iNOS, kao i ostalih NOS, zavisi od raspoloživosti arginina, njegovog transporta i potrošnje (128, 129). Povećana ekspresija iNOS je povezana sa A, kao i smanjenom ekspresijom eNOS u endotelnim ćelijama koje prekrivaju ateromatozne plakove (130, 131). Povećana aktivnost iNOS je prisutna u svim bolestima u kojima ima inflamacije (123, 132).

**eNOS** (endotelna ili tip 3) je konstitutivni enzim, primarno lokalizovan unutar kaveole plazma membrane endotelnih ćelija KS (133, 134). eNOS je neophodna za bazalne fiziološke procese u KVS, a njena aktivnost može biti i pod uticajem različitih stimulansa (135). Kada je neaktivna, eNOS je vezana za kaveolin 1, koji ometa njeno vezivanje za K. Povećanjem koncentracije intraćelijskog  $Ca^{2+}$ , sledi uklanjanje kaveolina 1 iz kompleksa sa eNOS. Potom se eNOS vezuje za K i tako aktivira (114, 136, 137). eNOS zahteva višu koncentraciju intraćelijskog  $Ca^{2+}$  za razliku od iNOS (138).

Pozitivni efekti eNOS su: promocija vazodilatacije uzrokovane relaksacijom glatkih mišićnih ćelija zida KS, sprečavanje proliferacije glatkih mišićnih ćelija, kao i smanjenje adhezivnosti trombocita. Pored toga, eNOS deluje antiinflamatorno (smanjuje adhezivnost leukocita za zid KS), antioksidativno (lokalno uklanja slobodne kiseonične radikale (ROS; od engl.Reactive Oxygen Species), kao i antifibrotično (pri normalnom nivou NO snižen je nivo matriksne metaloproteinaze). Uopšteno govoreći, eNOS ima antiaterosklerotsko dejstvo (139, 140).

### **1.2.1.2. Produkcija i mehanizam delovanja NO**

NOS funkcioniše kao dimer, sastavljen iz dva različita monomera, koji se strukturno i funkcionalno mogu podeliti na C terminalni- reduktazni i N terminalni- oksigenazni monomer. N-terminalni oksigenazni domen ima vezna mesta za hem, tetrahidrobiopterin (BH4) i L-arginin,



**Slika 1. Shematski prikaz mehanizma nastanka NO pomoću enzima NOS i njenih kofaktora**

**NO**-azot-monoksid; **NOS**- NO-sintaza;  $e^-$ - elektroni; **NADP**- nikotinamid adenin dinukleotid fosfat; **FMN/FAD**- flavin mononukleotid/flavin adenin dinukleotid; **BH<sub>4</sub>**- tetrahydrobiopterin; **Fe**- hem gvožđe; **Ca<sup>2+</sup>**- joni kalcijuma; **O<sub>2</sub>**- kiseonik [preuzeto iz Sudar i sar. (143)].

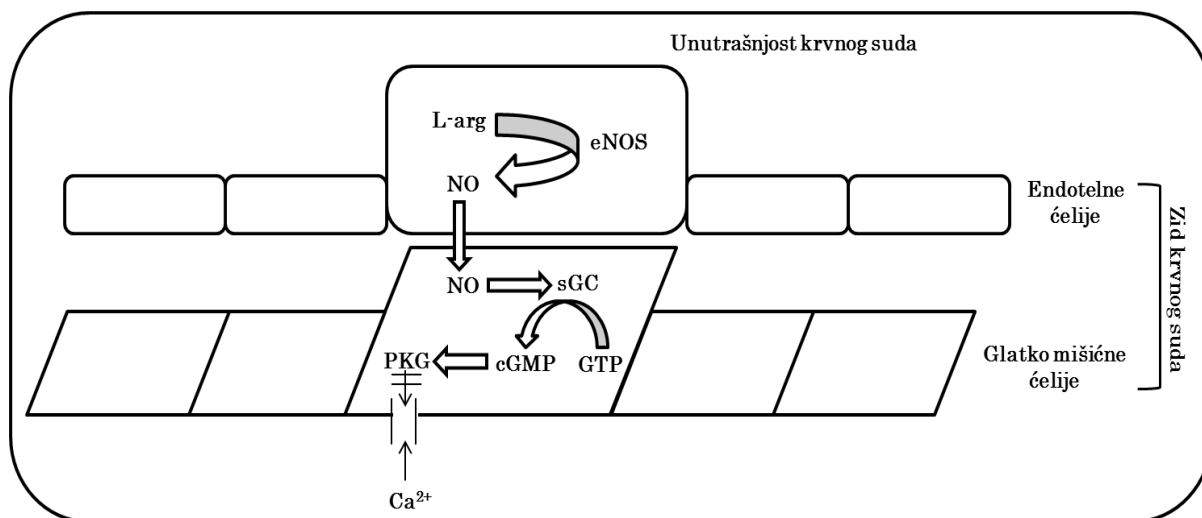
dok C-terminalni reduktazni domen ima vezna mesta za flavin adenin dinukleotid (FAD), flavin mononukleotid (FMN), kao i nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH). Između domena se nalazi vezno mesto za kalmodulin (115, 141, 142, 143) (Slika 1.).

Dimerizacija NOS počinje vezivanjem hema. Za takav Hem-NOS dimer se vezuje BH<sub>4</sub>, koji ga čini stabilnim (141, 142). Pretpostavka je da kofaktor BH<sub>4</sub> vrši alosteričnu promenu kojom se stabilizuje aktivna dimerna forma NOS, redukuje NOS pri stimulaciji i tako aktivira (144-145). U nedostatku ili oksidaciji BH<sub>4</sub>, NOS produkuje pre superoksid nego NO. To stanje se naziva funkcionalna razgradnja NOS (engl. „NOS uncoupling“) (146).

NADPH donira elektron reduktaznom domenu NOS, a potom se transfer elektrona dalje nastavlja preko FAD i FMN redoks nosača ka oksigenaznom domenu, a zatim interreaguju sa hemom i BH<sub>4</sub> na aktivnom mestu, gde se katalizuje reakcija kiseonika sa L-argininom. Da bi uopšte postojao transfer elektrona kroz reduktazni domen NOS, neophodno je prethodno vezivanje Ca<sup>2+</sup> za K. Produkti reakcije kiseonik i L-arginin su ekvimolarne koncentracije L-citrulina i NO (147).

Mehanizmi delovanja NO (Slika 2). Produkovano NO može delovati u ćeliji, ali isto tako može lako difundovati do ciljnog molekula ili ćelije, u blizini ili udaljeno (parakrini i endokrini efekat). NO ima kratak poluživot, oko 10 sec., što značajno limitira njegove udaljene endokrine efekte (124, 134, 147). NO produkovan u digestivnom traktu ne može delovati u centralnom nervnom sistemu (148). Ovaj veoma reaktivni slobodni radikal sa nesparenim elektronom, zahvaljujući osobinama hidro- i liposolubilnosti, slobodno difunduje u ćelije i stupa u interakciju sa brojnim ciljnim molekulima, poput kiseonika, ostalih radikala, proteina sa tiol-grupom, kao i metalima, npr. gvožđem (149). Interakcija sa kiseonikom omogućuje nastanak nitrita (NO<sub>2</sub>) i nitrata (NO<sub>3</sub>), što inaktivira molekul NO. Nadalje, NO se može jediniti sa ostalim reaktivnim molekulima, kao npr. sa superoksid anjonom (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) i formirati druge reaktivne molekule, poput peroksinitrita, azot IV oksida i sl., koji oštećuju tkiva, ali i interreagovati sa metalima, formirajući komplekse koji aktiviraju ili inaktiviraju enzime. Kada je produkcija NO veoma visoka, brojni enzimi mogu biti inhibirani u reakciji sa NO (npr. RNK reduktaza, dehidrogenaza, citohrom P450). Inhibicija pomenutih, ali i brojnih drugih enzima, smatra se mehanizmom kako NO produkovan posredstvom uticaja citokina može inhibirati rast ćelija meta, bilo da se radi o mikroorganizmima, tumorskim ćelijama ili limfocitima (149, 150).

U osnovi, NO svoje efekte ostvaruje preko najmanje dva različita puta. Prvi put je vezan za produkciju cikličnog guanozin monofosfata (cGMP). U glatkim mišićnim ćelijama KS NO aktivira guanilatnu ciklazu, koja povećava nivo cGMP, koji aktivira protein kinazu G (PKG) i fosfodiesteraze regulisane cGMP-om. Aktivacija NO/cGMP/PKG puta dovodi do relaksacije glatkih mišićnih ćelija i dilatacije KS na račun smanjenja koncentracije intraćelijskog Ca<sup>2+</sup> (151-153). Pored toga, povišen nivo cGMP dovodi i do sprečavanja agregacije trombocita i adhezije leukocita za endotel (154).



**Slika 2. Shematski prikaz mehanizma delovanja NO naglatke mišićne ćelije krvnih sudova**

**NO**-azot-monoksid; **eNOS**- endotelna NO-sintaza; **sGC**- solubilna guanilat ciklaza; **GTP**- guanozin trifosfat; **cGMP**- ciklični adenozin monofosfat; **PKG**- protein kinaza G; **Ca<sup>2+</sup>**- joni kalcijuma; **L-arg**- L-arginin [preuzeto iz Sudar i sar. (143)]

Drugi put delovanja NO, koji je cGMP nezavisan, predstavljen je aktivacijom adenilatne ciklaze i sledstvenog povećanja nivoa cikličnog adenozin monofosfata (cAMP), koji potencira kontraktilnost miokarda (155).

U slučaju povećane produkcije NO, ne treba zanemariti i neke druge njegove cGMP nezavisne efekte – mogućnost reagovanja kao slobodnog radikala (156), mogućnost aktivacije nekih drugih enzima, npr. ciklooksigenaze, koja omogućuje sintezu eikosanoida (157).

### 1.2.1.3. Fiziološka uloga NO

NO je otkriven kao relaksator krvnih sudova poreklom iz endotela (EDRF; od engl. Endothelium-Derived Relaxing Factor)(151, 158-160). NO je uključen u različite fiziološke i patofiziološke procese. Iako se često predstavlja kao visoko reaktivan i toksičan, NO je uopšteno uzeto manje reaktivan od molekularnog kiseonika (148). U fiziološkim uslovima se primarno sintetise u endotelnim ćelijama KS, gde ima ulogu u održavanju KV homeostaze (158-160). Narušena ravnoteža između vazodilalatornih (predominantno NO) i vazokonstriktivnih endotelnih faktora predstavlja ED, koja je u osnovi brojnih KV, ali i drugih sistemskih bolesti. Sa aspekta NO, karakteriše se njegovom smanjenom sintezom, oslobađanjem ili aktivnošću (156).

Glavni izvor NO u srcu u fiziološkim uslovima je endotel koronarnih KS. Odatle NO difunduje u kardiomiocite i tako ostvaruje parakrine efekte (161). Inače, u kardiomiocitima pretkomora i komora su eksprimirane sve tri izoforme NOS (162). Od ostalih tkiva, značajna produkcija NO se zapaža u jetri, posebno u patofiziološkim uslovima, poput endotoksičnog i hemoragijskog šoka, hepatitisa, fenomena ishemija-reperfuzija ili sepse, kada je značajno naglašena ekspresija iNOS. Obzirom na visok nivo produkcije NO posredovan iNOS-om (i do 1000 puta veća produkcija od eNOS), pored regulatorne i efektorske uloge u inflamaciji i infekciji, tako visok nivo NO može dovesti i do oštećenja brojnih tkiva, posebno jetre (163-165). Aktivacijom iNOS povećava se koncentracija NO sve do razgradnje samog enzima (166). Razlog zašto visoke koncentracije NO imaju štetne efekte leži u činjenici da NO može reagovati sa superoksidnim anjonima i dovesti do nastanka visoko ROS (167), a na nivou KVS delovati negativno inotropno (168). Sa druge strane, u slučaju kada nedostaje L-arginin kao supstrat, narušava se normalna aktivnost iNOS, koji počinje da stvara ROS, predominantno superoksidni anjon (169). Nadalje, već stvoreni visoko reaktivni NO lako stupa u reakcije sa ROS. U takvoj interakciji sa superoksidnim anjonom nastaju intermedijerni produkti, često mnogo reaktivniji od samog NO, kao što je npr. pomenuti peroksinitrit (170).

NO kao produkt eNOS je niskih koncentracija, a održava krvni pritisak, inhibira agregaciju trombocita i adheziju leukocita. Pored uloge u regulaciji vaskularnog tonusa i remodelovanja vaskulature, eNOS NO ima i ulogu u angiogenezi (171), kao i endogenog beta blokatora – sprečava hipertrofiju, a utiče na vazodilataciju i neoangiogenezu (172). U srčanim bolestima je detektovano značajno smanjenje ekspresije i aktivnosti eNOS u miokardu (173). Endotelni NO ima dvostruku ulogu u procesu A (174). Visok nivo NO, produkovan od strane iNOS endotelnih ćelija i makrofaga, može biti uzrok oštećenja endotela. Pored toga, visok nivo NO može stupiti u interakciju sa superoksidom i formirati peroksinitrit. Nadalje, peroksinitrit može oksidovati BH<sub>4</sub>, smanjiti njegov nivo neophodan za funkciju eNOS i tako dovesti do promene u funkciji eNOS iz enzima koji produkuje NO u enzim koji produkuje superoksid. Tako NO može imati anti- i proaterogene karakteristike (170, 173, 175).

NO kao produkt nNOS stimuliše motilitet digestivnog trakta, deluje kao neurotransmiter i inhibira sekreciju insulina (176).



NO kao produkt iNOS, čija je produkcija značajno veća od produkcije indukovane konstitutivnim NOS, utiče na imunost domaćina, inflamaciju i nastanak bola, dovodi do oštećenja pojedinih tkiva, inhibira sekreciju insulina i indukuje apoptozu (176).

Fiziološke „mete“ za delovanje NO su mitohondrije (177). NO utiče na funkciju mitohondrija tako što se veže za citohrom c oksidazu, koja je terminalni akceptor elektrona u mitohondrijalnom transportnom lancu u kompeticiji sa kiseonikom. Vezivanjem NO za citohrom c oksidazu, pokreću se brojni intraćelijski događaji, uključujući i stvaranje ROS, koji su generatori potencijalnih štetnih efekata, prevashodno u uslovima hipoksije (178-181).

NO, kao glavni medijator endotel-zavisne vazodilatacije, ima značajne antiinflamatorne i antitrombotične karakteristike, koje uključuju inhibiciju adhezije leukocita, adhezije i agregacije trombocita, kao i ekspresiju inhibitora aktivatora plazminogena 1 (PAI 1; engl. Plasminogen activator inhibitor 1), koji ima protrombotične karakteristike (182).

#### **1.2.1.4. Hipotireoidizam i NO**

Ekperimentalni dokazi. Prisustvo hipotireoidizma kod pacova smanjuje presorne efekte nastale nakon akutne inhibicije NO i kratkotrajno sprečava hipertenziju uzrokovanu hroničnom primenom inhibitora NO, N-nitro-L-arginin metilestar (L- NAME), ali ne dovodi do dugoročnog sprečavanja hipertenzije (183). NO puferuje prohipertenzivne efekte tireoidnih i drugih vazokonstriktornih hormona. Bolesti koje su povezane sa smanjenjem produkcije NO, mogu biti značajno pogoršane u uslovima viška tireoidnih hormona. Stoga se smatra da je deficit NO veza sa metaboličkim i KVB, prevashodno hipertenzijom (184).

Kod pacova, hipotireoidizam je povezan sa značajnim padom senzitivnosti na vazokonstriktore, prevashodno na simpatičke agoniste. Pored toga, smanjena je kako endotel-zavisna, tako i vazodilatacija uzrokovana donatorima NO (185). Poznato je da endotelne ćelije u kulturi izložene prilivom krvi, kao i KS koji su hronično izloženi povećanom protoku, pokazuju povećanu endotel-zavisnu vazodilataciju, kao i povećanu aktivnost i/ili ekspresiju NOS (186-188). Stres uzrokovan prilivom krvi reguliše ekspresiju NOS (187). Stoga u stanjima koja su praćena hiperdinamskom cirkulacijom (sideropenijska anemija, ciroza jetre), dolazi do povećanja ekspresije/aktivnosti konstitutivne NOS (189). U hipotireoidizmu je detektovana smanjena NOS aktivnost u aorti i bubrežnim KS, a takođe i smanjena endotel-zavisna vazodilatacija (190-193).

Takođe, nije nađena povišena aktivnost NO u preparatima KS hipotireoidnih pacova (185, 194). Propiltiouracilom indukovana hipotireoza kod pacova je povezana sa značajnim smanjenjem genske ekspresije NOS, ali i njenom normalizacijom nakon primene LT4 u hrani (195).

Aktivnost NOS je veoma heterogena u tkivima hipotireoidnih pacova, bilo zbog promene u ekspresije različitih izoformi NOS, bilo zbog promene u aktivnosti NOS na subćelijskom nivou. U srčanim komorama je NOS aktivnost povišena, a u aorti snižena, što bi moglo biti objašnjenje za povećanu perifernu rezistenciju i sledstvenu sklonost hipertenziji (196). Pokazano je da je kod hipotireoidnih pacova ekspresija/aktivnost mitohondrijalne NOS jetre i skeletnih mišića povišena i da inverzno koreliše sa nivoom serumskog T3. Takođe, kod istih pacova je pokazana smanjena genska transkripcija NOS u supraoptičkim i paraventrikularnim jedrima hipotalamusa (197).

Blag hipotireoidizam kod pacova indukuje progresiju ED uzrokovane smanjenjem NO, koja je nastala kao posledica povećanog oksidativnog stresa. Pored toga, detektovano je kako povećanje ekspresije, tako i aktivnosti iNOS, koja uslovljava povećanje produkcije superoksida (198).

Klinički dokazi. Ekspresija eNOS u tireoidnim folikularnim ćelijama i varijacije u njenoj imunoreaktivnosti ukazuju na moguću ulogu NO u rastu i/ili funkciji tireocita. Kod obolelih od hipertireoidizma, ekspresija mRNK eNOS u endotelnim i u folikularnim tireoidnim ćelijama značajno je veća nego kod eu- ili hipotireoidnih (199, 200). U uslovima hronične deficijencije NO, nema promene u nivoima tireoidnih hormona (200).

### **1.2.2. NO<sub>3</sub> i NO<sub>2</sub>/NO**

Pored produkcije NO zavisnog od NOS, otkrivena je produkcija NO iz anjona NO<sub>2</sub>, koja je NOS nezavisna. Smatralo se da su NO<sub>2</sub> relativno stabilni završni produkti metabolizma NO i da nemaju značajnu biološku ulogu. Međutim, NO<sub>2</sub> se u organizmu mogu reciklirati u NO enzimskim i ne-enzimskim putevima, zbog čega se zovu endokrinim rezervoarom NO (201-204). Ne-enzimski mehanizmi redukovanja NO<sub>2</sub> u NO su promena pH i kiseoničnog gradijenta, dok su enzimi koji katalizuju konverziju NO<sub>2</sub> u NO: ksantin oksidoreduktaza, aldehidoksidaza, mioglobin, hemoglobin i citohrom c oksidaza (205). Cirkulišući NO<sub>2</sub> se mogu, pored eNOS/NO

puta, proizvoditi iz NO<sub>3</sub> unetih hranom i oni se najvećim delom konvertuju u NO<sub>2</sub> preko entero-salivarnog puta (201, 202, 206, 207).

I NO<sub>3</sub> i NO<sub>2</sub> mogu nastati iz endogenih i egzogenih (dijetarnih) izvora. Primarni endogeni izvor produkcije NO<sub>3</sub> i NO<sub>2</sub> je L-arginin/NOS/NO put. Na taj način nastali NO se brzo oksiduje u krvi i tkivima u NO<sub>3</sub> i NO<sub>2</sub>. NO reaguje sa oksihemoglobinom u eritrocitima i nastaje NO<sub>3</sub> i methemoglobin, a u plazmi sa ceruloplazminom i kiseonikom uz bakarne oksidaze formira NO<sub>2</sub> (207-209). Egzogeni (dijetarni) izvori značajno doprinose nivou cirkulišućih NO<sub>3</sub> i NO<sub>2</sub>. Glavni dijetarni izvori NO<sub>3</sub> su zelenolisno (zeleni salata i spanać) i korenasto povrće (202). Ove namirnice sadrže više NO<sub>3</sub> nego što se može endogeno proizvoditi tokom celog dana. Iako su nivoi NO<sub>3</sub> u pijaćoj vodi u nekim zemljama zakonom regulisani, oni mogu biti značajno prisutni u vodi i biti izvor NO<sub>3</sub> (210, 211). NO<sub>2</sub> se u hrani nalaze kao aditivi i konzervativi (prevažno u mesu i prerađevinama) zbog sanitarnih razloga i poboljšanja organoleptičkih svojstava. Približno polovina plazmatskog nivoa NO<sub>2</sub> je porekla dijetarnih NO<sub>3</sub>, a druga polovina je nastala oksidacijom endogenog NO (205, 210, 212). Normalni nivoi NO<sub>3</sub> u plazmi su 20-40 μmol, a NO<sub>2</sub> znatno niži – 50-300 nmol (206, 209, 213, 214). U uslovima povećane aktivnosti eNOS (npr. u fizičkoj aktivnosti), kao i povećane aktivnosti iNOS (npr. ozbiljni gastroenteritis, sepsa), znatno se povećavaju nivoi NO<sub>3</sub> i NO<sub>2</sub> (207, 215). Međutim, u uslovima ED i sledstveno snižene aktivnosti eNOS, nivoi NO<sub>3</sub> i NO<sub>2</sub> su sniženi (216).

Enterosalivarna cirkulacija. Bioaktivacija NO<sub>3</sub> iz dijetarnih i endogenih izvora zahteva njihovu inicijalnu redukciju u NO<sub>2</sub>. Konverzija dijetarnih NO<sub>3</sub> u NO<sub>2</sub> i NO je proces u digestivnom sistemu, koji je prvi put opisan 1994. godine (204, 217). NO<sub>3</sub> se iz cirkulacije, bilo da su nastali endogeno ili se uneti hranom, apsorbuju iz digestivnog trakta u krv, koncentrišu u pljuvački do visokih koncentracija (niske mmol koncentracije) pomoću pljuvačnih žlezda. Ovo je tzv. enterosalivarna cirkulacija NO<sub>3</sub>. Do sada nije poznato zbog čega se NO<sub>3</sub> ekskretuju i koncentrišu u pljuvački (218, 219). U usnoj duplji, komensalne bakterije, koje poseduju NO<sub>3</sub> reduktazne enzime, konvertuju NO<sub>3</sub> u NO<sub>2</sub>, koji potom bivaju progutani i dospevaju u želudac. Redukcija NO<sub>3</sub> u NO<sub>2</sub> se, pored želuca i u usnoj duplji, odvija i na površini kože, debelom crevu, kao i urinu (218, 220-222). Deo tih NO<sub>2</sub> se neenzimski (protonovanjem ili redukcijom), pomoću hemoglobina (223), askorbata (224), polifenola (225), ksantinoksidoreduktaza (226), protona (204), kao i mioglobina (227) konvertuje u NO. Ova reakcija zavisi od niskog pH

želudačnog soka i može biti značajno limitirana upotrebom lekova, poput inhibitora protonske pumpe (204). Ovako produkovan NO u želucu ima antimikrobne karakteristike, održava mukozalni krvotok i povećava lokalnu produkciju sluzi (219, 228, 229). Pored korisnih, postoje i neki štetni efekti, kao npr. produkcija nitrozamina, koji se povezuju sa kancerogenezom (228, 230). Drugi deo NO<sub>2</sub> se apsorbuje u proksimalnim partijama digestivnog sistema, a potom se dalje može redukovati u NO u sistemskoj cirkulaciji pomoću neenzimske ili enzimске redukcije, posebno u hipoksičnim uslovima. Stoga se NO<sub>3</sub>/NO<sub>2</sub>/NO put smatra komplementarnim L-arginin/NOS/NO putu u uslovima hipoksije, ali i kompenzatorno adaptivnim u prisustvu oksidativnog stresa i ishemije, kada je aktivnost NOS snižena (181, 205, 231, 232). Još uvek se ne zna koji je to parcijalni pritisak kiseonika, pri kom se prelazi iz jednog puta produkcije NO u drugi (201), što navodi na pretpostavku da je produkcija praktično zavisna od koncentracije NO<sub>2</sub> (209, 233, 234).

### **1.2.3. Endotelna disfunkcija, ateroskleroza i hipotireoidizam**

Parcijalni ili kompletni gubitak balansa između vazodilatatora i vazokonstriktora, inhibitora ili promotora rasta, pro- i antiaterogenih, kao i pro- i antikoagulantnih faktoramože se definisati kao ED. Produkcija NO u ED je smanjena i sveukupno doprinosi povećanom KV riziku, iako je ED rani događaj u procesu A (239-241). ED je povezana sa godinama života, menopauzom, kao i pušenjem (242). Isto tako, ED predstavlja rani nalaz kod obolelih od dijabetesa, hipertenzije, SI, gde nastaje kao posledica lokalnog efekta formiranih reaktivnih azotnih jedinjenja, kao i ROS (243-247). Značaj ED je u sklonosti obolelih ka nastanku i razvoju KV komplikacija i formiranja mikrotromboza (236, 248-250). Smanjena biološka raspoloživost NO je prva faza u razvoju vaskularnih bolesti, ali se ne zna da li je ona uzrok ili posledica ED ili nastaje kao sadejstvo oba faktora (117, 249, 251).

Endotel ima jednu od glavnih uloga u održavanju vaskularnog tonusa, vaskularne homeostaze, proliferacije glatkih mišićnih ćelija, kao i održavanju balansa između tromboze i trombolize, tako što produkuje veliki broj vazoaktivnih materija (235). Upravo endotelne ćelije u odgovoru na različite fizičke i hemijske stimulanse (npr. promena pritiska, uticaj struje krvi, protoka), cirkulišuće hormone, lekove, citokine, kao i autonomne medijatore produkuju vazoaktivne relaksirajuće (NO, prostaciklin, C-natriuretski peptid), kao i kontraktilne supstance (angiotenzin II, endotelin-1, tromboksan A<sub>2</sub>) (148, 236). Vaskularni tonus predstavlja balans

između vazokonstrikcije i vazodilatacije (237). Vaskularni endotel je regulator funkcije vaskularnih glatkih mišićnih ćelija i pomaže u održavanju vaskularnog tonusa i fluidnosti krvi. NO iz endotela difunduje u glatke mišićne ćelije KS i indukuje relaksaciju. U hipotireoidizmu je dokazana ED (20, 44). Protokom regulisana endotel zavisna vazodilatacija brahijalne arterije, koja se detektuje visokoosetljivim ultrazvučnim snimanjem, je značajno smanjena kod obolelih od skH i kH. Ta ED se pripisuje smanjenjem raspoloživosti NO. Verovatno je za to odgovorna blaga hronična inflamacija preko ciklooksigenaznog 2 (COX-2; od engl. Cyclooxygenase 2) puta, koji povećava oksidativni stres, prevashodno kod skH uzrokovanim Hashimoto tireoiditisom (44, 238).

Tueremen i sar. (45) su ukazali na prisustvo endotel-zavisne ED uz endotel-nezavisni vaskularni odgovor na nitroglicerin u grupi obolelih od skH uzrokovane autoimunskim tireoiditisom u odnosu na eutireoidnu kontrolu. Objašnjenje za postojanje ED u ovoj populaciji je bila blaga inflamacija (dokazana na osnovu lako povišenih medijatora inflamacije), kao i hiperlipidemija.

Akutna i hronična inflamacija značajno doprinose nastanku ED. Kod obolelih od skH i kH su detektovani povišeni nivoi interleukina 6 (IL-6), TNF- $\alpha$  i CRP. IL-6 ima centralnu ulogu u vaskularnoj inflamaciji (252). TNF- $\alpha$  je glavni medijator apoptoze i inflamacije (253). CRP, pored toga što ukazuje na sistemska inflamaciju, predstavlja koristan biomarker u proceni KV rizika, kako kod zdravih, tako i kod obolelih od različitih bolesti (103). Svi pomenuti povišeni markeri korelišu sa etiologijom skH i kH (autoimunska hronična tireoiditis), kao i sa brzinom pulsno talasa, kao markerom endotel-zavisne disfunkcije (254). To ukazuje da oboleli od skH i kH, koji su uzrokovani hroničnim autoimunskim tireoiditisom, imaju povećan KV rizik (66).

Hiperlipidemija uzrokuje ED *per se*, smanjenjem ekspresije eNOS i povećanjem nivoa endogenog inhibitora eNOS, asimetričnog dimetilarginina (ADMA) (255). Doprinos dislipidemije ED je parcijalan, što pokazuje činjenica da korekcijom hipotireoidizma i dislipidemije dolazi do delimičnog oporavka endotel-zavisne vazodilatacije (44).

SkH *per se* dovodi do poremećaja endotel-zavisne vazodilatacije. Naime, vazodilatatorni efekat acetilholina je značajno smanjen kod obolelih od skH kod kojih je TSH >10mIU/ml. Pod uticajem LT4, ova vazodilatacija se poboljšava. Ona je povezana sa vraćanjem inhibitorne

aktivnosti L-NMMA, koji je blokator NOS. Drugim rečima, supstitucijom LT4 poboljšava se endotel-zavisna vazodilatacija vraćanjem produkcije NO. Stoga se ranom primenom LT4 u skH postiže prevencija progresije u kH, ali i usporavanje akceleracije A (44).

Sve A bolesti se karakterišu sniženom eNOS aktivnošću i posledičnim smanjenjem raspoloživosti NO, uz povećanje ekspresije ćelijskih adhezivnih molekula, poput adhezivnog proteina vaskularne ćelije 1 (VCAM 1; engl. Vascular cell adhesion molecule 1), interćelijskog adhezivnog molekula 1 (ICAM 1; engl. Intercellular adhesion molecule 1), kao i inhibicije oslobađanja hemokina, poput monocitnog hemoatraktantnog proteina 1 (MCP 1; engl. Monocyte chemoattractant protein 1) (256, 257).

Inhibicija eNOS ubrzava A, što znači da NO ima značajnu ulogu u procesu aterogeneze (140, 258). Takođe, primena L-arginina (259, 260), kao i BH4 (261), usporava progresiju A, dok primena inhibitora NOS poništava taj protektivni efekat (262).

### **1.3.1. Farmakologija LT4**

Lek LT4 je fabrikovan u obliku tableta za oralnu primenu, koja je najčešća, kao i rastvora za intravensku primenu, koja se primenjuje u posebnim situacijama. Nakon oralne primene, poluživot LT4 u cirkulaciji iznosi 6-7 dana. Enteralna apsorpcija iznosi 70-80% unete doze leka. Primarno mesto apsorpcije LT4 je tanko crevo, prevashodno proksimalni deo, dok nivo apsorpcije opada prema ileumu. Tačan mehanizam apsorpcije LT4 iz lumena creva u cirkulaciju za sada nije razjašnjen. Na apsorpciju LT4 utiču brojni faktori, a najviše lekoviti preparati i različite vrste namirnica. Stoga je neophodno lek uzimati izjutra, sa vodom, najmanje 30-45 min. pre bilo kakve druge tečnosti, hrane ili nekog drugog leka, posebno anjonskih smola, preparata gvožđa i sukralfata. Nakon primene leka, serumska koncentracija tiroksina dostiže maksimum nakon 2-4 sata, a nakon 6 sati počinje postepeno da opada (263, 264).

Postoje brojne formule za izračunavanje optimalne doze LT4. Jedna od njih je (265):

Dnevna doza LT4 ( $\mu\text{g}$ ) =  $-1,4+(4,1 \times \text{TSH})$ , kod osoba sa nivoom TSH  $<36$  mIU/ml, odnosno  $107+(0,69 \times \text{TSH})$ , kod osoba sa nivoom TSH  $>36$  mIU/ml (265).

Uobičajena prosečna doza za odrasle obolele od hipotireoidizma iznosi oko 1,6mcg/kg idealne telesne težine. Doze su veće kada nedostaje štitasta žlezda u odnosu na osobe sa prisutnom, patološki izmenjenom žlezdom. Kontrola kvaliteta supstitucije LT4 može se određivati merenjem nivoa TSH, kao i slobodnih frakcija perifernih tireoidnih hormona. Ako se kvalitet supstitucije meri određivanjem nivoa TSH i T3, bolesnik može nesmetano popiti svoju jutarnju dozu leka na dan kada vadi krv, jer su njihove koncentracije stabilne. Ukoliko se kvalitet supstitucije određuje merenjem nivoa fT4, zbog fluktuacije u nivou tiroksina nakon uzimanja leka, potrebno je izostviti jutarnju dozu na dan vađenja krvi i popiti je nakon (264, 266).

Uvođenje supstitucione terapije LT4 je individualizovano, a zavisi od godina života i postojećih bolesti. Kod muškaraca >40 godina i žena >50 godina, daje se puna doza leka po formuli 1,6µg/kg idealne telesne težine. Prva kontrola nivoa TSH je posle 6-8 nedelja. Što je nivo TSH veći na početku tretmana, to je vreme potrebno za normalizaciju nivoa TSH duže (267). U pomenutoj populaciji obolelih, kao i kod bolesnika sa poznatom bolešću srca, uvođenje LT4 je postepeno, obzirom da predstavljaju rizičnu populaciju. Početna doza kod tih bolesnika se preporučuje da bude 25µg ili  $\frac{1}{4}$  izračunate dnevne doze, sa postepenim povećavanjem doze nakon dvonedeljnih intervala, do uspostavljanja referentnih vrednosti TSH. Slično tome, kod bolesnika sa ishemijskom bolešću srca, takođe se preporučuje započinjanje lečenja malim dozama LT4 (12,5-25µg/dnevno), a potom se doza postepeno povećava svakih 6-8 nedelja do uspostavljanja eutireoidnog ranga TSH (50). Ukoliko se bolesnik žali na anginozne smetnje, ili na pogoršanje postojeće srčane bolesti, potrebno ga je vratiti na prethodnu dozu pod kojom nije imao smetnje još dve nedelje, pa potom postepeno povećavati dozu. U slučaju da se anginozne smetnje ponovo jave, potrebno je sprovesti kontrolu kardiologa u cilju eventualne dalje kardiološke evaluacije ili ostaviti bolesnika na dozi koju najbolje toleriše, najčešće uz pomoć beta blokatora. Ukoliko se konstatuje značajna KB, oboleli od hipotireoidizma mogu da se tretiraju invazivnim kardiološkim i/ili kardiohirurškim procedurama. Kod tih bolesnika, sprovođenje invazivnih kardioloških ili kardiohirurških procedura i intervencija nema veći rizik od KV mortaliteta u odnosu na eutireoidne osobe (268, 269). Bernštajn i sar. (270) su pokazali da postoji poremećaj koronarne vazodilatacije kod obolelih od H, sa dokazanim scintigrafskim defektima u regionalnoj miokardnoj perfuziji tokom napora kod četvoro od šestoro obolelih od kH bez koronarne bolesti. Iako se miokardna perfuzija normalizuje uspostavljanjem eutireoidniog stanja, autori smatraju potencijalno rizičnom kratkotrajnu kombinaciju povećane

miokardne potrošnje kiseonika i izmenjene kompenzatorne koronarne vazodilatacije na prilikom inicijacije tretmana LT4. Uz to, tranzicija koagulacionog statusa od hemoragijske dijateze kod kH, do hiperkoagulabilnosti kod skH, može dovesti do nastanka akutne tromboze i razvoja infarkta miokarda (108).

Puna dnevna doza LT4 može biti bezbedno primenjena mladim osobama obolelim od skH/kH, koji su bez poznate srčane bolesti (271, 272).

Za kontrolu kvaliteta supstitucije LT4 najčešće se određuje nivo TSH. Cilj supstitucione terapije LT4 je održavanje nivoa TSH u referentnom-eutireoidnom rang, a taj nivo je stvar rasprave. Prema pojedinim autorima, optimalan nivo TSH treba da iznosi 0,5-2,5mIU/ml, čime se izbegava i sub- i prekomerno doziranje (273, 274), dok po drugim gornja granica nivoa TSH za standardnu populaciju treba da iznosi 4,5-5,5mIU/ml (19).

Po uspostavljanju stabilnih vrednosti TSH, potrebne su kontrole na godišnjem nivou (267). Vanredne kontrole se sprovode u slučajevima sumnji na lošu komplijansu, kao i stanja ili bolesti koje utiču na metabolizam ili transport tiroksina u krvi (uvođenje novih lekova, nastanka trudnoće, pojave drugih bolesti). Pri svakoj kontroli, kliničar treba da ima na umu da je terapijska širina LT4 uska, kao i da se njegova doza isključivo individualno prilagođava (275, 276).

### **1.3.2. SkH i stavovi o započinjanju supstitucije LT4**

Dileme oko započinjanja lečenja LT4 kod kH nema. On se započinje odmah po dijagnostikovanju kH stanja (71).

Dva najčešća razloga za uvođenje LT4 obolelom od skH su: 1) terapija može sprečiti progresiju u kH (godišnja stopa progresije oko 5% obolelih); 2) terapija može smanjiti simptome hipotireoidizma, koji su reverzibilni kod oko 25% obolelih od skH (50, 59).

Konsenzus-konferencija o započinjanju lečenja skH preporučila je inicijaciju tretmana kod nivoa TSH  $\geq 10$ mIU/ml, prevashodno sa ciljem da se spreči prelazak u kH i smanji povišen rizik od KV morbiditeta i mortaliteta (42, 277, 278). Trebalo bi da se leči samo perzistentni skH (20). Odluka o započinjanju LT4 supstitucije kod obolelih od skH treba da bude individualizovana i da obuhvata celokupno stanje bolesnika. U odluci o započinjanju terapije kod starijih bolesnika, moraju se uzeti u obzir negativni efekti skH na funkciju leve komore, kao i



povećan rizik od ubrzane A i infarkta miokarda (47). Potencijalne koristi LT4 supstitucije mogu prevazići rizike od iste, ukoliko se ispoštuju procedure postepenog uvođenja LT4 i monitoring bolesnika u cilju održavanja TSH u referentnom opsegu (28).

Kod osoba kod kojih je nivo TSH 3-4,5mIU/ml postoji povećan rizik od transfera u kH. Stoga se oni periodično moraju kontrolisati određivanjem nivoa TSH, posebno ukoliko oboleli imaju pozitivna ATPO antitela (28).

Kod obolelih sa nivoom TSH 5-9mIU/ml, nema konsenzusa u smislu započinjanja terapije LT4. Takođe, i ovde odluka treba da bude individualizovana, uzimajući u obzir brojne aspekte obolelog. Cilj lečenja je normalizacija nivoa TSH u opsegu 1-2,5mIU/ml, posebno kod mladih i sredovečnih osoba (14, 20). Kod starijih bolesnika se procenjuje potreba za LT4 tretmanom. Postoje studije koje ne preporučuju supstituciju LT4 kod obolelih >60 godina života, jer još uvek nema dokaza da su ti bolesnici sa simptomatskom bolešću, kao i dokaza da primena LT4 poboljšava njihov kvalitet života (279, 280).

Tokom trudnoće, nivoi TSH >2,5mIU/ml u prvom trimestru odnosno 3,1-3,5mIU/ml tokom drugog trimestra, su verovatno posledica skH. Stoga bi trudnice trebalo tretirati ukoliko su nivoi TSH pri gornjim granicama normalnih vrednosti za žene koje nisu trudne. Korist supstitucije LT4 prevazilazi rizik od primene. Razlozi za tretman su potencijalne neželjene posledice po plod, nestabilan tok trudnoće, kao i težak porođaj. Lečenje treba započeti što ranije, u cilju normalizacije nivoa TSH (13). Žene koje su eutireoidne, a imaju pozitivna ATPO antitela, trebalo bi kontrolisati tokom trudnoće određivanjem nivoa TSH (28, 108, 281).

### **1.3.3. Uspostavljanje eutireoidnog stanja LT4 i uticaj na A**

Primena LT4 kod obolelih od skH je dovela do smanjenja nivoa holesterola u 11 od 13 studija, odnosno sniženje nivoa LDL-H u 7 od 9 studija. Promene u nivou HDL-H i triglicerida nisu dostigle statističku značajnost. Oboleli od skH sa nivoom ukupnog holesterola >6,2mmol/L, pokazuju njegovo veće smanjenje delovanjem LT4 (70). Pokazano je da redovna upotreba supstitucije LT4 smanjuje potrebu za primenom statina. Benefit od smanjenja ukupnog holesterola na KV morbiditet i mortalitet nije definitivno dokazan, posebno u podgrupama sa najvećom prevalencom skH (osobe >65 godina, naročito žene) (282).

Oboleli od skH, koji su tretirani LT4, imaju značajno manju progresiju nestabilnosti plaka u odnosu na one bez tretmana. Primena LT4 kod obolelih od skH negativno modulira najveći broj KV faktora rizika i utiče povoljno na funkciju endotela (283). Dokaz antiaterogenom i antioksidativnom uticaju LT4 je smanjenje broja makrofaga, T limfocita, kao i proinflamatornih HLA-DR ćelija u plaku, što sveukupno smanjuje inflamatorni potencijal hipotireoidizma (284).

Merenje brzine pulsog talasa je značajan surogat marker endotelne funkcije koronarnih krvnih sudova u smislu predikcije budućih srčanih događaja (285). Objašnjenje korisnog efekta LT4 na brzinu pulsog talasa je u boljoj biološkoj raspoloživosti NO, prevashodno u klinički važnim regijama, poput koronarnih i karotidnih arterija (286). Poboljšanje endotelne funkcije može se izraziti smanjenje KV morbiditeta i mortaliteta (287). Oboleli od skH, bez klinički manifeste vaskularne bolesti, primenom LT4 mogu poboljšati svoje rizične faktore, prevashodno u smislu gubitka u telesnoj težini, promena u lipidogramu, kao i poboljšanju endotelne funkcije (283).

U studiji Danesea i sar. (70) tretman LT4 kod obolelih od skH je doveo do umerenog, ali statistički značajnog, poboljšanja brojnih KV rizičnih faktora. Dokazano je značajno smanjenje nivoa ukupnog holesterola, LDL-H i ApoB, dok značajnih promena nije bilo u nivoima triglicerida, ApoA1 i HDL-H. Sniženje ukupnog holesterola je bilo veće kod nedovoljno supstituisanih bolesnika sa kH (prosečno sniženje ukupnog holesterola od 0,44mmol/L), nego kod de novo tretiranih sa skH (prosečno sniženje ukupnog holesterola 0,14mmol/L), kao i onih sa nivoom ukupnog holesterola >6,2mmol/L. Nivo ukupnog holesterola je prosečno smanjen za oko 0,2mmol/L, a LDL-H za oko 0,3mmol/l. Najveće sniženje je postignuto kod obolelih sa većim inicijalnim nivoom TSH i većim nivoom lipida pre tretmana.

U studiji Razvija i sar. (283) je pokazano da je porast fT4, iako u referentnom opsegu, bolji marker za procenu KV rizika nego sam nivo TSH, što ukazuje da nivo fT4 najbolje koreliše sa KV rizikom.

U studiji Monzaniya i sar. (77) smanjenje LDL-H uzrokovano LT4 supstitucijom kod obolelih od skH (TSH <10mIU/ml) je značajno u pogledu smanjenja KV rizika. Smanjenje ukupnog holesterola je iznosilo oko 10% u odnosu na bazalne vrednosti pre supstitucije LT4, dok je u slučaju LDL-H iznosilo oko 13%. Imajući u vidu da DIMK predstavlja marker rane A,

kao i da predstavlja sliku ispoljenosti generalizovane A, jasno je da redukcija u njenoj debljini uspostavljanjem eutireoidnog stanja značajno redukuje KV rizik. Nakon 6 meseci od uspostavljanja stabilnog eutireoidnog stanja, smanjenje DIMK je iznosilo oko 10% u odnosu na preterapijske vrednosti. Pored toga, postojala je značajna statistička veza između redukcije DIMK i smanjenja nivoa ukupnog i LDL-H. Redukcija DIMK karotidnih arterija je bila prisutna kako kod starijih ispitanika (>35 godina), tako i kod mlađih (<35 godina) sa skH. Međutim, prosečna DIMK lečenih od skH je postala ekvivalentna eutireoidnim kontrolama samo kod obolelih iz grupe <35 godina života, što potvrđuje značajan uticaj godina života na razvoj A (77, 288).

Nekoliko studija je pokazalo smanjenje nivoa Lp(a) pod terapijom LT4 (95, 96).

Nisu nađene korekcije nivoa homocisteina nakon supstitucijom uspostavljenog eutireoidizma kod obolelih od skH i kH, baš kao ni povišenih nivoa CRP (103).

Terapija LT4 kod obolelih od hipotireoidizma dovodi do normalizacije lipidnog profila, ali i delimičnog vraćanja poremećene endotel-zavisne vazodilatacije (44). LT4 u potpunosti redukuje KV abnormalnosti: poboljšava kontraktilnost miokarda, sistolnu i dijastolnu funkciju, uzrokuje smanjenje sistemske vaskularne rezistencije i tako smanjuje naknadno opterećenje. Oboleli od skH, a koji su pod supstitucionom terapijom, imaju značajno manji rizik od SI po Studiji kardiovaskularnog zdravlja (289), kao i značajno niži ukupni mortalitet u odnosu na netretirane bolesnike po Vikamskoj studiji (290). Snižavanje nivoa lipida se registruje pri primeni LT4 kod obolelih od skH (27, 291).

LT4 supstitucija popravljiva funkciju miokarda i smanjuje anginozne smetnje kod obolelih od hipotireoidizma (89). Takođe, može se javiti delimično ili potpuno povlačenje ventrikularnih poremećaja ritma po uspostavljanju eutireoidnog stanja pod efektom LT4 supstitucije (14, 27). Negativni efekti skH i kH na KV aparat mogu biti popravljivi delimično ili potpuno (292).

## **2. CILJEVI I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA**

### **2.1. Ciljevi**

Ciljevi ove doktorske disertacije su sledeći:

- Izmeriti koncentracije NO<sub>2</sub> u krvi pacijenata sa hipotireoidizmom i eutireoidnih kontrolnih pacijenata
- Utvrditi korelaciju između koncentracija TSH, fT<sub>4</sub> i NO<sub>2</sub> u krvi
- Pokazati uticaj supstitucione terapije LT<sub>4</sub> na koncentraciju NO<sub>2</sub> u krvi

### **2.2. Hipoteza**

Radna hipoteza predloženih istraživanja u okviru ove doktorske disertacije je da je povišena/snižena koncentracija NO<sub>2</sub> u krvi obolelih od primarnog hipotireoidizma pouzdan dodatni kriterijum za uvođenje supstitucione terapije LT<sub>4</sub>.

# 3. MATERIJAL I METODE

## 3.1. Protokol

Studija preseka je sprovedena u KBC Zemun, Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma i na Institutu za nuklearne nauke „Vinča“ - Laboratorija za molekularnu genetiku i radiobiologiju, tokom 2013.-2014. godine. U studiju su uključene 82 ispitanice, koje su ispunile osnovne biohemijske kriterijume (TSH i fT4), kao i da su bez tretmana LT4. Formirane se dve grupe, grupa sa primarnom hipotireozom sa ukupno 44 ispitanice [supkliničkom ( $3,40 < \text{TSH} < 10,00 \text{mIU/ml}$ ,  $f\text{T4 } 7,8-14,3 \text{pmol/L}$ )- 22 ispitanice i kliničkom ( $\text{TSH} > 10,00 \text{mIU/ml}$ ,  $f\text{T4} < 7,8 \text{pmol/L}$ )- 22 ispitanice], kao i kontrolna grupa sa 38 eutireoidnih ispitanica (TSH i fT4 u referentnom opsegu). Ekskluzioni kriterijumi su bili: jatrogena H, amiodaronom indukovana H, prisustvo hipertenzije [ $>140/90 \text{mm živinog (Hg) stuba}$ ], dijabetesa (glikemija  $>6,1 \text{mmol/L}$ ,  $\text{HbA1c} >6,5\%$ ) i gojaznosti ( $\text{BMI} >30 \text{kg/m}^2$ ), određena životna dob ( $<18$  i  $>70$  godina), inflamatorne i maligne bolesti, postojanje hronične bubrežne i/ili srčane slabosti, hronične dijareje, upotreba lekova (LT4 ili tireostatika, statina i/ili antitrombocitne terapije, kontraceptiva, digitalisa, betablokatora, steroida, ACE inhibitora, nitrata), kao i postojanje štetnih navika (pušenje i konzumacija alkohola).

S'obzirom da je pokazano da je nivo NO<sub>2</sub> posebno visok u pojedinim namirnicama, kao što su spanać, zelena salata i cvekla, tj. viši nego dnevna endogena produkcija NO<sub>3</sub> koju generišu sve tri NOS izoforme, ispitanicama koje su pristale na učestvovanje u studiji i potpisale informisani pristanak, je uručena pisana dijeta (202).

## 3.2. Određivanje biohemijskih parametara

U dijeti su naznačene namirnice koje je trebalo izbegavati najmanje 16 sati do momenta vađenja krvi. Na sledećoj ugovorenoj viziti, ujutru našte, ispitanicama je uzimana krv za određivanje nivoa TSH i fT4, glikemije, osnovnih lipida (ukupni holesterol, LDL-H, HDL-H i

TG), kao i koncentracije NO<sub>2</sub>. Nivo TSH (mIU/ml) i fT<sub>4</sub> (pmol/L) se određivao komercijalnim testovima na automatskim analizatorima *Access-2 "Beckman Coulter"*. Referentne vrednosti za TSH su 0,4-3,4mIU/ml, dok su za fT<sub>4</sub> 7,8-14,3pmol/L. Glikemija (mmol/L), kao i ukupni holesterol, HDL-H i nivo TG (sve u mmol/L) su određivani pomoću biohemijskog analajzera *DxC -800 "Beckman Coulter"*, dok su vrednosti LDL-H izračunate primenom Friedvaldove formule ( $LDL-H = \text{ukupni holesterol} - HDL-H - 0,45 * TG [mmol/L](293)$ ). Referentne vrednosti za glikemiju, ukupni holesterol, TG, HDL-H i LDL-H su 3,6-6,1, 3,6-5,1, <1,7, >1,1 i <3,2mmol/L. Nivo HbA<sub>1c</sub>, kao i nivo CRP su određivani turbidimetrijskom metodom na *DxC 800 "Beckman Coulter"* aparatu. Referentna vrednost za HbA<sub>1c</sub> (za nedijabetičare) je <6,5%, dok je za CRP <7,0mg/L.

### **3.3. Određivanje antropometrijskih parametara**

Ispitanicama je merena telesna težina (TT), telesna visina (TV), sistolni i dijastolni pritisak (s/dTA), a potom je računat indeks telesne mase (BMI; od engl. BodyMass Index). BMI je odnos TT u kg i kvadrata TV u m; TT i TV je merena vagom Metalija Subotica. S/dTA je meren istim manometrom (HS 201C1 Palm Type Sphygmomanometer Wenzhou Hongshun Industries and Trade Co.), a izražavan je u mm Hg stuba.

### **3.4. Izračunavanje indeksa metaboličkog opterećenja (IMO)**

U IMO, koji je formulisan autorski, ulaze sledeće četiri ispitivane varijable: BMI >25kg/m<sup>2</sup>, sTA ≥130mmHg ili dTA ≥90mmHg, HbA<sub>1c</sub> ≥5.7% i TG ≥1.7mmol/L. Prisustvo makar dve od ukupno četiri moguće varijable, smatrano je prisustvom povećanog kardiometaboličkog rizika u ispitivanoj populaciji.

### **3.5. Određivanje koncentracije NO<sub>2</sub>**

Određivanje koncentracije NO<sub>2</sub> u krvi svih ispitanika rađeno je inicijalno, kao i u grupi ispitanika sa hipotireozom po uspostavljanju eutireoidnog ranga TSH (prvo merenje TSH bilo je 3 meseca nakon uvođenja LT<sub>4</sub>, a potom na svaka 3 meseca do uspostavljanja laboratorijskog eutireoidizma). Uzeta krv u epruveti od 5ml se centrifugirala 15 minuta/3000 rpm, a potom se serum adekvatno transportovao do referentne laboratorije. Određivanje koncentracije NO<sub>2</sub> i NO<sub>3</sub>, kao stabilnih metabolita NO (NO<sub>x</sub>), koristilo se za indirektno merenje produkcije NO u

biološkim sistemima i podrazumeva dvostepenu reakciju. Prva reakcija je uključivala aktivnost nitratne reduktaze, a nakon nje je sledila Grisova reakcija (202, 294, 295). Odnos NO<sub>2</sub> i NO<sub>3</sub> je varijabilan i teško predvidljiv, te je njihova suma najbolji pokazatelj totalne produkcije NO. Da bi se detektovali kolorimetrijski, NO<sub>3</sub> je preveden u NO<sub>2</sub> pomoću koenzima NADP ili NADPH zavisne nitrat-reduktaze. Konvertovani NO<sub>2</sub> je kvantifikovan uz pomoć Grisovog reagensa, koji konvertuje NO<sub>2</sub> u purpurno (ljubičasto) azo jedinjenje sa maksimumom apsorpcije na 570nm. NADPH je neophodan kofaktor za nitrat-reduktazu, ali u višku interferira sa Grisovim reagensom i utiče na senzitivnost metode. Da bi se odstranio višak NADPH, neophodan je dodatni korak nakon redukcije NO<sub>3</sub>, koji podrazumeva reakciju NADPH sa L-glutamat dehidrogenazom i  $\alpha$ -ketoglutaratom radi oksidacije NADPH u NADP.

Esej za određivanje nivoa NO je rađen u mikrotitarskim polistirenskim pločama sa 96 bunarića. Uzorci seruma krvi ispitanica u zapremini od 100 $\mu$ l su inkubirani 3h na 37°C sa 15 $\mu$ l (30mU) nitrat-reduktaze u prisustvu 1 $\mu$ l 2,5 mM  $\beta$ -NADPH. NO<sub>3</sub> je redukovan do NO<sub>2</sub>, a višak  $\beta$ -NADPH je zatim bio oksidovan dodavanjem 2 $\mu$ l (100mU) L-glutamin dehidrogenaze, 1 $\mu$ l 0,4 mM  $\alpha$ -ketoglutarata i 12,5 $\mu$ l 2M amonijum sulfata, inkubiranjem 30 minuta na 37°C. Nakon redukcije, koncentracija NO<sub>2</sub> je određena mešanjem istih zapremina uzorka i Grisovog reagensa (mešavina 1:1, 0,1% rastvor naftil etilen diaminodihlorida u H<sub>2</sub>O i 1% rastvor sulfanilamida u 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> i 95% H<sub>2</sub>O) i inkubirana na sobnoj temperaturi 15 minuta. Absorbanca na 570nm je merena na automatskom čitaču za mikrotitarske ploče (*Sunrise basic, Tecan, Austrija*). Koncentracija NO<sub>3</sub> je određivana na osnovu standardne krive konstruisane na osnovu vrednosti absorbanci očitanih za seriju rastvora KNO<sub>3</sub> poznate koncentracije i izražavana u  $\mu$ mol/l.

Koncentracija NO<sub>2</sub> je određivana u Institutu „Vinča“, Univerziteta u Beogradu, u Laboratoriji za molekularnu genetiku i radiobiologiju (laboratorija Prof. dr Esme R. Isenović, naučnog savetnika).

### **3.6. Statistika**

Od metoda deskriptivne statistike korišćeni su relativni brojevi, mere centralne tendencije i mere varijabiliteta. Od mera centralne tendencije korišćena je aritmetička sredina i medijana, a od mera varijabiliteta standardna devijacija, interval i koeficijent varijacije.

Od metoda analitičke statistike korišćeni su testovi za procenu značajnosti povezanosti i razlike. Od testova za procenu značajnosti povezanosti korišćeni su Pearsonov test i Spearmanov test korelacije ranga, dok je za procenu značajnosti razlike korišćen  $\chi^2$  test u slučajevima kategorijskih podataka, odnosno Mann-Whitney test u slučajevima intervalnih podataka, koji ne slede normalnu distribuciju. U slučajevima gde je ispitivana značajnost razlike među tri grupe ispitanika, koristiće se jednofaktorska parametarska i neparametarska analiza varijanse (ANOVA i Kruskal-Wallis). Ispitivanje prediktivnosti antropometrijskih, biohemijskih i hormonskih varijabli za koncentraciju NO<sub>2</sub> određivano je multivarijantnom linearnom regresionom analizom.

Nivo statističke značajnosti je 0,05. Dobijeni podaci i rezultati su prikazivani tabelarno i grafički, shodno karakteristikama varijabli, a analizirani su upotrebom statističkog paketa SPSS for Windows 18.0.



## 4. REZULTATI

### 4.1. Antropometrijski i klinički parametri u ispitivanoj populaciji

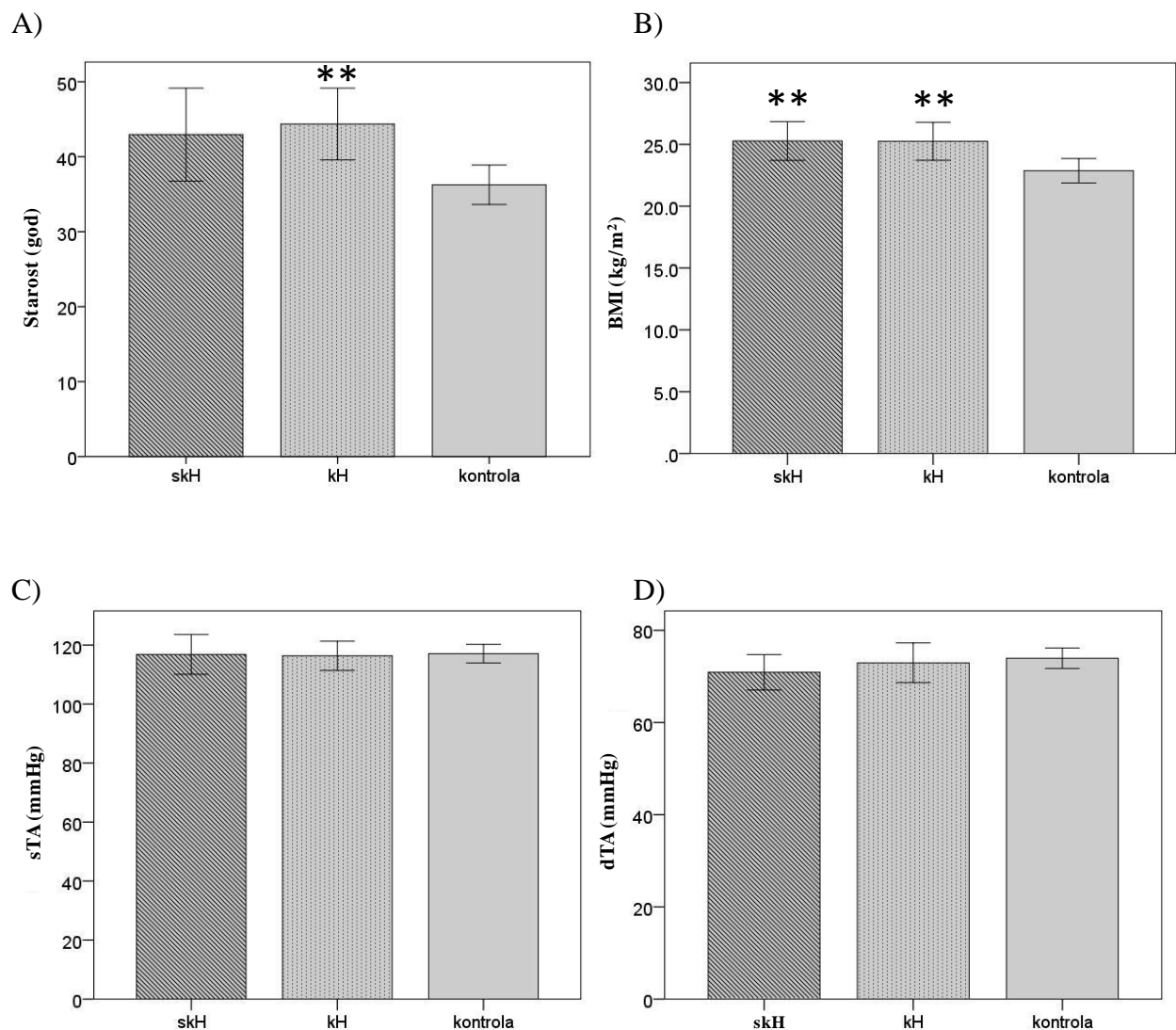
U Tabeli 1 su prikazani rezultati antropometrijskih i kliničkih parametara prema ispitivanim grupama. Uočena je statistički značajna razlika u prosečnoj starosti između ispitivanih grupa ( $p=0,007$ ); ispitanice u kontrolnoj grupi su mlađe od ispitanica sa kH ( $36,3\pm 8,0$  vs  $44,4\pm 10,8$ ) (Grafikon 1). Takođe, uočena je statistički značajna razlika u prosečnoj vrednosti BMI između ispitivanih grupa ( $p=0,006$ ); vrednosti BMI u skH i kH grupi su statistički značajno više u poređenju sa BMI vrednostima kontrolne grupe (Grafikon 1). Dobijeni rezultati pokazuju da nema statistički značajne razlike između grupa u vrednostima za sTA i dTA (Grafikon 1).

**Tabela 1.** Antropometrijske i kliničke karakteristike ispitanica sa skH, kH i kontrolne grupe

Varijabla <sup>†</sup>	skH (n=22)	kH (n=22)	Kontrola (n=38)	p	Međugrupne razlike
Starost, god	43,0±14,0	44,4±10,8	36,3±8,0	0,007	kH-K
BMI, kg/m <sup>2</sup>	25,3±3,5	25,3±3,5	22,9±3,0	0,006	skH-K; kH-K
sTA, mmHg	116,8±15,2	116,4±11,1	117,1±9,6	0,967	/
dTA, mmHg	70,9±8,7	73,0±9,7	73,9±6,8	0,385	/

<sup>†</sup>Podaci su predstavljeni kao aritmetička sredina±standardna devijacija

**Grafikon 1.** Antropometrijske (A, B) i kliničke karakteristike (C, D) ispitanica sa skH, kH i kontrolne grupe. Starost (A), BMI (B), kao i s/d TA (C, D) su izmerene kod ispitanica iz skH, kH i kontrolne grupe. Vrednosti dobijene za starost su prikazane u godinama, za BMI u  $\text{kg}/\text{m}^2$ , a za s/dTA u mmHg;  $p < 0,01$  za starost između kH i kontrola,  $p < 0,01$  za BMI između kH i kontrola kao i između skH i kontrola.



## 4.2. Biohemijski parametri u ispitivanoj populaciji

### 4.2.1. Parametri glukozne i lipidne homeostaze u ispitivanoj populaciji

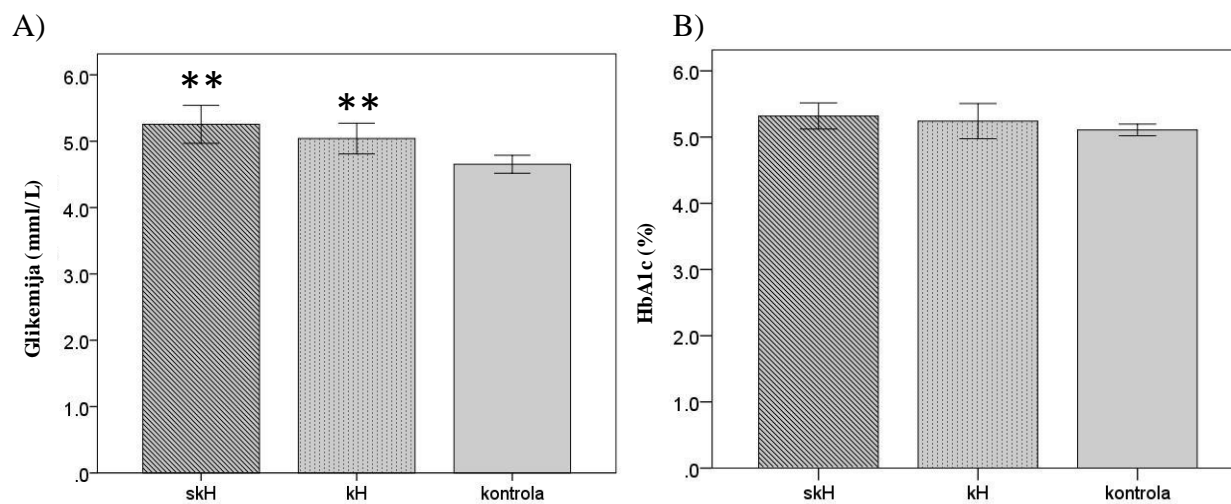
Rezultati analize prikazane u Tabeli 2 su proizašli iz merenja biohemijskih parametara, kako u grupi skH i kH, tako i u kontrolnih ispitanica. Statistički značajna razlika je uočena za nivo glikemije ( $p < 0,001$ ), holesterola ( $p = 0,005$ ), HDL-H ( $p < 0,001$ ) i LDL-H ( $p < 0,001$ ), dok se nivoi HbA1c i TG statistički značajno ne razlikuju između ispitivanih grupa ( $p > 0,05$  za oba). Dobijeni rezultati pokazuju da je nivo glukoze statistički značajno viši u grupi skH i kH u poređenju sa kontrolnim ispitanicima (Grafikon 2). Takođe, u kH su izmerene statistički značajno više vrednosti holesterola u odnosu na kontrolnu grupu; vrednosti LDL-H su bile značajno više i u grupi skH i kH u odnosu na kontrolnu grupu, dok je nivo HDL-H bio značajno niži kod ispitanica sa skH i kH u poređenju sa kontrolnim ispitanicima (Grafikon 3).

**Tabela 2.** Biohemijske karakteristike ispitanica sa skH, kH i kontrolne grupe

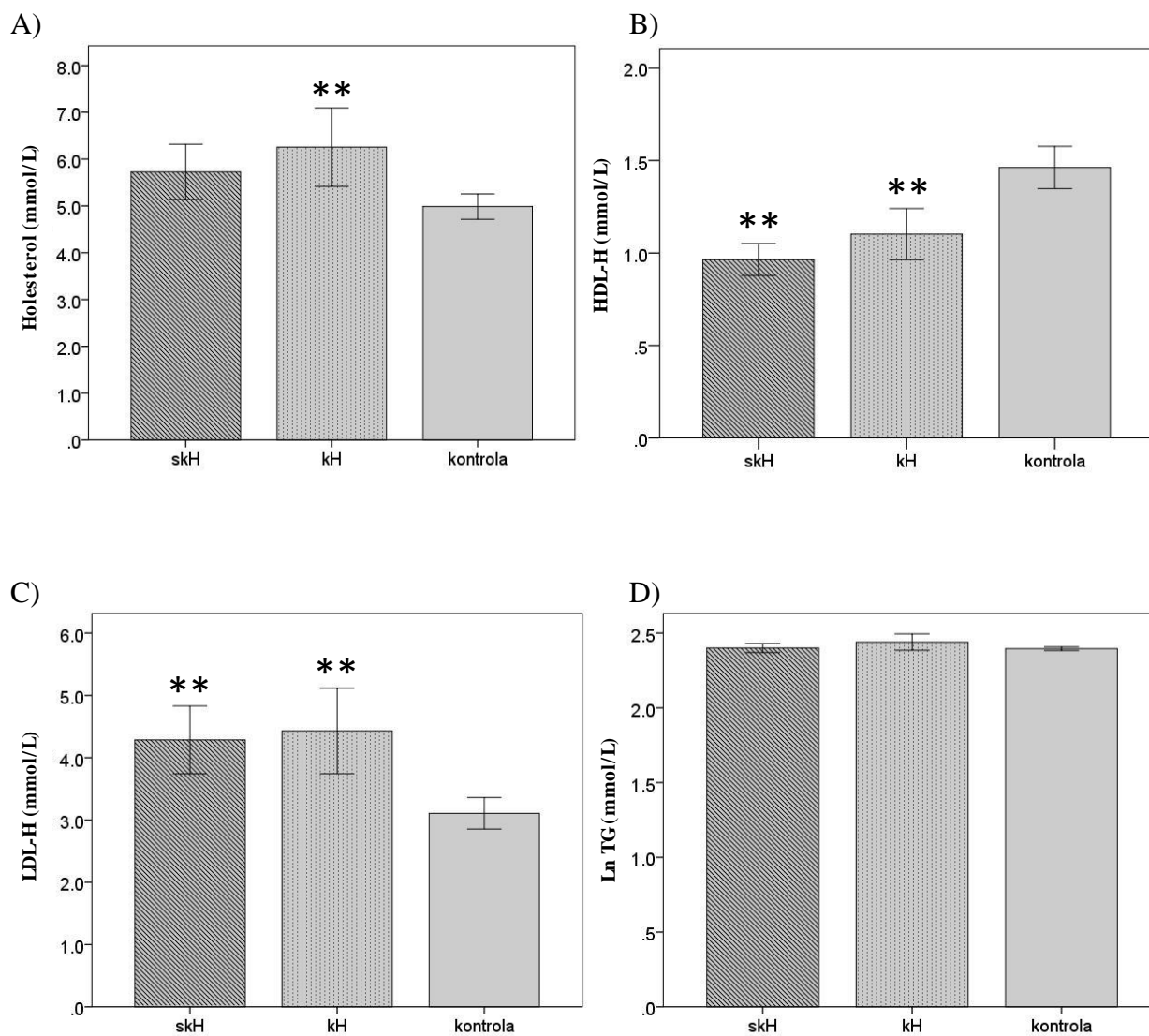
Varijabla <sup>†</sup>	skH (n=22)	kH (n=22)	Kontrola (n=38)	P	Međugrupne razlike
Glikemija, mmol/L	5,3±0,6	5,0±0,5	4,7±0,4	<0,001	skH-K; kH-K
HbA1c, %	5,3±0,4	5,2±0,6	5,1±0,3	0,121	/
Holesterol, mmol/L	5,7±1,3	6,3±1,9	5,0±0,8	0,005	kH-K
HDL-H, mmol/L	1,0±0,2	1,1±0,3	1,5±0,3	<0,001	skH-K; kH-K
LDL-H, mmol/L	4,3±1,2	4,4±1,5	3,1±0,8	<0,001	skH-K; kH-K
Ln TG, mmol/L	2,40±0,07	2,44±0,12	2,40±0,04	0,291	/
antiLn TG, mmol/L	1,02	1,47	1,02		

<sup>†</sup>Podaci su predstavljeni kao aritmetička sredina±standardna devijacija

**Grafikon 2.** Glikemija i HbA1c u krvi kod ispitanica iz skH, kH i kontrolne grupe. Glikemija (A) i HbA1c (B) su izmereni kod ispitanica iz skH, kH i kontrolne grupe. Vrednosti dobijene za glikemiju su prikazane u mmol/L, za HbA1cu %;  $p < 0,01$  za glikemiju između kH i kontrola kao i između skH i kontrola.



**Grafikon 3.** Lipidi u krvi kod ispitanica sa skH, kH i kontrolne grupe. Holesterol (A), HDL-H (B), LDL-H (C) i TG (D) su izmereni kod ispitanica iz skH, kH i kontrolne grupe. Sve vrednosti su prikazane u mmol/L;  $p < 0,01$  za holesterol između kH i kontrola,  $p < 0,01$  za HDL-H i LDL-H između kH i kontrola, kao i između skH i kontrola.



#### 4.2.2. Hormonski parametri u ispitivanoj populaciji

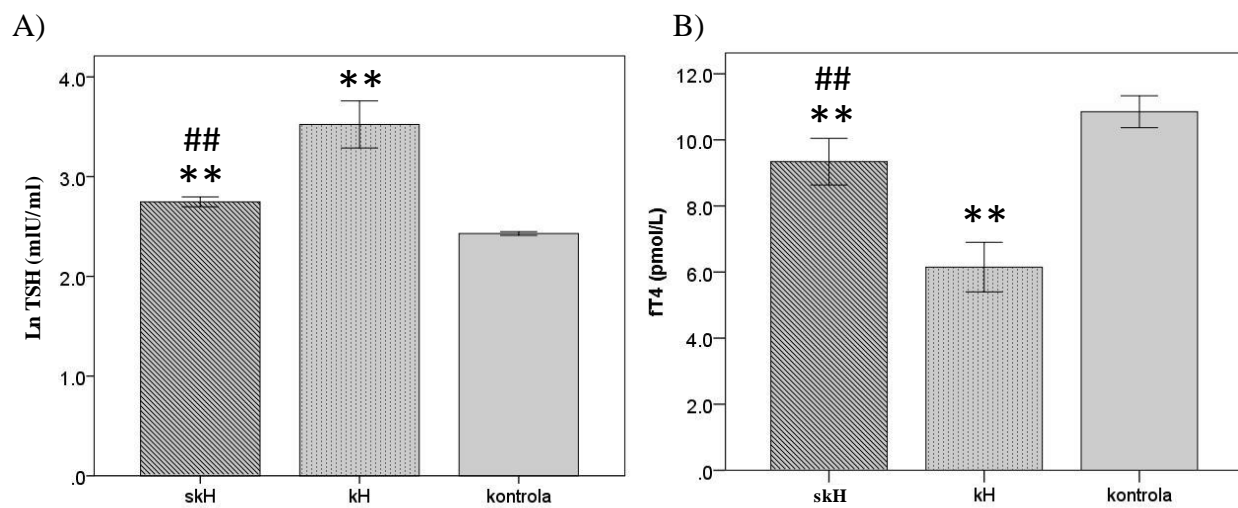
Izmerene vrednosti nivoa TSH i fT4 (Tabela 3) pokazuju da se nivoi oba hormona statistički značajno razlikuju između ispitivanih grupa ( $p < 0,001$ ). Nivo TSH je statistički značajno viši, dok je nivo fT4 statistički značajno niži kod ispitanica u grupi skH i kH u poređenju sa ispitanicima iz kontrolne grupe. Takođe, nivo TSH je statistički značajno viši, dok je nivo fT4 statistički značajno niži kod ispitanica u grupi kH u poređenju sa grupom skH (Grafikon 4).

**Tabela 3.** Nivo TSH i fT4 kod ispitanica sa skH, kH i kontrolne grupe

Varijabla <sup>†</sup>	skH (n=22)	kH (n=22)	Kontrola (n=38)	p	Međugrupne razlike
Ln TSH, mIU/ml	2,75±0,11	3,52±0,53	2,43±0,06	<0,001	skH-K; kH-K; skH-kH
antiLn TSH, mIU/ml	5,6	23,8	1,4		
fT4, pmol/L	9,3±1,5	6,1±1,7	10,9±1,2	<0,001	skH-K; kH-K; skH-kH

<sup>†</sup>Podaci su predstavljeni kao aritmetička sredina±standardna devijacija

**Grafikon 4.** TSH i fT4 kod ispitanica iz skH, kH i kontrolne grupe. Nivo TSH (A) i fT4 (B) su izmereni kod ispitanica sa skH, kH i kontrolne grupe. Vrednosti TSH su prikazane u mIU/ml, dok su vrednosti za fT4 prikazane u pmol/L;  $p < 0,01$  za TSH i fT4 između kH i skH, između kH i kontrola, kao i između skH i kontrola.



#### 4.2.3. Markeri inflamacije, NO<sub>2</sub> i CRP, u ispitivanoj populaciji

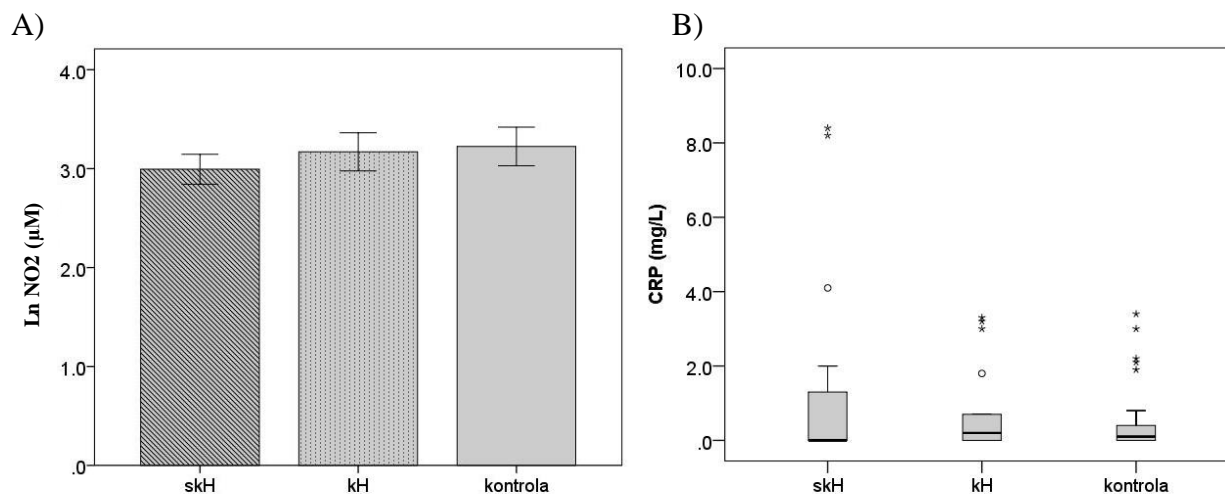
U daljem radu smo želeli da ispitamo da li stanje skH i kH dovodi do izmena posmatranih biomarkera inflamacije, koncentracije NO<sub>2</sub> i nivoa CRP. Dobijeni rezultati (Tabela 4) pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u koncentracijama NO<sub>2</sub> i u nivoima izmerenog CRP između ispitivanih grupa ( $p > 0,05$ ) (Grafikon 5).

**Tabela 4.** Markeri inflamacije (NO<sub>2</sub> i CRP) kod ispitanica sa skH, kH i kontrolne grupe

Varijabla <sup>†</sup>	skH (n=22)	kH (n=22)	Kontrola (n=38)	p	Međugrupne razlike
Ln NO <sub>2</sub> , μM <sup>†</sup>	2,99±0,34	3,17±0,44	3,22±0,59	0,128	/
antiLn NO <sub>2</sub> , μM <sup>†</sup>	5,6	13,8	15,0		
CRP, mg/L <sup>††</sup>	0 (1,33)	0,2(0,7)	0,1 (0,4)	0,902	/

<sup>†</sup>Podaci su predstavljeni kao aritmetička sredina±standardna devijacija; <sup>††</sup> Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni opseg)

**Grafikon 5.** NO<sub>2</sub> i CRP kod ispitanica iz skH, kH i kontrolne grupe. Markeri inflamacije, NO<sub>2</sub> (A) i CRP (B), su izmereni kod ispitanica sa skH, kH i kontrolne grupe. Vrednosti NO<sub>2</sub> su prikazane u μM, dok su vrednosti za CRP prikazane u mg/L.





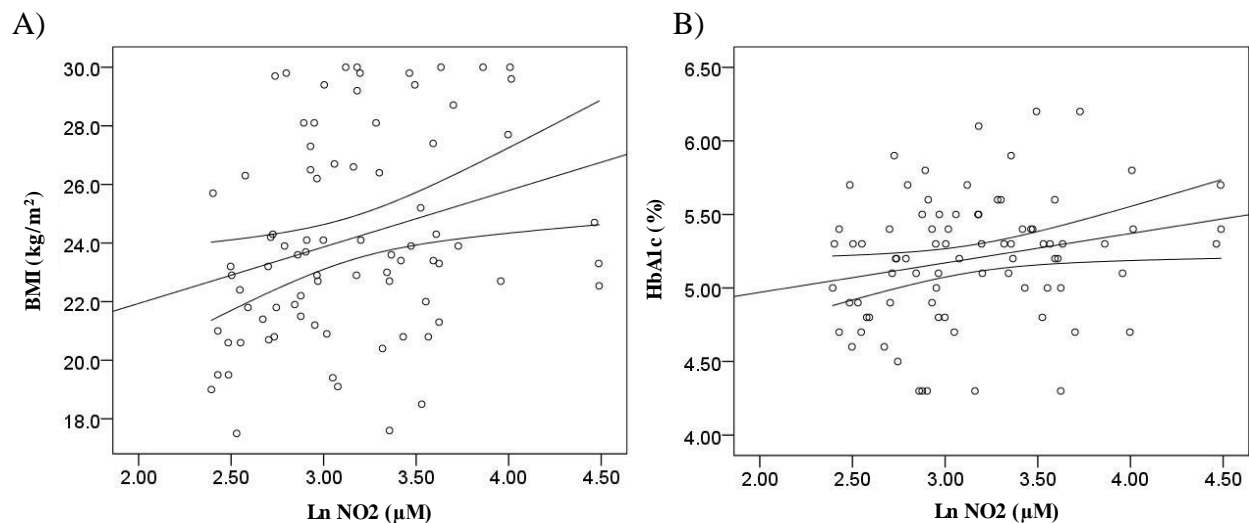
### 4.3. Korelacija koncentracije NO<sub>2</sub> sa antropometrijskim, hormonskim i lipidnim parametrima u ispitivanoj populaciji

Analizom korelacija koncentracija NO<sub>2</sub> sa antropometrijskim, hormonskim i lipidnim parametrima, prikazanom u Tabeli 5, zapaža se statistički značajna korelacija koncentracija NO<sub>2</sub> sa BMI ( $p=0,011$ ), nivoom HbA1c ( $p=0,036$ ), kao i nivoom TG ( $p<0,001$ ) (Grafikon 6).

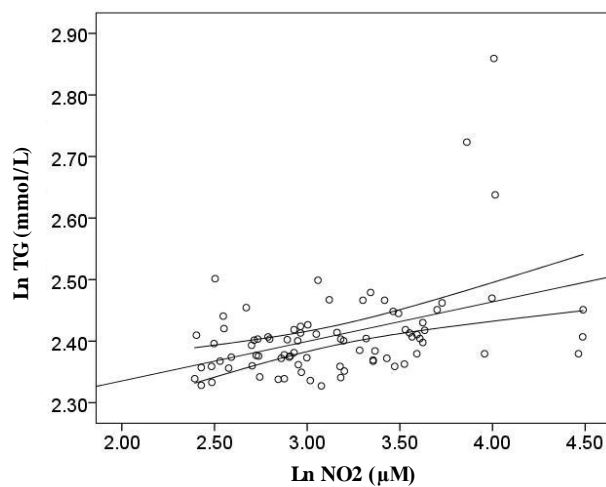
**Tabela 5.** Korelacija koncentracija NO<sub>2</sub> (Ln) sa antropometrijskim, biohemijskim i hormonskim karakteristikama u ispitivanoj populaciji

Varijabla	r	p
BMI, kg/m <sup>2</sup>	0,279	0,011
HbA1c, %	0,232	0,036
LnTG, mmol/L	0,409	<0,001

**Grafikon 6.** Korelacija koncentracija NO<sub>2</sub> sa antropometrijskim, biohemijskim i hormonskim karakteristikama u ispitivanoj populaciji



C)



Multivarijantna linearna regresija antropometrijskih, biohemijskih i hormonalnih prediktora NO<sub>2</sub> u ispitivanoj populaciji prikazana je u Tabeli 6. Jedini nezavisni prediktor koncentracije NO<sub>2</sub> u ispitivanoj populaciji je vrednost TG (p<0,001).

**Tabela 6.** Multivarijantna linearna regresija antropometrijskih, biohemijskih i hormonalnih prediktora NO<sub>2</sub> u ispitivanoj populaciji

<b>Varijabla</b>	<b>b</b>	<b>SE</b>	<b>p</b>
BMI, kg/m <sup>2</sup>	-0,010	0,016	0,545
HbA1c, %	0,042	0,114	0,714
LnTG, mmol/L	3,671	0,697	<0,001
LnTSH, mlU/ml	-0,112	0,169	0,510
fT4, pmol/L	0,056	0,039	0,156

#### 4.4. IMO kod skH, kH i kontrolnih ispitanica

S'obzirom da je pronađena povezanost koncentracije NO<sub>2</sub> sa tzv. markerima metaboličkog rizika (BMI, HbA1c i TG), analizirana je zastupljenost metaboličkog rizika definisanog kroz IMO u ispitivanoj populaciji i prikazana je Tabelom 7.

**Tabela 7.** Zastupljenost metaboličkog rizika definisanog kroz IMO u ispitivanoj populaciji

IMO <sup>†</sup>	skH (n=22)	kH (n=22)	Kontrola (n=38)	p	Medugrupne razlike
Odsutan	14 (63,6%)	13 (59,1%)	34 (89,5%)	<0,001	skH-K; kH-K
Prisutan	8 (36,4%)	9 (40,9%)	4 (10,5%)		

IMO, indeks metaboličkog opterećenja; <sup>†</sup>Podaci su predstavljeni kao n(%)

U Tabeli 8 su prikazane koncentracije NO<sub>2</sub> kod ispitanica sa i bez metaboličkog rizika. Nađena je statistički značajna razlika u koncentraciji NO<sub>2</sub> kod ispitanica sa i bez metaboličkog rizika- ispitanice sa metaboličkim rizikom imale su značajno više koncentracije NO<sub>2</sub> (p=0,01).

**Tabela 8.** Marker inflamacije NO<sub>2</sub> kod ispitanica sa i bez metaboličkog rizika

Varijabla <sup>†</sup>	Bez MR	MR	p
	(n=61)	(n=21)	
Ln NO <sub>2</sub> , μM	3,07±0,51	3,39±0,39	0,01
antiLn NO <sub>2</sub> , μM	11,5	19,7	

MR, metabolički rizik; <sup>††</sup>Podaci su predstavljeni kao aritmetička sredina±standardna devijacija

S'obzirom na to da je prethodnim analizama utvrđena veza koncentracije NO<sub>2</sub> sa prisustvom metaboličkog rizika definisanim kroz IMO, u cilju dalje analize koncentracije NO<sub>2</sub> u ispitivanoj populaciji vršeno je prilagođavanje vrednosti NO<sub>2</sub> za IMO i starost populacije (tj. za

varijable po kojima se ispitivane grupe razlikuju). U Tabeli 9 prikazani su rezultati ove analize, koji ukazuju na postojanje statistički značajne razlike u koncentracijama NO<sub>2</sub> između ispitanica obolelih od hipotireoze (skH i kH) i zdravih ispitanica (p=0,021).

**Tabela 9.** Marker inflamacije NO<sub>2</sub> kod ispitanica sa skH, kH i kontrolne grupe

Varijabla†	skH/kH		kontrola		p
	prosek	95% IP za prosek	prosek	95% IP za prosek	
Ln NO <sub>2</sub> , μM	3,018	2,865-3,171	3,299	3,133-3,464	0,021
antiLn NO <sub>2</sub> , μM	10,4	7,5-13,8	17,1	12,9-21,9	

† vrednosti su prilagođene za starost i IMO

#### 4.5. Dužina primene i nedeljna doza LT4 kojom je uspostavljen laboratorijski eutireoidizam

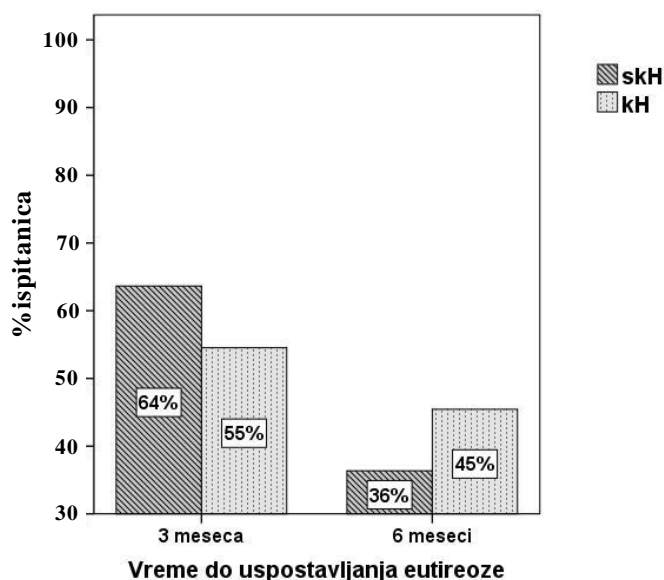
Medijana primene LT4 do uspostavljanja eutireoidnog ranga TSH je 3 meseca u obe grupe i statistički se nije razlikovala (p>0,05) (Tabela 10 i Grafikon 7). Medijana nedeljne doze LT4 je 175μg u skH grupi, odnosno 525μg u grupi kH i statistički se razlikovala (p<0,001) (Tabela 10).

**Tabela 10.** Dužina primene i nedeljna doza LT4 kojom je uspostavljen laboratorijski eutireoidizam

Varijabla†	skH		kH		p
	medijana	min-max	medijana	min-max	
Dužina primene, mes	3	3-6	3	3-6	0,544
Nedeljna doza, μg	175	175-525	525	225-875	<0,001

† Podaci su predstavljeni kao medijana (interkvartilni opseg)

**Grafikon 7.** Prikaz broja tretiranih ispitanica po grupama u odnosu na period do uspostavljanja eutireoze



## 4.6. Efekat LT4 na nivo TSH i NO2 u populaciji tretiranih

### 4.6.1. Efekat LT4 na nivo TSH i NO2 u populaciji skH

Tabelom 11 prikazani su nivoi TSH i koncentracije NO2 pre, kao i nakon uspostavljenog eutireoidizma primenom LT4 u grupi skH. Nivo TSH je statistički značajno niži ( $p < 0,001$ ), dok se koncentracija NO2 nije statistički značajno razlikovala ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 11.** Nivoi TSH i koncentracije NO2 pre i nakon terapije LT4 u grupi skH

Varijabla <sup>†</sup>	Pre terapije	Nakon terapije	p
Ln TSH, mIU/ml	2,75±0,11	2,52±0,07	<0,001
antLn TSH, mIU/ml	5,6	2,4	
Ln NO2, μM	2,99±0,34	2,95±0,41	0,725
antiLn NO2, μM	9,9	9,1	

<sup>†</sup>Podaci su predstavljeni kao aritmetička sredina±standardna devijacija

#### 4.6.2. Efekat LT4 na nivo TSH i koncentracije NO2 u populaciji kH

Tabelom 12 prikazani su nivoi TSH i NO2 pre, kao i nakon uspostavljenog eutireoidizma primenom LT4 u grupi kH. Nivo TSH je statistički značajno niži ( $p < 0,001$ ), dok se koncentracija NO2 nije statistički značajno razlikovala ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 12.** Nivoi TSH i koncentracije NO2 pre i nakon terapije LT4 u grupi kH

Varijabla <sup>†</sup>	Pre terapije	Nakon terapije	p
Ln TSH, mIU/ml	3,52±0,53	2,50±0,09	<0,001
antLn TSH, mIU/ml	23,8	2,2	
Ln NO2, μM	3,17±0,44	3,28±0,43	0,242
antiLn NO2, μM	13,8	19,4	

<sup>†</sup>Podaci su predstavljeni kao aritmetička sredina±standardna devijacija

## 5. DISKUSIJA

Ova doktorska disertacija zasnovana je na hipotezi da je povišena/snižena koncentracija NO<sub>2</sub> u krvi obolelih od primarne H, kao NO metabolita (NO<sub>x</sub>), pouzdan dodatni kriterijum za uvođenje supstitucione terapije LT<sub>4</sub>.

U ovoj doktorskoj disertaciji sprovedena je studija preseka, kojom su obuhvaćene 82 ispitanice, podeljene u 3 grupe (skH, kH i eutireoidna kontrola), kod kojih je određivan inicijalni nivo NO<sub>2</sub>, a nakon primene LT<sub>4</sub> i uspostavljanja eutireoidnog ranga TSH, i kontrolni nivo NO<sub>2</sub>. Prosečne inicijalne koncentracije NO<sub>2</sub> u ispitivanoj populaciji su iznosile 16,69±16,32 (0,95-71,00) μM. Najniže koncentracije NO<sub>2</sub> se registruju u skH grupi, a najviše u kontrolnoj eutireoidnoj grupi. Izmerene koncentracije NO<sub>2</sub>, kao NO<sub>x</sub>, se nalaze u predloženom referentnom opsegu za adulte, odnosno adultne osobe ženskog pola. U okviru studije nije zabeležen uticaj TSH i fT<sub>4</sub> na koncentracije NO<sub>2</sub>, pri čemu je uočena pozitivna korelacija inicijalnih koncentracija NO<sub>2</sub> sa nivoima TG među grupama ispitanica. Kontrolne koncentracije NO<sub>2</sub> po uspostavljanju laboratorijskog eutireoidizma indukovano primenom LT<sub>4</sub> (medijana primene LT<sub>4</sub> je 3 meseca) su u normalnom rasponu vrednosti za pomenute referentne populacije – 14,99±11,93 (0,76-50,46) μM i nisu se razlikovale od prosečnih inicijalnih koncentracija NO<sub>2</sub>.

NO je plejotropni ćelijski signalni molekul, sintetisan iz aminokiseline L-arginina od strane enzima NOS klase, koje postoje u tri izoforme: eNOS, iNOS, nNOS. NO, sintetisan u endotelnim ćelijama, odgovoran je za relaksaciju glatkih mišića KS, tako što difundujući preko sloja endotelnih ćelija ulazi u glatke mišićne ćelije, gde stimulacijom guanilat ciklaznog puta, dovodi do vazodilatacije (296).

Na eksperimentalnim životinjskim modelima je pokazano da tireoidni status utiče na ekspresiju i eNOS i nNOS izoformi, kao i na odgovor na NO (297). Na modelu glodara je dokazan uticaj produkcije NO na aktivnost hipotalamo-hipofizno-tireoidne osovine (298). Takođe, postoje studije kojima je pokazana smanjena produkcija NO kod obolelih od hipertireoze (299), ali i skH i kH (107, 299). Vicinanza i aut. su objavili da endotelna produkcija

NO u stanjima hipotireoidizma može biti redukovana zbog inhibicije proizvodnje NO posredovane negenomskim efektima tireoidnih hormona (300). Isti autori dalje navode da bi produkcija NO mogla biti inhibirana usled rezistencija na T3 (300).

Tireoidni hormoni imaju značajan uticaj na sintezu, mobilizaciju i metabolizam lipida (43). Klinički hipotireoidizam je povezan sa abnormalnostima u metabolizmu masti i sa povećanim rizikom od KVB, što se pripisuje povišenom ukupnom holesterolu i LDL-H (301). Takođe, veliki broj studija je ukazao na značajno povišene nivoe ukupnog holesterola, LDL-H i TG kod obolelih od skH (302-304).

U *in vitro* istraživanjima je pokazan inhibitorni uticaj tiroksina na oksidaciju LDL-H, što bi moglo ukazivati na veću prijemčivost LDL-H za oksidaciju u uslovima manjka tiroksina (305). Mala frakcija tiroksina (oko 3%) je vezana za lipoproteine plazme tokom njegovog transporta. Tiroksin-LDL kompleks se prepoznaje od LDL receptora i upravo postojanje te veze može protektovati LDL od oksidacije (306).

Hipotireoidizam je klinički sindrom uzrokovan deficijencijom tireoidnih hormona zbog smanjene produkcije, poremećene distribucije ili izostanka njihovog efekata (307, 308). Hipotireoidizam se potvrđuje povišenim nivoom TSH, a patofiziološki hipotireoidizam se odlikuje usporavanjem metaboličkih procesa (309). Najčešći vid supstitucione terapije kod hipotireoidizma je primena sintetičkog tiroksina, poznatog kao LT<sub>4</sub>, kojim se postiže supresija povišenog TSH. Postoji mišljenje da LT<sub>4</sub> supstituciona terapija ima svoje prednosti, ali takođe postoje i mišljenja koja ukazuju na nepovoljne efekte LT<sub>4</sub> supstitucione terapije (19, 274, 310).

Prema težini kliničke slike, hipotireoidizam se deli na jasan ili klinički i blag ili supklinički. SkH se karakteriše normalnim nivoima perifernih tireoidnih hormona, sa blago povišenim nivoima TSH, sa ili bez kliničkih simptoma (311-313). Nadalje, skH se može podeliti u dve kategorije, zavisno od nivoa TSH, pri čemu se skH sa nivoima TSH <10mIU/mL smatra blažom, a skH sa nivoima TSH >10mIU/ml težom formom skH (19, 276).

Vodeći uzrok morbiditeta i mortaliteta u savremenom svetu je A. Ona može uzrokovati IBS, moždani udar ili distalnu angiopatiju manifestovanu kao intermitentna klaudikacija ili, u najtežem slučaju, gangrena (314-316). Aterosklerotske lezije se najčešće razvijaju na mestima



grananja arterijskih KS, gde su promene protoka i prisustvo turbulencija najizraženije. U najvećem broju slučajeva, pre kliničkog ispoljavanja ovih poremećaja, postoji dug period klinički neme, ali progresivne koronarne A. Faktori rizika za nastanak A uključuju insulinsku rezistenciju, dislipidemiju, centralni i visceralni tip gojaznosti, hipertenziju, ED, pušenje i fizičku neaktivnost. Hipotireoidizam je povezan sa faktorima metaboličkog sindroma kao što su: dislipidemija, hipertenzija, gojaznost i često insulinska rezistencija. Svi ovi faktori direktno doprinose ubrzanju nastanka ateroskleroze (317). Neke studije pokazuju vezu između hipotireoidizma i IBS, bez obzira na uzrast, sTA, BMI i ukupan holesterol (6), dok neke ne ukazuju na postojanje povezanosti između povišenog TSH i KVB (67).

Hipotireoidizam je jedan od najčešćih uzroka sekundarne dislipidemije (318). Pokazano da je oko 95% novodijagnostikovanih pacijenata sa hipotireoidizmom imalo hiperholesterolemiju, dok je oko 5% imalo hipertrigliceridemiju (70, 319-321). Hipotireoidizam dovodi do smanjenja ekspresije LDL receptora na fibroblastima i hepatocitima i sledstveno smanjenog preuzimanja LDL-H, što vodi ka porastu nivoa LDL-H (70, 320).

Odnos između hipotireoidizma i A je nedvosmisleno potvrđen (47, 322, 323). Razumevanje efekata hipotireoidizma na morfološke i hemodinamske parametre funkcionalnog statusa KS, kao indikatora pojave rane A, je od velikog je značaja u smislu pravovremenog uvođenja supstitucione terapije LT4.

***Promena antropometrijskih i kliničkih parametara u stanjima skH i kH.*** Pandemija dijabetesa je usloвила intenziviranje istraživanja veze između tireoidnih hormona i TT, obzirom da je poznato da tireoidni hormoni imaju važnu ulogu u energetskej homoeostazi. Shodno tome, poremećaj energetske ravnoteže uzrokovan tireoidnim hormonima, može biti jedno od potencijalnih objašnjenja za razumevanje nastanka gojaznosti (324). Rezultati naših merenja antropometrijskih i kliničkih parametara pokazuju postojanje statistički značajne razlike u prosečnoj vrednosti BMI između ispitivanih grupa; vrednosti BMI u skH i kH grupi su statistički značajno više u poređenju sa BMI vrednostima kontrolne grupe. Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima iz literature, koji pokazuju da je prevalenca skH kod žena sa centralnim tipom gojaznosti 20,5% u odnosu na 5,2% žena sa normalnim obimom struka (324). Takođe, oba

stanja, i skH i kH, su povezana sa promenama u TT i telesnom sastavu, telesnoj temperaturi, ukupnoj i potrošnji energije nezavisno od fizičke aktivnosti (325).

Naši rezultati dobijeni za nivo TSH pokazuju da je on statistički značajno viši, dok je nivo fT4 statistički značajno niži kod ispitanica u grupi skH i kH u poređenju sa onima iz kontrolne grupe. Takođe, nivo TSH je statistički značajno viši, dok je nivo fT4 statistički značajno niži kod ispitanica u grupi kH u poređenju sa grupom skH. Dobijeni rezultati ukazuju na korelaciju između nivoa TSH i gojaznosti kod skH i kH ispitanica, što može biti rezultat promena u aktivnosti tireoidnih hormona i/ili rezultat promena u funkcionisanju hipotalmo-hipofizno-tireoidne osovine. Ova hipoteza postaje verodostojna, obzirom da je TSH receptor ekspimiran u masnom tkivu (326). Pokazano je da cirkulišući citokini povezani sa metaboličkim sindromom, mogu suprimirati tireoidnu funkciju na bilo kom nivou: hipotalamičnom ili hipofiznom ili tireoidnom (327). Najprikladniji doprinoseći faktor je poremećena hipotalo-hipofizno-tireoidna osovina u populaciji gojaznih, s'obzirom da se direktna veza između TSH i gojaznosti konzistentno spominje, ali i da ima suprotnih podataka u literaturi (328).

Neke studije su ukazale na niske nivoe T3 i T4 kod osoba sa većom TT, dok su drugi autori našli postojanje direktne veze između slobodnog T3 i gojaznosti, što ukazuje na postojanje niza faktora koji utiču na slobodne nivoe T3 kod gojaznih osoba. Ovi faktori mogu varirati kod različitih osoba iste TT i telesnog sastava, iste etiologije tireoidopatije, unosa joda i sl. Druga pretpostavka za objašnjenje korelacije između nivoa TSH i gojaznosti je narušavanje neuroendokrine homeostaze, koja kod gojaznih osoba može dovesti do povišenih koncentracija TSH. Naime, dejodinaza 2, kao najvažnija dejodinaza u hipofizi, ima ulogu u kontroli sekrecije TSH pod efektom T3. Kod gojaznih osoba, ova uloga dejodinaze 2 je narušena, a jedno od objašnjenja je niži nivo ekspresije ovog enzima u hipofizi kod pomenutih pacijenata. Pored toga, Ala92 varijanta dejodinaze 2 kod ljudi se povezuje sa indukcijom stanja gojaznosti i insulinske rezistencije u poređenju sa drugim genotipovima, poput 92Thr dejodinaza 2 (329). Ne treba zanemariti takođe i moguću ulogu leptina, s'obzirom da leptin direktno stimuliše izlučivanje TRH, a potom TSH i tireoidnih hormona (330). Pored toga, pokazano je da leptin ima direktan inhibitorski uticaj na neke komponente u tireocitima koje su uključene u produkciju tireoidnih hormona (331), ali isto takomože direktno uticati na samu senzitivnost tireotrofa i/ili tireocita (332).

***Efekti skH i kH na biohemijske parametre i lipidni profil.*** Tireoidni hormoni značajno utiču na metabolizam lipoproteina (333). Pored efekta tireoidnih hormona, i TSH nezavisno utiče na metabolizam lipida. Hormon TSH deluje dvojako na metabolizam lipida- samostalno direktno, ali i indirektno, preko tireoidnih hormona (334). Pokazano je da je metabolizam lipida izmenjen u skH (333). U našoj studiji, statistički značajna razlika je uočena za nivoe glikemije, holesterola, HDL-H i LDL-H, dok se nivoi HbA1c i TG statistički značajno ne razlikuju između ispitivanih grupa. Kod kH ispitanica su izmerene statistički značajno više vrednosti holesterola u odnosu na kontrolnu grupu; vrednosti LDL-H su bile značajno više i u grupi skH i kH u odnosu na K, dok je nivo HDL-H bio značajno niži kod ispitanica sa skH i kH u poređenju sa kontrolama.

Rezultati lipidnog profila u našoj studiji su slični rezultatima dobijenim u drugim studijama (302, 303, 335, 336). Naši rezultati pokazuju statistički značajno više vrednosti ukupnog holesterola i LDL-H kod pacijenata sa skH i kH. Suprotno od rezultata studija, koje su ukazale na povišene nivoe serumskih lipida, postoje i studije koje nisu pokazale značajne razlike u nivoima lipida između obolelih od skH i eutireoidnih kontrola (337-340). Takođe, postoje i studije koje pokazuju povezanost skH sa ostalim lipidnim varijablama izuzev sa vrednostima za ukupni holesterol i LDL-H (66, 341, 342). U literaturi je pokazano je da su u poređenju sa eutireoidnim kontrolama, povišeni ukupni holesterol i/ili LDL-H posebno zastupljeni kod pacijenata sa skH (302, 303, 335, 336). Slično tome, rezultati iz Tromso studije takođe su ukazali na povišene nivoe LDL-H kod skH pacijenata (304). Neke studije su pokazale da su povišeni nivoi LDL-H u skH reverzibilni – imaju tendenciju pada primenom LT4 supstitucije (68, 283). Tireoidni hormoni dovode do povećane ekspresije LDL-receptora, što sugeriše da je hiperholesterolemija često posledica hipotireoidizma (343). Međutim, rezultati dobijeni u okviru Whickham studije nisu pokazali povišene nivoe ukupnog holesterola kod obolelih od skH (12). Takođe, u studijama poput NHANES III (10, 339) i Busselton (62), prvobitno su registrovane povišene vrednosti ukupnog holesterola u skH, ali je kasnije, prilagođavanjem po uzrastu i polu, razlika u vrednostima holesterola odnosu na kontrole gotovo u potpunosti izostala.

Pored toga, neke studije su pokazale da dislipidemija kod pacijenata sa skH može biti predstavljena povišenim nivoom TG (344, 345), ali i sniženim nivoima HDL-H (346). Značajno niži nivo HDL-H, bez značajnih promena u TG kod skH pacijenata u poređenju sa kontrolama

zabeležen je u našoj studiji, što je u saglasnosti sa rezultatima iz literature (347). Tako su u studiji Efstathiadou i aut. pacijenti sa skH imali značajno viši nivo ukupnog holesterola i LDL-H, dok se nivoi TG i HDL-C nisu značajno razlikovali u poređenju sa eutireoidnim kontrolama (335). Nivoi serumskih TG u našoj studiji se nisu menjali kod pacijenata sa skH, mada je takođe pokazano da nivo TG može biti neznatno povišen (16).

U našoj studiji, pacijenti sa hipotireoidizmom nisu imali lipidni profil statistički značajno različit od eutireoidne kontrole (384), a moguće objašnjenje moglo bi biti u činjenici da su nivoi lipida u kontrolnoj grupi bili relativno visoki. Takođe, nije nađena korelacija između nivoa TSH i fT4 sa lipidnim parametrima (TG, ukupni holesterol, HDL-H, LDL-H). Verovatan razlog zašto nije uočena korelacija između nivoa TSH i lipidnog profila je uticaj nekih drugih parametara, npr. godina života i navika ishrane (348, 349). Druga mogućnost može biti mala veličina uzorka ili, pak nedovoljan uticaj hormona na lipidne parametre. Dodatno, nije zabeležena ni korelacija BMI sa TSH i fT4. Važno je napomenuti da u okviru naše studije nismo ispitivali uticaj etiologije hipotireoidizma, obzirom da je poznato da je Hashimoto tireoiditis najčešći uzrok povišenog nivoa TSH. Upravo jedan od razloga lečenja hipotireoidizma je korekcija lipidnog profila (350).

***Koncentracije NO<sub>2</sub> i CRP u eutireoidnim i primarnim hipotireoidnim stanjima.***  
Promene u koncentracijama NO<sub>2</sub>, kao NO<sub>x</sub>, su prisutne u brojnim patofiziološkim stanjima, poput dijabetesa (351), metaboličkog sindroma (352), kao i KVB (353).

Eksperimentalne studije su pokazale da je u hipotireoidizmu smanjena endotel-zavisna vazorelaksacija u aorti i bubrežnim KS (190, 192, 193), uz smanjenje eNOS aktivnosti u aorti pacova. Ovi nalazi su u diskrepanci sa nalazima u kojima u hipotireoidizmu nije detektovana ED, verovatno zbog dužine trajanja, ali i težine ispoljavanja hipotireoidizma, koji su ovom slučaju veoma značajni (196). Koncentracije NO<sub>x</sub> su inače značajno niže kod hipotireoidnih Sprague-Dawley pacova, što se objašnjava smanjenom biološkom raspoloživošću usled tireoidne disfunkcije, pri čemu se mogu povećati primenom donora NO, poput Na<sup>+</sup>-nitroprusida (354).

U našoj studiji nismo našli statistički značajno smanjenje koncentracije NO<sub>2</sub> kod pacijenata skH u poređenju sa kontrolama, za razliku od rezultata drugih studija, poput one koju su objavili Kumar i aut. (355), u kojoj je pokazano da je nivo NO bio niži, ali bez statističke značajnosti u grupi skH u odnosu na eutireodne kontrole, pri čemu je nivo NO negativno korelisao sa porastom TSH. Smanjena produkcija NO je dokazana u hipertireoidnih (299), obolelih od kH (299), kao i od skH (107).

U našoj studiji registrovano je smanjenje u koncentracijama NO<sub>2</sub> kod skH, ali ono nije statistički značajno. Pretpostavlja se da ova statistička značajnost nije dostignuta zbog male veličine ispitivane populacije. Analizom korelacija koncentracija NO<sub>2</sub> sa antropometrijskim, hormonskim i lipidnim parametrima, zapaža se statistički značajna korelacija koncentracija NO<sub>2</sub> sa BMI, HbA<sub>1c</sub>, kao i nivoom TG. Multivarijantna linearna regresija antropometrijskih, biohemijskih i hormonalnih prediktora NO<sub>2</sub> u ispitivanoj populaciji pokazuje da je jedini nezavisni prediktor koncentracije NO<sub>2</sub> u ispitivanoj populaciji, upravo vrednost TG.

S'obzirom da je pronađena povezanost koncentracije NO<sub>2</sub> sa tzv. markerima metaboličkog rizika (BMI, HbA<sub>1c</sub> i TG), radi dalje analize koncentracija NO<sub>2</sub> u ispitivanoj populaciji, izračunali smo indeks metaboličkog opterećenja. Dobijeni rezultati pokazuju postojanje statistički značajne razlike u koncentraciji NO<sub>2</sub> kod ispitanica sa i bez metaboličkog opterećenja, tj. ispitanice sa povećanim metaboličkim rizikom imale su značajno više koncentracije NO<sub>2</sub>. Naši rezultati su u saglasnosti sa podacima drugih autora, koji isto tako pokazuju da kod pacijenata sa dijagnostikovanim metaboličkim sindromom dolazi do povećanja koncentracija NO<sub>x</sub> (356-358). Tako su Caimi i sar. (359) pokazali da kod ispitanika sa metaboličkim sindromom dolazi do značajnog povećanja koncentracije NO, mada ovo povećanje nije povezano sa prisustvom dijabetesa. Moguće objašnjenje ovog povećanja u koncentracijama NO pripisuje se stepenu zapaljenja koje prati stanje metaboličkog sindroma, koje indukuje ekspresiju iNOS u makrofagima. Osim na taj način, poznato je da se iNOS može aktivirati u stanjima inflamacije pod uticajem aktiviranih citokina, poput TNF- $\alpha$ , IL-1b i interferona (360-362, 389).

Za oba pola i različite starosne grupe u populaciji zdravih odraslih osoba, referentni opseg za NO<sub>x</sub> je 10,3-66,8 $\mu$ M, a po polovima- za muški 11,5-76,4 $\mu$ M, a za ženski 10,1-65,6 $\mu$ M (363). Slične rezultate prikazuje i Romitelli i sar. (364), koji je u grupi 50 zdravih ispitanica identičnim (Grisovim metodom), definisao referentni opseg koncentracije NO: 8,2-75 $\mu$ M, dok je

određivanjem metodom gasne hromatografije, koji se smatra najtačnijim metodom kvantifikacije koncentracija NO, referentni opseg iznosio 19,9-85,0 $\mu$ M. Watanabe i sar. (365) su ispitivanjem 263 odrasle zdrave osobe (145 muškog i 118 ženskog pola) definisali interkvartilni opseg za NOx od 34,4-51,1 tj. 24,8-50,7 $\mu$ M za muški odnosno ženski pol. Posmatrano po godinama života, u studiji Ghasemija i sar. (363), najniže i najviše granične referentne vrednosti su registrovane u klasterima od 20-30 godina i >50 godina života. Više gornje granice referentnih vrednosti za NO su objašnjene uticajem menopauze (363, 365), obzirom na veću ekspresiju iNOS u uslovima deficijencije estrogena (366). Takođe, koncentracije NO su veće kod inače zdravih žena koje su gojazne, što se objašnjava verovatno povećanom produkcijom NO u masnom tkivu (367). Sa druge strane, niže koncentracije NO se registruju kod mladih osoba (363, 368).

Poput studije Gaoa i sar. (369), i u drugim studijama su pokazane niže koncentracije NOx u grupi skH u odnosu na zdrave eutireoidne kontrole (44, 107, 355, 370). Pre primene LT4, koncentracije NOx se razlikuju između zdravih i skH grupe (niže u skH grupi), a po primeni LT4 dolazi do statistički značajnog porasta NOx u skH grupi (369). Koncentracije NOx su bile značajno niže u skH grupi, što se objašnjava dozno-zavisnim efektom porasta TSH, iako su nivoi fT4 bili slični među grupama skH i eutireoidne kontrole. Nakon šest meseci od uspostavljenog stabilnog eutireoidnog ranga TSH, dolazi do porasta NOx (369). To pokazuje da TSH na endotelne ćelije deluje nezavisnim mehanizmom od promena nivoa perifernih tireoidnih hormona (369), što potvrđuje i već pomenuta ekspresija TSH receptora na endotelnim ćelijama (371, 372). Eksperimentalni dokaz tome je i smanjena ekspresija eNOS i prostaciklina I2 u endotelnim ćelijama humanih umbilikalnih vena u uslovima povišenog TSH (373), čime se ujedno objašnjava uticaj povišenog TSH na nastanak ED. Multiplom linearnom regresijom je potvrđena povezanost koncentracija NOx i povišenog nivoa TSH, čak i nakon prilagođavanja za ostale KV faktore rizika, što vodi zaključku da povišen nivo TSH doprinosi razvoju i ubrzanju A kod obolelih od skH (369).

Dodatno, povezanost između kaveolina i tireoidne disfunkcije, može doprineti razjašnjenju direktnog uticaja TSH na smanjenje raspoloživosti NO i nastanku i razvoju ED. Naime, bazične studije su dokazale da kod hipotireoidnih pacova u hipokampusu i cerebelumu dolazi do povećane ekspresije kaveolina (374). U drugoj studijina populaciji odraslih hipotireoidnih pacova, pored induktivnog efekta hipotireoidizma na ekspresiju kaveolina,

pokazana je i snižena aktivnost eNOS (375). Smanjena raspoloživost NO uzrokovana brojnim faktorima u skH, narušava vazodilatatorni odgovor na različite stimuluse, ubrzava regrutaciju makrofaga i njihovu migraciju u zid KS, promoviše adheziju trombocita i njihovu agregaciju, a potom i razvoj tromboze (376).

Naši rezultati pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u nivou izmerenog CRP između ispitivanih grupa. Literaturni podaci koji se odnose na promene nivoa CRP u stanjima hipotireoidizma su kontradiktorni. U studijama Tuzcu i sar. i Hristos-Crain i sar. pokazana je veza između hipotireoidizma i povišenog nivoa visoko senzitivnog CRP (103, 377). Suprotno, Pearce i sar. su pokazali da su pacijenti sa Hashimoto tireoiditisom, kao i tranzitornim hipotireoidizmom uključujući i postpartalni, imali slične nivoe visokosenzitivnog CRP u odnosu na njihove eutireoidnih kontrole. Isti autori sugerišu da nivo visokosenzitivnog CRP može imati samo ograničenu ulogu u dijagnostici tireoidnih oboljenja (378). Studija Huestona i sar., takođe je pokazala da nema razlike u nivoima visokosenzitivnog CRP između pacijenata sa skH i eutireoidnih kontrola (379).

***Efekti primene LT4 u stanjima skH i kH.*** Tretman kH primenom LT4 se sprovodi odmah nakon postavljanja dijagnoze. Tretman skH je često delikatan u smislu inicijacije LT4. Najčešći razlozi za uvođenje LT4 su sprečavanje transfera u kH, kao i poboljšanje kvaliteta života, prevashodno kod onih pacijenata kod kojih se klinički ispoljava (50, 59, 71).

Konsenzus-konferencija o započinjanju lečenja skH preporučila je inicijaciju lečenja kod perzistentno povišenog nivoa TSH  $\geq 10$  mIU/ml, prevashodno sa ciljem da se spreči prelazak u kH i smanji povišen rizik od KV morbiditeta i mortaliteta (20, 42, 277, 278). Pristup lečenju skH treba biti strogo individualizovan, sa sagledavanjem celokupnog stanja bolesnika. Kod starijih bolesnika se moraju anticipirati potencijalni negativni efekti skH na funkciju leve komore i povećan rizik od IBS (47). U tim slučajevima, moraju se u potpunosti ispoštovati procedure postepenog uvođenja LT4 i monitoring bolesnika u cilju održavanja TSH u referentnom opsegu (28). Kod osoba kod kojih je nivo TSH 3-4,5 mIU/ml, posebno ukoliko imaju pozitivna ATPO antitela, postoji povećan rizik od transfera u kH, te se oni periodično prate određivanjem nivoa TSH (28).

Odluka u smislu započinjanja terapije LT4 kod obolelih sa nivoom TSH 5-9mIU/ml morala bi biti individualizovana, uzimajući u obzir i brojne aspekte obolelog (14, 20). U ovoj disertaciji, medijana dužine primene LT4 do uspostavljanja eutireoidnog ranga TSH (<3,4mIU/mL) je 3 meseca (3-6 meseci), bez razlika među grupama tretiranih. Prosečna nedeljna doza LT4 se razlikovala među grupama; u grupi skH je bila manja-175µg, dok je u kH grupi iznosila 525µg. Posmatrano u ispitivanom uzorku tretiranih LT4, prosečan nivo TSH po uspostavljanju eutireoidizma je  $2,33\pm 0,98$ mIU/ml, dok su koncentracije NO<sub>2</sub>  $14,90\pm 11,99$ µM. Inicijalne prosečne koncentracije NO<sub>2</sub> i koncentracije NO<sub>2</sub> po uspostavljanju eutireoidizma se nisu razlikovale, dok se prosečni nivo TSH inicijalno i nakon terapije, očekivano statistički razlikovao.

Posmatrano unutar grupa, nivo TSH se u grupi skH statistički značajno snizio po primeni LT4, baš kao i u grupi kH. Koncentracija NO<sub>2</sub> po primeni LT4 je u grupi skH pokazala tendenciju opadanja, dok je u grupi kH pokazala tendenciju rasta, ali te promene nisu dostigle statističku značajnost.

Pozitivan efekat supstitucije LT4 na lipidni profil i smanjenje rizika od KB je pokazan u studijama (74, 75, 301, 380, 381). Tireoidna funkcija je reverzibilna primenom LT4. Postmortem studije, kao i epidemiološki podaci, ukazuju na povećan vaskularni rizik kod lečenih pacijenata od hipotireoidizma (382). Promene u KVS su reverzibilne po uspostavljanju eutireoidnog ranga TSH primenom LT4. Rana primena LT4 u tretmanu skH može korigovati nivo holesterola, ali isto tako može dovesti do razvoja ili pogoršanja već postojeće KB ili aritmija (67). Takođe, postoje i studije koje su pokazale izostanak korekcije lipidnih abnormalnosti po primeni supstitucije LT4 (380, 383).

Našom studijom (384), pokazana je značajna korekcija aterosklerotskih rizičnih faktora nakon 3 meseca primene LT4. Nakon uspostavljanja eutireoidnog ranga TSH, oboleli od hipotireoidizma su značajno korigovali vrednosti BMI, sTA, dTA, ukupnog holesterola, kao i LDL-H u odnosu na preterapijske vrednosti. Slične rezultate u smislu korekcije nivoa ukupnog holesterola, kao i LDL-H prikazani su i nakon 6 meseci primene LT4 (77). Kvalitet korekcije lipidnog disbalansa po uspostavljanju biohemijskog eutireoidizma lekom zavisi od težine i trajanja tireoidopatije, ali i od težine hiperholesterolemije (67, 321, 385). Takođe, ishrana,



inicijalni BMI i pušenje mogu primarno uticati na nivo LDL-H (102). Efekat korekcije hiperholesteolemije i nivoa LDL-H je obično izraženiji kada je TSH >10mIU/ml (70, 321).

Ipak, najviše kontroverze ima oko uticaja LT4 na HDL-H kod hipotireoidnih pacijenata. Pojedine studije su pokazale porast nivoa HDL-H primenom LT4 (335, 380), druge sniženje (386, 387), dok treće nisu pokazale značajan efekat supstitucije LT4 na nivo HDL-H (383, 388). Naši rezultati pokazuju da nivoi TG i HDL-H nisu bili značajno promenjeni po primeni LT4 kod obolelih od hipotireoidizma (384). Meta analizom, koja je uključila 13 studija, nisu pokazani efekti LT4 na nivo HDL-H i TG (70). Kod obolelih od skH, primena LT4 je dovela do smanjenja ukupnog holesterola (u 11 od 13 studija), dok se u 7 od 9 studija registruje pad LDL-H (9). Ovi rezultati podržavaju hipotezu da lečenje skH koriguje lipidni profil i redukuje rizik od KB (9, 67, 70). Još uvek nije definisano koji nivo lečenja skH redukuje KV morbiditet (9). Lečenje LT4 obično koriguje dislipidemiju, ali, ukoliko to ne obezbedi, trebalo bi razmišljati u pravcu postojanja primarne dislipidemije. Našom studijom (384) smo pokazali značajne metaboličke efekte primenjene supstitucije LT4 u obolelih od hipotireoidizma.

Limitacije naše studije su relativno mala populacija bolesnika i kontrola, kao i izražena heterogenost podataka (različito životno doba, pojedinačni slučajevi postmenopauzalnih žena), što je onemogućilo da se u potpunosti analiziraju efekti supstitucione terapije. Buduće studije bi trebalo sprovesti na većem uzorku da bi se što bolje sagledali efekti supstitucije LT4 na koncentracije NO<sub>2</sub>, kao NO<sub>x</sub>, kao i lipidne parametre kod obolelih od skH i kH u Srbiji. Takođe, uključivanjem veće populacije bolesnih i kontrola, omogućiće se rasvetljenje odnosa NO<sub>2</sub> i TSH, ali i lipida i inflamatornih markera u stanjima skH i kH.

U zaključku, uzimajući u obzir podatke iz literature, zajedno sa rezultatima prikazanim u okviru ove doktorske disertacije, kao i naše objavljene i preliminarne rezultate koji se odnose na efekte NO<sub>2</sub> u stanjima hipotireoze, sugerise se da bi koncentracija NO<sub>2</sub> mogla biti jedan od korisnih parametara, a svakako ne jedini, za opredeljenje uvođenja supstitucije LT4. Iako izostanak statističke značajnosti u ranim promenama koncentracija NO<sub>2</sub> ne ide u prilog hipotezi da inicijalna koncentracija NO<sub>2</sub> može biti pouzdan dodatni parametar u započinjanju terapije LT4 kod primarnog hipotireoidizma, a prevashodno skH, bilo bi korisno dizajnirati kliničku studiju gde će se pratiti kasniji efekti LT4 na koncentracije NO<sub>2</sub> (npr. 6, 12 ili više meseci od uspostavljanja stabilnog eutireoidizma), ali i evaluirati njihova asocijacija sa lipidnim i drugim

inflamatornim parametrima i eventualna potreba za optimizacijom terapije LT4. Razumevanje molekularnih mehanizama, koji su u osnovi efekata NO<sub>2</sub>, kako u fiziološkim, tako i u patofiziološkim stanjima, kao što je stanje hipotireoidizma, stoga je od velike važnosti.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu dobijenih i prikazanih rezultata u okviru ove doktorske disertacije, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Inicijalne koncentracije NO<sub>2</sub> u ispitivanoj populaciji nalaze se kako u referentnom opsegu za odrasle osobe, tako i u opsegu za odrasle osobe ženskog pola; najniže koncentracije NO<sub>2</sub> su zapažene u skH grupi, a najviše u kontrolnoj grupi, bez dokazane statističke razlike među grupama.
2. Prilagođavanjem koncentracija NO<sub>2</sub> za parametre metaboličkog rizika i godine života, pokazana je statistički značajna razlika između obolelih od hipotireoidizma i kontrole grupe.
3. Nije zabeležen uticaj TSH i fT<sub>4</sub> na inicijalne koncentracije NO<sub>2</sub>.
4. Analizom korelacija koncentracija NO<sub>2</sub> sa antropometrijskim, hormonskim i lipidnim parametrima, zapažena je statistički značajna korelacija koncentracija NO<sub>2</sub> sa BMI, HbA<sub>1c</sub>, kao i nivoom TG.
5. Nivo TSH je statistički značajno niži, dok se koncentracije NO<sub>2</sub> nisu statistički značajno razlikovale pre, kao i nakon uspostavljenog eutireoidizma, primenom LT<sub>4</sub> u grupi skH.
6. Nivo TSH je statistički značajno niži, dok se koncentracije NO<sub>2</sub> nisu statistički značajno razlikovale pre, kao i nakon uspostavljenog eutireoidizma, primenom LT<sub>4</sub> u grupi kH.
7. Nakon prosečno 3 meseca primene LT<sub>4</sub>, koncentracije NO<sub>2</sub> nisu se razlikovale od prosečnih inicijalnih koncentracija NO<sub>2</sub>, a nalaze se u normalnom opsegu za NO<sub>2</sub> u adultnoj populaciji ženskog pola.
8. Prosečne koncentracije NO<sub>2</sub> po uspostavljanju laboratorijskog eutireoidizma su pokazale trend opadanja u skH, odnosno porasta u kH grupi, ali bez dostizanja statističke značajnosti u odnosu na inicijalne vrednosti.
9. Ispitanice sa metaboličkim rizikom imale su značajno više koncentracije NO<sub>2</sub>.

Rezultati prikazani u ovoj doktorskoj disertaciji ukazuju na rane efekte LT4 supstitucije na koncentracije NO<sub>2</sub>, kao markere inflamacije i parametre ED u hipotireoidnim stanjima. Takođe, ukazano je da u stanjima hipotireoze postoji pozitivna korelacija između koncentracija NO<sub>2</sub> i TG, što govori o tome da je jedini nezavisni prediktor koncentracije NO<sub>2</sub> u ispitivanoj populaciji, upravo vrednost TG.

Potencijalni naučni doprinos rezultata dobijenih ovom doktorskom disertacijom je, između ostalog, upoznavanje delovanja NO<sub>2</sub> u stanjima hipotireoidizma. Izučavanja usmerena u tom pravcu su od izuzetne važnosti za razumevanje uloge NO, kako u endokrinologiji, tako i u KVB.

## 7. LITERATURA

1. Warfovsky L. Disease of Thyroid. In: Isselbacher JK, Braunwald E, Wilson DJ, Martin BJ, Fauci AS, Kasper D, eds. Harrison's principles of Internal medicine. 13th ed. International edition: McGraw Hill; 1994.p. 1931-53.
2. Greenspan FS. The Thyroid Gland. In: Greenspan FS, Gardner DG, eds. Basic and Clinical Endocrinology. 7th ed. London: Lange Medical Books; 2004.p. 215-94.
3. Trbojević B. Tiroidna žlezda: patofiziološke osnove i klinički pristup. Beograd:ČIP Štampa; 1994.
4. Braverman LE, Utiger RD. Werner and Ingbar's-The Thyroid. 6th ed. Philadelphia:JB Lippincot Company; 1991.p. 919-1084.
5. Trbojević B, Marina Đ. Dijagnoza hipotireoze. In: Micić D, Popović-Brkić V, eds. Acta Clinica-Hipotireoza. 1st ed. Beograd: Klinički Centar Srbije; 2008.p. 39-53.
6. Imaizumi M, Akahoshi M, Ichimaru S, Nakashima E, Hida A, Soda M et al. Risk of ischaemic heart disease and all-cause mortality in subclinical hypothyroidism. JCEM 2004; 89:3365-70.
7. Surks MI, Ocampo E. Subclinical thyroid disease. Am J Med 1996; 100: 217-22.
8. Sawin CT, Castelli WP, Hershman JM, McNamara P, Bacharach P. The aging thyroid. Thyroid deficiency in the Framingham Study. Arch Intern Med 1985; 145: 1386-8.
9. Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The Colorado thyroid disease prevalence study. Arch Intern Med 2000; 160: 526-34.

10. 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). *JCEM* 2002; 87: 489-99.
11. Helfand M. Screening for subclinical thyroid dysfunction in nonpregnant adults: a summary of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2004; 140: 128-41.
12. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F et al. The spectrum of thyroid disease in a community: the Wickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1977; 7: 481-93.
13. Krassas GE, Poppe K, Glinoe D. Thyroid function and human reproductive health. *Endocr Rev* 2010; 31: 702-55.
14. Cooper DS, Biondi B. Subclinical thyroid disease. *Lancet* 2012; 379: 1142-54.
15. Nystrom E, Bengtsson C, Lindquist O, Noppa H, Lindstedt G, Lundberg PA. Thyroid disease and high concentration of serum thyrotrophin in a population sample of women: a 4-year follow-up. *Acta Med Scand* 1981; 210: 39-46.
16. Wiersinga WM. Adult hypothyroidism. Available from: [www.thyroidmanager.org](http://www.thyroidmanager.org)
17. Biondi B. Thyroid and obesity: an intriguing relationship. *JCEM* 2010; 95: 3614-7.
18. Surks MI, Hollowell JG. Age-specific distribution of serum thyrotrophin and antithyroid antibodies in the US population: implication for the prevalence of subclinical hypothyroidism. *JCEM* 2007; 92: 4575-82.
19. Surks MI, Ortiz E, Daniels GH, Sawin CT, Col NF, Cobin RH et al. Subclinical thyroid disease: scientific review and guidelines for diagnosis and management. *JAMA* 2004; 291: 228-38.
20. Biondi B, Cooper DS. The clinical significance of subclinical thyroid dysfunction. *Endocr Rev* 2008; 29: 76-131.

21. Walsh JP, Bremner AP, Feddema P, Leedman PJ, Brown SJ, O'Leary P. Thyrotropin and thyroid antibodies as predictors of hypothyroidism: a 13-year, longitudinal study of community-based cohort using current immunoassay techniques. *JCEM* 2010; 95: 1095-104.
22. Huber G, Staub JJ, Meier C, Mitrache C, Guglielmetti M, Huber P et al. Prospective study of spontaneous course of subclinical hypothyroidism: prognostic value of thyrotropin, thyroid reserve, and thyroid antibodies. *JCEM* 2002; 87: 3221-6.
23. Diez JJ, Iglesias P, Burman KD. Spontaneous normalization of thyrotropin concentrations in patients with subclinical hypothyroidism. *JCEM* 2005; 90: 4124-7.
24. Petakov M, Beleslin B, Ćirić S. Oboljenja štitaste žlezde. In: Micić D, Damjanović S, eds. *Acta Clinica-funkcionalna ispitivanja u endokrinologiji*. 1st ed. Beograd: Klinički Centar Srbije; 2004.p. 32-44.
25. Turner HE, Wass AHW. *Oxford Handbook of Endocrinology and Diabetes*. Oxford University Press; 2009.
26. Fazio S, Palmieri EA, Lombardi G, Biondi B. Effects of thyroid hormone on the cardiovascular system. *Recent Prog Horm Res* 2004; 59: 31-50.
27. Klein I, Ojamaa K. Thyroid Hormone and the cardiovascular system. *NEJM* 2001; 344: 501-9.
28. Biondi B, Klein I. Hypothyroidism as a risk factor for cardiovascular disease. *Endocrine* 2004; 24(1): 1-13.
29. Kahaly GJ, DillmannWH. Thyroid hormone action in the heart. *Endoc Rev* 2005; 26: 704-28.
30. Kiss E, Jakab G, Kranias EG, Edes I. Thyroid hormone-induced alterations in phospholamban protein expression: regulatory effects on sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  transport and myocardial relaxation. *Circ Res* 1994; 75: 245-51.
31. Biondi B, Kahaly GJ. The cardiovascular risk in thyroid dysfunction. *Thyroid International* 2013; 3: 1-8.

32. Davis PJ, Davis FB. Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart. *Thyroid* 2002; 12: 459-66.
33. Danzi S, Klein I. Thyroid hormone and blood pressure regulation. *Curr Hypertens* 2003; 5: 513–20.
34. Gerdes AM, Iervasi G. Thyroid replacement therapy and heart failure. *Circ* 2010; 122: 385-93.
35. Tang YD, Kuzman JA, Said S, Anderson BA, Wang X, Gerdes AM. Low thyroid function leads to cardiac atrophy with chamber dilatation, impaired myocardial blood flow loss of arterioles, and severe systolic dysfunction. *Circulation* 2005; 112: 3122-30.
36. Biondi B, Palmieri EA, Lombardi G, Fazio S. Subclinical hypothyroidism and cardiac function. *Thyroid* 2002; 12: 505-10.
37. Ripoli A, Pingitore A, Favilli B, Bottoni A, Turchi S, Osman NF et al. Does subclinical hypothyroidism affect cardiac pump performance? Evidence from a magnetic resonance imaging study. *JACC* 2005; 45: 439-45.
38. Biondi B. Cardiovascular effects of mild hypothyroidism. *Thyroid* 2007; 17: 625-30.
39. Brenta G, Mutti LA, Schnitman M, Fretes O, Perrone A, Matute MI. Assessment of left ventricular diastolic function by radionuclide ventriculography at rest and exercise in subclinical hypothyroidism and its response to L-thyroxine therapy. *American Journal of Cardiology* 2003; 91: 1327-30.
40. Rodondi N, Newman AB, Vittinghoff E, de Rekeneire N, Satterfield S, Harris TB et al. Subclinical hypothyroidism and the risk of heart failure, other cardiovascular events, and death. *Arch Intern Med* 2005; 165: 2460-6.
41. Rodondi N, den Elzen WP, Bauer DC, Cappola AR, Razvi S, Walsh JP et al. Subclinical hypothyroidism and the risk of coronary heart disease and mortality. *JAMA* 2010; 304: 1365-74.



42. Razvi S, Shakoor A, Vanderpump M, Weaver JU, Pearce SH. The influence of age on the relationship between subclinical hypothyroidism and ischemic heart disease: a meta-analysis. *JCEM* 2008; 93: 2998-3007.
43. Cappola AR, Ladenson PW. Hypothyroidism and atherosclerosis. *JCEM* 2003; 88(6): 2438-44.
44. Taddei S, Caraccio N, Viridis A, Dardano A, Versari D, Ghiadoni L et al. Impaired endothelium-dependent vasodilatation in subclinical hypothyroidism: beneficial effect of levothyroxine therapy. *JCEM* 2003; 88: 3731-7.
45. Türemen EE, Cetinarslan B, Sahin T, Cantürk Z, Tarkun I. Endothelial dysfunction and low grade chronic inflammation in subclinical hypothyroidism due to autoimmune thyroiditis. *Endocr J* 2011; 58(5): 349-54.
46. Tieche M, Lupi GA, Gutzweiler F, Grob PJ, Studer H, Burgi H. Borderline low thyroid function and thyroid autoimmunity. Risk factors for coronary heart disease? *Br Heart J* 1981; 46: 202-6.
47. Hak AE, Pols HA, Visser TJ, Drexhage HA, Hofman A, Witteman JC. Subclinical hypothyroidism is an independent risk factor for atherosclerosis and myocardial infarction in elderly women: Rotterdam Study. *Ann Intern Med* 2000; 132: 270-8.
48. Dean JW, Fowler PB. Exaggerated responsiveness to thyrotrophin releasing hormone: a risk factor in women with coronary artery disease. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1985; 290: 1555-61.
49. Heinonen OP, Gordin A, Aho K, Punsar S, Pyorala K, Puro K. Symptomless autoimmune thyroiditis in coronary heart disease. *Lancet* 1972; 1: 785-6.
50. Cooper DS, Halpern R, Wood LC, Levin A, Ridgway EC. L-thyroxine therapy in subclinical hypothyroidism – a double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Int Med* 1984; 101: 18-24.
51. Vanderpump MPJ, Tunbridge WMG, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F et al. The development of ischemic heart disease in relation to autoimmune thyroid disease in a 20-year follow-up study of an English community. *Thyroid* 1996; 6: 155-60.

52. Fowler PBS, Swale J, Andrews H. Hypercholesterolemia in borderline hypothyroidism: stage of premyxoedema. *Lancet* 1970; 2: 488-91.
53. O’Kane MJ, Neely RDG, Trimble ER, Nicholls DP. The incidence of asymptomatic hypothyroidism in new referrals to a hospital lipid clinic. *Ann Clin Biochem* 1991; 2: 509-11.
54. Alaghband-Zadeh J, Carter JD, Daly JR, Fowler PBS, Greenwood TW. Association between exaggerated responsiveness to thyrotropin releasing hormone and hypercholesterolemia. *Lancet* 1977; 2: 998-1000.
55. Ball MJ, Griffiths D, Thorogood M. Asymptomatic hypothyroidism and hypercholesterolemia. *Roy Soc Med* 1991; 84: 527-9.
56. Bastenie PA, Vanhaelst L, Golstein J, Smets Ph, Keys A, Karvonen MJ et al. Asymptomatic autoimmune thyroiditis and coronary heart disease – cross sectional and prospective studies. *Lancet* 1977; 2: 155-8.
57. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, Appleton D, Brewis M, Clark F et al. Lipid profiles and cardiovascular disease in the Whickham area with particular reference to thyroid failure. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1977; 7: 495-508.
58. Razvi S, Weaver JU, Vanderpump MP, Pearce SH. The incidence of ischemic heart disease and mortality rate in people with subclinical hypothyroidism: reanalysis of the Whickham Survey Cohort. *JCEM* 2010; 95: 1734-40.
59. Staub JJ, Althaus BU, Engler H, Ryff AS, Trabucco P, Marquardi K, Burckhardt D, Girard J, Weintraub BD. Spectrum of subclinical and overt hypothyroidism: effect on thyrotropin, prolactin, and thyroid reserve, and metabolic impact on peripheral target tissues. *Am J Med* 1992; 92: 631-42.
60. Biondi B. Natural history, diagnosis and management of subclinical thyroid dysfunction. *Best Practice and Research Clinical Endocrinology and Metabolism* 2012; 26: 431-46.
61. Asvold BO, Bjoro T, Nilsen TI, Gunnell D, Vatten LJ. Thyrotropin levels and risk of fatal coronary heart disease: the HUNT study. *Ann Intern Med* 2008; 168: 855-60.

62. Walsh JP, Bremner AP, Bulsara MK, O'Leary P, Leedman PJ, Feddema P et al. Subclinical thyroid dysfunction as a risk factor for cardiovascular disease. *Arch Intern Med* 2005; 165: 2467-72.
63. Ladenson PW, Wilson MC, Gardin J, Kronmal R, Kuller L, Tracy R et al. Relationship of subclinical hypothyroidism to cardiovascular risk factors and disease in an elderly population. *Thyroid* 1994; 4: S-18.
64. Boekholdt SM, Titan SM, Wiersinga WM et al. Initial thyroid status and cardiovascular risk factors: the EPIC-Norfolk prospective population study. *Clinical Endocrinol (Oxf)* 2010; 72: 404-10.
65. Bastenie PA, Banhaelst L, Bonnyns M, Neve P, Staquet M. Preclinical hypothyroidism: a risk factor for coronary heart disease. *Lancet* 1971; 1: 203-4.
66. Kvetny J, Heldgaard PE, Bladbjerg EM, Gram J. Subclinical hypothyroidism is associated with low-grade inflammation, increased triglyceride levels and predicts cardiovascular disease in males below 50 years. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 61: 232-8.
67. Kahaly GJ. Cardiovascular and atherogenic aspects of subclinical hypothyroidism. *Thyroid* 2000; 10: 665-79.
68. Caraccio N, Ferraninni E, Monzani F. Lipoprotein profile in subclinical hypothyroidism: response to levothyroxine replacement, a randomized placebo-controlled study. *JCEM* 2002; 87(4): 1533-8.
69. Tzotzas T, Krassas GE, Konstantinidis T, Bougoulia M. Changes in lipoprotein(a) levels in overt and subclinical hypothyroidism before and during treatment. *Thyroid* 2000; 10: 803-8.
70. Danese MD, Ladenson PW, Meinert CL, Powe NR. Clinical Review 115: effects of thyroxine therapy on serum lipoproteins in patients with mild thyroid failure: a quantitative review of literature. *JCEM* 2000; 85: 2993-3001.
71. Geul KW, van Sluisveld IL, Grobbee DE, Docter R, de Bruyn AM, Hooykaas H et al. The importance of thyroid microsomal antibodies in the development of elevated serum TSH in middle-aged women: association with serum lipids. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993; 39: 275-80.

72. Parle JV, Franklin JA, Cross KW, Jones SR, Sheppard MC. Circulating lipids and minor abnormalities of thyroid function. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1992; 37: 411-4.
73. Kung AW, Pang RW, Janus ED. Elevated serum lipoprotein(a) in subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43: 445-9.
74. Yildirimkaya MA, Ozata M, Yilmaz K, Kilinc C, Gundogan MA, Kutluay I. Lipoprotein(a) concentration in subclinical hypothyroidism before and after levo-thyroxine therapy. *Endoc J* 1996; 43: 7316.
75. Arem R, Escalante DA, Arem N, Morrisett JD, Patsch W. Effect of l-thyroxine therapy on lipoprotein fractions in overt and subclinical hypothyroidism, with special reference to lipoprotein(a). *Metabolism* 1995; 44(12): 1559-63.
76. Meier C, Staub JJ, Roth CB, Guglielmetti M, Kunz M, Miserez AR et al. TSH-controlled L-thyroxine therapy reduces cholesterol levels and clinical symptoms in subclinical hypothyroidism: a double blind, placebo-controlled trial (Basel Thyroid Study) *JCEM* 2001; 86: 4860-6.
77. Monzani F, Caraccio N, Kozakowa M, Dardano A, Vittone F, Viridis A et al. Effect of levothyroxine replacement on lipid profile and intima-media thickness in subclinical hypothyroidism: a double-blind, placebo-controlled trial. *JCEM* 2004; 89: 2099-106.
78. Pazos F, Alvarez JJ, Rubies-Prat J, Varela C, Lasuncion MA. Long-term thyroid replacement therapy and levels of lipoprotein(a) and other lipoproteins. *JCEM* 1995; 80: 562-6.
79. Marfella R, Ferraraccio F, Rizzo MR, Portghese M, Barbieri M, Basilio C et al. Innate immunity activity in plaque of patients with untreated and L-thyroxine –treated subclinical hypothyroidism. *JCEM* 2011; 96: 1015-20.
80. Salonen RM, Nyyssonen K, Kaikkonen J, Porkkala-Sarataho E, Voitelainen S, Rissanen TH et al. Six-year effect of combined vitamin C et E supplementation on atherosclerotic progression: the antioxidant supplementation in atherosclerosis prevention (ASAP) study. *Circulation* 2003; 107: 947-53.

81. Mithat E, Hakan I, Koray E. Effect of tibolone treatment on intima-media thickness and the resistive indices of the carotid arteries. *Fertil Steril* 2003; 79: 268-73.
82. Tica JS. Uticaj supkliničkog hipotiroidizma na stanje krvnih sudova donjih ekstremiteta [rad uže specijalizacije]. [Beograd]: Univerzitet u Beogradu; 2011.
83. Mizuma H, Murakami M, Mori M. Thyroid hormone activation in human vascular smooth muscle cells: expression of type II iodothyronine deiodinase. *Circ Res* 2001; 88: 313-8.
84. Vanhaelst L, Neve P, Chailly P, Bastenie PA. Coronary artery disease in hypothyroidism. Observations in clinical myxedema. *Lancet* 1967; 2: 800-2.
85. Steinberg AD. Myxoedema and coronary artery disease- a comparative autopsy study. *Ann Intern Med* 1968; 68: 338-44.
86. Weber T, Auer J, O'Rourke MF, Kvas E, Lassnig E, Berent R et al. Arterial stiffness, wave reflections, and the risk of coronary artery disease. *Circulation* 2004; 109: 184-9.
87. Galli E, Pingitore A, Iervasi G. The role of thyroid hormone in the pathophysiology of heart failure: clinical evidence. *Heart Failure Reviews* 2010; 15: 155-69.
88. Biondi B, Kahaly GJ. Cardiovascular involvement in patients with different causes of hyperthyroidism. *Nature Reviews. Endocrinology* 2010; 6: 431-43.
89. Bengel FM, Nekolla SG, Ibrahim T, Weniger C, Ziegler S, Schwaiger M. Effect of thyroid hormones on cardiac function, geometry, and oxidative metabolism assessed noninvasively by positron emission tomography and magnetic resonance imaging. *JCEM* 2000; 85: 1822-7.
90. Walton KW, Scott PJ, Dykes PW, Davis JW. The significance of alterations in serum lipids in thyroid dysfunctions. Alterations of the metabolism and turnover of <sup>131</sup>I-low density lipoproteins in hypothyroidism and thyrotoxicosis. *Clin Sci* 1965; 29: 217-38.

91. Salter AM, Hayashi R, al Seeni M, Brown NF, Bruce J, Sorensen O et al. Effects of hypothyroidism and high-fat feeding on mRNA concentrations for the low-density lipoprotein receptor and on acyl-CoA cholesterol acyltransferase activities in rat liver. *Biochem J* 1991; 276(Pt3): 825-32.
92. Staels B, Van Tol A, Chan L, Will H, Verhoeven G, Auwerx J. Alterations in thyroid status modulate apolipoprotein, hepatic triglyceride lipase, and low density lipoprotein receptor in rats. *Endocrinology* 1990; 127: 1144-52.
93. Sundaram V, Hanna AN, Koneru L, Newman HA, Falko JM. Both hypothyroidism and hyperthyroidism enhance low density lipoprotein oxidation. *JCEM* 1997; 82: 3421-4.
94. Diekman T, Demacker PN, Kastelein JJ, Stalenhoef AF, Wiersinga WM. Increased oxidizability of low-density lipoproteins in hypothyroidism. *JCEM* 1998; 83: 1752-5.
95. Tzotzas T, Krassas GE, Konstantinidis T, Bougoulia M. Changes in lipoprotein(a) levels in overt and subclinical hypothyroidism before and during treatment. *Thyroid* 2000; 10: 803-8.
96. Becerra A, Bellido D, Luengo A, Piedrola G, Luis DA. Lipoprotein(a) and other lipoproteins in hypothyroid patients before and after thyroid replacement therapy. *Clin Nutr* 1999; 18: 319-22.
97. Caron P, Calazel C, Parra HJ, Hoff M, Louvet JP. Decreased HDL cholesterol in subclinical hypothyroidism: the effect of L-thyroxine therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1990; 33: 519-23.
98. Weintraub M, Grosskopf I, Trostanesky Y, Charach G, Rubinstein A, Stern N. Thyroxine replacement therapy enhances clearance of chylomicron remnants in patients with hypothyroidism. *JCEM* 1999; 84: 2532-6.
99. Ritter MC, Kannan CR, Bagdade JD. The effects of hypothyroidism and replacement therapy on cholesteryl ester transfer. *JCEM* 1996; 81: 797-800.

100. Lam KS, Chan MK, Yeung RT. High-density lipoprotein cholesterol, hepatic lipase and lipoprotein lipase activities in thyroid dysfunction-effects of treatment. *Q J Med* 1986; 59: 513-21.
101. Saito I, Saruta T. Hypertension in thyroid disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994; 23: 379-86.
102. Müller B, Zulewski H, Huber P, Ratcliffe JG, Staub JJ. Impaired action of thyroid hormone associated with smoking in women with hypothyroidism. *NEJM* 1995; 333: 964-9.
103. Christ-Crain M, Meier C, Guglielmetti M, Huber PR, Riesen W, Staub JJ et al. Elevated C-reactive protein and homocysteine values: cardiovascular risk factors in hypothyroidism. A cross-sectional and a double-blind, placebo-controlled trial. *Atherosclerosis* 2003; 166: 379-86.
104. Morris MS, Bostom AG, Jacques PF, Selhub J, Rosenberg IH. Hyperhomocysteinemia and hypercholesterolemia associated with hypothyroidism in the third U.S. National Health and Nutrition Examination Survey. *Atherosclerosis* 2001; 155: 195-200.
105. Deicher R, Vierhapper H. Homocysteine: a risk factor for cardiovascular disease in subclinical hypothyroidism? *Thyroid* 2002; 12: 733-6.
106. Woo KS, Chook P, Lolin YI, Cheung AS, Chan LT, Sun YY et al. Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 1997; 96:2542-4.
107. Ozcan O, Cakir E, Yaman H, Akgul EO, Erturk K, Beyhan Z et al. The effects of thyroxine replacement on the levels of serum asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other biochemical cardiovascular risk markers in patients with subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63:203-6.
108. Chadarevian R, Bruckert E, Leenhardt I, Giral P, Ankri A, Turpin G. Components of fibrinolytic system are differently altered in moderate and severe hypothyroidism. *JCEM* 2001; 86: 732-7.

109. Lyons CR, Orloff GJ, Cunningham JM. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 1992; 267: 6370-4.
110. Marsden PA, Schappert KT, Chen HS, Flowers M, Sundell CL, Wilcox JN et al. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 1992; 307(3): 287–93.
111. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 6348-52.
112. Xie QW, Cho HJ, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 1992; 256: 225-8.
113. Zhang P, Xu X, Hu X, van Deel ED, Zhu G, Chen Y. Inducible Nitric Oxide Synthase deficiency protects the heart from systolic overload–induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res* 2007; 100: 1089-98.
114. Schulz R, Rassaf T, Massion PB, Kelm M, Balligand JL. Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. *Pharmacol Ther* 2005; 108(3): 225-56.
115. Bian K, Doursout MF, Murad F. Vascular system: role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2008; 10: 304-10.
116. Miyazaki-Akita A, Hayashi T, Ding QF, Shiraishi H, Nomura T, Hattori Y et al. 17beta-estradiol antagonizes the down-regulation of endothelial nitric-oxide synthase and GTP cyclohydrolase I by high glucose: relevance to postmenopausal diabetic cardiovascular disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 320: 591-8.
117. Dobutović B, Smiljanić K, Šoškić S, Dungen H-D, Isenović ER. Nitric oxide and its role in cardiovascular diseases. *Open Nitric Oxide Journal* 2011; 3: 65-71.



118. Kubes P. Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut* 2000; 47: 6-9.
119. Petruson K, Stalfors J, Jacobsson KE, Ny L, Petruson B. Nitric oxide production in the sphenoidal sinus by the inducible and constitutive isozymes of nitric oxide synthase. *Rhinology* 2005; 43: 18-23.
120. Sudar E. Regulacija ekspresije i aktivnosti endotelne i inducibilne azot-monoksid-sintaze u srcu gojaznih pacova tretiranih grelinom [doktorska disertacija]. [Beograd]: Univerzitet u Beogradu; 2011.
121. Elizalde M, Ryden M, van Harmelen V, Eneroth P, Gyllenhammar H, Holm C et al. Expression of nitric oxide synthases in subcutaneous adipose tissue of nonobese and obese humans. *J Lipid Res* 2000; 41: 1244-51.
122. Shimabukuro M, Higa M, Zhou YT, Wang MY, Newgard CB, Unger RH. Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. *Journal of Biological Chemistry* 1998; 273(49): 32487-90.
123. Fujimoto M, Shimizu N, Kunii K, Jeevendra Martyn JA, Ueki K, Kaneki M. A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice. *Diabetes* 2005; 54(5): 1340-8.
124. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthase: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001; 357: 593-615.
125. Fukuchi M, Hussain SN, Giaid A. Heterogeneous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure: their relation to lesion site and beta-adrenergic receptor therapy. *Circulation* 1998; 98: 132-9.
126. Vejstrup NG, Bouloumie A, Boesgaard S, Andersen CB, Nielsen-Kudsk JE, Mortensen SA et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the human heart: expression and localization in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 1215-23.

127. Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I et al. Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 1994; 23: 1121-31.
128. Wu J, Lin Q, Lu Y, Willis WD, Westlund KN. Changes in nitric oxide synthase isoforms in the spinal cord of rat following induction of chronic arthritis. *Exp Brain Res* 1998; 118: 457-65.
129. El-Gayar S, Thüring-Nahler H, Pfeilschifter J, Rööllinghoff M, Bogdan C. Translational control of inducible nitric oxide synthase by Il-13 and arginine availability in inflammatory macrophages. *J Immunol* 2003; 171: 4561-8.
130. Fukuchi M, Giaid A. Endothelial expression of endothelial nitric oxide synthase and endothelin-1 in human coronary artery disease. Specific reference to underlying lesion. *Lab Invest*. 1999; 79: 659–70.
131. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL,.Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2479–88.
132. LaPointe MC, Isenovic E. Interleukin-1beta regulation of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 involves the p42/44 and p38 MAPK signaling pathways in cardiac myocytes. *Hypertension* 1999; 33: 276–82.
133. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992; 145: 201-27.
134. Nathan CF and Xie Q-w. Nitric oxide synthase: Roles, tolls and controls. *Cell* 1994; 78: 915-8.
135. Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000; 190: 244-54.
136. Michel JB, Feron O, Sase K, Prabhakar P, Michel T. Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1997; 272(41): 25907-12.

137. Gratton JP, Fontana J, O'Connor DS, Garcia-Cardena G, McCabe TJ, Sessa WC. Reconstitution of an endothelial nitric-oxide synthase (eNOS), hsp90, and caveolin-1 complex in vitro: evidence that hsp90 facilitates calmodulin stimulated displacement of eNOS from caveolin-1. *J Biol Chem* 2000; 275(29): 22268-72.
138. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003; 284: R1-12.
139. Hayden MR, Tyagi SC. Is type 2 diabetes mellitus a vascular disease (atheroscleropathy) with hyperglycemia a late manifestation? The role of NOS, NO, and redox stress. *Cardiovasc Diabetol* 2003; 2: 2.
140. Isenović E, Soskić S, Dungen HD, Dobutovic B, Tahirovic E, Simone I et al. Regulation of endothelial nitric oxide synthase in pathophysiological conditions. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2011; 11(2): 109-18.
141. List BM, Klösch B, Völker C, Gorren ACF, Sessa W, Werner ER et al. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. *Biochem J* 1997; 323:159-65.
142. Venema RC, Ju H, Zou R, Ryan JW, Venema VJ. Subunit interactions of endothelial nitric-oxide synthase. Comparisons to the neuronal and inducible nitric-oxide synthase isoforms. *J Biol Chem* 1997; 272: 1276-82.
143. Sudar E, Obradovic M, Zafirovic S, Soskic S, Knezevic-Rajic I, Isenovic RE. Uloga ERK1/2 i AKT u regulaciji ekspresije i aktivnosti eNOS i iNOS u kardiovaskularnom sistemu. *Medicinska istraživanja* 2012; 46(3): 35-42.
144. Xu X, Wollenberger U, Qian J, Lettau K, Jung C, Liu S. Electrochemically driven biocatalysis of the oxygenase domain of neuronal nitric oxide synthase in indium tin oxide nanoparticles/polyvinyl alcohol nanocomposite. *Bioelectrochemistry* 2013; 94: 7-12.
145. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; 298: 249-58.

146. Karuppiyah K, Druhan LJ, Chen CA, Smith T, Zweier J L, Sessa WC et al. Suppression of eNOS-derived superoxide by caveolin-1: a biopterin-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301: H903-11.
147. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol* 2003; 199: 8-17.
148. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; 87: 315-424.
149. Nathan CF. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992; 6: 3051-64.
150. Feldman PL, Griffith OW, Stuehr DJ. The surprising life of nitric oxide. *Chem Eng News* 1993; 71: 26-39.
151. Ignarro LJ, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246: 218-26.
152. Mizuno Y, Isotani E, Huang J, Ding H, Stull JT, Kamm KE. Myosin light chain kinase activation and calcium sensitization in smooth muscle in vivo. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295(2): C358-64.
153. Ding HL, Ryder JW, Stull JT, Kamm KE. Signaling processes for initiating smooth muscle contraction upon neural stimulation. *J Biol Chem* 2009; 284(23): 15541-8.
154. Yan ZQ, Yokota T, Zhang W, Hansson GK. Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restore blood flow in the injured artery. *Circ Res* 1996; 79: 38-44.
155. Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* 1999; 84(9): 1020-31.
156. Strijdom H, Chamane N, Lochner A. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovasc J Afr* 2009; 20: 303-10.

157. Billiar TR. Nitric oxide. Novel biology with clinical relevance. *Ann Surg* 1995; 221: 339-49.
158. Murad F, Waldman S, Molina C, Bennett B, Leitman D. Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Prog Clin Biol Res* 1987; 249: 65-76.
159. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3: 2007-18.
160. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2006; 147 (1): S193-201.
161. Smith JA, Shah AM, Lewis MJ. Factors released from endocardium of the ferret and pig modulates myocardial contraction. *J Physiol* 1991; 439: 1-14.
162. Ziolo MT, Kohr MJ, Wang H. Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 45(5): 625-32.
163. Osei SY, Ahima RS, Fabry ME, Nagel RL, Bank N. Immunohistochemical localization of hepatic nitric oxide synthase in normal and transgenic sickle cell mice: the effect of hypoxia. *Blood* 1996; 88: 3583-8.
164. Singh S, Evans TW. Nitric oxide, the biological mediator of the decade: fact or fiction? *Eur Respir J* 1997; 10: 699-707.
165. Li J, Billiar TR. Nitric Oxide. IV. Determinants of nitric oxide protection and toxicity in liver. *Am J Physiol* 1999; 276: G1069-73.
166. Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 2010; 23: 75-93.
167. Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 532-43.
168. Mohan P, Sys SU, Brutsaert DL. Positive inotropic effect of nitric oxide in myocardium. *Int J Cardiol* 1995; 50: 233-7.

169. Heusch P, Aker S, Boengler K, Deindl E, van de Sand A, Klein K, et al. Increased inducible nitric oxide synthase and arginase II expression in heart failure: no net nitrite/nitrate production and protein S-nitrosylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010; 299: H446-53.
170. Brown MD, Sacks DB. Protein scaffolds in MAP kinase signaling. *Cellular Signaling* 2009; 21: 462-9.
171. Morbidelli L, Donnini S, Ziche M. Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 521-30.
172. Umar S, van der Laarse A. Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol Cell Biochem* 2010; 333: 191-201.
173. Damy T, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G et al. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet* 2004; 363: 1365-7.
174. Chatterjee A, Black SM, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol* 2008; 49: 134-40.
175. Xu J, Xie Z, Reece R, Pimental D, Zou MH. Uncoupling of endothelial nitric oxidase synthase by hypochlorous acid: role of NAD(P)H oxidase-derived superoxide and peroxynitrite. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2688-95.
176. Abramson SB, Amin AR, Clancy RM, Attur M. The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2001; 15: 831-45.
177. Erusalimsky JD, Moncada S. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2524-31.
178. van Faassen EE, Bahrami S, Feelisch M, Hogg N, Kelm M, Kim-Shapiro DB et al. Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology. *Med Res Rev* 2009; 29(5): 683-741.
179. Kozlov AV, Staniek K, Nohl H. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett* 1999; 454: 127-30.

180. Larsen FJ, Weitzberg E, Lundberg JO, Ekblom B. Effects of dietary nitrate on oxygen cost during exercise. *Acta Physiol (Oxf)* 2007; 191(1): 59-66.
181. Shiva S, Sack MN, Greer JJ, Duranski M, Ringwood LA, Burwell L et al. Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med* 2007; 204(9): 2089-102.
182. Yu Q, Gao F, Ma XL. Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2011; 89: 516-24.
183. Vargas F, Fernandez-Rivas A, Osuna A. Effects of methimazole in the early and established phases of L-NAME hypertension. *EJE* 1996; 135: 506-13.
184. Vargas F, Moreno JM, Wangenstein R, Rodriguez-Gomez I, Garcia-Estan J. The endocrine system in chronic nitric oxide deficiency. *EJE* 2007; 156: 1-12.
185. Vargas F, Moreno JM, Rodriguez-Gomez I, Wangenstein R, Osuna A. Vascular and renal function in experimental thyroid disorders. *EJE* 2006; 154: 197-212.
186. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander TW et al. Regulation of endothelial cells nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 1995; 269: C1371-8.
187. Xiao Z, Zhang Z, Ranjan V, Diamond SL. Shear stress induction of the endothelial nitric oxide synthase gene is calcium dependent but not calcium-activated. *J Cell Physiol* 1997; 171: 205-11.
188. Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M et al. Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res* 1995; 76: 536-43.
189. Klein I. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *Am J Med* 1990; 88: 631-7.
190. Delp MD, McAllister RM, Laughlin MH. Exercise training alters aortic vascular reactivity in hypothyroid rats. *Am J Physiol* 1995; 268: H1428-35.

191. Moreno JM, Wangenstein R, Sainz J, Rodriguez-Gomez I, Chamorro V, Osuna A et al. Role of endothelium-derived relaxing factors in the renal response to vasoactive agents in hypothyroid rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285: E182-8.
192. Vargas F, Fernandez-Rivas A, Garcia-Estan J, Garcia del Rio C. Endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilatation in hyperthyroid and hypothyroid rats. *Pharmacology* 1995; 51: 308-14.
193. McAllister RM, Luther KL, Pfeifer PC. Thyroid status and response to endothelin-1 in rat arterial vessels. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E252-8.
194. Grieve DJ, Fletcher S, Pitsillides AA, Botham KM, Elliot J. Effects of oral propylthiouracil treatment on nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol* 1999; 127:1-8.
195. Vargas F, Osuna A, Fernandez-Rivas A. Vascular reactivity and flow-pressure curve in isolated perfused kidneys from L-NAME hypertensive rats. *J Hypertens* 1996; 14: 373-9.
196. Quesada A, Sainz J, Wangenstein R, Rodriguez-Gomez I, Vargas F, Osuna A. Nitric oxide synthase activity in hyperthyroid and hypothyroid rats. *EJE* 2002; 147: 117-22.
197. Ueta Y, Levy A, Chowdrey HS, Lightman SL. Hypothalamic nitric oxide synthase gene expression is regulated by thyroid hormones. *Endocrinology* 1995; 136: 4182-7.
198. Viridis A, Colucci R, Fornai M, Polini A, Daghini E, Duranti E et al. Inducible nitric oxide synthase is involved in endothelial dysfunction of mesenteric small arteries from hypothyroid rats. *Endocrinology* 2009; 150(2): 1033-42.
199. Colin IM, Kopp P, Zbären J, Häberli A, Grizzle WE, Jameson LJ. Expression of nitric oxide synthase III in human thyroid follicular cell: evidence for increased expression in hyperthyroidism. *EJE* 1997; 136: 649-55.
200. Kasai K, Hattori Y, Nakanishi N, Manaka K, Banba N, Motohashi S et al. Regulation of inducible nitric oxide production by cytokines in human thyrocytes in culture. *Endocrinology* 1995; 136: 4261-70.



201. Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 156-7.
202. Lundberg JO, Gladwin MT, Ahluwalia A, Benjamin N, Bryan NS, Butler A et al. Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics. *Nat Chem Biol* 2009; 5: 865-9.
203. Zweier JL, Wang P, Samouilov A, Kuppusamy P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med* 1995; 1: 804-9.
204. Benjamin N, O'Driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M et al. Stomach NO synthesis. *Nature* 1994; 368: 502.
205. Zuckerbraun BS, George P, Gladwin MT. Nitrite in pulmonary arterial hypertension: therapeutic avenues in the setting of dysregulated arginine/nitric oxide synthase signaling. *Cardiovasc Res* 2011; 89: 542-52.
206. Lundberg JO, Govoni M. Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 395-400.
207. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *NEJM* 1993; 329: 2002-12.
208. Gladwin MT, Ognibene FP, Pannell LK, Nichols JS, Pease-Fye ME, Shelhamer JH et al. Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9943-8.
209. Shiva S, Wang X, Ringwood LA, Xu X, Yuditskaya S, Annavajjhala V et al. Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis. *Nat Chem Biol* 2006; 2: 486-93.
210. Lundberg JO, Weitzberg E, Cole JA, Benjamin N. Nitrate, bacteria and human health. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2: 593-602.
211. Wennmalm A, Benthin G, Edlund A, Kiele-Jensen N, Lundin S, Petersson A-S et al. Nitric oxide synthesis and metabolism in man. *Ann NY Acad Sci* 1994; 714: 158-64.

212. Gladwin MT, Schechter AN, Kim-Shapiro DB, Patel RP, Hogg N, Shiva S et al. The emerging biology of the nitrite anion. *Nat Chem Biol* 2005; 1: 308-14.
213. Kelm M, Preik-Steinhoff H, Preik M, Strauer BE. Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. *Cardiovasc Res* 1999; 41: 765-72.
214. Rassaf T, Feelisch M, Kelm M. Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 413-22.
215. Crawford JH, Chacko BK, Pruitt HM, Piknova B, Hogg N, Patel RP. Transduction of NO-bioactivity by the red blood cells in sepsis: novel mechanisms of vasodilation during acute inflammatory disease. *Blood* 2004; 104: 1375-82.
216. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Jax T, Kerber S, Gharini P et al. Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 295-302.
217. Lundberg JO, Weitzberg E, Lundberg JM, Alving K. Intra-gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut* 1994; 35: 1543-6.
218. Duncan C, Dougall H, Johnston P, Green S, Brogan R, Leifert C et al. Chemical generation of nitric oxide in the mouth from the enterosalivary circulation of dietary nitrate. *Nat Med* 1995; 1: 546-51.
219. Lundberg JO, Feelisch M, Bjorne H, Jansson EA, Weitzberg E. Cardioprotective effects of vegetables: is nitrate the answer? *Nitric Oxide* 2006; 15: 359-62.
220. Sobko T, Reinders CI, Jansson EA, Norin E, Midtvedt T, Lundberg JO. Gastrointestinal bacteria generate nitric oxide from nitrate and nitrite. *Nitric Oxide* 2005; 13: 272-8.
221. Lundberg JO, Carlsson S, Engstrand L, Morcos E, Wiklund NP, Weitzberg E. Urinary nitrite: more than a marker of infection. *Urology* 1997; 50: 189-91.

222. Weller R, Patullo S, Smith L, Golden M, Ormerod A, Benjamin N. Nitric oxide is generated on the skin surface by the reduction of sweat nitrate. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 327-31.
223. Nagababu E, Ramasamy S, Abernethy DR, Rifkind JM. Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction. *J Biol Chem* 2003; 278: 46349-56.
224. Carlsson S, Wiklund NP, Engstrand L, Weitzberg E, Lundberg JO. Effects of pH, nitrite, and ascorbic acid on nonenzymatic nitric oxide generation and bacterial growth in urine. *Nitric Oxide* 2001; 5: 580-6.
225. Gago B, Lundberg JO, Barbosa RM, Laranjinha J. Red wine-dependent reduction of nitrite to nitric oxide in the stomach. *Free Radical Biol Med* 2007; 43: 1233-42.
226. Godber BL, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R et al. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyze by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* 2000; 275: 7757-63.
227. Rassaf T, Flögel U, Drexhage C, Hendgen-Cotta U, Kelm M, Schrader J. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circ Res* 2007; 100: 1749-54.
228. Bjorne HH, Petersson J, Phillipson L, Weitzberg E, Holm L, Lundberg JO. Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness. *J Clin Invest* 2004; 113: 108-14.
229. Bjorne HH, Weitzberg E, Lundberg JO. Intra-gastric generation of antimicrobial nitrogen oxides from saliva- physiological and therapeutic considerations. *Free Radical Biol Med* 2006; 41: 1404-12.
230. Petersson J, Phillipson M, Jansson EA, Patzak A, Lundberg JO, Holm L. Dietary nitrate increases gastric mucosal blood flow and mucosal defense. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G718-24.

231. Webb A, Bond R, McLean P, Uppal R, Benjamin N, Ahluwalia A. Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia- reperfusion damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 13683-8.
232. Dezfulian C, Raat N, Shiva S, Gladwin MT. Role of the anion nitrite in ischemia-reperfusion cytoprotection and therapeutics. *Cardiovasc Res* 2007; 75: 327-38.
233. Bryan NS, Rassaf T, Maloney RE, Rodriguez CM, Saijo F, Rodriguez JR et al. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: An insight into their nature and kinetics *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4308-13.
234. Bryan NS, Fernandez BO, Bauer S, Garcia-Saura MF, Milsom AB, Rassaf T et al. Nitrite is signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissue. *Nature Chem Biol* 2005; 1: 290-7.
235. Quyyumi AA. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. *Am J Med* 1998; 105(1A): 32-9S.
236. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H985-1002.
237. Davidovic L, Vodenicharov M, Affar EB, Poirer GG. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism. *Exp Cell Res* 2001; 268: 7-13.
238. Taddei S, Caraccio N, Viridis A, Dardano A, Versari D, Ghiadoni L et al. Low-grade systemic inflammation causes endothelial dysfunction in patients with Hashimoto's thyroiditis. *JCEM* 2006; 91: 5076-82.
239. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *NEJM* 1999; 340: 115-26.
240. Suwaidi JA, Hamasaki S, Higano ST, Nishimura RA, Holmes DR Jr, Lerman A. Long term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 2000; 101: 948-54.

241. Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000; 101: 1899-906.
242. Anderson TJ. Assessment and treatment of endothelial dysfunction in humans. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34: 631-8.
243. Escobales N, Crespo MJ. Oxidative-nitrosative stress in hypertension. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3: 231-46.
244. Linke A, Recchia F, Zhang X, Hintze TH. Acute and chronic endothelial dysfunction: indication for the development of heart failure. *Heart Fail Rev* 2003; 8: 87-97.
245. Wolin MS. Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation* 1996; 3: 1-17.
246. Pacher P, Szabo C. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6:136-41.
247. Ungvari Z, Gupte SA, Recchia FA, Batkai MJ, Pacher P. Role of oxidative-nitrosative stress and downstream pathways in various forms of cardiomyopathy and heart failure. *Curr Vasc Pharmacol* 2005; 3: 221-9.
248. Landmesser U, Drexler H. The clinical significance of endothelial dysfunction. *Curr Opin Cardiol* 2005; 20: 547-51.
249. Zago AS, Zanesco A. Nitric oxide, cardiovascular disease and physical exercise. *Arq Bras Cardiol* 2006; 87: e260-6.
250. Flammer AJ, Lüscher TF. Three decades of endothelium research: from the detection of nitric oxide to the everyday implementation of endothelial function measurements in cardiovascular diseases. *Swiss Med Wkly* 2010; 140: w13122.
251. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch Pharm Res* 2009; 32: 1103-8.

252. Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, Grote K, Schieffer B. How much is too much? Interleukin-6 and its signaling in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2009; 102: 215-22.
253. Aust G, Heuer M, Laue S, Lehmann I, Hoffmann A, Heldin NE et al. Expression of tumor necrosis factor- alpha mRNA and protein in pathological thyroid tissue and carcinoma cell lines. *Clin Exp Immunol* 1996; 105: 148-54.
254. Kharbanda RK, Walton B, Allen M, Klein N, Hingorani AD, MacAllister RJ et al. Prevention of inflammation-induced endothelial dysfunction: a novel vasculo-protective action of aspirin. *Circulation* 2002; 105: 2600-4.
255. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cook JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; 99: 3092-5.
256. Jialal I, Devaraj S, Venugopal SK. C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis? *Hypertension* 2004; 44: 6-11.
257. Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4651-5.
258. Kolluru GK, Siamwala JH, Chatterjee S. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie* 2010; 92: 1186-98.
259. Aji W, Ravalli S, Szabolcs M, Jiang XC, Sciacca RR, Michler RE et al. L-arginine prevents xanthoma development and inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. *Circulation* 1997; 95: 430-7.
260. Böger RH, Bode-Böger SM, Brandes RP, Phivthong-ngam L, Böhme M, Nafe R et al. Dietary L-arginine reduces the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits: comparison with lovastatin. *Circulation* 1997; 96: 1282-90.
261. Tiefenbacher CP, Blecke T, Vahl C, Amann K, Vogt A, Kübler W. Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation* 2000; 102: 2172-9.

262. Wang BY, Candipan RC, Arjomandi M, Hsiun PT, Tsao PS, Cooke JP. Arginine restores nitric oxide activity and inhibits monocyte accumulation after vascular injury in hypercholesterolemic rabbits. *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 1573-9.
263. Dickey RA, Wartofsky L, Feld S. Optimal thyrotropin level: normal ranges and reference intervals are not equivalent. *Thyroid* 2005; 15(9): 1035-9.
264. Stockigt J. Testing the bioavailability of oral L-thyroxine by studying its absorption: smoke or mirrors? *Thyroid* 2004; 14(3): 167-8.
265. Wiersinga WM. Thyroid hormone replacement therapy. *Horm Res* 2001; 56(Suppl1): 74-81.
266. Klein I, Danzi S. Evaluation of the therapeutic efficacy of different levothyroxine preparations in the treatment of human thyroid disease. *Thyroid* 2003; 13(12): 1127-32.
267. Demers LM, Spencer CA. Laboratory medicine practice guidelines: Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 58(2): 138-40.
268. Drucker DJ, Burrow GN. Cardiovascular surgery in the hypothyroid patient. *Arch Intern Med* 1985; 145: 1585-7.
269. Ladenson PW, Levin AA, Ridgway EC, Daniels GH. Complications of surgery in hypothyroid patients. *Am J Med* 1984; 77: 261-6.
270. Bernstein R, Müller C, Midtbo K, Smith G, Haug E, Hertenberg L. Silent myocardial ischemia in hypothyroidism. *Thyroid* 1995; 5: 443-7.
271. Wartofsky L. Levothyroxine therapy for hypothyroidism. Should we abandon conservative dosage titration? *Arch Intern Med* 2005; 165: 1683-4.
272. Ross A, Linn-Rasker SP, van Domburg RT, Tijssen JP, Berghout A. The starting dose of levothyroxine in primary hypothyroidism treatment: a prospective, randomized, double-blind trial. *Arch Intern Med* 2005; 165: 1714-20.

273. Sawin CT, Geller A, Wolf PA, Belanger AJ, Baker E, Bacharach P et al. Low serum thyrotropin concentrations as a risk factor for atrial fibrillation in older patients. *N Engl J Med* 1994; 331: 1249-52.
274. Roberts CGP, Ladenson PW. Hypothyroidism. *Lancet* 2004; 363: 793-803.
275. Woeber KA. Update on the management of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Arch Intern Med* 2000; 160: 1067-71.
276. Ross DS. Serum thyroid-stimulating hormone measurement for assessment of thyroid function and disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2001; 30: 245-64.
277. Imaizumi M, Sera N, Ueki I, Horie I, Ando T, Usa T et al. Risk for progression to overt hypothyroidism in an elderly Japanese population with subclinical hypothyroidism. *Thyroid* 2011; 21: 1177-82.
278. Ochs N, Auer R, Bauer DC, Nanchen D, Gussekloo J, Cornuz J et al. Meta-analysis: subclinical thyroid dysfunction and the risk for coronary heart disease and mortality. *Ann Intern Med* 2008; 148: 832-45.
279. Atzmon G, Barzilai N, Surks MI, Gabriely I. Genetic predisposition to elevated serum thyrotropin is associated with exceptional longevity. *JCEM* 2009; 94: 4768-75.
280. Parle J, Roberts L, Wilson S, Pattison H, Roalfe A, Haque MC et al. Randomized controlled trial of the effect of thyroxine replacement on cognitive function in community-living elderly subjects with subclinical hypothyroidism: the Birmingham elderly thyroid study. *JCEM* 2010; 95(8): 3623-32.
281. Barbe F, Klein M, Chango A, Fremont S, Gerard P, Weryha G et al. Homocysteine, folate, vitamin B12, and transcobalamins in patients undergoing successive hypo- and hyperthyroid states. *JCEM* 2001; 86: 1845-6.
282. Garber AM, Browner WS, Hulley SB. Clinical guideline, part 2: cholesterol screening in asymptomatic adults, revisited. *Ann Intern Med* 1996; 124: 518-31.



283. Razvi S, Ingoe L, Keeka G, Oates C, McMillan C, Weaver JU. The beneficial effect of L-thyroxine on cardiovascular risk factors, endothelial function, and quality of life in subclinical hypothyroidism: randomized, crossover trial. *JCEM* 2007; 92: 1715-23.
284. Baskol G, Atmaca H, Tanriverdi F, Baskol M, Kocer D, Bayram F. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with hypothyroidism before and after treatment. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007; 115: 522-6.
285. Gokce N, Keaney Jr JF, Hunter LM, Watkins MT, Menzoian JO, Vita JA. Risk stratification for postoperative cardiovascular events via noninvasive assessment of endothelial function: a prospective study. *Circulation* 2002; 105:1567-72.
286. Pyke KE, Tschakovsky ME. The relationship between shear stress and flow-mediated dilatation: implications for the assessment of endothelial function. *J Physiol* 2005; 568: 357-69.
287. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 168-75.
288. Zanchetti A, Bond MG, Hennig M, Neiss A, Mancia G, Dal Palu C et al. Risk factors associated with alterations in carotid intima-media thickness in hypertension: baseline data from the European lacidipine study on Atherosclerosis. *J Hypertens* 1998; 16: 949-61.
289. Martínez-Triguero ML, Hernández-Mijares A, Nguyen TT, Muñoz ML, Peña H, Morillas C et al. Effect of thyroid hormone replacement on lipoprotein(a), lipids, and apolipoproteins in subjects with hypothyroidism. *Mayo Clin Proc* 1998; 73: 837-41.
290. Lindeman RD, Romero LJ, Schade DS, Wayne S, Baumgartner RN, Garry PJ. Impact of subclinical hypothyroidism on serum total homocysteine concentrations, the prevalence of coronary heart disease (CHD), and CHD risk factors in the New Mexico Elder Health Survey. *Thyroid* 2003; 13:595-600.
291. Dernellis J, Panaretou MP. Effects of thyroid replacement therapy on arterial blood pressure in patients with hypertension and hypothyroidism. *Am Heart J* 2002; 143: 718-24.
292. Perk M, O'Neill BJ. The effect of thyroid hormone therapy on angiographic coronary artery disease progression. *Can J Cardiol* 1997; 13: 273-6.

293. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry* 1972; 18(6): 499–502.
294. Hevel JM, Marletta MA. Nitric-oxide synthase assays. *Methods Enzymol* 1994; 233: 250-8.
295. Griess P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt „Ueber einige azoverbindungen“. *Chem Ber* 1879; 12: 426-8.
296. Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* 1986; 78(1): 1-5.
297. McAllister RM, Albarracin I, Price EM, Smith TK, Turk JR, Wyatt KD. Thyroid status and nitric oxide in rat arterial vessels. *J Endocrinol* 2005; 185(1): 111-9.
298. Uribe RM, Cisneros M, Vargas MA, Lezama L, Cote-Velez A, Joseph-Bravo P et al. The systemic inhibition of nitric oxide production rapidly regulates TRH mRNA concentration in the paraventricular nucleus of the hypothalamus and serum TSH concentration. *Studies in control and cold-stressed rats. Brain Res* 2011; 1367: 188-97.
299. Arikan E, Karadag CH, Guldiken S. Asymmetric dimethylarginine levels in thyroid diseases. *J Endocrinol Invest* 2007; 30(3): 186-91.
300. Vicinanza R, Coppotelli G, Malacrino C, Nardo T, Buchetti B, Lenti L et al. Oxidized low-density lipoproteins impair endothelial function by inhibiting non-genomic action of thyroid hormone-mediated nitric oxide production in human endothelial cells. *Thyroid* 2013; 23(2): 231-8.
301. Pucci E, Chiovato L, Pinchera A. Thyroid and lipid metabolism. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24(Suppl 2): S109-12.
302. Jung CH, Sung KC, Shin HS, Rhee EJ, Lee WY, Kim BS et al. Thyroid dysfunction and their relation to cardiovascular risk factors such as lipid profile, hsCRP, and waist hip ratio in Korea. *Korean J Intern Med* 2003; 18(3): 146-53.

303. Walsh JP, Bremner AP, Bulsara MK, O'leary P, Leedman PJ, Feddema P et al. Thyroid dysfunction and serum lipids: a community-based study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63(6): 670-5.
304. Iqbal A, Jorde R, Figenschau Y. Serum lipid levels in relation to serum thyroid-stimulating hormone and the effect of thyroxine treatment on serum lipid levels in subjects with subclinical hypothyroidism: the Tromso Study. *J Intern Med* 2006; 260(1): 53-61.
305. Hanna AN, Titterington LC, Lantry LE, Stephens RE, Newman HA. Thyronines and probucol inhibition of human capillary endothelial cell-induced low density lipoprotein oxidation. *Biochem Pharmacol* 1995; 50(10): 1627-33.
306. Benvenga S, Robbins J. Enhancement of thyroxine entry into low density lipoprotein (LDL) receptor-competent fibroblasts by LDL: an additional mode of entry of thyroxine into cells. *Endocrinology* 1990; 126(2): 933-41.
307. Xu, C, Yang X, Liu W, Yuan H, Yu C, Gao L et al. Thyroid stimulating hormone, independent of thyroid hormone, can elevate the serum total cholesterol level in patients with coronary heart disease: a cross-sectional design. *Nutr Metab (Lond)* 2012; 9(1): 44.
308. Chakera AJ, Pearce SSH, Vaidya B. Treatment for primary hypothyroidism: current approaches and future possibilities. *Drug Des Devel Ther* 2012; 6: 1-11.
309. Fatourech V. Subclinical hypothyroidism: an update for primary care physicians. *Mayo Clin Proc* 2009; 84(1): 65-71.
310. Cooper DS. Subclinical thyroid disease: consensus or conundrum? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60(4): 410-2.
311. Cooper DS. Clinical practice. Subclinical hypothyroidism. *NEJM* 2001; 345(4): 260-5.
312. Ayala AR, Danese MD, Ladenson PW. When to treat mild hypothyroidism. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2000; 29(2): 399-415.

313. Gharib H, Tuttle RM, Baskin HJ, Fish LH, Singer PA, McDermott MT; American Association of Clinical Endocrinologists; American Thyroid Association; Endocrine Society. Consensus Statement #1: Subclinical thyroid dysfunction: a joint statement on management from the American Association of Clinical Endocrinologists, the American Thyroid Association, and The Endocrine Society. *Thyroid* 2005; 15(1): 24-8; response 32-3.
314. Zordoky BN, Robertson IM, Dyck JR. Preclinical and clinical evidence for the role of resveratrol in the treatment of cardiovascular diseases. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852(6): 1155-77.
315. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E. Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* 2014; 114(12): 1852-66.
316. Vogel TR, Dombrovskiy VY, Galiñanes EL, Kruse RL. Preoperative statins and limb salvage after lower extremity revascularization in the Medicare population. *Circ Cardiovasc Interv* 2013; 6(6): 694-700.
317. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 15th ed. New York: McGraw-Hill Medical; 2001.
318. Rizos CV, Elisaf MS, Liberopoulos EN. Effects of thyroid dysfunction on lipid profile. *Open Cardiovasc Med J* 2011; 5: 76-84.
319. Lepšanović L, Lepšanović Lj, eds. *Klinička lipidologija*. Beograd: Savremena administracija; 2000.
320. Stone NJ. Secondary causes of hyperlipidemia. *Med Clin North Am* 1994; 78(1): 117-41.
321. Tanis BC, Westendorp GJ, Smelt HM. Effect of thyroid substitution on hypercholesterolaemia in patients with subclinical hypothyroidism: a reanalysis of intervention studies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996; 44(6): 643-9.
322. Ichiki T. Thyroid hormone and atherosclerosis. *Vascul Pharmacol* 2010; 52(3-4): 151-6.

323. Lu M, Yang CB, Gao L, Zhao JJ. Mechanism of subclinical hypothyroidism accelerating endothelial dysfunction (Review). *Exp Ther Med* 2015; 9(1): 3-10.
324. Hammed IH. Subclinical hypothyroidism and central adiposity. *Iraqi Postgrad Med J* 2012; 11(3): 423-9.
325. Iervasi G, Molinaro S, Landi P, Taddei MC, Galli E, Mariani F et al. Association between increased mortality and mild thyroid dysfunction in cardiac patients. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1526-32.
326. Lin SY, Wang YY, Liu PH, Lai WA, Sheu WH. Lower serum free thyroxine levels are associated with metabolic syndrome in a Chinese population. *Metabolism* 2005; 54: 1524-8.
327. Sari R, Balci MK, Altunbas H, Karayalcin U. The effect of body weight and weight loss on thyroid volume and function in obese women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 59: 258-62.
328. Mentuccia D, Proietti-Pannunzi L, Tanner K, Bacci V, Pollin TI, Poehlman ET et al. Association between a novel variant of the human type 2 deiodinase gene Thr92Ala and insulin resistance: evidence of interaction with the Trp64Arg variant of the beta-3-adrenergic receptor. *Diabetes* 2002; 51: 880-3.
329. Mantzoros CS, Rosen HN, Greenspan SL, Flier JS, Moses AC. Short-term hyperthyroidism has no effect on leptin levels in man. *JCEM* 1997; 82: 497-9.
330. Chubb SA, Davis WA, Davis TME. Interactions among thyroid function, insulin sensitivity, and serum lipid concentrations: the Fremantle diabetes study. *JCEM* 2005; 90: 5317-20.
331. Weiss RE, Brown RL. Doctor ... could it be my thyroid? *Arch Intern Med* 2008; 168: 568-9.
332. Reinehr T. Obesity and thyroid function. *Mol Cell Endocrinol* 2010;316:165-71.
333. Duntas LH. Thyroid disease and lipids. *Thyroid* 2002; 12(4): 287-93.

334. Wang F, Tan Y, Wang C, Zhang X, Zhao Y, Song X et al. Thyroid-stimulating hormone levels within the reference range are associated with serum lipid profiles independent of thyroid hormones. *JCEM* 2012; 97(8): 2724-31.
335. Efstathiadou Z, Bitsis S, Milionis HJ, Kukuvtis A, Bairaktari ET, Elisaf MS et al. Lipid profile in subclinical hypothyroidism: is L-thyroxine substitution beneficial? *Eur J Endocrinol* 2001; 145(6): 705-10.
336. Luboshitzky R, Aviv A, Herer P, Lavie L. Risk factors for cardiovascular disease in women with subclinical hypothyroidism. *Thyroid* 2002; 12(5): 421-5.
337. Al-Tonsi AA, Abdel-Gayoum AA, Saad M. The secondary dyslipidemia and deranged serum phosphate concentration in thyroid disorders. *Exp Mol Pathol* 2004; 76(2): 182-7.
338. Brenta G, Berg G, Arias P, Zago V, Schnitman M, Muzzio ML et al. Lipoprotein alterations, hepatic lipase activity, and insulin sensitivity in subclinical hypothyroidism: response to L-T(4) treatment. *Thyroid* 2007; 17(5): 453-60.
339. Hueston WJ, Pearson WS. Subclinical hypothyroidism and the risk of hypercholesterolemia. *Ann Fam Med* 2004; 2(4): 351-5.
340. Teixeira Pde F, Reuters VS, Ferreira MM, Almeida CP, Reis FA, Buescu A et al. Lipid profile in different degrees of hypothyroidism and effects of levothyroxine replacement in mild thyroid failure. *Transl Res* 2008; 151(4): 224-31.
341. Arikan S, Bahceci M, Tuzcu A, Celik F, Gokalp D. Postprandial hyperlipidemia in overt and subclinical hypothyroidism. *Eur J Intern Med* 2012; 23(6): e141-5.
342. Hernández-Mijares A, Jover A, Bellod L, Bañuls C, Solá E, Veses S et al. Relation between lipoprotein subfractions and TSH levels in the cardiovascular risk among women with subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2013; 78(5): 777-82.
343. Huesca-Gomez C, Franco M, Luc G, Montañó L, Massó F, Posadas-Romero C et al. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism* 2002; 51(4): 443-50.

344. Milionis HJ, Tambaki AP, Kanioglou CN, Elisaf MS, Tselepis AD, Tsatsoulis A. Thyroid substitution therapy induces high-density lipoprotein-associated platelet-activating factor-acetylhydrolase in patients with subclinical hypothyroidism: a potential antiatherogenic effect. *Thyroid* 2005; 15(5): 455-60.
345. Toruner F, Altinova AE, Karakoc A, Yetkin I, Ayvaz G, Cakir N et al. Risk factors for cardiovascular disease in patients with subclinical hypothyroidism. *Adv Ther* 2008; 25(5): 430-7.
346. Erdem TY, Ercan M, Ugurlu S, Balci H, Acbay O, Gundogdu S. Plasma viscosity, an early cardiovascular risk factor in women with subclinical hypothyroidism. *Clin Hemorheol Microcirc* 2008; 38(4): 219-25.
347. Asranna A, Taneja RS, Kulshreshta B. Dyslipidemia in subclinical hypothyroidism and the effect of thyroxine on lipid profile. *Indian J Endocrinol Metab* 2012; 16(Suppl 2): S347-9.
348. Harder H, Dinesen B, Astrup A. The effect of a rapid weight loss on lipid profile and glycemic control in obese type 2 diabetic patients. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28(1): 180-2.
349. Okęcka-Szymańska J, Hübner-Woźniak E, Piątkowska I, Malara M. Effects of age, gender and physical activity on plasma lipid profile. *Biomedical Human Kinetics* 2011; 3: 1-5.
350. Palmieri EA, Fazio S, Lombardi G, Biondi B. Subclinical hypothyroidism and cardiovascular risk: a reason to treat? *Treat Endocrinol* 2004; 3(4): 233-44.
351. Maejima K, Nakano S, Himeno M, Tsuda S, Makiishi H, Ito T. Increased basal levels of plasma nitric oxide in type 2 diabetes subjects. Relationship to microvascular complications. *J Diabetes Complications* 2001; 15: 135-43.
352. Ueyama J, Kondo T, Imai R, Kimata A, Yamamoto K, Suzuki K et al. Association of serum NOx level with clustering of metabolic syndrome components in middle-aged and elderly general populations in Japan. *Environ Health Prev Med* 2008; 13: 36-42.
353. Winlaw DS, Smythe GA, Keogh AM, Schyvens CG, Spratt PM, Macdonald PS. Increased nitric oxide production in heart failure. *Lancet* 1994; 344: 373-4.

354. Ragginer C, Bernecker C, Ainoedhofer H, Pailer S, Kieslinger P, Truschnig-Wilders M et al. Treatment with nitric oxide donor SNP increases triiodothyronine levels in hyper- and hypothyroid Sprague-Dawley rats. *Horm Metab Res* 2013; 45: 808-12.
355. Kumar A, Suresh DR, Annam V, Srikrishna R. Significance of early biochemical markers of atherosclerosis in subclinical hypothyroidism patients with normal lipid profile. *Int J Biol Med Res* 2012; 3(4): 2483-6.
356. Zahedi Asl S, Ghasemi A, Azizi F. Serum nitric oxide metabolites in subjects with metabolic syndrome. *Clin Biochem* 2008; 41(16-17): 1342-7.
357. Stühlinger MC, Abbasi F, Chu JW, Lamendola C, McLaughlin TL, Cooke JP et al. Relationship Between Insulin Resistance and an Endogenous Nitric Oxide Synthase Inhibitor. *JAMA* 2002; 287(11): 1420-1426.
358. Chedraui P, Escobar GS, Ramírez C, Pérez-López FR, Hidalgo L, Mannella P et al. Nitric oxide and pro-inflammatory cytokine serum levels in postmenopausal women with the metabolic syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2012; 28(10): 787-91.
359. Caimi G, Hopps E, Montana M, Noto D, Canino B, Lo Presti R et al. Evaluation of nitric oxide metabolites in a group of subjects with metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr* 2012; 6(3): 132-5.
360. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2): 109-42.
361. Förstermann U, Kleinert H, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Dun NJ. Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types. *Adv Pharmacol* 1995; 34: 171-86.
362. Weinberg JB. Nitric oxide production and nitric oxide synthase type 2 expression by human mononuclear phagocytes: a review. *Mol Med* 1998; 4(9): 557-91.
363. Ghasemi A, Zahediasl S, Azizi F. Reference values for serum nitric oxide metabolites in an adult population. *Clin Biochem* 2010; 43: 89-94.



364. Romitelli F, Santini SA, Chiericia E, Pitocco D, Tavazzia B, Amorini AM et al. Comparison of nitrite/nitrate concentration in human plasma and serum samples measured by the enzymatic batch Griess assay, ion-pairing HPLC and ion-trap GC-MS: The importance of a correct removal of proteins in the Griess assay. *J Chromatograph B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007; 851: 257-67.
365. Watanabe T, Akishita M, Toba K, Kozaki K, Eto M, Sugimoto N et al. Influence of sex and age on serum nitrite/nitrate concentration in healthy subjects. *Clin Chim Acta* 2000; 301: 169-79.
366. Higashino H, Miya H, Mukai H, Miya Y. Serum nitric oxide metabolite (NO<sub>x</sub>) levels in hypertensive patients at rest: a comparison of age, gender, blood pressure and complications using normotensive controls. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2007; 34: 725-31.
367. Olszanecka-Glinianowicz M, Zahorska-Markiewicz B, Janowska J, Zurakowski A. Serum concentrations of nitric oxide, tumor necrosis factor (TNF)-alpha and TNF soluble receptors in women with overweight and obesity. *Metabolism* 2004; 53(10): 1268-73.
368. Gruber HJ, Mayer C, Mangge H, Fauler G, Grandits N, Wilders-Truschnig M. Obesity reduces the bioavailability of nitric oxide in juveniles. *Int J Obes (Lond)* 2008; 32: 826-31.
369. Gao CX, Yang B, Guo Q, Wei LH, Tian LM. High thyroid-stimulating hormone level is associated with the risk of developing atherosclerosis in subclinical hypothyroidism. *Horm Metab Res.* 2015; 47(3): 220-4.
370. Gao CX, Yang B, Guo Q, Wei LH, Tian LM. High thyroid-stimulating hormone level is associated with the risk of developing atherosclerosis in subclinical hypothyroidism. *Horm Metab Res* 2015; 47(3): 220-4.
371. Balzan S, Del Carratore R, Nicolini G, Beffy P, Lubrano V, Forini F et al. Proangiogenic effect of TSH in Human Microvascular Endothelial Cells through Its Membrane Receptor. *JCEM* 2012; 97: 1763-70.

372. Donnini D, Ambesi-Impiombato FS, Curcio F. Thyrotropin stimulates production of procoagulant and vasodilative factors in human aortic endothelial cells. *Thyroid* 2003; 13(6): 517-21.
373. Tian L, Zhang L, Liu J, Guo T, Gao C, Ni J. Effects of TSH on the function of human umbilical vein endothelial cells. *J Mol Endocrinol* 2014; 52: 215-22.
374. Wang Y, Zhong J, Wei W, Gong J, Dong J, Yu F et al. Developmental iodine deficiency and hypothyroidism impair neural development, upregulate caveolin-1, and downregulate synaptotagmin-1 in the rat cerebellum. *Biol Trace Elem Res* 2011; 144: 1039-49.
375. Sarati LI, Martinez CR, Artés N, Arreche N, López-Costa JJ, Balaszczuk AM et al. Hypothyroidism: age-related influence on cardiovascular nitric oxide system in rats. *Metabolism* 2012; 61: 1301-11.
376. Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 2006; 5: 4-22.
377. Tuzcu A, Bahceci M, Gokalp D, Tuzun Y, Gunes K. Subclinical hypothyroidism may be associated with elevated high-sensitive c-reactive protein (low grade inflammation) and fasting hyperinsulinemia. *Endocr J* 2005; 52(1): 89-94.
378. Pearce EN, Bogazzi F, Martino E, Brogioni S, Pardini E, Pellegrini G et al. The prevalence of elevated serum C-reactive protein levels in inflammatory and noninflammatory thyroid disease. *Thyroid* 2003; 13(7): 643-8.
379. Hueston WJ, King DE, Geesey ME. Serum biomarkers for cardiovascular inflammation in subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63(5): 582-7.
380. Tsimihodimos V, Bairaktari E, Tzallas C, Miltiadus G, Liberopoulos E, Elisaf M. The incidence of thyroid function abnormalities in patients attending an outpatient lipid clinic. *Thyroid* 1999; 9(4): 365-8.

381. Miura S, Iitaka M, Yoshimura H, Kitahama S, Fukasawa N, Kawakami Y et al. Disturbed lipid metabolism in patients with subclinical hypothyroidism: effect of L-thyroxine therapy. *Intern Med* 1994; 33(7): 413-7.
382. Nyirenda MJ, Clark DN, Finlayson AR, Read J, Elders A, Bain M. Thyroid disease and increased cardiovascular risk. *Thyroid* 2005; 15(7): 718-24.
383. Franklyn JA, Daykin J, Betteridge J, Hughes EA, Holder R, Jones SR et al. Thyroxine replacement therapy and circulating lipid concentrations. *Clinical Endocrinology* 1993; 38(5): 453-9.
384. Gluvic Z, Sudar E, Tica J, Jovanovic A, Zafirovic S, Tomasevic R et al. Effects of levothyroxine replacement therapy on parameters of metabolic syndrome and atherosclerosis in hypothyroid patients: a prospective pilot study. *IJE* 2015; 147070.
385. Kung AW, Pang RW, Lauder I, Lam KS, Janus ED. Changes in serum lipoprotein(a) and lipids during treatment of hyperthyroidism. *Clin Chem* 1995; 41(2): 226-31.
386. Kung AW, Pang RW, Janus ED. Elevated serum lipoprotein(a) in subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43(4): 445-9.
387. Bauer DC, Ettinger B, Browner WS. Thyroid functions and serum lipids in older women: a population-based study. *Am J Med* 1998; 104(6): 546-51.
388. Diekman MJM, Anghelescu N, Endert E, Bakker O, Wiersinga WM. Changes in plasma low-density lipoprotein (LDL)- and high-density lipoprotein cholesterol in hypo- and hyperthyroid patients are related to changes in free thyroxine, not to polymorphisms in LDL receptor or cholesterol ester transfer protein genes. *JCEM* 2000; 85(5): 1875-62.
389. Stanimirovic J, Obradovic M, Zafirovic S, Resanovic I, Bogdanovic N, Gluvic Z et al. Effects of altered hepatic lipid metabolism in regulation of hepatic iNOS. *Clin Lipidol* 2015; 10(2): 167-75.

# LISTA SKRAĆENICA

**A** – ateroskleroza

**ATPO** – anti tireoperoksidazna

**apoA1** – apolipoprotein A1

**apoB** - apolipoprotein B

**ADMA** – asimetrični dimetil arginin

**BH4** – tetrahidrobiopterin

**BMI** – engl. Body Mass Index – indeks telesne mase

**VCAM-1** –engl. Vascular Cell Adhesion Molecule 1- athezioni molekul vaskularne ćelije 1

**DIMK** - debljina intima-medija kompleksa

**dTA** – dijastolni arterijski pritisak

**EDRF** – engl. Endothelium-Derived Relaxing Factor – faktor relaksacije KS iz endotela

**ED** – endotelna disfunkcija

**eNOS** – engl. Endothelial Nitric Oxide Synthase - endotelna NO sintetaza

**iNOS** – engl. Inducible Nitric Oxide Synthase - inducibilna NO sintetaza

**IL-6** – interleukin 6

**ICAM-1** – engl. Intercellular Adhesion Molecule 1- međućelijski athezioni molekul 1

**kH** – klinički hipotireoidizam

**KVS** – kardiovaskularni sistem

**KV**- kardiovaskularni

**KB** – koronarna bolešt

**KVB** – kardiovaskularna bolešt

**KS** – krvni sud/ovi

**K** – kalmodulin

**LT4**- levotiroksin

**LDL-H** – LDL-holesterol

**Lp(a)** – lipoprotein (a)

**L-NAME** – N-nitro-L-arginin-metilestar

**L-NMMA** – N-monometil-L-arginin

**MCP-1** – engl. Monocyte Chemoattractant Protein 1- monocitni hemoatraktant protein 1

**MMP** – matriksna metaloproteinaza

**NHANES III** – engl. National Health and Nutrition Examination Survey- Istraživanje Javnog zdravlja i ispitivanja ishrane

**NO** – azot oksid

**NOS** – engl. Nitric Oxide Synthetase – sintetaze NO

**nNOS** - engl. Neuronal Nitric Oxide Synthetase - neuronalna sintetaza NO

**NO<sub>2</sub>** – nitriti

**NO<sub>3</sub>** – nitrati

**NO<sub>x</sub>** – NO metaboliti

**NFκB** – engl. Nuclear Factor kapa B – nuklearni faktor kapa B

**NADPH** – nikotinamid dinukleotid

**ORL** – otorinolaringologija

**PET** – pozitron emisiona tomografija

**PKG** – protein kinaza G

**PAI 1** – engl. Plasminogen Activator Inhibitor 1 – inhibitor plazminogenog aktivatora 1

**RNK**- ribonukleinska

**ROS** – engl. Reactive Oxygen Species – slobodni kiseonični radikali

**skH** – supklinički hipotireoidizam

**sTA** – sistolni arterijski pritisak

**SAD** – Sjedinjene američke države

**SI** – srčana insuficijencija

**TSH** – tireotropni hormon

**TT** – telesna težina

**TV** – telesna visina

**T3** – trijodtironin

**TNF- $\alpha$**  – engl. Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  – faktor nekroze tumora  $\alpha$

**TRE** – engl. Thyroid Hormone Response Elements- vezna mesta za tireoidne hormone

**TG** - trigliceridi

**fT4** – enfl. Free Thyroxine – slobodni tiroksin

**FAD** – flavin adenin dinukleotid

**FMN** – flavinmononukleotid

**HDL-H** – HDL- holesterol

**HbA1c** – glikozilirani hemoglobin

**Ca<sup>2+</sup>-ATP-aza** – kalcijum adozintrifosfataza

**CRP** – C reaktivni protein

**cAMP** – ciklični adozinmonofosfat

**cGMP** – ciklični guanozinmonofosfat

**COX-2** – engl. Cyclooxygenase 2 – ciklooksigenaza 2

# BIOGRAFIJA

Dr Zoran Gluvić je rođen 11/09/1972. godine u Zemunu. Medicinski fakultet u Beogradu je upisao je 1992. godine, a diplomirao je 1998. godine, sa srednjom ocenom 9,63. Magistarsku tezu iz oblasti imunologije "Efikasnost antiretrovirusne terapije primenjene po modifikovanim uslovima na tok i prognozu HIV infekcije" odbranio je 2003. godine. Specijalizaciju iz interne medicine započeo je 2000. godine, a specijalistički ispit sa odličnom ocenom položio 2004. godine. Užu specijalizaciju iz endokrinologije započeo 2008. godine, a rad „Merenje simptoma hipotireoidizma primenom bodovnog sistema kod ispitanica supstituisanih levotiroksinom nakon uspostavljenog laboratorijskog eutireoidizma“ odbranio u januaru 2010. godine. Od oktobra 2000. godine zaposlen je na Klinici za internu medicinu KBC Zemun, Služba endokrinologije i dijabetesa i Odeljenje internističke intenzivne nege. Od 2012. godine izabran je u zvanje kliničkog asistenta za predmet interna medicina na Medicinskom fakultetu u Beogradu. Autor je i koautor preko 40 stručnih radova i publikacija, od čega je 19 radova objavljeno *in extenso* u časopisima indeksiranim u JCR/Medline bazama podataka.





Prilog 1.

## Izjava o autorstvu

Potpisani-a Zoran Gluvić

broj upisa \_\_\_\_\_

### Izjavljujem

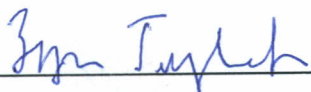
da je doktorska disertacija pod naslovom

**KONCENTRACIJA NITRITA U KRVI KOD OBOLELIH OD HIPOTIREOZE KAO  
PARAMETAR ZA UVOĐENJE SUPSTITUCIONE TERAPIJE**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 10/11/2015.

  
\_\_\_\_\_

Prilog 2.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Zoran Gluvić

Broj upisa \_\_\_\_\_

Studijski program \_\_\_\_\_

Naslov rada KONCENTRACIJA NITRITA U KRVI KOD OBOLELIH OD HIPOTIREOZE  
KAO PARAMETAR ZA UVOĐENJE SUPSTITUCIONE TERAPIJE

Mentor Prof. dr Miloš Žarković

Potpisani Zoran Gluvić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 10/11/2015.

  
\_\_\_\_\_

Prilog 3.

## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

KONCENTRACIJA NITRITA U KRVI KOD OBOLELIH OD HIPOTIREOZE KAO PARAMETAR ZA UVOĐENJE SUPSTITUCIONE TERAPIJE

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poleđini lista).

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 10/11/2015.

