

Analiza podataka o učincima levotiroksina na funkcijske testove štitnjače

Daskijević, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:790769>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Lucija Daskijević

**Analiza podataka o učincima levotiroksina na
određivanje funkcijskih testova štitnjače**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Imunokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju i u Endokrinološkom laboratoriju KBC-a Sestre milosrdnice u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura i dr. sc. Domagoja Marijančevića.

Zahvaljujem doc. dr. sc. Aniti Somborac Bačura i dr. sc. Domagoju Marijančeviću na stručnom vodstvu i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.

Hvala mojim kolegama i prijateljima koji su mi uljepšali studiranje i obogatili ovo razdoblje.

Posebno hvala mojoj obitelji jer su mi uvijek bili najveća podrška.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Štitnjača	1
1.1.1. Anatomija štitnjače	1
1.1.2. Biosinteza hormona štitnjače, metabolizam i fiziološko djelovanje.....	2
1.2. Hipotireoza	5
1.2.1. Uzroci hipotireoze.....	5
1.2.2. Simptomi hipotireoze.....	7
1.3. Laboratorijska dijagnostika hipotireoze	8
1.3.1. Predanalitički čimbenici.....	8
1.3.2. Laboratorijski testovi funkcije štitnjače i klinička primjena.....	10
1.4. Liječenje hipotireoze	12
1.4.1. Terapija levotiroksinom	12
2. Obrazloženje teme	14
3. Materijali i metode	15
3.1. Ispitanici i uzorkovanje	15
3.2. Metode	15
3.2.1. Određivanje TSH	15
3.2.2. Određivanje ukupnog T3 i T4.....	16
3.2.3. Određivanje slobodnog T3 i T4	17
3.3. Statističke metode.....	18
4. Rezultati	19
5. Rasprava	27
6. Zaključak.....	30
7. Literatura	31

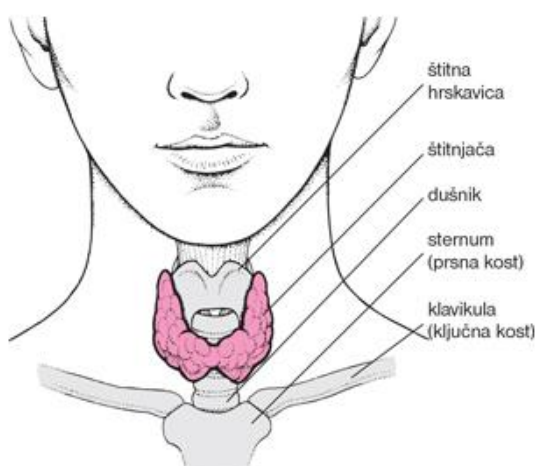
8. Sažetak	33
8.1. Sažetak.....	33
8.2. Summary.....	34
9. Prilozi	35
9.1. Popis kratica	35
10. Temeljna dokumentacijska kartica/ Basic documentation card.....	36

1. Uvod

1.1. Štitnjača

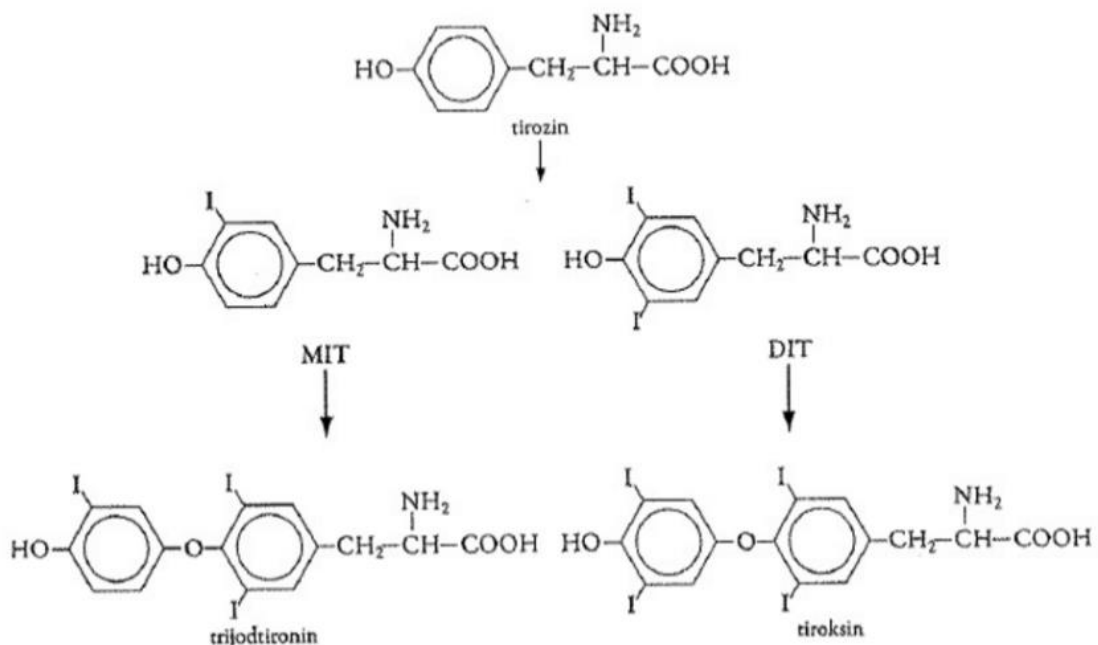
1.1.1. Anatomija štitnjače

Štitnjača (lat. *Glandula thyroidea*) endokrina je žlijezda smještena u prednjem dijelu vrata, ispod hrskavice larinksa. Ima dva režnja, desni i lijevi, odnosno *lobus dexter* i *lobus sinister*, koji su međusobno povezani suženim dijelom, *isthmus glandulae thyroideae*. Sprijeda štitnjača ima oblik slova H gdje okomiti krakovi odgovaraju režnjevima, a vodoravni dio istmusu (Slika 1). Nekada postoji i treći režanj, *lobus piramidalis*, uski tračak žljezdanog tkiva koji se penje do jezične kosti. Štitnjača je obavijena vezivnom ovojnicom, *capsula fibrosa*, koja u dubini žlijezde čini vezivne pregrade, *trabeculae*, a one onda tkivo štitnjače dijele na sitne režnjice, *lobule glandulae thyroideae*. Vezivnim sklopovima stražnja ploha žlijezde povezana je s dušnikom, a od mišića *m. sternothyroideus* odvaja se nekoliko vlakana koji se hvataju na vezivnu ovojnicu žlijezde. Krv dovode dvije parne arterije koje se između vanjske i unutarnje ovojnice razgranjuju u mrežu i njihovi ogranci vezivnim tračcima idu u žljezdano tkivo. Iz kapilarne mreže oko štitnjače prolaze vene koje također preko vezivnih tračaka dolaze na površinu žlijezde i tvore vensku mrežu (Krpmotić-Nemanić i Marušić, 2007).



Slika 1. Smještaj štitnjače, preuzeto s <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/hormonski-poremecaji/poremecaji-stitnjace>

prijenosa jodida i može toliko koncentrirati ione joda da im koncentracija bude 30 puta viša nego u krvi, što se naziva „jodna pumpa“. Zatim slijedi oksidacija jodida u elementarni jod uz enzim peroksidazu i vodikov peroksid koji čine sustav za oksidaciju jodida. Oksidirani oblik joda može se izravno vezati s tirozinom na tireoglobulinu. Svaki tireoglobulin sadrži oko 140 molekula aminokiseline tirozina. Tirozin se najprije jodira u monojodtirozin (MIT), a zatim u dijodtirozin (DIT) (Slika 3). MIT i DIT međusobno se vežu djelovanjem enzima peroksidaze gdje vezanjem dviju molekula DIT-a nastaje tiroksin, a vezanjem jedne molekule DIT-a i jedne molekule MIT-a trijodtironin (Guyton i Fall, 2017, Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009).



Slika 3. Biosinteza hormona štitnjače, MIT-monojodtirozin, DIT-dijodtirozin, preuzeto: Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009

Kad završi sinteza T3 i T4, ostaju vezani za tireoglobulin dok u stanicama ne dođe do potrebe za njima. Tada procesom pinocitoze čestice koloida budu fagocitirane spajajući se s lizosomima te djelovanjem proteaza dolazi do odcjepljenja hormona od tireoglobulina i njihovog odlaska u cirkulaciju (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009).

U perifernoj cirkulaciji tiroksin i trijodtironin reverzibilno su vezani na proteine nosače i to ponajviše za glikoprotein TBG (globulin koji veže tiroksin). Tako je vezano 60 % T4, dok je oko 30 % vezano za prealbumin, a 10 % za albumin. Slobodna frakcija iznosi manje od 0,1 %.

T3 je 10-20 % slabije vezan za TBG, a njegova slobodna frakcija iznosi 0,3 %. Biološki su aktivne samo slobodne frakcije hormona štitnjače, a proteini nosači služe kao skladište hormona. Oni osiguravaju da se hormoni ne mogu eliminirati iz organizma filtracijom u bubrezima i da ne dođe do naglih promjena u njihovim koncentracijama, već da se otpuštaju po potrebi (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009).

Hormoni štitnjače metaboliziraju se dejodinacijom pomoću enzima dejodinaze tipa I, tipa II i tipa III (70%), oksidativnom deaminacijom, dekarboksilacijom i pucanjem eterske veze. U jetri se konjugiraju s glukuronskom i sumpornom kiselinom te se kao glukuronidi i sulfati izlučuju iz organizma putem žuči i crijeva. Enzimskim djelovanjem jodtirozin-dehalogenaze dolazi do odcjepljivanja joda iz jodtirozina koji se u obliku jodida vraća u štitnjaču gdje opet služi za sintezu hormona (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009).

Jedini izvor T4 je štitnjača, dok većina T3 (80 %), nastaje perifernom konverzijom iz T4 u ciljnim organima, primarno u jetri, enzimskim uklanjanjem 5'-joda iz vanjskog prstena tirozina. Može nastati i obratni ili reverzni T3 (rT3). On nastaje dejodinacijom na petom C-atomu unutarnjeg prstena T4 i on je metabolički inaktivan. Daljnjom dejodinacijom nastaju dijodtironini, monojodtironini i konačno tironin. Ravnoteža hormona štitnjače najbrže se kontrolira perifernom dejodinacijom (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009).

Hormoni štitnjače cirkulacijom dolaze do ciljnih organa, a njihovo djelovanje je primarno rezultat vezanja T3 za specifične receptore u jezgri ciljnih stanica. Postoje dvije vrste receptora za T3, α i β , koje kodiraju geni $TR\alpha$ i $TR\beta$. Nakon toga se kompleksi hormon-receptor vežu na specifična regulacijska mjesta na kromosomima i dovode do ekspresije gena. Dolazi do stimulacije transkripcije mRNA i aktivacije funkcije ciljne stanice (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009).

T3 je 4-5 puta biološki aktivniji od T4. Njihovo fiziološko djelovanje je kompleksno i djeluju na cijeli organizam. Pojačavaju sintezu proteina i metabolizam ugljikohidrata, pojačavaju sintezu te razgradnju triglicerida i kolesterola i proteolizu ovisnu o ATP-u. Uz to djeluju i na mitohondrijski metabolizam gdje stimuliraju mitohondrijsko disanje i oksidativnu fosforilaciju te povećavaju broj β -adrenergičkih receptora u odnosu na α -adrenergičke receptore. Utječu na rast i sazrijevanje tkiva, razvoj i spolno sazrijevanje. Povećavaju aktivnost Na^+/K^+ ATPaze u jetri, miokardu, skeletnim mišićima, tankom crijevu i bubregu što dovodi do povećane sinteze i potrošnje ATP-a te stvaranja topline (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009).

1.2. Hipotireoza

1.2.1. Uzroci hipotireoze

Hipotireoza se pojavljuje kada su stvaranje i lučenje hormona štitnjače smanjeni. Zbog mehanizma negativne povratne sprege dolazi do porasta TSH-a. Najčešći je poremećaj funkcije štitnjače uz učestalost od 0,5 – 1 % u žena, a u muškaraca je 10 puta rjeđa. Uzrok primarne hipotireoze mogu biti autoimuni procesi gdje zbog prisutnosti antitireoidnih antitijela (antitijela na mikrosome i peroksidazu) dolazi do propadanja tkiva štitnjače. To se zove Hashimotova bolest ili Hashimotov tireoiditis. Kod većine bolesnika s hipotireozom najprije dolazi do razvitka autoimunog tireoiditisa, odnosno upale zbog koje tkivo propada i naposljetku fibrozira, pa se lučenje hormona smanji, nekad i u potpunosti. Do razaranja tkiva štitnjače dovodi i liječenje jodom-131, vanjsko zračenje vrata, operacija štitnjače te infiltracijska bolest štitnjače. Druge vrste primarne hipotireoze su one u kojima je štitnjača često povećana, što se naziva gušom. Uzrok tome je manjak joda u prehrani što uzrokuje endemsku koloidnu gušu. Manjak joda sprječava stvaranje T3 i T4 te posljedično hipofiza luči iznimno velike količine TSH. Takvo povećano lučenje TSH potiče stanice štitnjače na lučenje golemih količina tireoglobulinskog koloida u folikule, pa štitnjača postaje sve veća i veća. Zbog nedostatka joda unutar molekule tireoglobulina nema stvaranja T3 i T4, dakle nema ni supresije lučenja TSH iz adenohipofize. Folikuli postaju ogromni, a štitnjača se može povećati 10 do 20 puta. U hrani obično ima dovoljno joda, osim u područjima gdje je tlo siromašno jodom. Takva područja su švicarske Alpe, Ande te područje Velikih jezera u SAD-u. Idiopatska netoksična koloidna guša je povećanje štitnjače kod osoba koje prehranom unose dostatne količine joda. Točan uzrok takvog povećanja nije poznat, a kod većine bolesnika postoji blaga upala koja uzrokuje blagu hipotireozu. Zbog povećanog lučenja TSH sve više rastu dijelovi žijezde koji nisu zahvaćeni upalnim procesom. Štitnjače je kod takvih pacijenata čvorasta: neki dijelovi žijezde rastu, a druge dijelove razara upala (Guyton i Fall, 2017., Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009).

Uzrok primarne hipotireoze su i poremećaji u sintezi i djelovanju hormona štitnjače koji dovode do kongenitalne hipotireoze u novorođenčadi. Prenose se autosomno recesivno. U sintezi može doći do poremećaja prijenosa jodida u štitnjaču, poremećaja aktivnosti enzima tireoidne peroksidaze, poremećaja vezanja tirozina u jodtironine, poremećaja u sintezi ili prijenosu tireoglobulina, poremećaja dejodinacije, kad se tironini gube mokraćom nedejodimirani i ne oslobađa se jod za ponovnu sintezu hormona štitnjače, poremećaja prijenosa hormona štitnjače

zbog manjka TBG-a ili stvaranja TBG-a sa smanjenim afinitetom za T3 i T4. Osim ovih, uzroci kongenitalne hipotireoze mogu biti i ageneza, hipoplazija ili ektopija štitnjače, endemski kretinizam i hipopituitarizam. Za pravodobno otkrivanje kongenitalne hipotireoze primjenjuje se sustavno novorođenačko probiranje koje se u većini zemalja, pa tako i u Hrvatskoj, provodi u prvim danima života svakog novorođenčeta. U Hrvatskoj je učestalost kongenitalne hipotireoze približno 1:4300 (Čvorišćec i Čepalak, ured., 2009).

Poremećaji hipofize i hipotalamusa uzrokuju centralnu hipotireozu. TSH je nizak, ali može biti i unutar referentnog intervala, u nekim slučajevima čak i malo povišen. Koncentracije hormona štitnjače su suprimirane. Sekundarna hipotireoza poremećaj je na razini hipofize, a najčešći je uzrok tumorski proces selarne regije, u većini slučajeva adenom hipofize. Često nalazimo manjak i ostalih hormona hipofize. Kod tercijarne hipotireoze poremećaj je na razini hipotalamusa i uzrokuje poremećaj lučenja hormona koji oslobađa tireotropin (TRH). Sekundarna i tercijarna hipotireoza rijetki su uzroci hipotireoze (Čvorišćec i Čepalak, ured., 2009, Vidranski, 2020).

Prolaznu hipotireozu mogu uzrokovati subakutni tireoiditis, tihi tireoiditis uključujući i postporođajni tireoiditis i prekid nadomjesnog liječenja levotiroksinom (Vidranski, 2020).

Do hipotireoze može doći i zbog neosjetljivosti perifernih tkiva na hormone štitnjače. Riječ je o blagoj hipotireozu bez obzira na povećanu koncentraciju hormona štitnjače. Uzrok je mutacija gena za tireoidne receptore. Ovaj poremećaj nasljeđuje se autosomno recesivno i rijetko autosomno dominantno (Čvorišćec i Čepalak, ured., 2009).

Problem pri postavljanju dijagnoze u hospitaliziranih pacijenata može biti sindrom netireoidne bolesti (engl. *euthyroid sick syndrome*) gdje u teško oboljelih nalazimo patološke testove funkcije štitnjače uz odsutnost poremećaja funkcije štitnjače. Najčešće se javlja u pacijenata hospitaliziranih u jedinicama intenzivne njege. Često se najprije snizi koncentracija slobodnog i ukupnog T3, a poraste rT3. U kasnijoj fazi teške bolesti može doći i do sniženja koncentracije ukupnog T4, dok slobodni T4 može biti snižen, povećan ili unutar referentnog intervala, ovisno o metodi određivanja. TSH može biti blago snižen u akutnoj fazi bolesti, a povećan u fazi oporavka. Smatra se da su uzroci ovih pojava smanjena periferna konverzija T4 u T3, poremećaj hipofizno-tireoidne funkcije, smanjeno stvaranje proteina nosača, cirkulirajući inhibitori vezanja hormona štitnjače i neki lijekovi. Snižavanje koncentracije T3 moglo bi se smatrati korisnim mehanizmom koji djeluje protiv povećanog katabolizma i uklapa se u širi koncept

odgovora akutne faze kao glavnog obrambenog mehanizma organizma (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009).

1.2.2. Simptomi hipotireoze

Klinički simptomi i znakovi hipotireoze posljedica su smanjenog učinka hormona štitnjače u tkivima. Hipotireoza tijekom fetalnog života i u ranom djetinjstvu može prouzročiti razne razvojne i funkcijske poremećaje od kojih je najvažnije zaostajanje u psihofizičkom razvoju zbog poremećenog razvoja mozga. Teški nedostatak hormona štitnjače tijekom razvoja uzrokuje kretinizam. Najčešći su uzroci kretinizma prirođeni nedostatak štitnjače (kongenitalni kretinizam), smanjeno stvaranje hormona štitnjače zbog genskog poremećaja žlijezde ili manjak joda u hrani (endemski kretinizam). Normalan tjelesni razvoj obično možemo postići započnemo li liječenje jodom ili nadomjesnom hormonskom terapijom u bilo kojoj životnoj dobi, ali mentalni će razvoj biti nepovratno usporen, osim ako liječenje ne započne u prvim tjednima života. Posljedica hipotireoze u starije djece jest usporen rast i spolno sazrijevanje. Fiziološki učinci hipotireoze su umor i krajnja pospanost (uz spavanje 12 do 14 sati dnevno), potpuna mišićna slabost, smanjena srčana frekvencija, srčani minutni volumen i volumen krvi, može doći i do povećanja tjelesne mase, opstipacije, umne tromosti i zatajivanja mnogih trofičkih funkcija u tijelu što se očituje smanjenim rastom dlaka, ljuštenjem kože i hrapavim glasom. U klinički izraženoj hipotireozu najčešće nalazimo periorbitalne edeme i edeme ruku i nogu, dok u najtežim slučajevima dolazi do potpunog edematoznog izgleda cijelog tijela što se naziva miksedem. Miksedem se razvija u pacijenata s gotovo potpunim zatajenjem funkcije štitnjače. U takvome se stanju, iz nepoznatog razloga, u međustaničnim prostorima stvara prekomjerna količina tkivnog gela jer su znatno povećane količine hijaluronske kiseline i hondroitin-sulfata vezanih na proteine. Zato je povećana ukupna količina međustanične tekućine, a edem je nepomičan. U mnogih hipotireoidnih bolesnika, a osobito u onih s miksedemom, razvija se ateroskleroza. Ona uzrokuje bolest perifernih krvnih žila, gluhoću i bolest koronarnih arterija, pa takvi bolesnici rano umiru. Do razvoja ateroskleroze dolazi jer se kod manjka hormona štitnjače povećava koncentracija kolesterola u krvi zbog promjena u metabolizmu masti i kolesterola te smanjenog izlučivanja kolesterola iz jetre u žuč (Vidranski, 2020, Guyton i Fall, 2017).

1.3. Laboratorijska dijagnostika hipotireoze

1.3.1. Predanalitički čimbenici

Za određivanje funkcijskih testova štitnjače pacijent treba doći na vađenje krvi ujutro, između 7 i 10 sati, što je vrlo bitno jer TSH ima cirkadijalni ritam lučenja. Dnevne vrijednosti TSH mogu varirati do 50 % u odnosu na srednje vrijednosti, uz najniže vrijednosti tijekom kasnog popodneva, između 16 i 20 sati, a najviše tijekom sna, između 2 i 4 ujutro (Vidranski, 2020). Slobodni T3 (FT3) također karakterizira cirkadijalni ritam lučenja, FT3 svoje najviše i najniže dnevne koncentracije doseže 0,5 do 2,5 sata kasnije nego TSH (www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com).

Povećana učestalost povišenih vrijednosti TSH-a može se naći u starijih osoba, osobito starijih od 80 godina, pa je referentni interval odnosno gornja granica TSH-a viša u starijih osoba. Referentni interval TSH-a različit je u trudnica. Preporuča se primjena graničnih vrijednosti specifičnih za tromjesečja. Većina je istraživanja pokazala pad koncentracije slobodnog T4 (FT4) tijekom trudnoće (Vidranski, 2020).

24 sata prije vađenja krvi treba izbjegavati konzumaciju alkohola, a 12 sati prije ne uzimati hranu, piti čaj, kavu ili sokove. Postprandijalne koncentracije TSH niže su od vrijednosti TSH dobivenih natašte. Određivanje FT4 ne pokazuje statistički značajnu razliku u vrijednostima natašte i postprandijalno (Nair i sur., 2014.). U dužem gladovanju, smanjena je razina cirkulirajućeg T3, kao i broj staničnih T3-receptora (Katzung i sur., 2011).

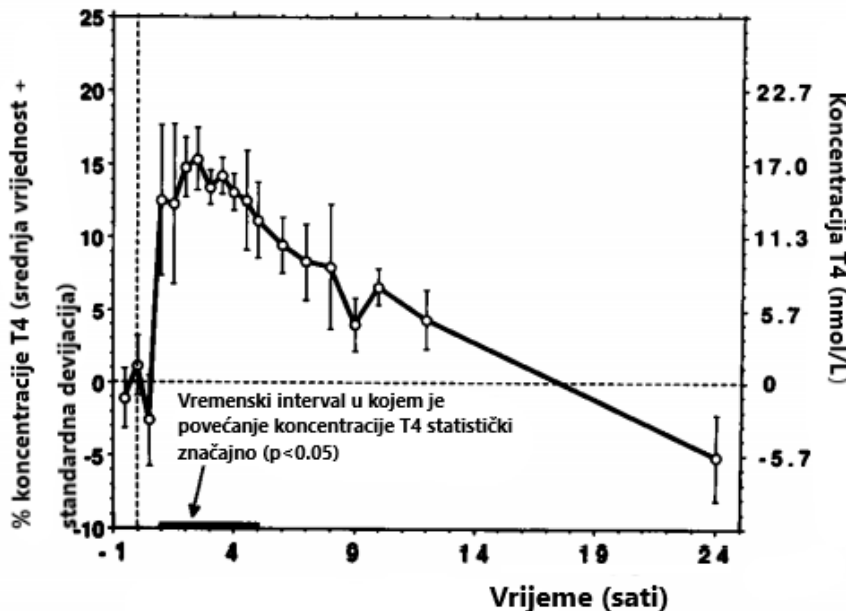
Prije vađenja krvi poželjno je mirovati u sjedećem položaju barem 15 minuta. Tjelesna aktivnost dovodi do porasta koncentracije T4 i FT4, bez značajnijeg utjecaja na određivanje T3 i FT3, dok su vrijednosti TSH nakon tjelesne aktivnosti niže od bazalnih (Licata i sur., 1984).

U stresnim situacijama, inhibitornim djelovanjem glukokortikoida, dolazi do smanjenog izlučivanja TSH što rezultira sniženim koncentracijama T3 i T4 (Ranabir i sur., 2011).

Promjena specifičnih proteinskih nosača mijenja razinu ukupnih hormona štitnjače, ali ne utječe na slobodne hormone štitnjače ili funkciju štitnjače. Lijekovi koji kompetitivno inhibiraju vezanje hormona štitnjače na proteinske nosače u uzorku poput furosemida, salicilata, karbamazepina i fenitoina te posebno heparina akutno povišuju udio FT4 i FT3. U tim slučajevima dolazi do lažnog povišenja slobodne frakcije hormona štitnjače. Mehanizam učinka

heparina jest indukcija lipoprotein-lipaze i porast slobodnih masnih kiselina u serumu. One su inhibitori vezanja hormona štitnjače na proteinske nosače. Stanja koja povećavaju koncentraciju globulina koji veže tiroksin su ona koja su praćena povećanjem koncentracije estrogena, novorođenačka dob, hepatitis i lijekovi kao što su metadon, heroin, tamoksifen i raloksifen. Do snižene koncentracije globulina koji veže tiroksin dovodi nefrotski sindrom, ciroza jetre, kritična stanja te uzimanje testosterona, anaboličkih steroida i glukokortikoida (Vidranski, 2020).

Tijekom nadomjesne terapije levotiroksinom, serumske koncentracije FT4 su više od očekivanih kada ih interpretiramo u odnosu na pripadajuće koncentracije TSH. Koncentracije ukupnog T4 i FT4 ovise o vremenu uzimanja lijeka i vađenja krvi. U bolesnika bez štitnjače koji uzimaju 150-200 mg levotiroksina dnevno, koncentracije T4 i FT4 se povećaju za 20 % unutar 1-4 sata od uzimanja lijeka i te se nakon 9 sati normaliziraju do bazalnih koncentracija (Slika 4) (Ain i sur., 1993). Serumske koncentracije TSH i FT3 ostaju nepromijenjene. Vađenje krvi treba se izvoditi barem 12 sati, najbolje 24 sata, nakon zadnje doze levotiroksina (www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com).



Slika 4. Promjena koncentracije T4 u četiri pacijenta kojima je uklonjena štitnjača tijekom 24 sata nakon uzimanja levotiroksina. Koncentracije T4 su statistički značajno povećane 1-4 sata nakon uzimanja terapije levotiroksina, preuzeto i prilagođeno: Ain i sur., 1993

1.3.2. Laboratorijski testovi funkcije štitnjače i klinička primjena

Određivanje TSH-a u serumu je izvrstan test probira na hipotireozu i najosjetljiviji test za otkrivanje blagog (subkličkog) poremećaja funkcije štitnjače (*Slika 5*). Za pouzdanu primjenu TSH-a potrebna je uredna hipotalamo-hipofizna osovina i stabilno stanje štitnjače jer je tada odnos TSH/FT4 obrnuto log/linearan. U tim okolnostima male promjene FT4 uzrokuju višestruke promjene TSH-a. TSH u granicama referentnog intervala upućuje da je bolesnik u eutireozu i nije potrebno dodatno određivanje hormona štitnjače, osim u slučaju centralne hipotireoze koja se javlja iznimno rijetko. Povišena vrijednost TSH-a upućuje na hipotireozu pa je potrebno dodatno odrediti FT4 radi utvrđivanja radi li se o klinički izraženoj ili subkličkoj hipotireozu, dok snižene vrijednosti TSH-a upućuju na hipertireozu. Gornja granica TSH-a, prema rezultatima velike američke epidemiološke studije, u zdravih osoba bez bolesti štitnjače u anamnezi iznosila je 4,5 mIU/L odnosno 4,12 mIU/L u zdravih osoba s negativnim antitijelima na tireoglobulin i tireoidnu peroksidazu (Vidranski, 2020). Nacionalna akademija kliničkih biokemičara navodi da 95 % zdravih osoba ima vrijednost TSH-a manju od 2,5 mIU/L. U slučaju nalaza TSH-a 5-10 mIU/L nužno je ponoviti test za 2-3 mjeseca uz određivanje FT4 kako bi se izbjegla moguća laboratorijska pogreška ili prolazno povišena vrijednost kao posljedica oporavka od netireoidne bolesti ili drugih uzroka. Ako je vrijednost TSH-a veća od 10 mIU/L nužno je odrediti FT4. Ukoliko je vrijednost FT4 snižena, tada je pacijent u primarnoj hipotireozu, dok uredna vrijednost FT4 uz blago povišen TSH upućuje na subkličku hipotireozu. Određivanje slobodnih hormona danas je zamijenilo određivanje ukupnih hormona jer je određivanje slobodnih hormona dijagnostički pouzdanije. Određivanje FT4 pouzdaniji je pokazatelj funkcije štitnjače u odnosu na TSH u stanjima brze promjene funkcije štitnjače, primjerice 2-3 mjeseca nakon početka liječenja hipotireoze. U navedenim okolnostima serumski FT4 se normalizira prije nego TSH. Za prilagodbu TSH-a novoj serumskoj razini hormona štitnjače potrebno je najmanje 6-8 tjedana (Vidranski, 2020).

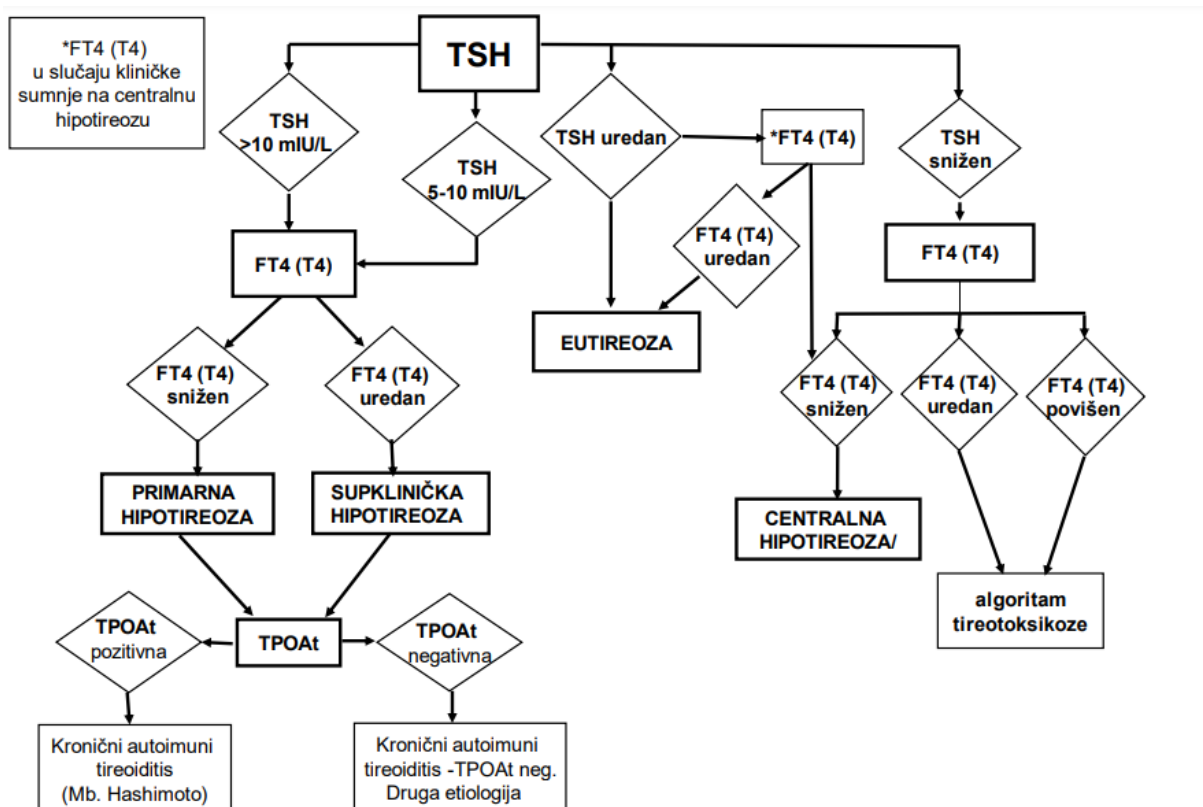
U slučaju primarne hipotireoze, a osobito one subkličke korisno je odrediti antitijela na tireoidnu peroksidazu (TPOAt). Pozitivna TPOAt upućuju na kronični autoimuni tireoiditis. Negativna TPOAt mogu upućivati na APOAt negativni kronični tireoiditis ili drugu etiologiju (Vidranski, 2020).

Kod sumnje na centralnu hipotireozu potrebno je uz TSH odrediti u FT4. Centralna hipotireoza obilježena je sniženom razinom FT4 u serumu uz normalnu ili sniženu koncentraciju TSH-a.

Daljnjom se obradom utvrđuje je li uzrok poremećaja bolest hipofize ili hipotalamusa (Vidranski, 2020).

Određivanje FT3 ima malu osjetljivost u otkrivanju hipotireoze pa se rutinski ne primjenjuje. U stanju hipotireoze dolazi do povećane pretvorbe FT4 u FT3 pa FT3 dugo ostaje u granicama referentnog intervala i snižen je jedino u dugotrajnoj i teškoj hipotireozu (Vidranski, 2020).

Kod pacijenata s netireoidnom bolesti štitnjače je specifičnost određivanja TSH-a manja, osobito ako uzimaju glukokortikoide u velikim dozama ili dopamin jer oba lijeka inhibiraju lučenje TSH-a. Istodobno određivanje T4 i TSH preporuča se u teško oboljelih radi otkrivanja poremećaja funkcije štitnjače jer su metode procjene FT4 manje pouzdane u teško oboljenih pacijenata. Ako su vrijednosti TSH i T4 usklađene, primjerice visok TSH uz nizak T4, tada se radi o poremećaju funkcije štitnjače, odnosno o primarnoj hipotireozu, a ako su te vrijednosti neusklađene tada se najvjerojatnije radi o netireoidnoj bolesti štitnjače (Vidranski, 2020).



Slika 5. Postupnik za racionalnu dijagnostiku hipotireoze, preuzeto: Kusić i sur., 2009

1.4. Liječenje hipotireoze

1.4.1. Terapija levotiroksinom

Pacijenti s hipotireozom jednostavno se liječe sintetskim hormonom štitnjače levotiroksinom (L-T4), što nazivamo nadomjesnom terapijom. Sintetski levotiroksin pripravak je izbora za nadomjesnu terapiju zbog stabilnosti, jednolikosti sadržaja, niske cijene, nedostatka alergeni stranih proteina i dugog poluvremena eliminacije (7 dana) koji omogućuje primjenu jednom na dan. Levotiroksin je po učinku potpuno jednak hormonu kojeg luči štitna žlijezda. Kako se unutar stanice T4 pretvara u T3, primjenom T4 nastaju oba hormona (Katzung i sur., 2011).

Tiroksin se najbolje apsorbira iz duodenuma i ileuma, a na apsorpciju utječu intraluminalni čimbenici poput hrane, lijekova, gastične kiselosti i intestinalne flore. Bioraspoloživost trenutno dostupnih preparata levotiroksina nakon oralne primjene prosječno iznosi 80 %. Vrijeme potrebno za postizanje vršnih koncentracija (Tmax) jest otprilike 5 do 6 sati. U pacijenata s hipotireozom poluvrijeme eliminacije je produženo. Lijekovi koji induciraju jetrene mikrosomske enzime povećavaju metabolizam T4 i T3, pa kod pacijenta koji ih primaju zajedno s levotiroksinom mogu biti potrebne veće doze za održavanje kliničke djelotvornosti. 99,96 % tiroksina reverzibilno se veže za proteine, primarno globulin koji veže tiroksin (TBG). Povećan broj veznih mjesta za tiroksin na TBG-u uzrokuju estrogini tijekom trudnoće ili terapije oralnim kontraceptivima. Hormoni štitnjače se metaboliziraju u jetri, bubrezima, mozgu i mišićima, dok se metaboliti izlučuju mokraćom i fecesom. Volumen distribucije lijeka iznosi 10-12 L, dok je metabolički klirens oko 1,2 L plazme dnevno (Katzung i sur., 2011).

Nakon disocijacije s TBG-a, sintetski L-T4 kao i T4, aktivnim transportom ulazi u stanicu. Unutar stanice T4 se pretvara u T3 pomoću 5'-dehidrogenaze. T3 zatim prelazi u jezgru gdje se veže za specifični T3 receptorski protein, član porodice c-erb onkogene. Aktivacija nuklearnih receptora rezultira stvaranjem mRNA i sintezom proteina, naprimjer povećanom sintezom Na⁺/K⁺ ATPaze. To je u skladu s činjenicom da se učinci hormona manifestiraju nekoliko sati ili dana nakon primjene. Najveći broj receptora za tireoidne hormone nađen je u tkivima vrlo osjetljivima na njihove učinke kao što su jetra, hipofiza, bubrezi, srce, skeletni mišići, pluća i crijeva. U tkivima koja nisu osjetljiva na tireoidne hormone, kao što su slezena i testisi, nalazi se samo nekoliko receptorskih mjesta. Mozak, u kojem T3 nema anaboličkih učinaka, ima umjeren broj receptora. Sukladno razlici njihove biološke potentnosti, afinitet receptora za T4

oko 10 puta je manji nego za T3. Pod određenim uvjetima, broj nuklearnih receptora se može promijeniti kako bi se očuvala tjelesna homeostaza (Katzung i sur., 2011).

Levotiroksin je indiciran:

- u liječenju benigne eutireoidne strume,
- u profilaksi relapsa nakon operacije eutireoidne strume, ovisno o postoperativnom hormonalnom statusu,
- kao supstitucijska terapija tiroidnim hormonima u liječenju hipotireoidizma,
- u supresivskoj terapiji tiroidnog karcinoma.

(<https://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-14-01-218.pdf>)

Prosječna doza za odrasle je približno 1,7 µg/kg/dan. Starijim osobama (> 65 godina) mogu biti potrebne manje količine tiroksina za nadomjesno liječenje. Serumski TSH i FT4 moraju se mjeriti u određenim vremenskim intervalima, pri čemu TSH mora biti unutar optimalnog intervala od 0,5 do 2,5 mIU/L. Za postizanje ravnotežne koncentracije u krvi, potrebno je 6-8 tjedana od početka primjene tiroksina. Zbog toga se doze tiroksina moraju mijenjati polako i postupno. U dugotrajnoj hipotireozu u starijih bolesnika i u bolesnika sa srčanom bolešću liječenje se obavezno započinje niskim dozama (Katzung i sur., 2011).

Toksičnost tiroksina izravno je ovisna o razini hormona. Nemir, nesanica, ubrzana maturacija kostiju i rast mogu u djece biti znakovi toksičnosti tiroksina. Vidljivi simptomi u odraslih mogu biti povećana nervoza, povećana osjetljivost na toplinu, epizode palpitacija i tahikardije ili neobjašnjivi gubitak težine. Uočili li se prisutnost navedenih simptoma, važno je pratiti serumski TSH (Katzung i sur., 2011).

2. Obrazloženje teme

Štitnjača je endokrini žlijezda anatomske smještena u vratu. U njezinim folikulima stvaraju se hormoni štitnjače trijodtironin i tiroksin. Njihovo fiziološko djelovanje je kompleksno i djeluju sustavno na cijeli organizam. Poremećaji štitne žlijezde predstavljaju učestalije endokrinološke poremećaje, a najveću incidenciju ima hipotireoza koja se pojavljuje kada su stvaranje i lučenje hormona štitnjače smanjeni. Bolesnici s hipotireozom liječe se levotiroksinom, sintetskim hormonom štitnjače. Laboratorij ima središnju ulogu u dijagnozi hipotireoze, praćenju pacijenata i doziranju nadomjesne terapije.

Hipoteza ovog rada je da terapija levotiroksinom uzeta prije vađenja krvi statistički značajno utječe na koncentraciju funkcijskih testova štitnjače (tj. na određivanje koncentracije TSH, T4, T3, FT4 i FT3).

Cilj istraživanja jest ispitati učinke terapije levotiroksinom uzete prije vađenja krvi na koncentraciju funkcijskih testova štitnjače, kako bi se temeljem dobivenih spoznaja mogao definirati točan postupak pripreme bolesnika prije određivanja koncentracije funkcijskih testova štitnjače. Preciznije, ako terapija levotiroksinom ima klinički značajan učinak na koncentraciju funkcijskih testova štitnjače, od pacijenata će se zahtijevati da prije vađenja krvi ne uzimaju terapiju, već da to učine nakon uzorkovanja krvi.

3. Materijali i metode

3.1. Ispitanici i uzorkovanje

Istraživanje je provedeno prospektivno u vremenskom periodu od studenog 2020. do ožujka 2021. u KBC-u Sestre milosrdnice na malom uzorku odraslih dobrovoljaca. Sudjelovalo je 20 odraslih ispitanika, 18 žena i 2 muškarca. Dob ispitanika bila je u rasponu od 22 do 52 godine, s medijanom od 38 godina. Ispitanicima su uzorci krvi za određivanje koncentracije TSH, T4, T3, FT4 i FT3 uzeti neposredno prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina. Uzorci venske krvi dobiveni su venepunkcijom u epruvete s aktivatorom zgrušavanja s/bez gela (Greiner Bio-One GmbH od 6 mL, Kremsmuenster, Austria). Nakon 30-minutnog stajanja centrifugirani su 10 minuta na 3100 okretaja po minuti korištenjem centrifuge Hettich Rotanta 460RC. Tim se postupkom serum odvaja od stanica i u njemu se određuju koncentracije TSH, T4, T3, FT4 i FT3.

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje TSH

TSH se određuje kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom s mikročesticama (engl. *CMIA, chemiluminescent microparticle immunoassay*) na automatskom analizatoru Abbott Architect i2000. Analizator određuje TSH u dva koraka, prema *sandwich* principu. U prvom koraku u reakcijsku smjesu se dodaju paramagnetske mikročestice obložene anti- β TSH antitijelima. Tijekom prve inkubacije koja traje 18 minuta stvara se kompleks TSH iz uzorka i anti- β TSH antitijela, nakon čega slijedi prvo ispiranje u kojem se otklanjaju potencijalno interferirajuće tvari. U drugom se koraku dodaju sekundarna anti- α TSH antitijela obilježena akridinijem i tijekom inkubacije nastaje kompleks Antitijelo_{mikročestica} – Analit – Antitijelo_{akridinij}. Slijedi drugo ispiranje kojim se otklanjaju nevezana anti- α TSH antitijela. Nakon ispiranja dodaje se predaktivacijska otopina (engl. *Pre-Trigger* (H_2O_2)) i aktivacijska otopina (engl. *Trigger* (NaOH)). To aktivira kemiluminiscentnu reakciju koja se mjeri i izražava relativnim svjetlosnim jedinicama (engl. *Relative Light Units; RLU*). Koncentracija TSH u uzorku proporcionalna je vrijednosti RLU izmjerenoj optičkim sistemom analizatora.

3.2.1.1 Reagensi

Architect reagens kit sastoji se od:

- mikročestica obloženih s anti- β TSH antitijelima (monoklonska antitijela mišjeg podrijetla) u TRIS puferu s proteinskim stabilizatorom,
- anti- α TSH antitijela (monoklonska antitijela mišjeg podrijetla) obilježena akridinijem u MES puferu s proteinskim stabilizatorom i
- TSH otopine za razrjeđivanje (engl. *Assay diluent*) u TRIS puferu.

Ostali reagensi su:

- predaktivacijska otopina koja sadrži 1,32 % vodikov peroksid,
- aktivacijska otopina koja sadrži 0,35 N natrijev hidroksid, a
- otopina za ispiranje je slana otopina fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffer saline*).

3.2.2. Određivanje ukupnog T3 i T4

Ukupni T3 i T4 određuju se kemiluminiscentnom metodom s mikročesticama na automatskom analizatoru Abbott Architect i2000. Načelo metode je kompeticija. U prvom koraku tijekom inkubacije se stvara kompleks T4/T3 iz uzorka i paramagnetske mikročestice obložene anti-T4/anti-T3 antitijelima. Vezani T4 i T3 odvajaju se s globulina koji veže tiroksin, albumina i prealbumina. Zatim slijedi ispiranje. Tijekom druge inkubacije, dodaje se T3 konjugat obilježen akridinijem i ponovno ispire. U završnoj reakciji, dodatkom predaktivacijske (H_2O_2) i aktivacijske (NaOH) otopine razvija se kemiluminiscencija koja se mjeri i izražava relativnim svjetlosnim jedinicama. Vrijednost RLU je obrnuto proporcionalna koncentraciji analita u uzorku.

3.2.2.1 Reagensi

Architect T4 reagens kit sadrži:

- mikročestice obložene anti-T4 antitijelima ovčjeg podrijetla u TRIS puferu s ovčjim IgG stabilizatorima i
- T3 konjugat obložen akridinijem u MES puferu uz NaCl i Triton-100 stabilizator.

Architect T3 reagens kit sadrži:

- mikročestice obložene anti-T3 antitijelima ovčjeg podrijetla u MES puferu s ovčjim IgG stabilizatorima i
- T3 konjugat obložen akridinijem u citratnom puferu uz NaCl i Triton-100 stabilizator.

U oba se testa koriste:

- predaktivacijska otopina koja sadrži 1,32 % vodikov peroksid,
- aktivacijska otopina koja sadrži 0,35 N natrijev hidroksid, a
- otopina za ispiranje je slana otopina fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffer saline*).

3.2.3. Određivanje slobodnog T3 i T4

Slobodni T4 i T3 određuju se na automatskom analizatoru Abbott Architect i2000 metodom kemiluminiscencije s mikročesticama. Načelo metode je kompeticija. Tijekom prve inkubacije, nastaje kompleks FT4/FT3 i paramagnetske mikročestice obložene antitijelima. Prva inkubacija traje 18 minuta i nakon nje slijedi ispiranje. Tijekom druge inkubacije od 4 minute, dodaje se T3 konjugat obilježen akridinijem. Slijedi ispiranje. U završnoj reakciji, dodatkom predaktivacijske otopine (H₂O₂) i aktivacijske otopine (NaOH) razvija se kemiluminiscencija koja se mjeri i izražava relativnim svjetlosnim jedinicama. Vrijednost RLU je obrnuto proporcionalna koncentraciji FT4/FT3 u uzorku.

3.2.3.1. Reagensi

Architect FT4 reagens kit sadrži:

- mikročestice obložene anti-FT4 antitijelima ovčjeg podrijetla u TRIS puferu s ovčjim IgG stabilizatorima i
- T3 konjugat obložen akridinijem u MES puferu uz NaCl i Triton-100 stabilizator.

Architect FT3 reagens kit sadrži:

- mikročestice obložene anti-FT3 antitijelima ovčjeg podrijetla u MES puferu s ovčjim IgG stabilizatorima i
- T3 konjugat obložen akridinijem u MES puferu uz NaCl i Triton-100 stabilizator.

U oba se testa koriste:

- predaktivacijska otopina koja sadrži 1,32 % vodikov peroksid,
- aktivacijska otopina koja sadrži 0,35 N natrijev hidroksid, a
- otopina za ispiranje je slana otopina fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffer saline*).

3.3. Statističke metode

Podaci su prikazani i statistički obrađeni koristeći računalni program Excel za Office 365 MSO, Microsoft office (Microsoft, USA) i statistički program MedCalc® Statistical Software version 19.8 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2021). Pomoću istog statističkog programa konstruirane su i tablice i grafovi za prikaz rezultata. S obzirom na mali broj ispitanika, vodeći se preporukama koje se odnose na veličinu uzorka, statistički značajna razlika između uzastopnih kvantitativnih, zavisnih mjerenja procijenjena je neparametarskim testom, a podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon (IQR) (Šimundić, 2012). Za ispitivanje statističke značajnosti razlike u vrijednostima hormona štitnjače prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina korišten je Wilcoxonov parni test. Wilcoxonov parni test neparametrijski je test kojim se uspoređuju zavisni podaci. Dob je, bez obzira na raspodjelu, prikazana medijanom i rasponom (minimum – maksimum). Svi rezultati ispitivani su na razini statističke značajnosti $P < 0,05$.

4. Rezultati

U istraživanju je sudjelovalo 20 ispitanika odrasle dobi, 18 žena i 2 muškarca (*Slika 6*). Dob ispitanika bila je u rasponu od 22 do 52 godine, s medijanom od 38 godina.



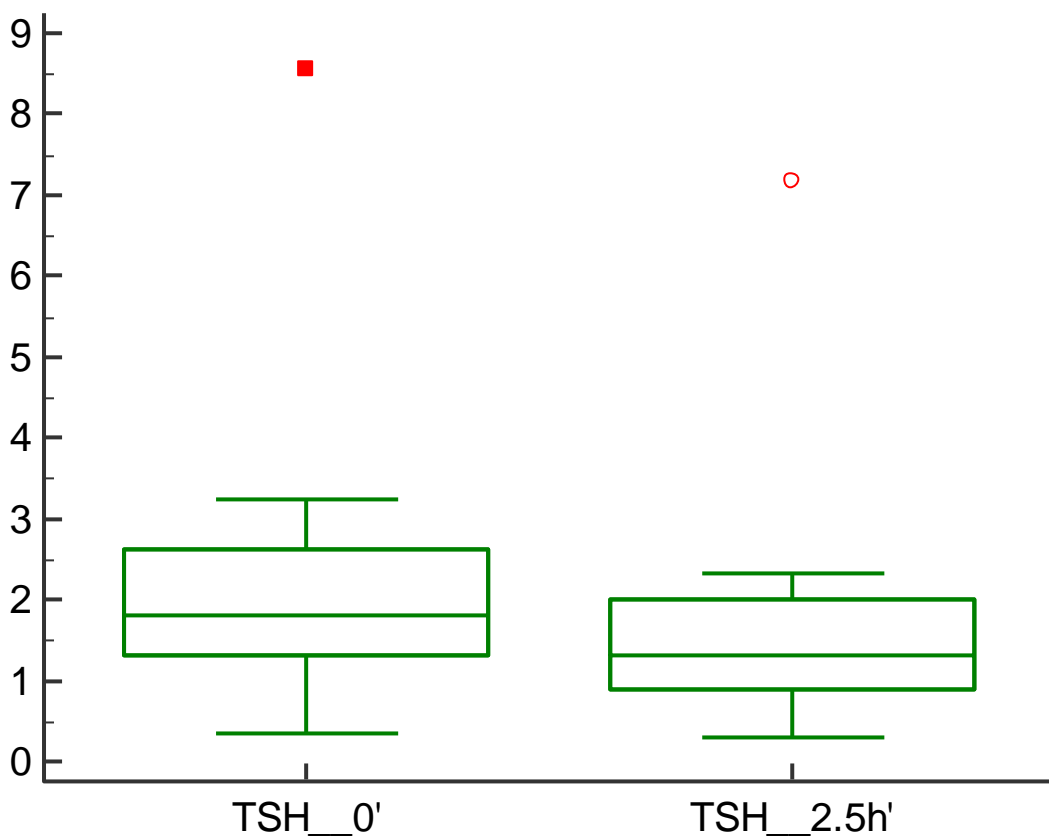
Slika 6. Raspodjela ispitanika prema spolu

U *Tablici 1* prikazane su koncentracije TSH prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina na uzorku od 20 ispitanika, uz prikaz najniže i najviše vrijednosti, medijana te interkvartilnog raspona. Raspon koncentracija TSH u ispitanika grafički vidljiv je na *Slici 7*. Wilcoxonovim parnim testom utvrđena je statistički značajna razlika u koncentracijama TSH prije i nakon terapije levotiroksinom uz P vrijednost od 0,001. Interpretirajući dinamiku promjene koncentracije TSH, zamjetan je statistički značajan pad koncentracije (1,802 vs. 1,311 mIU/L, $P < 0,001$).

Tablica 1. Prikaz koncentracija TSH prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina

	TSH ₀ (mIU/L)	TSH _{2,5h} (mIU/L)
Najniža vrijednost	0,352	0,289
Najviša vrijednost	8,559	7,175
Medijan (interkvartilni raspon)	1,802 (1,315 - 2,620)	1,311 (0,886 - 2,015)

TSH₀ – koncentracija TSH prije uzimanja levotiroksina, TSH_{2,5h} – koncentracija TSH 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina



Slika 7. Grafički prikaz koncentracije TSH prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Narančasti kvadratić/krug iznad ručica predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 1,5 puta.

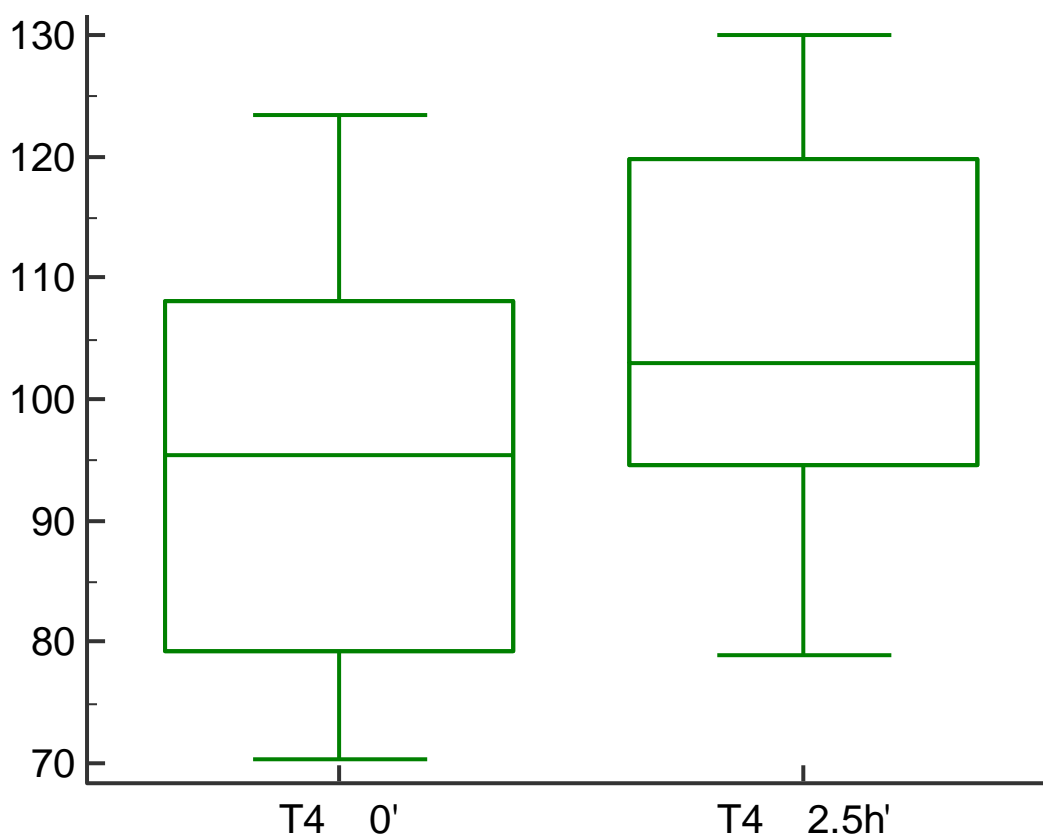
TSH₀ – koncentracija TSH prije uzimanja levotiroksina, TSH_{2,5} – koncentracija TSH 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina

U *Tablici 2* dan je prikaz koncentracija ukupnog T4 prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotirksina na istom uzorku od 20 ispitanika. Tablicom je prikazana najniža i najviša vrijednost te medijan uz interkvartilni raspon, dok je razlika u koncentracijama grafički prikazana na *Slici 8*. Wilcoxonovim parnim testom, kojeg smo koristili za ispitivanje statistički značajne razlike u koncentracijam, dobivena je P vrijednost <0,001. Postoji statistički značajno povećanje koncentracije ukupnog T4 u odnosu na koncentraciju prije terapije (95 vs. 103 nmol/L, P<0,001).

Tablica 2. Prikaz koncentracija ukupnog T4 prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina

	T4 _{0'} nmol/L	T4 _{2,5h'} nmol/L
Najniža vrijednost	70	79
Najviša vrijednost	123	130
Medijan (interkvartilni raspon)	95 (79 - 108)	103 (94 - 120)

T4_{0'} – koncentracija T4 prije uzimanja levotiroksina, T4_{2,5h'} – koncentracija T4 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina



Slika 8. Grafički prikaz koncentracija ukupnog T4 prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama.

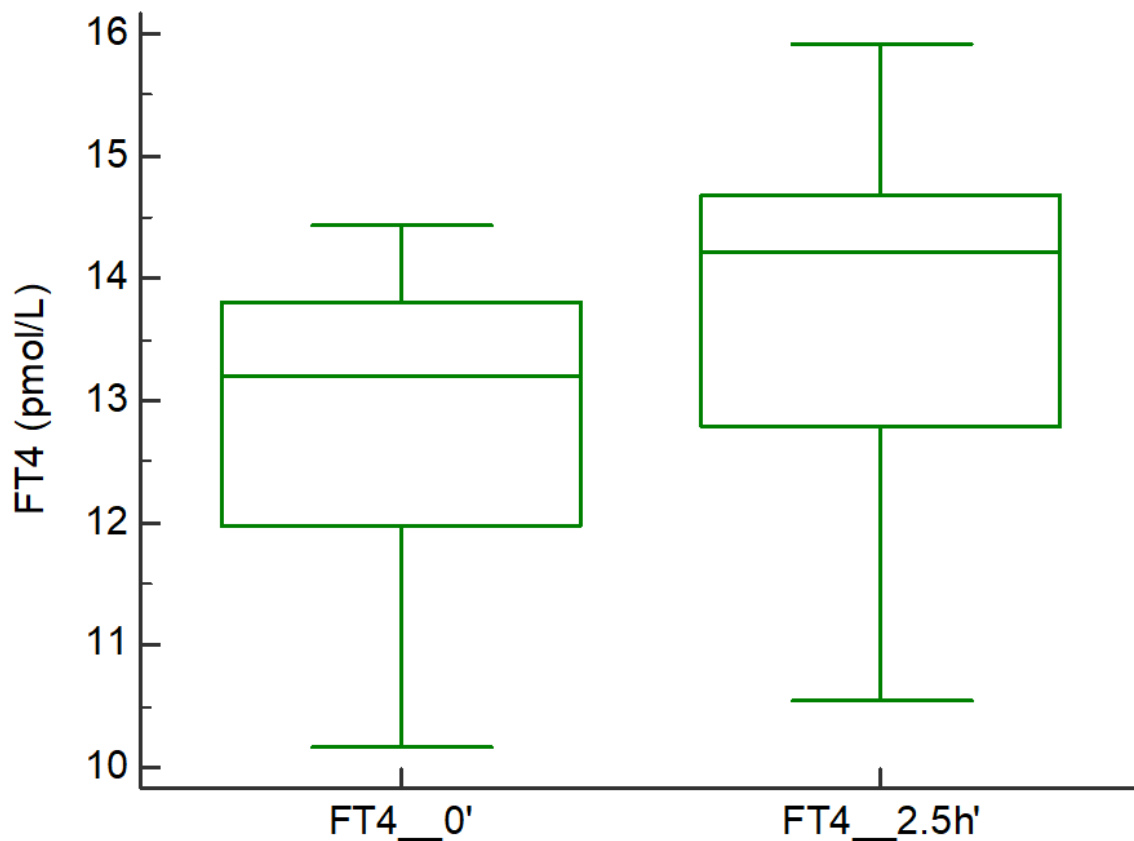
T4_{0'} – koncentracija T4 prije uzimanja levotiroksina, T4_{2,5h'} – koncentracija T4 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina

Isti trend koji smo uočili kod određivanja T4 uočljiv je za i za pretragu FT4. *Tablica 3* prikazuje koncentracije FT4 prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina na uzorku od 20 ispitanika. Prikazana je najniža i najviša vrijednost, medijan te interkvartilni raspon koncentracije FT4. Grafički prikaz razlika u koncentraciji FT4 prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina prikazan je na *Slici 9*. Wilcoxonovim parnim testom dobivena je P vrijednost <0,001 koja pokazuje statistički značajno povećanje koncentracije 2,5 sata nakon terapije levotiroksinom (13,2 vs. 14,2 pmol/L, P<0,001).

Tablica 3. Prikaz koncentracija FT4 prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina

	FT4 _{0'} pmol/L	FT4 _{2,5h'} pmol/L
Najniža vrijednost	10,2	10,4
Najviša vrijednost	14,4	15,9
Medijan (interkvartilni raspon)	13,2 (12,0 - 13,8)	14,2 (12,8 - 14,7)

FT4_{0'} – koncentracija FT4 prije uzimanja levotiroksina, FT4_{2,5h'} – koncentracija FT4 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina.



Slika 9. Grafički prikaz koncentracija FT4 prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama.

FT4_{0'} – koncentracija FT4 prije uzimanja levotiroksina, FT4_{2,5h'} – koncentracija FT4 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina

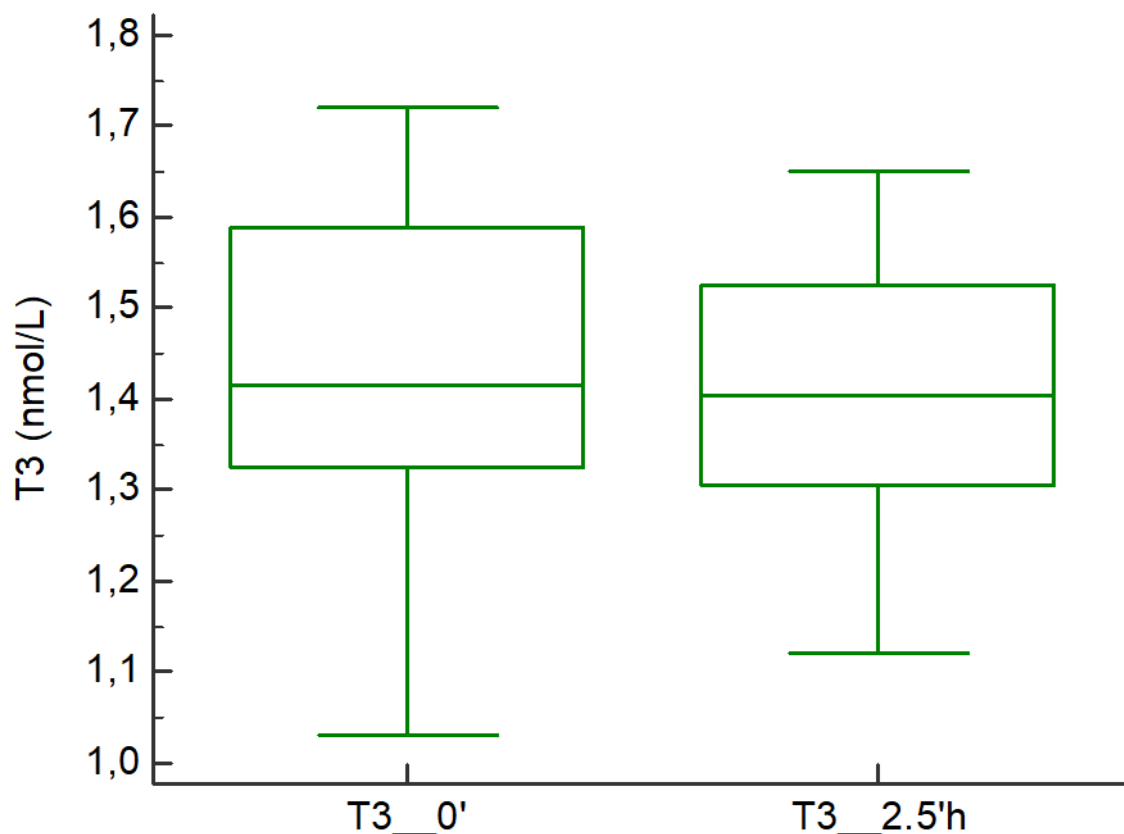
S druge strane, određivanje koncentracije T3 prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina pokazuje drugačiji trend. U Tablici 4 dan je prikaz koncentracija ukupnog T3, najniža i najviša

vrijednost, medijan te interkvartilni raspon koji su određeni na uzorku od 20 ispitanika. Raspon koncentracija ukupnog T3 u ispitanika grafički je prikazan na *Slici 10*. Wilcoxonovim parnim testom nije dobivena statistički značajna razlika ($P=0,212$). Terapija levotiroksinom nije izazvala statistički značajnu promjenu koncentracije ukupnog T3 (1,42 vs. 1,41 nmol/L, $P=0,212$).

Tablica 4. Prikaz koncentracija ukupnog T3 prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina

	T3 _{0'} nmol/L	T3 _{2,5h'} nmol/L
Najniža vrijednost	1,03	1,12
Najviša vrijednost	1,72	1,65
Medijan (interkvartilni raspon)	1,42 (1,33 - 1,59)	1,41 (1,31 - 1,53)

T3_{0'} – koncentracija T3 prije uzimanja levotiroksina, T3_{2,5h'} – koncentracija T3 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina



Slika 10. Grafički prikaz koncentracija ukupnog T3 prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama.

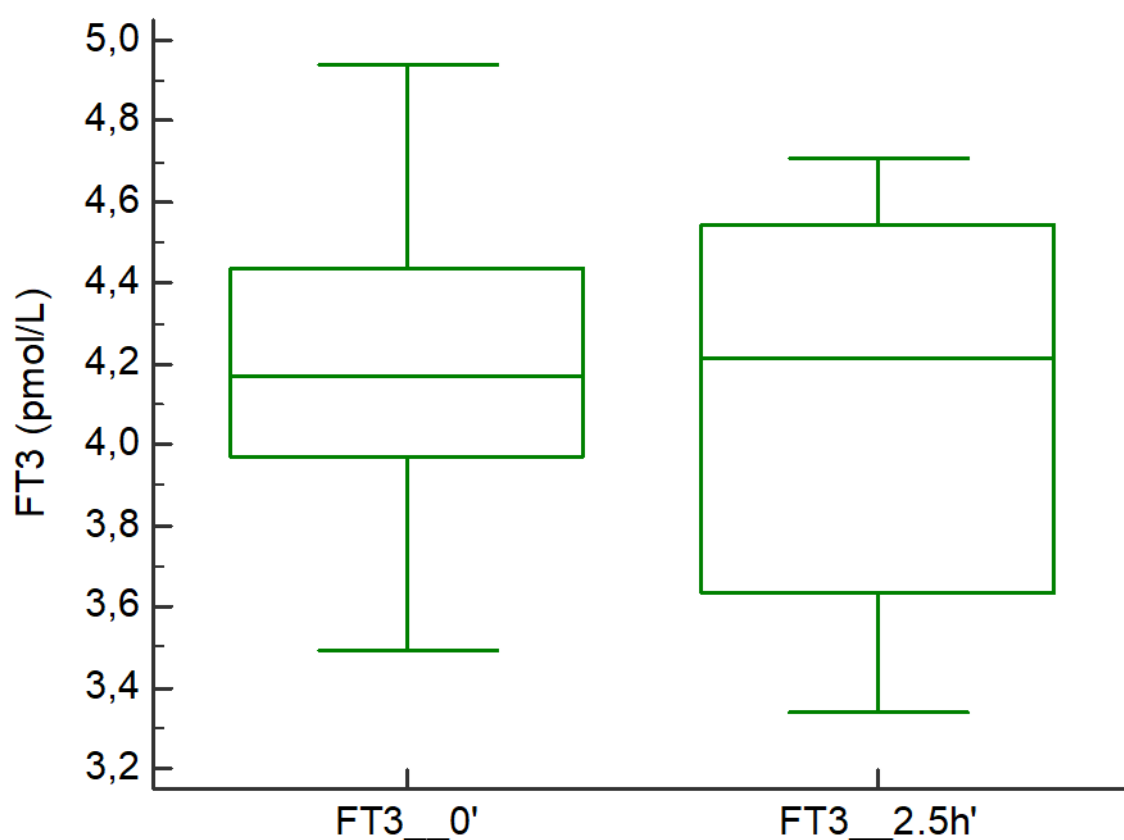
$T3_{0'}$ – koncentracija T3 prije uzimanja levotiroksina, $T3_{2,5h'}$ – koncentracija T3 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina

Rezultati određivanja FT3 slični su rezultatima koje smo dobili za ukupni T3. U *Tablici 5* prikazane su koncentracije FT3 prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina na uzorku od 20 ispitanika. Prikazana je najniža i najviša vrijednost, medijan te interkvartilni raspon koncentracija FT3. Razlika u koncentracijama grafički je prikazana na *Slici 11*. Statističkom analizom koristeći Wilcoxonov parni test dobivena P vrijednost iznosi 0,216. Kao i kod statističke analize promjena koncentracija T3, terapija levotiroksinom nije izazvala statistički značajnu promjenu FT3 (4,2 vs. 4,2 pmol/L, P=0,216).

Tablica 5. Prikaz koncentracija FT3 prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina

	FT3 _{0'} pmol/L	FT3 _{2,5h'} pmol/L
Najniža vrijednost	3,5	3,3
Najviša vrijednost	4,400	4,7
Medijan (interkvartilni raspon)	4,2 (4,0 - 4,4)	4,2 (3,6 - 4,5)

FT3_{0'} – koncentracija FT3 prije uzimanja levotiroksina, FT3_{2,5h'} – koncentracija FT3 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina



Slika 11. Prikaz koncentracija FT3 prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina. Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama.

FT3_{0'} – koncentracija FT3 prije uzimanja levotiroksina, FT3_{2,5h'} – koncentracija FT3 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina

5. Rasprava

Primarna terapija u liječenju hipotireoze je levotiroksin, sintetski analog tiroksina. Prosječna doza levotiroksina za odrasle je približno 1,7 µg/kg/dan. Za praćenje djelotvornosti terapije određuju se serumski TSH i FT4 u određenim vremenskim intervalima, pri čemu TSH mora biti unutar optimalnog intervala od 0,5 do 2,5 mIU/L (Katzung i sur., 2011) Više studija je pokazalo da pacijenti koji uzimaju levotiroksin imaju više koncentracije serumskog T4 i FT4 u usporedbi s eutireoidnom kontrolnom grupom (Ain i sur., 1993). Benvenga i sur. (2017) u svojem su radu pokazali da nakon uzimanja levotiroksina koncentracija FT4 raste linearno u prvih 60–90 minuta prije nego što dosegne plato. Najveća vrijednost koncentracije FT4 postiže nakon 3 sata (Gnosh i sur., 2019). U ovome istraživanju promatrali smo kako uzimanje uobičajene dnevne doze levotiroksina ujutro prije vađenja krvi utječe na koncentraciju funkcijskih testova štitnjače kako bi se temeljem dobivenih spoznaja mogao definirati precizan postupak pripreme pacijenta prije određivanja koncentracije funkcijskih testova štitnjače.

Istraživanje je provedeno na uzorku od 20 ispitanika, 18 žena i 2 muškarca. Kako su ispitanici većinom žene ne možemo zaključivati o spolno uvjetovanim razlikama u koncentraciji funkcijskih testova štitnjače (*Slika 6*). Dob ispitanika bila je u rasponu od 22 do 52 godine, s medijanom od 38 godina. Ispitanicima su određene koncentracije TSH, T4, T3, FT4 i FT3 prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina.

Utvrđivanjem promjene koncentracije TSH zamjetan je statistički značajan pad koncentracije. Medijan koncentracije TSH prije uzimanja levotiroksina iznosi 1,802 mIU/L, a 2,5 sata nakon je 1,311 mIU/L. Međutim, pad koncentracije TSH može se interpretirati kao posljedica njegovog cirkadijalnog ritma lučenja, a ne u zavisnosti o terapiji levotiroksinom. Najniže vrijednosti TSH su tijekom kasnog popodneva, između 16 i 20 sati, a najviše tijekom sna, između 2 i 4 sata ujutro (Vidranski, 2020). Sviridonova i sur. (2013) su u svome istraživanju provedenom na 22 ispitanice s hipotireozom koje su na terapiji levotiroksinom prikazali pad koncentracije TSH tijekom dana. Medijan jutarnjih vrijednosti TSH iznosio je 5,83 mIU/L (koncentracije TSH su određene između 8 i 9 sati ujutro), a popodnevnih 3,79 mIU/L (između 14 i 16 sati).

U ovom radu pokazali smo da terapija levotiroksinom dovodi do povećanja koncentracije T4 i FT4. Medijan koncentracije T4 prije uzimanja levotiroksina iznosi 95 nmol/L, a 2,5 sata nakon je 103 nmol/L, što predstavlja statistički značajano povećanje. Isti trend je uočljiv i u dinamici

promjene FT4 s medijanom koncentracije FT4 13,2 pmol/L prije uzimanja levotiroksina i 14,2 pmol/L 2,5 sata nakon terapije. Ain i sur. (1993) su u svome istraživanju na ispitanicima kojima je uklonjena štitnjača pokazali da se koncentracije T4 povećavaju 1 h nakon uzimanja levotiroksina i značajno su povišene do 5 h nakon ingestije. Najveće povećanje koncentracije T4 je nakon 2,5 sata i iznosi 16 ± 2 %. Koncentracija T4 se snižava do bazalnih vrijednosti nakon 12 sati. Za FT4 je, kao i za T4, najveće povećanje koncentracije bilo nakon 2,5 sata, a iznosilo je 22 ± 3 %. Koncentracije FT4 značajno su više od baznih koncentracija 1 do 9 sati nakon uzimanja levotiroksina. Ghosh i sur. (2020) su određivali vrijednosti FT4 prije i 3 sata nakon uzimanja levotiroksina u dozi od 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (maksimalno 600 μg). Ispitanici su bili eutireoidni pacijenti (broj ispitanika je bio 25), izmjerena bazalna koncentracija FT4 iznosila je $10,7 \pm 1,5$ ng/L, a nakon 3 sata koncentracija FT4 iznosila je $18,9 \pm 0,23$ ng/L što je predstavljalo statistički značajno povećanje ($P < 0,001$, Studentov t test).

S druge strane, u radu smo pokazali da terapija levotiroksinom nije izazivala statistički značajnu promjenu koncentracije T3 ni FT3. Medijan koncentracije T3 prije uzimanje levotiroksina iznosi 1,42 nmol/L, a 2,5 sata nakon je 1,41 nmol/L što ne predstavlja statistički značajnu promjenu. Isti trend je uočljiv i u dinamici promjene FT3 s medijanom koncentracije FT3 od 4,2 nmol/L prije uzimanja levotiroksina i 4,2 nmol/L 2,5 sata nakon terapije. Ain i sur. (1993) su u svome istraživanju na ispitanicima kojima je uklonjena štitnjača određivali serumske vrijednosti T3. One se nisu značajno razlikovale od bazalnih vrijednosti tijekom 24 sata od uzimanja levotiroksina. Saravanan i sur. (2007) su promatrali varijacije koncentracija FT3 i FT4 24 sata nakon uzimanja levotiroksina. Došlo je do 16 %-tnog povećanja FT4 2 do 4 sata nakon doze levotiroksina, a koncentracija FT4 ostala je povećana 12 do 16 sati. Nije došlo do povećanja koncentracije FT3, nego je zamjećen blagi pad.

Usporedbom dobivenih rezultata u ovom istraživanju vidljivo je kako su oni komplementarni rezultatima ostalih sličnih istraživanja.

Ograničenje ove studije je mali broj ispitanika na kojima je provedeno ispitivanje. Zbog pandemije bolesti COVID-19 i pridržavanja epidemioloških mjera bilo je teško organizirati te motivirati ispitanike na uključivanje u ovo istraživanje.

Možemo zaključiti da terapija levotiroksinom ima klinički značajan učinak na koncentraciju funkcijskih testova štitnjače, preciznije na određivanje T4 i FT4, stoga je opravdano od pacijenata zahtijevati da prije vađenja krvi ne uzimaju terapiju, već da to učine nakon

uzorkovanja krvi. Ispitivane se teze i ciljevi istraživanja trebaju potvrditi u budućim slično ustrojenim studijama koje će se provesti na puno većem broju ispitanika.

6. Zaključak

1. Terapija levotiroksinom dovela je do statistički značajnog pada koncentracije TSH ($P < 0,001$) koji nije ovisan o terapiji levotiroksinom, već je posljedica dnevnog ritma lučenja TSH.
2. Određivanje koncentracija T4 i FT4 2,5 sata nakon terapije levotiroksinom dovodi do statistički značajnog povećanja koncentracija T4 ($P < 0,001$) i FT4 ($P < 0,001$) u odnosu na bazalne koncentracije.
3. Suprotno tome, terapija levotiroksinom nije izazvala statistički značajnu promjenu u koncentracijama T3 ($P = 0,212$) i FT3 ($P = 0,216$).
4. Terapija levotiroksinom ima klinički značajan učinak na koncentraciju funkcijskih testova štitnjače, preciznije na određivanje T4 i FT4, stoga je opravdano od pacijenata zahtijevati da prije vađenja krvi ne uzimaju terapiju, već da to učine nakon uzorkovanja krvi.

7. Literatura

Ain KB, Pucino F, Shiver TM, Banks SM. Thyroid hormone levels affected by time of blood sampling in thyroxine-treated patients. *Thyroid*. 1993, 3, 81-85.

Agencija za lijekove i medicinske proizvode. Euthyrox 100 mg tablete <https://www.halmed.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-14-01-218.pdf>, pristupljeno 5.4.2021.

Benvenga S, Capodicasa G, Perelli S. l-Thyroxine in an Oral Liquid or Softgel Formulation Ensures More Normal Serum Levels of Free T4 in Patients with Central Hypothyroidism. *Front Endocrinol*. 2017, 8, 321.

Clinical Laboratory Diagnostics 2020., <https://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/index.html>, pristupljeno 11.4.2021.

Ghosh S, Pramanik S, Biswas K, Bhattacharjee K, Sarkar R, Chowdhury S, Mukhopadhyay P. Levothyroxine Absorption Test to Differentiate Pseudomalabsorption from True Malabsorption. *European Thyroid Journal*. 2020, 9, 19-24.

Guyton AC, Hall JE. Medicinska fiziologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2017, str. 961-963.

Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 666-670, 673-675, 679.

Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. Zagreb, Medicinska naklada, 2007, str. 392-393.

Kusić Z, Jukić T, Franceschi M, Dabelić N, Rončević S, Lukinac Lj, Labar Ž, Mateša N, Solter M, Dodig D, Koršić M, Bence-Žigman Z. Smjernice Hrvatskog društva za racionalnu dijagnostiku poremećaja funkcije štitnjače. *Liječnički Vjesnik*, 2009; 131.

Licata G, Scaglione R, Novo S, Dichiaro MA, Di Vincenzo D. Behaviour of serum T3, rT3, TT4, FT4 and TSH levels after exercise on a bicycle ergometer in healthy euthyroid male young subjects. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1984, 60, 753-759.

Msd medicinski priručnik za pacijente, <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-za-pacijente/hormonski-poremecaji/poremecaji-stitnjace>, pristupljeno 1.4.2021.

Nair R, Mahadevan S, Muralidharan R.S. Does fasting or postprandial state affect thyroid function testing? *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2014, 18, 705–707.

Ranabir S, Reetu K. Stress and hormones. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*. 2011, 15, 18-22.

Saravanan P, Siddique H, Simmons DJ, Greenwood R, Dayan CM. Twenty-four hour hormone profiles of TSH, Free T3 and free T4 in hypothyroid patients on combined T3/T4 therapy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2007, 115, 261-267.

Sviridonova MA, Fadeyev VV, Sych YP, Melnichenko GA. Clinical significance of TSH circadian variability in patients with hypothyroidism. *Endocr Res*. 2013, 38, 24-31.

Šimundić AM. Practical recommendations for statistical analysis and data presentation in Biochemia Medica journal. *Biochem Med*. 2012, 22, 15–23.

Štraus B, Plavšić V. Hormoni. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čeplak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 354-360.

Valentina Vidranski. Štitnjača - u lovu na leptira. Priručnik za trajno usavršavanje Hrvatske komore medicinskih biokemičara. Zagreb, Medicinska naklada, 2020, str. 9-12., 14-19.

8. Sažetak

8.1. Sažetak

Bolesnici s hipotireozom liječe se levotiroksinom, sintetskim analogom tiroksina. Laboratorij ima središnju ulogu u dijagnozi hipotireoze, praćenju pacijenata i doziranju nadomjesne terapije. Predanalitički čimbenici koji utječu na određivanje koncentracije funkcijskih testova štitnjače su vrijeme uzorkovanja i postupak uzimanja krvi, prehrana, tjelesna aktivnost, stres i dnevni ritam lučenja. Na razine hormona štitnjače utječu i različiti lijekovi poput furosemda, salicilata i heparina te određena stanja kao ona koja su praćena povećanjem koncentracije estrogena, novorođenačka dob i hepatits.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati učinke terapije levotiroksinom uzete prije vađenja krvi na koncentracije funkcijskih testova štitnjače kako bi se temeljem dobivenih spoznaja mogao definirati točan postupak pripreme bolesnika.

Istraživanje je provedeno prospektivno u KBC Sestre milosrdnice na malom uzorku od 20 dobrovoljaca odrasle životne dobi. Ispitanicima su se uzimali uzorci krvi za određivanje koncentracija TSH, T4, T3, FT4 i FT3 neposredno prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina. Koncentracije TSH, T4, T3, FT4 i FT3 određene su kemiluminiscentnom metodom s mikročesticama na automatskom analizatoru Abbott Architect i2000. Utvrđivanje statistički značajnih razlika u koncentracijama ispitali smo Wilcoxonovim parnim testom.

Dobiveni rezultati pokazali su statistički značajan pad koncentracije TSH koji je posljedica njegovog cirkadijalnog ritma lučenja. Terapija levotiroksinom dovela je do statistički značajnog povećanja koncentracije T4 i FT4. S druge strane, terapija levotiroksinom nije izazvala statistički značajnu promjenu koncentracije T3 ni FT3.

Terapija levotiroksinom ima klinički značajan učinak na koncentraciju funkcijskih testova štitnjače, preciznije na određivanje T4 i FT4, pa je opravdano od pacijenata zahtijevati da prije vađenja krvi ne uzimaju terapiju, već da to učine nakon uzorkovanja krvi.

8.2. Summary

Levothyroxine, a synthetic thyroxine analog, is used for the treatment of hypothyroidism. The laboratory has a central role in the diagnosis of hypothyroidism, monitoring of patients and dosing of replacement therapy. Preanalytical considerations in thyroid function tests include time and procedure of blood sampling, diet, physical activity, stress and circadian rhythm. Thyroid hormone concentrations are also affected by various medications such as furosemide, salicylates, heparin and certain conditions such as those accompanied by increased estrogen levels, neonatal age and hepatitis.

This study aimed to examine the effects of taking levothyroxine therapy before blood sampling to define the exact procedure of patient preparation for thyroid function tests based on the findings. Wilcoxon's paired test was used to determine whether there was a statistically significant difference in concentrations.

The study was conducted prospectively in the period from November 2020 to March 2021 in Sestre milosrdnice University Hospital Centre on a small sample of 20 adult volunteers. Blood samples for TSH, T4, T3, FT4 and FT3 assays were obtained immediately before and 2.5 hours after taking levothyroxine. Measurements of TSH, T4, T3, FT4 and FT3 were performed with the chemiluminescence method with microparticles on Abbott Architect i2000 automatic analyzer. Wilcoxon's paired test was used to determine whether there was a statistically significant difference in concentrations.

The results of the study showed a statistically significant decrease in TSH concentration due to its circadian rhythm of secretion. Levothyroxine therapy led to a statistically significant increase in T4 and FT4 concentrations. On the other hand, levothyroxine therapy did not cause a statistically significant change in T3 or FT3 concentration.

Levothyroxine therapy has a clinically significant effect on thyroid function tests, more specifically on T4 and FT4 concentrations, so it is justified to require patients not to take therapy before blood sampling, but to do so after blood samples are obtained.

9. Prilozi

9.1. Popis kratica

T3	-	trijodtironin
T4	-	tiroksin
FT3	-	slobodni trijodtironin
FT4	-	slobodni tiroksin
TSH	-	tireotropin ili tireostimulirajući hormon
TRH	-	hormon koji oslobađa tireotropin
SRIH	-	somatostatin
MIT	-	monojodtirozin
DIT	-	dijodtirozin
TBG	-	globulin koji veže tiroksin
rT3	-	reverzni ili obratni trijodtironin
TPOAt-	-	antitijela na tireoidnu peroksidazu
L-T4	-	levotiroksin
CMIA	-	kemiluminiscentna imunokemijska metoda s mikročesticama
RLU	-	relativne svjetlosne jedinice

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Analiza podataka o učincima levotiroksina na određivanje funkcijskih testova štitnjače

Lucija Daskijević

SAŽETAK

Bolesnici s hipotireozom liječe se levotiroksinom, sintetskim analogom tiroksina. Laboratorij ima središnju ulogu u dijagnozi hipotireoze, praćenju pacijenata i doziranju nadomjesne terapije. Predanalitički čimbenici koji utječu na određivanje koncentracije funkcijskih testova štitnjače su vrijeme uzorkovanja i postupak uzimanja krvi, prehrana, tjelesna aktivnost, stres i dnevni ritam lučenja. Na razine hormona štitnjače utječu i različiti lijekovi poput furosemda, salicilata i heparina te određena stanja kao ona koja su praćena povećanjem koncentracije estrogena, novorođenačka dob i hepatitis. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati učinke terapije levotiroksinom uzete prije vađenja krvi na koncentracije funkcijskih testova štitnjače kako bi se temeljem dobivenih spoznaja mogao definirati točan postupak pripreme bolesnika. Istraživanje je provedeno prospektivno u KBC Sestre milosrdnice na malom uzorku od 20 dobrovoljaca odrasle životne dobi. Ispitanicima su se uzimali uzorci krvi za određivanje koncentracija TSH, T4, T3, FT4 i FT3 neposredno prije i 2,5 sata nakon uzimanja levotiroksina. Koncentracije TSH, T4, T3, FT4 i FT3 određene su kemiluminiscentnom metodom s mikročesticama na automatskom analizatoru Abbott Architect i2000. Utvrđivanje statistički značajnih razlika u koncentracijama ispitali smo Wilcoxonovim parnim testom. Dobiveni rezultati pokazali su statistički značajan pad koncentracije TSH koji je posljedica njegovog cirkadijalnog ritma lučenja. Terapija levotiroksinom dovela je do statistički značajnog povećanja koncentracije T4 i FT4. S druge strane, terapija levotiroksinom nije izazvala statistički značajnu promjenu koncentracije T3 ni FT3. Terapija levotiroksinom ima klinički značajan učinak na koncentraciju funkcijskih testova štitnjače, preciznije na određivanje T4 i FT4, pa je opravdano od pacijenata zahtijevati da prije vađenja krvi ne uzimaju terapiju, već da to učine nakon uzorkovanja krvi.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 35 stranica, 11 grafičkih prikaza, 5 tablica i 18 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Hipotireoza, levotiroksin, predanalitika, štitnjača

Mentori: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Domagoj Marijančević, *spec. med. biokem., Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Dr. sc. Domagoj Marijančević, *spec. med. biokem., Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice*

Dr. sc. Marija Grdić Rajković, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta*

Rad prihvaćen: srpanj 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Medical biochemistry and Hematology
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Analysis of data on the effects of levothyroxine on the determination of thyroid function tests

Lucija Daskijević

SUMMARY

Levothyroxine, a synthetic thyroxine analog, is used for the treatment of hypothyroidism. The laboratory has a central role in the diagnosis of hypothyroidism, monitoring of patients and dosing of replacement therapy. Preanalytical considerations in thyroid function tests include time and procedure of blood sampling, diet, physical activity, stress and circadian rhythm. Thyroid hormone concentrations are also affected by various medications such as furosemide, salicylates, heparin and certain conditions such as those accompanied by increased estrogen levels, neonatal age and hepatitis. This study aimed to examine the effects of taking levothyroxine therapy before blood sampling to define the exact procedure of patient preparation for thyroid function tests based on the findings. Wilcoxon's paired test was used to determine whether there was a statistically significant difference in concentrations. The study was conducted prospectively in the period from November 2020 to March 2021 in Sestre milosrdnice University Hospital Centre on a small sample of 20 adult volunteers. Blood samples for TSH, T4, T3, FT4 and FT3 assays were obtained immediately before and 2.5 hours after taking levothyroxine. Measurements of TSH, T4, T3, FT4 and FT3 were performed with the chemiluminescence method with microparticles on Abbott Architect i2000 automatic analyzer. Wilcoxon's paired test was used to determine whether there was a statistically significant difference in concentrations. The results of the study showed a statistically significant decrease in TSH concentration due to its circadian rhythm of secretion. Levothyroxine therapy led to a statistically significant increase in T4 and FT4 concentrations. On the other hand, levothyroxine therapy did not cause a statistically significant change in T3 or FT3 concentration. Levothyroxine therapy has a clinically significant effect on thyroid function tests, more specifically on T4 and FT4 concentrations, so it is justified to require patients not to take therapy before blood sampling, but to do so after blood samples are obtained.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 35 pages, 11 figures, 5 tables and 18 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Hypothyroidism, levothyroxine, pre-analytics, thyroid gland

Mentors: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Domagoj Marijančević, Ph.D. European Specialist in Laboratory Medicine, Sestre milosrdnice University Hospital Center

Reviewers: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Domagoj Marijančević, Ph.D. European Specialist in Laboratory Medicine, Sestre milosrdnice University Hospital Center
Marija Grdić Rajković, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021.

