

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Davor Lešić

**POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA ZA
RECEPTOR MELATONINA (*MTNR1B*) S
KRONOTIPOM U BOLESNIKA S
HASHIMOTOVOM BOLESTI**

Doktorski rad

Osijek, 2025.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacija

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: Temeljne medicinske znanosti i biologija

POVEZANOST POLIMORFIZAMA GENA ZA RECEPTOR MELATONINA (*MTNR1B*) S KRONOTIPOM U BOLESNIKA S HASHIMOTOVOM BOLESTI

Davor Lešić

Disertacija je izrađena u poliklinici Leptir Zagreb te na Fakultetu za dentalnu medicinu i zdravstvo Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor 1: doc. dr. sc. Ivana Škrlec, mag. mol. biol.

Mentor 2: izv. prof. dr. sc. prim. Darko Katalinić, dr. med.

Kratki sažetak doktorske disertacije:

Receptori za melatonin izraženi su u većini tkiva, uključujući i štitnu žlijezdu, a vežu cirkadijani hormon, melatonin. Parafolikularne, C-stanice, štitne žlijezde mogu sintetizirati melatonin. Polimorfizmi gena za receptor melatonina (*MTNR1B*) mogu utjecati na osjetljivost za razvoj autoimunih bolesti štitne žlijezde, među kojima je najčešća Hashimotova bolest. Melatonin djeluje kao modulator stanične imunosti putem receptora *MTNR1B* vezanih na membranu imunoloških stanica te također utječe na poremećaje spavanja kao što su dnevna pospanosti i kronotip. Cilj istraživanja je ispitati povezanost polimorfizama gena za receptor melatonina s cirkadijanim fenotipovima (dnevnom pospanosti i kronotipom) u bolesnika s Hashimotovom bolesti. U istraživanju je sudjelovalo 115 pacijenata kod kojih je dnevna pospanost bila povezana s polimorfizmom rs10830963 gena *MTNR1B*. Indeks tjelesne mase bio je povezan s rs10830963 te je alel G češći u pacijenata s Hashimotovom bolesti s većim indeksom tjelesne mase.

Broj stranica: 143

Broj slika: 10

Broj tablica: 56

Broj literaturnih navoda: 350

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: hipotireoza; kronotip; melatonin; tjelesna masa; pospanost; štitna žlijezda

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (zamjena)

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruder Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary area of science
Scientific Fields: Basic medical sciences and biology

ASSOCIATION BETWEEN POLYMORPHISMS OF THE MELATONIN RECEPTOR GENE (*MTNR1B*) AND CHRONOTYPE IN PATIENTS WITH HASHIMOTO'S DISEASE

Davor Lešić

Thesis performed at the Leptir Polyclinic in Zagreb and the Faculty of Dental Medicine and Health Josip Juraj Strossmayer University in Osijek.

Supervisor 1: Asst. Prof. Ivana Škrlec, BSc, PhD
Supervisor 2: Assoc. Prof. Darko Katalinić, MD, PhD

Short abstract:

Melatonin receptors are expressed in most tissues, including the thyroid gland. They bind the circadian hormone melatonin. The parafollicular C-cells of the thyroid gland can synthesize melatonin. Polymorphisms of the melatonin receptor gene (*MTNR1B*) may influence the risk of developing autoimmune thyroid diseases, the most common of which is Hashimoto's disease. Melatonin acts as a modulator of cellular immunity via *MTNR1B* receptors expressed on the membrane of immune cells. It also mediates the occurrence of sleep disorders such as daytime sleepiness and chronotype. The research aims to investigate the association between melatonin receptor gene polymorphisms and circadian phenotypes (daytime sleepiness and chronotype) in patients with Hashimoto's disease. The study involved 115 patients whose daytime sleepiness was associated with the rs10830963 polymorphism of the *MTNR1B* gene. Body mass index was associated with rs10830963, and the G allele is more common in patients with a higher body mass index with Hashimoto's disease.

Number of pages: 143

Number of figures: 10

Number of tables: 56

Number of references: 350

Original in: Croatian

Key words: hypothyroidism; chronotype; melatonin; body mass; sleepiness; thyroid gland

Date of the thesis defense:

Reviewers:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Predgovor

Istraživanje je provedeno na Fakultetu za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku u sklopu projekata IP7-FDMZ-2023 i IP-FDMZ-2024.2025-09 pod voditeljstvom doc. dr. sc. Ivane Škrlec, mag. mol. biol., univ. mag. pharm., te u Poliklinici Leptir u Zagrebu pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. prim. Darka Katalinića, dr. med.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Štitna žlijezda	3
1.1.1. Sinteza hormona štitne žlijezde	4
1.2. Autoimune bolesti štitne žlijezde	7
1.2.1. Hashimotova bolest.....	10
1.2.2. Mikronutrijenti kao rizični čimbenici za Hashimotovu bolest	12
1.2.3. ITM kao rizični čimbenik za Hashimotovu bolest.....	14
1.3. Melatonin.....	14
1.3.1. Receptori za melatonin	17
1.3.2. Melatonin i Hashimotova bolest	20
1.4. Kronotip.....	22
1.5. Dnevna pospanost.....	24
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	28
2.1. Hipoteza.....	28
3. ISPITANICI I METODE	29
3.1. Ispitanici	29
3.2. Metode.....	30
3.2.1. Biokemijske metode.....	31
3.2.2. Kronotip	33
3.2.3. Dnevna pospanost	34
3.2.4. Analiza polimorfizama gena <i>MTNR1B</i>	35
3.2.4.1. Izolacija DNA iz leukocita pune periferne krvi.....	36
3.2.4.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu	37
3.3. Plan istraživanja.....	41
3.4. Statističke metode.....	42
4. REZULTATI.....	46
4.1. Analiza polimorfizama gena <i>MTNR1B</i>	47
4.2. Kronotip i dnevna pospanost	51

4.3.	Povezanost polimorfizama gena <i>MTNR1B</i> s kronotipom.....	54
4.4.	Povezanost polimorfizama gena <i>MTNR1B</i> s dnevnom pospanošću.....	61
4.5.	Razlike u polimorfizmima gena <i>MTNR1B</i> na temelju anti-Tg.....	67
4.6.	Razlike u polimorfizmima gena <i>MTNR1B</i> na temelju ITM-a	73
4.7.	Razlike u polimorfizmima gena <i>MTNR1B</i> na temelju primjene nadomjesne hormonske terapije s LT4.....	79
5.	RASPRAVA	86
5.1.	Povezanost polimorfizama gena <i>MTNR1B</i> s kronotipom i dnevnom pospanošću....	87
5.2.	Povezanost polimorfizama gena <i>MTNR1B</i> s kliničkim pokazateljima hipotireoze ..	92
5.3.	Povezanost polimorfizama gena <i>MTNR1B</i> s Hashimotovom bolesti ovisno o razini anti-Tg	95
5.4.	Povezanost polimorfizama gena <i>MTNR1B</i> s Hashimotovom bolesti ovisno o ITM-u..	96
5.5.	Povezanost polimorfizama gena <i>MTNR1B</i> s nadomjesnom hormonskom terapijom s LT4	99
5.6.	Prednosti i ograničenja istraživanja.....	101
6.	ZAKLJUČAK.....	104
7.	LITERATURA	105
8.	SAŽETAK	128
9.	SUMMARY	130
10.	ŽIVOTOPIS	132

POPIS KRATICA

AIC	Akaikeov kriterij informacije, engl. <i>Akaike information criterion</i>
ADCC	stanično posredovana citotoksičnost ovisna o protutijelima, engl. <i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
AITD	autoimuna bolest štitne žlijezde, engl. <i>Autoimmune thyroid diseases</i>
anti-Tg	protutijela na tireoglobulin
anti-TPO	protutijela na tireoidnu peroksidazu
anti-TSHR	protutijela na receptor TSH
cAMP	ciklični adenzin monofosfat, engl. <i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
CD40	engl. <i>Cluster of differentiation 40</i>
CMIA	kemiluminiscentna imunokemijska metoda pomoću magnetskih mikročestica, engl. <i>Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay</i>
CTLA4	engl. <i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DIO	jodtironin dejodinaza, engl. <i>Iodothyronine deiodinase</i>
DIT	dijodtirozin
ELISA	engl. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESS	Epworthova ljestvica pospanosti, engl. <i>Epworth Sleepiness Scale</i>
ETA	engl. <i>European Thyroid Association</i>
FAM	engl. <i>Fluorescein amidites</i>
FOXE1	engl. <i>Forkhead box E1</i>
FPKM	engl. <i>Fragments Per Kilobase Million</i>
FRET	prijenos fluorescentne rezonantne energije, engl. <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
ft3	slobodni trijodtironin
ft4	slobodni trioksin
GWAS	studije povezanosti cijelih genoma, engl. <i>Genome-wide association studies</i>
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HLA	humani leukocitni antigen, engl. <i>Human leukocyte antigens</i>

HPT	os hipotalamus-hipofiza-štitna žlijezda, engl. <i>Hypothalamus-pituitary-thyroid</i>
IFN- γ	interferon gama
Ig	imunoglobulin
IL-2	interleukin 2
ITM	indeks tjelesne mase
kDa	kilo Dalton
LT4	levotiroksin
MEQ	upitnik jutarnji-večernji kronotip, engl. <i>Morningness-Eveningness Questionnaire</i>
MGB	engl. <i>Minor Groove Binder</i>
MHC	glavni histokompatibilni kompleks, engl. <i>Major histocompatibility complex</i>
MIT	monojodtirozin
MTCQ	engl. <i>Munich Chronotype Questionnaire</i>
MTNR1A/B	receptor za melatonin 1A/B
NQF	nefluorescentni prigušivač, engl. <i>Nonfluorescent quencher</i>
OSA	opstruktivna bolesti spavanja, engl. <i>Obstructive Sleep Apnea</i>
PL-CSEM	engl. <i>Partition-Ligation Combination-Subdivision Expectation Maximization</i>
PTPN22	nereceptorska protein tirozin fosfataza tipa 22, engl. <i>Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22</i>
rMEQ	kratki upitnik jutarnji-večernji kronotip, engl. <i>Reduced Morningness-Eveningness Questionnaire</i>
ROS	reaktivne vrste kisika, engl. <i>Reactive oxygen species</i>
SCN	suprahijazmatska jezgra, engl. <i>Suprachiasmatic nucleus</i>
SE	standarna greška, engl. <i>Standard error</i>
SLC36A4	engl. <i>Solute carrier family 36 member 4</i>
SNP	polimorfizmi jednog nukleotida, engl. <i>Single nucleotide polymorphisms</i>
T3	trijodtironin
T4	tiroksin

TBG	globulin koji veže hormone štitne žlijezde, engl. <i>Thyroxine-binding globulin</i>
Tg	tireoglobulin
TGF- β	transformirajući čimbenik rasta beta, engl. <i>Transforming growth factor beta</i>
Th1	pomoćnički T-limfociti tipa 1
Th2	pomoćnički T-limfociti tipa 2
TLR	receptori slični Tollu, engl. <i>Toll-Like Receptors</i>
TNF- α	čimbenik nekroze tumora alfa, engl. <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TPO	tireoidna peroksidaza, engl. <i>Thyroid peroxidase</i>
TR	receptor hormona štitne žlijezde, engl. <i>Thyroid receptor</i>
TRH	tireotropin oslobađajući hormon, engl. <i>Thyrotropin-releasing hormone</i>
TSH	tireotropni hormon ili hormon koji stimulira štitnu žlijezdu, engl. <i>Thyroid stimulating hormone</i>
TSHA	alfa podjedinica TSH
TSHB	beta podjedinica TSH
TSHR	TSH receptor, engl. <i>Thyroid-stimulating hormone receptor</i>
VDR	receptor vitamina D, engl. <i>Vitamin D receptor</i>
VIC	engl. <i>Fluorescent dye 2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein</i>
VIF	čimbenik inflacije varijance, engl. <i>Variance inflation factor</i>
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija, engl. <i>World Health Organization</i>

1. UVOD

Poremećaj cirkadijanoga ritma prepoznat je kao poremećaj endokrinog sustava. Cirkadijani poremećaj također utječe na rad nekih endokrinih žlijezda, što za posljedicu može imati promjene u lučenju glukokortikoida, melatonina i hormona hipofize [1]. Trenutne znanstvene spoznaje govore u prilog da je melatonin glavni cirkadijani hormon [2]. Melatonin ima višestruke biološke funkcije, uključujući promicanje sna, reguliranje cirkadijanih i sezonskih ritmova, usporavanje starenja, antioksidacijske, protuupalne, kronobiotske i epigenetske regulatorne funkcije. Osim toga, melatonin ima ulogu u regulaciji urođenih i adaptivnih imunoloških odgovora te se povezuje s autoimunim bolestima [3–6]. Začarani krug između cirkadijanih poremećaja i poremećaja imunološkog odgovora opisan je u različitim upalnim bolestima [7]. Tako je melatonin, zbog svoje imunoregulacijske funkcije [8–11], povezan s nekoliko autoimunih bolesti, uključujući sistemski eritemski lupus, multiplu sklerozu, dijabetes melitus tipa 1, reumatoidni artritis te upalne bolesti crijeva [3–6,12].

Hashimotovu bolest (Hashimotov autoimuni, kronični tireoiditis) vrlo često prati oslabljena funkcija štitne žlijezde (primarna hipotireoza) te se procjenjuje da zahvaća oko 1-5 % opće populacije [13]. Definirana je smanjenim razinama hormona štitne žlijezde tj. slobodnog tiroksina (fT4) uz sniženu ili normalnu razinu slobodnog trijodtironina (fT3) s posljedičnim porastom vrijednosti tireotropnog hormona (TSH) koji se sintetizira u hipofizi (mehanizam negativne povratne sprege). U genetski predisponiranih pojedinaca, Hashimotova bolest praćena je poremećajem humoralne imunosti – povećano stvaranje protutijela na tireoidnu peroksidazu (anti-TPO) i tireoglobulin (anti-Tg), i u većoj mjeri, stanično posredovanim imunološkim procesima koji dovode do poticanja apoptoze folikularnih stanica štitne žlijezde [14,15], povećane infiltracije limfocita u štitnu žlijezdu i uništavanja folikula štitne žlijezde, što posljedično utječe na smanjeno izlučivanje hormona štitne žlijezde i različite metaboličke promjene (snižene vrijednosti željeza [16,17] uz povišene razine lipoproteina (kolesterol) [18,19]). Međutim, kod sekundarne anemije i sekundarne hiperlipidemije moguća je reverzibilnost uz nadomjesno hormonsko liječenje levotiroksinom (L-tiroksinom ili LT4), osim kod onih bolesnika kod kojih se radi o genetskim ili nekim drugim mehanizmima koji uvjetuju poremećaje metabolizma željeza i lipida.

Osovina hipotalamus–hipofiza–štitna žlijezda (engl. *Hypothalamus-pituitary-thyroid*, HPT) pod kontrolom je cirkadijanog sata preko suprahijazmatske jezgre (engl. *Suprachiasmatic*

nucleus, SCN) u hipotalamusu. Poremećaji dnevnog profila lučenja TSH postoje u nekih bolesnika s hipotireozom i u bolesnika s primarnom hipertireozom [1]. Neka ranija istraživanja pokazala su da postoji povezanost između melatonina i funkcije štitne žlijezde [20–22]. Na primjer, melatonin bi mogao, posredno ili neposredno, potisnuti mitozu folikularnih stanica štitne žlijezde *in vivo* te može potisnuti lučenje hormona štitne žlijezde [23,24].

Melatonin i receptori za melatonin prisutni su u štitnoj žlijezdi ljudi (BioGPS baza podataka) temeljem rezultata oligonukleotidnih mikročipova (engl. *Microarray*), na temelju podataka iz dva uzroka odrasle štitne žlijezde i dva uzorka fetalne štitne žlijezde (<http://biogps.org/#goto=genereport&id=4544>) [25]. Pozitivno imunohistofluorescentno bojanje na receptor MTNR1B pokazano je i u štitnoj žlijezdi štakora [26]. Navedeno upućuje na potencijalni utjecaj melatonina na tkivno-specifičnu aktivnost gena u štitnoj žlijezdi putem receptora MTNR1B [6]. Sporadična ekspresija gena *MTNR1B* zabilježena je i u štitnoj žlijezdi čovjeka (sekvenciranje RNA, 0,43 100xFPKM, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MTNR1B#expression>) [26], lijevom režnju (u dva od šest uzoraka, ekspresija mRNA), i preciznije, u folikularnim epitelnim stanicama (imunohistokemijska metoda, jedan preparat, https://www.nextprot.org/entry/NX_P49286/expression) [27]. Sporadična ekspresija *MTNR1B* također je zabilježena u lijevom režnju štitne žlijezde sekvenciranjem ukupne tkivne RNA (13/124 uzoraka, https://www.bgee.org/search/raw-data?pageType=proc_expr_values&dana_type=RNA_SEQ&data=06a2fd671425f7f52611567c2624580b48d8486c) [28], a imunohistokemijskom metodom – korištenjem protutijela HPA074024 (anti-MTNR1B protutijelo proizvedeno u zeca) – detektirana je ekspresija *MTNR1B* na razini proteina u folikularnim stanicama štitne žlijezde (*The Human Protein Atlas*, www.proteinatlas.org) [29]. Ista baza, međutim, ne pruža jednoznačne dokaze o genskoj ekspresiji *MTNR1B* u štitnoj žlijezdi ljudi (sekvenciranje RNA, pet negativnih uzoraka, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000134640-MTNR1B/tissue/thyroid+gland>) [29]. Slično, ni u *Ensembl* bazi nije zabilježena ekspresija *MTNR1B* gena u tkivu štitne žlijezde (https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/ExpressionAtlas?db=core;g=ENSG00000134640;r=11:92969651-92985066).

1.1. Štitna žlijezda

Štitna žlijezda je endokrina žlijezda smještena u srednjem dijelu vrata neposredno ispred grkljana i dušnika [30]. Ima ključnu ulogu u regulaciji metabolizma, rasta i razvoja putem hormona koje proizvodi [31]. Funkcionalna jedinica štitne žlijezde je folikul. To su okrugle strukture obložene jednim slojem kockastih ili stupčastih epitelnih stanica, poznatih kao folikularne stanice [30]. Folikularne stanice odgovorne su za sintezu i lučenje hormona štitne žlijezde, a središnje područje folikula sadrži periodnu kiselinu–Schiff–pozitivan koloid u kojem je pohranjen tireoglobulin prije intracelularne hidrolize [30]. Parafolikularne ili C-stanice smještene su između folikula ili unutar folikularnog epitela [32].

Štitna žlijezda proizvodi i luči nekoliko hormona. Hormon tiroksin (T4) proizvode folikularne stanice i čini 90 % proizvodnje hormona koji sintetizira štitna žlijezda [33]. Sastoji se od aminokiseline tirozina i joda te je folikularnim epitelnim stanicama potreban jod za njegovu sintezu [31]. Glavna uloga T4 je da se pretvara u aktivniji trijodtironin (T3) u perifernim tkivima. Štitna žlijezda izravno izlučuje i malu količinu T3, no većina T3 nastaje direktno iz T4. T3 se veže na nuklearne receptore u ciljnim stanicama te utječe na ekspresiju gena i povećava brzinu metabolizma, sintezu proteina i osjetljivost na kateholamine (npr. adrenalin) [32]. T3 ima važnu ulogu u regulaciji metabolizma, utječući na rast i razvoj te regulira rad mnogih organa i tkiva [34]. Oba hormona, T4 i T3, povećavaju bazalni metabolizam, potrošnju kisika i stimuliraju proizvodnju topline [31]. Također, ključni su za normalan rast i neurološki razvoj, osobito kod fetusa i dojenčadi. Hormoni štitne žlijezde povećavaju otkucaje srca, minutni volumen srca i potiču vazodilataciju, poboljšavajući protok krvi u mnogim organima. Sintezu i oslobađanje hormona štitne žlijezde reguliraju hipotalamus i hipofiza putem tireotropin oslobađajućeg hormona (engl. *Thyrotropin-releasing hormone*, TRH) odnosno TSH. Ova regulacija dio je negativne povratne sprege koja održava razine hormona unutar uskog raspona [32].

Kalcitonin, kojeg luče parafolikularne C-stanice, regulira razinu kalcija i fosfata u krvi [30]. Snižava razinu kalcija u krvi inhibiranjem aktivnosti osteoklasta (stanica koje razgrađuju kosti) i pospješuje izlučivanje kalcija putem bubrega [34]. Osim kalcitonina, parafolikularne C-stanice proizvode niz drugih peptida, uključujući somatostatin, peptid koji oslobađa gastrin i hormon koji oslobađa TSH [30,35].

1.1.1. Sinteza hormona štitne žlijezde

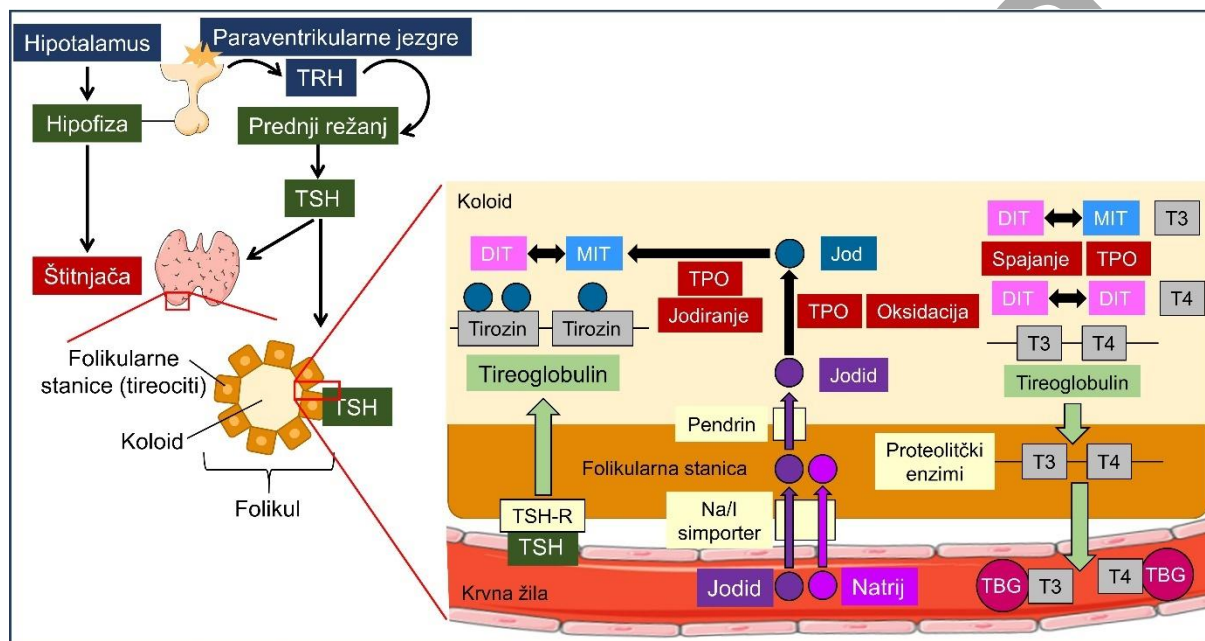
Sintezu i izlučivanje hormona štitne žlijezde prvenstveno regulira TSH [1]. TSH potječe iz tireotrofnih stanica (tireotrofa) smještenih u *pars distalis* u prednjem režnju hipofize [1]. Proizvodnja i izlučivanje TSH regulirani su putem TRH. Cirkulirajući hormoni štitne žlijezde kontroliraju sintezu i oslobađanje TRH i TSH kao dio klasične petlje negativne povratne sprege (os HPT) [1,36,37].

TSH je heterodimerni glikoprotein koji se sastoji od α i β podjedinica, te stimulira štitnu žlijezdu na proizvodnju T4 i T3. TRH koji se izlučuje iz podskupa neurona u paraventrikularnoj jezgri hipotalamusa, putem hipotalamus-hipofiznog portalnog sustava djeluje na oslobađanje TSH iz hipofize [1,36–38]. TRH se veže na membranski receptor na tireotrofima u *pars distalis* prednjeg režnja hipofize i stimulira sintezu TSH inducirajući ekspresiju mRNA *TSHA* i *TSHB*, koji kodiraju α i β podjedinice TSH [1,39].

Vezanjem TSH na TSH receptor (engl. *Thyroid-stimulating hormone receptor*, TSHR) potiče se proizvodnja hormona štitne žlijezde putem sekundarnih glasnika – cikličkog adenozin monofosfata (engl. *Cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) i inozitol fosfata [1,40,41]. TSHR sastoji se od izvanstanične podjedinice veličine oko 55 kDa i transmembranske podjedinice veličine oko 40 kDa koje su povezane disulfidnim vezama [41]. TSH receptor povezan je s G-proteinom na bazolateralnoj membrani folikularnih stanica štitne žlijezde [42,43] i glavni je regulator štitne žlijezde. Signalizacija kroz TSHR putem stimulacije citosolnih sekundarnih glasnika potiče sintezu hormona štitne žlijezde i rast folikularnih stanica štitne žlijezde [42,44]. Prirodni ligand TSHR je TSH koji se veže na više mjesta u izvanstaničnoj domeni [42,44].

Sinteza hormona štitne žlijezde počinje aktivnim transportom jodida (joda u njegovom ioniziranom obliku) u folikularne stanice, što je posredovano simporterom natrijevog jodida [30,45]. Unutarstanični jodid oksidira tireoidna peroksidaza (engl. *Thyroid peroxidase*, TPO) i veže se na tirozin da bi se formirali hormonski neaktivni jodtirozini – monojodtirozin i dijodtirozin [30,46] (**Slika 1**). Stvaranje T4 nastaje spajanjem dviju molekula dijodtirozina, dok T3 nastaje spajanjem jedne molekule monojodtirozina i jedne molekule dijodtirozina [30]. Molekule jodtironina naknadno se ugrađuju u tireoglobulin. Produkt tireoglobulinskog gena, homodimerni glikozilirani jodo-protein od oko 660 kDa, predstavlja glavni protein unutar štitne žlijezde (oko 80 %). Sinteza hormona štitne žlijezde ovisi o tireoglobulinu. Tireoglobulin

proizvode epitelne (folikularne) stanice štitne žlijezde, izlučuje se i pohranjuje u lumenu folikula (koloid) [42,47].



Slika 1. Osovina hipotalamus–hipofiza–štitna žlijezda i regulacija sinteze hormona štitne žlijezde. Paraventrikularne jezgre hipotalamusa sintetiziraju tireotropin oslobađajući hormon (TRH) koji potiče hipofizu na otpuštanje hormona koji stimulira štitnu žlijezdu (TSH). TSH se veže na TSH receptor (TSH-R) na stanicama štitne žlijezde (tireocitima) gdje potiče stvaranje tireoglobulina. Sinteza hormona štitne žlijezde započinje aktivnim transportom jodida u folikularne stanice pomoću simportera natrijevog jodida (Na/I). Unutarstanični jodid oksidira peroksidaza štitne žlijezde (TPO) te se jodid veže na tirozin djelovanjem TPO čime nastaju hormonski neaktivni jodtirozini – monojodtirozin (MIT) i dijodtirozin (DIT). Stvaranje tiroksina (T4) nastaje spajanjem dviju molekula DIT, dok trijodtironin (T3) nastaje spajanjem jedne molekule MIT i jedne molekule DIT što je posredovano djelovanjem TPO. Molekule jodtironina naknadno se ugrađuju u tireoglobulin. Tireoglobulin se razgrađuje oslobađajući T4 i T3 u krvotok. Hormoni štitne žlijezde se transportiraju do globulina koji vežu hormone štitne žlijezde (engl. *Thyroxine-binding globulin*, TBG) i dalje se krvnom cirkulacijom prenose do ciljnih tkiva.

Tireoglobulin ima važnu ulogu u skladištenju joda i sintezi hormona štitne žlijezde [42,44]. Nakon internalizacije iz lumena folikula u folikularne stanice, jodirani tireoglobulin razgrađuje

se kroz lizosomski put, oslobađajući uglavnom T4 i nešto T3 u krvotok [1]. Nakon sinteze, u nekim slučajevima tireoglobulin ulazi u cirkulaciju kroz prolaz koji dijelom ovisi o volumenu štitne žlijezde. Ulaskom u krvožilni sustav, tireoglobulin je izložen imunološkim stanicama. Antigenost tireoglobulina ovisi o njegovoj razini jodiranja [41] te je visokojodirani tireoglobulin antigenski [42,44,48,49]. Protutijela na tireoglobulin su primarno IgG s glavnim potklasama IgG2 koje nalazimo u Hashimotovoj bolesti i IgG4 koji prevladavaju u Gravesovoj bolesti [42,49]. Stimulacija folikularnih stanica hormonom TSH dovodi do resorpcije koloida preko apikalnog dijela folikularnih stanica i naknadnog otpuštanja T4 i T3 na bazalnom dijelu stanica gdje zatim ulaze u krvnu cirkulaciju [32]. Jodtirozini se podvrgavaju naknadnoj intratireoidnoj dejodinaciji recikliranjem nastalog slobodnog jodida.

Hormoni štitne žlijezde transportiraju se u serumu do proteina nosača [1,37]. TBG je glavni je proteinski prijenosnik koji čini 75 % vezanog T4 i sav vezani T3. Za ostalo odgovorni su prealbumin i albumin koji vežu T4 [33]. Nevezani, također poznati kao slobodni hormoni štitne žlijezde (fT4 i fT3), prenose se u ciljna tkiva membranskim transporterima [33]. Nakon ulaska u ciljnu stanicu, hormone štitne žlijezde metaboliziraju dejodinaze. Enzimi jodtironin dejodinaze (engl. *Iodothyronine deiodinases*, DIO) i prijenosnici hormona štitne žlijezde reguliraju koncentraciju hormona štitne žlijezde u tkivu [50]. Tip 1 jodtironin dejodinaza (DIO1) i tip 2 jodtironin dejodinaza (DIO2) funkcioniraju uglavnom kao aktivatori hormona štitne žlijezde, stvarajući T3 iz T4 uklanjanjem jednog joda s 5' mjesta T4. DIO3 inaktivira hormone štitne žlijezde uklanjanjem joda s položaja pet T3 što stvara neaktivne jodtironine u obrnutom smjeru [1,51].

Oslobodeni T3 i T4 djeluju kao dio povratne sprege koja inhibira proizvodnju TRH-a u hipotalamusu i TSH-a u hipofizi [1]. Receptor hormona štitne žlijezde (engl. *Thyroid receptor*, TR) ima izoforme, TR α i TR β . Kada se na njih veže T3, ova dva receptora potiskuju ekspresiju *TRH* i *TSHB* gena vezanjem na elemente odgovora hormona štitne žlijezde na DNA. U prisutnosti ili odsutnosti hormona štitne žlijezde, receptorski kompleksi hormona štitne žlijezde reguliraju pozitivnu ili negativnu ekspresiju ciljnog gena interakcijom s koaktivatorima, odnosno korepresorima [1,37].

1.2. Autoimune bolesti štitne žlijezde

Autoimune bolesti se obično klasificiraju kao organ-specifične ili organ-nespecifične bolesti. Najčešća organ-specifična autoimuna bolest je autoimuna bolest štitne žlijezde (engl. *Autoimmune thyroid diseases*, AITD) [52–54]. AITD su najraširenije autoimune bolesti, a uključuju skupinu bolesti štitne žlijezde koje dijele nalaz promijenjene funkcije štitne žlijezde s osjetljivošću određenom kombinacijom genetičkih i okolišnih čimbenika [55]. Glavno obilježje AITD su gubitak imunološke tolerancije i prisutnost staničnog i humoralnog imunološkog odgovora protiv antigena iz štitne žlijezde s reaktivnom infiltracijom T- i B-limfocita, stvaranjem autoprotutijela i, posljedično, razvojem kliničkih manifestacija [42,56,57].

AITD pogađaju 1 do 2 % populacije, a pet do 10 puta češće su u žena. To je heterogena skupina bolesti čija je posljedica gubitak tolerancije na vlastite antigene. Primarna značajka u patogenezi AITD je aktivacija i humoralnog i staničnog imunološkog odgovora protiv autoantigena. Autoprotutijela usmjerena protiv različitih antigena štitne žlijezde doprinose ekspanziji autoimunog odgovora, te imaju funkcionalnu ulogu jer mogu inducirati izlučivanje hormona štitne žlijezde [58]. Glavni antigeni štitne žlijezde koji mogu inducirati odgovor posredovan protutijelima su TSHR, Tg i TPO [52,59] (**Tablica 1**). Potpuna etiopatogeneza je i dalje do kraja nejasna, ali se smatra da različiti genetički i okolišni čimbenici imaju ulogu u razvoju autoimunosti, uključujući infekcije, niske razine vitamina D, UV zračenje i melatonin [60,61]. Većina navedenih čimbenika sezonski variraju te tako mogu utjecati na razvoj, težinu i progresiju bolesti [62].

Tablica 1. Značajke antigena štitne žlijezde

Karakteristike	Tg	TSHR	TPO
Protein	Jodirani glikoprotein	Receptor vezan uz G-protein	Hemoproteinski enzim
Broj aminokiselina	2748	743	933
Molekularna težina (kDa)	660	85	105–110
Lokalizacija epitopa	Uglavnom središnja regija i C-kraj	Uglavnom izvanstanična podjedinica	Uglavnom domena slična mijeloperoksidazi ili domena slična proteinskoj kontroli komplementa
Funkcija	Skladištenje jodida i proizvodnja hormona štitne žlijezde	Aktivacija signalnih puteva koji potiču ekspresiju gena koji kontroliraju rast i diferencijaciju tireocita i sintezu hormona štitne žlijezde	Biosinteza hormona štitne žlijezde
Položaj na kromosomu	8q24	14q31	2p25
Tg – tireoglobulin, TSHR – receptor hormona koji stimulira štitnu žlijezdu, TPO – tireoidna peroksidaza, kDa – kilo Dalton			

Dvije klinički najpoznatije AITD su primarna autoimuna hipertireoza (Flajani-Parry-Graves-von Basedowljeva bolest (tj. Gravesova bolest, kako se često skraćeno naziva) i primarna autoimuna hipotireoza koju uzrokuje Hashimotova bolest [55]. Kod osoba s Flajani-Parry-Graves-von Basedowljevom bolesti pronađena su uz autoprotutijela na TPO i Tg također i autoprotutijela protiv TSH receptora koja pretjerano stimuliraju štitnu žlijezdu, uzrokujući primarnu hipertireozu, koju karakterizira prekomjerna proizvodnja hormona štitne žlijezde [52]. Kod Hashimotove bolesti prisutna su autoprotutijela na TPO i Tg koja su u najvećem broju destruktivna, što dovodi do kronične upale i uništavanja tkiva štitne žlijezde. To rezultira primarnom hipotireozom, gdje žlijezda nije u stanju proizvesti dovoljno hormona [63]. Međutim, anti-TPO i anti-Tg mogu ponekad djelovati i stimulacijski na stanice štitne žlijezde pri čemu uzrokuju povišenje razine T4 i/ili T3, najčešće prolaznog karaktera. Ovo stanje nazivamo hašitoksikoza [64].

Anti-TPO prepoznaje svoje konformacijske epitope, posebno na razini imunološki dominantne regije, koja se sastoji od dvije preklapajuće regije, A i B regije [41,65]. Anti-TPO ne mogu prodrijeti kroz uske spojeve između stanica štitne žlijezde, pa se stoga ne mogu vezati na njihov autoantigen (TPO) [52]. Pokazano je da anti-TPO imaju važnu ulogu u imunološkoj patogenezi primarne hipotireoze kod AITD, te mogu inducirati dvije različite vrste citotoksičnosti, staničnu citotoksičnost ovisnu o protutijelima od strane prirodnih stanica ubojica (NK) i citotoksičnost ovisnu o komplementu te pridonose smrti tireocita i atrofiji štitne žlijezde [41,66,67]. Stanice štitne žlijezde pod učinkom komplementa mogu osloboditi proupalne molekule, povećati destrukciju tkiva i upalnu reakciju te inducirati veći rizik od AITD [52,68,69]. AITD mogu biti rezultat nekoliko mehanizama, uključujući potpuno odsustvo aktivnosti TPO, nemogućnost TPO da se veže na hem kofaktor, nemogućnost interakcije s tireoglobulinom i abnormalnu substaničnu lokalizaciju [52]. Velika većina polimorfizama gena *TPO* povezana je s određenim rizikom za AITD; međutim, taj je rizik nizak, što ukazuje na to da su i drugi čimbenici potrebni za pokretanje i razvoj AITD [52,70,71].

Anti-Tg prepoznaju nativni T-limfociti, a prisutni su u cirkulaciji u 60 do 80 % bolesnika s AITD [41]. IgG i IgM anti-Tg niskog afiniteta otkriveni su u bolesnika bez AITD, a IgG1 ili IgG4 anti-Tg ne mogu stimulirati komplement i nisu odgovorni za pojavu hipotireoze u AITD [41,66]. Pokazano je da postoji povezanost između varijanti aminokiselina tireoglobulina i AITD, te značajna povezanost između polimorfizma gena *Tg* i varijante humanog leukocitnog antigena (engl. *Human leukocyte antigens*, HLA) HLA-DRb1-Arg74 (varijanta koja sadrži arginin na mjestu 74) te obje doprinose visokom riziku od AITD [41,72].

Anti-TSHR su protutijela tipa IgG koja vežu TSHR na specifičnim veznim mjestima [41]. Anti-TSHR mogu se klasificirati u dvije skupine: ona koja stimuliraju TSH receptor i ona koja ga blokiraju. Stimulirajuća protutijela stimuliraju TSHR i vrlo su česta u bolesnika s Flajani-Parry-Graves-von Basedowljevom bolesti. Blokirajuća protutijela povećavaju rizik od primarne hipotireoze i mogu se otkriti u 10 do 90 % osoba s Hashimotovom bolesti, iako se također mogu naći u manjine pacijenata s Flajani-Parry-Graves-von Basedowljevom bolesti [52]. Anti-TSHR, naročito stimulirajuća, obilježje su Flajani-Parry-Graves-von Basedowljeve bolesti i imaju specifičnu patogenetsku ulogu [41].

1.2.1. Hashimotova bolest

Hashimotova bolest ili Hashimotov tireoiditis, poznat i kao kronični limfocitni tireoiditis, autoimuni je poremećaj u kojem imunološki sustav napada štitnu žlijezdu, što u najvećem broju slučajeva rezultira primarnom hipotireozom [73]. Bolest je prvi opisao Hakaru Hashimoto 1912. pod nazivom *Struma lymphomatosa* [55,74]. Autoprotutijela prisutna u ovom poremećaju identificirali su 1956. Roitt i suradnici [55]. Bolest karakterizira limfocitna infiltracija parenhima uzrokujući gustu nakupinu limfocita, plazma stanica i makrofaga ponekad s formiranjem germinativnog centra i prisutnošću tiroidnih autoprotutijela na TPO i/ili Tg [55,74]. Infiltracija limfocita, osobito T-stanica, uništava folikule štitne žlijezde što dovodi do postupne atrofije i fibroze [41,75].

Hashimotova bolest najčešći je temeljni uzrok primarne hipotireoze [31]. Kod primarne hipotireoze štitna žlijezda ne proizvodi dovoljne količine svojih hormona. Povijesno gledano glavni uzrok primarne hipotireoze bio je nedostatak joda. Nedostatak joda aktivira autoimuni odgovor i pokreće signalne putove koji vode do apoptoze, što dovodi do razaranja tkiva štitne žlijezde [61,76]. Međutim, u zemljama zapadnog svijeta, prosječna osoba unosi višestruko veće količine kuhinjske soli (NaCl) nego što je potrebno, a poznata je činjenica da se sol na našem prostoru jodira od 1953. godine što je zakonski regulirano (Zakon obveznom jodiranju soli). Također, u Hrvatskoj je 1996. uveden Naputak o jodiranju kuhinjske soli (NN 84/96) kojim se propisuje jodiranje s 25 mg kalijeva jodida po kilogramu NaCl-a [77]. Nadalje, globalni prosječni unos soli procjenjuje se na 10,8 grama dnevno, što je dvostruko više od preporuke Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) od manje od 5 grama soli dnevno (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction>) [78]. Stoga je temeljni razlog primarne hipotireoze u razvijenim zemljama danas Hashimotova bolest [79], a ne deficit joda. Međutim, hipotireoza može nastati i kao posljedica liječenja primarne hipertireoze. Nakon primjene radioaktivnog joda u terapijske svrhe ili operacije štitne žlijezde zbog primarne hipertireoze kod pacijenata s Flajani-Parry-Graves-von Basedowljevom bolesti, operacije štitne žlijezde zbog zloćudnih tumora štitne žlijezde ili višečvoraste štitne žlijezde, nastupa tzv. post-terapijska (jatrogena) hipotireoza [80].

Sekundarna hipotireoza posljedica je nedovoljne stimulacije štitne žlijezde zbog patologije hipofize (nedovoljna proizvodnja TSH), dok je tercijarna hipotireoza posljedica nedovoljne stimulacije štitne žlijezde zbog patologije hipotalamusa (nedovoljna proizvodnja TRH). One se

puno rjeđe javljaju u odnosu na primarnu hipotireozu. Kao uzorci se navode različiti poremećaji hipofize ili hipotalamusa poput tumora, apopleksije, trauma glave, otpornost na TRH i TSH, nedostatak TRH i TSH, do brojnih lijekova koji utječu na rad hipofize i/ili hipotalamusa [80].

Prevalencija Hashimotove bolesti je oko 1 na 1000 odraslih osoba i raste s godinama, zahvaćajući do 40 % starijih žena [42,81,82]. Procjenjuje se da oko 3 do 4 % stanovništva boluje od Hashimotove bolesti [55]. Hashimotova bolest pojavljuje se sedam puta češće u žena s vršnom incidencijom između 40-e i 60-e godine života [74,83] te je češća u zemljama s viškom joda u prehrani [42]. Bijela rasa pokazuje veću incidenciju od crne, dok je rijetka kod stanovnika Pacifika [84,85]. Hashimotova bolest u oko 20 do 30 % oboljelih nastaje zbog kombinacije genetske osjetljivosti i čimbenika okoliša koji uzrokuju gubitak imunološke tolerancije [41], a također može koegzistirati s Flajani-Parry-Graves-von Basedowljevom bolesti [74].

Kod Hashimotove bolesti destrukcija štitne žlijezde i jačanje autoimunog procesa događa se najvećim dijelom putem humoralnog odgovora [86]. Infiltrirajuće B-stanice (potaknute Th2 citokinima, odnosno IL-4, IL-5 i IL-10) oslobađaju autoprotutijela (uglavnom anti-TPO i anti-Tg), što dalje dovodi do razaranja tireocita u mehanizmu stanično posredovane citotoksičnosti ovisne o protutijelima (engl. *Antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) [87–89]. Protutijela na TPO, prisutna u više od 90 % oboljelih, mogu fiksirati komplement i potaknuti citotoksičnost ovisnu o komplementu. Protutijela na Tg nalaze se u više od 75 % oboljelih [30], dok su protutijela na TSH receptor prisutna u 10 % do 15 % oboljelih. Ona blokiraju TSH receptor što za posljedicu ima smanjenu proizvodnju T4 i T3 [79]. Zbog smanjene količine tireocita, stimulacija štitne žlijezde s dugotrajno povišenim razinama TSH u pacijenata s Hashimotovom bolesti može stimulirati proliferaciju folikularnog epitela čime dolazi do rasta, odnosno povećanja opsega štitne žlijezde (nastanak guše ili strume) [84].

Hashimotova bolest ima genetsku predispoziciju i sklona je grupirati se u obiteljima, što dodatno ukazuje na jaku genetsku komponentu bolesti [90]. Čak 50 % srodnika u prvom koljenu oboljelih s Hashimotovom bolesti ima autoprotutijela na štitnu žlijezdu [30]. Geni humanog leukocitnog antigena (HLA) klase II i njihovi aleli smatraju se važim čimbenicima za nastanak Hashimotove bolesti [91]. Hashimotova bolest povezana je s određenim tipovima HLA, kao što su HLA-B8, HLA-DR5, HLA-D3 i HLA-DR4 [30,91]. Specifični HLA-DQ aleli, kao što su DQA1*0102 i DQB1*0602, negativno su povezani s razvojem Hashimotove bolesti, što

ukazuje na potencijalni zaštitni učinak [92]. Također, polimorfizmi jednog nukleotida gena *CTLA4* (engl. *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), koji regulira imunološki odgovor, povezani su s razvojem Hashimotove bolesti [93–95]. Polimorfizmi jednog nukleotida različitih gena mogu pridonijeti od 4,8 % do 5,5 % ukupne genetske varijabilnosti u Hashimotovoj bolesti [95–97]. Genetski elementi očituju se iz činjenice da 95 % osoba koje obole su žene [55,98], što snažno ukazuje i na moguću ulogu spolnih hormona u Hashimotovoj bolesti. Testosteron potiskuje, a estrogen pogoršava eksperimentalni autoimuni tireoiditis [55].

Dijagnoza Hashimotove bolesti temelji se na kliničkom pregledu te znakovima i simptomima bolesti, ultrazvučnom pregledu štitne žlijezde i laboratorijskom nalazu povišenih razina anti-TPO i/ili anti-Tg [41]. Štitna žlijezda je skoro uvijek povećana s prosječnom težinom od 40 do 80 g, a povećanje je obično difuzno i simetrično [30]. Ključni nalazi laboratorijskih pretraga su povišeni, a nekada i iznimno visoki titri anti-TPO i/ili anti-Tg u serumu [31]. Anti-TPO smatraju se najvažnijim laboratorijskim obilježjem Hashimotove bolesti i prisutna su u oko 95 % oboljelih [84,99]. Nasuprot tome, anti-Tg su prisutna u nižem postotku (60–80 %) i stoga su manje dijagnostički pouzdana [100]. Čini se da povišena razina anti-Tg može biti izraz početnog, dok povišena razina anti-TPO može biti rezultat kasnijeg imunološkog odgovora [84,101]. Povišena razina TSH u prisutnosti normalnih razina T4 i/ili T3 nagovještava primarnu subkliničku hipotireozu [55]. Ona se međutim široko dijagnosticira zbog proširene uporabe testova funkcije štitne žlijezde [74]. Malo se zna o progresiji eutireoidnog u hipotireoidno stanje kod Hashimotove bolesti, a odnosi se na progresiju subkliničke do očite (kliničke) hipotireoze (povišena razina TSH, smanjena razina T4 i/ili T3) u odraslih s Hashimotovom bolesti [74,102].

Liječenje Hashimotove bolesti temelji se na liječenju primarne hipotireoze. Koristi se nadomjesna terapija hormonima štitne žlijezde, tj. sintetski oblik levotiroksina (LT4) [41]. Sintetski LT4 lijek je koji oboljeli uzimaju svakodnevno, doživotno, međutim kod nekih starijih osoba koje imaju manje potrebe za hormonima štitne žlijezde moguće je liječenje s LT4 pauzirati, a ponekad čak i u potpunosti prekinuti [55].

1.2.2. Mikronutrijenti kao rizični čimbenici za Hashimotovu bolest

Različiti dodaci prehrani mogu imati važnu ulogu u nastanku i razvoju Hashimotove bolesti [93]. Tako jod može uzrokovati autoimuni tireoiditis stvaranjem reaktivnih vrsta kisika,

povećanjem imunogenosti Tg-a i izravnim stimuliranjem imunološkog sustava, posebno dendritičnih stanica i povećanjem limfocitne infiltracije štitne žlijezde [74]. Hrvatska se smatra područjem s dovoljnim unosom joda zbog nacionalnih propisa kao dio programa globalne mreže (engl. *Iodine Global Network*) za poremećaje uzrokovane nedostatkom joda [103,104].

Smanjene razine vitamina D u serumu kod ispitanika s Hashimotovom bolesti povezane su s metaboličkim promjenama u hipotireozi [84]. Normalne koncentracije vitamina D povezane su sa značajnim poboljšanjem funkcije štitne žlijezde, naročito s adaptivnim imunološkim sustavom jer vitamin D sprječava diferencijaciju dendritičnih stanica i smanjuje prezentaciju antigena čime se sprječava razvoj autoimunih bolesti kao što je Hashimotova bolest [105,106]. Vitamin D utječe na B-limfocite na različite načine, uključujući inhibiciju naivne diferencijacije B-limfocita ili njihovog sazrijevanja u plazma stanice, što potencijalno može smanjiti proizvodnju autoprotutijela [89,107]. Istraživanja su pokazala da su razine vitamina D u serumu niže u ispitanika s AITD u odnosu na zdrave ispitanike [41,108]. Također, različiti polimorfizmi gena za receptor vitamina D imaju važnu ulogu u riziku od nastanka AITD. Literaturni podaci pokazuju da se nakon šest mjeseci suplementacije vitaminom D, razine anti-TPO i anti-Tg mogu značajno smanjiti, podupirući ideju učinkovitosti vitamina D u smanjenju koncentracije autoprotutijela u Hashimotovoj bolesti [41]. Kakva je detaljna klinička reperkusija navedenih promjena, ostaje tek za istražiti.

Željezo ima važnu ulogu u hemoglobinu i mioglobinu te je uključeno u mnoge važne metaboličke procese [61,109]. Željezo i selen sudjeluju u stvaranju T3 i T4, gdje je jod dio ovih molekula, a selen je kofaktor dejodinaza koji aktivira T4 pretvarajući ga u T3 ili inaktivira i T4 i T3 [93,110]. Osim toga, željezo je važno za aktivnost TPO te njegov nedostatak smanjuje aktivnost TPO, a može dovesti i do depresije funkcije štitne žlijezde te postoji povezanost između anemije, štitne žlijezde i metaboličkog statusa u bolesnika s Hashimotovom bolesti [111–114]. Naime, TPO se može aktivirati tek nakon što se veže za hem kofaktor, koji je uključen u sintezu hormona štitne žlijezde [115], stoga sadržaj željeza utječe na sintezu T3 i T4 [61,116]. Nedavno je utvrđeno da je osovina štitna žlijezda–crijeva usko povezana s Hashimotovom bolesti [117]. Hipotireoza može dovesti do probavnih abnormalnosti, oslabljene funkcije crijeva i smanjene apsorpcije željeza. Nedostatak željeza ozbiljno utječe na jednu regulaciju Tg-a. Tijelo ne može učinkovito apsorbirati željezo iz hrane, što dovodi do malapsorpcije željeza [61,115]. Međutim, kod sekundarne anemije moguća je reverzibilnosti

uz nadomjesno hormonsko liječenje s LT4, osim kod onih bolesnika kod kojih se radi o genetskim ili nekim drugim mehanizmima koji uvjetuju poremećaj metabolizma željeza.

1.2.3. ITM kao rizični čimbenik za Hashimotovu bolest

Kao što je već ranije spomenuto, AITD su posljedica međudjelovanja genetičke osjetljivosti i čimbenika okoliša koji dovode do smanjene imunološke tolerancije. Pretilost doprinosi patogenezi autoimunih bolesti, uključujući i Hashimotovu bolest [118,119], kroz različite mehanizme, kao što su kronična upala, stvaranje i lučenje adipokina i modulacija imunoloških stanica [120,121]. Indeks tjelesne mase (ITM) često služi kao zamjena za ukupnu adipoznost i koristi se u epidemiološkim studijama za procjenu odnosa između pretilosti i različitih zdravstvenih ishoda [122]. Pretilost pogoršava ozbiljnost određenih autoimunih bolesti i smanjuje odgovor na liječenje, s time da višak tjelesne masti može potaknuti napredovanje autoimunih bolesti [123]. Pretpostavlja se da osobe s povišenim ITM mogu biti podložnije razvoju Hashimotove bolesti što je podržano rezultatima jednog opservacijskog istraživanja [124] koje je pokazalo da su opća i abdominalna pretilost bile povezane s povećanim rizikom od Hashimotove bolesti [124]. Rezultati istraživanja metode Mendelove randomizacije pokazali su da postoji potencijalna uzročna povezanost između ITM i autoimunog tireoiditisa [125]. Stoga se pretpostavlja da bi pretilost mogla pridonijeti razvoju Hashimotove bolesti, što bi zauzvrat moglo rezultirati i njenom progresijom [123,126].

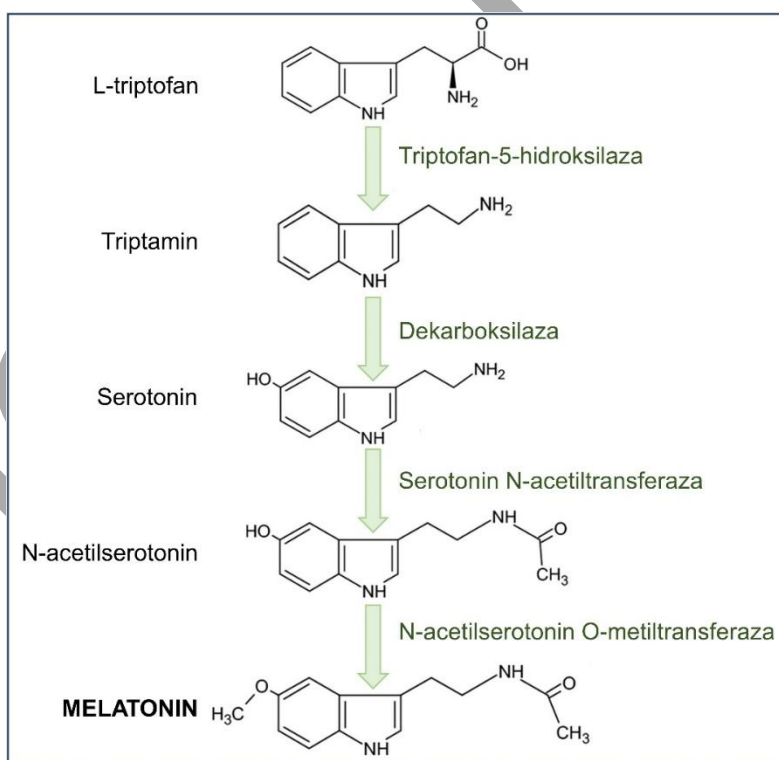
Studije na blizancima pokazale su da genetski čimbenici čine veliki udio varijance ITM te se nasljednost procjenjuje između 40 do 70 % [127,128], ali to uvelike varira među populacijama i okruženjima [129,130]. Također, genetska varijanca ITM je veća za žene nego za muškarce [129], te bi mogle postojati neke razlike između muškaraca i žena u genetskim čimbenicima koji utječu na varijacije u ITM-u. To potencijalno može biti značajno u kontekstu Hashimotove bolesti koja u najvećoj mjeri zahvaća žene.

1.3. Melatonin

Melatonin (N-acetil-5-metoksitriptamin) je hormon koji je prema biokemijskoj strukturi indolamin. Proizvodi ga primarno pinealna žlijezda (epifiza), a njegovu sintezu i izlučivanje regulira ciklus svjetlo-tama [131]. Ima značajnu ulogu u regulaciji cirkadijanih ritmova,

uključujući cikluse spavanja i budnosti. Melatonin također posjeduje antioksidativna svojstva i modulira imunološku funkciju [132]. Kolokvijalno se naziva „hormonom tame“ budući da se proizvodi kao odgovor na tamu koju percipira mrežnica oka [133]. Njegova se sinteza smanjuje izlaganjem svjetlu, pri čemu umjetno svjetlo smanjuje proizvodnju melatonina i povećava rizik od različitih bolesti [132–134].

Melatonin se biosintetizira iz triptofana te se preko 5-hidroksi-triptofana pretvara u serotonin [135] (**Slika 5**). Serotonin se zatim acetilira u N-acetil serotonin pomoću enzima arilalkilamin (serotonin) N-acetiltransferaze, koji se zatim pretvara u melatonin pomoću hidroksiindol-O-metiltransferaze ili N-acetil serotonin O-metiltransferaze [135,136].



Slika 2. Sinteza melatonina u epifizi. Enzimi koji sudjeluju u procesu sinteze melatonina napisani su zelenom bojom.

Biosinteza i izlučivanje melatonina u epifizi odvija se cirkadijanim ritmom, s niskim razinama proizvedenim danju i visokim razinama noću. Ovaj cirkadijani ritam proizvodnje i izlučivanja melatonina u epifizi reguliran je složenim neuralnim krugom koji počinje s vlaknima koja potječu iz mrežnice oka i projiciraju se do SCN-a hipotalamusa preko retinohipotalamičkog sustava [136,137]. Cirkulirajući melatonin gotovo isključivo potječe iz epifize [136]. Međutim,

procjenjuje se da enterokromafine stanice unutar crijeva sadrže više od 400 puta veće količine melatonina od one koju proizvode pinealociti [132]. Poluživot melatonina kreće se od 20 do 40 minuta [138]. Uz vrlo visoku interindividualnu varijabilnost [139], razlike dan-noć u ritmu melatonina znatno su smanjene u starijih osoba [140]. Kod ljudi se opažaju sezonske promjene u lučenju melatonina, kao raniji vrhunac lučenja melatonina ljeti u odnosu na zimu [141].

Ovaj pleiotropni hormon ima nekoliko funkcija [142], no regulacija cirkadijanog ritma, uključujući spavanje i budnost, smatra se najvažnijom [2,143]. On je antioksidans koji štiti od štetnih učinaka UV svjetla te je stanični zaštitnik od oksidativnog stresa, posebno povezanog s redoks statusom stanica i tkiva [132]. Također, uključen je u brojne aktivnosti koje uključuju homeostazu mitohondrija, genomsku regulaciju, modulaciju upalnih citokina, izravno utječući na sustavna i akutna protuupalna svojstva [132]. Melatonin sudjeluje u raznim funkcijama tijela, među kojima je njegova imunomodulacijska uloga posljednjih godina dobila visoki značaj [136]. Deprivacija melatonina i egzogena primjena melatonina mogu izazvati imunološku disregulaciju [144]. Melatonin ima protuupalna svojstva posredovana njegovom inhibicijom upalnih citokina, kao i utjecajima na različite dijelove imunološkog sustava [62,145,146]. Melatonin ne samo da stimulira proizvodnju prirodnih stanica ubojica, monocita i leukocita, već također mijenja ravnotežu T-pomoćnih (Th1 i Th2) limfocita uglavnom prema Th1 odgovorima i povećava proizvodnju važnih citokina kao što su IL-2, IL-6, IL-12 i INF γ [136]. Melatonin može modulirati apoptozu (programiranu staničnu smrt) u imunološkim stanicama, što može pomoći u održavanju imunološke tolerancije i sprječavanju prekomjernih imunoloških odgovora viđenih kod autoimunih bolesti [136]. Ima inhibitorni učinak na funkciju štitne žlijezde jer djeluje na hipotalamus tako da dolazi do smanjenja otpuštanja TRH [147]. Također, može vezati receptor vitamina D (VDR), pojačavajući signalne učinke vitamina D i naknadne stanične aktivnosti [132,148].

Zanimljivo je da djeca proizvode više melatonina nego odrasli, te proizvodnja melatonina postupno opada kako ljudi stare, počevši od kasnih dvadesetih do pedesetih godina [132]. Na proizvodnju melatonina mogu utjecati bolesti [149], prehrana [133], okolišni čimbenici poput jakog svjetla noću [150], upotreba lijekova [151] i stil života [132,152].

1.3.1. Receptori za melatonin

Melatonin ima važnu ulogu u ispravnom prijenosu signala kroz različite receptore, uključujući membranske i jezgrine receptore, među kojima su receptor melatonina, nuklearni retinoidni orphan receptori (ROR), receptor čimbenika tumorske nekroze (TNF), *Toll-like* receptori (TLR) i *Notch* receptor [2,153].

U ljudi postoje dva membranska receptora povezana s G-proteinom za melatonin – MTNR1A (MT1) i MTNR1B (MT2) [2]. Melatonin ispoljava većinu svojih fizioloških funkcija djelovanjem preko membranski vezanih receptora MTNR1A i MTNR1B [136,154]. Navedeni receptori za melatonin izraženi su u većini tkiva, uključujući i imunološki sustav. Receptor MTNR1B prisutan je u imunološkom sustavu [155], uključujući CD4⁺ i CD8⁺ limfocite (oligonukleotidni mikročipovi u dva uzorka CD4⁺ i dva uzorka CD8⁺ stanica, <http://biogps.org/#goto=genereport&id=4544>) [25]. Pored toga, melatonin mogu sintetizirati parafolikularne C-stanice štitne žlijezde štakora [156,157], što potencijalno ukazuje na značaj da polimorfizmi gena *MTNR1B* mogu utjecati na osjetljivost za razvoj AITD [6]. Iako, višestruke GWAS studije AITD-a [158–160] ne nalaze signal u *MTNR1B* lokusu i okolici, neke studije ipak ne isključuju moguću povezanost *MTNR1B* s autoimunim bolestima [3–6]. Osim toga, melatonin se može vezati na receptore MTNR1B imunocita te na taj način kontrolirati nizvodni unutarstanični signalni put i izravno modulirati imunološke reakcije [8–11]. Receptor MTNR1B pronađen je u imunološkom sustavu ljudi [161], te su receptori za melatonin (MTNR1A i MTNR1B) eksprimirani u ljudskim B- i T-limfocitima [9,155]. Pokazano je također da humani monociti izražavaju receptore melatonina ovisno o njihovom stupnju sazrijevanja [162]. Rezultate ovih istraživanja dijelom potvrđuju podaci u javnim repozitorijima. Ekspresija *MTNR1B* zabilježena je u leukocitima (pet pozitivnih uzoraka na oligonukleotidnim mikročipovima, bez validacije drugom ortogonalnom metodom) i monocitima (sedam pozitivnih i 20 negativnih uzoraka, sekvenciranje RNA, <https://www.bgee.org/gene/ENSG00000134640>) [28], no bez jasnog konsenzusa među različitim izvorima. Primjerice, slaba ekspresija zabilježena je u T-limfocitima, CD4⁺ i CD8⁺ klase (oligonukleotidni mikročipovi u dva uzorka CD4⁺ i dva uzorka CD8⁺ stanica, <http://biogps.org/#goto=genereport&id=4544>) [25], odnosno u 86 od 870220 ljudskih $\alpha\beta$ memorijskih CD4⁺ i u pet od 45628 ljudskih $\alpha\beta$ memorijskih CD8⁺ stanica pune krvi (sekvenciranje jednostanične RNA, <https://cellxgene.cziscience.com/gene-expression>, datum pristupa 3. 11. 2024.) [163]. Nasuprot tome, multimodalni *Immune Health Atlas (Human*

Immune System Explorer, alleninstitute.org) ne pruža uvjerljive dokaze o ekspresiji *MTNR1B* gena u različitim vrstama imunocita [164].

Na temelju navedenog, za ovo istraživanje odabrana su tri polimorfizma gena *MTNR1B*: rs10830963 (chr11:92975544 (GRCh38.p14), C>G), rs1387153 (chr11:92940662 (GRCh38.p14), C>T) i rs4753426 (1193 T>C, chr11:92968430 (GRCh38.p14), T>C). Odabir polimorfizama temeljio se na rezultatima prethodnih istraživanja i podacima iz GTEx baze podataka (**Tablica 2**).

Prvi odabrani polimorfizam rs10830963 analiziran je jer je bio povezan s kronotipom [165], a temeljem GWAS kataloga s ITM [166] i metaboličkim sindromom [167]. Navedeni polimorfizam nalazi se unutar jednog introna *MTNR1B* te nema vidljiv učinak na vezanje transkripcijskog čimbenika, ali je povezan s prekomjernom ekspresijom *MTNR1B* [168].

Drugi odabrani polimorfizam jest rs1387153 te je bio povezan s Flajani-Parry-Graves-von Basedowljevom bolesti u jednom istraživanju [6] i dijabetesom u drugom [169], a temeljem GWAS kataloga s metaboličkim sindromom [170]. To je nekodirajući polimorfizam koji je smješten 28 kb uzvodno od 5' regije gena *MTNR1B* na kromosomu 11q21-q22. Globalni podaci o ekspresiji dostupni iz ljudskih limfoblastoidnih staničnih linija nisu pokazali da polimorfizam rs1387153 izravno utječe na ekspresiju *MTNR1B* [171]. Međutim, temeljem podataka iz HaploReg v4.2 baze (<https://pubs.broadinstitute.org/mammals/haploreg/haploreg.php>) [172] vidljivo je da su polimorfizmi rs10830963 i rs1387153 u snažnoj neravnoteži alelna povezanosti ($D' = 0,84$).

Treći odabrani polimorfizam jest rs4753426 (-1193T > C) koji je bio povezan s kronotipom u dvije studije [173,174]. Navedeni polimorfizam nalazi se u promotorskoj regiji gena *MTNR1B*. Podaci iz GTEx baze podataka (<https://gtexportal.org/home/snp/rs4753426>) [175] sugeriraju transkripcijsku modulaciju ekspresije *MTNR1B*. Genotip -1193C/C imao je značajno niže razine ekspresije gena *MTNR1B* u usporedbi sa skupinom homozigotnog genotipa TT u tkivu štitne žlijezde.

Frekvencije rjeđih alela polimorfizama rs10830963, rs1387153 i rs4753426 temeljem referentne europske populacije iz baze 1000 Genomes su slijedeće: G = 0,2883; T = 0,2873 i T = 0,4980. Na temelju svega navedenog, izabrani polimorfizmi bi mogli biti povezani s cirkadijalnim fenotipovima kod osoba s Hashimotovom bolesti.

Tablica 2. Analizirani polimorfizmi gena *MTNR1B*

Polimorfizam	rs10830963	rs1387153	rs4753426 (-1193 T>C)
Položaj	chr11:92975544 (GRCh38.p14)	chr11:92940662 (GRCh38.p14)	chr11:92968430 (GRCh38.p14)
Aleli	C>G	C>T	T>C
Frekvencije	C = 0,712	C = 0,713	T = 0,498
alela	G = 0,288	T = 0,287	C = 0,502
Promjena na razini DNA	Intronska substitucija	Intragenska supstitucija, 28 kb uzvodno od 5' regije	Intragenska supstitucija, promorska regija gena <i>MTNR1B</i>
Učinak na razini proteina	Prekomjerna ekspresija <i>MTNR1B</i>	rs10830963 i rs1387153 u snažnoj neravnoteži alelna povezanosti ($D' = 0,84$)	1193C/C niže razine ekspresije <i>MTNR1B</i> u odnosu na T/T genotip u tkivu štitne žlijezde

Melatonin djeluje kao modulator imunosti posredovane stanicama i protutijelima preko receptora *MTNR1B* vezanih na membranu koje izražavaju imunološke stanice, a promjene signalnog puta melatonin-receptor *MTNR1B* mogu pridonijeti razvoju različitih kliničkih fenotipova autoimunih bolesti [6,176,177]. Receptori melatonina pomažu regulirati cirkadijani ritam imunoloških odgovora [178]. Cirkadijani sat preko SCN-a kontrolira osovinu HPT te utječe na dnevne profile lučenja TSH [179] te je TSH negativno reguliran melatoninom preko receptora *MTNR1B* [180]. Također, aktivnost imunoloških stanica mijenja se ovisno o dobu dana, a signalizacija melatonina kroz njegove receptore ključni je regulator ovog procesa [181]. Pravilna cirkadijana regulacija imunološkog sustava ključna je za održavanje imunološke homeostaze i sprječavanje nereguliranih imunoloških odgovora koji mogu dovesti do autoimunosti [133].

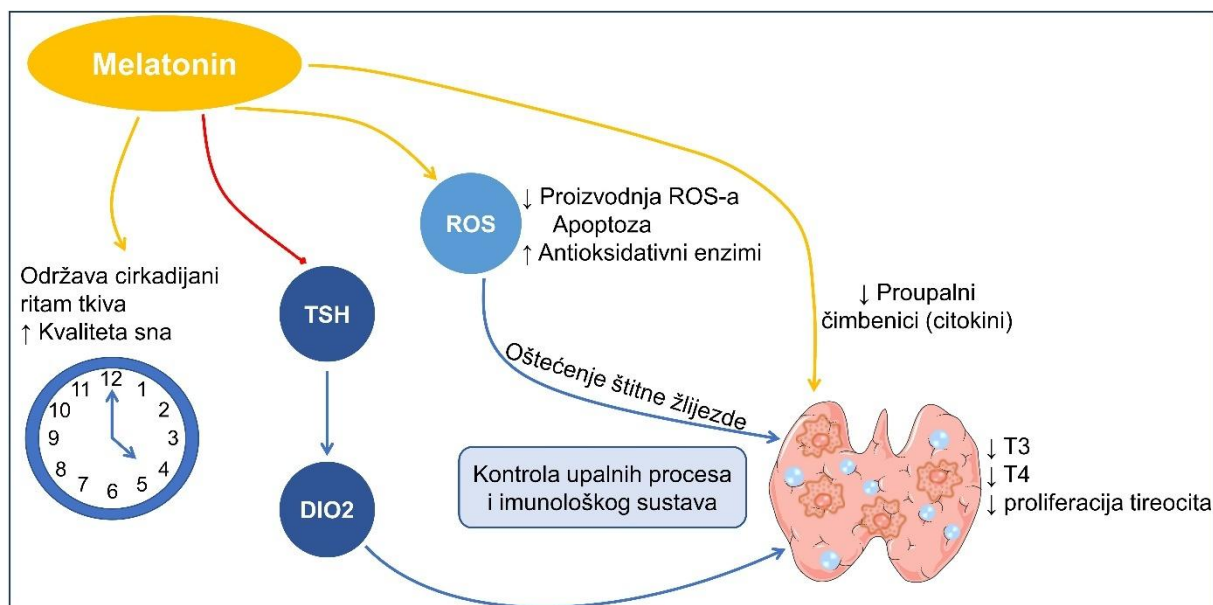
Antioksidativna svojstva melatonina, posredovana preko njegovih receptora, pomažu u zaštiti imunoloških stanica od oksidativnog stresa [182]. Aktivacija receptora melatonina može modulirati imunološki odgovor protiv antigena štitne žlijezde. Smanjenjem proizvodnje

proupalnih citokina i jačanjem antioksidativne obrane, melatonin može pomoći ublažiti kroničnu upalu koja se vidi kod Hashimotove bolesti [183].

Polimorfizmi gena za receptor melatonina (*MTNR1A* i *MTNR1B*) mogu utjecati na osjetljivost pojedinca na AITD. Polimorfizmi mogu dovesti do promjena u strukturi i funkciji receptora što može utjecati na afinitet vezanja melatonina i nizvodne signalne putove. Ove promjene mogu promijeniti imunološke modulacijske učinke melatonina, potencijalno utječući na rizik od razvoja AITD [6]. Istraživanje provedeno u kineskoj populaciji pokazalo je da su određeni polimorfizmi gena *MTNR1B* povezani s Flajani-Parry-Graves-von Basedowljevom bolesti, ali ne i Hashimotovom bolesti [6].

1.3.2. Melatonin i Hashimotova bolest

Cirkadijani ritam koncentracije melatonina u serumu procijenjen je u žena s poremećajima rada štitne žlijezde – s hipotireozom i hipertireozom, te u zdravih žena [147]. Zanimljivo je da se koncentracije melatonina u serumu nisu značajno razlikovale u tri proučavane skupine žena [147]. Međutim, koncentracije melatonina bile su u pozitivnoj korelaciji s TSH u žena s hipotireozom. U žena s hipertireozom uočena je negativna korelacija između serumskog melatonina i T3 [147]. Međutim, drugo istraživanje provedeno u Egiptu pokazalo je kako kod Hashimotove bolesti postoji statistički značajno smanjenje koncentracije melatonina u serumu u odnosu na zdrave žene [111]. Signalni put melatonin-receptor *MTNR1B* povezan je s imunološkom regulacijom, autoimunim bolestima i samom štitnom žlijezdom (**Slika 3**).



Slika 3. Utjecaj melatonina na rad štitne žlijezde. Melatonin potiskuje ekspresiju TSH, koji pak ne može potaknuti ekspresiju jodtironin dejodinaze 2 (DIO2). DIO2 potiče sintezu hormona štitne žlijezde T4 i T3 koja je melatoninom potisnuta. Melatonin također inhibira proliferaciju tireocita čime se sprječava nastanak guše, te smanjuje količinu slobodnih reaktivnih vrsta kisika (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*), što je povezano s nižim razinama oksidativnog stresa. Kao esencijalni hormon koji regulira cirkadijani ritam, melatonin doprinosi ponovnom uspostavljanju cirkadijanog ritma i pozitivno djeluje na štitnu žlijezdu.

U Hashimotovoj bolesti, kronična upala i oksidativni stres doprinose razaranju štitne žlijezde. Protuupalni i antioksidativni učinci melatonina mogu pomoći u ublažavanju ovih procesa. Terapija melatoninom u autoimunim bolestima proučavana je na životinjskim modelima i u kliničkim ispitivanjima na ljudima [93,184]. Zanimljivo je da kod ženki štakora primjena melatonina povećava razinu T4 [185], dok kod oboljelih s hipotireozom kombinacija primjene melatonina i LT4 smanjuje razinu TSH i povećava razinu fT4 [186]. Također, suplementacija melatoninom mogla bi smanjiti razinu protutijela na TPO koja su jedan od najvažnijih biljega autoimune aktivnosti kod Hashimotove bolesti [187]. Liječenje melatoninom moglo bi biti važna strategija za Hashimotovu bolest. Međutim, nedostaju uvjerljiva istraživanja na ovu temu, posebno u svjetlu kompleksne uloge melatonina kao endokrinog i imunološkog modulatora te kao aktivne molekule na staničnoj razini [93,132].

1.4. Kronotip

Kronotip se odnosi na prirodnu preferenciju pojedinca za cikluse spavanja i budnosti i obrasce aktivnosti tijekom razdoblja od 24 sata. Određuje je li osoba jutarnji tip (rani kronotip), večernji tip (kasni kronotip) ili negdje između oba navedena (srednji ili intermedijarni kronotip) [188]. Na kronotip utječu genetski i okolišni čimbenici, te stil života [189]. Kronotip se procjenjuje na temelju upitnika MEQ (engl. *Morningness-Eveningness Questionnaire*) ili MTCQ (engl. *Munich Chronotype Questionnaire*) kojima se određuje je li osoba više jutarnji ili večernji tip [190–193].

Kronotip je ponašanje osobe na temelju unutarnjeg, cirkadijanog, sata potaknuto signalima iz SCN-a o kojem ovisi hoće li osoba biti jutarnji ili večernji tip. Na kronotip pojedinca utječu spol, genetička podloga i okolišni čimbenici [190]. Također, s kronotipom su povezani mnogi poremećaji spavanja, metaboličke, neurološke, autoimune bolesti, tumori te preuranjeno starenje. Kronotip ne ovisi samo o genetičkim i okolišnim čimbenicima, nego i o dobi [194,195].

Žene dostižu svoj najkasniji kronotip oko devetnaeste godine života, dok su muškarci u prosjeku kasniji kronotipovi tijekom cijelog života. Ta spolna razlika nestaje tijekom 50-e godine života što se podudara s prosječnom dobi menopauze. Osobe starije od 60 godina obično postaju raniji kronotipovi nego što su bili kada su bili djeca. Smatra se da su u promjene kronotipa ovisne o dobi uključeni endokrinološki čimbenici [194,195]. Procjenjuje se da je kronotip nasljedan u 50 % slučajeva [190,196] što je pokazano na studijama monozigotnih i dizigotnih blizanaca [197]. Normalna raspodjela kronotipa prema Gaussovoj krivulji ukazuje da je kronotip poligeno i složeno svojstvo [196].

Ciklusi dan/noć i spavanje/budnost reguliraju sva ponašanja i funkcije kod sisavaca. Melatonin, služi kao signal, prenoseći informacije o trajanju dnevnog svjetla i tame tijekom godine do svake stanice, uključujući i one u SCN-u [131]. Ovo naglašava varijacije u dnevno-noćnim ciklusima s godišnjim dobima, naglašavajući ulogu melatonina u omogućavanju prilagodbe tim promjenama [198,199]. Cirkadijani poremećaj povezan je s bolestima povezanim s imunološkim sustavom, uključujući autoimune bolesti. Ritmičke promjene u ekspresiji gena cirkadijanog sata povezane su s regulacijom imunoloških funkcija, uključujući broj specifičnih imunoloških stanica (npr. monocita, neutrofila i limfocita) u cirkulaciji i razine citokina u

plazmi (npr. TNF- α i IL-6) [200]. Pokazano je da su loša kvaliteta sna i poremećaj cirkadijanog ritma povezani s povišenim razinama upalnih markera i većim rizikom od autoimunih bolesti [201]. Veća je vjerojatnost da će osobe s večernjim kronotipom imati lošiju kvalitetu sna i nedovoljno sna, što može pogoršati imunološku disregulaciju i povećati rizik od Hashimotove bolesti [202,203].

Kronotip je povezan s cirkadijanim ritmom melatonina [2,165]. Osim toga, večernji kronotip povezan je s većim morbiditetom, uključujući više stope metaboličkih poremećaja i autoimunih bolesti [204]. Pokazano je da su žene s hipotireozom češće imale rani ili jutarnji kronotip u odnosu na kontrolnu skupinu. Izloženost svjetlosti, ITM i nedostatak ritmičnosti hormona štitne žlijezde mogu utjecati na kronotipove žena koje imaju hipotireozu [203]. Večernji kronotip može biti povezan s višim razinama TSH i većim rizikom od hipotireoze [205].

Uočena je povezanost između kronotipa i polimorfizama gena *MTNR1B*. Alel G polimorfizma rs10830963 povezan je s promijenjenim lučenjem melatonina i cirkadijanim fenotipovima [206], a večernji kronotip povezan je s većim rizikom od dijabetesa kod osoba s GG genotipom polimorfizma rs10830963 gena *MTNR1B* [2,165]. Osim toga, razine melatonina fluktuiraju dnevno i može postojati veza između kronotipa i polimorfizama gena *MTNR1B* budući da je G alel rs10830963 povezan s povećanom ekspresijom mRNA *MTNR1B* [207]. Povećane razine mRNA *MTNR1B* rezultiraju višim razinama signalizacije melatonina [2,207].

Promjene signalnog puta melatonin-receptor *MTNR1B* mogu pridonijeti razvoju i/ili različitim kliničkim fenotipovima autoimunih bolesti [3–6,12]. TSH je negativno reguliran melatoninom preko receptora *MTNR1B* [208]. Obrazac lučenja melatonina u epifizi odražava duljinu noći i potiskuje ekspresiju TSH [1]. Kronotipovi su pod utjecajem različitih zdravstvenih stanja pa tako mogu biti i pod utjecajem Hashimotove bolesti [203]. Oboljeli od Hashimotove bolesti mogu imati povećan rizik od poremećaja cirkadijanih fenotipova (kronotipa i spavanja), ali postoji malo informacija o odnosu između kronotipa i Hashimotove bolesti.

Rezultati navedenih istraživanja u skladu su s opažanjima u drugim studijama u kojima se navodi kako su zdravija ponašanja češća među pacijentima koji imaju tendenciju prema jutarnjim satima ili jutarnjem kronotipu. Razumijevanje kronotipa pojedinca može pomoći u prilagođavanju intervencija i tretmana za optimiziranje ishoda za osobe s AITD. Kronotip

utječe na rizik i progresiju AITD kroz mehanizme koji uključuju poremećaj cirkadijanog ritma, lučenje melatonina i imunološku regulaciju.

1.5. Dnevna pospanost

Dnevna pospanost, karakterizirana stalnim osjećajem umora i povećanom sklonošću spavanja tijekom dana, čest je problem kod mnogih zdravstvenih stanja, uključujući AITD kao što je Hashimotova bolest. To je mjera poremećaja spavanja, odnosno mjera poremećaja samog cirkadijanog ritma. Dnevna pospanost ispituje se s pomoću Epworthove ljestvice pospanosti (ESS, engl. *Epworth Sleepiness Scale*) [209].

Spavanje je svuda prisutan biološki imperativ koji je evolucijski konzerviran među vrstama. Dovoljna količina kontinuiranog i dubokog spavanja bez cirkadijanog ometanja potrebna je za održavanje kognitivnih funkcija tijekom perioda budnosti te za sprječavanje fizioloških promjena koje mogu imati štetne posljedice za zdravlje. Smanjena dužina spavanja i cirkadijana desinkronizacija povezane su s dobivanjem na težini, pretilosti, dijabetesom, arterijskom hipertenzijom i povećanom smrtnošću [190].

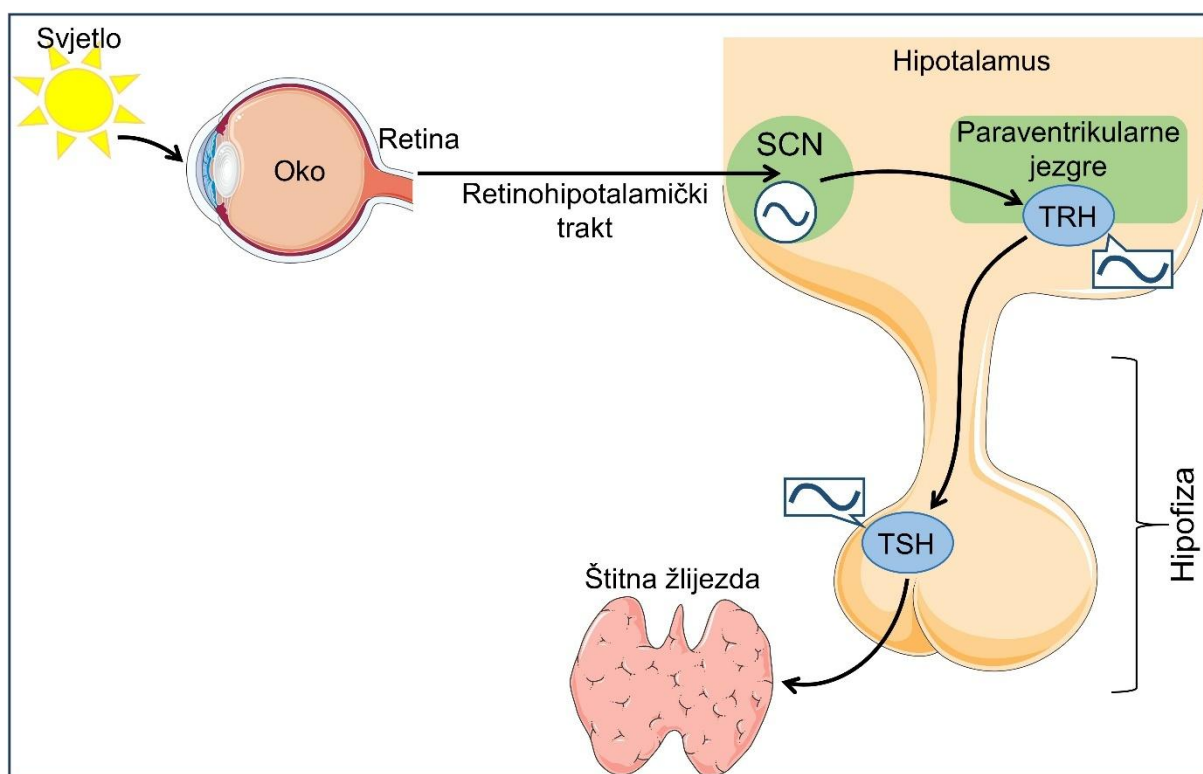
Poremećaj dnevnog ritma može biti posljedica vanjskih promjena, kao što je promjena vremenske zone ili smjenski rad, ili unutarnjeg poremećaja izmjene dana i noći samog tijela, kao što je sindrom odgođenog usnivanja. Desinkronizacija sna prouzročena vanjskim utjecajima mijenja dnevni ritam drugih bioloških funkcija u tijelu uključujući tjelesnu temperaturu i lučenje hormona. Osim nesanice i pospanosti to može prouzročiti mučninu, slabost, iritabilnost i depresiju. Učestale promjene cirkadijanog ritma, kao što su učestala duga putovanja, smjenski rad, posebno su teške za organizam. Simptomi se povlače nakon nekoliko dana kad se ritam nanovo uspostavi. Svjetlost najviše utječe na cirkadijani ritam, zato izloženost svjetlu, bilo prirodnom, odnosno sunčevom ili umjetnom svjetlu, nakon vremena kada se želi probuditi, ubrzava novo prilagođavanje organizma [197].

Poremećaji spavanja postali su ozbiljan javnozdravstveni problem te su česti u općoj populaciji [210,211]. Poremećaji spavanja imaju negativan učinak na kvalitetu života i zdravstveno stanje [211]. Poremećaji štitne žlijezde povezani su s problemima spavanja [212–214]. Nekoliko endokrinih funkcija mijenja se tijekom procesa od budnog stanja do spavanja. Jedna od

najuočljivijih endokrinih promjena je aktivnost osovine hipotalamus-hipofiza-štitna žlijezda [215]. Kada osoba ima poremećen san, porast razine TSH odgovara povećanju razine hormona štitne žlijezde [210]. Također, u sprezi s cirkadijanim sustavom, spavanje je snažan regulator mnogih imunoloških procesa [216]. Istraživanja redovitog ciklusa spavanja i budnosti pokazala su da imunološki parametri poput broja i funkcije leukocita i cirkulirajućih razina topivih imunomodulatornih čimbenika, uključujući kemokine i citokine, pokazuju snažne dnevne ritmove [200,217].

Dnevni profili lučenja TSH poremećeni su u nekih bolesnika s hipotireozom i hipertireozom te cirkadijani ritmovi moduliraju višestruke fiziološke i bihevioralne procese, uključujući cikluse spavanja i budnosti, oslobađanje hormona i metabolizam. Sve to odvija se putem SCN-a koji kontrolira osovinu hipotalamus-hipofiza-štitna žlijezda [218]. Stoga, izlučivanje TSH djelomično kontrolira središnji cirkadijani pacemaker u SCN [1,219]. U ljudi, cirkulirajuće razine TSH pokazuju jasan dnevni ritam. Nakon noćnog vrha u razinama TSH, koncentracije TSH u plazmi opadaju tijekom ostatka razdoblja spavanja, sve dok ne dosegnu niske dnevne razine (**Slika 4**). Otpuštanje TSH u krv inhibirano je tijekom spavanja [220,221], ali nastavlja se tijekom noćnog nedostatka sna. Stoga su jutarnje razine TSH u plazmi otprilike dvostruko više kod ljudi koji su imali neprospavanu noć nego kod ljudi koji su normalno spavali [220]. Uz dobro karakterizirani ritam razina TSH u plazmi, kod ljudi su također zabilježene dnevne varijacije u razinama hormona štitne žlijezde u plazmi [1].

Spavanje ima važnu ulogu u održavanju ljudskog zdravlja, utječući na različite vitalne fiziološke funkcije [222,223]. Regulacija sna je zamršena i podložna preciznoj fiziološkoj kontroli [224,225]. Poremećaj cirkadijane regulacije endokrinog sustava predstavlja važan mehanizam kojim se posreduju ti nepovoljni ishodi povezani s cirkadijanim poremećajima [220,226,227]. Kraće trajanje sna može poslužiti kao neovisni čimbenik rizika za subkliničku hipotireozu [52,224,228]. Suprotno tome, druga istraživanja sugeriraju da bi subklinička hipotireoza mogla biti temeljni uzrok smanjenog trajanja sna [210,224]. Subklinička hipotireoza, definirana kao povišenje razine TSH s normalnim razinama fT4 i/ili fT3, povezana je s lošijim spavanjem, dužom latencijom spavanja i kraćim trajanjem sna [210]. Spavanje ima utjecaj na izlučivanje hormona štitne žlijezde, što rezultira smanjenjem amplitude cirkadijanog ritma za TSH i naknadne razine hormona štitne žlijezde [224,229]. Populacijsko istraživanje provedeno u Kini pokazalo je da subklinička hipotireoza služi kao čimbenik rizika za lošu kvalitetu sna [210,224].



Slika 4. Osovina hipotalamus–hipofiza–štitna žlijezda i sinteza TSH ovisno o cirkadijanom ritmu. Os hipotalamus–hipofiza–štitna žlijezda je pod cirkadijanom regulacijom. Suprahijazmatska jezgra (SCN) prima svjetlosne informacije od mrežnice kroz retinohipotalamički trakt i šalje signal hipotalamičkoj paraventrikularnoj jezgri putem živčanih veza. Kod ljudi, lučenje tireotropin oslobađajućeg hormona (TRH) i TSH pokazuje cirkadijani ritam. Prilagođeno prema [1].

Pospanost tijekom dana učestali je simptom kod bolesnika s AITD, tako i kod Hashimotove bolesti zbog hipotireoze i s njom povezanih metaboličkih i sistemskih učinaka. Abnormalna funkcija štitne žlijezde može poremetiti arhitekturu spavanja. Osim što melatonin izravno djeluje na rad štitne žlijezde, utječe i na poremećaje spavanja. Učinkovito upravljanje zahtijeva sveobuhvatan pristup koji uključuje nadomjesnu terapiju hormonima štitne žlijezde, rješavanje poremećaja spavanja, upravljanje upalom, podržavanje mentalnog zdravlja i promicanje zdravog načina života. Rješavanjem ovih čimbenika, oboljeli mogu poboljšati kvalitetu sna i smanjiti dnevnu pospanost, poboljšavajući svoju ukupnu kvalitetu života.

Iako su provedena mnoga istraživanja i identificirani različiti genetski i okolišni čimbenici koji bi mogli potaknuti autoimuni odgovor, točni mehanizmi nastanka Hashimotove bolesti još uvijek nisu poznati. Signalni put melatonin-MTNR1B mogao bi imati određenu ulogu u Hashimotovoj bolesti. Postoje li biološke interakcije između gena osjetljivosti ili njihovih proizvoda za induciranje fenotipa osjetljivosti? Kako bismo bolje razumjeli te učinke, moramo identificirati sve uključene gene i njihove molekularne mehanizme koji induciraju osjetljivost na autoimune bolesti. U ovom istraživanju ispitana je moguća povezanost polimorfizama gena *MTNR1B* s elementima cirkadijanog ritma, kronotipom i dnevnom pospanošću, u bolesnika s Hashimotovom bolesti.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je ispitati povezanost polimorfizama gena za receptor melatonina (*MTNR1B*) s cirkadijanim fenotipovima (dnevna pospanost i kronotip) i drugim parametrima Hashimotove bolesti kao što su negativna/pozitivna anti-Tg te ITM.

Specifični ciljevi su:

1. odrediti učestalost polimorfizama gena *MTNR1B* u osoba s Hashimotovom bolesti;
2. ispitati povezanost izabranih polimorfizama gena *MTNR1B* s elementima cirkadijanog ritma (kronotipom i dnevnim pospanošću) kod osoba s Hashimotovom bolesti;
3. ispitati povezanost izabranih polimorfizama gena *MTNR1B* s prisustvom/odsustvom anti-Tg u serumu;
4. ispitati povezanost izabranih polimorfizama gena *MTNR1B* s ITM-om;
5. ispitati povezanost polimorfizama gena *MTNR1B* s primjenom nadomjesne hormonske terapije s LT4.

2.1. Hipoteza

Osnovna pretpostavka ovog istraživanja jest da su elementi cirkadijanoga ritma (kronotip i dnevna pospanost) povezani s polimorfizmima gena za receptor melatonina (*MTNR1B*) u osoba s Hashimotovom bolesti.

3. ISPITANICI I METODE

3.1. Ispitanici

Istraživanje je provedeno kao presječno istraživanje skupine bolesnika s dijagnozom Hashimotove bolesti u Poliklinici Leptir Zagreb i na Fakultetu za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo poliklinike Leptir Zagreb (br. 25-10-6-12/23) i Etičko povjerenstvo Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (br. 2158/97-97-10-24-03). Provedeno je u skladu s osnovama dobre kliničke prakse, Helsinškom deklaracijom i svim njenim nadopunama, Zakonom o zdravstvenoj zaštiti Republike Hrvatske (NN 121/03) i Zakonom o pravima pacijenata Republike Hrvatske (NN 169/04).

U istraživanje je uključeno 115 osoba ambulantno liječenih u poliklinici Leptir Zagreb kojima je postavljena dijagnoza Hashimotove bolesti i posljedične primarne kliničke hipotireoze.

Kriteriji za uključivanje ispitanika u istraživanje su:

- osobe starije od 18 godina,
- hipotireoidne osobe dijagnosticirane nakon iscrpljenja funkcijske pričuve štitne žlijezde,
- klinički, ultrazvučno i laboratorijski potvrđena Hashimotova bolest (pozitivni anti-TPO i pozitivni anti-Tg, ili pozitivni anti-TPO ili pozitivni anti-Tg),
- osobe koje su bile na kontroli u Poliklinici Leptir tijekom studenog, prosinca, siječnja ili veljače (zimski period 2023/2024 godine),
- osobe čije su razine anti-TPO, anti-Tg, fT3, fT4 i TSH određene u istoj ustanovi istom laboratorijskom metodom kako bi se osigurala usporedivost podataka.

Kriteriji za isključivanje ispitanika iz istraživanja:

- osobe mlađe od 18 godina,
- eutireoidne osobe,
- trudnice,
- osobe sa šećernom bolesti tip 2,

3. ISPITANICI I METODE

- osobe sa zloćudnim bolestima,
- osobe s drugim autoimunim bolestima,
- osobe s akutnim ili kroničnim infektivnim upalnim zbivanjima,
- osobe s oralnom suplementacijom joda, selen, mio-inozitola, cinka, magnezija, željeza, vitaminskog B-kompleksa i vitamina D,
- osobe koje se liječe hipolipemicima,
- vegetarijanci i vegani,
- osobe koje konzumiraju kurkumu,
- osobe koje imaju kronične bolesti poput opstruktivne bolesti spavanja (OSA) ili druge kronične i neurološke bolesti koje dovode do poremećaja spavanja.

Prije početka istraživanja, od svih ispitanika zatražen je pristanak obaviještene osobe za sudjelovanje u istraživanju. Istraživanje je obuhvatilo:

- anamnestičke i kliničke podatke ispitanika,
- upitnik za određivanje kronotipa,
- upitnik dnevne pospanosti,
- uzimanje uzorka krvi iz periferne vene za biokemijske pretrage,
- uzimanje uzorka krvi iz periferne vene za genotipizaciju i određivanje polimorfizama gena *MTNR1B*.

3.2. Metode

Anamnestički podaci ispitanika obuhvatili su podatke vezane uz životnu dob i spol, tjelesnu visinu i masu, dok su klinički podaci obuhvatili primjenu nadomjesne hormonske terapije s LT4 i biokemijske parametre: ukupni kolesterol, trigliceridi, HDL (lipoprotein velike gustoće), LDL (lipoprotein male gustoće), željezo, vitamin D, anti-TPO, anti-Tg, fT3, fT4 i TSH.

3.2.1. Biokemijske metode

TSH, cirkulirajući hormoni štitne žlijezde fT3, fT4, anti-Tg i anti-TPO te vitamin D određeni su kemiluminiscentnom imunokemijskom metodom pomoću magnetskih mikročestica (engl. *Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay*, CMIA) uz korištenje Abbott (Chicago, IL, USA) setova kemikalija na potpuno automatiziranom instrumentu Alinity i (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA). U **Tablici 3** navedene su referente vrijednosti i kataloški brojevi za korištene Abbottove setove kemikalija.

Tablica 3. Referente vrijednosti Abbott setova kemikalija za CMIA metodu

Analit	Biokemijska metoda	Komercijalni naziv testa	Referentna vrijednost
Anti-Tg	CMIA	Anti-Tg Reagent Kat.br. 09P34	< 115 kIU/mL
Anti-TPO	CMIA	Anti-TPO Reagent Kit Kat. br. 09P35	< 34 kIU /mL
fT3	CMIA	Free T3 Reagent Kit Kat. br. 07P69	3,95 do 6,8 pmol/L
fT4	CMIA	Free T4 Reagent Kit Kat. br. 07P70	12 do 22 pmol/L
TSH	CMIA	TSH Reagent Kit Kat. br. 07P48	0,27 do 4,2 mU/L
Vitamin D	CMIA	25-OH Vitamin D Reagent Kit Kat. br. 08P4522	50 do 200 nmol/L

CMIA - kemiluminiscentna imunokemijska metoda pomoću magnetskih mikročestica (engl. *Chemiluminescent Microparticle Immuno Assay*)

Kemiluminiscentna imunokemijska metoda pomoću magnetskih mikročestica (CMIA) proizvođača Abbott temelji se na paramagnetskoj kemiluminescentnoj tehnologiji mikročestica koja radi na principu sličnom ELISA testu (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), a radi

3. ISPITANICI I METODE

se u dva koraka. Luminiscencija je emisija vidljivog ili gotovo vidljivog (300–800 nm) zračenja koje nastaje kada elektron prijeđe iz pobuđenog stanja u osnovno stanje. Potencijalna energija koja nastaje u atomu oslobađa se u obliku svjetlosti [230]. Čvrsta faza sastoji od magnetskih kuglica, koriste se nanočestice zlata s dvostrukim označavanjem. Jedna oznaka je monoklonsko protutijelo specifično za analit, a druga oznaka je peroksidaza hrena, čime se eksponencijalno pojačava luminiscentni signal izveden iz imunoreakcije i povezane enzimске reakcije [230]. Prvo, kemiluminiscentne tvari ili enzimi koriste se za označavanje antigena ili protutijela čijom reakcijom nastaje imunološki kompleks. Antigeni obilježeni biotinom miješaju se sa specifičnim protutijelima na imunoglobine (IgG, uključujući IgA i IgM) i magnetskim česticama obloženim streptavidinom u uzorku koji se testira. Nakon ispiranja dodaje se enzimom obilježeni anti-humani IgG. Kompleksna faza tvori krutu fazu enzimom obilježenog sekundarnog kompleksa protutijela, koji se uklanja ispiranjem nevezanih enzimom obilježenih protutijela i drugih tvari [231]. Nakon toga, kemiluminiscencijski sustav se aktivira kada se doda luminiscentni supstrat i oksidans. Enzim na protutijelima označenim enzimom katalizira luminiscentni supstrat koji emitira fotone. Ti se fotoni mjere instrumentom, a broj fotona proporcionalan je količini specifičnog protutijela u uzorku [231,232]. Analizator automatski izračunava koncentraciju autoprotutijela u svakom uzorku seruma pomoću radne krivulje dobivene kalibracijom u dvije točke glavne krivulje. Ukupna specifičnost i osjetljivost ove metode je 99,6 %, odnosno 99,7 % [231]. Cijeli postupak se provodi automatski te je u skladu s uputama za dijagnostičke setove kemikalija. Za mnoge kemiluminiscentne sustave postoji niska pozadinska razina emisije u odsutnosti analita. Stoga kemiluminiscentni signali rastu proporcionalno koncentraciji analita [230]. Prednost CMIA metode je veća analitička osjetljivost i sposobnost točne detekcije povišenih koncentracija protutijela bez potrebe za razrjeđivanjem uzorka. CMIA metoda omogućuje analitičke postupke s nižim granicama detekcije analita od ostalih metoda imunotestiranja, te može odrediti prisutnost protutijela u jako niskim koncentracijama (granica detekcije = zeptomol 10^{-21} mol) [230].

Razina željeza određena je fotometrijskom metodom s ferenom, HDL fotometrijskom metodom s kolesterol esterazom, LDL fotometrijskom metodom s kolesterol esterazom i kolesterol oksidazom, te triglicerida fotometrijskom metodom s lipazom i glicerol-fosfat oksidazom (Abbott kemikalije) na automatiziranom uređaju Alinity c (Abbott Laboratories, Chicago, IL, USA). Razina kolesterola određena je enzimatskom metodom s kolesterol esterazom setom kemikalija proizvođača Abbott na automatiziranom uređaju Alinity c (Abbott Laboratories,

3. ISPITANICI I METODE

Chicago, IL, USA). Referente vrijednosti za lipidogram i željezo zajedno s kataloškim brojevima navedene su u **Tablici 4.**

Tablica 4. Referente vrijednosti Abbott setova kemikalija za lipidogram i željezo

Analit	Biokemijska metoda	Komercijalni naziv testa	Referentna vrijednost
Željezo	Fotometrija s ferenom	Iron Reagent Kit Kat. br. 08P3920	8 do 30 $\mu\text{mol/L}$
Kolesterol	Enzimatska s kolesterol esterazom	Cholesterol Reagent Kit Kat. br. 07P7620	<5 mmol/L
HDL	Fotometrijska s kolesterol esterazom	Ultra HDL Reagent Kit Kat. br. 07P7520	>1,2 mmol/L
LDL	Fotometrijska s kolesterol esterazom i kolesterol oksidazom	Direct LDL Reagent Kit Kat. br. 07P7120	<3 mmol/L
Trigliceridi	Fotometrija s lipazom i glicerol-fosfat oksidazom	Triglyceride Reagent Kit Kat. br. 07P7720	1,7 mmol/L

3.2.2. Kronotip

Kronotip je određen na temelju validiranog i na hrvatski jezik prevedenog kratkog *Morningness-Eveningness Questionnaire* (rMEQ) upitnika za procjenu kronotipa [191,233,234]. Upitnik se sastoji od pet pitanja s četiri ponuđena odgovora s točnim vremenskim razmacima. Svaki odgovor na pojedino pitanje boduje se s određenim brojem bodova te se kronotip određuje kao zbroj svih bodova iz pet pitanja i osobe se svrstavaju u jedan od tri tipa kronotipa na temelju kratke MEQ bodovne ljestvice prema **Tablici 5.** U slučaju MEQ upitnika, što je ukupan broj bodova veći znači da je osoba više jutarnji tip.

Tablica 5. Kategorije kronotipa na temelju rMEQ bodova

Kronotip	Broj bodova
Većernji tip	0 – 11
Intermedijarni tip	12 – 17
Jutarnji tip	18 – 20

3.2.3. Dnevna pospanost

Dnevna pospanost određena je Epworthovom ljestvicom pospanosti (ESS, engl. *Epworth sleepiness scale*) [209,235]. Odobrenje za korištenje ESS upitnika dobiveno je od Mapi Research Trust, Lyon, France [209,236]. To je upitnik s osam pitanja za samoprocjenu dnevne pospanosti osobe – što je veći broj bodova na toj ljestvici to je veća dnevna pospanost. Epworthova skala pospanosti validirana je i prevedena na hrvatski jezik i kao takva dostupna je na stranicama Mapi Research Trusta te je korištena u prijašnjim istraživanjima [189].

Ispitanici su pitani koliko je vjerojatno da će zadrijemati ili zaspati u sljedećim situacijama: sjedenje i čitanje, gledanje televizije, inaktivno sjedenje na javnom mjestu (kazalište, sastanak), kao putnik u automobilu tijekom jednog sata bez pauze, ležanje tijekom popodneva kada okolnosti to dozvole, sjedenje i pričanje s nekim, tiho sjedenje poslije ručka bez konzumacije alkoholnih pića te u automobilu nakon zaustavljanja na nekoliko minuta u prometnoj gužvi. Za svaki od navedenih osam okolnosti odgovori su bodovani vrijednostima od nula do tri: 0 – nikad ne bih zadrijemao(la), 1 – postoji mala mogućnost da bih zadrijemao(la), 2 – postoji umjerena mogućnost da bih zadrijemao(la), te 3 – postoji velika mogućnost da bih zadrijemao(la). Ukupan broj ESS bodova dobiven je zbrojem svih osam odgovora (0 – 24) te su ispitanici svrstani u četiri kategorije dnevne pospanosti prema **Tablici 6**.

Tablica 6. Kategorije dnevne pospanosti na temelju ESS bodova

Dnevna pospanost	Broj bodova
Normalna	0 – 10
Blaga pospanost	11 – 14
Umjerena pospanost	15 – 17
Velika pospanost	18 – 24

3.2.4. Analiza polimorfizama gena *MTNR1B*

Odabir polimorfizama temeljio se na poznatoj uključenosti gena u molekularni mehanizam regulacije cirkadijanog ritma (kronotip i dnevna pospanost) te na povezanosti polimorfizama s rizičnim čimbenicima za AITD (**Tablica 7**).

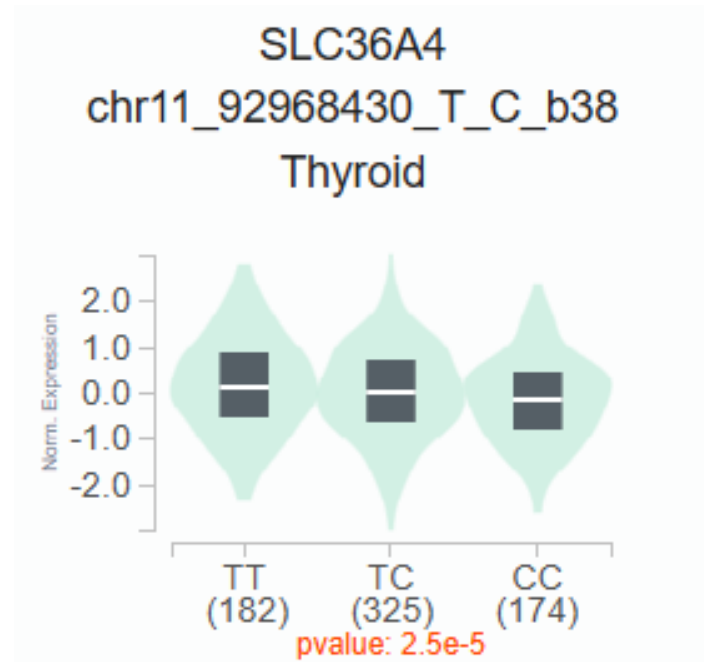
Tablica 7. Popis određivanih polimorfizama gena receptora za melatonin 1B (*MTNR1B*)

Polimorfizam	Povezani fenotip	Literatura
rs10830963 (C>G)	Kronotip	Tan i sur. 2020 [165]
	Indeks tjelesne mase (GWAS)	Manning i sur. 2012 [166]
	Metabolički sindrom (GWAS)	Park i sur. 2024 [167]
	Gravesova bolest	Lin i sur. 2017 [6]
rs1387153 (C>T)	Debljina	Zhen i sur. 2015 [237]
	Gravesova bolest	Lin i sur. 2017 [6]
	Poremećaj spavanja	Potter i sur. 2016 [238]
	Debljina	Been i sur. 2012 [239]
rs4753426 (C>T)	Metabolički sindrom (GWAS)	Kraja i sur. 2011 [170]
	Kronotip	Silva i sur. 2019 [173]
	Kronotip	Santos i sur. 2020 [174]
	Sekrecija inzulina	Nikolaev i sur. 2021 [152]

Dodatno, polimorfizam rs4753426 preklapa se s genom *SLC36A4* (engl. *Solute carrier family 36 member 4*) te je njegova ekspresija u štitnoj žlijezdi prikazana na **Slici 5**. Genotip -1193C/C

3. ISPITANICI I METODE

imao je značajno nižu razinu ekspresije *MTNR1B* u odnosu na homozigotni genotip TT u tkivu štitne žlijezde [175].



Slika 5. Violinski dijagram s podacima o ekspresiji rs4753426 polimorfizma u štitnoj žlijezdi.

Izvor GTEx AnalysisRelease V10 (dbGaP Accession phs000424.v10.p2),

<https://gtexportal.org/home/snp/rs4753426>, datum pristupa 11. 11. 2024.; [175].

3.2.4.1. Izolacija DNA iz leukocita pune periferne krvi

Venska krv ispitanika uzeta je nakon venepunkcije u epruvete s podtlakom (*Vacutainer*, *Becton Dickinson*) kojima je dodan antikoagulans EDTA (etilendiamintetraoctena kiselina). Izdvajanje leukocitne genomske DNA iz 600 μ L pune krvi napravljeno je prema standardnom protokolu proizvođača na kolonama sa silika-membranom [240]. Korišten je *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany) komplet kemikalija koji sadržava različite kemikalije i kolone za izdvajanje i pročišćavanje DNA. Pritom su napravljene manje izmjene originalnih uputa za izolaciju preporučenih od strane proizvođača.

Izdvajanje DNA započeto je inkubiranjem 600 μ L pune krvi u 600 μ L odgovarajućeg pufera za liziranje uz prisutnost 60 μ L proteinaze K koja se nalazi u sastavu kompleta reagensa. Proteinaza K je enzim koji neselektivno razgrađuje proteine. Nakon inkubiranja smjese od 10

3. ISPITANICI I METODE

minuta pri 56°C i dodavanja 600 µL 100 %-tnog etanola s pomoću kojega dolazi do precipitacije DNA, smjesa je prebačena na tzv. silika-membranu unutar kolone. Smjesa je centrifugirana na 6000 g jednu minutu. DNA se veže na membranu, a ostatak smjese prolazi kroz pore membrane. Ovako izolirana DNA dodatno je pročišćena dodavanjem različitih pufera. Prvo je dodano 500 µL AW1 pufera te je smjesa centrifugirana na 6000 g jednu minutu. Zatim je *QIAamp Mini spin* kolona prebačena u novu epruvetu te je dodano 500 µL pufera AW2 i ponovno centrifugirano na 20 000 g tijekom tri minute. Tijekom postupka mijenja se ionska jakost. U uvjetima visoke ionske jakosti, DNA se veže za kolonu i nečistoće se ispiru. U posljednjem koraku korišten je pufer niske ionske jakosti koji potiče otpuštanje DNA s kolone (cijepa veze između DNA i membrane). *QIAamp Mini spin* kolona prebačena je u novu epruvetu i dodano je 200 µL AE pufera te inkubirano na sobnoj temperaturi jednu minutu, a zatim centrifugirano na 6000 g jednu minutu. Izolirana DNA čuvana je u AE puferu pohranjena na -20°C.

Nakon izolacije određena je koncentracija DNA uzoraka spektrofotometrijskom metodom na uređaju NanoPhotometer N60-Touch (Implen GmbH, München, Njemačka). DNA u otopini apsorbira svjetlost u ultraljubičastom području od 260 nm. Za određivanje koncentracije DNA u otopini korištena je apsorbancija na valnoj duljini 260 nm, dok je omjer apsorbancije A₂₆₀/A₂₈₀ poslužio za procjenu čistoće DNA. Prosječna koncentracija DNA uzoraka iznosila je 54,79 ± 9,80 ng/µl, a čistoća 1,82 ± 0,01.

3.2.4.2. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Polimorfizmi gena *MTNR1B* određeni su primjenom komercijalno dostupnih TaqMan kompleta reagensa tvrtke Applied Biosystems [241] na instrumentu za lančanu reakciju polimerazom (engl. *Polymerase chain reaction*, PCR) u stvarnom vremenu Applied Biosystems QuantStudio 5 uređaju (Thermo Fisher Scientific, Foster City, California, USA). PCR u stvarnom vremenu (engl. *Real-time PCR*) je varijanta PCR-a koja omogućava praćenje nastajanja produkta tijekom same PCR reakcije na monitoru uređaja. Dok se produkt stvara, intenzitet fluorescencije se bilježi, obrađuje, analizira i pohranjuje unutar uređaja, a nakon završetka reakcije rezultati su spremni za daljnju obradu. Prednosti metode PCR-a u stvarnom vremenu u odnosu na konvencionalni PCR uključuju pouzdano otkrivanje promjena u samo jednom nukleotidu te

3. ISPITANICI I METODE

uklanjanje potrebe za dodatnom analizom PCR produkata čime se značajno smanjuje mogućnost kontaminacije i ubrzava proces analize.

PCR reakcije napravljene su u 96-pločama s dvije negativne kontrole (engl. *No template control*, NTC) u kojima je umjesto DNA uzorka dodana jednaka količina PCR čiste vode. Korištene su TaqMan probe (TaqMan Assay) za tri polimorfizma gena *MTNR1B* (**Tablica 8**) uz TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems).

Tablica 8. Korištene TaqMan probe i fluorescentno označeni aleli

SNP	TaqMan Assay	Aleli	
		VIC	FAM
rs10830963	C__3256858_10	C	G
rs1387153	C__1932612_10	C	T
rs4753426	C__289583_10	C	T

Prije slaganja PCR reakcije, uzorci DNA su razrijeđeni u PCR čistoj vodi (bez nukleaza) kako bi se dobilo 1-20 ng DNA po jažici, odnosno konačna koncentracija DNA u PCR reakciji nije manja od 0,2 ng/μl.

Ukupni volumen PCR reakcije bio je 12,5 μl:

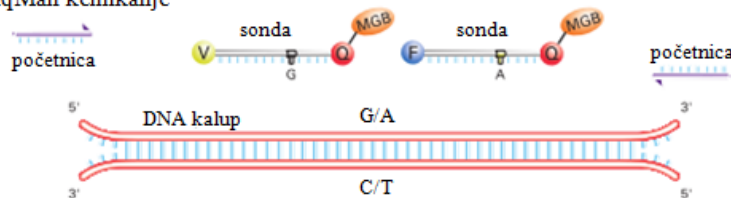
- 6,25 μl 2x TaqMan Genotyping master mix
- 0,31 μl 20x TaqMan proba pojedinog polimorfizma (TaqMan Assay)
- 2 μl genomske DNA
- 3,94 μl voda za PCR (bez nukleaza).

TaqMan metodologija zasniva se na 5'-3' egzonukleaznoj aktivnosti AmpliTaq Gold DNA polimeraze. TaqMan sonda sadrži dva fluorofora (reporter, R i prigušivač, Q) smještena na suprotnim krajevima sonde. Dok su oba fluorofora vezana za sondu, ne dolazi do emitiranja fluorescencije. Nefluorescentni prigušivač na 3' kraju emitira svjetlost duže valne duljine, čime prikriva signal reporterske boje kraće valne duljine na 5' kraju. Ovaj učinak postiže se prijenosom fluorescentne rezonantne energije (engl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, FRET), gdje jedna boja inhibira drugu bez emisije protona. Egzonukleazna aktivnost DNA polimeraze razgrađuje hibridiziranu TaqMan sondu samo kada je sonda vezana za ciljni odsječak između uzvodne i nizvodne početnice, odnosno kad se taj odsječak umnožava. To

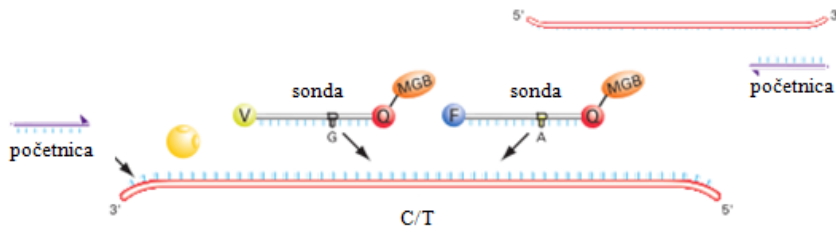
3. ISPITANICI I METODE

dovodi do odvajanja reporterske boje od prigušivača, što rezultira emisijom fluorescencije određene valne duljine. Fragmenti sonde uklanjaju se s ciljnog odsječka DNA, omogućujući nastavak polimerizacije. Sonda je blokirana na 3' kraju kako bi se spriječilo njeno produljenje tijekom PCR-a. Povećanje fluorescentnog signala događa se samo kada je ciljna sekvenca komplementarna sondi i amplificirana tijekom PCR reakcije (Slika 6), čime se sprječava detekcija nespecifičnih umnožavanja [242,243]. Svaka TaqMan MGB (engl. *Minor Groove Binder*) sonda sastoji se od reporterske boje koja je vezana na 5' kraj, odnosno VIC ili FAM (engl. *Carboxyfluorescein*) boje vezane na 5' kraj sonde za alel 1 i alel 2. MGB komponenta povećava temperaturu taljenja sonde, a na 3' kraju nalazi se nefluorescentni prigušivač (engl. *Nonfluorescent quencher*, NQF).

1. TaqMan kemikalije



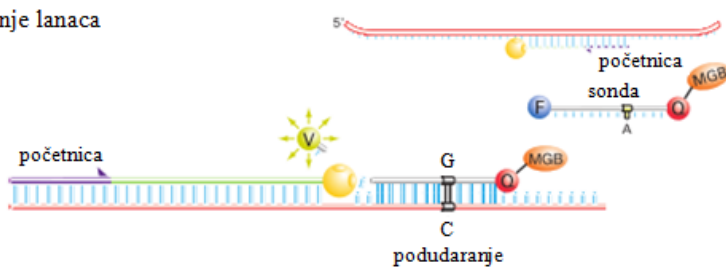
2. Denaturacija i vezanje početnica



Objašnjenja:

- V VIC boja
- F FAM boja
- Q Prigušivač
- MGB Vezanje za manji utor
- Taq DNA polimeraza
- Sonda
- Početnica
- Kalup
- Produžena početnica

3. Produljivanje lanaca

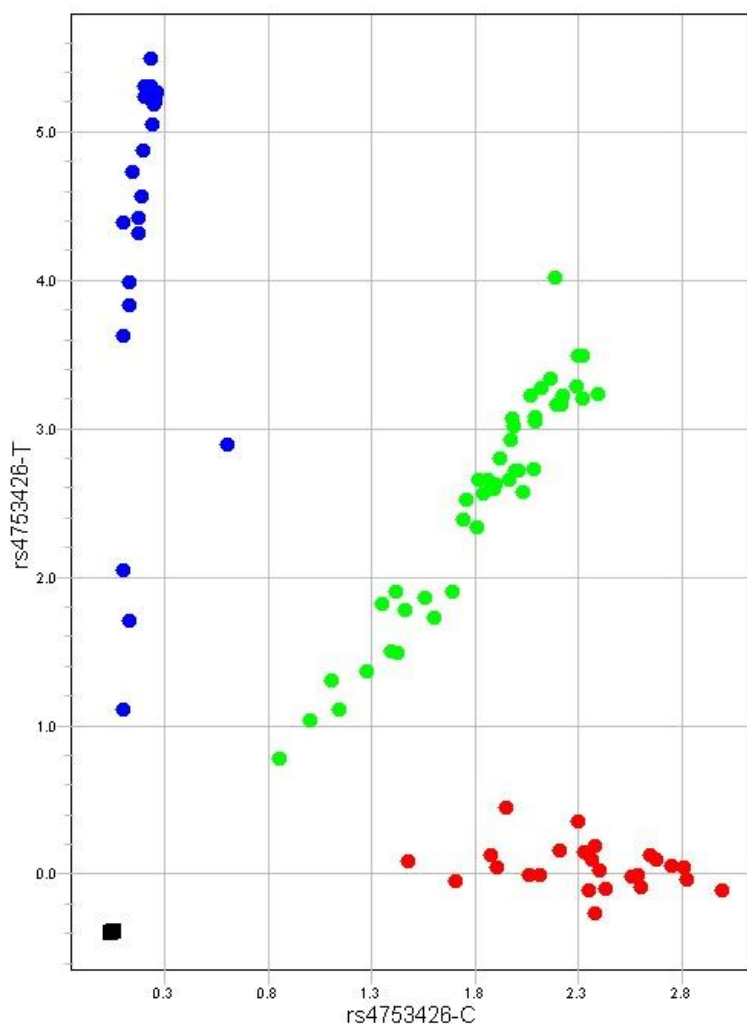


Slika 6. Shematski prikaz TaqMan metodologije. Prilagođeno prema TaqMan SNP Genotyping protokolu [242].

PCR reakcija odvijala se u tri koraka. Prvi korak je denaturacija DNA na 95°C u trajanju od 10 minuta, te zatim 40 ciklusa u kojima su se izmjenjivala denaturacija i vezanje početnica i TaqMan sonda na 92°C tijekom 15 sekundi te produljivanje lanaca DNA na 60°C jednu minutu.

3. ISPITANICI I METODE

Očitavanje i analiza genotipova napravljena je programom QuantStudio™ Design & Analysis v1.5.2. Program istovremeno određuje genotipove svih DNA uzoraka, tako što prvo normalizira fluorescenciju reporterske boje u odnosu na fluorescenciju pasivne referentne boje u svakoj jažici. Nakon toga, program izračunava normalizirane intenzitete reporterske boje za svaki uzorak i prikazuje ih na grafu u odnosu na intenzitete boje specifične za alele sonde. Na temelju položaja uzoraka na grafu, program algoritamski dodjeljuje genotipove (**Slika 7**).



Slika 7. Graf distribucije genotipova. Prikazani su rezultati polimorfizma rs4753426 gena *MTNR1B*.

Legenda: ■ negativna kontrola; ● homozigot T/T; ● homozigot C/C; ● heterozigot C/T

Grupiranje podataka mijenja se duž horizontalne osi (alel C), vertikalne osi (alel T) ili dijagonalno (aleli C/T). Odstupanja u rezultatima nastaju zbog razlike intenziteta fluorescencije reporterske boje nakon umnožavanja PCR-om.

3.3. Plan istraživanja

Svi ispitanici potpisali su informirani pristanak te ispunili upitnike, a uzorci krvi za biokemijske pretrage i izolaciju DNA uzeti su od strane kvalificiranog medicinskog osoblja te proslijeđeni u laboratorije radi određivanja biokemijskih parametra i izolacije DNA te analize polimorfizama gena *MTNR1B*.

Analiza povezanosti polimorfizama gena *MTNR1B* napravljena je podjelom ispitanika u različite skupine na temelju specifično postavljenih ciljeva istraživanja.

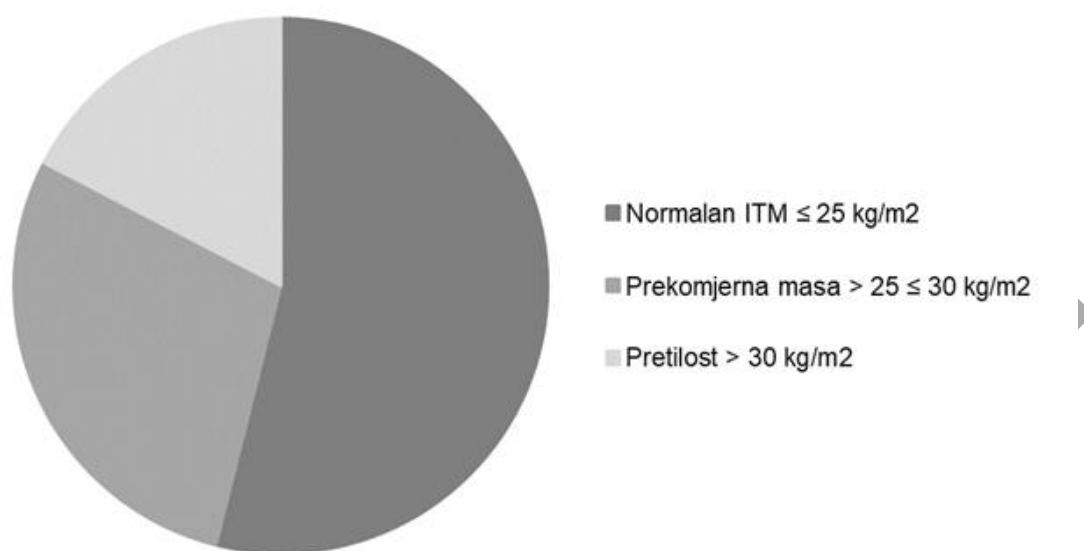
Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine na temelju kronotipa. Kako je najzastupljeniji intermedijarni kronotip, dok je jutarnji najrjeđi, ispitanici su podijeljeni u dvije skupine na temelju samoprocjene kronotipa. Stoga su ispitanici intermedijarnog i jutarnjeg kronotipa grupirani zajedno te su uspoređene razlike između ispitanika intermedijarnog i jutarnjeg kronotipa nasuprot ispitanika s večernjim kronotipom.

Slična podjela napravljena je za dnevnu pospanost jer je broj ispitanika s umjerenom i velikom dnevnom pospanosti mali. Na temelju samoprocjene dnevne pospanosti analizirane su razlike između ispitanika s normalnom dnevnom pospanošću nasuprot onih s povećanom dnevnom pospanošću koja obuhvaća kategorije blage, umjerene i velike dnevne pospanosti na temelju Epworthove skale pospanosti.

Za Hashimotovu bolest karakteristično je da 60 do 80 % bolesnika ima pozitivna anti-Tg, međutim, dio bolesnika ima negativna anti-Tg (manje od 115 kIU/L). Na temelju negativnih/pozitivnih anti-Tg ispitanici su podijeljeni u dvije skupine – jednu skupinu čine ispitanici s negativnim anti-Tg (manjim ili jednakim 115 kIU/L), dok se druga skupina sastoji od ispitanika s pozitivnim anti-Tg (većim od 115 kIU/L).

3. ISPITANICI I METODE

Pretilost je povezana s hipotireozom i Hashimotovom bolesti, a ITM je korišten za procjenu odnosa između pretilosti i polimorfizama gena *MTNR1B*. Funkcija štitne žlijezde mogla bi biti jedan od čimbenika koji utječe na tjelesnu masu i popratne bolesti poput pretilosti, stoga su ispitanici na temelju ITM-a podijeljeni u dvije skupine (**Slika 8**). Kao granična vrijednost uzet je ITM od 25 kg/m^2 na temelju kojeg su ispitanici podijeljeni na one normalne tjelesne mase (ITM jednak ili manji od 25 kg/m^2) te na one s prekomjernom tjelesnom masom (ITM veći od 25 kg/m^2).



Slika 8. Raspodjela ispitanika na temelju indeksa tjelesne mase (ITM). Većina ispitanika (62) ima normalnu, 33 ima prekomjernu tjelesnu masu, a 20 je pretilo s ITM većim od 30 kg/m^2 .

Također, ispitanici su podijeljeni u dvije skupine na temelju primjene LT4 na one kod kojih se ono primjenjuje i one bez nadomjesnog hormonskog liječenja – novodijagnosticirani.

3.4. Statističke metode

Podaci su obrađeni u SPSS statističkom programu (26.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD). Varijable su podijeljene na kvalitativne, numeričke i ordinalne te je napravljena deskriptivna statistička obrada. Podaci su prikazani primjerenim mjerama središnjice i raspršenja – aritmetičkom sredinom i standardnim raspršenjem, medijanom i interkvartilnim rasponom, kao

3. ISPITANICI I METODE

i apsolutnom i relativnom učestalošću. Razlike numeričkih varijabli između dvije skupine testirane su Mann-Whitney U testom, dok su razlike između kategoričkih varijabli testirane Pearsonovim chi-kvadrat (χ^2) testom.

Chi-kvadrat (χ^2) test korišten je za utvrđivanje razlika u udjelu kliničkih karakteristika i kategorija kronotipa jutarnji/intermedijarni i večernjih kronotipova te kategorija dnevne pospanosti. Mann-Whitney U test korišten je za određivanje odnosa između genotipova i kronotipa te dnevne pospanosti. Kruskal-Wallis test korišten je za određivanje značajnosti odnosa između genotipa i rizičnih čimbenika za AITD.

Razlike u distribuciji i frekvenciji alela napravljene su χ^2 testom. Napravljena je analiza pojedinačnih polimorfizama prema različitim modelima nasljeđivanja (kodominantni, dominantni, recesivni) korištenjem pristupa logističke regresijske analize u sklopu paketa SNPStats (<https://www.snptest.net/>) [244] s učestalostima genotipova, proporcijama, omjerima izgleda (OR), 95 % intervalima pouzdanosti (CI) i Akaikeovim kriterijima informacija (AIC, engl. *Akaike information criterion*). Akaikeov kriterij informacije je procjenitelj pogreške predviđanja, a time i relativne kvalitete statističkih modela nasljeđivanja za analizirane polimorfizme. AIC procjenjuje kvalitetu svakog modela nasljeđivanja u odnosu na svaki od ostalih modela te omogućuje odabir modela nasljeđivanja koji najbolje odgovara podacima te se oslanja na asimptotsku aproksimaciju. Najbolji model je model s najmanjim AIC koji odgovara minimiziranju očekivane entropije [244].

Statistička korelacija vidljiva između različitih polimorfizama koji su bliže smješteni na istom kromosomu naziva se neravnoteža alelne povezanosti (engl. *Linkage disequilibrium*, LD). Napravljena je za tri analizirana polimorfizma gena *MTNR1B* SHEsisPlus programom (<http://analysis.bio-x.cn/>) [245]. Određene su vrijednosti relativnog koeficijenta vezane neravnoteže (Lewontinov D' ($|D'|$) – ako je bliže jedan, povezanost ispitivanih polimorfizama je velika) i koeficijenta korelacije (r^2 – što je bliže nuli, populacija je bliže ravnoteži) između svakog para polimorfizama. Veći D' i manji r^2 označavaju da je vjerojatnost rekombinacije između bližih lokusa vrlo mala i obično se ti lokusi prenose u bloku.

Skup polimorfizama koji se zajedno prenose na svakom kromosomu naziva se haplotip. S obzirom na genotipove uzorka, svaka jedinka ima dva moguća haplotipa, jedan po kromosomu. Rekonstrukcija haplotipova napravljena je algoritmom PL-CSEM (engl. *Partition-Ligation*

Combination-Subdivision Expectation Maximization) koji je sastavni dio SHEsisPlus programa (<http://analysis.bio-x.cn/>) [246] nakon 10000 permutacija gdje su rijetki haplotipovi s frekvencijama ispod 0,05 isključeni.

PL-CSEM algoritam napravljen je za učinkovitu procjenu haplotipova konstruiranih od velikog broja dvoalelnih ili multialelnih lokusa u diploidnih pojedinaca. Osnovni koraci CS strategije su kombinacija nekih alela kako bi se smanjio ukupan broj za svaki višalelni lokus (korak kombinacije), a zatim slijedi EM algoritam za konstrukciju haplotipova s novim alelima, tj. iz koraka kombinacije. Standardni EM algoritam uzima u obzir sve moguće haplotipove, ali korištenjem CS strategije, prvo se kombiniraju aleli kako bi se oba lokusa učinila bialelnim, a zatim se koristi EM algoritam za procjenu haplotipova s novim alelima. U EM koraku u obzir se uzimaju samo četiri moguća haplotipa. Zatim se u sljedećem koraku zadržavaju samo haplotipovi čije su frekvencije veće od granične vrijednosti, u ovom slučaju 0,05. U koraku podjele, svaki alel (osim početnog alela) podijeljen je na dva dijela, tako da se preostali haplotipovi razbijaju kako bi se formirao skup haplotipova kandidata za sljedeći EM korak. Podjela i EM koraci se ponavljaju dok se svi aleli ne vrate u početno stanje.

Tip generaliziranog linearnog modela (GLM), binarna logistička regresija, korištena je za procjenu učinka genotipova rs10830963, rs1387153 i rs4753426 gena *MTNR1B* kod Hashimotove bolesti za modeliranje vjerojatnosti binarnih ishoda – jutarnjeg/intermedijarnog kronotipa, povećane dnevne pospanosti, pozitivnih anti-Tg, pretilosti i primjene LT4. Dob, ITM, ukupni kolesterol, trigliceridi, LDL, HDL, TSH, fT3, fT4, željezo, vitamin D, rMEQ i ESS korišteni su kao kovarijate u različitim regresijskim modelima. Za svaki model određen je Nagelkerke R^2 i utvrđena je multikolinearnost.

Nagelkerke R^2 je mjera dobrog uklapanja u logistički regresijski model i predstavlja prilagođen Cox & Snell-ov R^2 tako da pokriva raspon statističke ljestvice od nula do jedan. Vrijednosti bliže jedan ukazuju na bolju prilagodbu modela. Vrijednosti Nagelkerke R^2 manje od 0,2 ukazuju na slab odnos između prediktora i ishoda, vrijednosti između 0,2 i 0,4 označavaju umjeren odnos, dok vrijednosti veće od 0,4 označuju jak odnos.

Za otkrivanje multikolinearnosti u regresijskoj analizi korišten je čimbenik inflacije varijance (VIF, engl. *Variance inflation factor*). Multikolinearnost je prisutna kada postoji korelacija između više nezavisnih varijabli u regresijskom modelu. Ukoliko je vrijednost VIF jedan, nema korelacije između varijable prediktora i drugih varijabli, dok VIF veći od jedan i manji od 10 predstavlja umjerenu korelaciju koja je prihvatljiva. Vrijednost VIF-a jednaka ili veća od 10

3. ISPITANICI I METODE

označava potencijalno problematičnu multikolinearnost i ovisnost više nezavisnih varijabli u modelu što može utjecati na tumačenje rezultata regresijskog modela.

Razina značajnosti postavljena je na dvostrani $P < 0,05$ te su sve P vrijednosti prilagođene prema Bonferronijevom testu za višestruko testiranje.

Izračun snage istraživanja napravljen je programom GAS Power Calculator (https://csg.sph.umich.edu/abecasis/gas_power_calculator/index.html) [247]. Uz pretpostavku multiplikativnog modela, dvostranu razinu značajnosti od 0,05 i populacijsku prevalenciju bolesti od 0,02. Veličina uzorka dovoljna je za 80 % snage istraživanja za otkrivanje značajnih omjera izgleda od 1,59, 1,58 i 1,57 za rjeđe učestali alel od 30 %, 40 %, odnosno 50 % u populaciji s normalnim ITM-om, negativnim anti-Tg i bez primjene liječenja s LT4.

4. REZULTATI

Opći i biokemijski podaci 115 ispitanika prikazani su u **Tablici 9**. Srednja životna dob bila je 43 ± 12 godina, te su 92,2 % ispitanika činile žene.

Normalan indeks tjelesne mase ima 62 (53,9 %) ispitanika, 33 (28,7 %) ispitanika pripada kategoriji prekomjerne tjelesne mase s ITM-om od 25,1 do 30 kg/m², te 20 (17,4 %) ispitanika je pretilo s ITM-om većim od 30,1 kg/m². Povišene razine kolesterola zabilježene su u 73 (63,5 %) ispitanika, dok je povišene razine triglicerida imalo 18 (15,7 %) ispitanika. Snižene razine HDL kolesterola bile su prisutne kod 16 (13,9 %) ispitanika, a povišene razine LDL kolesterola kod 28 (24,3 %) ispitanika. Snižene razine vitamina D imalo je 44 (38,3 %) ispitanika, dok su snižene razine željeza zabilježene kod 17 (14,8 %) ispitanika. Na nadomjesnom hormonskom liječenju s LT4 bilo je 61,7 % ispitanika.

Tablica 9. Opći i biokemijski podatci svih ispitanika (N = 115)

Variable	Medijan	Interkvartilni raspon	
Dob (godine)	41	33 – 50	
ITM (kg/m ²)	24,43	22,07 – 28,76	
Kolesterol (mmol/L)	5,40	4,40 – 6,00	
Trigliceridi (mmol/L)	1,30	0,90 – 1,60	
HDL (mmol/L)	1,50	1,30 – 1,80	
LDL (mmol/L)	2,20	1,60 – 3,00	
Željezo (μmol/L)	14,00	9,00 – 21,00	
Vitamin D (nmol/L)	56,70	43,00 – 73,30	
Spol	N	Udio	
Žene	106	92,2 %	
Muškarci	9	7,8 %	
LT4	Ne	44	38,3 %
	Da	71	61,7 %

ITM – indeks tjelesne mase, HDL – lipoprotein velike gustoće, LDL – lipoprotein niske gustoće, LT4 – levotiroksin

Biokemijski parametri štitne žlijezde prikazani su u **Tablici 10**. Samo jedan ispitanik imao je normalnu razinu anti-TPO, manju od 34 kIU/L, dok je 114 (99,1 %) ispitanika imalo povišene razine anti-TPO. Međutim, 28 (24,3 %) ispitanika imalo je normalne razine anti-Tg (anti-Tg do 115 kIU/L), dok je 87 (75,7 %) ispitanika imalo povišene razine anti-Tg.

Tablica 10. Parametri štitne žlijezde svih ispitanika (N = 115)

Varijable	Medijan	Interkvartilni raspon
anti-TPO (kIU/L)	260,50	127 – 600,50
anti-Tg (kIU/L)	181,80	120,00 – 300,00
TSH (mU/L)	11,20	7,90 – 15,70
fT3 (pmol/L)	5,40	4,50 – 6,00
fT4 (pmol/L)	15,60	13,70 – 17,40

anti-TPO – protutijela na tiroidnu peroksidazu, anti-Tg – tireoglobulinska protutijela, TSH – tireotropni hormon (tireotropin), fT3 – slobodni trijodtironin, fT4 – slobodni tiroksin

4.1. Analiza polimorfizama gena *MTNR1B*

U **Tablici 11.** prikazana je raspodjela alela u odnosu na referentnu populaciju HapMap baze podataka kod stanovnika države Utah porijeklom iz sjeverne i zapadne Europe (CEU) dobivenu projektom 1000 Genomes. Raspodjela i učestalost genotipova također je prikazana u **Tablici 11.**

Tablica 11. Raspodjela i učestalost alela i genotipova gena *MTNR1B*

SNP	Rjeđi alel	MAF* HB	MAF* HapMap**	Genotip	Učestalost genotipa (%)
rs10830963	G	0,465	0,288	CC	53
				CG	0,9
				GG	46,1
rs1387153	T	0,330	0,287	CC	48,7
				CT	36,5
				TT	14,8
rs4753426	T	0,457	0,479	CC	30,4
				CT	47,8
				TT	21,7

HB – ispitanici s Hashimotovom bolesti, *MAF – rjeđi alel (engl. *Minor allele frequency*),

** Učestalost MAF alela kod stanovnika države Utah porijeklom iz sjeverne i zapadne Europe u bazi HapMap (CEU)

Povezanost polimorfizama gena *MTNR1B* i čimbenika rizika za autoimune bolesti štitne žlijezde prikazana je u **Tablici 12**. Polimorfizam rs10830963 povezan je sa spolom ispitanika, jer jedini heterozigotni genotip (CG) ima ispitanik muškog spola. Polimorfizam rs10830963 povezan je razinama vitamina D ($\chi^2 = 202,493$; df = 2; P = 0,045), dok je rs4753426 bio granično povezan s razinama željeza ($\chi^2 = 85,097$; df = 2; P = 0,057).

Tablica 12. Povezanosti čimbenika rizika za AITD i polimorfizama gena *MTNR1B* (N = 115)

	rs10830963	rs1387153	rs4753426
Spol	0,001	0,254	0,485
LT4	0,157	0,142	0,931
Dob	0,826	0,347	0,593
ITM	0,414	0,427	0,462
Kolesterol (mmol/L)	0,945	0,774	0,652
Trigliceridi (mmol/L)	0,956	0,119	0,858
HDL (mmol/L)	0,989	0,480	0,619
LDL (mmol/L)	0,092	0,759	0,394
Željezo (μmol/L)	0,731	0,425	0,057
Vitamin D (nmol/L)	0,045	0,479	0,434

LT4 – levotiroksin, ITM – indeks tjelesne mase, HDL – lipoprotein velike gustoće, LDL – lipoprotein niske gustoće. Prikazane su P vrijednosti chi-kvadrat testa

Rezultati χ^2 testa o povezanosti biokemijskih parametara za AITD i polimorfizama gena *MTNR1B* prikazani su u **Tablici 13**. Pronađena je značajna povezanost polimorfizma rs10830963 s anti-Tg ($\chi^2 = 204,588$; df = 160; P = 0,010) te s fT3 ($\chi^2 = 152,143$; df = 58; P < 0,001).

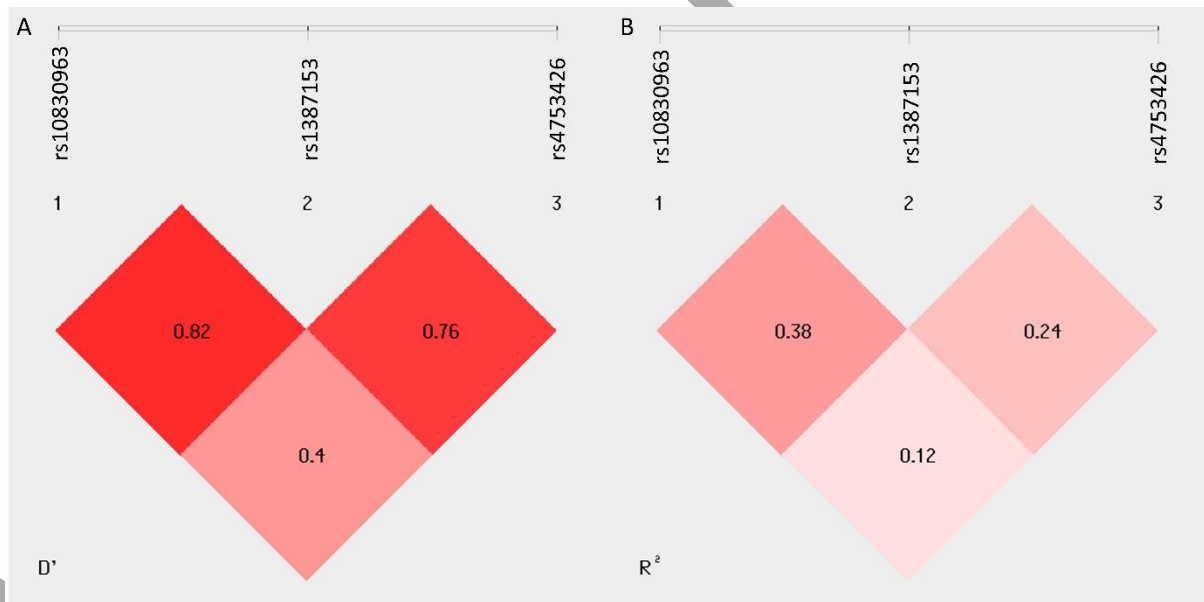
Tablica 13. Povezanost biokemijskih parametara za AITD i polimorfizama gena *MTNR1B* kod ispitanika s Hashimotovom bolesti (N = 115)

	rs10830963	rs1387153	rs4753426
anti-TPO (klU/L)	0,995	0,542	0,666
anti-Tg (klU/L)	0,010	0,450	0,469
TSH (mU/L)	0,877	0,689	0,416
fT3 (pmol/L)	<0,001	0,154	0,066
fT4 (pmol/L)	0,857	0,220	0,502

anti-TPO – protutijela na tiroidnu peroksidazu, anti-Tg – tireoglobulinska protutijela, TSH – tireotropni hormon (tireotropin), fT3 – slobodni trijodtironin, fT4 – slobodni tiroksin.

Prikazane su P vrijednosti za chi-kvadrat test

Analiza neravnoteže alelne povezanosti (engl. *Linkage disequilibrium*, LD) tri analizirana polimorfizma (rs10830963, rs1387153 i rs4753426) gena *MTNR1B* prikazana je relativnim koeficijentom vezane neravnoteže (Lewontinov D' (D')) i koeficijentom korelacije (r^2) na **Slici 9**. Najveća LD zapažena je između rs10830963 i rs1387153 ($D' = 0,827$; **slika 9A**), te između navedenih polimorfizama postoji mala mogućnost rekombinacije. Najmanja zapažena LD je između rs10830963 i rs4753426 ($D' = 0,406$). Na **slici 9B** prikazani su koeficijenti korelacije, koji, što su bliže nuli, populacija je bliže ravnoteži. Populacija je najbliže ravnoteži za polimorfizme rs10830963 i rs4753426 ($r^2 = 0,121$), a najveće odstupanje populacije od ravnoteže vidljivo je između polimorfizama rs10830963 i rs1387153 ($r^2 = 0,388$).



Slika 9. Neravnoteža alelne povezanosti (LD) tri odabrana polimorfizma (rs10830963, rs1387153 i rs4753426). A) relativni koeficijent vezane neravnoteže (D'), B) koeficijent korelacije (r^2).

4.2. Kronotip i dnevna pospanost

Učestalost pojedinih tipova kronotipa prikazana je u **Tablici 14.** Većina ispitanika (60,9 %) ima intermedijarni kronotip, dok je samo jedan ispitanik (0,9 %) jutarnjeg kronotipa.

Tablica 14. Učestalost pojedinog tipa kronotipa među ispitanicima (N = 115)

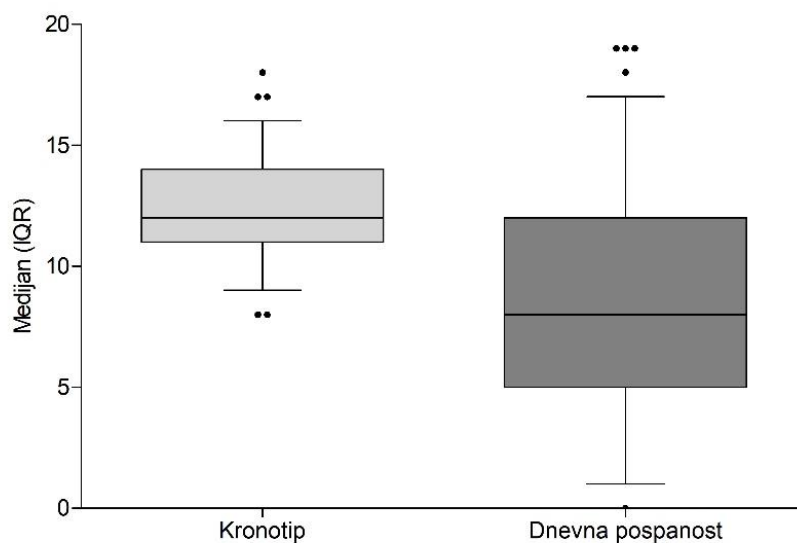
Tip	N	Postotak
Jutarnji tip (≥ 18)	1	0,9 %
Intermedijarni (12–17)	70	60,9 %
Večernji tip (≤ 11)	44	38,3 %

Učestalost različitih tipova dnevne pospanosti prikazana je u **Tablici 15.** Najviše ispitanika pripada skupini normalne dnevne pospanosti (71,3 %), a najmanje skupini velike dnevne pospanosti (3,5 %).

Tablica 15. Učestalost kategorija dnevne pospanosti (N = 115)

Pospanost	N	Postotak
Normalna pospanost (0–10)	82	71,3 %
Blaga pospanost (11–14)	20	17,4 %
Umjerena pospanost (15–17)	9	7,8 %
Velika pospanost (≥ 18)	4	3,5 %

Srednja vrijednost kronotipa u cijeloj populaciji ispitanika iznosila je $12,19 \pm 2,07$, dok je srednja vrijednost samoprocijenjene dnevne pospanosti bila $8,39 \pm 4,49$. Kako raspodjela kronotipa i dnevne pospanosti ne prati Gaussovu krivulju, vrijednosti kronotipa i dnevne pospanosti prikazane su na **Slici 10** kao medijani s interkvartilnom rasponom



Slika 10. Medijani i interkvartilni rasponi (IQR) kronotipa (12; 11-14) i dnevne pospanosti (8; 5-12) (N = 115)

Rezultati χ^2 testa o povezanosti demografskih podataka ispitanika i biokemijskih parametara s kronotipom i dnevnom pospanošću prikazani su u **Tablici 16**. Od svih analiziranih podataka samo je dob bila značajno povezana s kronotipom ($\chi^2 = 499,278$; $df = 430$; $P = 0,012$) te su mlađi ispitanici više težili večernjem kronotipu.

Tablica 16. Povezanost čimbenika rizika za AITD s kronotipom i dnevnom pospanošću kod ispitanika s Hashimotovom bolesti (N = 115)

	Kronotip*		Dnevna pospanost*	
	χ^2	P	χ^2	P
Spol	4,949	0,895	23,713	0,207
LT4	13,598	0,192	21,664	0,301
Dob	499,278	0,012	763,500	0,909
ITM	1136,353	0,283	2147,311	0,275
Kolesterol (mmol/L)	434,373	0,195	786,352	0,420
Trigliceridi (mmol/L)	178,163	0,946	347,256	0,971
HDL (mmol/L)	200,651	0,821	436,136	0,261
LDL (mmol/L)	387,649	0,524	729,777	0,609
Željezo (μ mol/L)	361,199	0,114	660,359	0,172
Vitamin D (nmol/L)	828,563	0,694	1667,768	0,176

LT4 – levotiroksin, ITM – indeks tjelesne mase, HDL – lipoprotein velike gustoće, LDL – lipoprotein niske gustoće. *P vrijednosti za chi-kvadrat test

Povezanost biokemijskih parametara za autoimune bolesti štitne žlijezde s kronotipom i dnevnom pospanošću prikazana je u **Tablici 17**. Prisutna je značajna povezanost anti-Tg i razina TSH s kronotipom i dnevnom pospanošću te razina fT3 s dnevnom pospanošću.

Tablica 17. Povezanost biokemijskih parametara za AITD s kronotipom i dnevnom pospanošću (N = 115)

	Kronotip*		Dnevna pospanost*	
	χ^2	P	χ^2	P
anti-TPO (klU/L)	986,378	0,697	1860,248	0,828
anti-Tg (klU/L)	898,614	0,008	1667,721	0,005
TSH (mU/L)	833,323	0,033	1531,095	0,050
fT3 (pmol/L)	251,152	0,952	618,605	0,024
fT4 (pmol/L)	579,322	0,926	1180,799	0,625

anti-TPO – protutijela na tireoidnu peroksidazu, anti-Tg – tireoglobulinska protutijela, TSH – tireotropni hormon (tireotropin), fT3 – slobodni trijodtironin, fT4 – slobodni tiroksin. *P vrijednosti za chi-kvadrat test

4.3. Povezanost polimorfizama gena *MTNR1B* s kronotipom

Povezanost između pojedinih polimorfizama gena *MTNR1B* i kronotipa kod ispitanika s Hashimotovom bolesti prikazana je u **Tablici 18**. Polimorfizmi rs10830963, rs1387153 i rs4753426 nisu bili povezani s kronotipom u cjelokupnoj populaciji ispitanika s Hashimotovom bolesti.

Tablica 18. Povezanost polimorfizama gena *MTNR1B* s kronotipom (N = 115)

Polimorfizam	χ^2	P
rs10830963	14,416	0,809
rs1387153	17,649	0,610
rs4753426	30,172	0,067

Odnosi između učestalosti genotipova istraživanih polimorfizama gena *MTNR1B* i samoprocjene kronotipa (rMEQ) kod svih ispitanika s Hashimotovom bolesti prikazani su u **Tablici 19**. Dodatnom analizom uočena je značajna razlika u kronotipu između genotipova CC i CT polimorfizma rs4753426 ($Z = -2,116$; $P = 0,034$).

Tablica 19. Odnos između učestalosti genotipova gena *MTNR1B* i samoprocjene kronotipa (N = 115)

SNP	Genotip	MEQ medijan	MEQ IQR	χ^2	P*
rs10830963	CC	12	11 – 13,50	14,416	0,809
	CG	11	11 – 11		
	GG	12	10 – 14		
rs1387153	CC	12	11 – 13,75	17,649	0,610
	CT	12	10 – 14		
	TT	12	10,50 – 14,50		
rs4753426	CC	12	10 – 13	30,172	0,067
	CT	12	11 – 14		
	TT	12	11 – 14		

IQR – interkvartilni raspon. *Chi-kvadrat test

Napravljena je odvojena statistička analiza na temelju kategorija samoprocijenjenog kronotipa. Analizirane su razlike između kategorije večernjeg kronotipa ($n = 44$) i intermedijarni + jutarnji kronotip ($n = 71$). Učestalost i razlika u alelima analiziranih polimorfizama gena *MTNR1B* u odnosu na kategoriju kronotipa ispitanika s Hashimotovom bolesti prikazana je u **Tablici 20**. Nije pronađena statistički značajna razlika između analiziranih polimorfizama gena *MTNR1B* na temelju kategorija kronotipa u populaciji ispitanika s Hashimotovom bolesti.

Tablica 20. Učestalost alela polimorfizama gena *MTNR1B* u odnosu na kronotip (N = 115)

SNP	Rjedi alel	Večernji (n = 44)	Intermedijarni + jutarnji (n = 71)	OR	95 % CI	P
		Učestalost alela	Učestalost alela			
rs10830963	G	0,443	0,478	1,15	0,68–1,97	0,597
rs1387153	T	0,318	0,338	1,09	0,62–1,93	0,755
rs4753426	T	0,454	0,457	1,01	0,59–1,73	0,962

OR – omjer izgleda (engl. *Odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *Confidence interval*).

Također, nisu uočene značajne razlike između različitih kategorija kronotipova i analiziranih genotipova polimorfizama gena *MTNR1B* (Tablica 21).

Tablica 21. *MTNR1B* genotipovi i kategorije kronotipa (N = 115)

SNP	Genotip	Večernji (n = 44)	Intermedijarni + jutarnji (n = 71)	Z	P*
rs10830963	CC	10,50 (9–11)	13 (12–14)	-0,365	0,715
	CG	11 (11–11)	-		
	GG	10 (9–11)	13 (12–15)		
rs1387153	CC	11 (9–11)	13 (12–14)	-0,271	0,786
	CT	10 (9–10,75)	13 (12–14)		
	TT	10 (9,75–11)	13 (12–16)		
rs4753426	CC	10 (9–10)	13 (12–14)	-0,125	0,901
	CT	10 (9–11)	13 (12–15)		
	TT	11 (10–11)	14 (12–14)		

rMEQ – kronotip, ESS – dnevna pospanost. Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. *Mann-Whitney U test

Učestalost kodominantnih, dominantnih i recesivnih modela genotipova između kategorija večernjih i intermedijarnih + jutarnjih kronotipova prikazane su u **Tablici 22**.

Tablica 22. Modeli genotipova gena *MTNR1B* na temelju kategorija kronotipova

Modeli genotipova		rs10830963	rs1387153	rs4753426
Kodominantni model	P	0,35	0,96	0,15
	OR	1,00	0,95	0,49
	95 % CI	0,40–1,84	0,42–2,16	0,20–1,18
	AIC	156,9	158,9	155,2
Dominantni model	P	0,80	0,83	0,28
	OR	0,91	0,92	0,64
	95 % CI	0,43–1,93	0,43–1,95	0,28–1,43
	AIC	157	157	155,9
Recesivni model	P	0,62	0,78	0,26
	OR	0,83	0,86	1,67
	95 % CI	0,39–1,76	0,29–2,52	0,68–4,10
	AIC	156,8	157	155,8

OR – omjer izgleda (engl. *Odds ratio*), CI – interval pouzdanosti (engl. *Confidence interval*), AIC – engl. *Akaike information criterion*.

Analizirani su haplotipovi na temelju kategorija kronotipova. Učestalost predviđenih haplotipova prikazana je u **Tablici 23**. Usporedbom četiri najčešća haplotipa između ispitanika večernjeg te intermedijarnog i jutarnjeg kronotipa nije pronađena statistički značajna razlika.

Tablica 23. Učestalost i raspodjela mogućih haplotipova gena *MTNR1B* na temelju kategorija kronotipova

rs10830963	rs1387153	rs4753426	Učestalost večernji	Učestalost intermedijarni +jutarnji	OR (95 % CI)	P
G	T	C	0,28	0,28	1,13 (0,58–2,20)	0,71
C	C	C	0,20	0,19	0,96 (0,46–2,01)	0,92
G	C	T	0,09	0,11	0,72 (0,26–2,01)	0,53
G	C	C	0,06	0,06	0,85 (0,24–3,03)	0,80

OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti.

Razlike u biokemijskim parametarima za AITD u odnosu na tip kronotipa prikazane su u **Tablici 24**. Pacijenti jutarnjeg i intermedijarnog kronotipa imaju značajno više razine fT3 u odnosu na pacijente večernjeg kronotipa. Ostali biokemijski parametri ne razlikuju se na temelju tipa kronotipa.

Tablica 24. Razlike u biokemijskim parametrima štitne žlijezde ovisno o kronotipu (N = 115)

Varijable	Večernji (n = 44)	Intermedijarni + jutarnji (n = 71)	Z	P*
anti-TPO (klU/L)	240,45 (116,25–437,63)	270,5 (127–690)	-0,791	0,429
anti-Tg (klU/L)	172,5 (121,88–217,13)	190 (100,5–330)	-0,881	0,379
TSH (mU/L)	39,8 (7,7–13,38)	12,1 (7,9–18,4)	-1,341	0,180
fT3 (pmol/L)	2,8 (14,53–17,38)	5,2 (4,4–5,8)	-2,160	0,031
fT4 (pmol/L)	11 (14,53–17,38)	15,1 (13,3–17,4)	-1,425	0,154

anti-TPO – protutijela na peroksidazu štitne žlijezde, anti-Tg – tireoglobulinska protutijela, TSH – tireotropin, fT3 – slobodni trijodtironin, fT4 – slobodni tiroksin. Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. *P vrijednosti za Mann-Whitney U test.

U **Tablici 25.** prikazane su razlike u rizičnim čimbenicima za AITD u odnosu na tip kronotipa. Nisu uočene statistički značajne razlike između večernjeg tipa i intermedijarnog + jutarnjeg kronotipa kod pacijenta s Hashimotovom bolesti.

Tablica 25. Razlike u čimbenicima rizika za AITD ovisno o kronotipu (N = 115)

Varijable	Večernji (n = 44)	Intermedijarni + jutarnji (n = 71)	Z	P
Spol (n, žene)	40 (90,9 %)	66 (93 %)	-0,396	0,692
LT4	27 (61,4 %)	44 (61,9 %)	-0,065	0,948
Dob	41 (37–50)	41 (32–51)	-0,665	0,506
ITM	25,07 (22,11–29,07)	24,27 (22,03–28,67)	-0,342	0,732
Kolesterol (mmol/L)	5,15 (4,13–5,9)	5,5 (4,5–6)	-1,132	0,258
Trigliceridi (mmol/L)	1,3 (0,9–1,48)	1,3 (0,9–1,6)	-0,949	0,342
HDL (mmol/L)	1,5 (1,4–1,8)	1,5 (1,3–1,9)	-0,217	0,828
LDL (mmol/L)	2,2 (1,6–3)	2,2 (1,6–3,1)	-0,760	0,447
Željezo (μmol/L)	12,85 (8–19,75)	15,5 (9–22)	-1,446	0,148
Vitamin D (nmol/L)	56,5 (43,7–78,6)	57 (43–73,3)	-0,029	0,977

LT4 – levotiroksin, ITM – indeks tjelesne mase, HDL – lipoprotein velike gustoće, LDL – lipoprotein niske gustoće. Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. *P vrijednosti za Mann-Whitney U test.

Napravljen je binarni logistički regresijski model za procjenu neovisnog učinka izabranih polimorfizma nakon prilagodbe za čimbenike rizika na temelju dvije kategorije kronotipa uz večernji kronotip kao referentu kategoriju. Model je pokazao da su ispitanici s intermedijarnim + jutarnjim kronotipovima imali značajno niže razine fT3 (P = 0,033; OR = 0,42; 95 % CI 0,19–0,93), ali više razine trigliceridija (P = 0,047; OR = 3,12; 95 % CI 1,02–9,60), te granično više razine željeza (P = 0,050; OR = 1,07; 95 % CI 1,00–1,14) što je prikazano u **Tablici 26.**

Za navedeni model VIF čimbenici iznosili su od 1,043 do 3,874 što znači da ne postoji multikolinearnost između kategorija kronotipa i bilo koje druge varijable u modelu te

multikolinearnost ne utječe na tumačenje regresijskog modela. Nagelkerke R^2 za navedeni model iznosio je 0,236.

Tablica 26. Omjeri izgleda za ispitanike s intermedijarnim i jutarnjim kronotipom prilagođeni za čimbenike rizika uključene u binarni logistički regresijski model.

Čimbenici	Beta	SE	OR (95% CI)	P
Dob (godine)	-0,010	0,019	0,99 (0,95 – 1,03)	0,589
ITM (kg/m ²)	-0,022	0,046	0,98 (0,89 – 1,07)	0,636
TSH (mU/L)	-0,024	0,056	0,98 (0,88 – 1,09)	0,663
fT3 (pmol/L)	-0,857	0,403	0,42 (0,19 – 0,93)	0,033
fT4 (pmol/L)	-0,113	0,172	0,89 (0,64 – 1,25)	0,511
Kolesterol (mmol/L)	0,153	0,317	1,17 (0,63 – 2,17)	0,628
Trigliceridi (mmol/L)	1,139	0,573	3,12 (1,02 – 9,60)	0,047
HDL (mmol/L)	0,045	0,169	1,05 (0,75 – 1,46)	0,791
LDL (mmol/L)	-0,090	0,311	0,91 (0,50 – 1,68)	0,772
Željezo (μmol/L)	0,067	0,034	1,07 (1,00 – 1,14)	0,050
rs10830963 (CC)	0,046	1,053	1,05 (0,13 – 8,25)	0,965
rs10830963 (CG)	-2,029	4,019	0 (0)	1,00
rs1387153 (CC)	-0,650	1,178	0,52 (0,05 – 5,25)	0,581
rs1387153 (CT)	-0,532	0,743	0,59 (0,14 – 2,52)	0,474
rs4753426 (CC)	0,150	0,724	1,16 (0,28 – 4,80)	0,835
rs4753426 (CT)	1,005	0,646	2,73 (0,77 – 9,69)	0,119

SE – standardna greška, OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti.

4.4. Povezanost polimorfizama gena *MTNR1B* s dnevnom pospanošću

Povezanost između pojedinih analiziranih polimorfizama gena *MTNR1B* i dnevne pospanosti kod ispitanika s Hashimotovom bolesti prikazana je u **Tablici 27**. Na razini cijele ispitivane populacije pronađena je statistički značajna povezanost polimorfizma rs10830963 gena *MTNR1B* i dnevne pospanosti ($\chi^2 = 133,540$; $df = 38$; $P < 0,001$). Polimorfizmi rs1387153 i rs4753426 nisu bili povezani s dnevnom pospanošću u cjelokupnoj populaciji ispitanika s Hashimotovom bolesti.

Tablica 27. Povezanost polimorfizama gena *MTNR1B* s dnevnom pospanošću (N = 115)

Polimorfizam	χ^2	P
rs10830963	133,540	<0,001
rs1387153	32,502	0,721
rs4753426	39,319	0,411

*P vrijednosti chi-kvadrat testa

Odnosi između učestalosti genotipova istraživanih polimorfizama gena *MTNR1B* i dnevne pospanosti (ESS) kod svih ispitanika s Hashimotovom bolesti prikazani su u **Tablici 28**. Uočena je povezanost dnevne pospanosti i rs10830963 genotipova ($\chi^2 = 133,540$; $df = 38$; $P < 0,001$). Dodatna analiza rs10830963 genotipova pokazala je značajnu razliku u dnevnoj pospanosti između CG i GG genotipova ($Z = -1,705$; $P = 0,037$) te CC i CG genotipova ($Z = -1,711$; $P = 0,032$).

Tablica 28. Odnos između učestalosti genotipova gena *MTNR1B* i dnevne pospanosti (N = 115)

SNP	Genotip	Medijan	IQR	χ^2	P*
rs10830963	CC	8	5,50 – 11,50	133,540	<0,001
	CG	0	0		
	GG	8	5,50 – 12		
rs1387153	CC	8	5 – 11	32,502	0,721
	CT	9	5,75 – 13		
	TT	7	5,50 – 9,50		
rs4753426	CC	9	6 – 12	39,319	0,411
	CT	8	5 – 12		
	TT	8	3 – 9		

IQR – interkvartilni raspon. * P vrijednosti chi-kvadrat testa

Na temelju kategorija samoprocjene dnevne pospanosti napravljena je statistička analiza za kategorije normalne dnevne pospanosti (n = 82) i povećane dnevne pospanosti (n = 33). Učestalosti alela analiziranih polimorfizama gena *MTNR1B* u donosu na kategorije dnevne pospanosti ispitanika s Hashimotovom bolesti prikazane su u **Tablici 29**. Nije pronađena statistički značajna razlika niti jednog od analiziranih polimorfizma gena *MTNR1B* između kategorija dnevne pospanosti u populaciji ispitanika s Hashimotovom bolesti.

Tablica 29. Učestalost alela polimorfizama gena *MTNR1B* u odnosu dnevnu pospanost (N = 115)

SNP	Rjedi alel	Normalna (n = 82)	Povećana (n = 33)	OR	95 % CI	P*
		Učestalost alela	Učestalost alela			
rs10830963	G	0,469	0,454	0,941	0,53–1,67	0,836
rs1387153	T	0,347	0,287	0,758	0,41–1,41	0,384
rs4753426	T	0,481	0,393	0,699	0,39–1,25	0,226

OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti. *P vrijednosti chi-kvadrat testa

Razlike između kategorija dnevne pospanosti i genotipova polimorfizama gena *MTNR1B* nisu bile značajne, a prikazane su u **Tablici 30**.

Tablica 30. *MTNR1B* genotipovi i dnevna pospanost (N = 115)

SNP	Genotip	Normalna (n = 82)	Povećana (n = 33)	Z	P*
rs10830963	CC	6 (5–8)	13,5 (12–15,5)	-0,150	0,881
	CG	-	-		
	GG	7 (4–8,25)	13 (13–16)		
rs1387153	CC	6 (4,25–8)	12,5 (12–15)	-0,552	0,581
	CT	7 (3–9)	13 (13–17)		
	TT	7 (5–9)	15,5 (15–16)		
rs4753426	CC	7 (5–9)	14 (12–16)	-1,172	0,241
	CT	6 (1–8)	13 (12–15)		
	TT	6 (3–8)	13 (12–18)		

Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. *Mann-Whitney test

Učestalosti kodominantnih, dominantnih i recesivnih modela genotipova između kategorija normalne i povećane dnevne pospanosti prikazane su u **Tablici 31**.

Tablica 31. Modeli genotipova polimorfizama gena *MTNR1B* na temelju kategorija dnevne pospanosti (N = 115)

Modeli genotipova		rs10830963	rs1387153	rs4753426
Kodominantni model	P	0,7	0,15	0,47
	OR	1,06	0,72	1,27
	95 % CI	0,47–2,39	0,31–1,70	0,51–3,16
	AIC	143,2	140,1	142,3
Dominantni model	P	0,84	0,98	0,39
	OR	1,09	0,99	1,47
	95 % CI	0,48–2,45	0,44–2,22	0,62–3,46
	AIC	141,8	141,9	141,1
Recesivni model	P	0,93	0,072	0,26
	OR	1,04	3,47	1,81
	95 % CI	0,46–2,33	0,75–16,12	0,62–5,30
	AIC	141,9	139,6	140,6

OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti, AIC – engl. *Akaike information criterion*.

U Tablici 32. prikazane su učestalosti predviđenih haplotipova na temelju kategorija dnevne pospanosti. Usporedbom četiri najčešća haplotipa između ispitanika normalne i povećane dnevne pospanosti pronađena je statistički značajna razlika u haplotipu GCC (OR = 0,22; 95 % CI 0,06–0,87; P = 0,033).

Tablica 32. Učestalost i raspodjela mogućih haplotipova gena *MTNR1B* na temelju kategorija dnevne pospanosti

rs10830963	rs1387153	rs4753426	Učestalost	Učestalost	OR (95 % CI)	P
			normalna ESS	povećana ESS		
G	T	C	0,29	0,14	1,16 (0,48–2,81)	0,741
C	C	C	0,17	0,27	0,47 (0,21–1,07)	0,070
G	C	T	0,11	0	0,57 (0,16–2,02)	0,391
G	C	C	0,05	0,19	0,22 (0,06–0,87)	0,033

OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti.

Nisu zapažene značajne razlike u biokemijskim parametarima za AITD između normalne i povećane dnevne pospanosti kod ispitanika s Hashimotovom bolesti (**Tablica 33.**).

Tablica 33. Razlike u biokemijskim parametrima štitne žlijezde ovisno o dnevnoj pospanosti (N = 115)

Varijable	Normalna (n = 82)	Povećana (n = 33)	Z	P*
anti-TPO (klU/L)	288 (139,21–550,45)	250 (102,2–755)	-0,176	0,860
anti-Tg (klU/L)	164 (109,13–235)	200 (142,25–325,9)	-1,806	0,071
TSH (mU/L)	11,05 (7,8–15,8)	1,4 (8,8–16,6)	-0,519	0,603
fT3 (pmol/L)	5,4 (4,58–5,93)	5,6 (4,5–6)	-0,931	0,352
fT4 (pmol/L)	15,8 (13,68–17,8)	14,9 (13,7–16,65)	-0,869	0,385

anti-TPO – protutijela na tiroidnu peroksidazu, anti-Tg – tireoglobulinska protutijela, TSH – tireotropni hormon (tireotropin), fT3 – slobodni trijodtironin, fT4 – slobodni tiroksin. Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. *P vrijednosti za Mann-Whitney U test.

Na temelju podataka u **Tablici 34.** nisu uočene značajne razlike između kategorija normalne i povećane dnevne pospanosti u rizičnim čimbenicima za Hashimotovu bolest. Međutim, svi muškarci uključeni u istraživanje pripadali su kategoriji normalne dnevne pospanosti.

Tablica 34. Razlike u čimbenicima rizika za AITD ovisno o dnevnoj pospanosti (N = 115)

	Normalna (n = 82)	Povećana (n = 33)	Z	P
Spol (n, žene)	73 (89 %)	33 (100 %)	-1,974	0,048
LT4	52 (63,4 %)	19 (57,6 %)	-0,580	0,562
Dob	41 (34,75–53)	40 (30,5–48)	-1,201	0,230
ITM	24,19 (21,99–28,48)	25,49 (22,37–29,58)	-0,890	0,373
Kolesterol (mmol/L)	5,4 (4,5–6)	5,2 (4,05–5,9)	-1,115	0,250
Trigliceridi (mmol/L)	1,3 (0,9–1,6)	1,2 (0,9–1,55)	-0,431	0,666
HDL (mmol/L)	1,5 (1,3–1,8)	1,6 (1,3–1,9)	-0,752	0,452
LDL (mmol/L)	2,3 (1,68–3,1)	2 (1,1–2,94)	-1,485	0,137
Željezo (μmol/L)	14 (9–19,25)	17 (10–23,5)	-1,730	0,084
Vitamin D (nmol/L)	57,5 (43,23–73,08)	56,5 (43–80,9)	-0,136	0,892

LT4 – levotiroksin, ITM – indeks tjelesne mase, HDL – lipoprotein velike gustoće, LDL – lipoprotein niske gustoće. Podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon. *P vrijednosti za Mann-Whitney U test.

Napravljen je binarni logistički regresijski model za procjenu neovisnog učinka izabranih polimorfizma nakon prilagodbe za čimbenike rizika na temelju kategorija dnevne pospanosti uz normalnu pospanost kao referentu kategoriju. Genotip CT polimorfizma rs1387153 ($P = 0,031$; OR = 7,13; 95 % CI 1,19 – 42,62) pozitivno je povezan s povećanom dnevnom pospanošću. Nadalje, model je pokazao da ispitanici s povećanom dnevnom pospanošću imaju značajno više razine željeza ($P = 0,027$; OR = 1,08; 95 % CI 1,01–1,16) što je prikazano u **Tablici 35**. VIF čimbenici multikolinearnosti za navedeni model iznosili su od 1,045 do 3,876 što znači da ne postoji korelacija između kategorija dnevne pospanosti i varijabli uključenih u model te multikolinearnost ne utječe na tumačenje regresijskog modela. Nagelkerke R^2 za navedeni model iznosio je 0,233.

Tablica 35. Omjeri izgleda za ispitanike s povećanom dnevnom pospanošću prilagođeni za čimbenike rizika uključene u binarni logistički regresijski model.

Čimbenici	Beta	SE	OR (95% CI)	P
Dob (godine)	-0,032	0,021	0,97 (0,93 – 1,01)	0,128
ITM (kg/m ²)	0,029	0,049	1,03 (0,93 – 1,13)	0,563
TSH (mU/L)	-0,003	0,062	1,00 (0,88 – 1,13)	0,958
fT3 (pmol/L)	0,181	0,397	1,20 (0,55 – 2,61)	0,649
fT4 (pmol/L)	-0,077	0,186	0,93 (0,64 – 1,33)	0,680
Kolesterol (mmol/L)	-0,219	0,334	0,80 (0,42 – 1,55)	0,512
Trigliceridi (mmol/L)	-0,338	0,400	0,71 (0,33 – 1,56)	0,399
HDL (mmol/L)	0,058	0,161	1,06 (0,77 – 1,45)	0,721
LDL (mmol/L)	-0,012	0,323	0,99 (0,53 – 1,86)	0,971
Željezo (μmol/L)	0,078	0,035	1,08 (1,01 – 1,16)	0,027
Vitamin D (nmol/L)	0,005	0,011	1,01 (0,98 – 1,03)	0,656
rs10830963 (CC)	0,654	1,001	1,92 (0,27 – 13,68)	0,513
rs10830963 (CG)	-2,116	4,019	0 (0)	1,00
rs1387153 (CC)	1,025	1,234	2,79 (0,25 – 31,31)	0,406
rs1387153 (CT)	1,964	0,912	7,13 (1,19 – 42,62)	0,031
rs4753426 (CC)	1,207	0,794	3,34 (0,70 – 15,87)	0,129
rs4753426 (CT)	0,500	0,717	1,65 (0,40 – 6,72)	0,485

SE – standardna greška, OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti.

4.5. Razlike u polimorfizmima gena *MTNR1B* na temelju anti-Tg

Na temelju prisutnosti anti-Tg ispitanici su podijeljeni u dvije kategorije – jednu skupinu su činili ispitanici s negativnim anti-Tg (manjim ili jednakim od 115 kIU/L), dok se druga skupina sastojala od ispitanika s pozitivnim anti-Tg (većim od 115 kIU/L). Rezultati Mann-Whitney U testa o razlici u rizičnim čimbenicima za Hashimotovu bolest ovisno o prisutnosti i odsutnosti anti-Tg prikazani su u **Tablici 36**. Ispitanici s negativnim anti-Tg imaju značajnije više razine

triglicerida od ispitanika s pozitivnim anti-Tg ($Z = -2,503$; $P = 0,012$).

Tablica 36. Rizični čimbenici za AITD ovisno o razini anti-Tg ($N = 115$)

Variable	anti-Tg $\leq$ 115 kIU/L	anti-Tg $>$ 115 kIU/L	P
	(n = 28)	(n = 87)	
	M (IQR)	M (IQR)	
Spol (žene, N, %)	27 (96,4 %)	79 (90,8 %)	0,337
LT4 (N, %)	16 (57,1 %)	55 (63,2 %)	0,567
Dob (godine)	41 (33–52,5)	41 (35–50)	0,602
ITM	24,09 (21,8–30,76)	24,45 (22,23–28,67)	0,92
Kolesterol (mmol/L)	5,45 (4,48–5,98)	5,3 (4,3–6)	0,873
Trigliceridi (mmol/L)	1,4 (1,1–1,8)	1,2 (0,9–1,5)	0,012
HDL (mmol/L)	1,5 (1,3–1,85)	1,5 (1,3–1,8)	0,630
LDL (mmol/L)	2,25 (1,6–3,55)	2,2 (1,6–3)	0,533
Željezo (μ mol/L)	14,6 (9,68–21)	14 (9–21)	0,615
Vitamin D (nmol/L)	58 (43,08–71)	55,3 (43–79,8)	0,527
rMEQ	12,5 (11–14)	12 (10–13)	0,148
ESS	8 (5,25–10)	8 (5–12)	0,857

LT4 – levotiroksin, ITM – indeks tjelesne mase, HDL – lipoprotein velike gustoće, LDL – lipoprotein niske gustoće, rMEQ – kronotip, ESS – dnevna pospanost, M – medijan, IQR – interkvartilni raspon. *P vrijednosti za Mann-Whitney U test

Razlike u biokemijskim parametarima za AITD ovisno o negativnim ili pozitivnim anti-Tg prikazane su u **Tablici 37**. Ispitanici s negativnim anti-Tg imaju značajnije niže razine anti-TPO ($Z = -3,340$; $P = 0,001$) i TSH ($Z = -3,835$; $P < 0,001$) te značajnije više razine fT3 ($Z = -2,612$; $P = 0,009$) i fT4 ($Z = -3,712$; $P < 0,001$) od ispitanika s pozitivnim anti-Tg.

Tablica 37. Razlika u biokemijskim parametarima za AITD ovisno o anti-Tg (N = 115)

Varijable	anti-Tg≤115 kIU/L	anti-Tg>115 kIU/L	P
	(n = 28)	(n = 87)	
	M (IQR)	M (IQR)	
anti-TPO (kIU/L)	165,5 (96,5–268)	343 (144–800)	0,001
TSH (mU/L)	7,95 (6,53–10,59)	12,2 (8,9–17,6)	<0,001
fT3 (pmol/L)	5,9 (5–6,2)	5,3 (4,4–5,8)	0,009
fT4 (pmol/L)	17,4 (15,9–18,65)	14,9 (13,3–16,9)	<0,001

ITM – indeks tjelesne mase, anti-TPO – protutijela na tireoidnu peroksidazu, anti-Tg – tireoglobulinska protutijela, TSH – tireotropni hormon (tireotropin), fT3 – slobodni trijodtironin, fT4 – slobodni tiroksin, M – medijan, IQR – interkvartilni raspon. *P vrijednosti za Mann-Whitney U test.

Učestalost alela analiziranih polimorfizama gena *MTNR1B* u odnosu na negativna ili pozitivna anti-Tg kod ispitanika s Hashimotovom bolesti prikazana je u **Tablici 38**. Nije pronađena statistički značajna razlika između analiziranih polimorfizma gena *MTNR1B* ovisno o negativnim ili pozitivnim anti-Tg u populaciji ispitanika s Hashimotovom bolesti.

Tablica 38. Učestalost alela polimorfizama gena *MTNR1B* u odnosu na razinu anti-Tg (N = 115)

SNP	Rjeđi alel	anti-Tg≤115 kIU/L (n = 28)	anti-Tg>115 kIU/L (n = 87)	OR	95 % CI	P*
		Učestalost alela	Učestalost alela			
rs10830963	G	0,428	0,477	1,22	0,66–2,23	0,527
rs1387153	T	0,285	0,344	1,32	0,68–2,54	0,513
rs4753426	T	0,482	0,448	0,87	0,48–1,59	0,757

OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti.

Razlike u učestalosti genotipova istraživanih polimorfizama gena *MTNR1B* ovisno o prisutnosti anti-Tg prikazani su u **Tablici 39.** te nisu uočene značajne razlike.

Tablica 39. *MTNR1B* genotipovi u odnosu na razine anti-Tg (N = 115)

SNP	Genotip	anti-Tg ≤ 115 kIU/L (n = 28)	anti-Tg > 115 kIU/L (n = 87)	P
rs10830963	CC	16 (57,1 %)	45 (51,7 %)	0,652
	CG	-	1 (1,1 %)	
	GG	12 (42,9 %)	41 (47,1 %)	
rs1387153	CC	14 (50 %)	42 (48,3 %)	0,563
	CT	12 (42,9 %)	30 (34,5 %)	
	TT	2 (7,1 %)	15 (17,2 %)	
rs4753426	CC	7 (25 %)	28 (32,2 %)	0,646
	CT	15 (53,6 %)	40 (46 %)	
	TT	6 (21,4 %)	19 (21,8 %)	

Podaci su prikazani kao apsolutna i relativna učestalost. P vrijednosti za Mann-Whitney U test.

Učestalost kodominantnih, dominantnih i recesivnih modela genotipova između negativnih i pozitivnih anti-Tg prikazani su u **Tablici 40.**

Tablica 40. Modeli genotipova gena *MTNR1B* na temelju anti-Tg skupina

Modeli genotipova		rs10830963	rs1387153	rs4753426
Kodominantni model	P	0,68	0,35	0,73
	OR	0,82	1,20	1,50
	95 % CI	0,35–1,94	0,49–2,96	0,54–4,16
	AIC	132,9	131,6	133
Dominantni model	P	0,62	0,87	0,47
	OR	0,80	0,93	4,42
	95 % CI	0,34–1,90	0,40–2,19	0,54–3,74
	AIC	131,4	131,6	131,1
Recesivni model	P	0,69	0,16	0,96
	OR	0,84	0,37	0,98
	95 % CI	0,36–1,99	0,08–1,73	0,35–2,75
	AIC	131,5	129,7	131,7

OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti, AIC – engl. *Akaike information criterion*.

Napravljen je binarni logistički regresijski model za procjenu neovisnog učinka izabranih polimorfizma nakon prilagodbe za čimbenike rizika na temelju pozitivnih anti-Tg pri čemu su negativni anti-Tg bili referentna kategorija. Model je pokazao značajnu negativnu povezanost pozitivnih anti-Tg s kronotipom ($P = 0,021$; $OR = 0,72$; 95 % CI 0,55–0,95) što je prikazano u **Tablici 41**. Nagelkerke R^2 za navedeni model iznosio je 0,377, dok su se VIF čimbenici kretali od 1,070 do 3,888. Na temelju VIF čimbenika nije utvrđena multikolinearnost između pozitivnih anti-Tg i drugih varijabli u modelu te multikolinearnost ne utječe na tumačenje regresijskog modela.

Tablica 41. Omjeri izgleda za ispitanike s pozitivnim anti-Tg prilagođeni za čimbenike rizika uključene u binarni logistički regresijski model.

Čimbenici	Beta	SE	OR (95% CI)	P
Dob (godine)	0,037	0,024	1,04 (0,99 – 1,09)	0,121
ITM (kg/m ²)	-0,085	0,060	0,92 (0,82 – 1,03)	0,155
TSH (mU/L)	0,059	0,110	1,06 (0,86 – 1,32)	0,591
fT3 (pmol/L)	-0,201	0,480	0,82 (0,32 – 2,10)	0,675
fT4 (pmol/L)	-0,379	0,227	0,68 (0,44 – 1,07)	0,095
LT4 terapija	-0,055	0,597	0,95 (0,29 – 3,05)	0,927
Kolesterol (mmol/L)	0,542	0,421	1,72 (0,75 – 3,93)	0,199
Trigliceridi (mmol/L)	-0,340	0,274	0,71 (0,42 – 1,22)	0,216
HDL (mmol/L)	0,100	0,180	1,10 (0,78 – 1,57)	0,580
LDL (mmol/L)	-0,354	0,371	0,70 (0,34 – 1,45)	0,340
Željezo (μmol/L)	0,009	0,042	1,01 (0,93 – 1,09)	0,829
Vitamin D (nmol/L)	-0,014	0,013	0,99 (0,96 – 1,01)	0,270
rMEQ	-0,324	0,140	0,72 (0,55 – 0,95)	0,021
ESS	0,032	0,067	1,03 (0,91 – 1,18)	0,634
rs10830963 (CC)	-0,945	1,189	0,39 (0,04 – 3,99)	0,427
rs10830963 (CG)	2,028	4,019	0 (0)	1,00
rs1387153 (CC)	-0,454	1,442	0,64 (0,04 – 10,73)	0,753
rs1387153 (CT)	-1,470	1,082	0,23 (0,03 – 1,92)	0,174
rs4753426 (CC)	-0,431	0,960	0,65 (0,10 – 4,27)	0,654
rs4753426 (CT)	0,015	0,790	1,01 (0,22 – 4,77)	0,985

SE – standardna greška, OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti.

Analizirani su haplotipovi između skupina ovisno o negativnim i pozitivnim anti-Tg. Učestalosti predviđenih haplotipova prikazane su u **Tablici 42**. Usporedbom četiri najčešća haplotipa između ispitanika s negativnim i pozitivnim anti-Tg nije pronađena značajna razlika.

Tablica 42. Učestalost i raspodjela mogućih haplotipova gena *MTNR1B* na temelju negativnih/pozitivnih anti-Tg

rs10830963	rs1387153	rs4753426	Učestalost anti-Tg $\leq$ 115 kIU/L	Učestalost anti-Tg $>$ 115 kIU/L	OR (95 % CI)	P
G	T	C	0,23	0,29	0,73 (0,29–1,82)	0,501
C	C	C	0,23	0,19	1,29 (0,56–2,95)	0,556
G	C	T	0,14	0,09	2,63 (0,77–9,02)	0,130
G	C	C	0,05	0,06	1,45 (0,31–6,68)	0,640

OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti.

4.6. Razlike u polimorfizmima gena *MTNR1B* na temelju ITM-a

Na temelju ITM-a, ispitanici su podijeljeni u dvije kategorije – jednu skupinu su činili ispitanici s normalnim ITM-om ($\leq 25 \text{ kg/m}^2$), dok se druga skupina sastojala od ispitanika s prekomjernom tjelesnom masom i pretilih osoba s ITM-om većim od 25 kg/m^2 (Tablica 43). Nisu zapažene značajne razlike na temelju kategorija ITM-a u rizičnim čimbenicima za Hashimotovu bolest.

Tablica 43. Povezanosti čimbenika rizika za AITD ovisno o ITM-u (N = 115)

Varijable	ITM $\leq$ 25 (n = 64)	ITM $>$ 25 (n = 51)	P
	M $\pm$ SD	M $\pm$ SD	
Spol (žene, N, %)	59 (92,2 %)	47 (92,2 %)	0,995
LT4	40 (62,5 %)	31 (60,8 %)	0,851
Dob (godine)	42,16 $\pm$ 12,61	43,08 $\pm$ 11,15	0,513
Kolesterol (mmol/L)	5,31 $\pm$ 1,02	5,34 $\pm$ 1,16	0,924
Trigliceridi (mmol/L)	1,42 $\pm$ 1,07	1,34 $\pm$ 0,74	0,695
HDL (mmol/L)	1,84 $\pm$ 1,38	1,70 $\pm$ 1,23	0,353
LDL (mmol/L)	2,44 $\pm$ 1,01	2,42 $\pm$ 1,28	0,524
Željezo (μ mol/L)	15,76 $\pm$ 6,59	13,76 $\pm$ 7,29	0,108
Vitamin D (nmol/L)	58,83 $\pm$ 23,33	62,98 $\pm$ 21,31	0,289
rMEQ	12,38 $\pm$ 1,94	11,96 $\pm$ 2,23	0,378
ESS	7,92 $\pm$ 4,72	8,89 $\pm$ 4,15	0,217

LT4 – levotiroksin, ITM – indeks tjelesne mase, HDL – lipoprotein velike gustoće, LDL – lipoprotein niske gustoće, rMEQ – kronotip, ESS – dnevna pospanost, M – srednja vrijednost, SD – standardno raspršenje. *P vrijednosti za Mann-Whitney U test

Razlike u biokemijskim parametarima za AITD na temelju kategorija ITM-a prikazane su u **Tablici 44**. Ispitanici s ITM-om većim od 25 kg/m² imaju granično značajno niže razine fT4 (Z = -1,616; P = 0,050) od ispitanika s normalnim ITM-om.

Tablica 44. Razlike u biokemijskim parametarima za AITD ovisno o ITM-u (N = 115)

Varijable	ITM $\leq$ 25 (n = 64)	ITM>25 (n = 51)	P
	M $\pm$ SD	M $\pm$ SD	
anti-TPO (klU/L)	403,04 $\pm$ 372,79	468,44 $\pm$ 512,07	0,987
anti-Tg (klU/L)	221,18 $\pm$ 175,15	252,58 $\pm$ 215,89	0,719
TSH (mU/L)	12,43 $\pm$ 6,84	14,28 $\pm$ 8,29	0,106
fT3 (pmol/L)	5,31 $\pm$ 0,72	5,27 $\pm$ 0,88	0,841
fT4 (pmol/L)	15,90 $\pm$ 2,40	15,05 $\pm$ 2,55	0,050

ITM – indeks tjelesne mase, anti-TPO – protutijela na tireoidnu peroksidazu, anti-Tg – tireoglobulinska protutijela, TSH – tireotropni hormon (tireotropin), fT3 – slobodni trijodtironin, fT4 – slobodni tiroksin, M – srednja vrijednost, SD – standardno raspršenje. *P vrijednosti za Mann-Whitney U test.

Učestalosti i razlike u alelima analiziranih polimorfizama gena *MTNR1B* u odnosu na ITM kod ispitanika s Hashimotovom bolesti prikazane su u **Tablici 45**. Alel G polimorfizma rs10830963 značajno je češći u osoba s ITM-om većim od 25 kg/m² te postoji statistički značajna razlika u frekvenciji polimorfizma rs10830963 gena *MTNR1B* ovisno o ITM ($\chi^2 = 5,173$; OR = 1,84; 95 % CI 1,09–3,11; P = 0,022). Frekvencije polimorfizmama rs1387153 i rs4753426 nisu se razlikovale s obzirom na kategoriju ITM-a u populaciji ispitanika s Hashimotovom bolesti.

Tablica 45. Učestalost alela polimorfizama gena *MTNR1B* u odnosu na ITM (N = 115)

SNP	Rjeđi alel	ITM $\leq$ 25 (n = 64)	ITM>25 (n = 51)	OR	95 % CI	P
		Učestalost alela	Učestalost alela			
rs10830963	G	0,398	0,549	1,84	1,09–3,11	0,022
rs1387153	T	0,32	0,343	1,11	0,64–1,93	0,714
rs4753426	T	0,484	0,421	0,78	0,46–1,31	0,342

OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti.

Odnosi između učestalosti genotipova istraživanih varijanti gena *MTNR1B* i kategorija ITM-a prikazani su u **Tablici 46**. Nije uočena značajna razlika između kategorija ITM i genotipova analiziranih polimorfizama.

Tablica 46. *MTNR1B* genotipovi u odnosu na ITM (N = 115)

SNP	Genotip	ITM ≤ 25 (n = 64)	ITM > 25 (n = 51)	P
rs10830963	CC	38 (59,4 %)	23 (45,1 %)	0,179
	CG	1 (1,6 %)	-	
	GG	25 (39,1 %)	28 (54,9 %)	
rs1387153	CC	32 (50 %)	24 (47,1 %)	0,944
	CT	23 (35,9 %)	19 (37,3 %)	
	TT	9 (14,1 %)	8 (15,7 %)	
rs4753426	CC	18 (28,1 %)	17 (33,3 %)	0,610
	CT	30 (46,9 %)	25 (49 %)	
	TT	16 (25 %)	9 (17,6 %)	

Podaci su prikazani kao apsolutna i relativna učestalost. P vrijednosti chi-kvadrat testa.

Učestalosti kodominantnih, dominantnih i recesivnih modela genotipova između ispitanika s ITM-om jednakim ili manjim od 25 kg/m² u odnosu na one s ITM-om većim od 25 kg/m² prikazane su u **Tablici 47**.

Tablica 47. Modeli genotipova gena *MTNR1B* na temelju ITM kategorija

Modeli genotipova		rs10830963	rs1387153	rs4753426
Kodominantni model	P	0,15	0,94	0,61
	OR	0,54	0,84	1,68
	95 % CI	0,26–1,14	0,28–2,51	0,59–4,81
	AIC	160,1	163,8	163
Dominantni model	P	0,13	0,75	0,55
	OR	0,56	0,89	1,28
	95 % CI	0,27–1,18	0,43–1,86	0,58–2,84
	AIC	159,6	161,9	161,6
Recesivni model	P	0,09	0,81	0,34
	OR	0,53	0,88	1,56
	95 % CI	0,25–1,11	0,31–2,03	0,62–3,89
	AIC	159,1	161,9	161

OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti, AIC – engl. *Akaike information criterion*.

Analizirani su haplotipovi na temelju ITM kategorija. Učestalost predviđenih haplotipova prikazana je u **Tablici 48**. Usporedbom četiri najčešća haplotipa između ispitanika normalnog i povećanog ITM-a nije pronađena statistički značajna razlika.

Tablica 48. Učestalost i raspodjela mogućih haplotipova gena *MTNR1B* na temelju kategorija

ITM-a			Učestalost ITM $\leq$ 25	Učestalost ITM>25	OR (95 % CI)	P
rs10830963	rs1387153	rs4753426				
C	C	T	0,26	0,34	0,71 (0,40–1,26)	0,243
G	C	T	0,14	0,09	1,69 (0,73–3,91)	0,214
G	T	C	0,32	0,25	1,43 (0,81–2,55)	0,218
C	C	C	0,19	0,21	0,86 (0,44–1,65)	0,642

OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti.

Napravljen je binarni logistički regresijski model za procjenu neovisnog učinka izabranih polimorfizma nakon prilagodbe za čimbenike rizika na temelju dvije kategorije ITM-a uz normalan ITM kao referentnu kategoriju. Polimorfizam rs10830963, genotip GG, povezan je s povećanim rizikom od višeg ITM-a ($P = 0,031$; OR = 2,35; 95 % CI 1,08–5,09). Nadalje, model logističke regresije pokazao je da ispitanici s povećanim ITM-om imaju značajno niže razine fT4 ($P = 0,030$; OR = 0,79; 95 % CI 0,64–0,98), kao što je prikazano u **Tablici 49**. Nagelkerke R^2 za navedeni model iznosio je 0,178, a VIF čimbenici od 1,022 do 3,664 što znači da ne postoji multikolinearnost između ITM-a $> 25 \text{ kg/m}^2$ i drugih varijabli uključenih u model te multikolinearnost ne utječe na tumačenje rezultata regresijskog modela.

Tablica 49. Omjeri izgleda za ispitanike s prekomjernom tjelesnom težinom/pretilošću prilagođeni za čimbenike rizika uključene u binarni logistički regresijski model.

Čimbenici	Beta	SE	OR (95% CI)	P
Dob (godine)	0,005	0,018	1,01 (0,91–1,04)	0,717
TSH (mU/L)	0,009	0,063	0,99 (0,91–1,09)	0,877
fT3 (pmol/L)	0,296	0,332	1,44 (0,74–2,84)	0,287
fT4 (pmol/L)	-0,210	0,106	0,79 (0,64–0,98)	0,030
Kolesterol (mmol/L)	-0,066	0,300	0,93 (0,52–1,67)	0,808
Trigliceridi (mmol/L)	-0,121	0,236	0,89 (0,56–1,41)	0,614
HDL (mmol/L)	-0,136	0,185	0,86 (0,61–1,25)	0,466
LDL (mmol/L)	0,094	0,285	1,11 (0,64–1,93)	0,705
Željezo (μmol/L)	-0,045	0,032	0,86 (0,89–1,02)	0,162
Vitamin D (nmol/L)	0,010	0,010	1,01 (0,99–1,03)	0,310
rs10830963 (GG)	0,879	0,405	2,35 (1,08–5,09)	0,031
rs10830963 (CG)	2,182	4,019	0 (0)	1,00
rs1387153 (TT)	-0,715	0,510	0,49 (0,18 – 1,33)	0,161
rs1387153 (CT)	0,051	0,712	1,05 (0,26 – 4,25)	0,942
rs4753426 (TT)	-0,068	0,319	0,93 (0,50 – 1,74)	0,831
rs4753426 (CT)	0,015	0,657	1,02 (0,28 – 3,68)	0,812

SE – standradna greška, OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti.

4.7. Razlike u polimorfizmima gena *MTNR1B* na temelju primjene nadomjesne hormonske terapije s LT4

Na temelju primjene nadomjesne hormonske terapije s LT4 ispitanici su podijeljeni u dvije kategorije – jednu skupinu činili su ispitanici koji nisu uzimali terapiju (bez LT4), dok su drugu skupinu činili ispitanici koji su uzimali terapiju (s LT4). Razlike u čimbenicima rizika za AITD ovisno o primjeni LT4 prikazane su u **Tablici 50** te nisu uočene značajne razlike.

Tablica 50. Razlike u čimbenicima rizika za AITD ovisno o primjeni LT4 (N = 115)

Varijable	Ne LT4 (n = 44)	Da LT4 (n = 71)	P
	M (IQR)	M (IQR)	
Spol (žene, N, %)	41 (93,2 %)	65 (91,5 %)	0,752
Dob (godine)	41 (36,25–53,75)	41 (32–48)	0,260
ITM	24,62 (22,34–28,61)	24,2 (21,87–28,81)	0,536
Kolesterol (mmol/L)	5,45 (4,45–6)	5,4 (4,4–6)	0,920
Trigliceridi (mmol/L)	1,35 (0,83–1,6)	1,2 (1–1,6)	0,612
HDL (mmol/L)	1,6 (1,3–1,9)	1,5 (1,3–1,8)	0,650
LDL (mmol/L)	2,15 (1,45–2,9)	2,3 (1,7–3,1)	0,685
Željezo (μmol/L)	13,85 (9–20,75)	15 (9–22)	0,372
Vitamin D (nmol/L)	56,5 (44,75–70,9)	58 (43–80,8)	0,745
rMEQ	13 (10–14)	12 (11–13)	0,798
ESS	8 (5,25–13)	8 (5–11)	0,296

LT4 – levotiroksin, ITM – indeks tjelesne mase, HDL – lipoprotein velike gustoće, LDL – lipoprotein niske gustoće, rMEQ – kronotip, ESS – dnevna pospanost, M – medijan, IQR – interkvartilni raspon. P vrijednosti za Mann-Whitney U test

Razlike u biokemijskim parametarima za AITD ovisno o primjeni LT4 prikazane su u **Tablici 51**. Značajne razlike nisu zapažene ni za jedan od mjerenih parametara.

Tablica 51. Razlike u biokemijskim parametarima za AITD ovisno o primjeni LT4 (N = 115)

Varijable	Ne LT4 (n = 44)	Da LT4 (n = 71)	P
	M (IQR)	M (IQR)	
anti-TPO (klU/L)	237,2 (147,63–590,38)	300,8 (110–600,5)	0,769
anti-Tg (klU/L)	152,75 (100,5–108,98)	190 (120–300,5)	0,210
TSH (mU/L)	9,9 (7,4–14,45)	11,6 (8,7–17,2)	0,092
fT3 (pmol/L)	5,55 (4,75–6,08)	5,4 (4,5–5,8)	0,172
fT4 (pmol/L)	15,8 (13,95–18,3)	15,6 (13,6–17,1)	0,265

LT4 – levotiroksin, M – medijan, IQR – interkvartilni raspon, anti-TPO – protutijela na tireoidnu peroksidazu, anti-Tg – tireoglobulinska protutijela, TSH – tireotropni hormon (tireotropin), fT3 – slobodni trijodtironin, fT4 – slobodni tiroksin. P vrijednosti za Mann-Whitney U test.

Učestalosti i razlike u alelima analiziranih polimorfizama gena *MTNR1B* u odnosu na primjenu LT4 kod ispitanika s Hashimotovom bolesti prikazane su u **Tablici 52**. Alel G polimorfizma rs10830963 značajnije je rjeđe zastupljen u ispitanika na terapiji s LT4.

Tablica 52. Učestalost alela polimorfizama gena *MTNR1B* u odnosu na primjenu LT4 (N = 115)

SNP	Rjeđi alel	Ne LT4 (n = 44)	Da LT4 (n = 71)	OR	95 % CI	P
		Učestalost alela	Učestalost alela			
rs10830963	G	0,568	0,401	1,96	1,14–3,36	0,014
rs1387153	T	0,352	0,317	0,85	0,49–1,49	0,579
rs4753426	T	0,455	0,458	1,01	0,59–1,73	0,962

OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti.

Razlike u učestalosti genotipova istraživanih polimorfizama gena *MTNR1B* i primjeni nadomjesne hormonske terapije s LT4 prikazani su u **Tablici 53** pri čemu nisu uočene značajne razlike.

Tablica 53. *MTNR1B* genotipovi u odnosu na nadomjesnu hormonsku terapiju s LT4
(N = 115)

SNP	Genotip	Ne LT4 (n = 44)	Da LT4 (n = 71)	P
rs10830963	CC	19 (43,2 %)	42 (59,2 %)	0,156
	CG	-	1 (1,4 %)	
	GG	25 (56,8 %)	28 (39,4 %)	
rs1387153	CC	18 (40,9 %)	38 (53,5 %)	0,142
	CT	21 (47,7 %)	21 (29,6 %)	
	TT	5 (11,4 %)	12 (16,9 %)	
rs4753426	CC	13 (29,5 %)	22 (31 %)	0,931
	CT	22 (50 %)	33 (46,5 %)	
	TT	9 (20,5 %)	16 (22,5 %)	

Podaci su prikazani kao apsolutna i relativna učestalost. P vrijednosti za Mann-Whitney U test.

Učestalosti kodominantnih, dominantnih i recesivnih modela genotipova u odnosu na primjenu LT4 prikazane su u **Tablici 54**.

Tablica 54. Modeli genotipova gena *MTNR1B* u odnosu na primjenu LT4

Modeli genotipova		rs10830963	rs1387153	rs4753426
Kodominantni model	P	0,13	0,14	0,93
	OR	1,97	0,88	0,95
	95 % CI	0,92–4,24	0,27–2,88	0,33–2,77
	AIC	155	155,2	158,9
Dominantni model	P	0,095	0,19	0,87
	OR	1,91	1,66	1,07
	95 % CI	0,89–4,08	0,78–3,56	0,47–2,43
	AIC	154,2	155,3	157
Recesivni model	P	0,069	0,41	0,79
	OR	2,02	0,63	0,88
	95 % CI	0,94–4,33	0,21–1,93	0,35–2,22
	AIC	153,7	156,3	157

OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti, AIC – engl. *Akaike information criterion*.

Napravljen je binarni logistički regresijski model za procjenu neovisnog učinka izabranih polimorfizma nakon prilagodbe za čimbenike rizika na temelju primjene nadomjesne hormonske terapije s LT4 (**Tablica 55**). Genotip GG polimorfizma rs10830963 negativno je povezan s primjenom LT4 ($P = 0,036$; $OR = 0,43$; 95 % CI 0,19–0,95). Nadalje, model logističke regresije pokazao je da ispitanici na terapiji s LT4 imaju granično značajno više razine željeza ($P = 0,050$; $OR = 1,07$; 95 % CI 1,00–1,14) te značajno manju dnevnu pospanost ($P = 0,038$; $OR = 0,90$; 95 % CI 0,81–0,99).

Tablica 55. Omjeri izgleda za ispitanike na terapiji s LT4 prilagođeni za čimbenike rizika uključene u binarni logistički regresijski model.

Čimbenici	Beta	SE	OR (95% CI)	P
Dob (godine)	-0,025	0,019	0,98 (0,91 – 1,01)	0,189
BMI	0,023	0,046	1,02 (0,93 – 1,12)	0,626
TSH (mU/L)	-0,029	0,054	0,97 (0,87 – 1,08)	0,591
fT3 (pmol/L)	-0,437	0,374	0,65 (0,31 – 1,35)	0,243
fT4 (pmol/L)	-0,087	0,166	0,92 (0,66 – 1,27)	0,598
Kolesterol (mmol/L)	0,026	0,307	1,03 (0,56 – 1,88)	0,932
Trigliceridi (mmol/L)	-0,140	0,241	0,87 (0,54 – 1,39)	0,560
HDL (mmol/L)	0,290	0,274	1,34 (0,78 – 2,29)	0,291
LDL (mmol/L)	-0,037	0,290	0,96 (0,55 – 1,70)	0,899
Željezo (μmol/L)	0,066	0,034	1,07 (1,00 – 1,14)	0,050
Vitamin D (nmol/L)	0,008	0,010	1,01 (0,99 – 1,03)	0,445
rMEQ	-0,033	0,105	0,97 (0,79 – 1,19)	0,752
ESS	-0,110	0,053	0,90 (0,81 – 0,99)	0,038
rs10830963 (GG)	-0,846	0,404	0,43 (0,19 – 0,95)	0,036
rs10830963 (CG)	2,131	4,019	0 (0)	1,00
rs1387153 (TT)	0,710	0,569	2,03 (0,67 – 6,20)	0,213
rs1387153 (CT)	-0,814	0,754	0,44 (0,10 – 1,94)	0,280
rs4753426 (TT)	-0,367	0,368	0,69 (0,34 – 1,43)	0,318
rs4753426 (CT)	0,627	0,639	1,87 (0,54 – 6,56)	0,327

SE – standardna greška, OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti.

Za navedeni model VIF čimbenici iznosili su od 1,059 do 3,881 što znači da ne postoji multikolinearnost između primjene terapije s LT4 i bilo koje druge varijable u modelu te multikolinearnost ne utječe na tumačenje rezultata modela. Nagelkerke R^2 za navedeni model iznosio je 0,195.

Analizirani su haplotipovi između ispitanika koji primjenjuju i neprimjenjuju nadomjesnu terapiju s LT4. Usporedbom četiri najčešća haplotipa između ispitanika ovisno o primjeni LT4 pronađena je statistički značajna razlika u GCT haplotipu koji je puno učestaliji u ispitanika koji ne primjenjuju nadomjesnu terapiju ($P = 0,009$; OR 4,47; 95 % CI 1,48 – 13,48) (Tablica 56).

Tablica 56. Učestalost i raspodjela mogućih haplotipova gena *MTNR1B* na temelju primjene LT4

rs10830963	rs1387153	rs4753426	Učestalost bez LT4	Učestalost uz LT4	OR (95 % CI)	P
G	T	C	0,32	0,25	0,76 (0,42–1,35)	0,368
C	C	C	0,17	0,22	1,36 (0,69–2,69)	0,402
G	C	T	0,18	0,06	0,30 (0,13–0,72)	0,009
G	C	C	0,06	0,05	0,99 (0,31–3,13)	0,987

OR – omjer izgleda, CI – interval pouzdanosti.

5. RASPRAVA

Melatonin je hormon koji proizvodi epifiza, a posjeduje imunomodulirajuća svojstva te utječe na brojne fiziološke procese putem cirkadijanog ritma [248]. Poremećaji u signalnom putu melatonina, potencijalno zbog polimorfizama u genima za receptore melatonina, mogu doprinijeti disregulaciji imunološkog sustava uočenoj kod Hashimotove bolesti [176,177]. Navedeno upućuje na to da treba dodatno istražiti kako cirkadijani ritam posredstvom hormona melatonina i njegovih receptora (MTNR1A i MTNR1B) utječe na AITD, ali i potencijalno štetne promjene cirkadijanog ritma. Razumijevanje genetskih čimbenika koji utječu na funkciju receptora melatonina moglo bi pružiti vrijedan uvid u temeljne mehanizme koji pokreću razvoj ovog autoimunog stanja. Iz dosadašnje literature vidljivo je da nisu provedena istraživanja koja bi pokazala jesu li polimorfizmi gena za receptor melatonina povezani s Hashimotovom bolesti, niti kako su povezani s cirkadijanim fenotipovima – kronotipom i dnevnom pospanošću kod pacijenata s Hashimotovom bolesti.

Predmetno istraživanje provedeno je kao istraživanje povezanosti genotipa i fenotipa, kako bi se odredilo koji su polimorfizmi gena za receptor melatonina (*MTNR1B*) povezani s cirkadijanim fenotipom u oboljelih od Hashimotove bolesti. Rezultati dobiveni ovim istraživanjem napravljenim na populaciji bolesnika s Hashimotovom bolesti podijeljenih u različite skupine na temelju cirkadijanih fenotipova, anti-Tg, primjene LT4 i indeksa tjelesne mase, pokazuju da su neki polimorfizmi gena *MTNR1B* receptora za melatonin povezani s dnevnom pospanošću, ITM-om i nadomjesnom terapijom s LT4. Nije pronađena povezanost između različitih kronotipova i Hashimotove bolesti, ali je pokazano kako su neki od analiziranih polimorfizama gena *MTNR1B* povezani s biokemijskim parametrima kao što su anti-Tg i fT3. Također, određeni biokemijski parametri povezani su s kronotipom i dnevnom pospanošću osoba s Hashimotovom bolesti, a među njima su anti-Tg, TSH i fT3. S druge strane, nisu pronađeni dokazi koji podupiru povezanost polimorfizma rs4753426 i rizičnih čimbenika za Hashimotovu bolest, ali su zato analizirani polimorfizmi rs10830963 i rs1387153 povezani s rizičnim čimbenicima za Hashimotovu bolest.

Identifikacija specifičnih polimorfizama povezanih s Hashimotovom bolesti mogla bi imati važne implikacije za prevenciju bolesti, ranu dijagnozu i personalizirane pristupe liječenju. Razumijevanjem genetske podloge Hashimotove bolesti, kliničari bi mogli razviti ciljane terapije ili preventivne strategije koje se bave disregulacijom signalnog puta melatonina.

5.1. Povezanost polimorfizama gena *MTNR1B* s kronotipom i dnevnom pospanošću

Kronotip je pod utjecajem složene interakcije gena, hormona (poput melatonina i kortizola) i vanjskih čimbenika. Epidemiološke studije pokazale su da kronični cirkadijani poremećaj ima dugoročne posljedice za ljudsko zdravlje i važan je čimbenik načina života koji pridonosi riziku od razvoja pretilosti, dijabetesa, raka i kardiovaskularnih bolesti [1,249,250]. Ovim istraživanjem nije pronađena povezanost između analiziranih polimorfizama gena *MTNR1B* i kronotipa kod osoba s Hashimotovom bolesti, no to ne znači da ona ne postoji. Međutim, polimorfizam rs10830963 gena *MTNR1B* bio je povezan s dnevnim pospanošću kod osoba s Hashimotovom bolesti, dok je model logističke regresije pokazao da je genotip CT polimorfizma rs1387153 povezan s povećanom dnevnim pospanosti.

Arosemena i suradnici pokazali su kako su jutarnji kronotipovi značajno češći u žena s hipotireozom [203], dok Wanga i suradnici nisu uočili značajnu povezanost između dnevne pospanosti i hipotireoze s autoimunom etiologijom [224]. Navedene razlike mogu se pripisati korištenju različitih upitnika za određivanje kronotipa, MTCQ nasuprot MEQ, ili pak drugačijim kriterijima za uključivanje i isključivanje ispitanika iz istraživanja, kao što su smjenski rad, apneja u snu i drugi. Također, važno je napomenuti da je određena kombinacija polimorfizama različitih gena više povezana s kronotipom nego pojedinačni polimorfizmi [251]. Bez obzira na kronotip, pojedinac može imati poremećaje sna i pospanosti, što znači da bi polimorfizmi gena *MTNR1B* mogli biti povezani sa kvalitetom sna, ali ne nužno i sa vremenskim obrascem spavanja i budnosti, odnosno kronotipom. Kod osoba s Hashimotovom bolesti moguća je veća prevalencija večernjih kronotipova zbog toga što hipotireoza može uzrokovati umor i smanjenu razinu energije tijekom dana, a potencijalno bolju budnost navečer [252]. To može biti povezano s izmijenjenom hormonalnom regulacijom zbog autoimune reakcije. U ovom istraživanju kod osoba s Hashimotovom bolesti prevladao je intermedijarni kronotip (60,9 %), dok je večernji bio zastupljen s 38,3 %, a jutarnji je bio najmanje zastupljen sa svega 0,9 %, te dobivena raspodjela kronotipova u ovom istraživanju može utjecati na dobivene rezultate. Međutim, istraživanje provedeno samo na ženama s hipotireozom pokazalo je da je jutarnji kronotip značajno zastupljeniji s čak 56 % [203].

Osim navedene raspodjele kronotipova, polimorfizmi rs10830963, rs1387153 i rs4753426 gena *MTNR1B* mogu utjecati na funkciju melatoninskog receptora, ali ne moraju imati snažan utjecaj na biološki sat koji određuje kronotip. Kronotip je složeni fenomen koji je pod utjecajem više

gena i okolišnih čimbenika kao što su dužina izlaganja svjetlosti, radno vrijeme i navike spavanja [253], dok ovi polimorfizmi možda više utječu na metabolizam ili na signalni put melatonina [254], ali ne i na preferenciju vremena spavanja i budnosti. Međutim, nosioci G alela rs10830963 mogli bi imati velike koristi od prilagodbe svog načina života tako da zbog posla i društvenih obaveza nisu prisiljeni doručkovati rano ujutro, kada su im razine melatonina još uvijek visoke [255]. Naime, odgođen jutarnji pad melatonina, te pomak u lučenju melatonina prema kasnijem porastu navečer kod nositelja alela G rs10830963 mogao bi biti povezan s kronotipom i spavanjem [254]. Istraživanje Vejraskova i suradnika provedeno na općoj populaciji pokazalo je da nema povezanosti između rs10830963 gena *MTNR1B* i kronotipa [254]. Specifični polimorfizmi gena *MTNR1B* mogu imati ulogu u signalnom putu melatonina preko receptora za melatonin, ali vjerojatno nisu glavni čimbenici koji određuju hoće li osoba biti jutarnji ili večernji tip. Drugi geni i čimbenici možda imaju veći utjecaj na kronotip. Rezultati pokazuju da polimorfizmi rs10830963, rs1387153 i rs4753426 nisu povezani s kronotipom kod osoba s Hashimotovom bolesti te da ti polimorfizmi više utječu na specifične aspekte kvalitete sna (kao što su dnevna pospanost ili problemi sa spavanjem), nego na preferenciju vremena kada osoba prirodno želi biti budna ili spavati, odnosno kronotipom. Kronotip pojedinca utječe na ekspresiju mnogih gena, ali i razine melatonina. Potencijalnu ulogu cirkadijanog poremećaja u napredovanju AITD još treba detaljno istražiti te pružiti mogućnost za ublažavanje AITD sa stajališta kronomedicine [7].

Također, kod Hashimotove bolesti upalni procesi su česti, te mogu pokrenuti začarani krug imunološkog odgovora i poremetiti cirkadijani ritam [256–258]. Vanjski čimbenici okoliša, kao što je poremećaj svjetla, te intervencije povezane s imunološkim sustavom mogu utjecati na cirkadijani ritam ekspresije gena u štitnoj žlijezdi što može biti povezano s kronotipom [7]. Istraživanje provedeno na populaciji 1097 Finaca s kronotipom određenim rMEQ upitnikom i praćenih tijekom sedam godina pokazalo je da su žene večernjeg kronotipa imale značajno veći porast tjelesne mase i ITM-a u odnosu na žene jutarnjeg kronotipa [259]. Žene večernjeg kronotipa bile su sklonije povećanju antropometrijskih obilježja, što su autori djelomično objasnili depresijom. Slično je opaženo kod pacijenata s hipotireozom i intermedijarnim/večernjim kronotipom [203]. Međutim, rezultati ovog istraživanja ne ukazuju na povezanost kronotipa s ITM, te nije uočena razlika u ITM-u temeljem kategorija kronotipa oboljelih od Hashimotove bolesti. Unatoč temeljitoj analizi, nikakav učinak analiziranih polimorfizama gena *MTNR1B* na kronotip nije bio očit.

Mendelova studija randomizacije provedena na 452 071 osobi iz UK Biobank baze nije uočila značajnu vezu između hipotireoze i dnevne pospanosti kao ni dnevnog drijemanja [224]. Povećani poremećaji spavanja zapaženi su kod osoba sa subkliničkom hipotireozom [210], dok je u ovom istraživanju većina oboljelih imala normalnu dnevnu pospanost (71,3 %), no ona je bila povezana s polimorfizmom rs108309630 gena *MTNR1B*, dok navedeni polimorfizam nije bio povezan s obrascima spavanja u općoj populaciji u Češkoj [254,260]. Upravo taj polimorfizam rs10830963 može djelovati na funkcionalnost melatoninskog receptora i time može promijeniti kako tijelo reagira na melatonin. Ovaj polimorfizam može pogoršati disfunkciju melatoninskih receptora, što remeti prirodni ritam spavanja. Navedeni polimorfizam povezan je sa disbalansom u metabolizmu glukoze i inzulinske osjetljivosti, što može neizravno utjecati na osjećaj umora. Tako, rjeđi alel G povećava izražaj receptora za melatonin u gušterači što dovodi do pojačanog signaliziranja melatonina i povećava rizik od dijabetesa tipa 2 [261], te je dijabetes povezan s prekomjernom dnevnom pospanošću [262]. Rizični alel G rs10830963 *MTNR1B* utječe na dinamiku lučenja melatonina, te može produžiti trajanje endogene proizvodnje melatonina kasnije ujutro tako da ranije vrijeme spavanja u kombinaciji s alelom G može povećati rizik od dijabetesa u usporedbi s kasnijim vremenom spavanja [255]. Isto tako su AITD povezane s dijabetesom tipa 2 [263]. Oslabljena funkcija melatoninskog receptora zbog polimorfizma rs10830963 mogla bi dodatno pojačati ove simptome, jer poremećen cirkadijani ritam može doprinijeti kroničnom umoru, poremećenom spavanju i dnevnoj pospanosti kod ovih osoba. Osim navedenog, melatonin ima važnu ulogu u imunomodulaciji i smanjenju učinaka citokinske oluje povezane s njegovom upotrebom za poboljšanje sna [132].

Genotip CT polimorfizma rs1387153 povezan je s povećanom dnevnom pospanosti u osoba s Hashimotovom bolesti u ovom istraživanju. Rezultati meta-analize pokazali su da je kratko i dugo trajanje spavanja u interakciji s polimorfizmom rs1387153 gena *MTNR1B*. Dodatno, pokazano je da je viši ITM u interakciji s kratkim i dugim trajanjem sna kod nositelja alela T rs1387153 [264]. Ova interakcija pruža dodatnu potporu za potencijalnu ulogu trajanja sna i pospanosti u modificiranje povezanosti između polimorfizama povezanih s cirkadijanim i kardiometaboličkim ishodima [265] te važnosti normalnog trajanja sna od sedam do devet sati za optimalno zdravlje. Iako u ovom istraživanju nije uočena povezanost polimorfizma rs1387153 s ITM-om, visoka učestalost rizičnog alela T među pojedincima europskog podrijetla (učestalost rjeđeg alela prema HapMap za europsku populaciju je 0,28, dok je u ovom

istraživanju 0,33), zahtijeva daljnje istraživanje ove povezanosti i ispitivanje potencijalne uloge većeg broja alela T na dnevnu pospanost.

Funkcija štitne žlijezde usko je povezana sa sezonskim ritmovima koji uključuju promjene u raspoloženju, imunološkoj funkciji, trajanju i amplitudi lučenja melatonina, endokrinoj funkciji i ekspresiji gena [1,266,267]. Tako je ovo istraživanje pokazalo da je haplotip GCC, odnosno kombinacija alela polimorfizama rs10830963, rs1387153 i rs4753426 gena *MTNR1B*, povezan s povećanom dnevnom pospanošću na temelju samoprocjene putem Epworthove skale pospanosti, a najvjerojatnije zbog njegovog utjecaja na funkciju melatoninskih receptora i na cirkadijani ritam. Već je spomenuto da je alel G rs10830963 povezan s inzulinskom rezistencijom i većim osjećajem umora i pospanosti, dok sam haplotip može oslabiti funkciju melatoninskog receptora, što dovodi do narušenog ciklusa spavanja, kraćeg sna noću i većeg osjećaja umora tijekom dana. Disbalans metabolizma glukoze može doprinijeti povećanom osjećaju umora i dnevnoj pospanosti [268].

Postoji dvostruka povezanost između spavanja i osovine hipotalamus-hipofiza-štitna žlijezda, pri čemu ovi povezani homeostatski mehanizmi međusobno ovise jedan o drugome kako bi osigurali učinkovitu fiziološku izvedbu [224]. Karakteristike i trajanje sna imaju važnu ulogu u modulaciji cirkadijanog obrasca lučenja TSH, T3 i T4 [224,269]. Cirkadijani ritam lučenja navedenih hormona održava se i bez kontrole SCN-a [7,270]. Ovim istraživanjem pokazano je da postoji povezanost između TSH i kronotipa, te TSH i dnevne pospanosti. Povišene razine TSH, karakteristične za hipotireozu kod Hashimotove bolesti, mogu pridonijeti večernjem kronotipu zbog smanjene energije i pojačane pospanosti u jutarnjim satima, dok niske razine TSH u slučajevima hipertireoze mogu povećati jutarnju budnost i energiju. Moguće objašnjenje viših korelacija TSH s jutarnjim kronotipom može biti povezano s višim izlučivanjem TSH u ranim večernjim satima i vršnim izlučivanjem tijekom rane noći [203,205]. Više razine TSH pomiču cirkadijani sat prema jutru [203]. Večernji kronotipovi imaju veću vjerojatnost nezdravog ponašanja i veći rizik od pretilosti [203] koji je dodatno povećan kod osoba s Hashimotovom bolesti. Također, na lučenje TSH utječe melatonin putem receptora za melatonin [1,271]. Visoka razina TSH uz niske razine T3 i T4 ukazuje na smanjenu funkciju štitne žlijezde. Ovi hormoni ključni su za održavanje normalne razine energije i budnosti. S niskim razinama hormona štitne žlijezde dolazi do usporavanja metabolizma, što uzrokuje osjećaj umora i iscrpljenosti. Posljedica toga je kronična dnevna pospanost, čak i nakon adekvatnog sna. Isto tako kronični nedostatak sna remeti ritmičko lučenje TSH [1,221].

Generalizirani poremećaj endokrinog sustava jedan je od važnih mehanizama za koje se smatra da posreduje u štetnim učincima cirkadijane neusklađenosti [1,250,272]. Naime, povećane razine TSH povezane su s lošom kvalitetom sna [210]. Nedostatak kvalitetnog sna može pojačati dnevnu pospanost jer tijelo ne dobiva dovoljno odmora. Gubitak sna može utjecati na funkciju osovine hipotalamus-hipofiza-štitna žlijezda što je povezano s povećanim lučenjem TSH [210,273,274]. Nakon restrikcije spavanja dolazi do značajnog smanjenja TSH, što ilustrira jedinstveni utjecaj sna na izlučivanje TSH [224,273]. Odnos između hormona štitne žlijezde i ciklusa spavanja i budnosti ostaje nejasan [224]. Povišene razine hormona štitne žlijezde povezane su sa skraćenim trajanjem sna. Pretpostavlja se da povišenje T4 kao posljedica nedostatka sna služi kao adaptivni fiziološki odgovor za promicanje budnosti [214,224].

Uočena je i značajna povezanost razina fT3 i dnevne pospanosti. Kod Hashimotove bolesti razina fT3 može biti snižena, što ima značajan utjecaj na dnevnu pospanost. fT3 aktivno utječe na tjelesne stanice, ubrzava metabolizam i omogućuje normalno funkcioniranje organa i tkiva te izravno utječe na razinu energije i budnost, jer potiče proizvodnju energije u stanicama [275]. Kada je razina fT3 niska, metabolizam je usporen, što znači da tijelo proizvodi manje energije. Ova energetska „kriza“ dovodi do kroničnog umora, iscrpljenosti i povećane potrebe za snom tijekom dana [276].

Anti-Tg sama po sebi ne uzrokuju dnevnu pospanost, ali su pokazatelj aktivne autoimune reakcije i povećane upale u tijelu, te su značajno povezana s dnevnom pospanošću u ovom istraživanju. Anti-Tg mogu doprinijeti dnevnoj pospanosti zbog smanjenog metabolizma i energije ili pak kronične upale koja dodatno doprinosi osjećaju umora i iscrpljenosti. Tako je istraživanje na animalnim modelima pokazalo da cirkadijani poremećaj ne potiče razvoj autoimunosti štitne žlijezde izravno, nego utječe na limfocitnu infiltraciju štitne žlijezde popraćenu prekomjernom proizvodnjom anti-Tg i citokina [7]. Povećane razine anti-Tg mogu biti povezane s težim oblikom bolesti i izraženijom upalom, što može dodatno poremetiti hormonalnu ravnotežu i utjecati na cirkadijani ritam [7,277]. Ovakvi rezultati pokazuju postojanost uzajamne veze između poremećaja cirkadijanog ritma i AITD.

5.2. Povezanost polimorfizama gena *MTNR1B* s kliničkim pokazateljima hipotireoze

Uzrok Hashimotove bolesti ovisi o kombinaciji genetske osjetljivosti i okolišnih rizičnih čimbenika, što određuje gubitak imunološke tolerancije s posljedičnim autoimunim napadom na štitnu žlijezdu [41]. Smatra se da je 79 % predispozicije uzrokovano genetskim čimbenicima, od čega 21 % utjecaja imaju okoliš i spolni hormoni [79]. Postoje tri utvrđena genetska markera (*HLA* razreda II, *CTLA4* i *PTPN22*) [278] čiji su polimorfizmi povezani s Hashimotovom bolesti [84]. Nekoliko je predloženih gena čiji su polimorfizmi povezani s Hashimotom, kao što su geni za *Tg*, *VDR*, *IFN- γ* , *IL-4* te *TNF- α* [278]. Hashimotova bolest uglavnom nije bila istraživana u studijama povezanosti genoma (GWAS), a najbliži fenotip koji je bio istraživan na razini genoma u dvije odvojene studije jest hipotireoza [279,280].

Sinteza hormona štitne žlijezde regulirana je osovino hipotalamus-hipofiza-štitna žlijezda pod cirkadijalnom kontrolom [1,270,281]. Učinci cirkadijanog hormona melatonina na ljudske bolesti su brojni [282], a uglavnom se očituju kroz membranski receptor [2,143]. U serumu bolesnika s Hashimotovom bolesti dolazi do značajnog smanjenja razine melatonina što ukazuje na povezanost između puta melatonina i Hashimotove bolesti [111]. Kako melatonin ima imunomodulatorne učinke, poremećaji u njegovoj signalizaciji zbog polimorfizama u genu za receptor melatonina, mogu pridonijeti disregulaciji imunološkog sustava uočenoj kod Hashimotove bolesti [176,177]. Polimorfizmi gena *MTNR1B* mogu utjecati na izražaj ili funkciju receptora za melatonin, mijenjajući tako odgovor imunološkog sustava i pridonoseći razvoju Hashimotove bolesti [90].

Poznato je da melatonin može suprimirati aktivnost štitne žlijezde, uključujući regulaciju sinteze T3 i T4. Ovim istraživanjem pokazano je da je polimorfizam rs10830963 povezan s razinom fT3. Navedeni polimorfizam može promijeniti funkciju melatoninskog receptora, što može dovesti do promijene u načinu na koji melatonin utječe na štitnu žlijezdu. To može uzrokovati promijene u pretvorbi T4 u fT3 (biološki aktivan oblik hormona), što bi moglo objasniti povezanost razina fT3 s ovim polimorfizmom kod osoba s Hashimotovom bolesti. Pretvorba T4 u T3 događa se u perifernim tkivima (jetra, bubrezi) te polimorfizam rs10830963 u genu *MTNR1B* može utjecati na metaboličke puteve uključene u konverziju ovih hormona, potencijalno kroz modulaciju inzulinske osjetljivost, upale ili oksidativnog stresa. Polimorfizam rs10830963 može smanjiti učinak melatonina, potencijalno povećavajući upalni odgovor u štitnoj žlijezdi i pogoršavajući oštećenje tkiva štitne žlijezde, što može izravno

utjecati na razine fT3 [283]. Povezanost razine fT3 s polimorfizmom rs10830963 gena *MTNR1B* kod osoba s Hashimotovom bolesti vjerojatno je rezultat interakcije između melatoninskog signalnog puta, regulacije štitne žlijezde i imunoloških procesa.

Serumsko željezo je ključno za pravilno funkcioniranje mnogih enzimskih sustava i za sintezu hormona štitne žlijezde. Nedostatak željeza može dovesti do smanjenja sinteze hormona štitne žlijezde, smanjenja aktivnosti enzima TPO i razvoja hipotireoze. Polimorfizam rs4753426 gena *MTNR1B* bio je granično povezan s razinama željeza kod ispitanika s Hashimotovom bolesti u ovom istraživanju te bi mogao imati neizravnu ulogu u regulaciji metabolizma željeza kod osoba s Hashimotovom bolesti. Naime, polimorfizmi gena *MTNR1B* mogu biti povezani s metabolizmom glukoze i apsorpcijom željeza iz hrane. Specifični polimorfizmi, kao što je G alel rs10830963, pogoršavaju nepovoljni metabolizam glukoze u vezi s povećanjem unosa željeza hranom [284]. Također, disregulacija cirkadijanog ritma može utjecati na metabolizam željeza, smanjujući njegovu dostupnost i apsorpciju. Polimorfizam rs4753426 može povećati osjetljivost na upalne procese ili poremetiti cirkadijanu regulaciju protuupalnih odgovora. Povećana upala može dovesti do smanjene dostupnosti željeza jer ga tijelo skladišti kao odgovor na upalu čime se smanjuje njegova dostupnost bakterijama [285]. S obzirom na to da serumsko željezo ima važnu ulogu u sintezi hormona štitne žlijezde, bilo kakva disregulacija povezana s ovim polimorfizmom mogla bi dodatno utjecati na simptome hipotireoze, uključujući umor i iscrpljenost, te povećati potrebu za regulacijom željeza i hormonalnog statusa kod tih osoba.

Melatonin i vitamin D imaju sinergističke učinke na imunološki sustav. Ovim istraživanjem pokazano je da je polimorfizam rs10830963 gena *MTNR1B* povezan s razinama vitamina D kod osoba s Hashimotovom bolesti. Mnoga istraživanja i meta-analize pokazale su da su razine vitamina D značajno niže u ispitanika s Hashimotovom bolesti nego u zdravih [89,286–288]. Time je pokazano da postoji povezanost između nedostatka vitamina D, patogeneze Hashimotove bolesti i hipofunkcije štitne žlijezde [84,289,290]. Receptori vitamina D (VDR) široko su prisutni u područjima mozga povezanima sa spavanjem uključujući hipotalamus [291]. Cirkadijani pacemaker u SCN-u šalje signale koji induciraju sintezu melatonina u epifizi pod prigušenim svjetlom [292], a pretpostavlja se da vitamin D ima važnu ulogu u regulaciji melatonina jer su razine vitamina D regulirane izlaganjem sunčevoj svjetlosti [293]. Budući da sunčeva svjetlost također utječe na cirkadijane ritmove, to dodatno ukazuje na njenu važnost u regulaciji sna [294]. Ovim istraživanjem nije uočena povezanost dnevne pospanosti s razinama

vitamina D kod bolesnika s Hashimotovom bolesti, jer je većina oboljelih (61,7 %) imala normalne razine, u odnosu na njih 38,3 % koji su imali smanjene razine vitamina D, iako su ispitanici s normalnom dnevnom pospanošću imali više razine vitamina D u odnosu na one s povećanom dnevnom pospanošću, ali ta razlika nije bila značajna. Manjak vitamina D bio je povezan s poremećajima spavanja [295–297] što sugerira da je status vitamina D jedan od modulatora cirkadijanog ritma [293]. Pinealna žlijezda pretvara 5-hidroksi-triptofan u melatonin kako bi se poboljšao san noću [298]. Oba oblika vitamina D, 25(OH)D i aktivni oblik 1,25(OH)2D slijede 24-satni obrazac [299] s najvišim razinama u podne kada je više sunčeve svjetlosti, a najnižima navečer kada je manje sunčeve svjetlosti [293]. Tijekom dana, kada su razine vitamina D visoke, izražaj triptofan hidroksilaze 2 se povećava, te se proizvodi dovoljno serotonina za poboljšanje raspoloženja, dok noću kada se razina vitamina D u serumu smanjuje, ekspresija triptofan hidroksilaze 1 povećava se u pinealnoj žlijezdi i potiče proizvodnju 5-hidroksi-triptofana, koji se zatim pretvara u melatonin s učinkom poboljšanja sna [293]. Također, učinci vitamina D na san i raspoloženje mogu biti povezani s imunološkim sustavom. Kao imunomodulatorna molekula, vitamin D je uključen u regulaciju upalnih markera poput TNF- α [293]. U nedostatku vitamina D, upalni markeri su povišeni, što može negativno utjecati na san i raspoloženje [300]. Niska razina vitamina D kod osoba s polimorfizmom rs10830963 mogla bi pogoršati disbalans u imunološkoj funkciji, povećavajući upalu i autoimuni napad na štitnu žlijezdu, te osobe s navedenim polimorfizmom i nedostatkom vitamina D mogu imati veći rizik od razvoja metaboličkih poremećaja, uključujući inzulinsku rezistenciju i povećanje ITM-a, što dodatno opterećuje štitnu žlijezdu i pogoršava simptome Hashimotove bolesti [301]. Međutim, niske razine vitamina D u pretilih pacijenata mogu biti posljedica nedovoljnog unosa vitamina D, povećane masne ili mišićne mase ili polimorfizama u enzimima koji metaboliziraju vitamin D [302,303]. I pretilost i nedostatak vitamina D doprinose kroničnoj upali niskog stupnja, za koju se smatra da doprinosi razvoju poremećaja spavanja [304]. Isto tako polimorfizam rs10830963 gena *MTNR1B* može pojačati upalne odgovore putem poremećaja melatoninskog signala, što dovodi do veće proizvodnje protuupalnih i upalnih citokina [180]. Osim polimorfizama gena *MTNR1B*, na razine vitamina D u osoba s AITD, mogu utjecati i polimorfizmi u receptoru za vitamin D [105]. Isto tako, suplementacija vitaminom D može poboljšati kliničke parametre vezane uz AITD kao što su smanjenje razina titra anti-TPO i anti-Tg [89]. Kombinacija niskih razina vitamina D i rs10830963 polimorfizma može rezultirati težim simptomima, uključujući jači autoimuni napad na štitnu žlijezdu i ozbiljnije metaboličke poremećaje.

5.3. Povezanost polimorfizama gena *MTNR1B* s Hashimotovom bolesti ovisno o razini anti-Tg

Pozitivna anti-Tg i povećane razine anti-Tg protutijela pronađena su u 55–90 % pacijenata s Hashimotovom bolesti [55]. Pronađena povezanost između razina anti-Tg i polimorfizma rs10830963 gena *MTNR1B* kod osoba s Hashimotovom bolesti u ovom istraživanju može se objasniti kroz ulogu melatonina, imunološkog sustava i disfunkcije štitne žlijezde. Promijene u funkciji melatoninskih receptora, koje mogu nastati zbog polimorfizma rs10830963, mogu utjecati na imunološki balans. Disfunkcija melatoninskih receptora može doprinijeti narušavanju imunološke kontrole i pojačanoj proizvodnji autoprotutijela, uključujući anti-Tg. Više od 10 % žena ima pozitivna anti-Tg protutijela, a oko 2 % pokazuje kliničke manifestacije bolesti [305], dok muškarci predstavljaju jednu desetinu ove prevalencije [84,306]. Oslabljena regulacija hormona i imunoloških odgovora može uzrokovati porast razina anti-Tg protutijela kod osoba s Hashimotovom bolesti.

Autoimunost štitne žlijezde izazvana jodom povezana je s anti-Tg [74], odnosno prekomjerni unos joda inducira autoimunost štitne žlijezde povećanjem imunogenosti tireoglobulina u genetski predisponiranih osoba [84,307]. Također, disregulacija melatoninskog puta može povećati proizvodnju upalnih citokina, što pak može pojačati autoimuni napad na štitnu žlijezdu i povećati razine anti-Tg protutijela.

Osim što polimorfizam rs10830963 gena *MTNR1B* kod osoba s Hashimotovom bolesti može poremetiti signalni put melatonina, na razine anti-Tg mogu utjecati i drugi signalni putevi među kojima se ističe NF- κ B signalni put. Nuklearni faktor (NF)- κ B signalni put kontrolira niz važnih bioloških funkcija, uključujući imunološke i upalne odgovore, diferencijaciju, rast stanica, tumorigenezu i apoptozu. NF- κ B transkripcijski čimbenik regulira ekspresiju citokina, čimbenika rasta i efektorskih enzima kao odgovor na ligaciju staničnih stanica na receptore uključene u imunološki odgovor i upalu [308]. NF- κ B signalni put također kontrolira ekspresiju velikog broja gena koji imaju funkciju u regulaciji imunoloških i upalnih odgovora, uključujući citokine, kemokine, adhezijske molekule i druge imunoregulacijske proteine [308]. Ekspresija gena ovisna o NF- κ B neophodna je za održavanje normalne strukture i funkcije štitne žlijezde [308]. U štitnoj žlijezdi NF- κ B signalizacija presudna je za preživljavanje tireocita i izražaj kritičnih markera štitne žlijezde, uključujući TPO i Tg [308].

Zanimljivost ovog istraživanja jest da osobe s negativnim razinama anti-Tg (manjim od 115 kIU/L) imaju više razine triglicerida od osoba s povišenim razinama anti-Tg, dok se u drugim markerima dislipidemije nisu razlikovali. Takvi rezultati su očekivani, jer liječenje hormonima štitne žlijezde često snižava razinu kolesterola u bolesnika s hipotireozom [79]. Za osobe s Hashimotovom bolesti karakteristično je da imaju povišene razine ukupnog kolesterola, LDL-a i triglicerida [79]. Pokazano je da postoji povezanost između AITD i dislipidemije, te osobe s pozitivnim protutijelima štitne žlijezde treba pomnije pratiti zbog dislipidemije i kardiovaskularnih događaja [309] zbog njihove sklonosti povećanju ITM-a i metaboličkom sindromu [310].

5.4. Povezanost polimorfizama gena *MTNR1B* s Hashimotovom bolesti ovisno o ITM-u

Ovo istraživanje potvrđuje povezanost između polimorfizma rs10830963 gena *MTNR1B* i ITM-a $> 25 \text{ kg/m}^2$ u osoba s Hashimotovom bolesti. Alel G i genotip GG polimorfizma rs10830963 bili su češći u oboljelih s prekomjernom tjelesnom masom/pretilošću. Koncentracije fT4 bile su povezane s prekomjernom masom/pretilošću u logističkoj regresiji. Poremećaji u signalnim putevima melatonina, vjerojatno zbog polimorfizama u genima receptora melatonina, mogu disregulirati imunološki sustav bolesnika s Hashimotovom bolesti [176,177].

Nedostatak prethodnih istraživanja ograničava usporedbu nalaza ovog istraživanja. Veliki udio varijacija ITM-a može se pripisati genetskim čimbenicima, npr. nasljednost u studijama blizanaca kretala se od 40 % do 70 % [127,128]. Budući da je pretilost kronična, relapsirajuća, multifaktorska, neurobihevioralna bolest sa složenom genetskom arhitekturom, malo je vjerojatno da bilo koja genetska varijanta može objasniti nalaze studije. Na poligenu prirodu pretilosti utječu kumulativni i mali učinci više od 500 gena povezanih s pretilošću u interakciji s čimbenicima okoliša [311]. Druge karakteristike među populacijama treba uzeti u obzir kada se raspravlja o ITM-u [129,130]. Nadalje, čini se da je uloga genetskih čimbenika u ITM-u izraženija u žena [129]. Spolne razlike imaju populacijski značaj budući da je Hashimotova bolesti sedam do 10 puta češća u žena [312].

Kao što je prethodno navedeno, melatonin regulira ciklus budnosti-spavanja, ali također ima ulogu u metabolizmu glukoze, osjetljivosti na inzulin i potrošnji energije. U osoba s

Hashimotovom bolesti uočena je povezanost između rjeđeg alela G polimorfizma rs10830963 i prekomjerne tjelesne mase/pretilosti. Općenito, većina pretilih osoba je metabolički „nezdrava“ [313]. Metabolički sindrom je obično povezan s arterijskom hipertenzijom u bolesnika s Hashimotovom bolesti s višim koncentracijama TSH i povišenim razinama autoprotilutijela štitne žlijezde [103,314].

Hipotireoza i usporeni metabolizam, česti klinički nalazi kod osoba s Hashimotovom bolesti, te polimorfizam rs10830963 mogu pogoršati metaboličke poremećaje i povećati ITM. Taj je polimorfizam povezan s povišenim razinama glukoze natašte i rizikom od dijabetesa tipa 2, kao i sniženim razinama adiponektina [315]. Prethodna studija ukazuje na vezu između polimorfizma rs10830963 i metaboličkih poremećaja, kao što je poremećena regulacija glukoze u krvi i povećana inzulinska rezistencija [254], što dovodi do prekomjernog skladištenja masti i povećanja ITM-a.

Povećana tjelesna masa, često povezana s povećanim rizikom od metaboličkih abnormalnosti, snažno je povezana s disfunkcijom štitne žlijezde [126,316]. Stanice štitne žlijezde oslobađaju oksidaze koje kataliziraju proizvodnju ROS-a [316,317], koje pak oštećuju strukturu stanica i stabilnost genoma [316]. Zaštitni učinak melatonina protiv oštećenja izazvanih ROS-om i pretilosti sugerira da bi dodatak melatonina mogao biti učinkovita intervencijska terapija za bolesti povezane sa starenjem [132,318]. Poremećaji spavanja, kao što su nesanica, pospanost tijekom dana ili loša kvaliteta sna, remete hormonalnu ravnotežu povećanjem razina hormona grelina koji stimulira apetit, što dovodi do debljanja. Štoviše, debljanje se također može pripisati stresu povezanom s kroničnim tireoiditisom i utjecajima svjetlosnih poremećaja [7]. Osobe s Hashimotovom bolesti često imaju povećanu tjelesnu masu u usporedbi sa zdravim osobama. Povećanje masne mase tijekom faze hipotireoze obično se normalizira nadomjesnom terapijom s LT4 [319]. Iako je pretilost poznati čimbenik rizika za hipotireozu, uloga gubitka tjelesne mase u smanjenju rizika za hipotireozu je mala [320].

Hormoni štitne žlijezde mogu utjecati na aktivnost masnog tkiva, a metaboličke promjene vezane uz masno tkivo uočene su kod nedostatka ili prekomjerne proizvodnje hormona štitne žlijezde. Dok su učinci hipotireoze i hipertireoze na tjelesnu masu dobro dokumentirani, dokazi o povezanosti između ITM-a i suptilnih varijacija hormona štitne žlijezde u osoba s eutireozom su ograničeni [321]. Milionis i suradnici pokazali su da nema razlike u serumskim koncentracijama fT3 u odnosu na ITM, niti koncentracije fT3 koreliraju s ITM-om [321]. Nasuprot tome, druge su studije izvijestile da se koncentracije fT3 povećavaju s povećanjem

pretilosti [322,323]. Pretilo osobe, iako su bile eutireoidne, imale su više koncentracije fT3 od osoba normalne tjelesne mase [323].

Ovim istraživanjem uočene su granično značajno niže vrijednosti fT4 kod osoba s Hashimotovom bolesti s prekomjernom tjelesnom masom. Sosa-López i sur. izvijestili su o negativnoj korelaciji između koncentracije fT4 i stupnja pretilosti [322]. Slično, Milionis i suradnici izvijestili su o negativnoj korelaciji između koncentracije fT4 i pretilosti [321]. Ovo istraživanje uočilo je povezanost između polimorfizma rs10830963 i koncentracije hormona fT4 u osoba s Hashimotovom bolesti s povišenim ITM-om. Kako je već navedeno, polimorfizam rs10830963 može modulirati funkciju receptora MTNR1B čime se mijenja signalizacija putem melatonina što može utjecati na dejodinaze i pretvaranje T4 u aktivan oblik T3 što za posljedicu ima utjecaj na razinu fT3 [283]. Također, niže razine fT4 kod osoba s ITM većim od 25 kg/m² vjerojatno su rezultat međudjelovanja između signalnog puta melatonina, regulacije štitne žlijezde i imunoloških procesa. Ovi nalazi sugeriraju potencijalnu povezanost između normalne funkcije štitne žlijezde i promjena ITM-a; međutim, dokazi su neuvjerljivi [321]. Kategorija pretilosti također utječe na promjene u funkciji štitne žlijezde, što može utjecati na normalan raspon koncentracija hormona štitne žlijezde [322]. Promjene u funkciji štitne žlijezde svrstavaju se u primarne, a promjene u tjelesnoj masi u sekundarne. Temeljni uzrok može biti pojedinačni ili multifaktorski, ali točni biološki mehanizmi nisu u potpunosti shvaćeni. Moguća hipoteza je bilateralna interakcija između štitne žlijezde i masnog tkiva [123]. Varijacije u normalnoj funkciji štitne žlijezde povezane su s promjenama tjelesne mase. Ovo istraživanje nije uočilo značajnu razliku u koncentracijama TSH između osoba normalne tjelesne mase i osoba s prekomjernom tjelesnom masom/pretilih. Nasuprot tome, Milionis i suradnici izvijestili su o značajno višim koncentracijama TSH u osoba s višim ITM-om, ali samo u muškaraca s hipotireozom, kod kojih je nađena negativna korelacija između TSH i ITM-a [321]. Nađene visoke koncentracije TSH mogu biti posljedica blage insuficijencije štitne žlijezde, vjerojatno pogoršane pretilošću [83], budući da TSH pozitivno korelira s ITM-om samo u žena s prekomjernom tjelesnom masom s povišenim koncentracijama autoprotilutijela na štitnu žlijezdu [203,322,324].

Ovakvi rezultati upućuju na to da normalna funkcija štitne žlijezde može biti povezana s promjenama ITM-a, ali ne postoji jasna povezanost [321]. Također, stupanj pretilosti povezan je s promjenama u funkciji štitne žlijezde koje mogu utjecati na normalan raspon razina hormona štitne žlijezde [322].

5.5. Povezanost polimorfizama gena *MTNR1B* s nadomjesnom hormonskom terapijom s LT4

Ovim istraživanjem pokazano je da je alel G polimorfizma rs10830963 gena *MTNR1B* češće zastupljen u pacijenata s Hashimotovom bolesti koji nisu bili na nadomjesnoj hormonskoj terapiji s LT4. Model logističke regresije pokazao je da osobe koje se liječe s LT4 imaju više razine serumskog željeza i manju dnevnu pospanost u odnosu na osobe koje ne uzimaju LT4. Takođe, haplotip GCT polimorfizama rs10830963, rs1387153 i rs4753426 češći je u osoba koje ne uzimaju LT4.

Alel G polimorfizma rs10830963 povezan je s poremećenim izlučivanjem inzulina, inzulinskom rezistencijom i pretilošću [325–327]. Osobe s ovim metaboličkim komorbiditetima možda neće odmah trebati terapiju s LT4 ako je njihova hipotireoza blaga ili subklinička, što potencijalno dovodi do veće prevalencije alela G u neliječenoj populaciji. U ovom istraživanju uočeno je da je alel G rs10830963 češći kod osoba s Hashimotovom bolesti koji se ne liječe s LT4 što se može objasniti na nekoliko načina, iako su izravni dokazi ograničeni. Receptori melatonina poput *MTNR1B* utječu na cirkadijane ritmove [207], ali nema izravnih dokaza koji povezuju rs10830963 s funkcijom štitne žlijezde ili potrebom za liječenjem s LT4. Međutim, poremećaji u cirkadijanom ritmu mogu utjecati na metaboličko zdravlje [328], što može neizravno utjecati na odluke o liječenju. Iako ovim istraživanjem nije uočena razlika u razinama TSH i fT4 u odnosu na primjenu nadomjesne hormonske terapije s LT4, na životinjskim modelima ženki štakora pokazano je da primjena melatonina povećava razinu T4 [185], dok kod osoba s hipotireozom kombinacija melatonina i LT4 smanjuje razinu TSH i povećava razinu fT4 [186]. Primjena visokih doza melatonina ujutro ili navečer također je povezana s promjenama u razinama glukoze i lučenju inzulina ovisnim o polimorfizmu rs10830963 [261,329]. Polimorfizmi rs1387153 i rs10830963 u jakoj su neravnoteži povezivanja barem u nekim etničkim skupinama, tako da njihovi učinci na abnormalnosti glukoze mogu ovisiti jedan o drugom [330]. Najviše istraženi polimorfizam *MTNR1B* rs10830963 povezan je s produljenom proizvodnjom melatonina koja bi mogla olakšati razvoj hiperglikemije u specifičnim uvjetima okoline. Prikupljanje dodatnih informacija o cirkadijanim ritmovima, endogenim signalnim putovima melatonina i polimorfizmima melatoninskih receptora kod osoba s Hashimotovom bolesti moglo bi pomoći u razvoju novih

preventivnih strategija temeljenih na individualnom cirkadijalnom ritmu i genetskim značajkama [152].

Opažane više razine željeza kod osoba s Hashimotovom bolesti koji se liječe s LT4 u usporedbi s onima koji ne uzimaju LT4 može se objasniti međuigrom između hormona štitne žlijezde i metabolizma željeza. Hashimotova bolest usporava metaboličke procese, uključujući gastrointestinalnu funkciju, što može narušiti crijevnu apsorpciju željeza. Liječenje s LT4 poboljšava normalne razine hormona štitne žlijezde, pokretljivost crijeva i apsorpciju hranjivih tvari, uključujući željezo. Liječenje subkliničke hipotireoze s LT4 pojačava odgovor na oralnu terapiju željezom, što dovodi do viših razina željeza i feritina u serumu u usporedbi s osobama koji ne uzimaju LT4 [331,332]. Također, liječenje s LT4 poboljšava proizvodnju crvenih krvnih stanica i smanjuje sideropeničnu anemiju izazvanu hipotireozom [332]. Ovaj proces povećava potražnju i korištenje željeza, što može potaknuti učinkovitiji metabolizam i skladištenje željeza. Kombinacija LT4 i nadomjestaka željeza rezultira značajno većim poboljšanjima u hemoglobinu, feritinu i razinama željeza u serumu u usporedbi sa samim nadomjestkom željeza [332]. Hormoni štitne žlijezde neophodni su za eritropoezu (proizvodnju eritrocita) i regulaciju enzima uključenih u metabolizam željeza [333]. Hipotireoza remeti te procese, što dovodi do funkcionalnog ili apsolutnog nedostatka željeza. Normalizirajući funkciju štitne žlijezde, LT4 pomaže u ponovnoj uspostavi pravilne regulacije ovih putova, pridonoseći višim izmjerenim razinama željeza [334]. Hormoni štitne žlijezde utječu na hepcidin koji je glavni regulator homeostaze željeza. Hipotireoza povećava razine hepcidina, koji smanjuje apsorpciju željeza. Terapija s LT4 snižava razine hepcidina, poboljšava apsorpciju željeza i povećava cirkulirajuće željezo [17]. Pored toga, Hashimotova bolest uključuje kroničnu upalu, koja može dovesti do funkcionalnog nedostatka željeza zbog upalne sekvestracije željeza posredovane citokinima. Terapija s LT4 može pomoći u smanjenju upale tijekom vremena, što dovodi do poboljšane dostupnosti željeza i viših izmjerenih razina željeza u krvi [17]. Kako je već spomenuto nedostatak željeza smanjuje aktivnost enzima TPO [335] što je pokazano u staničnim modelima koji eksprimiraju TPO [336]. Stupanj smanjenja aktivnosti enzima bio je povezan s razinom nedostatka željeza. U slučaju nedostatka željeza, vezanje T3 na njegov nuklearni receptor je poremećeno [337,338]. Dodatno, nedostatak željeza rezultira smanjenom aktivnošću dejodinaze i smanjenim korištenjem T3 iz krvotoka [339]. Nedostatak željeza jedan je od čimbenika koji pokreće upalni proces u štitnoj žlijezdi, što između ostalog dovodi do stvaranja protutijela protiv štitne žlijezde. Meta-analiza pokazala je da nedostatak željeza u žena

reproduktivne dobi dovodi do dvostrukog povećanja rizika od povišenih razina anti-TPO i anti-Tg [340].

Hipotireoza i dnevna pospanost mogu imati dvosmjernu vezu, sa simptomatskim preklapanjem koje je povezano s povećanim metaboličkim komorbiditetima i hormonskom disregulacijom [341]. Oboljeli od Hashimotove bolesti često imaju nesanicu ili poremećene cirkadijane ritmove, koje LT4 pomaže normalizirati reguliranjem funkcije štitne žlijezde [341]. U ovom istraživanju, osobe liječene s LT4 imale su manju dnevnu pospanost u usporedbi s onima koji nisu uzimali LT4. Moguće objašnjenje za pronađenu razliku jest da hipotireoza remeti metaboličke i neurološke procese, što dovodi do umora i prekomjerne dnevne pospanosti, dok liječenje s LT4 uspostavlja normalnu razinu hormona štitne žlijezde, poboljšavajući ukupni metabolizam i regulaciju energije [342]. Hormoni štitne žlijezde imaju važnu ulogu u funkciji mozga, uključujući regulaciju neurotransmitera. Hipotireoza može oslabiti kognitivnu budnost i uzrokovati pospanost tijekom dana [343]. LT4 značajno smanjuje dnevnu pospanost nakon svega četiri do osam tjedana terapije [344]. Također, pokazano je da LT4 skraćuje trajanje noćnog sna i poboljšava budnost tijekom dana te je taj učinak vjerojatno posljedica normalizacije ciklusa spavanja i budnosti ovisnih o hormonima štitne žlijezde [342].

5.6. Prednosti i ograničenja istraživanja

Ovo istraživanje jedinstveni je rad u kojem je istražena povezanost različitih polimorfizama gena za receptor melatonina (*MTNR1B*) s elementima cirkadijanog ritma u osoba s Hashimotovom bolesti. Slična istraživanja ovom istraživanju u Republici Hrvatskoj do sada nisu nikada provedena. U istraživanju su uspoređene razlike u učestalosti pojedinih polimorfizama, modela genotipova i haplotipova između osoba s Hashimotovom bolesti na temelju pozitivnih nalaza anti-Tg protutijela, primjene LT4 i ITM-a. Također, ispitana je razlika između tipova kronotipa i dnevne pospanosti u navedenih osoba. Ovakvim pristupom problemu Hashimotove bolesti otvara se mogućnost za nastavak istraživanja u multicentričnim studijama s većim brojem ispitanika te boljem razumijevanju povezanosti cirkadijanog ritma i AITD.

Prednost ovog istraživanja je što je uzorak ispitanika relativno homogen po pitanju dobi, etničke pripadnosti i društvenog okruženja. Istraživanja su pokazala da su melatonin, ključni enzimi potrebni za sintezu melatonina i receptori za melatonin prisutni u štitnoj žlijezdi, što sugerira

da melatonin može utjecati na ekspresiju gena specifičnih za štitnu žlijezdu, te sintezu i regulaciju hormona štitne žlijezde [345]. Rezultati ovog istraživanja nadograđuju naše razumijevanje patofizioloških procesa uključenih u nastanak Hashimotove bolesti, te zahtijevaju dodatna istraživanja s procjenom kronotipa i drugih važnih elemenata cirkadijanog ritma na većem broju ispitanika, kao i uključivanje kontrolne skupine zdravih ispitanika. U današnje doba personalizirane medicine, znanje o kronotipu i dnevnoj pospanosti pojedinačne osobe može biti vrlo važno za liječenje te se može uključiti kao važna sastavnica dijagnostičkog i terapijskog procesa. Iako su dobiveni rezultati značajni, teško ih je primijeniti u dijagnostičke i prognostičke svrhe.

Ovo istraživanje ima nekoliko ograničenja. Prvo ograničenje je veličina uzorka, ali prikladan okvir za uzorkovanje bio je moguć samo tijekom uobičajene kliničke obrade unutar medicinske ustanove. Takva veličina uzorka mogla je utjecati na preciznost i pouzdanost te povećati varijabilnost. S većim brojem ispitanika mogla bi se postići bolja povezanost genotipa i fenotipa. Pored velikih vrijednosti omjera izgleda i velikih raspona 95 %-tnih intervala pouzdanosti, te male učestalosti pojedinih genotipova teško je potvrditi pravu značajnosti dobivenih rezultata. Ni jedan rezultat povezanosti genotip-fenotip nije dovoljno jak da bi statistički bio uvjerljiv bez velikog broja ispitanika. Drugo, moguće je da ispitivani polimorfizmi gena *MTNR1B* nisu funkcionalno povezani s Hashimotovom bolesti, te bi u tom slučaju trebalo potražiti funkcionalne polimorfizme ili skupinu funkcionalno značajnih polimorfizama koji bi mogli biti jače povezani s nastankom Hashimotove bolesti. Treće, korištenjem upitnika za procjenu jutarnjeg i večernjeg kronotipa, te dnevne pospanosti ispitanici su subjektivno procijenili svoj cirkadijani ritam. Procjena bi bila objektivnija da se digitalno snimala duljina i kvaliteta spavanja svakog sudionika. Također, u obzir nisu uzeti podaci rade li ispitanici u smjenama te jesu li unazad mjesec dana putovali avionom (*jet lag*) što značajno može utjecati na njihove rezultate kronotipa i dnevne pospanosti. Četvrto, razine melatonina nisu mjerene u ovom istraživanju, a povezanost polimorfizama *MTNR1B* s razinama melatoninom u serumu tek treba razjasniti. Treba napomenuti da su maksimalne koncentracije specifične za pojedinca i dobi. Nakon 25 ili 40 godina, proizvodnja melatonina u pinealnoj žlijezdi pada na 60 % od razine nađene kod mladih odraslih osoba. Kod osoba starijih od 90 godina postoji stalan pad vrijednosti od čak 20 % u odnosu na razinu za mlade odrasle osobe, pri čemu su prosječne vrijednosti melatonina uvijek više kod žena [346,347]. Također, bilo bi vrijedno procijeniti povezanost između polimorfizama gena *MTNR1B*, razina melatonina i kliničke težine bolesti. Peto, budući da se izloženost i ishod procjenjuju istovremeno u

presječnim istraživanjima, ovaj dizajn studije je minimalno informativan za uzročno zaključivanje. Ipak, unatoč metodološkim ograničenjima, može pružiti uvid u uzročne učinke izloženosti bolesti [348]. Stoga su potrebne metodološki zahtjevne longitudinalne studije kako bi se temeljito razjasnio složeni međuodnos između polimorfizama gena *MTNR1B* i funkcije štitne žlijezde te kronotipa, dnevne pospanosti, anti-Tg, ITM-a i primjene LT4 u osoba s Hashimotovom bolesti. Šesto, Hashimotova bolest uzrokovana je interakcijom između genetskih, okolišnih i egzistencijalnih čimbenika, od kojih genetski čimbenici doprinose do 75 % patogeneze bolesti. Štoviše, procijenjeno je da se samo 5,5 % predispozicije za Hashimotovu bolest može objasniti do sada određenim genetskim čimbenicima [349]. Sedmo, u ovom istraživanju nisu analizirane epigenetičke modifikacije koje pridonose autoimunim patogenim mehanizmima, a što bi moglo pridonijeti točnijoj dijagnozi Hashimotove bolesti, adekvatnijem izboru načina liječenja te preciznijem predviđanju ishoda liječenja [84].

U kliničkoj praksi kontinuum poremećaja štitne žlijezde obilježavaju dva ekstrema stanja: hipotireoza i hipertireoza. Treba podići svijest o ograničenjima takve bivarijantne percepcije i složenosti interakcija s različitim čimbenicima rizika [350]. Budući da signalni put melatonin-*MTNR1B* utječe na imunološku regulaciju, autoimune bolesti i štitnu žlijezdu, treba razmotriti njegovu potencijalnu ulogu u Hashimotovoj bolesti. Iako je ovo istraživanje na jedinstven način istražilo povezanost polimorfizama gena *MTNR1B* s kronotipom, dnevnom pospanošću, anti-Tg, kategorijama ITM-a i primjenom LT4 u osoba s Hashimotovom bolesti te unatoč proširenju znanja dobivenog rezultatima, potrebna su daljnja istraživanja sa strožim dizajnom studije kako bi se osigurala validacija genetskih varijacija koje su u osnovi ove autoimune bolesti.

6. ZAKLJUČAK

Nakon provedenog istraživanja i na temelju dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Dnevna pospanost osoba s Hashimotovom bolesti povezana je s polimorfizmom rs10830963 gena *MTNR1B* te je haplotip GCC polimorfizama rs10830963, rs1387153 i rs4753426 povezan s povećanom dnevnom pospanošću. Uočena je povezanost dnevne pospanosti s anti-Tg, fT3 i fT4. Logistička regresija pokazala je da je genotip CT polimorfizma rs1387153 povezan s povećanom dnevnom pospanošću u osoba s Hashimotovom bolesti.
2. Polimorfizmi rs10830963, rs1387153 i rs4753426 gena *MTNR1B* nisu povezani s kronotipom osoba s Hashimotovom bolesti. Kronotip je negativno povezan s pozitivnim anti-Tg, a logistički regresijski model pokazao je da su osobe intermedijarnog + jutarnjeg kronotipa imale značajno niže razine fT3, ali više razine triglicerida i željeza.
3. Razine anti-Tg povezane su s polimorfizmom rs10830963 gena *MTNR1B*, te osobe s pozitivnim anti-Tg imaju značajno niže razine triglicerida.
4. ITM je povezan s rs10830963 polimorfizmom gena *MTNR1B* te su alel G i genotip GG polimorfizma rs10830963 češći u osoba s Hashimotovom bolesti s većim ITM-om. Također, osobe s ITM-om $> 25 \text{ kg/m}^2$ imaju značajno niže razine fT4.
5. Alel G polimorfizma rs10830963 češći je u osoba s Hashimotovom bolesti koje ne uzimaju nadomjesno hormonsko liječenje s LT4, a genotip GG navedenog polimorfizma negativno je povezan s primjenom LT4. Haplotip GCT, rs10830963, rs1387153 i rs4753426 polimorfizama češći je u oboljelih koje nisu liječeni s LT4. Oboljeli liječeni s LT4 imaju značajno manju dnevnu pospanost i više razine željeza.
6. Razine slobodnog trijodtironina (fT3) i vitamina D povezane su s rs10830963 polimorfizmom gena *MTNR1B*.

7. LITERATURA

1. Ikegami, K.; Refetoff, S.; Van Cauter, E.; Yoshimura, T. Interconnection between Circadian Clocks and Thyroid Function. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2019**, *15*, 590, doi:10.1038/S41574-019-0237-Z.
2. Škrlec, I.; Biloglav, Z.; Talapko, J.; Džijan, S.; Daus-Šebedak, D.; Cesar, V. Myocardial Infarction Susceptibility and the MTNR1B Polymorphisms. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 11444, doi:10.3390/IJMS241411444.
3. Wang, P.; Liu, L.; Zhao, L.F.; Zhao, C.N.; Mao, Y.M.; Dan, Y.L.; Wu, Q.; Li, X.M.; Wang, D.G.; Pan, H.F. Association of Melatonin Pathway Gene's Single-Nucleotide Polymorphisms with Systemic Lupus Erythematosus in a Chinese Population. *J. Immunol. Res.* **2019**, *2019*, 2397698, doi:10.1155/2019/2397698.
4. Natarajan, R.; Einarsdottir, E.; Riutta, A.; Hagman, S.; Raunio, M.; Mononen, N.; Lehtimäki, T.; Elovaara, I. Melatonin Pathway Genes Are Associated with Progressive Subtypes and Disability Status in Multiple Sclerosis among Finnish Patients. *J. Neuroimmunol.* **2012**, *250*, 106–110, doi:10.1016/J.JNEUROIM.2012.05.014.
5. Ha, E.; Choe, B.K.; Jung, K.H.; Yoon, S.H.; Park, H.J.; Park, H.K.; Yim, S.V.; Chung, J.H.; Bae, H.S.; Nam, M.; et al. Positive Relationship between Melatonin Receptor Type 1B Polymorphism and Rheumatoid Factor in Rheumatoid Arthritis Patients in the Korean Population. *J. Pineal Res.* **2005**, *39*, 201–205, doi:10.1111/J.1600-079X.2005.00237.X.
6. Lin, J.D.; Yang, S.F.; Wang, Y.H.; Fang, W.F.; Lin, Y.C.; Liou, B.C.; Lin, Y.F.; Tang, K.T.; Cheng, C.W. Associations of Melatonin Receptor Gene Polymorphisms with Graves' Disease. *PLoS One* **2017**, *12*, e0185529, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0185529.
7. Fu, J.; Fan, Z.; He, L.; Liu, Q.; Liu, H.; Li, Y.; Guan, H. Circadian Clock Disruption in Autoimmune Thyroiditis. *Eur. Thyroid J.* **2023**, *12*, e230035, doi:10.1530/ETJ-23-0035.
8. Calvo, J.R.; Maldonado, M.D. Immunoregulatory Properties of Melatonin in the Humoral Immune System: A Narrative Review. *Immunol. Lett.* **2024**, *269*, 106901, doi:10.1016/J.IMLET.2024.106901.
9. Gonzalez-Haba, M.G.; Garcia-Mauriño, S.; Calvo, J.R.; Goberna, R.; Guerrero, J.M. High-Affinity Binding of Melatonin by Human Circulating T Lymphocytes (CD4+). *FASEB J.* **1995**, *9*, 1331–1335, doi:10.1096/FASEBJ.9.13.7557023.
10. Pozo, D.; Mauriño, S.G.; Guerrero, J.M.; Calvo, J.R. mRNA Expression of Nuclear Receptor RZR/RORalpha, Melatonin Membrane Receptor MT, and Hydroxindole-O-Methyltransferase in Different Populations of Human Immune Cells. *J. Pineal Res.* **2004**, *37*, 48–54, doi:10.1111/J.1600-079X.2004.00135.X.
11. Chang, T.; Niu, C.; Sun, C.; Ma, Y.; Guo, R.; Ruan, Z.; Gao, Y.; Lu, X.; Li, H.; Lin, Y.; et al. Melatonin Exerts Immunoregulatory Effects by Balancing Peripheral Effector and Regulatory T Helper Cells in Myasthenia Gravis. *Aging (Albany, NY)*. **2020**, *12*, 21147–21160, doi:10.18632/AGING.103785.
12. Vaghari-Tabari, M.; Moein, S.; Alipourian, A.; Qujeq, D.; Malakoti, F.; Alemi, F.; Yousefi, B.; Khazaie, S. Melatonin and Inflammatory Bowel Disease: From Basic Mechanisms to Clinical Application. *Biochimie* **2023**, *209*, 20–36, doi:10.1016/J.BIOCHI.2022.12.007.
13. Hu, X.; Chen, Y.; Shen, Y.; Tian, R.; Sheng, Y.; Que, H. Global Prevalence and Epidemiological Trends of Hashimoto's Thyroiditis in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Public Heal.* **2022**, *10*, 1020709,

- doi:10.3389/FPUBH.2022.1020709.
14. Wrońska, K.; Hałasa, M.; Szczuko, M. The Role of the Immune System in the Course of Hashimoto's Thyroiditis: The Current State of Knowledge. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 6883, doi:10.3390/IJMS25136883.
 15. Pyzik, A.; Grywalska, E.; Matyjaszek-Matuszek, B.; Roliński, J. Immune Disorders in Hashimoto's Thyroiditis: What Do We Know So Far? *J. Immunol. Res.* **2015**, *2015*, 979167, doi:10.1155/2015/979167.
 16. Garofalo, V.; Condorelli, R.A.; Cannarella, R.; Aversa, A.; Calogero, A.E.; La Vignera, S. Relationship between Iron Deficiency and Thyroid Function: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* **2023**, *15*, 4790, doi:10.3390/NU15224790/S1.
 17. Gierach, M.; Rudewicz, M.; Junik, R. Iron and Ferritin Deficiency in Women with Hypothyroidism and Chronic Lymphocytic Thyroiditis — Systematic Review. *Endokrynol. Pol.* **2024**, *75*, 253–261, doi:10.5603/EP.97860.
 18. Yetkin, D.O.; Dogantekin, B. The Lipid Parameters and Lipoprotein(a) Excess in Hashimoto Thyroiditis. *Int. J. Endocrinol.* **2015**, *2015*, 952729, doi:10.1155/2015/952729.
 19. Duntas, L.H.; Brenta, G. A Renewed Focus on the Association Between Thyroid Hormones and Lipid Metabolism. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2018**, *9*, 511, doi:10.3389/FENDO.2018.00511.
 20. Aras, S.; Tanzer, İ.O.; Can, Ü.; Sümer, E.; Baydili, K.N. The Role of Melatonin on Acute Thyroid Damage Induced by High Dose Rate X-Ray in Head and Neck Radiotherapy. *Radiat. Phys. Chem.* **2021**, *179*, 109206, doi:10.1016/J.RADPHYSHEM.2020.109206.
 21. Zhang, D.; Jones, R.R.; James, P.; Kitahara, C.M.; Xiao, Q. Associations between Artificial Light at Night and Risk for Thyroid Cancer: A Large US Cohort Study. *Cancer* **2021**, *127*, 1448–1458, doi:10.1002/CNCR.33392.
 22. Lin, J.D.; Fang, W.F.; Tang, K.T.; Cheng, C.W. Effects of Exogenous Melatonin on Clinical and Pathological Features of a Human Thyroglobulin-Induced Experimental Autoimmune Thyroiditis Mouse Model. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 5886, doi:10.1038/S41598-019-42442-0.
 23. Lewiński, A.; Sewerynek, E. Melatonin Inhibits the Basal and TSH-Stimulated Mitotic Activity of Thyroid Follicular Cells in Vivo and in Organ Culture. *J. Pineal Res.* **1986**, *3*, 291–299, doi:10.1111/J.1600-079X.1986.TB00752.X.
 24. Wright, M.L.; Pikula, A.; Cykowski, L.J.; Kuliga, K. Effect of Melatonin on the Anuran Thyroid Gland: Follicle Cell Proliferation, Morphometry, and Subsequent Thyroid Hormone Secretion in Vitro after Melatonin Treatment in Vivo. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1996**, *103*, 182–191, doi:10.1006/GCEN.1996.0109.
 25. Wu, C.; Jin, X.; Tsueng, G.; Afrasiabi, C.; Su, A.I. BioGPS: Building Your Own Mash-up of Gene Annotations and Expression Profiles. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, D313–D316, doi:10.1093/NAR/GKV1104.
 26. Stelzer, G.; Rosen, N.; Plaschkes, I.; Zimmerman, S.; Twik, M.; Fishilevich, S.; Iny Stein, T.; Nudel, R.; Lieder, I.; Mazor, Y.; et al. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **2016**, *54*, 1.30.1-1.30.33, doi:10.1002/CPBI.5.
 27. Zahn-Zabal, M.; Michel, P.A.; Gateau, A.; Nikitin, F.; Schaeffer, M.; Audot, E.; Gaudet, P.; Duek, P.D.; Teixeira, D.; De Laval, V.R.; et al. The NeXtProt Knowledgebase in 2020: Data, Tools and Usability Improvements. *Nucleic Acids Res.* **2020**, *48*, D328–D334, doi:10.1093/NAR/GKZ995.
 28. Bastian, F.B.; Cammarata, A.B.; Carsanaro, S.; Detering, H.; Huang, W.T.; Joye, S.; Niknejad, A.; Nyamari, M.; De Farias, T.M.; Moretti, S.; et al. Bgee in 2024: Focus on

- Curated Single-Cell RNA-Seq Datasets, and Query Tools. *Nucleic Acids Res.* **2025**, 53, D878–D885, doi:10.1093/NAR/GKAE1118.
29. Uhlén, M.; Fagerberg, L.; Hallström, B.M.; Lindskog, C.; Oksvold, P.; Mardinoglu, A.; Sivertsson, Å.; Kampf, C.; Sjöstedt, E.; Asplund, A.; et al. Proteomics. Tissue-Based Map of the Human Proteome. *Science* (80-.). **2015**, 347, 1260419, doi:10.1126/SCIENCE.1260419.
 30. DeLellis, R.A.; Nikiforov, Y.E. Thyroid and Parathyroid Glands. *Diagnostic Surg. Pathol. Head Neck* **2009**, 563–646, doi:10.1016/B978-1-4160-2589-4.00007-3.
 31. Abrams, G.M. Thyroid and Thyroid Disorders. In *Encyclopedia of the Neurological Sciences*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2014; pp. 465–466 ISBN 9780123851574.
 32. Junqueira, L.; Carnerio, J. *Osnove Histologije - Udžbenik i Atlas*; Bradamante, Ž., Kostović-Knežević, L., Eds.; Školska knjiga: Zagreb, 2005; ISBN 978-953-0-31564-8.
 33. Skugor, M.; Flešeriu, M. Hypothyroidism and Hyperthyroidism. In *Current Clinical Medicine: Expert Consult Premium Edition*; W.B. Saunders, 2010; pp. 416-420.e1 ISBN 9781416066439.
 34. Mihić, D.; Mirat, J.; Včev, A. *Interna Medicina : Udžbenik Za Studente Medicine*; Medicinski fakultet Osijek.; Osijek, 2021; ISBN 9789537736491.
 35. Kumar, V.; Abbas, A.K.; Aster, J.C. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*; Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C., Eds.; 10th ed.; Elsevier, 2021; ISBN 9780323609920.
 36. Fekete, C.; Lechan, R.M. Central Regulation of Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis under Physiological and Pathophysiological Conditions. *Endocr. Rev.* **2014**, 35, 159–194, doi:10.1210/ER.2013-1087.
 37. Ortiga-Carvalho, T.M.; Chiamolera, M.I.; Pazos-Moura, C.C.; Wondisford, F.E. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. *Compr. Physiol.* **2016**, 6, 1387–1428, doi:10.1002/CPHY.C150027.
 38. Pierce, J.G. Eli Lilly Lecture. The Subunits of Pituitary Thyrotropin—Their Relationship to Other Glycoprotein Hormones. *Endocrinology* **1971**, 89, 1331–1344, doi:10.1210/ENDO-89-6-1331.
 39. Shupnik, M.A.; Greenspan, S.L.; Ridgway, E.C. Transcriptional Regulation of Thyrotropin Subunit Genes by Thyrotropin-Releasing Hormone and Dopamine in Pituitary Cell Culture. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 12675–12679, doi:10.1016/S0021-9258(18)67144-3.
 40. Vassart, G.; Dumont, J.E. The Thyrotropin Receptor and the Regulation of Thyrocyte Function and Growth. *Endocr. Rev.* **1992**, 13, 596–611, doi:10.1210/EDRV-13-3-596.
 41. Ragusa, F.; Fallahi, P.; Elia, G.; Gonnella, D.; Paparo, S.R.; Giusti, C.; Churilov, L.P.; Ferrari, S.M.; Antonelli, A. Hashimotos' Thyroiditis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinic and Therapy. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2019**, 33, 101367, doi:10.1016/J.BEEM.2019.101367.
 42. Franco, J.-S.; Amaya-Amaya, J.; Anaya, J.-M. Thyroid Disease and Autoimmune Diseases. In *Autoimmunity: From Bench to Bedside*; Anaya, J., Shoenfeld, Y., Rojas-Villarraga, A., Eds.; El Rosario University Press: Bogota, 2013.
 43. Davies, T.F.; Ando, T.; Lin, R.Y.; Tomer, Y.; Latif, R. Thyrotropin Receptor-Associated Diseases: From Adenomata to Graves Disease. *J. Clin. Invest.* **2005**, 115, 1972–1983, doi:10.1172/JCI26031.
 44. Lynne Burek, C.; Rose, N.R.; Caturegli, P. Thyroglobulin, Thyroperoxidase, and Thyrotropin-Receptor Autoantibodies. *Autoantibodies* **2007**, 403–414, doi:10.1016/B978-044452763-9/50055-X.
 45. Dai, G.; Levy, O.; Carrasco, N. Cloning and Characterization of the Thyroid Iodide

- Transporter. *Nature* **1996**, 379, 458–460, doi:10.1038/379458A0.
46. Tse, L.L.Y.; Chan, J.K.C. Thyroid and Parathyroid. *Mod. Surg. Pathol.* **2009**, 2, 1597–1685, doi:10.1016/B978-1-4160-3966-2.00044-8.
 47. Gentile, F.; Conte, M.; Formisano, S. Thyroglobulin as an Autoantigen: What Can We Learn about Immunopathogenicity from the Correlation of Antigenic Properties with Protein Structure? *Immunology* **2004**, 112, 25, doi:10.1111/J.1365-2567.2004.01861.X.
 48. Fenouillet, E.; Fayet, G.; Hovsepian, S.; Bahraoui, E.M.; Ronin, C. Immunochemical Evidence for a Role of Complex Carbohydrate Chains in Thyroglobulin Antigenicity. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 15153–15158, doi:10.1016/S0021-9258(18)66845-0.
 49. Hutchings, P.R.; Cooke, A.; Dawe, K.; Champion, B.R.; Geysen, M.; Valerio, R.; Roitt, I.M. A Thyroxine-Containing Peptide Can Induce Murine Experimental Autoimmune Thyroiditis. *J. Exp. Med.* **1992**, 175, 869–872, doi:10.1084/JEM.175.3.869.
 50. Arici, M.; Oztas, E.; Yanar, F.; Aksakal, N.; Ozcinar, B.; Ozhan, G. Association between Genetic Polymorphism and Levothyroxine Bioavailability in Hypothyroid Patients. *Endocr. J.* **2018**, 65, 317–323, doi:10.1507/ENDOCRJ.EJ17-0162.
 51. Gereben, B.; Zavacki, A.M.; Ribich, S.; Kim, B.W.; Huang, S.A.; Simonides, W.S.; Zeöld, A.; Bianco, A.C. Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling. *Endocr. Rev.* **2008**, 29, 898–938, doi:10.1210/ER.2008-0019.
 52. Vargas-Uricoechea, H. Molecular Mechanisms in Autoimmune Thyroid Disease. *Cells* **2023**, 12, 918, doi:10.3390/CELLS12060918.
 53. Bach, J.F. The Hygiene Hypothesis in Autoimmunity: The Role of Pathogens and Commensals. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, 18, 105–120, doi:10.1038/nri.2017.111.
 54. McLeod, D.S.A.; Cooper, D.S. The Incidence and Prevalence of Thyroid Autoimmunity. *Endocrine* **2012**, 42, 252–265, doi:10.1007/S12020-012-9703-2.
 55. Wang, S.H.; Baker, J.R. Autoimmune Thyroid Diseases. In *Clinical Immunology: Principles and Practice Expert Consult: Online and Print*; Mosby: Maryland Heights, MO, USA, 2008; pp. 1023–1033 ISBN 9780323044042.
 56. Tomer, Y.; Davies, T.F. Searching for the Autoimmune Thyroid Disease Susceptibility Genes: From Gene Mapping to Gene Function. *Endocr. Rev.* **2003**, 24, 694–717, doi:10.1210/ER.2002-0030.
 57. Anaya, J.M.; Castiblanco, J.; Rojas-Villarraga, A.; Pineda-Tamayo, R.; Levy, R.A.; Gómez-Puerta, J.; Dias, C.; Mantilla, R.D.; Gallo, J.E.; Cervera, R.; et al. The Multiple Autoimmune Syndromes. A Clue for the Autoimmune Tautology. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2012**, 43, 256–264, doi:10.1007/S12016-012-8317-Z.
 58. Pearce, E.N.; Farwell, A.P.; Braverman, L.E. Thyroiditis. *N. Engl. J. Med.* **2003**, 348, 2646–2655, doi:10.1056/NEJMra021194.
 59. Koehler, V.F.; Bojunga, J. Autoimmune Thyroid Disease. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **2021**, 146, 1329–1336, doi:10.1055/A-1258-5674.
 60. Ferrari, S.M.; Fallahi, P.; Mancusi, C.; Colaci, M.; Manfredi, A.; Ferri, C.; Antonelli, A. HCV-Related Autoimmune Disorders in HCV Chronic Infection. *Clin. Ter.* **2013**, 164, e305-12, doi:10.7417/CT.2013.1594.
 61. Jin, B.; Wang, S.; Fan, Z. Pathogenesis Markers of Hashimoto's Disease-A Mini Review. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* **2022**, 27, 297, doi:10.31083/J.FBL2710297.
 62. Watad, A.; Azrielant, S.; Bragazzi, N.L.; Sharif, K.; David, P.; Katz, I.; Aljadeff, G.; Quaresma, M.; Tanay, G.; Adawi, M.; et al. Seasonality and Autoimmune Diseases: The Contribution of the Four Seasons to the Mosaic of Autoimmunity. *J. Autoimmun.* **2017**, 82, 13–30, doi:10.1016/J.JAUT.2017.06.001.
 63. Tores, M.I.; López-Casado, M.A.; León, C.P. de; Lorite, P.; Palomeque, T. Physiology

- and Pathology of Immune Dysregulation: Regulatory T Cells and Anergy. In *Physiology and Pathology of Immunology*; Rezaei, N., Ed.; InTech, 2017.
64. Klubo-Gwiedzinska, J.; Wartofsky, L. Hashimoto Thyroiditis: An Evidence-Based Guide to Etiology, Diagnosis and Treatment. *Polish Arch. Intern. Med.* **2022**, *132*, 16222, doi:10.20452/PAMW.16222.
 65. Dubska, M.; Banga, J.P.; Plochocka, D.; Hoser, G.; Kemp, E.H.; Sutton, B.J.; Gardas, A.; Gora, M. Structural Insights into Autoreactive Determinants in Thyroid Peroxidase Composed of Discontinuous and Multiple Key Contact Amino Acid Residues Contributing to Epitopes Recognized by Patients' Autoantibodies. *Endocrinology* **2006**, *147*, 5995–6003, doi:10.1210/EN.2006-0912.
 66. Orgiazzi, J. Thyroid Autoimmunity. *Press. medicale* **2012**, *41*, e611-25, doi:10.1016/J.LPM.2012.10.002.
 67. Lo Nigro, C.; Macagno, M.; Sangiolo, D.; Bertolaccini, L.; Aglietta, M.; Merlano, M.C. NK-Mediated Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity in Solid Tumors: Biological Evidence and Clinical Perspectives. *Ann. Transl. Med.* **2019**, *7*, 105–105, doi:10.21037/atm.2019.01.42.
 68. Weetman, A.P. Autoimmune Thyroid Disease: Propagation and Progression. *Eur. J. Endocrinol.* **2003**, *148*, 1–9, doi:10.1530/EJE.0.1480001.
 69. Walsh, J.P.; Bremner, A.P.; Feddema, P.; Leedman, P.J.; Brown, S.J.; O'Leary, P. Thyrotropin and Thyroid Antibodies as Predictors of Hypothyroidism: A 13-Year, Longitudinal Study of a Community-Based Cohort Using Current Immunoassay Techniques. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, 1095–1104, doi:10.1210/jc.2009-1977.
 70. Jüngel, A.; Ospelt, C.; Gay, S. What Can We Learn from Epigenetics in the Year 2009? *Curr. Opin. Rheumatol.* **2010**, *22*, 284–292, doi:10.1097/BOR.0B013E3283389641.
 71. Coppedè, F. Epigenetics and Autoimmune Thyroid Diseases. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2017**, *8*, 149, doi:10.3389/FENDO.2017.00149.
 72. Hodge, S.E.; Ban, Y.; Strug, L.J.; Greenberg, D.A.; Davies, T.F.; Concepcion, E.S.; Villanueva, R.; Tomer, Y. Possible Interaction between HLA-DRbeta1 and Thyroglobulin Variants in Graves' Disease. *Thyroid* **2006**, *16*, 351–355, doi:10.1089/THY.2006.16.351.
 73. Katalinić, D.; Alerić, I. *Interna Medicina Za Studente Dentalne Medicine*; Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku: Osijek, 2022; ISBN 978-953-8385-05-6.
 74. Sanyal, D. Spectrum of Hashimoto's Thyroiditis: Clinical, Biochemical & Cytomorphologic Profile. *Indian J. Med. Res.* **2014**, *140*, 710.
 75. Cibas, E.S. Thyroid. In *Cytology: Diagnostic Principles and Clinical Correlates*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2009; pp. 255–284 ISBN 978-1-4160-5329-3.
 76. Cayres, L.C. de F.; de Salis, L.V.V.; Rodrigues, G.S.P.; Lengert, A. van H.; Biondi, A.P.C.; Sargentini, L.D.B.; Brisotti, J.L.; Gomes, E.; de Oliveira, G.L.V. Detection of Alterations in the Gut Microbiota and Intestinal Permeability in Patients With Hashimoto Thyroiditis. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 2579140, doi:10.3389/FIMMU.2021.579140.
 77. Kusić, Z. Novi Hrvatski Propis o Jodiranju Soli. *Liječnički Vjesn.* **1996**, *118*, 306.
 78. WHO *WHO Global Report on Sodium Intake Reduction*; World Health Organization, 2023;
 79. Mincer, D.; Jialal, I. Hashimoto Thyroiditis. In *Advances in Anatomic Pathology*; Ahmed, R., Al-Shaikh, S., Akhtar, M., Eds.; StatPearls Publishing, 2023; Vol. 19, pp. 181–186.

80. Patil, N.; Rehman, A.; Anastasopoulou, C.; Jialal, I. Hypothyroidism. *StatPearls* **2024**.
81. Hollowell, J.G.; Staehling, N.W.; Dana Flanders, W.; Harry Hannon, W.; Gunter, E.W.; Spencer, C.A.; Braverman, L.E. Serum TSH, T(4), and Thyroid Antibodies in the United States Population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2002**, *87*, 489–499, doi:10.1210/JCEM.87.2.8182.
82. Jacobson, D.L.; Gange, S.J.; Rose, N.R.; Graham, N.M.H. Epidemiology and Estimated Population Burden of Selected Autoimmune Diseases in the United States. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **1997**, *84*, 223–243, doi:10.1006/clin.1997.4412.
83. Dayan, C.M.; Daniels, G.H. Chronic Autoimmune Thyroiditis. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *335*, 99–107, doi:10.1056/NEJM199607113350206.
84. Ralli, M.; Angeletti, D.; Fiore, M.; D'Aguanno, V.; Lambiase, A.; Artico, M.; de Vincentiis, M.; Greco, A. Hashimoto's Thyroiditis: An Update on Pathogenic Mechanisms, Diagnostic Protocols, Therapeutic Strategies, and Potential Malignant Transformation. *Autoimmun. Rev.* **2020**, *19*, 102649, doi:10.1016/J.AUTREV.2020.102649.
85. McLeod, D.S.A.; Caturegli, P.; Cooper, D.S.; Matos, P.G.; Hutfless, S. Variation in Rates of Autoimmune Thyroid Disease by Race/Ethnicity in US Military Personnel. *JAMA* **2014**, *311*, 1563–1565, doi:10.1001/JAMA.2013.285606.
86. Zhao, L.; Wu, Q.; Wang, X.; Wang, S.; Shi, X.; Shan, Z.; Teng, W. Reversal of Abnormal CD4⁺ T Cell Metabolism Alleviates Thyroiditis by Deactivating the MTOR/HIF1a/Glycolysis Pathway. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2021**, *12*, 659738, doi:10.3389/FENDO.2021.659738.
87. Rydzewska, M.; Jaromin, M.; Pasierowska, I.E.; Stozek, K.; Bossowski, A. Role of the T and B Lymphocytes in Pathogenesis of Autoimmune Thyroid Diseases. *Thyroid Res.* **2018**, *11*, 1–11, doi:10.1186/s13044-018-0046-9.
88. Luty, J.; Ruckemann-Dziurdzińska, K.; Witkowski, J.M.; Bryl, E. Immunological Aspects of Autoimmune Thyroid Disease - Complex Interplay between Cells and Cytokines. *Cytokine* **2019**, *116*, 128–133, doi:10.1016/J.CYTO.2019.01.003.
89. Lebiecki, F.; Lisowska, K.A. Impact of Vitamin D on Immunopathology of Hashimoto's Thyroiditis: From Theory to Practice. *Nutrients* **2023**, *15*, 3174, doi:10.3390/NU15143174.
90. Chistiakov, D.A. Immunogenetics of Hashimoto's Thyroiditis. *J. Autoimmune Dis.* **2005**, *2*, 1, doi:10.1186/1740-2557-2-1.
91. Zheng, L.; Dou, X.; Song, H.; Wang, P.; Qu, W.; Zheng, X. Bioinformatics Analysis of Key Genes and Pathways in Hashimoto Thyroiditis Tissues. *Biosci. Rep.* **2020**, *40*, BSR20200759, doi:10.1042/BSR20200759.
92. Tamai, H.; Kimura, A.; Dong, R.P.; Matsubayashi, S.; Kuma, K.; Nagataki, S.; Sasazuki, T. Resistance to Autoimmune Thyroid Disease Is Associated with HLA-DQ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1994**, *78*, 94–97, doi:10.1210/JCEM.78.1.8288722.
93. Danailova, Y.; Velikova, T.; Nikolaev, G.; Mitova, Z.; Shinkov, A.; Gagov, H.; Konakchieva, R. Nutritional Management of Thyroiditis of Hashimoto. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 5144, doi:10.3390/IJMS23095144.
94. Wiersinga, W.M. Clinical Relevance of Environmental Factors in the Pathogenesis of Autoimmune Thyroid Disease. *Endocrinol. Metab. (Seoul, Korea)* **2016**, *31*, 213–222, doi:10.3803/ENM.2016.31.2.213.
95. Weetman, A.P. An Update on the Pathogenesis of Hashimoto's Thyroiditis. *J. Endocrinol. Invest.* **2021**, *44*, 883–890, doi:10.1007/S40618-020-01477-1.
96. Jabrocka-Hybel, A.; Skalniak, A.; Piątkowski, J.; Turek-Jabrocka, R.; Vyhouskaya, P.; Ludwig-Słomczyńska, A.; Machlowska, J.; Kapusta, P.; Małcki, M.; Pach, D.; et al.

- How Much of the Predisposition to Hashimoto's Thyroiditis Can Be Explained Based on Previously Reported Associations? *J. Endocrinol. Invest.* **2018**, *41*, 1409–1416, doi:10.1007/S40618-018-0910-4.
97. Guan, H.; De Moraes, N.S.; Stuart, J.; Ahmadi, S.; Marqusee, E.; Kim, M.I.; Alexander, E.K. Discordance of Serological and Sonographic Markers for Hashimoto's Thyroiditis with Gold Standard Histopathology. *Eur. J. Endocrinol.* **2019**, *181*, 539–544, doi:10.1530/EJE-19-0424.
 98. Levine, S. Current Concepts of Thyroiditis. *Arch Intern Med.* **1983**, *143*, 1952–1956.
 99. Caturegli, P.; De Remigis, A.; Rose, N.R. Hashimoto Thyroiditis: Clinical and Diagnostic Criteria. *Autoimmun. Rev.* **2014**, *13*, 391–397, doi:10.1016/J.AUTREV.2014.01.007.
 100. McLachlan, S.M.; Rapoport, B. Why Measure Thyroglobulin Autoantibodies Rather than Thyroid Peroxidase Autoantibodies? *Thyroid* **2004**, *14*, 510–520, doi:10.1089/1050725041517057.
 101. Rose, N.R. Prediction and Prevention of Autoimmune Disease: A Personal Perspective. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1109*, 117–128, doi:10.1196/ANNALS.1398.014.
 102. Surks, M.I.; Ortiz, E.; Daniels, G.H.; Sawin, C.T.; Col, N.F.; Cobin, R.H.; Franklyn, J.A.; Hershman, J.M.; Burman, K.D.; Denke, M.A.; et al. Subclinical Thyroid Disease: Scientific Review and Guidelines for Diagnosis and Management. *JAMA* **2004**, *291*, 228–238, doi:10.1001/JAMA.291.2.228.
 103. Barić, A.; Brčić, L.; Gračan, S.; Škrabić, V.; Brekalo, M.; Šimunac, M.; Lovrić, V.T.; Anić, I.; Barbalić, M.; Zemunik, T.; et al. Thyroglobulin Antibodies Are Associated with Symptom Burden in Patients with Hashimoto's Thyroiditis: A Cross-Sectional Study. *Immunol. Invest.* **2019**, *48*, 198–209, doi:10.1080/08820139.2018.1529040.
 104. Lazarus, J.H. Iodine Status in Europe in 2014. *Eur. Thyroid J.* **2014**, *3*, 6, doi:10.1159/000358873.
 105. Hanna, H.W.Z.; Rizzo, C.; Abdel Halim, R.M.; El Haddad, H.E.; Salam, R.; El-Sayed Abou-Youssef, H. Vitamin D Status in Hashimoto's Thyroiditis and Its Association with Vitamin D Receptor Genetic Variants. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2021**, *212*, 105922, doi:10.1016/J.JSBMB.2021.105922.
 106. Kim, D. The Role of Vitamin D in Thyroid Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1949, doi:10.3390/ijms18091949.
 107. Rolf, L.; Muris, A.H.; Hupperts, R.; Damoiseaux, J. Illuminating Vitamin D Effects on B Cells – the Multiple Sclerosis Perspective. *Immunology* **2016**, *147*, 275, doi:10.1111/IMM.12572.
 108. Wang, S.; Wu, Y.; Zuo, Z.; Zhao, Y.; Wang, K. The Effect of Vitamin D Supplementation on Thyroid Autoantibody Levels in the Treatment of Autoimmune Thyroiditis: A Systematic Review and a Meta-Analysis. *Endocrine* **2018**, *59*, 499–505, doi:10.1007/S12020-018-1532-5.
 109. Salnikow, K. Role of Iron in Cancer. *Semin. Cancer Biol.* **2021**, *76*, 189–194, doi:10.1016/J.SEMCANCER.2021.04.001.
 110. Benvenga, S.; Ferrari, S.M.; Elia, G.; Ragusa, F.; Patrizio, A.; Paparo, S.R.; Camastra, S.; Bonofiglio, D.; Antonelli, A.; Fallahi, P. Nutraceuticals in Thyroidology: A Review of in Vitro, and in Vivo Animal Studies. *Nutrients* **2020**, *12*, 1337, doi:10.3390/NU12051337.
 111. Shaker, S.; Meghad, M.; Mahfouz, M.; Hassanien, T.; Mahmoud, B.; Salem, T. Thyroid –Pineal Axis: Melatonin, Circadian Clock Genes Expression and Vitamin D in Hashimoto's Thyroiditis Patients. *Preprints* **2022**, 22.
 112. Shivaleela; Murthy, J. Serum Calcium and Phosphorous Levels in Thyroid Dysfunction. *Ind J Fund Appl Life Sci* **2012**, *2*, 179–183.

113. Hassan, E.E.; Ashmaik, A.S.; Gabra, H.M.; M Elzein, A.O.; Eldin AShrif, N.M.; Hassan Assessment, E.E. Assessment of Serum Levels of Calcium and Phosphorous in Sudanese Patients with Hypothyroidism. *Asian J. Biomed. Pharm. Sci.* **2013**, *2*, 22.
114. Abdel-Gayoum, A.A. Dyslipidemia and Serum Mineral Profiles in Patients with Thyroid Disorders. *Saudi Med. J.* **2014**, *35*, 1469.
115. Rayman, M.P. Multiple Nutritional Factors and Thyroid Disease, with Particular Reference to Autoimmune Thyroid Disease. *Proc. Nutr. Soc.* **2019**, *78*, 34–44, doi:10.1017/S0029665118001192.
116. Luo, J.; Hendryx, M.; Dinh, P.; He, K. Association of Iodine and Iron with Thyroid Function. *Biol. Trace Elem. Res.* **2017**, *179*, 38–44, doi:10.1007/S12011-017-0954-X/METRICS.
117. Knezevic, J.; Starchl, C.; Berisha, A.T.; Amrein, K. Thyroid-Gut-Axis: How Does the Microbiota Influence Thyroid Function? *Nutrients* **2020**, *12*, 1769, doi:10.3390/NU12061769.
118. Giannakou, M.; Saltiki, K.; Mantzou, E.; Loukari, E.; Philippou, G.; Terzidis, K.; Stavrianos, C.; Kyprianou, M.; Psaltopoulou, T.; Karatzi, K.; et al. The Effect of Obesity and Dietary Habits on Oxidative Stress in Hashimoto's Thyroiditis. *Endocr. Connect.* **2018**, *7*, 990–997, doi:10.1530/EC-18-0272.
119. Pekgor, S.; Duran, C.; Kutlu, R.; Solak, I.; Pekgor, A.; Eryilmaz, M.A. Visceral Adiposity Index Levels in Patients with Hypothyroidism. *J. Natl. Med. Assoc.* **2018**, *110*, 606–613, doi:10.1016/J.JNMA.2018.03.009.
120. Taylor, E.B. The Complex Role of Adipokines in Obesity, Inflammation, and Autoimmunity. *Clin. Sci. (London, England)* **2021**, *135*, 731, doi:10.1042/CS20200895.
121. Kwiat, V.R.; Reis, G.; Valera, I.C.; Parvatiyar, K.; Parvatiyar, M.S. Autoimmunity as a Sequela to Obesity and Systemic Inflammation. *Front. Physiol.* **2022**, *13*, 887702, doi:10.3389/FPHYS.2022.887702.
122. Ortega, F.B.; Sui, X.; Lavie, C.J.; Blair, S.N. Body Mass Index, the Most Widely Used But Also Widely Criticized Index: Would a Criterion Standard Measure of Total Body Fat Be a Better Predictor of Cardiovascular Disease Mortality? *Mayo Clin. Proc.* **2016**, *91*, 443–455, doi:10.1016/J.MAYOCP.2016.01.008.
123. Baranowska-Bik, A.; Bik, W. The Association of Obesity with Autoimmune Thyroiditis and Thyroid Function-Possible Mechanisms of Bilateral Interaction. *Int. J. Endocrinol.* **2020**, *2020*, 8894792, doi:10.1155/2020/8894792.
124. Yang, H.; Xia, Q.; Shen, Y.; Chen, T.L.; Wang, J.; Lu, Y.Y. Gender-Specific Impact of Metabolic Obesity Phenotypes on the Risk of Hashimoto's Thyroiditis: A Retrospective Data Analysis Using a Health Check-Up Database. *J. Inflamm. Res.* **2022**, *15*, 827–837, doi:10.2147/JIR.S353384.
125. Huo, J.; Xu, Y.; Yu, J.; Guo, Y.; Hu, X.; Ou, D.; Qu, R.; Zhao, L. Causal Association between Body Mass Index and Autoimmune Thyroiditis: Evidence from Mendelian Randomization. *Eur. J. Med. Res.* **2023**, *28*, 526, doi:10.1186/S40001-023-01480-1.
126. Song, R.H.; Wang, B.; Yao, Q.M.; Li, Q.; Jia, X.; Zhang, J.A. The Impact of Obesity on Thyroid Autoimmunity and Dysfunction: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2349, doi:10.3389/FIMMU.2019.02349.
127. Loos, R.J.F.; Yeo, G.S.H. The Genetics of Obesity: From Discovery to Biology. *Nat. Rev. Genet.* **2022**, *23*, 120–133, doi:10.1038/S41576-021-00414-Z.
128. Venkatesh, S.S.; Ganjgahi, H.; Palmer, D.S.; Coley, K.; Linchangco, G. V.; Hui, Q.; Wilson, P.; Ho, Y.L.; Cho, K.; Arumäe, K.; et al. Characterising the Genetic Architecture of Changes in Adiposity during Adulthood Using Electronic Health Records. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 5801, doi:10.1038/S41467-024-49998-0.

129. Schousboe, K.; Willemsen, G.; Kyvik, K.O.; Mortensen, J.; Boomsma, D.I.; Cornes, B.K.; Davis, C.J.; Fagnani, C.; Hjelmberg, J.; Kaprio, J.; et al. Sex Differences in Heritability of BMI: A Comparative Study of Results from Twin Studies in Eight Countries. *Twin Res.* **2003**, *6*, 409–421, doi:10.1375/136905203770326411.
130. Schrepft, S.; Van Jaarsveld, C.H.M.; Fisher, A.; Herle, M.; Smith, A.D.; Fildes, A.; Llewellyn, C.H. Variation in the Heritability of Child Body Mass Index by Obesogenic Home Environment. *JAMA Pediatr.* **2018**, *172*, 1153–1160, doi:10.1001/JAMAPEDIATRICS.2018.1508.
131. Škrlec, I. The Influence of Dental Implants on the Circadian Clock and the Role of Melatonin in the Oral Cavity. *Explor. Res. Hypothesis Med.* **2023**, *8*, 143–149, doi:10.14218/ERHM.2022.00052.
132. Minich, D.M.; Henning, M.; Darley, C.; Fahoum, M.; Schuler, C.B.; Frame, J. Is Melatonin the “Next Vitamin D”? A Review of Emerging Science, Clinical Uses, Safety, and Dietary Supplements. *Nutrients* **2022**, *14*, 3934, doi:10.3390/NU14193934.
133. Pandi-Perumal, S.R.; Srinivasan, V.; Maestroni, G.J.M.; Cardinali, D.P.; Poeggeler, B.; Hardeland, R. Melatonin: Nature’s Most Versatile Biological Signal? *FEBS J.* **2006**, *273*, 2813–2838, doi:10.1111/J.1742-4658.2006.05322.X.
134. Mahmood, D. Pleiotropic Effects of Melatonin. *Drug Res. (Stuttg).* **2019**, *69*, 65–74, doi:10.1055/A-0656-6643.
135. Axelrod, J. The Pineal Gland: A Neurochemical Transducer. *Science (80-.)*. **1974**, *184*, 1341–1348, doi:10.1126/SCIENCE.184.4144.1341.
136. Srinivasan, V.; Spence, D.W.; Trakht, I.; Pandi-Perumal, S.R.; Cardinali, D.P.; Maestroni, G.J. Immunomodulation by Melatonin: Its Significance for Seasonally Occurring Diseases. *Neuroimmunomodulation* **2008**, *15*, 93–101, doi:10.1159/000148191.
137. Moore, R.Y. Neural Control of the Pineal Gland. *Behav. Brain Res.* **1996**, *73*, 125–130, doi:10.1016/0166-4328(96)00083-6.
138. Claustat, B.; Brun, J.; Chazot, G. The Basic Physiology and Pathophysiology of Melatonin. *Sleep Med. Rev.* **2005**, *9*, 11–24, doi:10.1016/j.smrv.2004.08.001.
139. Bergiannaki, J. -D; Soldatos, C.R.; Paparrigopoulos, T.J.; Syrengelas, M.; Stefanis, C.N. Low and High Melatonin Excretors among Healthy Individuals. *J. Pineal Res.* **1995**, *18*, 159–164, doi:10.1111/J.1600-079X.1995.TB00155.X.
140. Leger, D.; Laudon, M.; Zisapel, N. Nocturnal 6-Sulfatoxymelatonin Excretion in Insomnia and Its Relation to the Response to Melatonin Replacement Therapy. *Am. J. Med.* **2004**, *116*, 91–95, doi:10.1016/j.amjmed.2003.07.017.
141. Honma, K.I.; Honma, S.; Kohsaka, M.; Fukuda, N. Seasonal Variation in the Human Circadian Rhythm: Dissociation between Sleep and Temperature Rhythm. *Am. J. Physiol.* **1992**, *262*, R885–91, doi:10.1152/AJPREGU.1992.262.5.R885.
142. Lochner, A.; Marais, E.; Huisamen, B. Melatonin and Cardioprotection against Ischaemia/Reperfusion Injury: What’s New? A Review. *J. Pineal Res.* **2018**, *65*, e12490, doi:10.1111/JPI.12490.
143. Han, D.; Wang, Y.Y.; Chen, J.; Zhang, J.; Yu, P.; Zhang, R.; Li, S.; Tao, B.; Wang, Y.Y.; Qiu, Y.; et al. Activation of Melatonin Receptor 2 but Not Melatonin Receptor 1 Mediates Melatonin-Conferred Cardioprotection against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *J. Pineal Res.* **2019**, *67*, e12571, doi:10.1111/JPI.12571.
144. Pioli, C.; Caroleo, M.C.; Nistico, G.; Doriac, G. Melatonin Increases Antigen Presentation and Amplifies Specific and Non Specific Signals for T-Cell Proliferation. *Int. J. Immunopharmacol.* **1993**, *15*, 463–468, doi:10.1016/0192-0561(93)90060-C.
145. Torres-Ruiz, J.; Sulli, A.; Cutolo, M.; Shoenfeld, Y. Air Travel, Circadian Rhythms/Hormones, and Autoimmunity. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **2017**, *53*, 117–

- 125, doi:10.1007/S12016-017-8599-2.
146. Manzel, A.; Muller, D.N.; Hafler, D.A.; Erdman, S.E.; Linker, R.A.; Kleinewietfeld, M. Role of “Western Diet” in Inflammatory Autoimmune Diseases. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **2014**, *14*, 404, doi:10.1007/S11882-013-0404-6.
 147. Soszynski, P.; Zgliczynski, S.; Pucilowska, J. The Circadian Rhythm of Melatonin in Hypothyroidism and Hyperthyroidism. *Acta Endocrinol. (Copenh).* **1988**, *119*, 240–244, doi:10.1530/ACTA.0.1190240.
 148. Fang, N.; Hu, C.; Sun, W.; Xu, Y.; Gu, Y.; Wu, L.; Peng, Q.; Reiter, R.J.; Liu, L. Identification of a Novel Melatonin-Binding Nuclear Receptor: Vitamin D Receptor. *J. Pineal Res.* **2020**, *68*, e12618, doi:10.1111/JPL.12618.
 149. Maas, M.B.; Lizza, B.D.; Abbott, S.M.; Liotta, E.M.; Gendy, M.; Eed, J.; Naidech, A.M.; Reid, K.J.; Zee, P.C. Factors Disrupting Melatonin Secretion Rhythms during Critical Illness. *Crit. Care Med.* **2020**, *48*, 854, doi:10.1097/CCM.0000000000004333.
 150. Kubota, T.; Uchiyama, M.; Suzuki, H.; Shibui, K.; Kim, K.; Tan, X.; Tagaya, H.; Okawa, M.; Inoué, S. Effects of Nocturnal Bright Light on Saliva Melatonin, Core Body Temperature and Sleep Propensity Rhythms in Human Subjects. *Neurosci. Res.* **2002**, *42*, 115–122, doi:10.1016/S0168-0102(01)00310-8.
 151. Muñoz-Hoyos, A.; Fernández-García, J.M.; Molina-Carballo, A.; Macías, M.; Escames, G.; Ruiz-Cosano, C.; Acuña-Castroviejo, D. Effect of Clonidine on Plasma ACTH, Cortisol and Melatonin in Children. *J. Pineal Res.* **2000**, *29*, 48–53, doi:10.1034/J.1600-079X.2000.290107.X.
 152. Nikolaev, G.; Robeva, R.; Konakchieva, R. Membrane Melatonin Receptors Activated Cell Signaling in Physiology and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *23*, 471, doi:10.3390/IJMS23010471.
 153. Sedova, K.A.; Bernikova, O.G.; Cuprova, J.I.; Ivanova, A.D.; Kutaeva, G.A.; Pliss, M.G.; Lopatina, E. V.; Vaykshnorayte, M.A.; Diez, E.R.; Azarov, J.E. Association Between Antiarrhythmic, Electrophysiological, and Antioxidative Effects of Melatonin in Ischemia/Reperfusion. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 6331, doi:10.3390/IJMS20246331.
 154. Dubocovich, M.L.; Markowska, M. Functional MT1 and MT2 Melatonin Receptors in Mammals. *Endocrine* **2005**, *27*, 101–110, doi:10.1385/ENDO:27:2:101.
 155. Lopez-Gonzalez, M.A.; Calvo, J.R.; Osuna, C.; Guerrero, J.M. Interaction of Melatonin with Human Lymphocytes: Evidence for Binding Sites Coupled to Potentiation of Cyclic AMP Stimulated by Vasoactive Intestinal Peptide and Activation of Cyclic GMP. *J. Pineal Res.* **1992**, *12*, 97–104, doi:10.1111/J.1600-079X.1992.TB00034.X.
 156. Garcia-Marin, R.; Fernandez-Santos, J.M.; Morillo-Bernal, J.; Gordillo-Martinez, F.; Vazquez-Roman, V.; Utrilla, J.C.; Carrillo-Vico, A.; Guerrero, J.M.; Martin-Lacave, I. Melatonin in the Thyroid Gland: Regulation by Thyroid-Stimulating Hormone and Role in Thyroglobulin Gene Expression. *J. Physiol. Pharmacol.* **2015**, *66*, 643–652.
 157. Ghorbani-Anarkooli, M.; Dabirian, S.; Zendedel, A.; Moladoust, H.; Bahadori, M. hadi Effects of Melatonin on the Toxicity and Proliferation of Human Anaplastic Thyroid Cancer Cell Line. *Acta Histochem.* **2021**, *123*, 151700, doi:10.1016/J.ACTHIS.2021.151700.
 158. Liu, X.; Miao, Y.; Liu, C.; Lu, W.; Feng, Q.; Zhang, Q. Identification of Multiple Novel Susceptibility Genes Associated with Autoimmune Thyroid Disease. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1161311, doi:10.3389/FIMMU.2023.1161311.
 159. Zucker, R.; Kovalerchik, M.; Stern, A.; Kaufman, H.; Linial, M. Revealing the Genetic Complexity of Hypothyroidism: Integrating Complementary Association Methods. *Front. Genet.* **2024**, *15*, 1409226, doi:10.3389/FGENE.2024.1409226.
 160. Saevarsdottir, S.; Bjarnadottir, K.; Markusson, T.; Berglund, J.; Olafsdottir, T.A.;

- Halldorsson, G.H.; Rutsdottir, G.; Gunnarsdottir, K.; Arnthorsson, A.O.; Lund, S.H.; et al. Start Codon Variant in LAG3 Is Associated with Decreased LAG-3 Expression and Increased Risk of Autoimmune Thyroid Disease. *Nat. Commun.* **2024**, *15*, 5748, doi:10.1038/S41467-024-50007-7.
161. Slominski, R.M.; Reiter, R.J.; Schlabritz-Loutsevitch, N.; Ostrom, R.S.; Slominski, A.T. Melatonin Membrane Receptors in Peripheral Tissues: Distribution and Functions. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *351*, 152, doi:10.1016/J.MCE.2012.01.004.
 162. Barjavel, M.J.; Mamdouh, Z.; Raghbati, N.; Bakouche, O. Differential Expression of the Melatonin Receptor in Human Monocytes. *J. Immunol.* **1998**, *160*, 1191–1197, doi:10.4049/JIMMUNOL.160.3.1191.
 163. Abdulla, S.; Aevermann, B.; Assis, P.; Badajoz, S.; Bell, S.M.; Bezzi, E.; Cakir, B.; Chaffer, J.; Chambers, S.; Cherry, J.M.; et al. CZ CELL×GENE Discover: A Single-Cell Data Platform for Scalable Exploration, Analysis and Modeling of Aggregated Data. *bioRxiv* **2023**, 2023.10.30.563174, doi:10.1101/2023.10.30.563174.
 164. Gong, Q.; Sharma, M.; Kuan, E.L.; Glass, M.C.; Chander, A.; Singh, M.; Graybuck, L.T.; Thomson, Z.J.; LaFrance, C.M.; Zaim, S.R.; et al. Longitudinal Multi-Omic Immune Profiling Reveals Age-Related Immune Cell Dynamics in Healthy Adults. *bioRxiv* **2024**, doi:10.1101/2024.09.10.612119.
 165. Tan, X.; Ciuculete, D.M.; Schiöth, H.B.; Benedict, C. Associations between Chronotype, MTNR1B Genotype and Risk of Type 2 Diabetes in UK Biobank. *J. Intern. Med.* **2020**, *287*, 189–196, doi:10.1111/JOIM.12994.
 166. Manning, A.K.; Hivert, M.F.; Scott, R.A.; Grimsby, J.L.; Bouatia-Naji, N.; Chen, H.; Rybin, D.; Liu, C.T.; Bielak, L.F.; Prokopenko, I.; et al. A Genome-Wide Approach Accounting for Body Mass Index Identifies Genetic Variants Influencing Fasting Glycemic Traits and Insulin Resistance. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 659, doi:10.1038/NG.2274.
 167. Park, S.; Kim, S.; Kim, B.; Kim, D.S.; Kim, J.; Ahn, Y.; Kim, H.; Song, M.; Shim, I.; Jung, S.H.; et al. Multivariate Genomic Analysis of 5 Million People Elucidates the Genetic Architecture of Shared Components of the Metabolic Syndrome. *Nat. Genet.* **2024**, doi:10.1038/S41588-024-01933-1.
 168. Renström, F.; Koivula, R.W.; Varga, T. V.; Hallmans, G.; Mulder, H.; Florez, J.C.; Hu, F.B.; Franks, P.W. Season-Dependent Associations of Circadian Rhythm-Regulating Loci (CRY1, CRY2 and MTNR1B) and Glucose Homeostasis: The GLACIER Study. *Diabetologia* **2015**, *58*, 997–1005, doi:10.1007/S00125-015-3533-8.
 169. Soranzo, N.; Sanna, S.; Wheeler, E.; Gieger, C.; Radke, D.; Dupuis, J.; Bouatia-Naji, N.; Langenberg, C.; Prokopenko, I.; Stoleran, E.; et al. Common Variants at 10 Genomic Loci Influence Hemoglobin A1C Levels via Glycemic and Nonglycemic Pathways. *Diabetes* **2010**, *59*, 3229, doi:10.2337/DB10-0502.
 170. Kraja, A.T.; Vaidya, D.; Pankow, J.S.; Goodarzi, M.O.; Assimes, T.L.; Kullo, I.J.; Sovio, U.; Mathias, R.A.; Sun, Y. V.; Franceschini, N.; et al. A Bivariate Genome-Wide Approach to Metabolic Syndrome: STAMPEED Consortium. *Diabetes* **2011**, *60*, 1329–1339, doi:10.2337/DB10-1011/-/DC1.
 171. Dixon, A.L.; Liang, L.; Moffatt, M.F.; Chen, W.; Heath, S.; Wong, K.C.C.; Taylor, J.; Burnett, E.; Gut, I.; Farrall, M.; et al. A Genome-Wide Association Study of Global Gene Expression. *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 1202–1207, doi:10.1038/NG2109.
 172. Ward, L.D.; Kellis, M. HaploReg: A Resource for Exploring Chromatin States, Conservation, and Regulatory Motif Alterations within Sets of Genetically Linked Variants. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D930–D934, doi:10.1093/NAR/GKR917.
 173. Silva, A.C.P. e.; Santos, M.J. dos; Koike, B.D.V.; Moreira, M.S.A.; Gitai, D.L.G.; de Miranda Coelho, J.A.P.; de Andrade, T.G. Melatonin Receptor 1B -1193T>C

- Polymorphism Is Associated with Diurnal Preference and Sleep Habits. *Sleep Med.* **2019**, 53, 106–114, doi:10.1016/J.SLEEP.2018.09.023.
174. Santos, R.C.; Silva, A.C.P. e.; José dos Santos, M.; Barbosa, M.R.; Coimbra, D.G.; Gitaí, D.L.G.; de Andrade, T.G. Environmental Temperature as a Mediator on the Association between Photoperiod at Birth and Chronotype. *Chronobiol. Int.* **2020**, 37, 1662–1668, doi:10.1080/07420528.2020.1773843.
 175. Lonsdale, J.; Thomas, J.; Salvatore, M.; Phillips, R.; Lo, E.; Shad, S.; Hasz, R.; Walters, G.; Garcia, F.; Young, N.; et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project. *Nat. Genet.* **2013**, 45, 580–585, doi:10.1038/NG.2653.
 176. Rosmalen, J.; Leenen, P.; Drexhage, H. Autoimmune Disease: Aetiology and Pathogenesis. *Encycl. Life Sci.* **2003**, 2, 349–360, doi:10.1038/NPG.ELS.0001277.
 177. Nicole, J.A.; Iván, G.A. Immunopathogenesis of Autoimmune Diseases. *Rev. Médica Clínica Las Condes* **2012**, 23, 464–472, doi:10.1016/S0716-8640(12)70337-1.
 178. Carrillo-Vico, A.; Guerrero, J.M.; Lardone, P.J.; Reiter, R.J. A Review of the Multiple Actions of Melatonin on the Immune System. *Endocrine* **2005**, 27, 189–200, doi:10.1385/ENDO:27:2:189.
 179. Van Der Spoel, E.; Roelfsema, F.; Van Heemst, D.; Forrest, D.; Murakami, M.; Marri, H.I.; Biotech, M.; Aramaki, C.M. Within-Person Variation in Serum Thyrotropin Concentrations: Main Sources, Potential Underlying Biological Mechanisms, and Clinical Implications. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2021**, 12, 619568, doi:10.3389/FENDO.2021.619568.
 180. Cipolla-Neto, J.; Amaral, F.G.; Afeche, S.C.; Tan, D.X.; Reiter, R.J. Melatonin, Energy Metabolism, and Obesity: A Review. *J. Pineal Res.* **2014**, 56, 371–381, doi:10.1111/JPI.12137.
 181. Lange, T.; Dimitrov, S.; Born, J. Effects of Sleep and Circadian Rhythm on the Human Immune System. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2010**, 1193, 48–59, doi:10.1111/J.1749-6632.2009.05300.X.
 182. Reiter, R.J.; Tan, D.X.; Galano, A. Melatonin: Exceeding Expectations. *Physiology (Bethesda)*. **2014**, 29, 325–333, doi:10.1152/PHYSIOL.00011.2014.
 183. Karaaslan, C.; Suzen, S. Antioxidant Properties of Melatonin and Its Potential Action in Diseases. *Curr. Top. Med. Chem.* **2015**, 15, 894–903, doi:10.2174/1568026615666150220120946.
 184. Ceballos, D.; Hernández-Camba, A.; Ramos, L. Diet and Microbiome in the Beginning of the Sequence of Gut Inflammation. *World J. Clin. cases* **2021**, 9, 11122–11147, doi:10.12998/WJCC.V9.I36.11122.
 185. de Albuquerque, Y.M.L.; da Silva, W.E.; Souza, F. de A.L.; Teixeira, V.W.; Teixeira, Á.A.C. Melatonin on Hypothyroidism and Gonadal Development in Rats: A Review. *JBRA Assist. Reprod.* **2020**, 24, 498, doi:10.5935/1518-0557.20200053.
 186. Mansharipova, A.; Moldabek, G.; Abylaiuly, Z. Melatonin Drug Use in Complex Treatment of Hypothyroidism Manifest. 13th European Congress of Endocrinology. *Endocr. Abstr.* **2011**, 26, P394.
 187. D'Angelo, G.; Marseglia, L.; Manti, S.; Colavita, L.; Cuppari, C.; Impellizzeri, P.; Arena, S.; Arrigo, T.; Salpietro, C.; Gitto, E. Atopy and Autoimmune Thyroid Diseases: Melatonin Can Be Useful? *Ital. J. Pediatr.* **2016**, 42, 95, doi:10.1186/S13052-016-0305-0.
 188. Škrlec, I.; Milić, J.; Heffer, M.; Wagner, J.; Peterlin, B. Circadian Clock Genes and Circadian Phenotypes in Patients with Myocardial Infarction. *Adv. Med. Sci.* **2019**, 64, 224–229, doi:https://doi.org/10.1016/j.advms.2018.12.003.
 189. Škrlec, I.; Milić, J.; Heffer, M.; Steiner, R.; Peterlin, B.; Wagner, J. Association of Circadian Rhythm with Myocardial Infarction. *Acta Clin. Croat.* **2018**, 57, 480–485,

- doi:10.20471/ACC.2018.57.03.11.
190. Goel, N.; Basner, M.; Rao, H.; Dinges, D.F. Circadian Rhythms, Sleep Deprivation, and Human Performance. *Prog Mol Biol Transl Sci* **2013**, *119*, 155–190, doi:10.1016/B978-0-12-396971-2.00007-5.
 191. Horne, J.A.; Ostberg, O. A Self-Assessment Questionnaire to Determine Morningness-Eveningness in Human Circadian Rhythms. *Int J Chronobiol* **1976**, *4*, 97–110.
 192. Zavada, A.; Gordijn, M.C.M.; Beersma, D.G.M.; Daan, S.; Roenneberg, T. Comparison of the Munich Chronotype Questionnaire with the Horne-Ostberg's Morningness-Eveningness Score. *Chronobiol. Int.* **2005**, *22*, 267–278.
 193. Roenneberg, T.; Wirz-Justice, A.; Mewes, M. Life between Clocks: Daily Temporal Patterns of Human Chronotypes. *J. Biol. Rhythms* **2003**, *18*, 80–90, doi:10.1177/0748730402239679.
 194. Roenneberg, T.; Mewes, M. Entrainment of the Human Circadian Clock. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **2007**, *72*, 293–299, doi:10.1101/sqb.2007.72.043.
 195. Roenneberg, T.; Kuehnle, T.; Juda, M.; Kantermann, T.; Allebrandt, K.; Gordijn, M.; Mewes, M. Epidemiology of the Human Circadian Clock. *Sleep Med Rev* **2007**, *11*, 429–438, doi:10.1016/j.smrv.2007.07.005.
 196. Kalmbach, D.A.; Schneider, L.D.; Cheung, J.; Bertrand, S.J.; Kariharan, T.; Pack, A.I.; Gehrman, P.R. Genetic Basis of Chronotype in Humans: Insights from Three Landmark GWAS. *Sleep* **2016**, *40*, 1–10, doi:10.1093/sleep/zsw048.
 197. Cermakian, N.; Boivin, D.B. A Molecular Perspective of Human Circadian Rhythm Disorders. *Brain Res Brain Res Rev* **2003**, *42*, 204–220.
 198. Luiz Bezerra de Pontes, A.; Clara Galvão Januário Engelberth, R.; da Silva Nascimento, E.; Cley Cavalcante, J.; Stela Maris de Oliveira Costa, M.; Pinato, L.; Antonio Barbosa de Toledo, C.; de Souza Cavalcante, J.; da Silva Nascimento Jr, E. Serotonin and Circadian Rhythms. *Psychol. Neurosci.* **2010**, *3*, 217–228, doi:10.3922/J.PSNS.2010.2.011.
 199. Jang, S.; Park, I.; Choi, M.; Kim, J.; Yeo, S.; Huh, S.O.; Choi, J.W.; Moon, C.; Choe, H.K.; Choe, Y.; et al. Impact of the Circadian Nuclear Receptor REV-ERB α in Dorsal Raphe 5-HT Neurons on Social Interaction Behavior, Especially Social Preference. *Exp. Mol. Med.* **2023**, *55*, 1806–1819, doi:10.1038/S12276-023-01052-7.
 200. Helvacı, N.; Oguz, S.H.; Kabacam, S.; Karabulut, E.; Akbiyik, F.; Alikasifoglu, M.; Gurlek, A. Clock Gene PERIOD3 Polymorphism Is Associated with Susceptibility to Graves' Disease but Not to Hashimoto's Thyroiditis. *Chronobiol. Int.* **2019**, *36*, 1343–1350, doi:10.1080/07420528.2019.1642909.
 201. Irwin, M.R. Sleep and Inflammation: Partners in Sickness and in Health. *Nat. Rev. Immunol.* **2019**, *19*, 702–715, doi:10.1038/S41577-019-0190-Z.
 202. Xerfan, E.M.S.; Facina, A.S.; Andersen, M.L.; Tufik, S.; Tomimori, J. Hashimoto Thyroiditis as a Cause or Consequence of Obstructive Sleep Apnea. *J. Clin. Sleep Med.* **2019**, *15*, 1703, doi:10.5664/JCSM.8054.
 203. Arosemena, M.A.; Ramos, A.R.; Marcus, E.N.; Slota, K.A.; Cheung, J.; Castillo, P.R. Primary Hypothyroidism and Chronotypes in Adult Women. *BMC Res. Notes* **2022**, *15*, 52, doi:10.1186/S13104-022-05934-3.
 204. Knutson, K.L.; von Schantz, M. Associations between Chronotype, Morbidity and Mortality in the UK Biobank Cohort. *Chronobiol. Int.* **2018**, *35*, 1045–1053, doi:10.1080/07420528.2018.1454458.
 205. Bellastella, G.; Maiorino, M.I.; Scappaticcio, L.; De Bellis, A.; Mercadante, S.; Esposito, K.; Bellastella, A. Chronothyroidology: Chronobiological Aspects in Thyroid Function and Diseases. *Life (Basel, Switzerland)* **2021**, *11*, 426, doi:10.3390/LIFE11050426.

206. Zhu, H.; Zhao, Z.; Liu, H.; Cai, J.; Lu, Q.; Ji, L.; Xu, J. The Melatonin Receptor 1B Gene Links Circadian Rhythms and Type 2 Diabetes Mellitus: An Evolutionary Story. *Ann. Med.* **2023**, *55*, 1262–1286, doi:10.1080/07853890.2023.2191218.
207. Chen, Y.; Yang, L.; Liang, Y.Y.; He, Z.; Ai, Q.-Y.H.Y.H.; Chen, W.; Xue, H.; Zhou, M.; Wang, Y.; Ma, H.; et al. Interaction of Night Shift Work with Polymorphism in Melatonin Receptor 1B Gene on Incident Stroke. *Scand. J. Work. Environ. Health* **2022**, *48*, 372, doi:10.5271/SJWEH.4025.
208. Wang, B.; Zhou, Y.; Niu, T.; Yin, M.; Cui, S. The Regulatory Role of Melatonin in Pituitary Thyroid-Stimulating Hormone Synthesis through Casein Kinase 1 α . *Biocell* **2024**, *48*, 327–338, doi:10.32604/BIOCELL.2023.044630.
209. Johns, M.W. A New Method for Measure Daytime Sleepiness: The Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* **1991**, *14*, 540–545.
210. Song, L.; Lei, J.; Jiang, K.; Lei, Y.; Tang, Y.; Zhu, J.; Li, Z.; Tang, H. The Association Between Subclinical Hypothyroidism and Sleep Quality: A Population-Based Study. *Risk Manag. Healthc. Policy* **2019**, *12*, 369, doi:10.2147/RMHP.S234552.
211. Irwin, M.R. Why Sleep Is Important for Health: A Psychoneuroimmunology Perspective. *Annu. Rev. Psychol.* **2015**, *66*, 143, doi:10.1146/ANNUREV-PSYCH-010213-115205.
212. Bahammam, S.A.; Sharif, M.M.; Jammah, A.A.; Bahammam, A.S. Prevalence of Thyroid Disease in Patients with Obstructive Sleep Apnea. *Respir. Med.* **2011**, *105*, 1755–1760, doi:10.1016/J.RMED.2011.07.007.
213. Lin, C.C.; Tsan, K.W.; Chen, P.J. The Relationship between Sleep Apnea Syndrome and Hypothyroidism. *Chest* **1992**, *102*, 1663–1667, doi:10.1378/CHEST.102.6.1663.
214. Pereira, J.C.; Andersen, M.L. The Role of Thyroid Hormone in Sleep Deprivation. *Med. Hypotheses* **2014**, *82*, 350–355, doi:10.1016/J.MEHY.2014.01.003.
215. Parker, D.C.; Rossman, L.G.; Pekary, A.E.; Hershman, J.M. Effect of 64-Hour Sleep Deprivation on the Circadian Waveform of Thyrotropin (TSH): Further Evidence of Sleep-Related Inhibition of TSH Release. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1987**, *64*, 157–161, doi:10.1210/JCEM-64-1-157.
216. Besedovsky, L.; Lange, T.; Born, J. Sleep and Immune Function. *Pflugers Arch.* **2012**, *463*, 121, doi:10.1007/S00424-011-1044-0.
217. Haus, E.; Smolensky, M.H. Biologic Rhythms in the Immune System. *Chronobiol. Int.* **1999**, *16*, 581–622, doi:10.3109/07420529908998730.
218. Mohawk, J.A.; Green, C.B.; Takahashi, J.S. Central and Peripheral Circadian Clocks in Mammals. *Annu. Rev. Neurosci.* **2012**, *35*, 445–462, doi:10.1146/annurev-neuro-060909-153128.
219. Weeke, J.; Gundersen, H.J.G. Circadian and 30 Minutes Variations in Serum TSH and Thyroid Hormones in Normal Subjects. *Acta Endocrinol. (Copenh)*. **1978**, *89*, 659–672, doi:10.1530/ACTA.0.0890659.
220. Gamble, K.L.; Berry, R.; Frank, S.J.; Young, M.E. Circadian Clock Control of Endocrine Factors. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2014**, *10*, 466, doi:10.1038/NREND0.2014.78.
221. Spiegel, K.; Leproult, R.; Van Cauter, E. Impact of Sleep Debt on Metabolic and Endocrine Function. *Lancet (London, England)* **1999**, *354*, 1435–1439, doi:10.1016/S0140-6736(99)01376-8.
222. Steiger, A. Sleep and Endocrinology. *J. Intern. Med.* **2003**, *254*, 13–22, doi:10.1046/J.1365-2796.2003.01175.X.
223. Mackiewicz, M.; Naidoo, N.; Zimmerman, J.E.; Pack, A.I. Molecular Mechanisms of Sleep and Wakefulness. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1129*, 335–349, doi:10.1196/ANNALS.1417.030.

224. Wang, S.; Wang, K.; Chen, X.; Lin, S. The Relationship between Autoimmune Thyroid Disease, Thyroid Nodules and Sleep Traits: A Mendelian Randomization Study. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2024**, *14*, 1325538, doi:10.3389/FENDO.2023.1325538.
225. Depner, C.M.; Stothard, E.R.; Wright, K.P. Metabolic Consequences of Sleep and Circadian Disorders. *Curr. Diab. Rep.* **2014**, *14*, doi:10.1007/s11892-014-0507-z.
226. Potter, G.D.M.; Skene, D.J.; Arendt, J.; Cade, J.E.; Grant, P.J.; Hardie, L.J. Circadian Rhythm and Sleep Disruption: Causes, Metabolic Consequences, and Countermeasures. *Endocr. Rev.* **2016**, *37*, 584, doi:10.1210/ER.2016-1083.
227. Medic, G.; Wille, M.; Hemels, M.E.H. Short- and Long-Term Health Consequences of Sleep Disruption. *Nat. Sci. Sleep* **2017**, *9*, 151, doi:10.2147/NSS.S134864.
228. Kim, W.; Lee, J.; Ha, J.; Jo, K.; Lim, D.J.; Lee, J.M.; Chang, S.A.; Kang, M. Il; Kim, M.H. Association between Sleep Duration and Subclinical Thyroid Dysfunction Based on Nationally Representative Data. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 2010, doi:10.3390/JCM8112010.
229. Romijn, J.A.; Adriaanse, R.; Brabant, G.; Prank, K.; Endert, E.; Wiersinga, W.M. Pulsatile Secretion of Thyrotropin during Fasting: A Decrease of Thyrotropin Pulse Amplitude. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1990**, *70*, 1631–1636, doi:10.1210/JCEM-70-6-1631.
230. Cinquanta, L.; Fontana, D.E.; Bizzaro, N. Chemiluminescent Immunoassay Technology: What Does It Change in Autoantibody Detection? *Auto-Immunity Highlights* **2017**, *8*, 9, doi:10.1007/S13317-017-0097-2.
231. Wei, Q.; Jiang, Y.; Xiao, M.; Zhang, X.; Qi, J.; Xie, J.; Wu, J.; Wu, Z.; Gu, J. Comparison of Chemiluminescence Microparticle Immunoassay, Indirect Immunofluorescence Assay, Linear Immunoassay and Multiple Microbead Immunoassay Detecting Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus. *Scand. J. Immunol.* **2020**, *91*, e12849, doi:10.1111/SJI.12849.
232. Bentow, C.; Swart, A.; Wu, J.; Seaman, A.; Manfredi, M.; Infantino, M.; Benucci, M.; Lakos, G.; Mahler, M. Clinical Performance Evaluation of a Novel Rapid Response Chemiluminescent Immunoassay for the Detection of Autoantibodies to Extractable Nuclear Antigens. *Clin. Chim. acta* **2013**, *424*, 141–147, doi:10.1016/J.CCA.2013.05.011.
233. Horne, J.; Ostberg, O. Individual Differences in Human Circadian Rhythms. *Biol Psychol* **1977**, *5*, 179–190.
234. Milić, J.; Škrlec, I.; Vranješ, I.M.; Matic, M.; Sertić, D.; Heffer, M. Croatian Translation of the Horne and Östberg Morningness-Eveningness Questionnaire With a Brief Review of Circadian Typology. *Southeast. Eur. Med. J.* **2018**, *2*, 1–11, doi:http://dx.doi.org/10.26332/seemedj.v2i1.62.
235. Johns, M.W. Reliability and Factor Analysis of the Epworth Sleepiness Scale. *Sleep* **1992**, *15*, 376–381.
236. Mapi Research Trust Available online: <http://www.mapi-trust.org/> (accessed on 1 January 2012).
237. Zheng, C.; Dalla Man, C.; Cobelli, C.; Groop, L.; Zhao, H.; Bale, A.E.; Shaw, M.; Duran, E.; Pierpont, B.; Caprio, S.; et al. A Common Variant in the MTNR1b Gene Is Associated with Increased Risk of Impaired Fasting Glucose (IFG) in Youth with Obesity. *Obesity (Silver Spring)*. **2015**, *23*, 1022–1029, doi:10.1002/OBY.21030.
238. Potter, G.D.M.; Skene, D.J.; Arendt, J.; Cade, J.E.; Grant, P.J.; Hardie, L.J. Circadian Rhythm and Sleep Disruption: Causes, Metabolic Consequences, and Countermeasures. *Endocr. Rev.* **2016**, *37*, 584, doi:10.1210/ER.2016-1083.
239. Been, L.F.; Hatfield, J.L.; Shankar, A.; Aston, C.E.; Ralhan, S.; Wander, G.S.; Mehra, N.K.; Singh, J.R.; Mulvihill, J.J.; Sanghera, D.K. A Low Frequency Variant within the

- GWAS Locus of MTNR1B Affects Fasting Glucose Concentrations: Genetic Risk Is Modulated by Obesity. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2012**, 22, 944–951, doi:10.1016/J.NUMECD.2011.01.006.
240. QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook 2015.
 241. Kubista, M.; Andrade, J.M.; Bengtsson, M.; Forootan, A.; Jonák, J.; Lind, K.; Sindelka, R.; Sjöback, R.; Sjögreen, B.; Strömbom, L.; et al. The Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Mol. Aspects Med.* **2006**, 27, 95–125, doi:10.1016/j.mam.2005.12.007.
 242. Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System. Genotyping Experiments. 2010.
 243. Malkki, M.; Petersdorf, E.W. Genotyping of Single Nucleotide Polymorphisms by 5' Nuclease Allelic Discrimination. *Methods Mol Biol* **2012**, 882, 1–10, doi:10.1007/978-1-61779-842-9.
 244. Solé, X.; Guinó, E.; Valls, J.; Iniesta, R.; Moreno, V. SNPStats: A Web Tool for the Analysis of Association Studies. *Bioinformatics* **2006**, 22, 1928–1929, doi:10.1093/bioinformatics/btl268.
 245. Shi, Y.Y.; He, L. SHEsis, a Powerful Software Platform for Analyses of Linkage Disequilibrium, Haplotype Construction, and Genetic Association at Polymorphism Loci. *Cell Res* **2005**, 15, 97–98, doi:10.1038/sj.cr.7290272.
 246. Li, Z.; Zhang, Z.; He, Z.; Tang, W.; Li, T.; Zeng, Z.; He, L.; Shi, Y. A Partition-Ligation-Combination-Subdivision EM Algorithm for Haplotype Inference with Multiallelic Markers: Update of the SHEsis (Http://Analysis.Bio-x.Cn). *Cell Res.* **2009**, 19, 519–523, doi:10.1038/cr.2009.33.
 247. Johnson, J.L.; Abecasis, G.R. GAS Power Calculator: Web-Based Power Calculator for Genetic Association Studies. *bioRxiv* **2017**, 164343, doi:10.1101/164343.
 248. Lin, G.J.; Huang, S.H.; Chen, S.J.; Wang, C.H.; Chang, D.M.; Sytwu, H.K. Modulation by Melatonin of the Pathogenesis of Inflammatory Autoimmune Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, 14, 11742–11766, doi:10.3390/IJMS140611742.
 249. Scheer, F.A.J.L.; Hilton, M.F.; Mantzoros, C.S.; Shea, S.A. Adverse Metabolic and Cardiovascular Consequences of Circadian Misalignment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106, 4453–4458, doi:10.1073/pnas.0808180106.
 250. Buxton, O.M.; Cain, S.W.; O'Connor, S.P.; Porter, J.H.; Duffy, J.F.; Wang, W.; Czeisler, C.A.; Shea, S.A. Adverse Metabolic Consequences in Humans of Prolonged Sleep Restriction Combined with Circadian Disruption. *Sci. Transl. Med.* **2012**, 4, 129ra43, doi:10.1126/SCITRANSLMED.3003200.
 251. Tsuchiya, Y.; Umemura, Y.; Minami, Y.; Koike, N.; Hosokawa, T.; Hara, M.; Ito, H.; Inokawa, H.; Yagita, K. Effect of Multiple Clock Gene Ablations on the Circadian Period Length and Temperature Compensation in Mammalian Cells. *J. Biol. Rhythms* **2016**, 31, 48–56, doi:10.1177/0748730415613888.
 252. Yamazaki, E.M.; Goel, N. Genetics of Circadian and Sleep Measures in Adults: Implications for Sleep Medicine. *Curr. Sleep Med. Reports* **2020**, 6, 32–45, doi:10.1007/S40675-020-00165-Z/METRICS.
 253. Montaruli, A.; Castelli, L.; Mulè, A.; Scurati, R.; Esposito, F.; Galasso, L.; Roveda, E. Biological Rhythm and Chronotype: New Perspectives in Health. *Biomolecules* **2021**, 11, 487, doi:10.3390/BIOM11040487.
 254. Vejrazkova, D.; Vankova, M.; Vcelak, J.; Krejci, H.; Anderlova, K.; Tura, A.; Pacini, G.; Sumova, A.; Sladek, M.; Bendlova, B. The Rs10830963 Polymorphism of the MTNR1B Gene: Association With Abnormal Glucose, Insulin and C-Peptide Kinetics. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2022**, 13, 868364, doi:10.3389/FENDO.2022.868364/BIBTEX.
 255. Lane, J.M.; Chang, A.M.; Bjorntjes, A.C.; Aeschbach, D.; Anderson, C.; Cade, B.E.;

- Cain, S.W.; Czeisler, C.A.; Gharib, S.A.; Gooley, J.J.; et al. Impact of Common Diabetes Risk Variant in MTNR1B on Sleep, Circadian, and Melatonin Physiology. *Diabetes* **2016**, *65*, 1741–1751, doi:10.2337/DB15-0999.
256. Scheiermann, C.; Kunisaki, Y.; Frenette, P.S. Circadian Control of the Immune System. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 190–198, doi:10.1038/nri3386.
 257. Angelousi, A.; Kassi, E.; Nasiri-Ansari, N.; Weickert, M.O.; Randeve, H.; Kaltsas, G. Clock Genes Alterations and Endocrine Disorders. *Eur. J. Clin. Invest.* **2018**, *48*, e12927, doi:10.1111/ECI.12927.
 258. Swanson, C.M.; Shea, S.A.; Kohrt, W.M.; Wright, K.P.; Cain, S.W.; Munch, M.; Vujovic, N.; Czeisler, C.A.; Orwoll, E.S.; Buxton, O.M. Sleep Restriction With Circadian Disruption Negatively Alter Bone Turnover Markers in Women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2020**, *105*, 2456, doi:10.1210/CLINEM/DGAA232.
 259. Maukonen, M.; Kanerva, N.; Partonen, T.; Männistö, S. Chronotype and Energy Intake Timing in Relation to Changes in Anthropometrics: A 7-Year Follow-up Study in Adults. *Chronobiol. Int.* **2019**, *36*, 27–41, doi:10.1080/07420528.2018.1515772.
 260. Vejrazkova, D.; Chocholova, D.; Vankova, M.; Lukasova, P.; Vcelak, J.; Sladek, M.; Sumova, A.; Bendlova, B. The Melatonin Receptor Gene Polymorphism Rs10830963 Is Not Associated with Significant Differences in Sleep Patterns and Biorhythms. *Endocr. Abstr.* **2022**, *81*, doi:10.1530/ENDOABS.81.EP294.
 261. Tuomi, T.; Nagorny, C.L.F.; Singh, P.; Bennet, H.; Yu, Q.; Alenkvist, I.; Isomaa, B.; Östman, B.; Söderström, J.; Pesonen, A.K.; et al. Increased Melatonin Signaling Is a Risk Factor for Type 2 Diabetes. *Cell Metab.* **2016**, *23*, 1067–1077, doi:10.1016/J.CMET.2016.04.009.
 262. Yusuf, F.L.A.; Tang, T.S.; Karim, M.E. The Association between Diabetes and Excessive Daytime Sleepiness among American Adults Aged 20–79 Years: Findings from the 2015–2018 National Health and Nutrition Examination Surveys. *Ann. Epidemiol.* **2022**, *68*, 54–63, doi:10.1016/J.ANNEPIDEM.2022.01.002.
 263. Hussein, S.M.M.; AbdElmageed, R.M. The Relationship Between Type 2 Diabetes Mellitus and Related Thyroid Diseases. *Cureus* **2021**, *13*, e20697, doi:10.7759/CUREUS.20697.
 264. Dashti, H.S.; Follis, J.L.; Smith, C.E.; Tanaka, T.; Garaulet, M.; Gottlieb, D.J.; Hruby, A.; Jacques, P.F.; Kieft-De Jong, J.C.; Lamon-Fava, S.; et al. Gene-Environment Interactions of Circadian-Related Genes for Cardiometabolic Traits. *Diabetes Care* **2015**, *38*, 1456–1466, doi:10.2337/DC14-2709.
 265. Dashti, H.S.; Follis, J.L.; Smith, C.E.; Tanaka, T.; Cade, B.E.; Gottlieb, D.J.; Hruby, A.; Jacques, P.F.; Lamon-Fava, S.; Richardson, K.; et al. Habitual Sleep Duration Is Associated with BMI and Macronutrient Intake and May Be Modified by CLOCK Genetic Variants. *Am. J. Clin. Nutr.* **2015**, *101*, 135–143, doi:10.3945/AJCN.114.095026.
 266. Wirz-Justice, A. Seasonality in Affective Disorders. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2018**, *258*, 244–249, doi:10.1016/J.YGCEN.2017.07.010.
 267. Dopico, X.C.; Evangelou, M.; Ferreira, R.C.; Guo, H.; Pekalski, M.L.; Smyth, D.J.; Cooper, N.; Burren, O.S.; Fulford, A.J.; Hennig, B.J.; et al. Widespread Seasonal Gene Expression Reveals Annual Differences in Human Immunity and Physiology. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7000, doi:10.1038/ncomms8000.
 268. Knutson, K.L. Impact of Sleep and Sleep Loss on Glucose Homeostasis and Appetite Regulation. *Sleep Med. Clin.* **2007**, *2*, 187, doi:10.1016/J.JSMC.2007.03.004.
 269. Shekhar, S.; Hall, J.E.; Klubo-Gwiedzdzinska, J. The Hypothalamic Pituitary Thyroid Axis and Sleep. *Curr. Opin. Endocr. Metab. Res.* **2021**, *17*, 14, doi:10.1016/J.COEMR.2020.10.002.

270. Georg, B.; Fahrenkrug, J.; Jørgensen, H.L.; Hannibal, J. The Circadian Clock Is Sustained in the Thyroid Gland of VIP Receptor 2 Deficient Mice. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2021**, *12*, 737581, doi:10.3389/FENDO.2021.737581.
271. Yasuo, S.; Yoshimura, T.; Ebihara, S.; Korf, H.W. Melatonin Transmits Photoperiodic Signals through the MT1 Melatonin Receptor. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 2885–2889, doi:10.1523/JNEUROSCI.0145-09.2009.
272. Bellastella, A.; Pisano, G.; Iorio, S.; Pasquali, D.; Orio, F.; Venditto, T.; Sinisi, A.A. Endocrine Secretions under Abnormal Light-Dark Cycles and in the Blind. *Horm. Res.* **1998**, *49*, 153–157, doi:10.1159/000023163.
273. Brabant, G.; Prank, K.; Ranft, U.; Schuermeyer, T.; Wagner, T.O.F.; Hauser, H.; Kummer, B.; Feistner, H.; Hesch, R.D.; Von Zur Mühlen, A. Physiological Regulation of Circadian and Pulsatile Thyrotropin Secretion in Normal Man and Woman. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1990**, *70*, 403–409, doi:10.1210/JCEM-70-2-403.
274. Kuhs, H.; Färber, D.; Tölle, R. Serum Prolactin, Growth Hormone, Total Corticoids, Thyroid Hormones and Thyrotropine during Serial Therapeutic Sleep Deprivation. *Biol. Psychiatry* **1996**, *39*, 857–864, doi:10.1016/0006-3223(95)00240-5.
275. Hoermann, R.; Pekker, M.J.; Midgley, J.E.M.; Larisch, R.; Dietrich, J.W. Principles of Endocrine Regulation: Reconciling Tensions Between Robustness in Performance and Adaptation to Change. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2022**, *13*, 825107, doi:10.3389/FENDO.2022.825107/FULL.
276. Hoermann, R.; Pekker, M.J.; Midgley, J.E.M.; Dietrich, J.W. The Role of Supporting and Disruptive Mechanisms of FT3 Homeostasis in Regulating the Hypothalamic–Pituitary–Thyroid Axis. *Ther. Adv. Endocrinol. Metab.* **2023**, *14*, 20420188231158164, doi:10.1177/20420188231158163.
277. Fröhlich, E.; Wahl, R. Thyroid Autoimmunity: Role of Anti-Thyroid Antibodies in Thyroid and Extra-Thyroidal Diseases. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 521, doi:10.3389/fimmu.2017.00521.
278. Barić, A.; Brčić, L.; Gračan, S.; Torlak Lovrić, V.; Gunjača, I.; Šimunac, M.; Brekalo, M.; Boban, M.; Polasek, O.; Barbalić, M.; et al. Association of Established Hypothyroidism-Associated Genetic Variants with Hashimoto's Thyroiditis. *J. Endocrinol. Invest.* **2017**, *40*, 1061–1067, doi:10.1007/S40618-017-0660-8.
279. Denny, J.C.; Crawford, D.C.; Ritchie, M.D.; Bielinski, S.J.; Basford, M.A.; Bradford, Y.; Chai, H.S.; Bastarache, L.; Zuvich, R.; Peissig, P.; et al. Variants near FOXE1 Are Associated with Hypothyroidism and Other Thyroid Conditions: Using Electronic Medical Records for Genome- and Phenome-Wide Studies. *Am. J. Hum. Genet.* **2011**, *89*, 529–542, doi:10.1016/J.AJHG.2011.09.008.
280. Eriksson, N.; Tung, J.Y.; Kiefer, A.K.; Hinds, D.A.; Francke, U.; Mountain, J.L.; Do, C.B. Novel Associations for Hypothyroidism Include Known Autoimmune Risk Loci. *PLoS One* **2012**, *7*, e34442, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0034442.
281. Ikegami, K.; Yoshimura, T. The Hypothalamic–Pituitary–Thyroid Axis and Biological Rhythms: The Discovery of TSH's Unexpected Role Using Animal Models. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2017**, *31*, 475–485, doi:10.1016/J.BEEM.2017.09.002.
282. Huber, M.; Treszl, A.; Reibis, R.; Teichmann, C.; Zergibel, I.; Bolbrinker, J.; Scholze, J.; Wegscheider, K.; Völler, H.; Kreutz, R. Genetics of Melatonin Receptor Type 2 Is Associated with Left Ventricular Function in Hypertensive Patients Treated According to Guidelines. *Eur. J. Intern. Med.* **2013**, *24*, 650–655, doi:10.1016/J.EJIM.2013.03.015.
283. Sarkar, S.; Chattopadhyay, A.; Bandyopadhyay, D. Melatonin as a Promising Agent Alleviating Endocrine Deregulation and Concurrent Cardiovascular Dysfunction: A

- Review and Future Prospect. *Melatonin Res.* **2024**, 7, 1–19.
284. Shen, L.; Wang, Z.; Zang, J.; Liu, H.; Lu, Y.; He, X.; Wu, C.; Su, J.; Zhu, Z. The Associations between Rs10830963 Polymorphisms in Mtnr1b, Dietary Iron, and Glucose Metabolism in Chinese Population. *The Lancet* **2023**, 1–18, doi:10.2139/SSRN.4362129.
 285. Cronin, S.J.F.; Woolf, C.J.; Weiss, G.; Penninger, J.M. The Role of Iron Regulation in Immunometabolism and Immune-Related Disease. *Front. Mol. Biosci.* **2019**, 6, 481580, doi:10.3389/FMOLB.2019.00116/BIBTEX.
 286. Štefanić, M.; Tokić, S. Serum 25-Hydroxyvitamin D Concentrations in Relation to Hashimoto's Thyroiditis: A Systematic Review, Meta-Analysis and Meta-Regression of Observational Studies. *Eur. J. Nutr.* **2020**, 59, 859–872, doi:10.1007/S00394-019-01991-W.
 287. Taheriniya, S.; Arab, A.; Hadi, A.; Fadel, A.; Askari, G. Vitamin D and Thyroid Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *BMC Endocr. Disord.* **2021**, 21, 171, doi:10.1186/S12902-021-00831-5.
 288. Wang, J.; Lv, S.; Chen, G.; Gao, C.; He, J.; Zhong, H.; Xu, Y. Meta-Analysis of the Association between Vitamin D and Autoimmune Thyroid Disease. *Nutrients* **2015**, 7, 2485–2498, doi:10.3390/NU7042485.
 289. Liontiris, M.I.; Mazokopakis, E.E. A Concise Review of Hashimoto Thyroiditis (HT) and the Importance of Iodine, Selenium, Vitamin D and Gluten on the Autoimmunity and Dietary Management of HT Patients. Points That Need More Investigation. *Hell. J. Nucl. Med.* **2017**, 20, 51–56, doi:10.1967/S002449910507.
 290. Chao, G.; Zhu, Y.; Fang, L. Correlation Between Hashimoto's Thyroiditis-Related Thyroid Hormone Levels and 25-Hydroxyvitamin D. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2020**, 11, 4, doi:10.3389/FENDO.2020.00004.
 291. Eyles, D.W.; Smith, S.; Kinobe, R.; Hewison, M.; McGrath, J.J. Distribution of the Vitamin D Receptor and 1 Alpha-Hydroxylase in Human Brain. *J. Chem. Neuroanat.* **2005**, 29, 21–30, doi:10.1016/J.JCHEMNEU.2004.08.006.
 292. Levi, F.; Schibler, U. Circadian Rhythms: Mechanisms and Therapeutic Implications. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2007**, 47, 593–628, doi:10.1146/ANNUREV.PHARMTOX.47.120505.105208.
 293. Yao, L.; Chen, M.; Zhang, N.; Ma, S.; Xie, X.; Xu, S.; Nie, Z.; Wang, W.; Zhou, E.; Xu, S.; et al. The Mediation Role of Sleep Disturbances between Vitamin D and Depressive Symptoms: A Cross-Sectional Study. *Brain Sci.* **2023**, 13, 1501, doi:10.3390/BRAINSKI13111501/S1.
 294. Huiberts, L.M.; Smolders, K.C.H.J. Effects of Vitamin D on Mood and Sleep in the Healthy Population: Interpretations from the Serotonergic Pathway. *Sleep Med. Rev.* **2021**, 55, 101379, doi:10.1016/J.SMRV.2020.101379.
 295. Abboud, M. Vitamin D Supplementation and Sleep: A Systematic Review and Meta-Analysis of Intervention Studies. *Nutrients* **2022**, 14, 1076, doi:10.3390/NU14051076/S1.
 296. Romano, F.; Muscogiuri, G.; Di Benedetto, E.; Zhukouskaya, V. V.; Barrea, L.; Savastano, S.; Colao, A.; Di Somma, C. Vitamin D and Sleep Regulation: Is There a Role for Vitamin D? *Curr. Pharm. Des.* **2020**, 26, 2492–2496, doi:10.2174/1381612826666200310145935.
 297. Gao, Q.; Kou, T.; Zhuang, B.; Ren, Y.; Dong, X.; Wang, Q. The Association between Vitamin D Deficiency and Sleep Disorders: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients* **2018**, 10, 1395, doi:10.3390/NU10101395.
 298. Patel, P.D.; Pontrello, C.; Burke, S. Robust and Tissue-Specific Expression of TPH2 versus TPH1 in Rat Raphe and Pineal Gland. *Biol. Psychiatry* **2004**, 55, 428–433,

- doi:10.1016/j.biopsycho.2003.09.002.
299. Jones, K.S.; Redmond, J.; Fulford, A.J.; Jarjou, L.; Zhou, B.; Prentice, A.; Schoenmakers, I. Diurnal Rhythms of Vitamin D Binding Protein and Total and Free Vitamin D Metabolites. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2017**, *172*, 130–135, doi:10.1016/J.JSBMB.2017.07.015.
 300. Krueger, J.M.; Majde, J.A.; Rector, D.M. Cytokines in Immune Function and Sleep Regulation. *Handb. Clin. Neurol.* **2011**, *98*, 229, doi:10.1016/B978-0-444-52006-7.00015-0.
 301. Mikulska, A.A.; Karaźniewicz-Łada, M.; Filipowicz, D.; Ruchała, M.; Głowska, F.K. Metabolic Characteristics of Hashimoto's Thyroiditis Patients and the Role of Microelements and Diet in the Disease Management—An Overview. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 6580, doi:10.3390/IJMS23126580.
 302. Vranić, L.; Mikolašević, I.; Milić, S. Vitamin D Deficiency: Consequence or Cause of Obesity? *Medicina (B. Aires)*. **2019**, *55*, 541, doi:10.3390/MEDICINA55090541.
 303. Duan, L.; Han, L.; Liu, Q.; Zhao, Y.; Wang, L.; Wang, Y. Effects of Vitamin D Supplementation on General and Central Obesity: Results from 20 Randomized Controlled Trials Involving Apparently Healthy Populations. *Ann. Nutr. Metab.* **2020**, *76*, 153–164, doi:10.1159/000507418.
 304. Abiri, B.; Vafa, M. Effects of Vitamin D and/or Magnesium Supplementation on Mood, Serum Levels of BDNF, Inflammatory Biomarkers, and SIRT1 in Obese Women: A Study Protocol for a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Trials* **2020**, *21*, 225, doi:10.1186/S13063-020-4122-9.
 305. Tunbridge, W.M.G.; Brewis, M.; French, J.M.; Appleton, D.; Bird, T.; Clark, F.; Evered, D.C.; Evans, J.G.; Hall, R.; Smith, P.; et al. Natural History of Autoimmune Thyroiditis. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed)*. **1981**, *282*, 258, doi:10.1136/BMJ.282.6260.258.
 306. Hiromatsu, Y.; Satoh, H.; Amino, N. Hashimoto's Thyroiditis: History and Future Outlook. *Hormones (Athens)*. **2013**, *12*, 12–18, doi:10.1007/BF03401282.
 307. Carayanniotis, G. Recognition of Thyroglobulin by T Cells: The Role of Iodine. *Thyroid* **2007**, *17*, 963–973, doi:10.1089/THY.2007.0199.
 308. Reale, C.; Zotti, T.; Scudiero, I.; Vito, P.; Stilo, R. The NF-KB Family of Transcription Factors and Its Role in Thyroid Physiology. *Vitam. Horm.* **2018**, *106*, 195–210, doi:10.1016/BS.VH.2017.05.003.
 309. Cengiz, H.; Demirci, T.; Varim, C.; Tamer, A. The Effect of Thyroid Autoimmunity on Dyslipidemia in Patients with Euthyroid Hashimoto Thyroiditis. *Pakistan J. Med. Sci.* **2021**, *37*, 1365, doi:10.12669/PJMS.37.5.3883.
 310. He, J.; Lai, Y.; Yang, J.; Yao, Y.; Li, Y.; Teng, W.; Shan, Z. The Relationship Between Thyroid Function and Metabolic Syndrome and Its Components: A Cross-Sectional Study in a Chinese Population. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2021**, *12*, 661160, doi:10.3389/FENDO.2021.661160/BIBTEX.
 311. Duis, J.; Butler, M.G. Syndromic and Nonsyndromic Obesity: Underlying Genetic Causes in Humans. *Adv. Biol.* **2022**, *6*, e2101154, doi:10.1002/ADBI.202101154.
 312. Caturegli, P.; De Remigis, A.; Chuang, K.; Dembele, M.; Iwama, A.; Iwama, S. Hashimoto's Thyroiditis: Celebrating the Centennial through the Lens of the Johns Hopkins Hospital Surgical Pathology Records. *Thyroid* **2013**, *23*, 142–150, doi:10.1089/THY.2012.0554.
 313. Engin, A. The Definition and Prevalence of Obesity and Metabolic Syndrome. In *Advances in experimental medicine and biology*; Springer: Cham, Switzerland, 2017; Vol. 960, pp. 1–17.
 314. Siemińska, L.; Wojciechowska, C.; Walczak, K.; Borowski, A.; Marek, B.; Nowak,

- M.; Kajdaniuk, D.; Foltyn, W.; Kos-Kudła, B. Associations between Metabolic Syndrome, Serum Thyrotropin, and Thyroid Antibodies Status in Postmenopausal Women, and the Role of Interleukin-6. *Endokrynol. Pol.* **2015**, *66*, 394–403, doi:10.5603/EP.2015.0049.
315. De Luis, D.A.; Izaola, O.; Primo, D.; Aller, R. Association of the Rs10830963 Polymorphism in MTNR1B with Fasting Glucose, Serum Adipokine Levels and Components of Metabolic Syndrome in Adult Obese Subjects. *Nutr. Hosp.* **2019**, *36*, 60–65, doi:10.20960/NH.2013.
 316. Kochman, J.; Jakubczyk, K.; Bargiel, P.; Janda-Milczarek, K. The Influence of Oxidative Stress on Thyroid Diseases. *Antioxidants* **2021**, *10*, 1442, doi:10.3390/ANTIOX10091442.
 317. Ameziane-El-Hassani, R.; Schlumberger, M.; Dupuy, C. NADPH Oxidases: New Actors in Thyroid Cancer? *Nat. Rev. Endocrinol.* **2016**, *12*, 485–494, doi:10.1038/NREND0.2016.64.
 318. Harceland, R. Aging, Melatonin, and the Pro- and Anti-Inflammatory Networks. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1223, doi:10.3390/IJMS20051223.
 319. Popławska-Kita, A.; Siewko, K.; Telejko, B.; Kościuszko-Zdrodowska, M.; Hryniewicka, J.; Szelachowska, M.; Milewski, R.; Górski, M. Body Mass Analysis in Patients with Hashimoto Thyroiditis. *Prog. Heal. Sci.* **2014**, *4*, 18–23.
 320. Qiu, Y.; Liu, Q.; Luo, Y.; Chen, J.; Zheng, Q.; Xie, Y.; Cao, Y. Causal Association between Obesity and Hypothyroidism: A Two-Sample Bidirectional Mendelian Randomization Study. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2023**, *14*, 1287463, doi:10.3389/FENDO.2023.1287463/BIBTEX.
 321. Milionis, A.; Milionis, C. Correlation between Body Mass Index and Thyroid Function in Euthyroid Individuals in Greece. *Int. Sch. Res. Not.* **2013**, *2013*, 651494, doi:10.1155/2013/651494.
 322. Sosa-López, J.G.; Alarcón-González, P.; Sánchez-Hernández, V.H.; Cruz-Estrada, A.; Aguilar-Serralde, C.A.; Velasco-Medina, A.A.; Sosa-López, J.G.; Alarcón-González, P.; Sánchez-Hernández, V.H.; Cruz-Estrada, A.; et al. Impact of Obesity on the Thyroid Profile, Long-Term Experience at the General Hospital of Mexico, “Dr. Eduardo Liceaga.” *Rev. médica del Hosp. Gen. México* **2021**, *84*, 4–10, doi:10.24875/HGMX.20000012.
 323. Fu, J.; Zhang, L.; An, Y.; Duan, Y.; Liu, J.; Wang, G. Association Between Body Mass Index and Thyroid Function in Euthyroid Chinese Adults. *Med. Sci. Monit.* **2021**, *27*, e930865-1–8, doi:10.12659/MSM.930865.
 324. Velluzzi, F.; Pisanu, S.; Galletta, M.; Fosci, M.; Secci, G.; Deledda, A.; Boi, F.; Rodia, R.; Fanciulli, G.; Delitala, A.P.; et al. Association between High Normal TSH Levels and Obesity in Women with Anti-Thyroid Autoantibodies (ATAs). *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 5125, doi:10.3390/JCM11175125.
 325. Çöl, N.; Nacak, M.; Araz, M. Association of Melatonin Receptor 1 B Gene (Rs10830963 and Rs9192552) Polymorphism with Adolescent Obesity and Related Comorbidities in Turkey. *J. Int. Med. Res.* **2018**, *46*, 3086–3096, doi:10.1177/0300060518772224.
 326. de Luis Román, D.A.; Primo, D.; Aller, R.; Izaola, O. Association of the Rs10830963 Polymorphism in MTNR1B with Fasting Glucose, Serum Adipokine Levels and Components of Metabolic Syndrome in Adult Obese Subjects. *Nutr. Hosp.* **2019**, *36*, 60–65, doi:10.20960/NH.2013.
 327. Goni, L.; Cuervo, M.; Milagro, F.I.; Martínez, J.A. Gene-Gene Interplay and Gene-Diet Interactions Involving the MTNR1B Rs10830963 Variant with Body Weight Loss. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics* **2014**, *7*, 232–242, doi:10.1159/000380951.

328. Škrlec, I.; Talapko, J.; Džijan, S.; Cesar, V.; Lazić, N.; Lepeduš, H. The Association between Circadian Clock Gene Polymorphisms and Metabolic Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biology (Basel)*. **2022**, *11*, 20, doi:10.3390/BIOLOGY11010020.
329. Garaulet, M.; Gómez-Abellán, P.; Rubio-Sastre, P.; Madrid, J.A.; Saxena, R.; Scheer, F.A.J.L. Common Type 2 Diabetes Risk Variant in MTNR1B Worsens the Deleterious Effect of Melatonin on Glucose Tolerance in Humans. *Metabolism*. **2015**, *64*, 1650–1657, doi:10.1016/J.METABOL.2015.08.003.
330. Kan, M.Y.; Zhou, D.Z.; Zhang, D.; Zhang, Z.; Chen, Z.; Yang, Y.F.; Guo, X.Z.; Xu, H.; He, L.; Liu, Y. Two Susceptible Diabetogenic Variants near/in MTNR1B Are Associated with Fasting Plasma Glucose in a Han Chinese Cohort. *Diabet. Med.* **2010**, *27*, 598–602, doi:10.1111/J.1464-5491.2010.02975.X.
331. Ravanbod, M.; Asadipooya, K.; Kalantarhormozi, M.; Nabipour, I.; Omrani, G.R. Treatment of Iron-Deficiency Anemia in Patients with Subclinical Hypothyroidism. *Am. J. Med.* **2013**, *126*, 420–424, doi:10.1016/j.amjmed.2012.12.009.
332. Cinemre, H.; Bilir, C.; Gokosmanoglu, F.; Bahcebasi, T. Hematologic Effects of Levothyroxine in Iron-Deficient Subclinical Hypothyroid Patients: A Randomized, Double-Blind, Controlled Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2009**, *94*, 151–156, doi:10.1210/JC.2008-1440.
333. Perrin, M.C.; Blanchet, J.P.; Mouchiroud, G. Modulation of Human and Mouse Erythropoiesis by Thyroid Hormone and Retinoic Acid: Evidence for Specific Effects at Different Steps of the Erythroid Pathway. *Hematol. Cell Ther.* **1997**, *39*, 19–26, doi:10.1007/S00282-997-0019-2/METRICS.
334. Christ-Crain, M.; Meier, C.; Huber, P.; Zulewski, H.; Staub, J.-J.; Müller, B. Effect of Restoration of Euthyroidism on Peripheral Blood Cells and Erythropoietin in Women with Subclinical Hypothyroidism. *Hormones (Athens)*. **2003**, *2*, 237–242, doi:10.14310/HORM.2002.11105.
335. Szklarz, M.; Gontarz-Nowak, K.; Matuszewski, W.; Bandurska-Stankiewicz, E. Iron: Not Just a Passive Bystander in AITD. *Nutrients* **2022**, *14*, 4682, doi:10.3390/NU14214682.
336. Fayadat, L.; Niccoli-Sire, P.; Lanet, J.; Franc, J.L. Role of Heme in Intracellular Trafficking of Thyroperoxidase and Involvement of H₂O₂ Generated at the Apical Surface of Thyroid Cells in Autocatalytic Covalent Heme Binding. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 10533–10538, doi:10.1074/JBC.274.15.10533.
337. Smith, S.M.; Finley, J.; Johnson, L.A.K.; Lukaski, H.C. Indices of in Vivo and in Vitro Thyroid Hormone Metabolism in Iron-Deficient Rats. *Nutr. Res.* **1994**, *14*, 729–739, doi:10.1016/S0271-5317(05)80208-8.
338. Szklarz, M.; Gontarz-Nowak, K.; Matuszewski, W.; Bandurska-Stankiewicz, E. “Ferrocrinology”-Iron Is an Important Factor Involved in Gluco- and Lipocrinology. *Nutrients* **2022**, *14*, 4693, doi:10.3390/NU14214693.
339. Dillman, E.; Gale, C.; Green, W.; Johnson, D.; Mackler, B.; Finch, C. Hypothermia in Iron Deficiency Due to Altered Triiodothyronine Metabolism. *Am. J. Physiol.* **1980**, *239*, R377–81, doi:10.1152/AJPREGU.1980.239.5.R377.
340. Luo, J.; Wang, X.; Yuan, L.; Guo, L. Iron Deficiency, a Risk Factor of Thyroid Disorders in Reproductive-Age and Pregnant Women: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2021**, *12*, 629831, doi:10.3389/FENDO.2021.629831.
341. Addanki, S.; Patel, K.; Patel, L.; Smith, B.; Patel, P.; Uppalapati, S.; Nathanson, L.; Addanki, S.; Patel, K.; Patel, L.; et al. Thyroid Function and Sleep Patterns: A Systematic Review. *Cureus* **2024**, *16*, e63447, doi:10.7759/CUREUS.63447.

342. Shinno, H.; Ishikawa, I.; Yamanaka, M.; Usui, A.; Danjo, S.; Inami, Y.; Horiguchi, J.; Nakamura, Y. Effect of Levothyroxine on Prolonged Nocturnal Sleep Time and Excessive Daytime Somnolence in Patients with Idiopathic Hypersomnia. *Sleep Med.* **2011**, *12*, 578–583, doi:10.1016/J.SLEEP.2011.02.004.
343. Green, M.E.; Bernet, V.; Cheung, J. Thyroid Dysfunction and Sleep Disorders. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2021**, *12*, 725829, doi:10.3389/FENDO.2021.725829/BIBTEX.
344. Shinno, H.; Inami, Y.; Inagaki, T.; Kawamukai, T.; Utani, E.; Nakamura, Y.; Horiguchi, J. Successful Treatment with Levothyroxine for Idiopathic Hypersomnia Patients with Subclinical Hypothyroidism. *Gen. Hosp. Psychiatry* **2009**, *31*, 190–193, doi:10.1016/J.GENHOSPPSYCH.2008.07.011.
345. García-Marín, R.; de Miguel, M.; Fernández-Santos, J.M.; Carrillo-Vico, A.; Utrilla, J.C.; Morillo-Bernal, J.; Díaz-Parrado, E.; Rodríguez-Prieto, I.; Guerrero, J.M.; Martín-Lacave, I. Melatonin-Synthesizing Enzymes and Melatonin Receptor in Rat Thyroid Cells. *Histol. Histopathol.* **2012**, *27*, 1429–1438, doi:10.14670/HH-27.1429.
346. Kennaway, D.J.; Stamp, G.E.; Goble, F.C. Development of Melatonin Production in Infants and the Impact of Prematurity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1992**, *75*, 367–369, doi:10.1210/JCEM.75.2.1639937.
347. Karasek, M. Melatonin, Human Aging, and Age-Related Diseases. *Exp. Gerontol.* **2004**, *39*, 1723–1729, doi:10.1016/J.EXGER.2004.04.012.
348. Savitz, D.A.; Wellenius, G.A. Can Cross-Sectional Studies Contribute to Causal Inference? It Depends. *Am. J. Epidemiol.* **2023**, *192*, 514–516, doi:10.1093/AJE/KWAC037.
349. Brčić, L.; Barić, A.; Gračan, S.; Brekalo, M.; Kalićanin, D.; Gunjača, I.; Torlak Lovrić, V.; Tokić, S.; Radman, M.; Škrabić, V.; et al. Genome-Wide Association Analysis Suggests Novel Loci for Hashimoto's Thyroiditis. *J. Endocrinol. Invest.* **2019**, *42*, 567–576, doi:10.1007/S40618-018-0955-4.
350. Deligiorgi, M. V.; Sagredou, S.; Vakkas, L.; Trafalis, D.T. The Continuum of Thyroid Disorders Related to Immune Checkpoint Inhibitors: Still Many Pending Queries. *Cancers (Basel)*. **2021**, *13*, 5277, doi:10.3390/CANCERS13215277.

8. SAŽETAK

Hashimotova bolest je autoimuni poremećaj kod kojeg imunološki sustav napada štitnu žlijezdu. Karakterizira ga patološka infiltracija T-limfocita koji uništavaju folikule štitne žlijezde što dovodi do atrofije i fibroze štitne žlijezde i posljedično do hipotireoze. Za Hashimotovu bolest važna je interakcija između gena, čimbenika okoliša i epigenetskih modifikacija te ima jaku genetsku predispoziciju i sklona je grupirati se u obiteljima. Melatonin je hormon kojeg proizvodi pinealna žlijezda u mozgu, a njegovu sintezu i izlučivanje regulira ciklus svjetlo-tama. Ima značajnu ulogu u regulaciji cirkadijanih ritmova, uključujući cikluse spavanja i budnost te u ispravnom prijenosu signala kroz različite receptore. Melatonin posjeduje antioksidativna svojstva i modulira imunološku funkciju. Receptor za melatonin, MTNR1B, važan je u signalnom putu kontrole nizvodnih unutarstaničnih signalnih puteva i modulaciji imunoloških reakcija putem kojih utječe na proizvodnju citokina, staničnu proliferaciju i diferencijaciju. Melatonin djeluje kao modulator imunosti posredovanih stanicama i protutijelima preko MTNR1B receptora vezanih na membranu koje izražavaju imunološke stanice, a promjene signalnog puta melatonin-receptor MTNR1B mogu pridonijeti razvoju ili različitim kliničkim fenotipovima autoimunih bolesti. Polimorfizmi gena za receptor melatonina (*MTNR1A* i *MTNR1B*) mogu utjecati na osjetljivost pojedinca na autoimune bolesti štitne žlijezde. Cilj istraživanja je ispitati moguću povezanost polimorfizama gena *MTNR1B* s elementima cirkadijanog ritma, kronotipom i dnevnom pospanošću u bolesnika s Hashimotovom bolesti. U istraživanju je sudjelovalo 115 pacijenata s Hashimotovom bolesti prosječne dobi 43 ± 12 godina, te su žene prevladavale s 92,2 %. Dnevna pospanost pacijenata s Hashimotovom bolesti bila je povezana s polimorfizmima rs10830963 i rs1387153 gena *MTNR1B*, dok polimorfizmi rs10830963, rs1387153 i rs4753426 nisu bili povezani s kronotipom. Indeks tjelesne mase bio je povezan s rs10830963 te je alel G češći u pacijenata s Hashimotovom bolesti s većim indeksom tjelesne mase. Također, razine protutijela na tireoglobulin (anti-Tg) i slobodnog T3 bile su povezane s polimorfizmom rs10830963 gena *MTNR1B*. Alel G polimorfizma rs10830963 češći je u pacijenata koji nisu bili na nadomjesnoj hormonskoj terapiji LT4, te je genotip GG navedenog polimorfizma negativno povezan s primjenom LT4. Dobiveni rezultati sugeriraju da polimorfizmi gena za receptor melatonina mogu dovesti do promjena u strukturi i funkciji receptora što može utjecati na afinitet vezanja melatonina i nizvodne signalne putove. Također, mogu imati važnu ulogu u razvoju Hashimotove bolesti te daljnja istraživanja trebaju razjasniti precizne mehanizme kako ovi

polimorfizmi utječu na cirkadijane fenotipove kod Hashimotove bolesti te istražiti potencijalne terapijske intervencije usmjerene na put receptora melatonina.

Ocjena rada
u tijeku

9. SUMMARY

Hashimoto's disease is an autoimmune disease in which the immune system attacks the thyroid gland. It is characterized by a pathological T-lymphocyte infiltration that destroys the thyroid follicles, leading to atrophy and fibrosis of the thyroid gland and, consequently, hypothyroidism. The interaction of genes, environmental factors, and epigenetic changes is important for Hashimoto's disease, as it has a strong genetic predisposition and runs in families. Melatonin is a hormone produced by the pineal gland in the brain. Its synthesis and secretion are regulated by the light-dark cycle. It plays an important role in regulating circadian rhythms, including sleep and wake cycles, and adequately transmitting signals through various receptors. Melatonin has antioxidant properties and modulates immune function. The melatonin receptor MTNR1B plays an important role in downstream intracellular signaling pathways and in the modulation of immune responses, through which it influences cytokine production, cell proliferation, and differentiation. Melatonin acts as a modulator of cell-mediated and antibody-mediated immunity via membrane-bound MTNR1B receptors expressed by immune cells. Alterations in the melatonin-MTNR1B receptor signaling pathway may contribute to the development of various clinical phenotypes of autoimmune diseases. Polymorphisms in the melatonin receptor gene (*MTNR1A* and *MTNR1B*) may influence an individual's susceptibility to autoimmune thyroid diseases. The research aims to investigate the possible association between *MTNR1B* gene polymorphisms and elements of circadian rhythm, chronotype, and daytime sleepiness in patients with Hashimoto's disease. The study involved 115 patients with Hashimoto's disease, with an average age of 43 ± 12 years, with women outnumbering men by 92.2%. Daytime sleepiness in patients with Hashimoto's disease was associated with the rs10830963 and rs1387153 polymorphisms of the *MTNR1B* gene, while the rs10830963, rs1387153, and rs4753426 polymorphisms were not associated with chronotype. Body mass index was associated with rs10830963, and the G allele is more common in patients with a higher body mass index with Hashimoto's disease. Thyroglobulin antibodies (anti-Tg) and free T3 levels were also associated with the rs10830963 polymorphism of the *MTNR1B* gene. In addition, the G allele of the rs10830963 polymorphism is more common in patients who did not receive LT4 hormone replacement therapy, and the GG genotype of the above polymorphism is negatively associated with LT4 intake. The results suggest that melatonin receptor gene polymorphisms may lead to changes in the structure and function of the receptor that may affect melatonin binding affinity and downstream signaling pathways. They may also play an essential role in developing Hashimoto's disease. Further research should clarify the

exact mechanisms of how these polymorphisms influence the elements of the circadian rhythm in Hashimoto's disease and investigate potential therapeutic interventions targeting the melatonin receptor signaling pathway.

Ocjena rada
u tileku

10. ŽIVOTOPIS

Davor Lešić, mag. phisioth., rođen je 12. listopada 1982. godine u Vinkovcima. Završio je (opću) gimnaziju u Županji. Upisao je preddiplomski studij Fizioterapije Sveučilišta u Splitu, Sveučilišni odjel zdravstvenih studija, gdje je diplomirao 2006. godine. Potom upisuje diplomski studij Fizioterapije na Fakultetu za dentalnu medicinu i zdravstvo Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, koji završava 2019. godine. Pripravnički staž odradio je u Domu zdravlja Županja te Općoj županijskoj bolnici Vinkovci. Poslije položenog državnog ispita radio je u Nado centru Osijek, na Fakultetu za dentalnu medicinu i zdravstvo, Fizio Educa, te kao fizioterapeut u kadetskom i seniorskom rukometu. Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni doktorski studij Molekularne bioznanosti na Sveučilištu Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, u suradnji s Institutom Ruđer Bošković u Zagrebu i Sveučilištem u Dubrovniku, upisao je u akademskoj godini 2019/2020. Autor je i koautor devet stručnih i znanstvenih publikacija kao i kongresnih sažetaka. Sudjelovao je na znanstvenim i stručnim skupovima, kao aktivni i pasivni sudionik. Član je Hrvatske komore fizioterapeuta. Aktivno se služi engleskim jezikom.

Dodatno se usavršavao u struci na brojim tečajevima i radionicama među kojima su: 2021 MFR Miofascijalna Relaksacija modul 4/4 , Zagreb; 2020 Cupping therapy, Zagreb; 2019 Homeopatija - osnovni nivo Međunarodno udruženje za promociju i razvoj kvantne medicine, Beograd (Srbija); 2018 Kvantna medicina – osnovni nivo; 2017 Akupunktura II – praktična primena; 2017 Akupunktura – osnovni nivo; 2014 Yumeiho Therapy Grade 2 Yumeiho, Osijek (Hrvatska); 2014 Atlas Specialist Atlas Profilax, Osijek (Hrvatska); 2010 The Noam Tyroler School of Thai Acupressure and Thai Massage Thai Healing Alliance International, Zagreb (Hrvatska); 2009 Kinesio Taping Clinical Reasoning KT3 Kinesio Taping Association International, Zagreb (Hrvatska); 2009 KT1 - KT2 Kinesio Taping Association International, Zagreb (Hrvatska); te 2009 Yumeiho Yumeiho, Osijek (Hrvatska).

Popis objavljenih radova:

1. Škrlec I, Biloglav Z, **Lešić D**, Talapko J, Žabić I, Katalinić D. Association of MTNR1B Gene Polymorphisms with Body Mass Index in Hashimoto's Thyroiditis. Int. J. Mol. Sci. 2025, 26, 3667. doi: 10.3390/ijms26083667.

2. Talapko J, Erić S, Meštrović T, Mravak MS, Juzbašić M, Katalinić D, Bekić S, Muršić D, Flam J, Belić D, **Lešić D**, Fureš R, Markanović M, Škrlec I. The Impact of Oral Microbiome Dysbiosis on the Aetiology, Pathogenesis, and Development of Oral Cancer. *Cancers (Basel)*. 2024;16(17):2997. doi: 10.3390/cancers16172997.
3. Čandrlić S, Šabanović D, Mahaček K, Holik D, Miškulin M, Beneš M, Miškulin I, Včev I, **Lešić D**, Čandrlić M. Zdravstvena skrb u slavonskom Provincijalu tijekom 19. stoljeća. *Acta Med Hist Adriat*. 2024;21(2):321-334. doi: 10.31952/amha.21.2.7.
4. Miškulin I, **Lešić D**, Kovačević J, Dumić J, Čurđinjaković VL, Dumić L, Miškulin M. Knowledge and Attitudes toward Vaccination in Croatian Adolescents, the Influence of the Internet. *Central European Journal of Paediatrics*. 2024;20(1):1 – 13. doi: 10.5457/p2005-114.353.
5. Kovacevic J, Fotez I, Miskulin I, **Lesic D**, Miskulin M, Berlancic T, Vukoja I, Candrlis S, Palenkic H, Candrlis M. Different Patterns of Mental Health Outcomes among Road Traffic Crash Survivors: A Prospective Cohort Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2021;18(4):1564. doi: 10.3390/ijerph18041564.
6. **Lešić D**, Iža S, Ivanković I. Fizioterapijske intervencije kod poremećaja temporomandibularnog zgloba. *Physiotherapia Croatica*. 2021;19(1):245-254.
7. Miškulin I, Raguž Z, Mujkić A, Miškulin M, **Lešić D**, Čandrlić M, Vukoja I, Kovačević J, Čandrlić S, Palenkić H. Mothers' attitudes regarding parental styles and child abuse in Croatia. *Cent. Eur. J. Paediatr*. 2021;17(1):87-92. doi: 10.5457/p2005-114.293.
8. Iža S, Ivanković I, **Lešić D**. Aurikulo akupunktura. *Zdravstveni glasnik (Health bulletin)*. 2021;7(1):93-101. doi: 259982.
9. **Lešić D**, Grgić A, Marić S. Vježbanje i kvaliteta života kod žena starije dobi. *Physiotherapia Croatica*. 2020;18:167-172.

Popis kongresnih sažetaka:

1. Iža S, Ivanković I, **Lešić D**. Aurikulo akupunktura. *Zdravstveni glasnik (Health bulletin)*. 2021; 1 (7):93-101.
2. **Lešić D**, Iža S, Grgić A. "Primjena dekompresijske terapije kralježnice kod cervikobrahijalnog sindroma – prikaz slučaja" 7. Međunarodni znanstveno-stručni skup „Fizioterapija u sportu, rekreaciji i wellnesu“, Vukovar 2021.
3. Ilić I, Mujkić R, **Lešić D**, Marić S. Latinski - „živi“ jezik medicinske terminologije. Festival znanosti. 2021.

Tečajevi trajne edukacije

1. Drugi poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I kategorije „Rehabilitacija u kliničkoj medicini“ – kardiovaskularna rehabilitacija (10/10/2019 – 11/10/2019)
2. Međunarodni znanstveni skup Physiotherapia Croatica 2019. (04/12/ 2019)
3. Drugi poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I kategorije „SPORT I SRCE“ (25/06/2020 – 26/06/2020)
4. Drugi kongres KOKOZ-a i Hrvatski kongres medicinskog prava s međunarodnim sudjelovanjem (4/12/2020.- 4/03/2021)