



چالش‌های سنجش هورمون‌های تیروئیدی آزاد و *T-Uptake Test*

دکتر مهدی هدایتی

مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی

پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

دی ماه ۱۴۰۰

زمان: ۹:۳۰ لغایت ۱۰:۰۰

مقدمه:

- گزارش اتصال بخش اعظم هورمونهای تیروئیدی به پروتئینهای پلازما (Trevorow, V.. J Biol Chem. 1939;127:737.)
- ارائه فرضیه هورمون آزاد
- تلاش برای سنجش بخش آزاد هورمونها
- گزارش سنجش هورمونهای آزاد تیروئیدی ۱۹۶۰
- تردید در خصوص اعتبار روشهای ارائه شده از دهه ۱۹۶۰

روشهای سنجش هورمون های آزاد تیروئیدی چیست؟
در این روش ها با چه چالشی مواجه هستیم؟

روشهای سنجش هورمونهای آزاد تیروئیدی

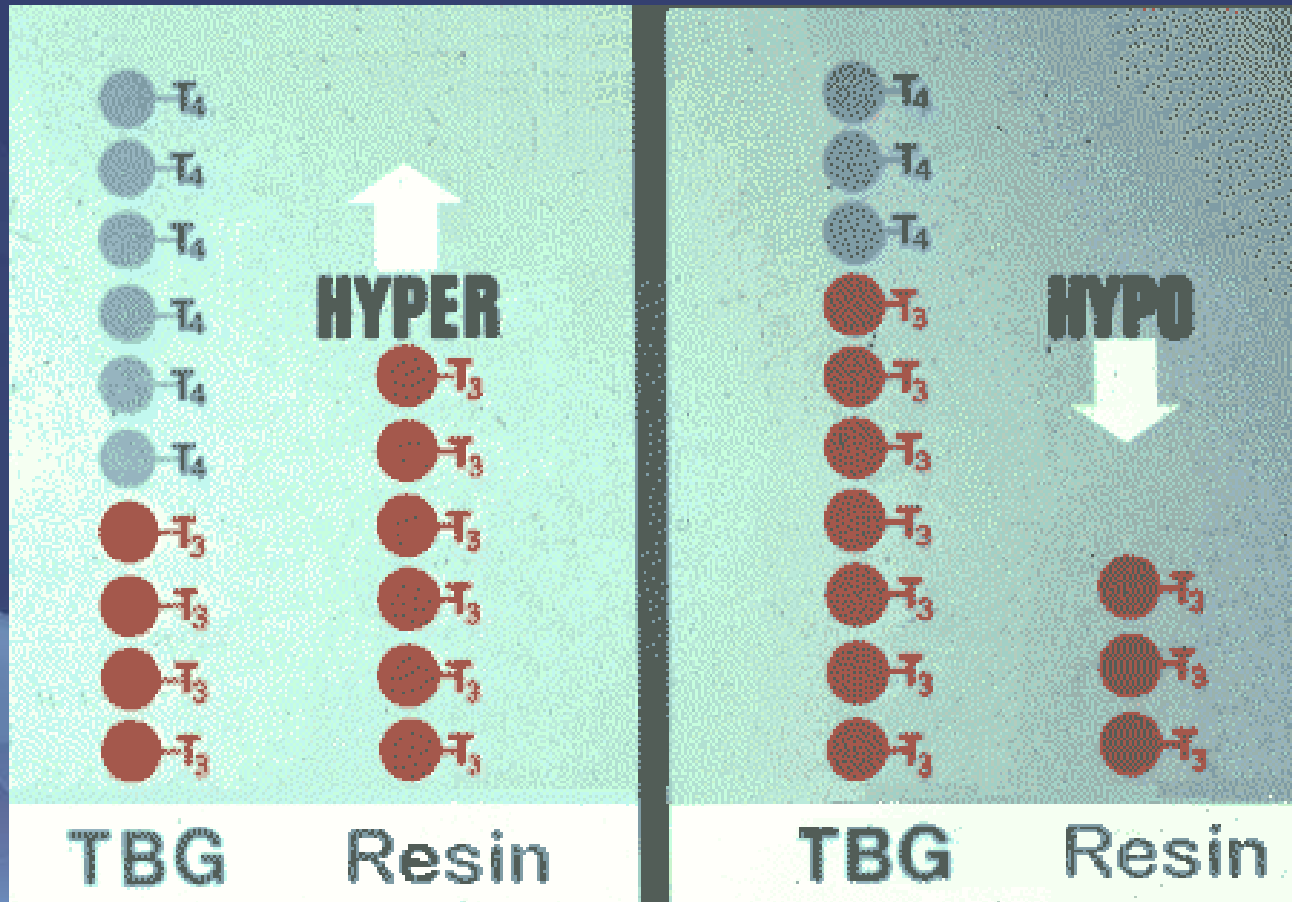
- روشهای غیر مستقیم یا روشهای زوج سنجشی، مانند سنجش هورمون تام و سنجش برداشت رزینی (T3R-Uptake = T3)

$$\text{Total T}_4 \times \frac{\text{T-uptake ratio}}{100} = \text{FTI}$$

- روشهای مستقیم تعیین میزان هورمون آزاد تیروئیدی:
 - الف: روشهای دو مرحله ایی جداسازی فیزیکی
 - ب: روشهای یک مرحله ایی بدون جداسازی هورمون آزاد

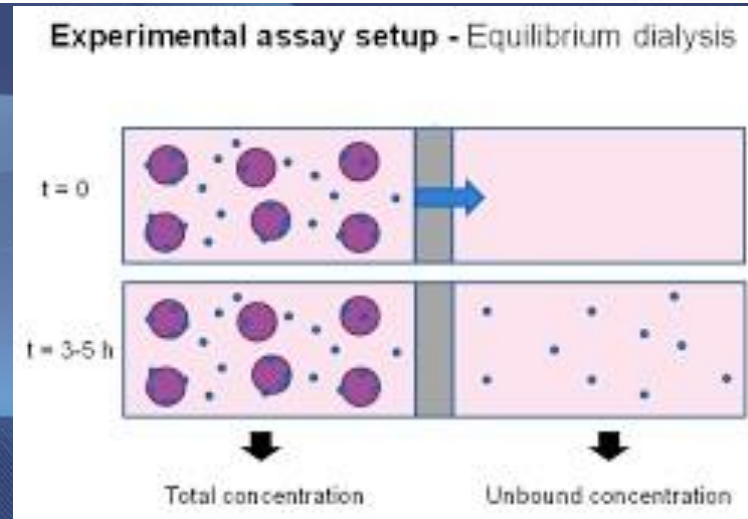
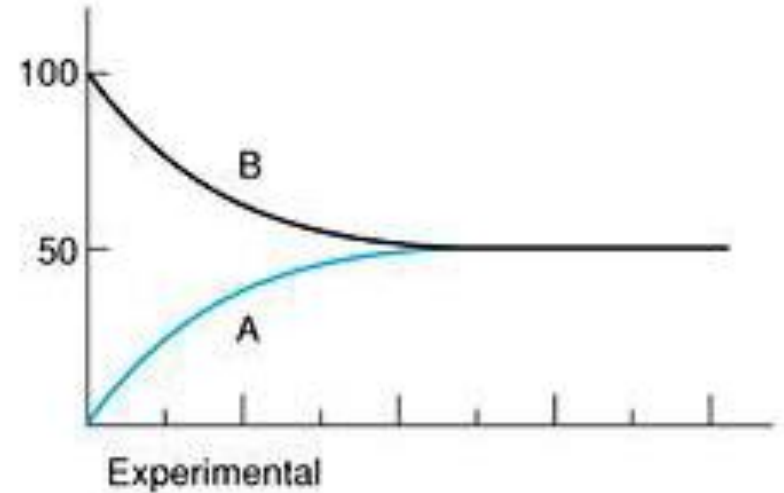
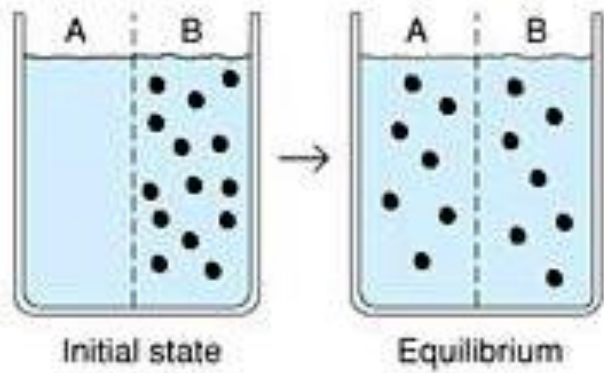
اساس روشهای سنجش غیر مستقیم چیست؟

روش غیر مستقیم (تعیین شاخص) هورمون آزاد تیروئیدی

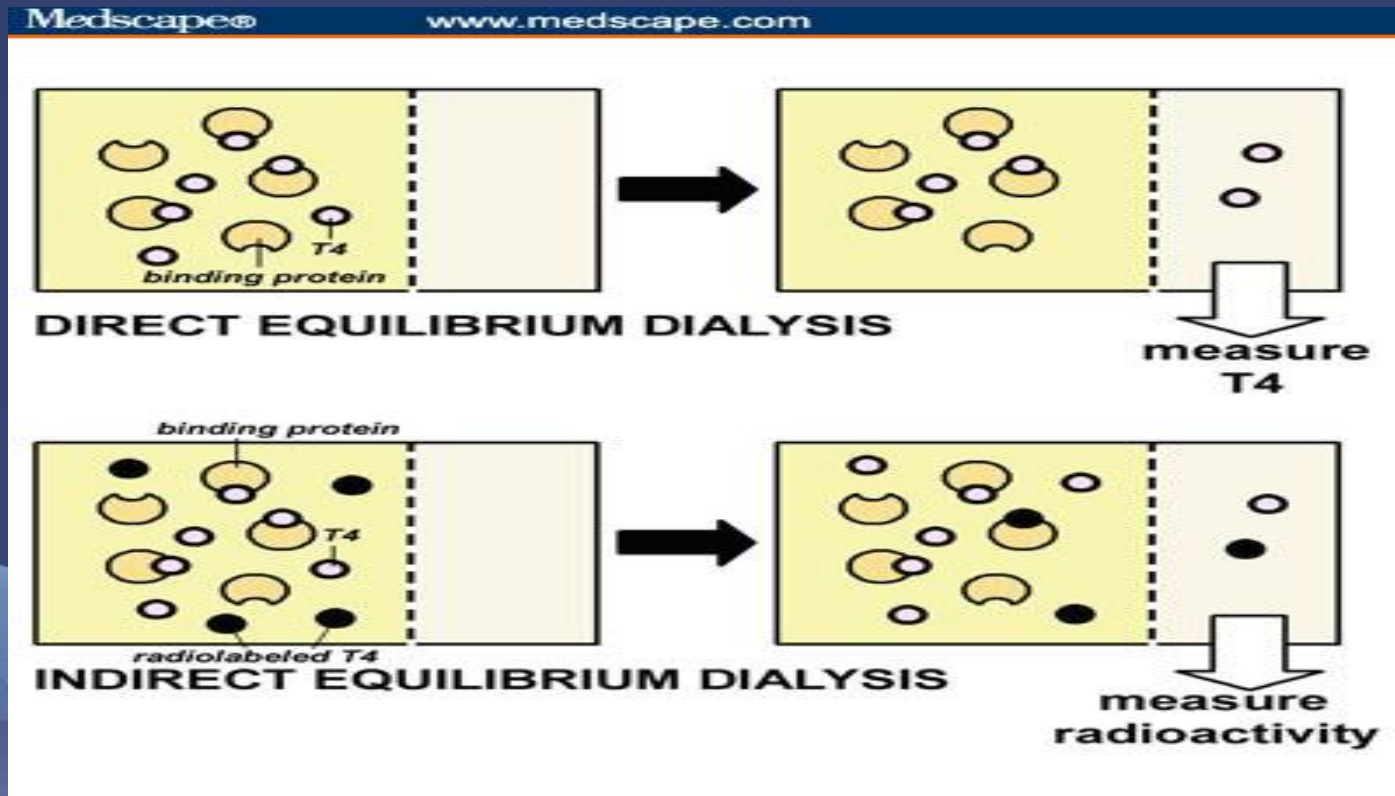


روش مستقیم (دیالیز تعادلی) در سنجش هورمون آزاد چگونه عمل می کند؟

روش مستقیم: جداسازی فیزیکی (دیالیز تعادلی): معتبرترین روش سنجش لیگاند آزاد

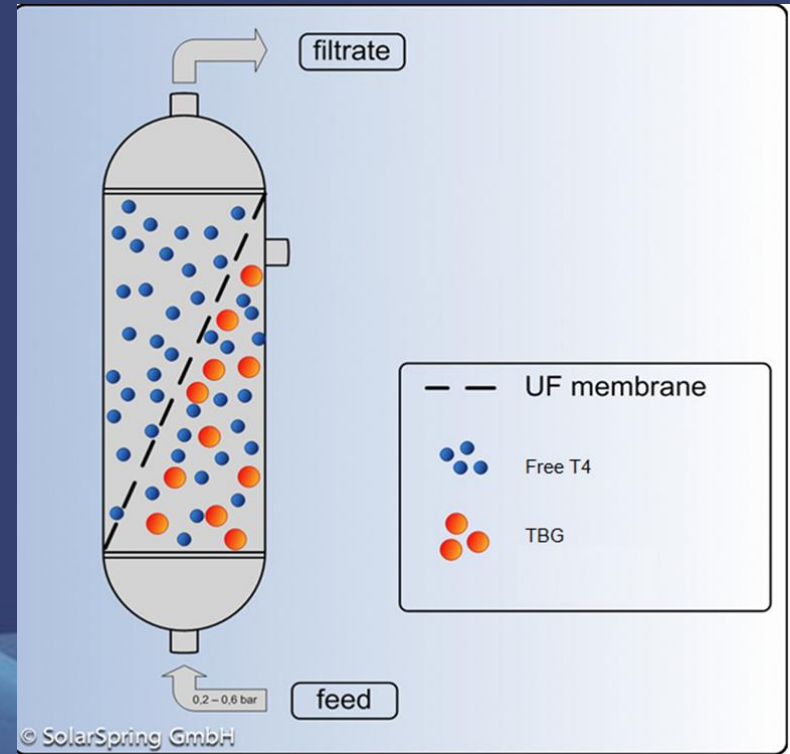
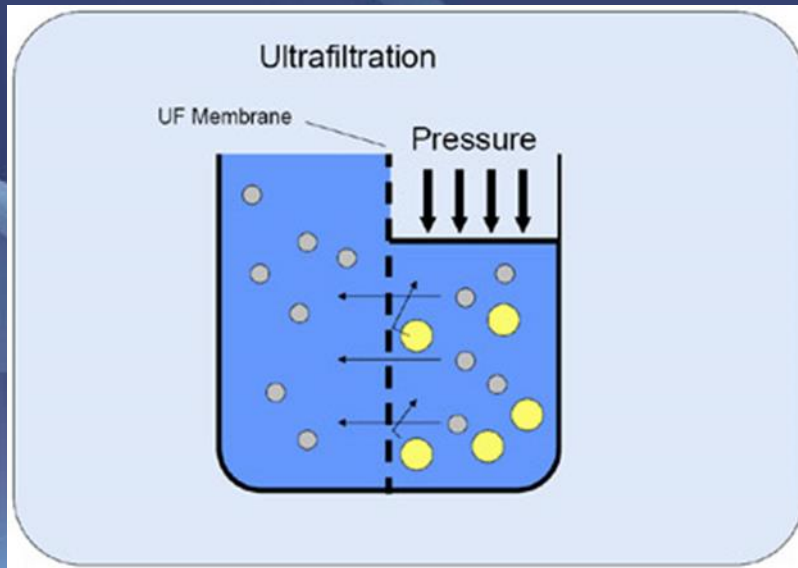


دو روش اجرای دیالیز تعادلی

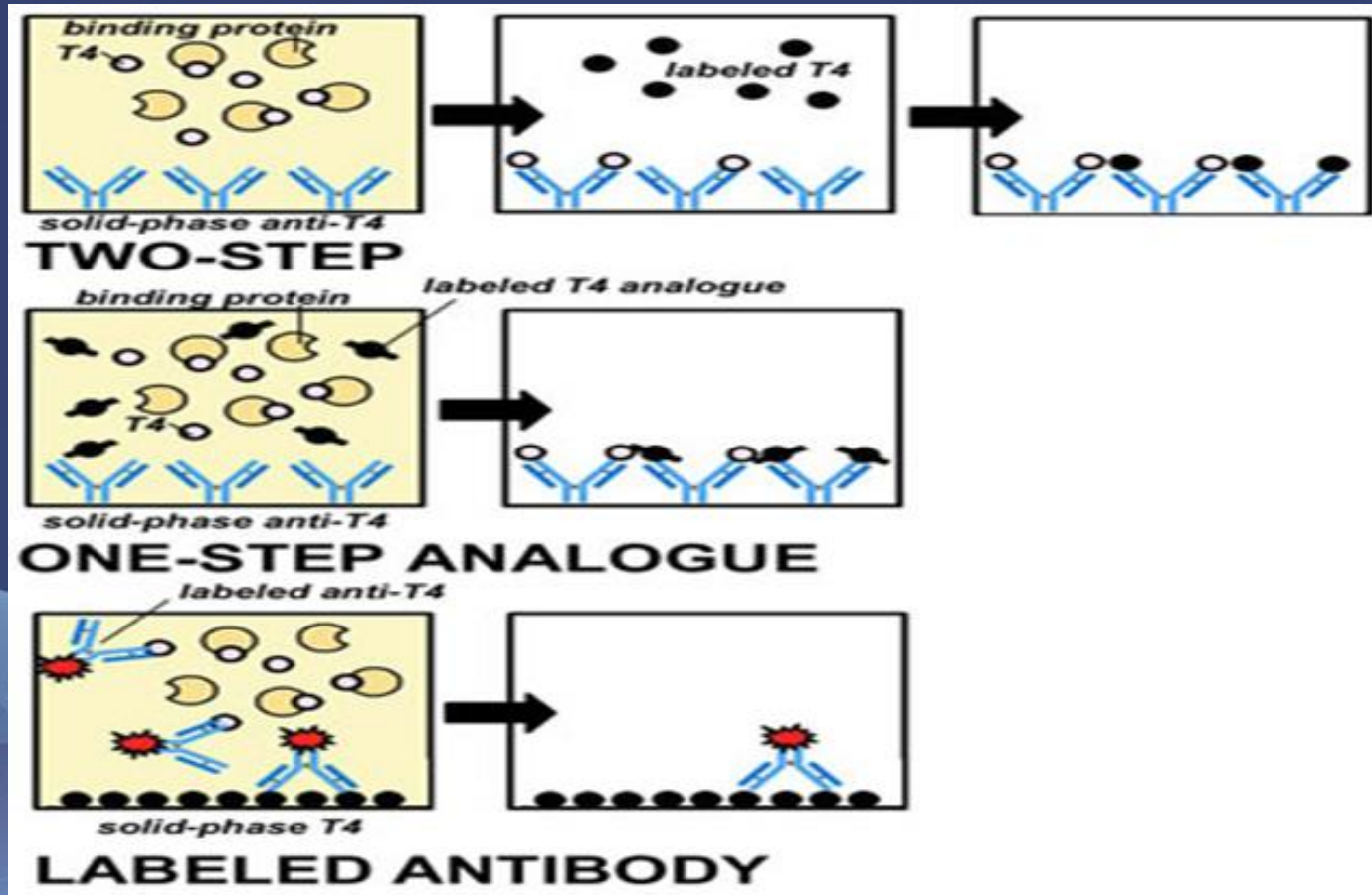


روش مستقیم (فیلتراسیون) در سنجش هورمون آزاد چگونه عمل می کند؟

روشهای جداسازی فیزیکی لیگاند با فیلتراسیون



روشهای بدون جداسازی فیزیکی هورمون آزاد



ویژگی روشهای مستقیم در سنجش هورمون آزاد چیست؟

نقد روشهای جداسازی فیزیکی لیگاند:

- **اساس روش:** ابتدا هورمون آزاد بصورت فیزیکی از هورمونهای متصل به پروتئینها جدا می شود و سپس هورمون آزاد شده با ایمونواسی حساس، مورد سنجش قرار می گیرد.
- **روش اجرا:** در این روشها یا از غشاهای نیمه تراوا برای دیالیز و یا از روشهای اولترافیلتراسیون استفاده می شود.
- **نیازمندی روش:** از آنجایی که میزان هورمون تام تیروکسین در حد نانومول اما هورمون آزاد تیروکسین در حد پیکو مول است، روش سنجش متعاقب جداسازی، می بایست بسیار حساس تر از روشهای سنجش هورمون تام باشد.
- متأسفانه روش استاندارد طلایی جهت محک زدن صحت این روش وجود ندارد و این روشها نیز متأثر از اختلالات پروتئینهای اتصال، رقیق سازی نمونه، و سایر لیگاندهای (داروها) موجود در نمونه قرار گرفته و در نتیجه سنجش انحراف ایجاد می کنند.

There is no officially "gold standard" free hormone methods,

ادامه نقد روش جداسازی لیگاند:

- از آنجایی که در این روشها (دیالیز تعادلی) **رقیق سازی نمونه** وجود دارد، سنجش تیروکسین آزاد با **تخمین پایین** مواجه می شود. خصوصا زمانی که مهار کننده اتصال هورمون در نمونه وجود داشته باشد (مانند اتوانتی بادی و یا برخی داروها).
- به علت اتصال و **جذب** هورمون تیروکسین هیدروفوب بروی **غشای نیمه تراوا**، **تخمین پایین** نتیجه هورمون آزاد محتمل است.
- در نمونه هایی که صاحب نمونه تیمار **هپارین** داشته است به علت افزایش میزان **اسید چرب آزاد**، میزان هورمون آزاد **تخمین بالاتری** را نشان خواهد داد.
- روشهای جداسازی فیزیکی هورمون آزاد، برای آزمایشگاههای تشخیص طبی پر دردر و گران قیمت محسوب می شوند و معمولا در **آزمایشگاه های پژوهشی** مورد استفاده قرار می گیرند.

راهنمای اول:

نام گذاری روش سنجش هورمون آزاد اصلاح شود

- روشهای سنجش هورمون آزاد در آزمایشگاههای تشخیصی اعم از سنجش مستقیم، و غیر مستقیم **شایسته لفظ اندازه گیری نیستند**، این روشها وابسته به وضعیت پروتئینهای اتصالی بوده و در اصل روشهای **تخمین هورمون آزاد** می بایست نامیده شوند.
- این نامگذاری کمک می کند تا به یاد داشته باشیم در روشهای تخمین هورمون آزاد، با افزایش و کاهش پروتئینهای اتصالی، ازدیاد و کاهش تخمین متصور است.

Free Hormone Estimate" tests, abbreviated FT4E and FT3E.

In general, Free Hormone Estimate tests overestimate the FT4 level at high protein concentrations and underestimate FT4 at low protein concentrations.

راهنمای دوم:

محدودیت تعیین شاخص هورمون آزاد با برداشت T3 رادیواکتیو (T3, T4, T7)

- در روش کلاسیک نسبت اتصال هورمون تیروئیدی (THBR: Thyroid Hormone Binding Ratio) از ردیاب T3 استفاده می شود.
- آفینیتی کمتر اتصال T3 به TBG نسبت به اتصال تیروکسین به این پروتئین سبب شده است مقدار هورمون نشاندار بیشتری برای شمارش جذب مثلا رزین شده، لذا با شمارش سیگنال بیشتر و زمان شمارش کمتری مواجه خواهیم بود. اما همواره این پرسش وجود دارد که آیا از برداشت T3 می توان برای اصلاح اختلالات TT4 بهره نمود؟

Validity of using T3 uptake for correct TT4 value is questionable

- به همین علت تستهای برداشت تیروئیدی به سراغ ردیابهای T4 رفتند. کمپانیهای سازنده هنوز هم اغلب از ردیاب T3 استفاده نموده و بطور سنتی یک محدوده برداشت تیروئیدی تقریبا ۲۵ تا ۴۰ را طبیعی اعلام می کنند.

- Use T3Uptake for FT3I and T4 Uptake for FT4I

راهنمای سوم: استفاده از THBI/THBR

$$FT4I = \text{total T4} \times \text{T3 uptake, or total T4} \times \text{THBI}$$
$$\text{THBI} = \text{patient's T3 uptake} \div \text{normal pool T3 uptake}$$

۱. تست Uptake باید THBR نامیده شده و حتما ردياب مورد استفاده در نامگذاري ذکر گردد مثلا THBR-T3، THBR-T4 or
۲. جهت انعكاس اختلال اتصال T4 به پروتئينهاي اتصالي در سنجش TT4 استفاده از ردياب T4 در THBR به ردياب T3 ارجح مي باشد.
۳. نتيجه تست THBR مي بايست در مقايسه با يك نمونه سرم طبيعي (با مقدار ۱.۰۰) گزارش گردد.
۴. در محاسبه THBR حتما از نسبت سيگنال جذب به سيگنال تام منهاي سيگنال جذب استفاده شود (نه فقط نسبت سيگنال جذب به سيگنال تام). (تفاوت نسبت و درصد رعايت شود).
۵. در گزارش آزمايشگاه علاوه بر ميزان تام هورمون، شاخص هورمون آزاد، مقدار خود THBR نيز ذکر گردد.
۶. نتيجه THBR به تنهائي نبايد ملاك تشخيص باليني مستقلي قرار گيرد و حتما با نتايج مقدار تام هورمون T3 or T4 تفسير شود.

$$\text{THBR (FTI)} = \frac{T_4 \text{ value } (\mu\text{g} / \text{dL}) \times \text{thyroid uptake } (\%)}{\text{median of reference interval } (\%)*}$$

$$\text{FT4I} = \text{Total T4 patient} \times \frac{\text{T3RU patient}}{\text{T3RU mean control}}$$

ادامه راهنمای سوم:

- تستهای در دسترس THBR خوشبختانه در صورت طبیعی بودن میزان پروتئینهای اتصالی و یا تغییرات فیزیولوژیک و خفیف آنها (مانند زمان بارداری) نتایج قابل قبولی برای محاسبه FT4I or FT3I بدست می دهند.
- در صورتی که اختلال پروتئینهای اتصالی خفیف نباشد نتایج این آزمون متاسفانه مختل و غیر قابل اعتماد می باشد:

Congenital TBG high or low, familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia (FDH), thyroid hormone autoantibodies or NTI

برخی داروها در نمونه افراد تحت درمان، از درجه اعتبار این آزمون می کاهند.

راهنمای چهارم: روشهای بدون جداسازی فیزیکی لیگاند

۱. روشهای که فاقد مرحله جداسازی فیزیکی هورمون آزاد هستند، **حداکثر ۱ تا ۲ درصد** مجازند که هورمون را از پروتئینهای اتصال **منفک** نمایند. لذا مطالعات تعادل ترمودینامیکی در طراحی این روشها بسیار مهم می باشند.
۲. این روشها می بایست **حداقل اثر رقیق سازی** را داشته باشند که اثر اتصال / رهایی مهارکنندگان داخلی به حداقل برسد.
۳. نمونه های استاندارد/ کالیبراتور حتما از جنس **نمونه سرمی** باشند (انحراف اثر زمینه مینیمم گردد).
۴. آزمایش، جهت حفظ هرچه بیشتر تعادل اتصال هورمون، در **دمای ۳۷ درجه** اجرا شود.

سنجش هورمون تام یا هورمون آزاد تیروئیدی؟

- مهمترین علت انتخاب تست سنجش هورمون آزاد، تشخیص کم کاری و یا پرکاری تیروئید در افرادی است که دارای اختلالات پروتئینهای اتصال هستند وگرنه سنجش هورمون تام تیروئیدی در سایر موارد کمک کننده است.

The only reason to select (FT4 or FT3) in preference to (TT4 or TT3) is diagnostic accuracy for detecting hypo-and hyperthyroidism in patients with thyroid hormone binding abnormalities.

- متاسفانه سنجشهای FT4 or FT3 مرسوم متاثر از پروتئینهای اتصال هستند و می توانند نتایج غیر معتبری به دست دهند.
- متاسفانه روش سنجش هورمون آزادی که در تمام شرایط بالینی معتبر باشد هنوز وجود ندارد.

دخالت اتوانتی بادی ها در سنجش هورمون آزاد

نمونه سرم / پلاسمای برخی افراد دارای اتوانتی بادی علیه هورمونهای تیروئیدی است، حضور این اتوانتی بادی ها سبب تداخل در سنجش، **هورمون تام و هورمون آزاد** خواهد بود.

۱. **جهت مداخله اتوانتی بادی به روش سنجش وابسته** است. اتصال هورمون نشاندار به این اتوانتی بادیها در برخی روشها نتایج منفی کاذب و در برخی دیگر نتایج مثبت کاذب به بار می آورد.

۲. **آنالوگ هورمون نشاندار** با اتصال به این اتوانتی بادی ها سبب **افزایش شدید و کاذب** هورمون تیروکسین آزاد می گردد.

۳. به عبارتی اتوانتی بادی ها در **هر سه روش مستقیم**، تک مرحله ایی، دو مرحله ایی و آنتی بادی نشاندار می توانند **تداخل** ایجاد کنند.

اثر داروها بر سنجش هورمون آزاد

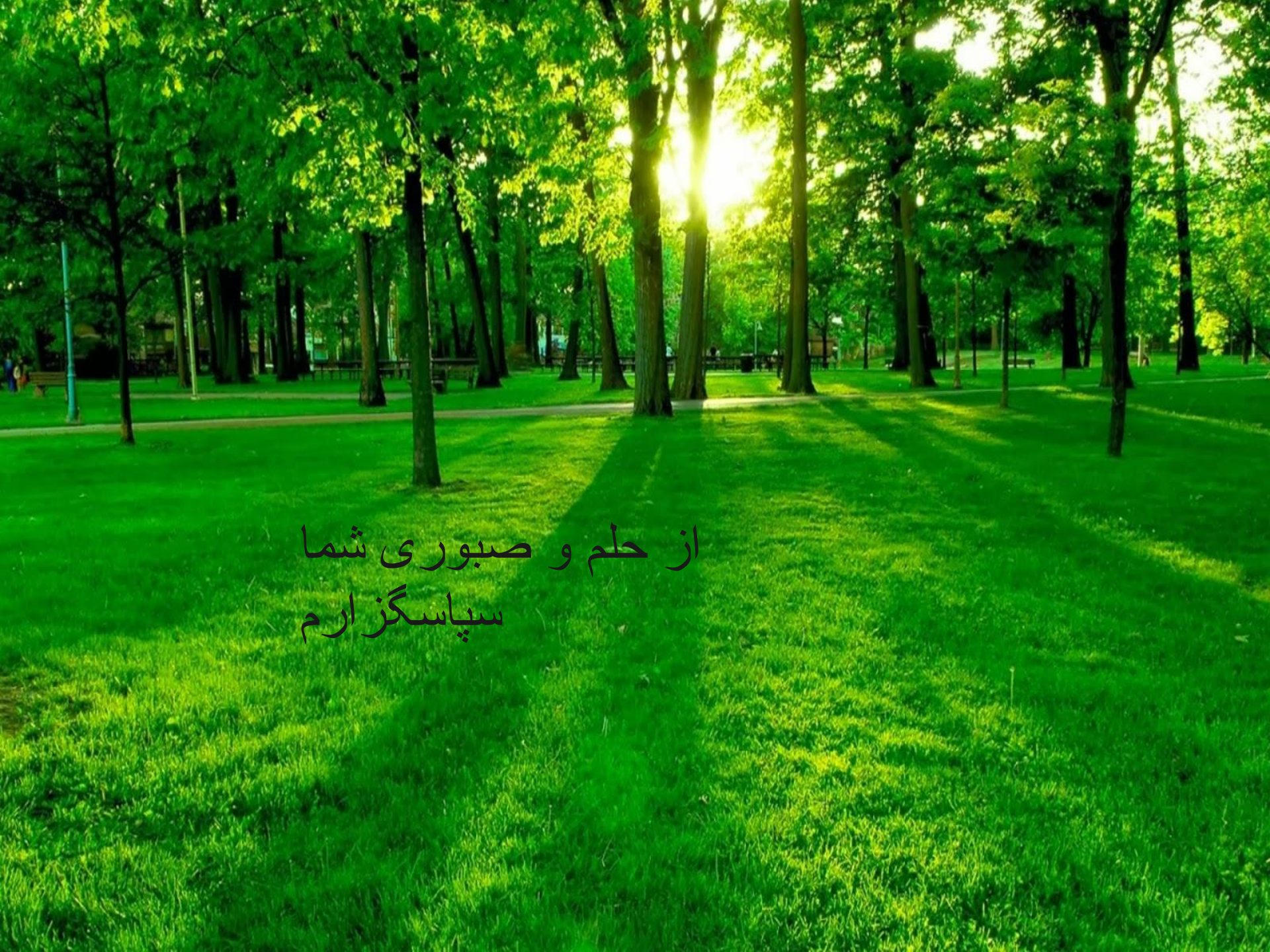
برخی از داروهای مصرفی، می توانند اتصال هورمونهای تیروئیدی به پروتئینهای اتصال را تحت تاثیر قرار دهند.

Phenytoin, Carbamazepine, Aspirin or Furosemide/Frusemide

- با اتصال داروهای مذکور به پروتئینهای اتصال، بخش بزرگتری از هورمون تیروکسین (Increase FT4) بصورت آزاد مورد سنجش قرار می گیرد.
- درمان با هپارین، سبب رهایی لیپاز، افزایش اسید چرب آزاد، در نتیجه جابجایی تیروکسین از پروتئینهای اتصال، افزایش میزان تیروکسین آزاد مشاهده خواهد شد.

خلاصه و نتیجه گیری:

- در سنجش هورمونهای آزاد تیروئیدی از روشهای دیالیز تعادلی، اولترافیلتراسیون و ژل فیلتراسیون برای مقاصد پژوهشی می توان استفاده نمود.
- در اهداف بالینی از شاخص هورمونهای آزاد و روشهای مستقیم یک مرحله ایی، دو مرحله ایی و آنتی بادی نشاندار می توان استفاده نمود.
- جهت سنجش هورمونهای آزاد تیروئیدی روش **استاندارد طلایی وجود ندارد**.
- هیچ روش سنجش هورمون آزادی که در تمام شرایط بالینی معتبر باشد وجود ندارد.
- در سنجش هورمونهای آزاد تیروئیدی می بایست به **تداخل داروها، آتوانتی بادیها و اثرات رقت** توجه نمود.
- به استاندارد سازی بر اساس **نمونه های سرمی هم شرایط، تنظیم درجه حرارت، همزمانی** سنجش میزان تام هورمون توجه نمود.
- استفاده از **Uptake متناسب** با نوع هورون و بیان نتیجه سنجش هورمون آزاد در قالب **THBR** توصیه می شود.



از حلم و صبوری شما
سپاسگزارم

Thyroid Function Tests

Normal Laboratory Values

Test	Abbreviation	Typical Ranges
Serum thyroxine	T4	4.6-12 ug/dl
Free thyroxine fraction	FT4F	0.03-0.005%
Free Thyroxine	FT4	0.7-1.9 ng/dl
Thyroid hormone binding ratio	THBR	0.9-1.1
Free Thyroxine index	FT4I	4-11
Serum Triiodothyronine	T3	80-180 ng/dl
Free Triiodothyronine I	FT3	230-619 pg/d
Free T3 Index	FT3I	80-180
Radioactive iodine uptake	RAIU	10-30%
Serum thyrotropin	TSH	0.5-6 uIU/ml
Thyroxine-binding globulin	TBG	12-20 ug/dl T4 +1.8 ugm
TRH stimulation test Peak	TSH	9-30 uIU/ml at 20-30 min
Serum thyroglobulin I	Tg	0-30 ng/ml
Thyroid microsomal antibody titer	TMAb	Varies with method
Thyroglobulin antibody titer	TgAb	Varies with method

$$FT4I = \text{Total T4 patient} \times \frac{\text{T3RU patient}}{\text{T3RU mean control}}$$

Test	Method	USC Reference Ranges *
Total Thyroxine (TT4)	Roche Cobas	57-159 nmol/L (4.5-12.5 ug/dL)
Total Triiodothyronine (T3)	Roche Cobas	1.2-2.8 nmol/L (80-180 ng/dL)
Thyroid Hormone Binding Ratio (THBR)	Roche Cobas	0.72 - 1.24 (unitless)
Thyrotropin (TSH)	Roche Cobas	0.3 - 4.0 mIU/L
Thyroxine Binding Globulin (TBG)	Siemens Immulite	14.0-31.0 mg/L (14.0-31.0 µg/mL)
Thyroid Peroxidase Antibody (TPOAb)	Kronus/RSR	<1.0 kIU/L
Thyroglobulin (2G-Tg-IMA)	Beckman Access	3-40 µg/L (3-40 ng/mL) #
Thyroglobulin RIA (Tg-RIA)	USC LDM [31]	3-40 µg/L (3-40 ng/mL) #
Tg Autoantibody (TgAb)	Kronus/RSR	<0.4 kIU/L