

چالشهای استانداردسازی اندازه گیری هورمونهای آزاد T3/T4

مهدی هدایتی

مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی
پژوهشکده علوم غدد درون ریز و متابولیسم
دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
اردیبهشت ۱۳۹۴

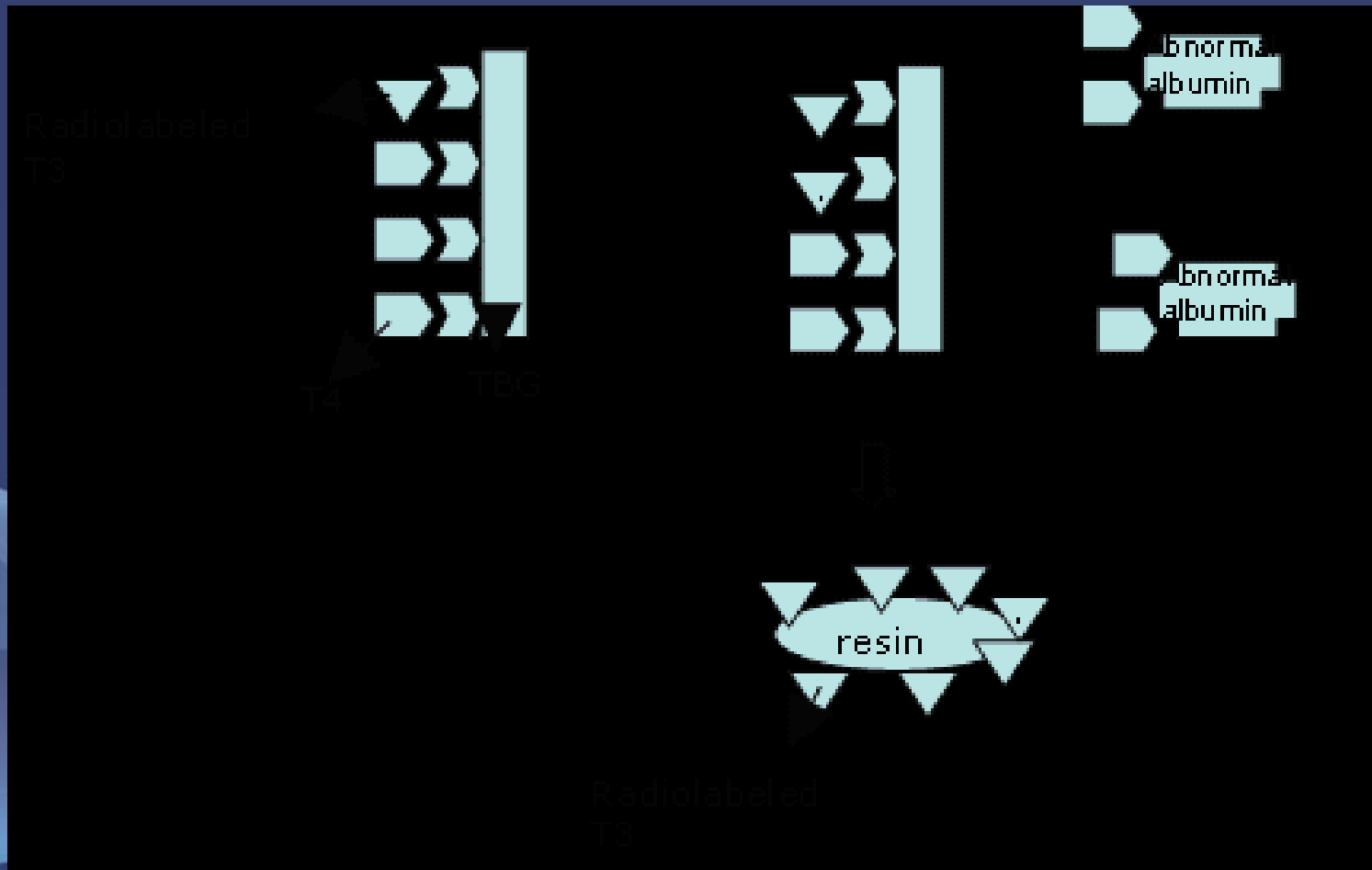
مقدمه:

- گزارش اتصال بخش اعظم هورمونهای تیروئیدی به پروتئینهای پلازما در سال ۱۹۳۹
- تلاش برای سنجش بخش آزاد هورمونها
- ارائه فرضیه هورمون آزاد
- گزارش سنجش هورمونهای آزاد تیروئیدی ۱۹۶۰
- تردید در خصوص اعتبار روشهای ارائه شده از دهه ۱۹۶۰

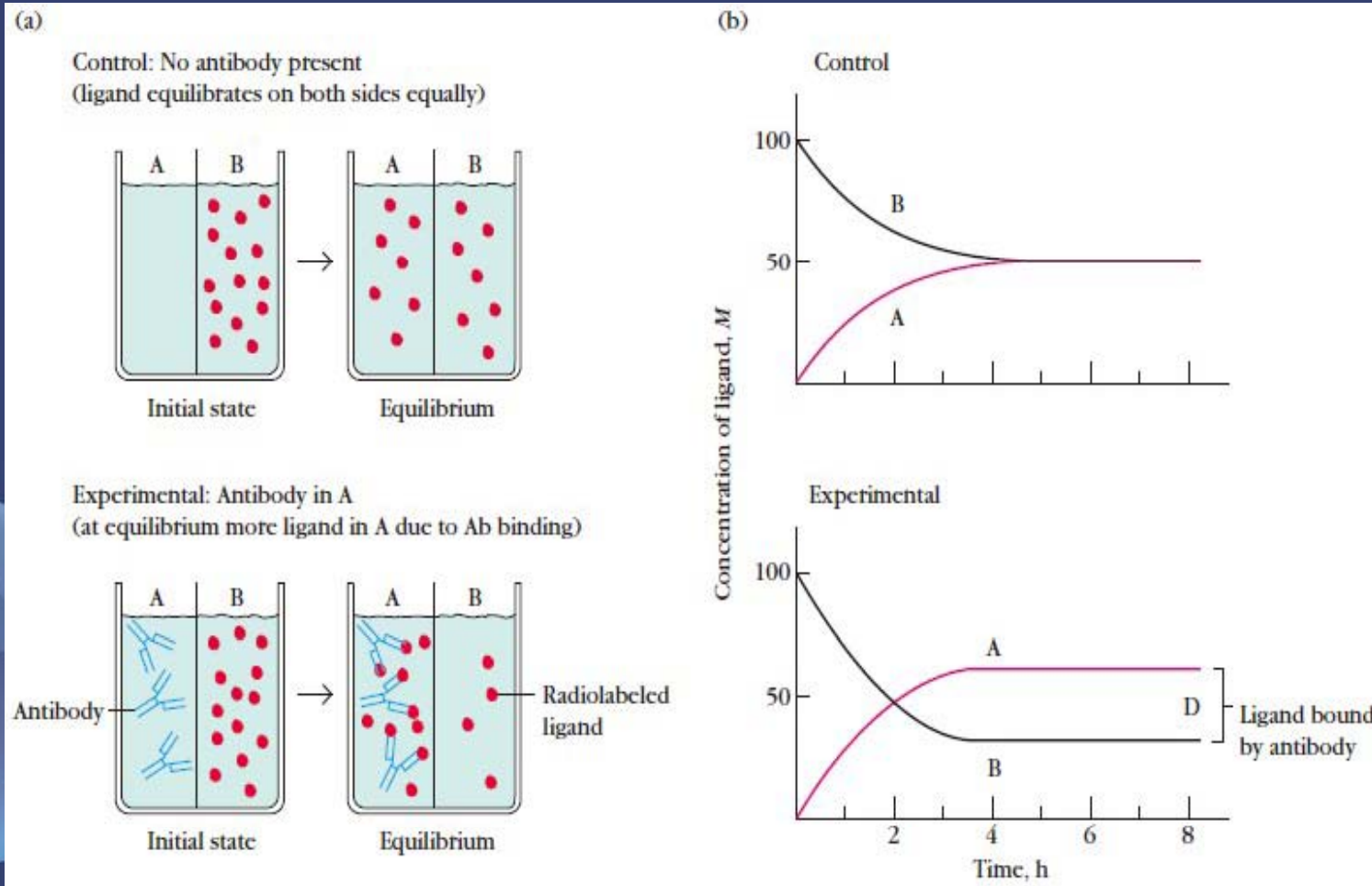
روشهای سنجش هورمونهای آزاد تیروئیدی

- روشهای غیر مستقیم یا همان روشهای تعیین شاخص هورمونهای آزاد تیروئیدی (روشهای زوج سنجشی، مانند برداشت رزینی T3)
- روشهای مستقیم تعیین میزان هورمون آزاد تیروئیدی:
 - الف: روشهای دو مرحله ایی جداسازی فیزیکی
 - ب: روشهای یک مرحله ایی بدون جداسازی هورمون آزاد

روش غیر مستقیم (تعیین شاخص) هورمون آزاد تیروئیدی



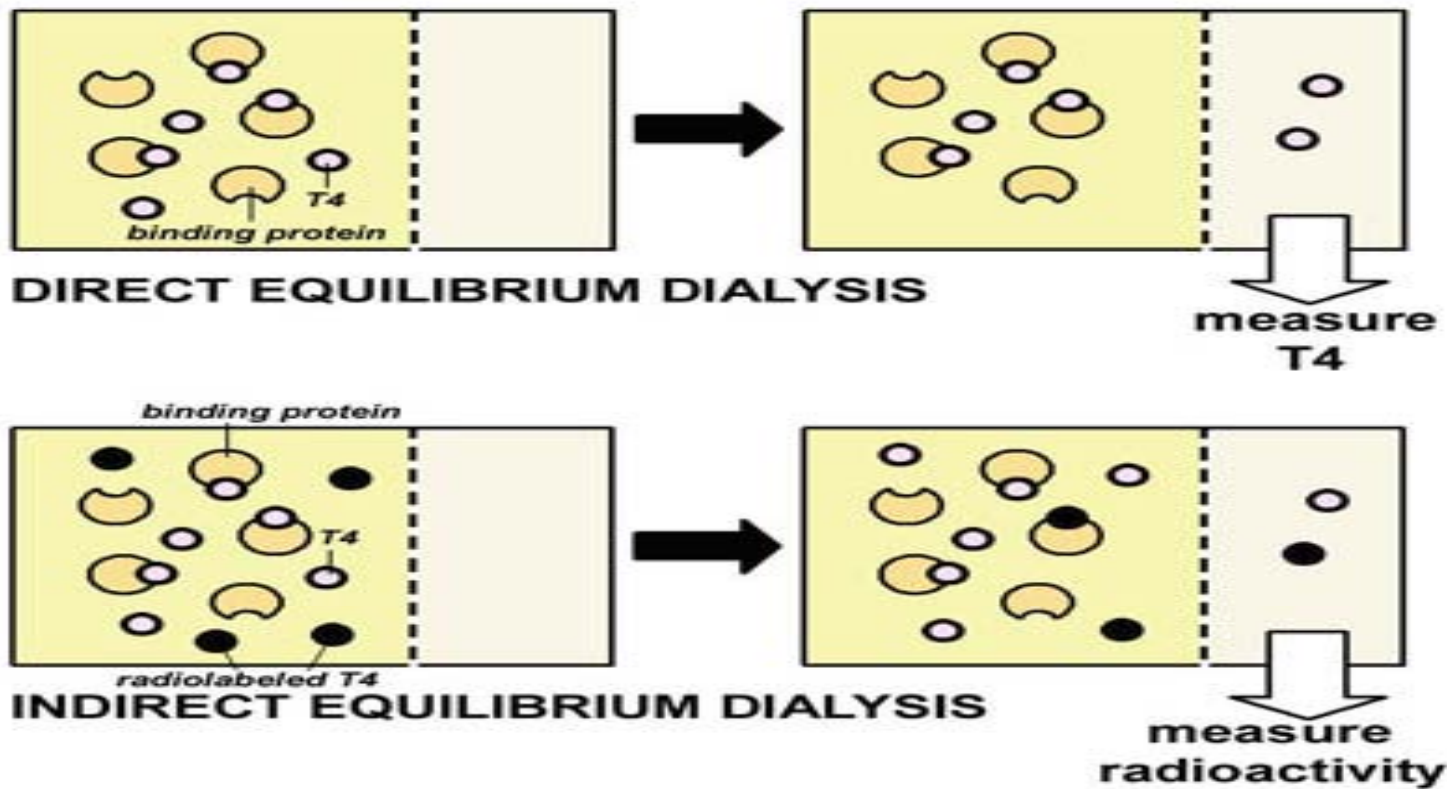
روش جداسازی فیزیکی (دیالیز تعادلی):



دو روش اجرای دیالیز تعادلی

Medscape®

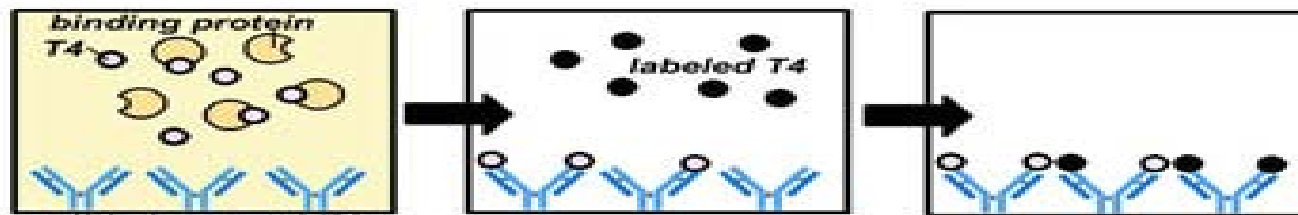
www.medscape.com



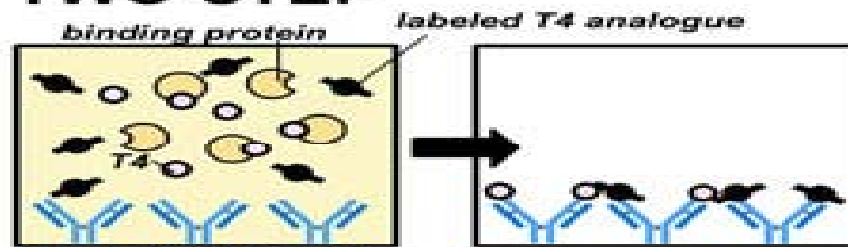
روشهای بدون جداسازی فیزیکی هورمون آزاد

Medscape®

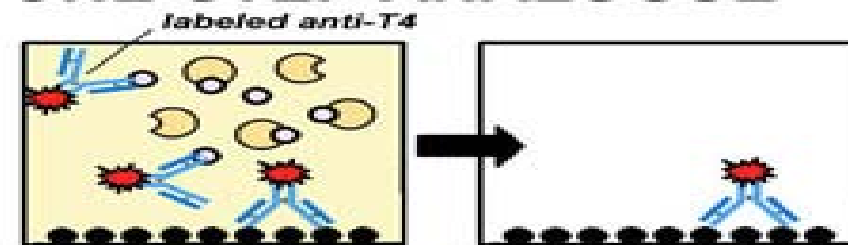
www.medscape.com



solid-phase anti-T4
TWO-STEP



solid-phase anti-T4
ONE-STEP ANALOGUE



solid-phase T4
LABELLED ANTIBODY

روشهای جدا سازی فیزیکی هورمون آزاد

- این روشها اعم از انواع دیالیز تعادلی، اولترافیلتراسیون و ژل فیلتراسیون:

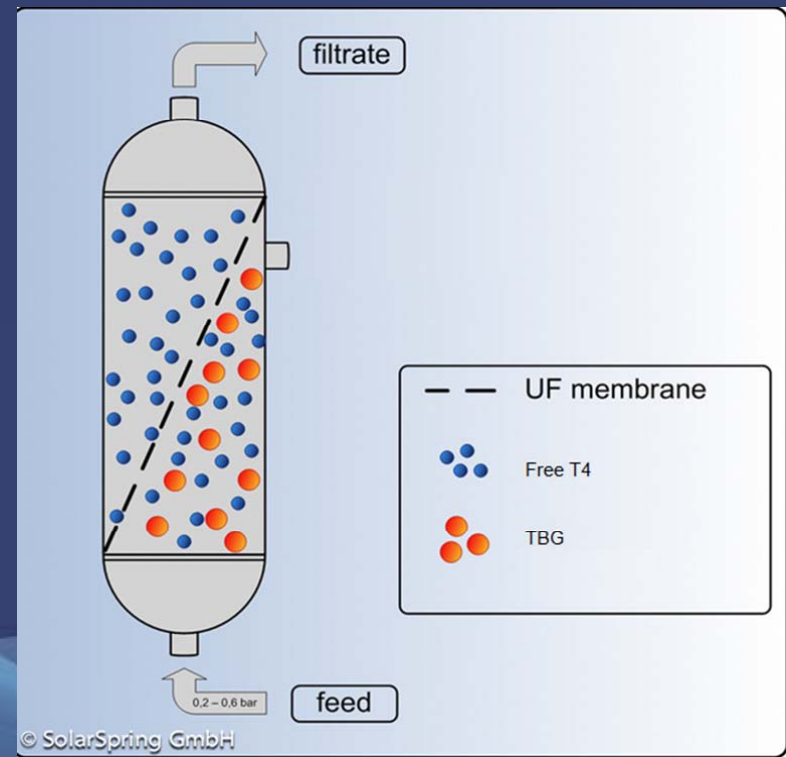
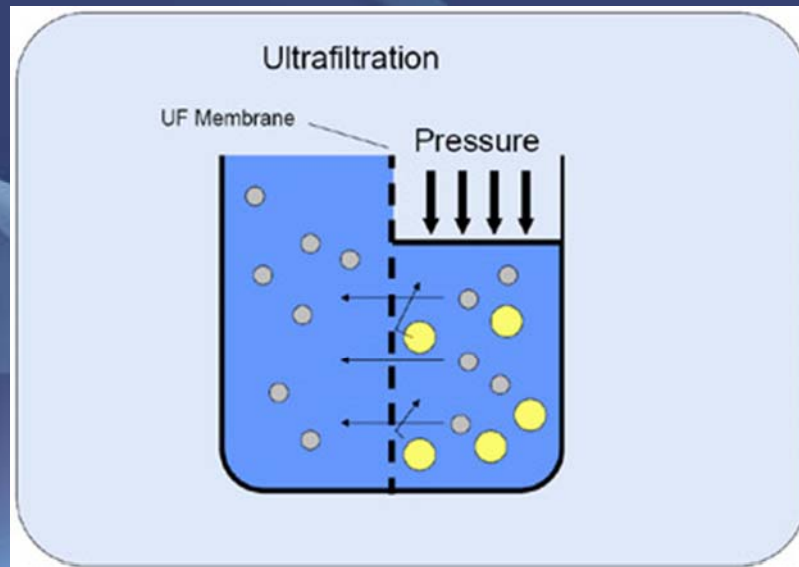
الف: نیازمند تجربه بالا

ب: نیازمند شرایط و امکانات مناسب

ج: پرهزینه و وقت گیر

در نتیجه برای آزمایشگاههای تحقیقاتی مناسب و برای آزمایشگاههای تشخیصی نامناسب هستند.

روشهای جداسازی فیزیکی لیگاند با فیلتراسیون



راهنمای اول: نام گذاری روش سنجش هورمون آزاد

- روشهای سنجش هورمون در آزمایشگاههای تشخیص اعم از تعیین شاخصهای آزاد و یا سنجش مستقیم، هورمون آزاد را بصورت فیزیکی از هورمونهای متصل به پروتئینها جداسازی نمی کنند، لذا 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.

روش تعیین شاخص هورمون آزاد با سنجش TBG

- محاسبه FT4 با کمک سنجش TBG فقط زمانی به صحت تشخیص در مقایسه با TT4 کمک کند که اختلال در نتیجه سنجش هورمون تام به علت **اختلال در غلظت TBG** باشد.
- چرا از سنجش TBG با TT4 استفاده نشود؟ چرا که این شاخص TT4/TBG مستقل از فاکتور TBG نیست و نمی تواند اختلالات ناشی از آفینیتی TBG را اصلاح کند. در ضمن کلا سنجش TBG نمی تواند اختلال در سایر پروتئینهای اتصالی را تصحیح نماید.
- ظرفیت اتصالی TBG می تواند مستقل از غلظت آن تغییر نماید، تغییر آفینیتی، تداخل داروها در اتصال به این پروتئین و بیماریهای غیر تیروئیدی (NTI) وضعیتی از قبیل هستند.
- همانطور که اشاره شد، حداکثر ۷۵٪ اتصال هورمونهای تیروئیدی با TBG است و اختلالات مقداری و یا عملکردی آلبومین و پره آلبومین در این روش لحاظ نمی شود.

روش تعیین شاخص هورمون آزاد با برداشت T3 رادیواکتیو (T7=3+4)

- 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 محدود برداشت تیروئیدی تقریبا ۲۵ تا ۴۰ را طبیعی اعلام می کنند.

راهنمای دوم: استفاده از THBR

۱. تست Uptake باید THBR نامیده شده و حتما ردياب مورد استفاده در نامگذاری ذکر گردد مثلا THBR-T3، THBR-T4 or
۲. جهت انعکاس اختلال اتصال T4 به پروتئینهای اتصالی در سنجش TT4 استفاده از ردياب T4 در THBR به ردياب T3 ارجح می باشد.
۳. نتیجه تست THBR می بایست در مقایسه با یک نمونه سرم طبیعی (با مقدار ۱.۰۰) گزارش گردد.
۴. در محاسبه THBR حتما از نسبت سیگنال جذب به سیگنال تام منهای سیگنال جذب استفاده شود (نه فقط نسبت سیگنال جذب به سیگنال تام).
۵. در گزارش آزمایشگاه علاوه بر میزان تام هورمون، شاخص هورمون آزاد، مقدار خود THBR نیز ذکر گردد.
۶. نتیجه THBR به تنهایی نباید ملاک تشخیص بالینی مستقلی قرار گیرد و حتما با نتایج مقدار تام هورمون T3 or T4 تفسیر شود.

ادامه:

- تستهای در دسترس THBR خوشبختانه در صورت طبیعی بودن میزان پروتئینهای اتصالی و یا تغییرات 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

حضور برخی داروها در نمونه افراد تحت درمان نیز درجه اعتبار این آزمون را می کاهند.

نقد روشهای جداسازی فیزیکی لیگاند:

- همانطور که اشاره شد در این روشهای سنجش FT4 ابتدا هورمون آزاد را بصورت فیزیکی از هورمونهای متصل به پروتئینها جدا می کنند و سپس میزان هورمون آزاد جدا شده را با ایمونواسی حساس، مورد سنجش قرار می دهند. در این روشها از محلولهای استاندارد شده به روش توزینی استفاده می شود.
- در این روشها یا از غشاهای نیمه تراوا برای دیالیز و یا از روشهای اولترافیلتر استفاده می شود. 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.

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

متأسفانه این روش ها نیز متاثر از اختلالات پروتئینهای اتصالی می باشند. این روشها نیز با رقیق سازی نمونه، در نتیجه سنجش انحراف ایجاد می کنند. متأسفانه برهم کنش هورمون آزاد با اجزای اجرای واکنش نیز می تواند از اعتبار روش بکاهد.

ادامه:

- 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.
- 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.
- این روشها برای سنجش FT3 هم به لحاظ اهمیت بالینی و هم اجرای آزمون، شیوع کمتری نسبت FT4 داشته و در تعداد محدودی آزمایشگاه تحقیقاتی استفاده می شوند.

روشهای بدون جداسازی فیزیکی لیگاند:

رمز موفقیت و اعتبار این روشها در دو نکته نهفته است:

۱. اولاً این روشها می بایست شرایطی را در طی فرآیند مهیا کنند که تعادل میان هورمون آزاد و هورمون متصل به پروتئینهای اتصال برهم نخورد و دچار آشفتگی نگردد (حداقل رقیق سازی اتفاق بیافتد).

۲. ثانياً کالیبراتورهای مورد استفاده از نوع سرم هایی با مقادیر معین هورمون آزاد باشند تا بیشترین قرابت را با نمونه های مورد بررسی داشته باشند.

این دو نکته در خصوص هر سه رویکرد و روش اصلی سنجش هورمون آزاد (بدون جداسازی فیزیکی) صادق می باشد:

- two-step labeled-hormone;
- one-step labeled-analog;
- labeled antibody.

راهنمای سوم: روشهای بدون جداسازی فیزیکی لیگاند

۱. روشهایی که فاقد مرحله جداسازی فیزیکی هورمون آزاد هستند، نباید بیش از ۱ تا ۲ درصد هورمون را از پروتئینهای اتصالی 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 اتصالی 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 اتصالی 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.
- از آنجایی جهت تداخل و تقریباً میزان تداخل در روش سنجش تیروکسین تام و تیروکسین آزاد یکسان می باشد در مواردی که به نتیجه هورمون آزاد شک دارید علاوه بر تکرار آزمایش هورمون آزاد، بهتر است به طور همزمان هورمون تام نیز سنجیده شود.

دخالت اتوانتی بادی ها در سنجش هورمون آزاد

نمونه سرم / پلاسمایی برخی افراد دارای اتوانتی بادی علیه هورمونهای تیروئیدی است، حضور این اتوانتی بادی ها سبب تداخل در سنجش هم هورمون تام و هم 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

۱. با اتصال داروهای مذکور به پروتئینهای اتصال، جایگاه کمتری در اختیار هورمونها قرار گرفته و بخش بزرگتری از هورمون تیروکسین (**Increase FT4**) بصورت آزاد مورد سنجش قرار می گیرد.
۲. در صورتی که طی فرآیند سنجش، نمونه رقیق شود، میزان هورمون تیروکسین آزاد، افزایش یافته خواهد بود. این عمل حتی در روش دیالیز تعادلی نیز اتفاق می افتد.
۳. درمان با هپارین، سبب رهایی لیپاز، افزایش اسید چرب آزاد، در نتیجه جابجایی تیروکسین از پروتئینهای اتصال، و افزایش میزان تیروکسین آزاد 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 در صورت نیاز توجه نمود.
- روشهای طیف سنجی جرمی علی رغم ویژگی بسیار بالا، قیمت بسیار زیاد، نیاز به تخصص، در خصوص سنجش میزان هورمون آزاد کارایی ندارند.

