

آزمایش‌های عملکرد تیروئید

آزمایش‌های عملکرد تیروئید

تألیف

دکتر هوشنگ امیررسولی

دانشیار و مدیر گروه علوم آزمایشگاهی

دانشکده پیراپزشکی

دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی



کتاب ارجمند



دکتر هوشنگ امیرسولی	سرشناسه: امیرسولی، هوشنگ، ۱۳۲۵
آزمایش‌های عملکرد تیروئید	عنوان و نام‌پدیدآور: آزمایش‌های عملکرد تیروئید / تألیف هوشنگ امیرسولی.
فروست: ۸۰۴	مشخصات نشر: تهران، کتاب ارجمند، ۱۳۹۱
ناشر: انتشارات کتاب ارجمند	مشخصات ظاهری: ۱۶۸ ص. پالتویی
صفحه‌آرا: فاطمه نویدی	شابک: ۹۷۸-۶۰۰-۲۰۰-۲۴۵-۷
طراح جلد: احسان ارجمند	وضعیت فهرست‌نویسی: فیا
چاپ: سامان، صحافی: نوین	موضوع: تیروئید - آزمون‌ها
چاپ اول، فروردین ۱۳۹۲، ۱۱۰۰ نسخه	رده‌بندی کنگره: ۱۳۹۱
شابک: ۹۷۸-۶۰۰-۲۰۰-۲۴۵-۷	۴ ۷ الف/۵/۶۵۵ RC
www.arjmandpub.com	رده‌بندی دیویی: ۶۱۶/۴۴۰۷۵۸
این اثر، مشمول قانون حمایت از مؤلفان و مصنفان و هنرمندان مصوب ۱۳۴۸ است، هر کس تمام یا قسمتی از این اثر را بدون اجازه مؤلف، ناشر، نشر یا پخش یا عرضه کند مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.	شماره کتابشناسی ملی: ۳۰۲۷۹۶۲

مرکز پخش: انتشارات ارجمند

دفتر مرکزی: تهران، بلوار کشاورز، بین کارگر و ۱۶ آذر، پلاک ۲۹۲، تلفن ۸۸۹۸۲۰۴۰
 شعبه اصفهان: خیابان چهارباغ بالا، پاساژ هزارجریب، تلفن ۳۱۱-۶۲۸۱۵۷۴
 شعبه مشهد: ابتدای احمدآباد، پاساژ امیر، انتشارات مجد دانش، تلفن ۵۱۱-۸۴۴۱۰۱۶
 شعبه بابل: خ گنج افروز، پاساژ گنج افروز، تلفن ۱۱۱-۲۲۲۷۷۶۴
 شعبه رشت: خ نامجو، روبروی ورزشگاه عضدی، تلفن ۱۳۱-۳۲۳۲۸۷۶
 شعبه ساری: بیمارستان امام، روبروی ریاست تلفن ۹۱۱۸۰۲۰۰۹۰

بها: ۶۰۰۰ تومان

فهرست مطالب

فصل ۱. آزمایش‌های کارکرد تیروئید..... ۹

۱-۱	مقدمه.....	۹
۱-۲	اندازه‌گیری تام هورمون‌های تیروئید (TT3 و TT4).....	۱۰
۱-۳	تست‌های هورمون‌های آزاد تیروئید (TT3 و TT4).....	۱۳
۱-۴	تست‌های برآورد غیرمستقیم FT3 و FT4.....	۱۷
۱-۵	روش‌های ایمونواسی هورمون‌های آزاد تیروئید (TT3 و TT4).....	۲۱
۱-۶	فایده بالینی اندازه‌گیری FT3 و FT4.....	۲۴
۱-۷	محدوده‌های مرجع FT3 و FT4.....	۲۶
۱-۸	تداخل در تست‌های FT3 و FT4.....	۲۶
۱-۹	سنجش TSH (هورمون محرکه تیروئید / تیروتروپین).....	۲۹
۱-۱۰	کاربرد بالینی اندازه‌گیری TSH.....	۳۸
۱-۱۱	اتوانتی‌بادی‌های مختص تیروئید (TPOAb, Tgb, TRAb).....	۴۰
۱-۱۲	تیروگلوبولین (Tg).....	۵۲
۱-۱۳	استفاده از Tg سریال سرم برای پایش بیماران مبتلا به DTC.....	۶۱
۱-۱۴	استفاده از mRNA اختصاصی تیروئید به‌عنوان یک تومور مارکر.....	۶۹
۱-۱۵	تداخل با متدولوژی‌های تست تیروئید.....	۷۱
۱-۱۶	داروهایی که بر روی تست‌های تیروئیدی در بیماران یوتیروئید اثر می‌کنند.....	۷۴
۱-۱۷	اتوماسیون تست‌های تیروئید.....	۷۶

فصل ۲. ارزیابی کارکرد تیروئید در شیرخواران و کودکان..... ۷۹

۲-۱	مقدمه.....	۷۹
۲-۲	شیرخواران.....	۸۰
۲-۳	کودکان.....	۹۱

فصل ۳. ارزیابی کارکرد تیروئید در بارداری..... ۹۹

۳-۱	اهمیت وضعیت تیروئید در بارداری.....	۹۹
۳-۲	گنادوتروپین کوریونی انسانی.....	۱۰۱
۳-۳	رابطه بالینی ارزیابی عملکرد تیروئید در بارداری.....	۱۰۵
۳-۴	بیماری تیروئید مادری در دوران بارداری: اثر آن بر روی تکامل کودک.....	۱۰۷
۳-۵	نقش بالینی آنتی‌بادی‌های ضدتیروئید در بارداری.....	۱۰۸
۳-۶	روش‌های اندازه‌گیری عملکرد تیروئید در بارداری.....	۱۰۹

۳-۷	ایجاد محدوده‌های مرجع برای هورمون‌های تیروئید در بارداری.....	۱۲۱
۳-۸	غربالگری عملکرد تیروئید در بارداری.....	۱۲۶
۳-۹	نتیجه‌گیری.....	۱۲۸
فصل ۴. سؤالات..... ۱۳۱		
ضمیمه - مقادیر و فواصل مرجع..... ۱۵۹		
منابع..... ۱۶۵		

مقدمه

آزمایش‌های بررسی کارکرد تیروئید مورد درخواست پزشکان و متخصصان برای همه سنین از نوزادی تا پیری است. آزمایش حساس TSH انعکاسی از میزان و عملکرد طبیعی هورمون‌های تیروئیدی می‌باشد و کاهش یا افزایش هورمون‌های تیروئیدی را نشان می‌دهد. با توجه به ارتباط لگاریتمی بین T_4 و TSH، تنها یک واحد تغییر در T_4 ، TSH را بیش از ده واحد تغییر خواهد داد اما انتخاب درست تست‌های تیروئیدی و تفسیر صحیح آنها برای تشخیص و درمان از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است به‌علاوه آگاهی از محدودیت‌هایی که اندازه‌گیری این تست‌ها دارد مهم‌تر است به‌طوری که بسیاری از بیماری‌های غیرتیروئیدی و تعداد زیادی از داروها نتایج TSH و T_3 و T_4 را به‌گونه‌ای تغییر می‌دهند که تفسیر نتایج آنها را با مشکل روبرو می‌کند تغییر در غلظت پروتئین‌های متصل‌شونده به هورمون‌های تیروئید مثل TBG و آلبومین و بارداری و بیماران بستری در بیمارستان روی تست‌های تیروئیدی تأثیر گذاشته و ارتباط T_4 و T_3 با TSH را به‌طور غیرمتعارف تغییر می‌دهند.

این کتاب نه تنها در انتخاب تست‌های تیروئیدی و تفسیر آنها، اثر داروها و سایر عوامل مؤثر روی این تست‌ها را نیز مورد بررسی قرار می‌دهد و پزشکان و متخصصان آزمایشگاه را از وجود مشکلات تکنیکی که در اندازه‌گیری صحیح این هورمون‌ها وجود دارد آگاه می‌سازد چه بسا با مشورت پزشک و آزمایشگاه می‌توان نه تنها در انتخاب نوع آزمایش بلکه در انتخاب روش مناسب اندازه‌گیری با توجه به شرایط بیمار نیز به پزشک در تشخیص و درمان کمک کرد برای همین منظور علاوه بر بحث متابولیسم تیروئید، اختلالات تیروئیدی کودکان و شیرخواران و هم‌چنین

تغییرات هورمون‌های تیروئیدی در دوران بارداری به‌طور جداگانه مورد بررسی قرار گرفته است.

در خاتمه ضمن تشکر از همکاران گرانقدر تقاضا می‌کنم از راهنمایی‌های خود اینجانب را یاری نمایید تا در چاپ بعدی کتاب با اشکال کمتری به چاپ برسد. لازم می‌دانم از انتشارات وزین ارجمند تشکر و قدردانی نمایم.

دکتر هوشنگ امیرسولی

۱-۱ مقدمه

در طول چهل سال گذشته پیشرفت‌های به‌دست آمده در زمینه حساسیت و ویژگی^۱ متدولوژیک تست‌های تیروئیدی تأثیر چشمگیری بر روی راهبردهای بالینی به منظور تشخیص و درمان اختلالات تیروئید داشته است. در دهه ۱۹۵۰ فقط یک تست تیروئیدی وجود داشت و آن‌هم، برآورد غیرمستقیم غلظت تام تیروکسین (T4) سرم (جزء آزاد و متصل به پروتئین) بود که با استفاده از تکنیک ید متصل به پروتئین^۲ (PBI) انجام می‌شد. از سال ۱۹۷۰ پیشرفت‌های تکنولوژیک در روش‌های رادیوایمونواسی (RIA) و اخیراً، سنجش ایمونوتریک (IMA) و اسپکترومتری جرمی متوالی، به‌طور فزاینده‌ای ویژگی، تکرارپذیری، و حساسیت تست‌های تیروئیدی را بهبود بخشیده‌اند. در حال حاضر، روش‌های ایمونواسی و اسپکترومتری جرمی متوالی برای اندازه‌گیری غلظت سرمی T4 تام (TT4) و تری‌یدوتیرونین تام (TT3) و همچنین جزء آزاد هورمون (FT4 و FT3) وجود دارند. علاوه بر اینها می‌توان پروتئین‌های متصل به هورمون تیروئید [گلوبولین متصل به تیروکسین (TBG)، ترانس - تیرتین (TTR)، پره‌آلبومین (TBPA) و آلبومین] و همچنین محرک هیپوفیزی

1- specificity

2- protein bound iodine

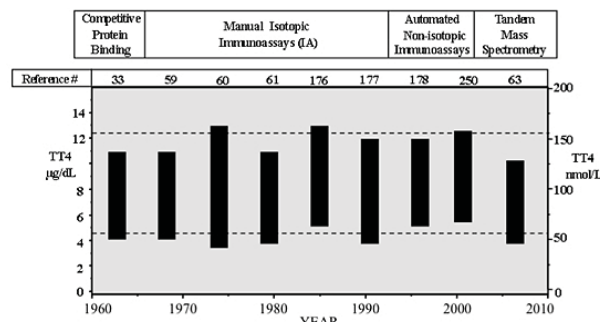
تیروئید [تیروتروپین (هورمون محرکه تیروئید، TSH)] و پروتئین پیش‌ساز هورمون تیروئید [تیروگلوبولین (Tg)] را اندازه‌گیری کرد. شناخت این موضوع که خودایمنی نمایانگر علت اصلی اختلال در عملکرد تیروئید است، باعث پیشرفت در تشخیص اتوآنتی‌بادی‌های تیروئیدی نظیر آنتی‌بادی علیه پراکسیداز تیروئیدی (TPOAb)، آنتی‌بادی علیه تیروگلوبولین (TgAb) و آنتی‌بادی علیه گیرنده TSH شده است. در حال حاضر، این تست‌های تیروئیدی با استفاده از روش‌های دستی یا اتوماتیک و به‌کارگیری معرف‌های مختص آنتی‌بادی‌های این لیگاندها، بر روی نمونه‌های سرم انجام می‌شود. با این وجود، مقوله‌های حساسیت، ویژگی و استانداردسازی، هنوز هم منجر به تغییرپذیری قابل‌توجهی بین روش‌های انجام‌شده برای بسیاری از تست‌های تیروئیدی می‌شود. برای پرداختن به این موضوع، سازمان‌های حرفه‌ای سعی در برقرار کردن استانداردهای اجرایی جدید هستند و همچنین تولیدکنندگان ابزارهای اندازه‌گیری متعهد به پیشرفت‌های تکنولوژیک شده‌اند. در این فصل یک مرور کلی بر روی وضعیت و محدودیت‌های فعلی متداول‌ترین روش‌های اندازه‌گیری تیروئید که در کار بالینی به‌کار گرفته می‌شوند و توسط رهنمون‌های جاری توصیه شده‌اند، انجام گرفته است.

۱-۲ اندازه‌گیری تام هورمون‌های تیروئید (TT4 و TT3)

تقریباً ۹۹/۹۷ درصد از تیروکسین (T4) به صورت متصل به پروتئین‌های پلاسما، در حال گردش است: TBG (۶۰ تا ۷۵٪)، TTR/TBPA (۱۵ تا ۳۰٪) و آلبومین (تقریباً ۱۰٪). برخلاف آن، تقریباً ۹۹/۷٪ تری‌یدوتیرونین (T3) به صورت متصل به پروتئین (عمدتاً متصل به TBG) است. غلظت‌های تام (آزاد و متصل به پروتئین) هورمون‌های تیروئید (TT4 و TT3) در حد نانومولار در گردش هستند و اندازه‌گیری آنها به‌طور قابل‌توجهی از اندازه‌گیری نوع آزاد هورمون (FT4 و FT3) که در حد پیکومولار گردش

می‌کنند، آسان‌تر است. اندازه‌گیری TT4 سرم در چهار دهه گذشته با پیدایش تکنولوژی‌های گوناگون متحول شده است. با این حال، علیرغم تغییر در متدولوژی، از PBI در دهه ۱۹۵۰، به سنجش‌های رقابتی اتصال به پروتئین در دهه ۱۹۶۰، و RIA در دهه ۱۹۷۰، و روش‌های فعلی اسپکترومتری جرمی متوالی، هنوز هم اندازه‌گیری تمام اشکال این هورمون کار سختی است (شکل ۱-۱). اساساً به همین دلیل است که در مطالعات اخیر که بر روی محور هیپوفیز- تیروئید در بیماری‌های وخیم انجام گرفته، به‌جای T4 آزاد به‌عنوان روش ارجح برای ارزیابی وضعیت تیروئید، از T4 تام استفاده شده است. اخیراً استانداردهای و کالیبراتور T4 و T3 در دسترس قرار گرفته‌اند و یک سیستم اندازه‌گیری مرجع براساس روش‌های اسپکترومتری جرمی کروماتوگرافی مایع با رقت ایزوتوپ (ID-LC/MS) معرفی شده است که استانداردسازی این تست‌ها را بهبود بخشیده است. غلظت TT4 و TT3 به‌طور متداول، توسط روش‌های ایمونواسی رقابتی غیر ایزوتوپی با دستگاه‌های اتوماتیکی اندازه‌گیری می‌شود که از آنزیم‌ها، مولکول‌های فلورسانس و مولکول‌های دارای خاصیت نورتابی به‌عنوان سیگنال استفاده می‌کنند. روش‌های اندازه‌گیری هورمون تام نیازمند گنجاندن مهارکننده‌هایی نظیر ۸-آنیلینو-۱-نفتالین-سولفونیک اسید برای ممانعت از اتصال هورمون به پروتئین‌های سرم است تا اتصال آن به معرف آنتی‌بادی تسهیل شود. پیشرفت در روش‌های اندازه‌گیری TT3 سرم به موازات آن در مورد TT4 رخ داده است. با این وجود، چون غلظت TT3 ده برابر کمتر است، لذا علیرغم استفاده از حجم زیاد نمونه، اندازه‌گیری آن دقت و حساسیت چشمگیری را می‌طلبد. امروزه که مقادیر بسیار خالص انواع متبلور L- تیروکسین و L- تری‌یدوتیرونین به آسانی در دسترس هستند و یک تکنیک مرجع وضع شده است، تغییرپذیری بین‌روشی^۱ اندازه‌گیری هورمون‌های تام (TT3 و TT4) به زیر ۱۰٪ کاهش

1- between-method variability



شکل ۱-۱ همسانی مقادیر مرجع گزارش شده T4 تام (TT4) با توجه به تغییر روش‌ها در طول چهار دهه گذشته.

یافته است. تغییرپذیری سنجشی که در حال حاضر دیده می‌شود به احتمال زیاد مربوط به اختلاف ماده زمینه‌ای بین کالیبراتورها و سرم بیماران، و کارایی ماده بازدارنده‌ای است که توسط تولیدکنندگان مختلف به کار رفته است.

۱-۲-۱ کاربرد بالینی اندازه‌گیری TT3 و TT4

اگر غلظت پروتئین اتصالی در تمام بیماران مشابه یکدیگر بود دقت تشخیصی اندازه‌گیری هورمون تام تیروئید متناسب با دقت تشخیصی تست‌های هورمون آزاد می‌بود. برای مثال، در یک مطالعه اخیر اعلام شده که $TT4 < 7.6 \mu g/dL$ ($TT4 < 98 \text{ nmol/L}$) در خون بند ناف می‌تواند به عنوان یک تست معتبر برای غربالگری هیپوتیروئیدی مادرزادی عمل کند. متأسفانه شرایط متعددی که به طور معمول در کار بالینی با آن روبرو می‌شویم با اختلال در TBG همراه هستند و این مسئله تناسب بین هورمون تام و آزاد تیروئید را به هم می‌زند (جدول ۱-۱). علاوه بر آن، بعضی از بیماران پروتئین‌های غیرعادی متصل‌شونده به هورمون تیروئید نظیر اتوانتی‌بادی‌های هورمون تیروئید دارند، یا داروهایی مصرف می‌کنند که اندازه‌گیری هورمون‌های تیروئید را غیرقابل اعتماد می‌سازند (جدول ۱-۱ و قسمت ۸-۱). در نتیجه، اندازه‌گیری TT4 و TT3 به ندرت به عنوان تنها تست‌های تیروئید مورد استفاده

قرار می‌گیرند ولی به‌طور معمول به همراه برآورد پروتئین‌های اتصال (یعنی تست نسبت اتصال هورمون تیروئیدی،^۱ THBR) به‌کار گرفته می‌شوند و به‌صورت شاخص محاسبه شده هورمون آزاد (FT4I یا FT3I) گزارش می‌شوند. این رویکرد، متداول‌ترین اختلالات موجود در رابطه با پروتئین‌های اتصال هورمون تیروئید را که باعث اشکال در اندازه‌گیری هورمون تام تیروئید می‌شوند، به‌طور مؤثری برطرف می‌سازد (قسمت ۱-۴-۱).

۱-۲-۲ محدوده‌های مرجع TT4 و TT3

اگرچه محدوده‌های مرجع T4 تام تا اندازه‌ای بسته به روش به‌کار گرفته شده فرق می‌کند، ولی برای بیش از چهار دهه تقریباً $58-160 \text{ nmol/L}$ ($4/5-12 \text{ } \mu\text{g/dl}$) بوده است. جالب اینکه، جدیداً این تمایل به‌وجود آمده است که برای پایش حاملگی به‌جای تست‌های برآورد FT4 از اندازه‌گیری TT4 استفاده شود. این کار با استفاده از محدوده مرجع زمان غیربارداری انجام می‌شود که توسط یک فاکتور ۱/۵ برای جبران افزایش قابل پیش‌بینی TBG تعدیل می‌گردد. همانند TT4، مقادیر سرمی TT3 نیز تا اندازه‌ای وابسته به روش اندازه‌گیری هستند و محدوده مرجع آنها $1/2-2/7 \text{ nmol/L}$ ($80-180 \text{ ng/dl}$) است.

۱-۳ تست‌های هورمون‌های آزاد تیروئید (FT3 و FT4)

انگیزه بهبود بخشیدن تست‌های تیروئید این بوده است که در کار بالینی به دفعات با مشکل اختلال در پروتئین‌های اتصال (به ویژه بالا بودن TBG در حاملگی) روبرو می‌شویم. هماهنگ با فرضیه هورمون آزاد، اعتقاد بر این است که جزء بسیار اندک هورمون آزاد ($0/02\%$ هورمون T4 در برابر $0/2\%$ هورمون T3) مسئول فعالیت بیولوژیک در سطح سلولی است. چنین برمی‌آید که هنگام غیر

1- thyroid hormone binding ratio

جدول ۱-۱ شرایطی که بر روی پروتئین‌های متصل‌شونده به هورمون‌های تیروئید اثر می‌گذارند.

افزایش TBG	کاهش TBG	اختلالات مربوط به آلبومین و ترانس - تیرتین
داروها استروژن‌ها تاموکسیفن ۵- فلوروئوراسیل هروئین / متادون کلوفیبرات نیکوتینیک اسید پرفنازین	هورمون‌های تیروئید آندروژن‌ها استروئیدهای آنبولیک گلو کورتیکوئیدها L- آسپارازیناز اینترلوکین-۶	
شرایط فیزیولوژیک حاملگی هیپوتیروئیدی هیپاتیت حاد/مزمن PBC نارسایی آدرنال ایدز ادم آنژیونوروتیک پورفیری حاد متناوب کارسینوم oat cell	هیپر تیروئیدی بیماری و خیم عفونت منتشر نارسایی کبدی سندرم نفروتیک کتواسیدوز دیابتی الکلیسم مزمن سوء تغذیه آکرومغالی سندرم کوشینگ نارس بودن بیش از حد نوزاد	بیماریهای غیر تیروئیدی سوء تغذیه التهاب حاملگی
مشکلات مادرزادی	کمبود TBG	هیپر تیروکسینمی دیس آلبومینمیک خانوادگی (FDH) هیپر تیروکسینمی مرتبط با ترانس تیرتین (TTR-AH)

طبیعی بودن هورمون‌های اتصالی، اندازه‌گیری هورمون‌های آزاد، اثرات فیزیولوژیک هورمون‌های تیروئیدی را بهتر از غلظت هورمون تام منعکس می‌سازند. روش‌های اندازه‌گیری هورمون آزاد در دو گروه قرار می‌گیرند: **روش‌های مستقیم** که جداسازی فیزیکی هورمون آزاد از هورمون متصل به پروتئین را به‌کار می‌گیرند، و **تست‌های تخمینی** که یا (الف) هورمون آزاد را از روی برآورد TBG و اندازه‌گیری هورمون تام محاسبه می‌کنند، یا (ب) از روش ایمونواسی استفاده می‌کنند که برای جداکردن جزء

کوچک هورمون آزاد (که متناسب با غلظت هورمون آزاد است) یک آنتی‌بادی را بکار می‌گیرد. نکته مهمی را که باید اعتراف کرد، این است که هیچ تست هورمون آزادی وجود ندارد که به‌طور جهانی در تمام مؤسسات پزشکی معتبر باشد. تست‌های شاخص (FT3I و FT4I) و ایمونواسی‌های FT4 و FT3 همگی تا اندازه‌ای وابسته به پروتئین هستند و اکثر آنها در بیمارانی که اختلال چشمگیر در پروتئین‌های متصل‌شونده به هورمون‌های تیروئید دارند، مستعد برآورد کمتر یا بیشتر از حد واقعی FT4 هستند. حتی روش‌های مستقیم نیز که اولترافیلتراسیون یا دیالیز تعادلی را به‌کار می‌گیرند (قسمت ۱-۳-۱) از مشکلات تکنیکی مرتبط با رقت، جذب، دما، یا تأثیر مهارکننده‌های درون‌زاد پروتئین‌های اتصال‌ی در امان نیستند. متأسفانه دقت تشخیصی روش‌های اندازه‌گیری هورمون‌های آزاد را نمی‌توان از روی دسته‌بندی متدولوژیک آنها یا توسط یک تست اعتبار تکنیکی در شرایط آزمایشگاهی (نظیر رقت) پیشگویی کرد.

۱-۳-۱ روش‌های اندازه‌گیری مستقیم FT3 و FT4

متأسفانه تکنیک‌های جداسازی فیزیکی مقادیر بسیار ناچیز هورمون آزاد از بخش غالب متصل به پروتئین روش‌هایی هستند که تکنیک بسیار بالایی را می‌طلبند، انجام آنها آسان نیست و برای کار آزمایشگاهی بالینی متداول پرهزینه هستند. روش‌های مستقیمی که دیالیز تعادلی، اولترافیلتراسیون یا فیلتراسیون ژلی را برای جداسازی هورمون آزاد از هورمون متصل به پروتئین به‌کار می‌گیرند، به‌طور متداول، تنها روشهایی هستند که به سهولت در آزمایشگاه‌های مرجع در دسترس می‌باشند. اگرچه دیالیز تعادلی و اولترافیلتراسیون در حال حاضر روش‌های مرجع محسوب می‌شوند، ولی از نظر تکنیکی پیچیده بوده و به‌دلیل مهارکننده‌های اتصال در نمونه، رقت، Ph، خطاهای مربوط به جذب، یا حساسیت به دما، دستخوش برآورد کمتر یا بیش از حد واقعی FT4 می‌شوند. با این حال، نکته بسیار مهم این است که دیالیز تعادلی در دمای ۳۷°C انجام شود.

۱-۳-۱-۱ دیالیز تعادلی

در روش‌های اولیه دیالیز تعادلی ابتدا از ردیاب‌های T4 نشاندار شده با ید ۱۳۱ و سپس با ید ۱۲۵ برای اندازه‌گیری جزء T4 آزاد استفاده می‌شد که وقتی در مقدار هورمون تام ضرب می‌شد برآوردی از غلظت هورمون آزاد به دست می‌داد. در روش دیالیز متقارن برای غلبه بر تأثیر رقت، سرم بدون اینکه رقیق شود مورد استفاده قرار می‌گرفت و یا از محیط نزدیک به حالت فیزیولوژیک استفاده می‌شد. تا اوایل دهه ۱۹۷۰ برای حساس کردن روش‌های RIA به منظور اندازه‌گیری مستقیم FT4 و FT3 در محصولات دیالیز و اولترافیلترها از آنتی‌بادی‌های ضد T4 دارای میل ترکیبی زیاد و ردیاب‌های T4-I125 دارای فعالیت اختصاصی‌تر استفاده می‌شد. در پیشرفت‌های بعدی از رقیق‌کننده‌های بافری دارای خاصیت فیزیولوژیک بیشتر و یک سلول دیالیزی بهبودیافته استفاده شد. اخیراً روش ایزوتوپ کروماتوگرافی مایع / اسپکترومتری جرمی متوالی به عنوان روش مرجع بین‌المللی برای اندازه‌گیری غلظت T4 آزاد محصولات دیالیز و اولترافیلترها پذیرفته شده است. روش‌های اندازه‌گیری مستقیم هورمون آزاد اساساً برای ارزیابی وضعیت تیروئید بیماران غیرعادی که از نظر تشخیصی مقادیر ایمونواسی آنها با TSH متناسب نیست به کار می‌رود. روشهای مستقیم همچنین به عنوان روش‌های مرجع برای تعیین کردن مقادیر کالیبراتور برای تست‌های ایمونواسی FT4 به کار می‌روند (قسمت ۵-۱). با این حال، انجام دیالیز تعادلی در دمای ۳۷°C خیلی مهم است. در یک بررسی که اخیراً با استفاده از ID-LC / اسپکترومتری جرمی متوالی انجام شد، محدوده‌های مرجع مشابهی برای FT4 و FT3 در افراد مذکر و مؤنث همه سنین به دست آمد.

۱-۳-۱-۲ روش‌های اولترافیلتراسیون

نتیجه اندازه‌گیری‌های مستقیم FT4 که از اولترافیلتراسیون

استفاده می‌کنند اغلب از آنهایی که دیالیز تعادلی را بکار می‌گیرند بالاتر است چون اولترافیلتراسیون مانع تأثیر رقت می‌شود. علاوه بر آن، اولترافیلتراسیون تحت تأثیر مهارکننده‌های قابل دیالیز اتصال T4 به پروتئین (که در شرایطی نظیر بیماری‌های غیر تیروئیدی می‌توانند وجود داشته باشند) قرار نمی‌گیرد. اخیراً برای اندازه‌گیری FT4 اولترافیلتراسیون به اسپکترومتری جرمی متوالی ترجیح داده می‌شود. با این حال، اولترافیلتراسیون به واسطه شکست در حذف کامل هورمون متصل به پروتئین و یا جذب سطحی هورمون به فیلترها، ظروف آزمایشگاهی شیشه‌ای یا لوله آزمایش، مستعد خطا می‌باشد. علاوه بر اینها، در مطالعاتی که اولترافیلتراسیون در دمای آزمایشگاه (۲۵°C) انجام شده است، مقادیر FT4 را ۶۷٪ پائین‌تر از شرایطی گزارش کرده‌اند که دما ۳۷°C بوده است. این مشکلات احتمالاً دلیل این مسئله هستند که چرا در حال حاضر دیالیز تعادلی همراه با ایزوتوپ کروماتوگرافی مایع / اسپکترومتری جرمی (ID-LC/MS) کاندید روش‌های قراردادی بین‌المللی اندازه‌گیری مرجع هستند.

۱-۳-۱-۳ روش‌های جذب ژلی

در بعضی از روش‌های اولیه اندازه‌گیری مستقیم FT4 برای جداسازی هورمون آزاد از هورمون متصل به پروتئین، از ستون‌های Sephadex LH-20 استفاده می‌شد. T4 آزاد از روی ستون شسته می‌شد و مایع شسته‌شده توسط یک RIA حساس اندازه‌گیری می‌شد. با این وجود به دلیل مشکلات تکنیکی گوناگون، امروزه به ندرت از این روش استفاده می‌شود.

۱-۴ تست‌های برآورد غیرمستقیم FT3 و FT4

اکثر روش‌های اندازه‌گیری FT4 و FT3 فقط هورمون آزاد را برآورد می‌کنند. تست‌های برآورد FT4 و FT3 از یکی از دو روش "شاخص" دو تستی یا روش "جداسازی" با ایمونواسی استفاده

می‌کنند. علی‌رغم ادعای تولیدکنندگان، تمام تست‌های برآورد FT4 و FT3 فعلی تا اندازه‌ای وابسته به پروتئین متصل‌شونده هستند. در حقیقت، در مطالعه‌ای که اخیراً انجام شد، نشان داد که ایمونواسی‌های FT4 بیشتر از همبستگی با غلظت T4 آزاد، با غلظت T4 تام مرتبط هستند هرچند که این نتیجه‌گیری مورد اختلاف نظر است.

۱-۴-۱ روش FTI (FT3I و FT4I)

بعضی از روش‌های شاخص هورمون آزاد (FT3I و FT4I) بر اساس یک محاسبه ساده ریاضی هستند که غلظت هورمون تام را در برابر تأثیر پروتئین‌های اتصال‌ی غیرعادی (عمدتاً TBG) تصحیح می‌کنند. بیش از ۴۰ سال است که این شاخص‌ها برای برآورد غلظت هورمون آزاد استفاده شده‌اند و نیازمند دو اندازه‌گیری جداگانه هستند. تست اول، اندازه‌گیری غلظت هورمون تام (TT4 و TT3) است و تست دوم ارزیابی غلظت پروتئین‌های اتصال‌ی است که با یکی از روش‌های زیر انجام می‌شود: (۱) ایمونواسی مستقیم TBG، (۲) نسبت اتصال هورمون تیروئید (THBR) تست "جذبی" (۳) تعیین ایزوتوپی جزء هورمون آزاد.

۱-۴-۲ ایمونواسی TBG

دقت تشخیصی شاخص محاسبه شده هورمون آزاد با استفاده از اندازه‌گیری TBG (TT4/TBG) بیشتر از تست THBR نیست. علاوه بر آن، شاخص TT4/TBG نه مستقل از غلظت TBG است و نه خطای مربوط به اختلالات مرتبط با هورمون‌های اتصال‌ی (آلبومین یا ترانس-تیرتین) را اصلاح می‌کند (جدول ۱-۱). بدین ترتیب علی‌رغم مزایای تئوریک احتمالی استفاده از اندازه‌گیری مستقیم TBG به نظر می‌رسد که شاخص‌هایی که THBR را به کار می‌گیرند از نظر تشخیصی بر TBG مستقیم ارجحیت داشته باشند.

۳-۴-۱ نسبت اتصال هورمون تیروئید (THBR) / "تست‌های جذبی"

اولین تست "جذب T3" که در دهه ۱۹۵۰ پدید آمد از قسمت‌بندی ردیاب T3-I131 بین پروتئین‌های نمونه آزمایش و یک رباینده خنثی (غشای گلبول‌های قرمز، تالک، شارکول، رزین تبادل یون، یا آنتی‌بادی) استفاده می‌کرد. "جذب" ردیاب T3 توسط رباینده، یک برآورد غیرمستقیم معکوس از غلظت TBG نمونه بدست می‌داد. در ابتدا تست‌های جذب T3 به صورت جذب درصدی (نسبت ردیاب آزاد به کل) گزارش می‌شد. به طور نمونه، در سرم‌هایی که غلظت TBG آنها عادی است تقریباً ۳۰٪ ردیاب T3 توسط رباینده جذب می‌شود. در دهه ۱۹۷۰ دقت روش‌های اندازه‌گیری به طرق زیر بهبود یافت: جایگزین کردن T3-I125 به جای T3-I131، محاسبه جذب براساس نسبت بین ماده جاذب و مقدار کل منهای ماده جاذب، و بیان کردن نتایج به صورت نسبت (با در نظر گرفتن اینکه به سرم‌های طبیعی مقدار ۱/۱۰۰ تخصیص داده شود). از لحاظ تاریخی استفاده از ردیاب T3 برخلاف ردیاب T4، به دلایل عملی انجام شد. این دلایل عبارت بودند از اینکه میل ترکیبی T3 ده برابر کمتر از میل ترکیبی آن با T4 است که این مسئله باعث تسهیل در جذب بیشتر ردیاب T3 توسط رباینده می‌شود و زمان شمارش ایزوتوپ را پائین‌تر می‌آورد. از آنجا که در روش‌های فعلی از آنالوگ‌های غیرایزوتوپی T4 یا T3 استفاده می‌شود، دیگر، مشکلی با زمان شمارش وجود ندارد. روش‌های THBR که براساس اتصال T4 انجام می‌شوند احتمالاً برای تصحیح اثر پروتئین متصل‌شونده به T4 مناسب‌تر هستند ولی این مسئله هنوز به صورت انحصاری مورد مطالعه قرار نگرفته است. اگرچه تست‌های THBR همگی تا حدی وابسته به TBG هستند، ولی معمولاً وقتی که اختلالات TBG خفیف باشند (یعنی در حاملگی و درمان با استروژن) مقادیر FT4I و FT3I نرمال به دست می‌دهند. با این حال، این تست‌ها نمی‌توانند مقادیر FT4I و FT3I را در موارد زیر به حالت عادی درآورند: (الف) در بیماران پوتیروئیدی

که به طور آشکار پروتئین‌های متصل‌شونده ناهنجار دارند (نظیر افرادی که مقدار TBG آنها به طور مادرزادی در دو حد انتهایی قرار دارد)، (ب) هیپرتیروکسینمی دیس‌آلبومینمیک خانوادگی^۱ (FDH)، (ج) اتوانتی‌بادی علیه هورمون‌های تیروئید، بیماری‌های غیر تیروئیدی^۲ (NTI)، (د) مصرف داروهایی که به طور مستقیم یا غیرمستقیم بر روی اتصال هورمون‌های تیروئیدی به پروتئین‌های پلاسما اثر می‌کنند.

۱-۴-۵ روش‌های شاخص ایزوتوپی

اولین تست‌های اندازه‌گیری هورمون آزاد که در دهه ۱۹۶۰ پدید آمد عبارت بودند از شاخص‌های محاسبه شده از روی محصول هورمون آزاد که توسط دیالیز، به صورت ایزوتوپی اندازه‌گیری شده بود و TT4 که به وسیله PBI و بعداً با RIA اندازه‌گیری شده بود. این سیستم‌های اولیه آشکارسازی ایزوتوپی از نظر تکنیکی سخت بوده و متضمن کروماتوگرافی کاغذی، الکتروفورز، رسوب کلرید منیزیم و کروماتوگرافی ستونی بودند. روش شاخص هورمون آزاد بعداً به اولترافیلتراسیون و دیالیز متقارن توسعه یافت که در روش اخیر سرعت انتقال هورمون نشاندار شده با ایزوتوپ از داخل غشای جداکننده دو محفظه حاوی نمونه رقیق نشده یکسان اندازه‌گیری می‌شود. فایده اولترافیلتراسیون و دیالیز تعادلی این بود که اثر رقت را که بر روی مقدار دیالیز ردیاب تأثیر می‌کرد، حذف می‌نمود. با این حال، شاخص هورمون آزاد که با استفاده از یک جزء آزاد ایزوتوپی محاسبه می‌شود، به طور کامل مستقل از غلظت TBG نیست و علاوه بر آن تحت تأثیر خلوص ردیاب و ماده زمینه‌ای بافری بکار رفته قرار می‌گیرد.

۱-۴-۶ کاربرد بالینی روش‌های FTI

برای پایش زنان باردار و بیماران غیر تیروئیدی (NTI) بستری شده،

1- Familial Dysalbuminemic Hyperthyroxinemia
2- Non-Thyroidal Illness

روش شاخص FT4I به روش‌های ایمونواسی هورمون آزاد ترجیح داده می‌شود. علت این امر آن است که اختلالات پروتئین‌های متصل‌شونده (که در حاملگی و بیماری‌های غیر تیروئیدی دیده می‌شود) می‌تواند باعث اختلالات مختص روش در مقادیر ایمونواسی FT4 بشود به طوری که محدوده‌های مرجع آن برای زنان غیرباردار به کار نمی‌آید. برخلاف آن، محدوده مرجع FT4I مربوط به زنان غیرباردار برای بیماران بستری شده مبتلا به بیماری‌های غیرتیروئیدی و زنان باردار بکار می‌آید.

۵-۱ روش‌های ایمونواسی هورمون‌های آزاد

تیروئید (FT3 و FT4)

در حال حاضر اکثر آزمایشگاه‌های بالینی از ایمونواسی‌های اتوماتیک برای برآورد غلظت FT4 و FT3 استفاده می‌کنند. این روش‌ها با استفاده از استانداردهای گراویمتریک یا کالیبراتورهایی که مقادیر آنها با یک روش مرجع مستقیم تعیین شده است، کالیبره می‌شوند. ایمونواسی‌های هورمون آزاد براساس اصولی هستند که از یک آنتی‌بادی خاص برای جداسازی مقدار کم هورمون آزاد استفاده می‌کنند به طوری که اشغال نسبی جایگاه‌های اتصال آنتی‌بادی توسط غلظت هورمون آزاد تعیین می‌شود. کلید اعتبار این روش‌ها استفاده از شرایطی است که تعادل بین هورمون آزاد و متصل به پروتئین را حفظ می‌کند و اثرات رقت احتمالی موجود در نمونه را که تأثیر هرگونه مهارکننده درون‌زاد را تضعیف می‌کند، به حداقل می‌رساند. نسبت واقعی هورمون آزاد جدا شده (۳-۱٪) بسته به روش به کار گرفته شده فرق می‌کند ولی از غلظت واقعی هورمون آزاد به میزان زیادی فراتر می‌رود. متأسفانه به نظر می‌رسد که ایمونواسی‌های فعلی هورمون آزاد (به‌ویژه FT3) نسبت به اندازه‌گیری هورمون تام تغییرپذیری بیشتری داشته و کمتر قابل اعتماد هستند. هنوز هم سردرگمی قابل توجهی در رابطه با نامگذاری این تست‌ها وجود دارد و اعتبار تکنیکی خود

اندازه‌گیری‌ها و اعتبار بالینی آنها در شرایط پاتوفیزیولوژیک مرتبط با پروتئین‌های غیرعادی متصل‌شونده (جدول ۱-۱) مورد اختلاف نظر است. از آنجا که تست‌های ابتدایی "آنالوگ" یک مرحله‌ای در دهه ۱۹۷۰ وجود داشتند، واژه "آنالوگ" باعث حفظ سردرگمی شده است. علیرغم پیشرفت‌های حاصله هنوز به نظر می‌رسد که روش‌های فعلی ایمونواسی هورمون آزاد به تغییر در آلبومین سرم و پروتئین‌های غیرعادی متصل‌شونده و همچنین بعضی از داروها، بالابودن اسیدهای چرب آزاد (FFA) یا مهارکننده‌های متصل‌شونده به هورمون (که تصور می‌شود در سرم بیماران مبتلا به بیماری‌های غیرتیروئیدی وجود دارد) حساس هستند. برای پیشرفت روش‌های ایمونواسی FT4 و FT3 سه رویکرد کلی مورد استفاده قرار گرفته است: (۱) تست دومرحله‌ای هورمون نشاندار؛ (۲) تست یک مرحله‌ای آنالوگ نشاندار؛ و (۳) تست آنتی‌بادی نشاندار.

۱-۵-۱ روش‌های دو مرحله‌ای هورمون

نشاندار / تیتراسیون معکوس FT4 و FT3

رویکرد دومرحله‌ای در ابتدا توسط Ekins و همکارانش در اواخر دهه ۱۹۷۰ پدید آمد و هنوز هم برای بعضی روش‌ها از آن استفاده می‌شود. روش‌های دومرحله‌ای به طور معمول برای جداسازی بخش کوچک هورمون تام از نمونه سرم رقیق شده، آنتی‌بادی بی‌حرکت شده علیه T4 و T3 (به ترتیب برای FT4 و FT3) را به کار می‌گیرند بدون اینکه اختلالی در تعادل اولیه هورمون آزاد و متصل به پروتئین به وجود آورند. پس از حذف اجزای سرمی غیرمتصل (با شستشو)، برای شمارش جایگاه‌های اشغال‌نشده اتصال به آنتی‌بادی که نسبت معکوس با غلظت هورمون آزاد دارند، یک ردیاب نشاندار (T4-125 یا کنژوگه T4 ماکرومولکولار) اضافه می‌شود. پس از شستشو، مقدار ردیاب متصل به آنتی‌بادی فاز جامد شمارش می‌شود.

۲-۵-۱ روش یک مرحله‌ای آنالوگ هورمونی نشاندار

FT3 و FT4

در روش‌های کلاسیک "یک مرحله‌ای" از آنالوگ‌هایی استفاده می‌شود که گفته می‌شود ساختار مولکولی آنها طوری است که به پروتئین‌های سرمی واکنش نشان نمی‌دهند ولی قادرند برای اتصال به جایگاه‌های اشغال‌نشده آنتی‌بادی با هورمون آزاد رقابت کنند. این آنالوگ‌های هورمونی که به یک مولکول ایزوتوپی یا غیرایزوتوپی تولیدکننده سیگنال جفت شده‌اند، در یک چارچوب کلاسیک ایمونواسی رقابتی برای اشغال تعداد محدودی از جایگاه‌های اتصال به آنتی‌بادی، با هورمون آزاد رقابت می‌کنند. اگرچه این مسئله از نظر مفهومی جذاب است، و علیرغم ادعاهای اولیه مبنی بر موفقیت این روش در اندازه‌گیری هورمون آزاد مستقل از غلظت پروتئین‌های متصل‌شونده، کسب نتایج رضایت بخش در عمل سخت بوده است. این روش‌ها در ابتدا برای بدست آوردن مقادیر طبیعی FT4 در شرایط TBG بالا (یعنی حاملگی) طراحی شده بودند ولی بعدها مشخص گردید که در حضور غلظت‌های غیرعادی آلبومین (ثانویه به هیپرتیروکسینمی دیس‌آلبومینمیک خانوادگی)، بیماری‌های غیرتیروئیدی (NTI)، غلظت‌های بالای اسیدهای چرب آزاد، یا آنتی‌بادی علیه هورمون تیروئید دقت تشخیصی آنها کم است.

۳-۵-۱ روش‌های آنتی‌بادی نشاندار FT3 و FT4

روش‌های آنتی‌بادی نشاندار، ایمونواسی‌های رقابتی هستند که هورمون آزاد را به عنوان تابعی از اشغال نسبی جایگاه‌های اتصال آنتی‌بادی به هورمون، با استفاده از مواد ایمونولوژیک جاذب ویژه برای شمارش جایگاه‌های اشغال‌نشده اتصال به آنتی‌بادی اندازه‌گیری می‌کنند. تئوری فیزیکوشیمیایی روش‌های آنتی‌بادی نشاندار با اساس آنالوگ، مطرح‌کننده این موضوع می‌بودند که مستعد همان خطاهای شرح داده شده در مورد روش‌های آنالوگ هورمونی نشاندار خواهند بود. اما اختلافات فیزیکوشیمیایی ناشی از اتصال آنتی‌بادی‌های نشاندار به تکیه‌گاه جامد، باعث

تفاوت‌های کینتیکی می‌گردد که منجر به کاهش میل ترکیبی آنالوگ با پروتئین‌های متصل‌شونده درون‌زاد شده و در نتیجه، باعث می‌شود اندازه‌گیری هورمون آزاد قابل اعتمادتر باشد. به همین دلیل، روش آنتی‌بادی نشاندار برای تعدادی از دستگاه‌های اتوماتیک ایمنونواسی فعلی ترجیح داده می‌شود.

۱-۶ فایده بالینی اندازه‌گیری FT3 و FT4

متأسفانه دقت تشخیصی تست تعیین هورمون آزاد را نمی‌توان از روی هیچیک از دسته‌بندی‌های متدولوژیک پیش‌بینی کرد. با این وجود، علیرغم این کاستی‌ها، این تست‌ها به دلیل سودمندی تشخیصی‌شان متداول شده‌اند.

۱-۶-۱ بیماران سرپایی

به منظور بالابردن دقت تشخیصی برای کشف هیپوتیروئیدی و هیپرتیروئیدی در جمعیت بیمارانی که ممکن است دربرگیرنده افرادی باشند که دچار اختلال در اتصال هورمون تیروئیدی هستند (جدول ۱-۱)، تست‌های اندازه‌گیری هورمون آزاد (FT3 و FT4) متداول‌ترین تست‌هایی هستند که به اندازه‌گیری هورمون تام ترجیح داده می‌شوند. با این حال، در روش جاری، در اکثر شرایط بالینی از TSH به عنوان تست خط اول استفاده می‌شود و برای تحقیق در مورد شرایطی که در آن، اختلالات TSH دیده می‌شود اندازه‌گیری FT3 و FT4 به ترتیب به عنوان تست‌های خط دوم و سوم انجام می‌شود. استثنای این قاعده کلی در شرایط خاصی رخ می‌دهد که TSH ممکن است از نظر تشخیصی قابل اعتماد نباشد که در این‌گونه موارد FT4 تست خط اول خواهد بود. این شرایط عبارتند از: دوره‌هایی از وضعیت ناپایدار تیروئید (مراحل اولیه درمان هیپو و هیپرتیروئیدی)، شک به وجود اختلال در محور هیپوتالاموس-هیپوفیز، یا هنگامی که داروهایی نظیر گلوکوکورتیکوئیدها (که بر روی ترشح TSH اثر می‌گذارند) استفاده شده باشند.

ناهماهنگی بین TSH و FT4 اندازه‌گیری شده در یک نمونه واحد، می‌تواند باعث مشکل تشخیصی بشود. با این حال باید دانست که رابطه لگاریتمی / خطی ذاتی بین TSH و FT4 جبراً باعث می‌شود که با کاهش نسبتاً کم TSH ($0.3-0.5 \text{ mIU/L}$) یا افزایش نسبتاً کم آن ($3-10 \text{ mIU/L}$)، انتظار تغییر در مقادیر FT4 خارج از محدوده مرجع نرمال نداشته باشیم. از طرف دیگر، وقتی که ناهماهنگی شدید بین TSH و FT4 دیده می‌شود، قدم اول این است که آن دو را با دستگاه و روش دیگری اندازه‌گیری کنیم تا مشکل تداخل سنجشی در اندازه‌گیری FT4 و یا TSH کنار گذاشته شود. مشکلات اینچینی برای FT4 عموماً در نتیجه تغییر در پروتئین‌های متصل شونده به هورمون (اغلب، آلبومین) یا تداخل دارویی به وجود می‌آید. از طرف دیگر، متداول‌ترین علت بالابودن کاذب TSH، تداخل سنجشی ناشی از یک آنتی‌بادی انسانی علیه آنتی‌ژن موشی^۱ (HAMA) یا یک آنتی‌بادی درون‌زاد ضد TSH است.

۲-۶-۱ بیماران بستری

روش‌های فعلی آزمایش FT4 هنوز اعتبار کافی برای شرایط بیمارستانی پیدا نکرده‌اند چون در آن شرایط، غالباً با انواع گوناگونی از بیماری‌های غیرتیروئیدی و مصرف داروهایی روبرو می‌شویم که اثر شناخته‌شده‌ای بر روی تست هورمون‌های تیروئید و TSH دارند. به ویژه سه دسته از بیماران بستری وجود دارند که باید به آنها توجه خاص نمود: (۱) بیمارانی که اختلال شناخته‌شده‌ای در عملکرد تیروئید ندارند ولی به‌طور همزمان، بیماری غیرتیروئیدی افزایش یا کاهش TT4 را نشان بدهد؛ (۲) بیماران مبتلا به هیپوتیروئیدی اولیه و بیماری غیرتیروئیدی شدید هم‌زمان، و (۳) بیماران مبتلا به هیپرتیروئیدی و بیماری غیرتیروئیدی هم‌زمان. از آنجا که اعتبار تشخیصی تست FT4 در بیماران بستری در بیمارستان مورد شک و تردید است، توصیه شده

1- Human Anti-Mouse (HAMA) Antibody

است که برای ارزیابی تیروئید در این‌گونه شرایط از ترکیب تست T4 (ترجیحاً TT4) و TSH استفاده شود. در اکثر شرایط بالینی که در آنها بین نتایج FT4 و TSH ناهماهنگی وجود دارد، تست TSH معمولاً از نظر تشخیصی نتایج قابل اعتمادتری به دست می‌دهد به شرط آنکه بیمار داروهایی نظیر گلوکوکورتیکوئیدها و دوپامین (که مستقیماً ترشح TSH را مهار می‌کنند) مصرف نکرده باشد، یا شرایط دربرگیرنده نارسایی هیپوفیز وجود نداشته باشد. تکرار TSH ممکن است به ویژه در روشن نمودن علت غیرطبیعی بودن نتیجه FT4 مفید باشد زیرا در صورتی که نتیجه غیرطبیعی TSH به علت اثرات حاد NTI به تنهایی باشد، مقادیر TSH با گذشت زمان در تست‌های مکرر به حالت عادی برمی‌گردد، در حالی که اگر به واسطه اختلال زمینه‌ای در عملکرد تیروئید باشد، مقدار TSH پایدار می‌ماند.

۱-۷ محدوده‌های مرجع FT4 و FT3

محدوده مرجع FT4 برای شیرخواران مذکر و مؤنث ۱۲-۱ ماهه ۰/۹-۱/۹ ng/dL (۰/۹-۱/۹ pmol/L) است. محدوده مرجع FT4 برای کودکان ۱۸-۱ ساله ۰/۹-۱/۶ ng/dL (۰/۹-۱/۶ pmol/L) است که مشابه محدوده مرجع بزرگسالان می‌باشد. همچنین محدوده مرجع FT3 برای افراد مذکر و مؤنث ۱ ماهه تا ۱۸ ساله ۱-۴ pg/mL (۱-۴ pmol/L) است. این اندازه‌گیری‌ها در دمای ۲۵°C انجام شده است و در صورتی که این کار در دمای ۳۷°C صورت پذیرد، مقادیر FT4 و FT3 ۱/۵ برابر بیشتر می‌شود. در حال حاضر توصیه می‌شود که اندازه‌گیری FT3 و FT4 در دمای ۳۷°C صورت پذیرد.

۱-۸ تداخل در تست‌های FT4 و FT3

شرایط مشترکی که دقت تشخیصی تست‌های رایج برآورد هورمون آزاد را در بیماران سرپایی کاهش می‌دهند عبارتند از:

۱-۸-۱ اختلالات TBG

در کار بالینی بطور معمول با حالات افزایش یا کمبود گلبولین متصل شونده به تیروکسین (TBG) که با انواع گوناگونی از شرایط پاتوفیزیولوژیک یا درمان‌های دارویی در ارتباط هستند روبرو می‌شویم (جدول ۱-۱).

۱-۸-۱-۱ افزایش یا کمبود مادرزادی TBG

هنگامی که غلظت TBG به طور آشکار تغییر یافته است (مثلاً در حالات افزایش یا کمبود مادرزادی TBG، هیچیک از روش‌های ایمونواسی هورمون آزاد یا بعضی از تست‌های شاخص T4 آزاد نمی‌توانند غلظت هورمون آزاد را به طور قابل اعتمادی تعیین کنند.

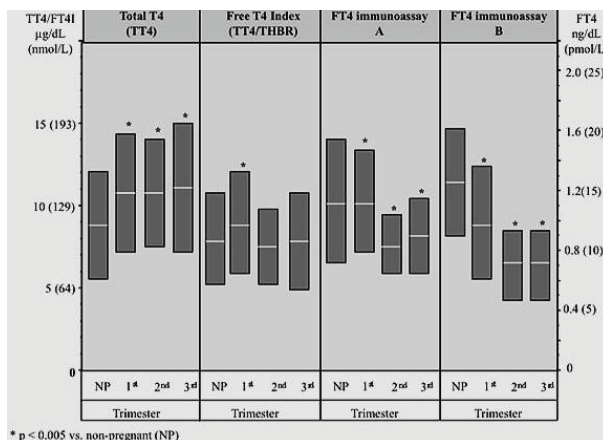
۱-۸-۱-۲ حاملگی

محدوده مرجع ایمونواسی‌های فعلی FT4 در زنان غیرباردار، برای زنان باردار بکار برده نمی‌شود (شکل ۱-۲). مقادیر کم، به ویژه در درصد چشمگیری از زنان تا سه ماهه سوم حاملگی دیده می‌شود. برخلاف آن، می‌توان محدوده مرجع شاخص T4 آزاد (FT4I) زنان غیرباردار را برای ارزیابی وضعیت T4 آزاد بیماران باردار بکار برد. حتی می‌توان در صورت اعمال ضریب ۱/۵ برای محدوده‌های مرجع (به منظور جبران افزایش TBG)، از اندازه‌گیری TT4 استفاده نمود.

۱-۸-۲ هیپرتیروکسینمی دیس‌آلبومینیک خانوادگی

و هیپرتیروکسینمی مرتبط با ترانس‌تیرتین

جهش‌های اتوزومال غالب در ژن آلبومین یا ترانس - تیرتین (پره‌آلبومین) می‌تواند باعث تغییر در ساختار پروتئینی و افزایش میل ترکیبی برای تیروکسین و یا تری‌یدوتیرونین بشود. این پروتئین‌های غیرعادی می‌توانند در اندازه‌گیری FT4 و یا FT3 تداخل ایجاد کرده و باعث شوند که مقادیر آنها به طور نامتناسبی بالا گزارش شود. هیپرتیروکسینمی دیس‌آلبومینیک خانوادگی



شکل ۲-۱ مقادیر میانه و صدک ۹۵ برای زنان غیرباردار (NP) در برابر سه ماهه اول، دوم، و سوم که با تست‌های متفاوت برآورد T4 آزاد اندازه‌گیری شده‌اند: تیروکسین تام، TT4؛ شاخص تیروکسین آزاد، FT4I [محاسبه شده از روی نسبت TT4 و یک نسبت اتصال به هورمون تیروئید (THBR)، که قبلاً به عنوان تست "جذب T3" شناخته می‌شد] در برابر دو ایمونواسی T4 آزاد، A=Roche Elecsys و B=Tosoh AIA. ستاره‌ها نشان‌دهنده تفاوت چشمگیر در مقایسه با زنان غیرباردار است.

(FDH) یک بیماری نادر با شیوع تقریباً ۱/۸٪ در جمعیت اسپانیولی است. سه گونه ژنتیکی وجود دارند که شایع‌ترین آنها R218H است. این جهش به‌طور شاخص باعث می‌شود که TT4 دو برابر افزایش یابد ولی تغییر ناچیزی در TT3 ایجاد می‌کند. جهش R218P با حداکثر افزایش TT4 و همچنین TT3 همراه است، در حالی که جهش L66P صرفاً روی T3 اثر می‌کند. افراد دارای این جهش، پوتیروئید بوده و TSH و FT4 آنها هنگامی که با تکنیک‌های مستقیم نظیر دیالیز تعادلی اندازه‌گیری شود، طبیعی می‌باشد. متأسفانه اکثر تست‌های برآورد FT4 (ایمونواسی‌ها و شاخص‌ها) به‌طور کاذب بالا گزارش می‌شوند که در صورت عدم شناخت این جهش، ممکن است پزشک را به درمان بی‌مورد هیپرتیروئیدی فرضی وادارد.

۳-۸-۱ اتوانتی‌بادی‌های ضد T4 و T3

اتوانتی‌بادی‌های ضد T4 و T3 می‌توانند بسته به روش به‌کارگرفته شده اندازه هورمون تام، هورمون آزاد، یا THBR را به‌طور کاذب بالا ببرند. شیوع اتوانتی‌بادی‌های ضد هورمون‌های تیروئید از ۲٪ در جمعیت کل تا ۳۰٪ در بیماران مبتلا به بیماری اتوایمون تیروئید متفاوت است. با این حال، علیرغم این شیوع بالای اتوانتی‌بادی‌های قابل تشخیص ضد تیروئید، تداخل چشمگیر به واسطه آنها به‌طور قابل توجهی کم بوده و به ویژگی‌های کیفی اتوانتی‌بادی موجود (یعنی میل ترکیبی آن با معرف‌های تست) بستگی دارد. علاوه بر آن، روش‌های گوناگون، تداخل کمتر یا بیشتری از خود نشان می‌دهند. از آنجا که در آزمایشگاه نمی‌توان تداخل اتوانتی‌بادی را از پیش تشخیص داد، لذا اکثراً این موضوع ابتدا توسط پزشکی که ناهماهنگی آشکار بین تظاهرات بالینی بیمار و نتایج تست آزمایشگاهی می‌بیند مورد شک و تردید قرار می‌گیرد. موضوع مهم این است که این اتوانتی‌بادی‌ها از جفت عبور کرده و ممکن است باعث نتیجه منفی کاذب در تست غربالگری هیپوتیروئیدی مادرزادی نوزاد بشوند.

۹-۱-۱ سنجش TSH

(هورمون محرکه تیروئید / تیروتروپین)

در طول چهار دهه اخیر روش‌های سنجش TSH سرم دستخوش پیشرفت‌های چشمگیری شده است به‌طوری که استراتژی‌های مربوط به تست‌های تیروئید را متحول نموده و TSH را به عنوان تست خط اول عملکرد تیروئید برای ارزیابی وضعیت هورمون‌های تیروئید برای اکثر شرایط بالینی محرز نموده‌اند. درحقیقت، TSH سرم به‌صورت قابل اعتمادترین تست منفرد تیروئید برای تشخیص اختلالات تیروئید درآمده است مشروط بر آنکه بیمار، سرپایی بوده و دارویی مصرف نکند که ترشح TSH را تغییر دهد. ارجحیت تشخیصی اندازه‌گیری TSH اساساً از رابطه فیزیولوژیک و لگاریتمی/خطی معکوس بین غلظت TSH و هورمون آزاد درحال گردش نشأت می‌گیرد.

۱-۹-۱ متدولوژی سنجش TSH

"کیفیت" سنجش TSH، از لحاظ تاریخی، از روی حساسیت بالینی آن (توانایی تفکیک بین مقادیر هیپرتیروئید و یوتیروئید) معین می‌شود. نسل اول سنجش‌های TSH مورد استفاده بین سال‌های ۱۹۶۵ تا ۱۹۸۵ براساس روش RIA بود که حساسیت عملکردی محدودی (تقریباً ۱mIU/L) داشت. از آنجاکه روش‌های سنجش TSH در عصر RIA، برای یافتن TSH در تمام افراد یوتیروئید بسیار غیرحساس بودند، استفاده بالینی آنها محدود به تشخیص هیپوتیروئیدی اولیه بود. بین سال‌های ۱۹۷۰ تا ۱۹۸۰ تلاش‌های چشمگیری برای پیشرفت روش‌های TSH انجام شد تا بتوانند مقادیر TSH یوتیروئید را از هیپرتیروئید تفکیک کنند. با استفاده از روش‌های اصلاح شده RIA با به‌کارگیری روش استخراج برپایه میل ترکیبی با لکترین یا یک دوره طولانی پیش انکوباسیون، قبل از اضافه نمودن ردیاب، میتوان به این تفکیک دست یافت ولی این روش‌ها اساساً محدود به کاربردهای تحقیقاتی هستند. در سال ۱۹۷۰ تری‌پتید هیپوتالاموسی یا هورمون آزادکننده تیروتروپین (TRH) (تیرولیبرین) سنتز شد و نشان داده شد که قادر است TSH سرم را در تمام افراد یوتیروئید در حد قابل اندازه‌گیری تحریک کند ولی این کار را در بیماران هیپرتیروئید یا مبتلا به کم کاری هیپوفیز انجام نمی‌دهد. این مشاهدات باعث شد که اندازه‌گیری TSH سرم ۳۰-۱۵ دقیقه پس از تزریق وریدی ۵۰۰-۲۰۰ μg TRH (به عنوان راهی برای غلبه بر غیرحساس بودن روش TSH RIA) مورد آزمایش قرار گیرد. با این حال، در اواسط دهه ۱۹۸۰ پس از پیدایش روش‌های حساس‌تر سنجش ایمونومتریکی^۱ (IMA) که به آن، روش "ساندویچی" یا "غیررقابتی" نیز گفته می‌شود، تست TRH اهمیت خود را از دست داد. تکنیک IMA براساس روش فزونی آنتی‌بادی Miles و Hales است، که در ابتدا در دهه ۱۹۶۰ گزارش شد ولی به‌طور گسترده پذیرفته نشد تا اینکه

1- immunometric assay

پیشرفت‌های به‌دست آمده در تکنولوژی آنتی‌بادی مونوکلونال امکان تولید آنتی‌بادی‌های ویژه را در دهه ۱۹۸۰ در مقیاس گسترده فراهم آورد. از نظر علم مکانیک، در روش IMA، فزونی آنتی‌بادی مونوکلونال ضد TSH بکار گرفته می‌شد. این آنتی‌بادی به یک تکیه‌گاه جامد (مهره، لوله، ذرات ریز مغناطیسی، یا ژل جاذب) متصل بود و در طول یک دوره انکوباسیون ۲۰ تا ۱۲۰ دقیقه‌ای TSH سرم نمونه را می‌ربود. سپس آنتی‌بادی مونوکلونال یا پلی‌کلونال دیگری اضافه گردید که اپی‌توپ TSH متفاوتی را هدف قرار می‌داد و با یک سیگنال ایزوتوپی (I-125) نشاندار شده بود و به دنبال آن، با دوره انکوباسیون بیشتر، اجزای غیرمتصل توسط شستشو برداشته می‌شد. رادیواکتیویته متصل به تکیه‌گاه جامد شمارش می‌شد چون مسقیماً با غلظت TSH سرم در نمونه مورد آزمایش متناسب بود. اصلاحات بعدی که بر روی این روش اولیه صورت پذیرفت شامل تکنیک‌های به‌کارگیری آنتی‌بادی‌های مونوکلونال کایمربک به منظور کاهش تداخل با آنتی‌بادی‌های هتروفیلیک / HAMA، و استفاده از Avidin-Biotin و جداسازی ذرات مغناطیسی بود. در دو دهه اخیر، با اتخاذ سیگنال‌های غیرایزوتوپی (فلورسنت یا chemiluminescent) که به‌طور ذاتی حساس‌تر از I-125 هستند و مزیت دیگر آنها سهولت در اتوماسیون آنها می‌باشد، حساسیت سنجش TSH بیشتر شده است. تا سال ۱۹۹۰ روش‌های غیر ایزوتوپی IMA جایگزین اکثر روش‌های TSH RIA شده بود و در نتیجه ویژگی و حساسیت سنجشی ذاتی بیشتر باعث شد که با کاهش حساسیت متقاطع گلیکوپروتئین با هورمون و افزایش دقت، محدوده مرجع TSH باریک‌تر شود. در حال حاضر اکثر تست‌های TSH با به‌کارگیری یک تکنولوژی پیشرفته اینچینی IMA بر روی دستگاه‌های ایمونواسی اتوماتیک انجام می‌شود (بخش ۱۷-۱).

۱-۹-۲ نام‌گذاری روش‌های اندازه‌گیری TSH

حد تشخیصی روش‌های نسل اول RIA تقریباً ۱ mIU/L بود.