

NUKLEARNA MEDICINA, ZDRAVSTVENI CENTAR ZAJEČAR

TESTIRANJE AUTOIMUNE TIREOIDNE STIMULACIJE

Paunković Nebojša, Džejn Paunković

U fiziološkim uslovima štitasta žlezda je stimulisana tireotropnim hormonom adenohipofize. Intaktnost funkcionisanja hipotalamo-hipofizo-tireoidne osovine najbolji je dokaz eutireoidnog stanja.

U autoimunoj hipertireozii (Graves-Bazedovljeva bolest) štitasta žlezda je pod uticajem »patoloških stimulatora«. Otkrićem humoralnog stimulatora »dugog dejstva« (Long Acting Thyroid Stimulator – LATS) od strane Adams-a i Purves-a, 1956 (1) započeta je era razumevanja etiologije autoimune hipertireoze. Identifikovanje prirode LATS-a (2), razumevanje njegovog delovanja na receptore za TSH tireocita (3), povezivanje ove »humoralne« stimulacije sa celularnim imunitetom (4,5) dovelo je do značajnog razjašnjenja etiopatogeneze ove bolesti, ali i do razvoja niza metoda i postupaka za detekciju ove stimulacije (6,7,8,9,10).

U načelu, testovi za procenu autoimune tireoidne stimulacije mogli bi da se svrstaju u nekoliko grupa:

Indirektno dokazivanje tireostimulantnih autoantitela (TSAb) radioreceptorskim testom

Direktno dokazivanje ove stimulacije u serumu obolelih merenjem efekata in vivo ili in vitro koje ona izaziva:

- testiranje LATS-a
- merenje generacije cAMP u tireocitima
- uticaj na akumulaciju jodida i na sekreciju trijodotironina u in vitro ćelijama štitaste žlezde
- in vivo merenjem »trapping-a« jednovalentnih anjona u tireoidej

Analogno dokazivanje autoimune stimulacije (testiranje drugih tireoidnih autoantitela)

Testiranje celularnog imuniteta

U ovom saopštenju će biti prikazane samo one metode testiranja autoimune stimulacije štitaste žlezde sa kojima autori imaju iskustvo.

METODOLOGIJA I REZULTATI

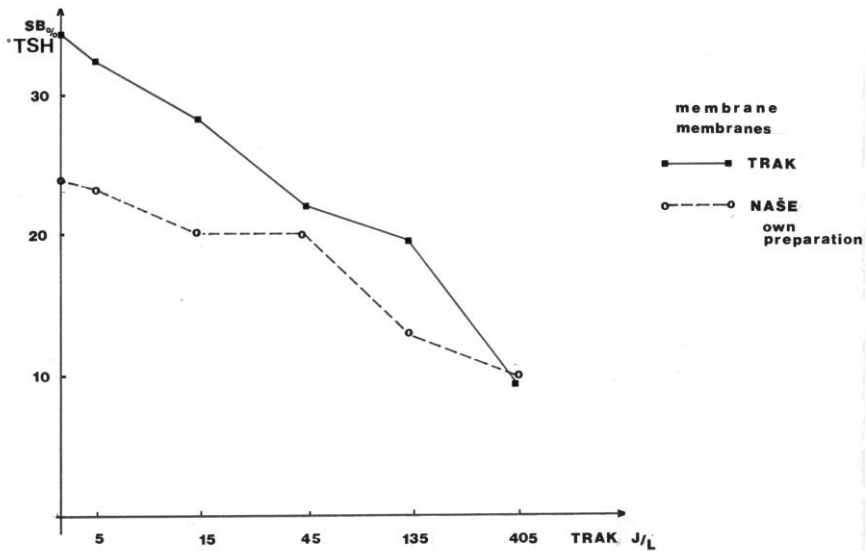
Dokazivanje autoantitela na TSH receptore radioreceptorskim testom

Membranska frakcija tireocita (čovaka ili nekih životinja) može da posluži kao bogat izvor receptora za tireotropin (TSH-R). Ako se ovoj frakciji doda specifični »obeleženi« ligand (^{125}I TSH), njegovo vezivanje može da se inhibira neobeleženim ligandom (endogenim ili egzogeno dodatim TSH) ali i autoantitelima koja se vezuju na TSH-R. Ova inhibicija biće u srazmeri sa koncentracijom autoantitela koja se na taj način mogu da detektuju.

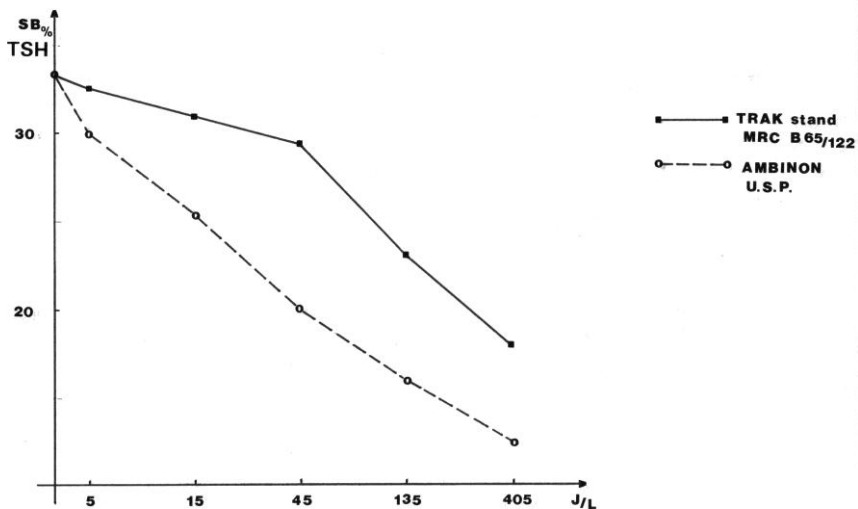
Danas postoje vrlo kvalitetni (i skupi) komercijalni kompleti za izvodjenje ovog radioreceptorskog testa. TRAK-assay, Henning, Germany, kao receptorsku komponentu koristi solubilizovane membrane svinjskih tireocita, naknadno liofilizirane, kao radioaktivnu

preparaciju jako dobar obeleženi TSH za receptorske studije («receptor grade») a kao neaktivnu komponentu («standarde») preparaciju sa tireotropnim delovanjem (MRC Research standard B.65/122) (11,12).

Mi smo uspeali da supstituišemo dve od tri navedene komponente ovog radioreceptorskog (RRA) sistema. Proizveli smo kvalitetne membranske preparacije (receptorska komponenta), a standard B.65/122 vrlo uspešno zamenili komercijalnim preparatom sa tireotropnim delovanjem (13) (grafikoni 1 i 2).



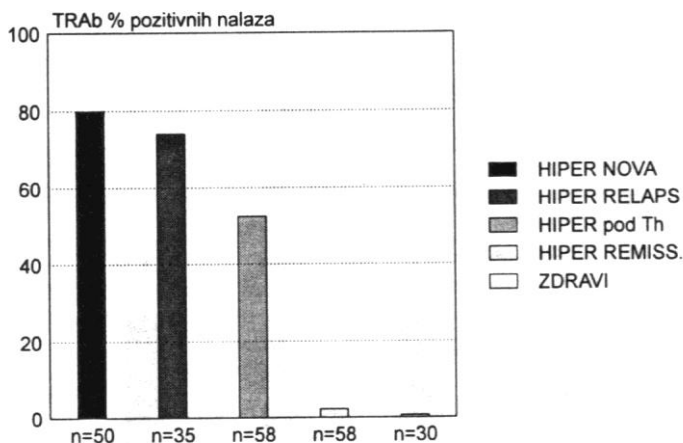
Grafikon 1 Radioreceptorski test za tireotropin: testiranje membranskih preparacija



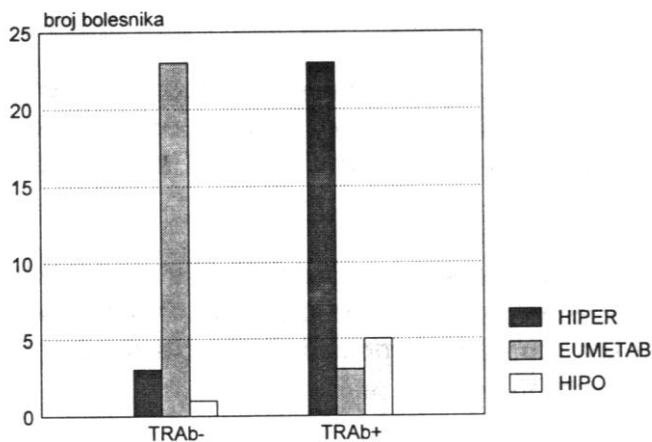
Grafikon 2 Radioreceptorski test za tireotropin: testiranje neobeženog hormona

Ovim radioreceptorskim testom u serumu obolelih od Graves-ove bolesti detektuje se aktivnost koja ometa vezivanje »obeženo« TSH na receptor (Thyrotropin Binding Inhibitor Immunoglobuline – TBII), odnosno autoantitela na TSH-R (TRAb).

Desetak poslednjih godina mi koristimo ovaj test (14,15). Rezultati nekih naših ispitivanja prikazani su na grafikonima 3 i 4.



Grafikon 3. *Učestalost TSH-R antitela kod bolesnika sa hipertireozom u raznim stadijumima i kontrolnoj grupi*



Grafikon 4 *Metabolički status TSH-R Ab negativnih i pozitivnih bolesnika od Graves-ove bolesti u toku terapije*

Kao što se sa grafikona uočava u nelečenoj autoimunoj hipertireozu zastupljenost TBII je oko 90%, njihova učestalost pada u toku medikamentne terapije i gotovo iščezava u trajnoj remisiji (grafikon 3). U toku terapije nešto više od polovine bolesnika reaguje smanjenjem do normalizacije TBII (»responderi«), kod oko ¼ visok nalaz perzistira (»neresponderi«), dok se

kod oko $\frac{1}{4}$ završava ili čak povećava intenzitet TBII uz ispoljavanje hipometaboličkog stanja (grafikon 4) (15,16).

Rezimirajući naša zapažanja o vrednosti primene radioreceptorskog testa za dokazivanje antitela na TSH receptor možemo reći: ova autoantitela su pozitivna u nelečenoj Graves-ovoj bolesti i u korelaciji su sa funkcijom tireoideje, tj imaju tireostimulantni učinak (tireostimulantna antitela – TSAb). U jednog manjeg broja bolesnika, u toku tireosupresivne terapije, a retko i spontano, i pored visokog titra TRAb javlja se hipotireoza. Logično je prepostaviti da u njih ova autoantitela imaju tireoblokirajući karakter (TSBAb).

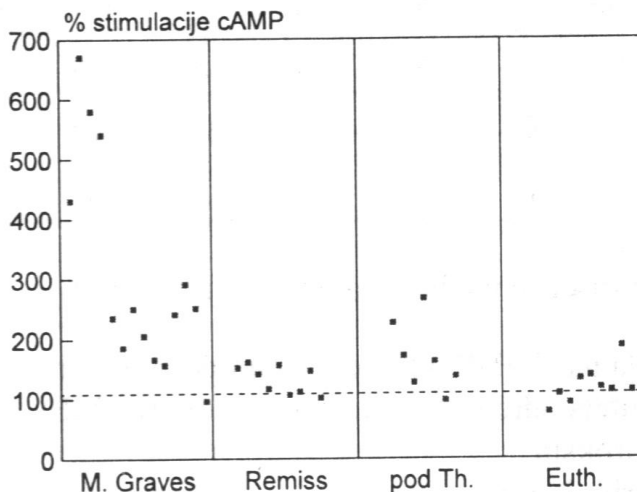
Merenje stimulatornog učinka antitela na TSH receptore

a) Testiranje LATS-a

Ranih sedamdesetih godina i mi smo pokušali da razvijemo metodu za dokazivanje LATS-a (17). U to vreme, a i kasnije, u našoj zemlji metodu su primenjivali samo istraživači iz jedne institucije (18). Metodu smo izvodili na osnovu McKenzie-evog ogleđa namiševima (19) uz maksimalne improvizacije (zamena komercijalne niskojudne dijetne hranjenjem eksperimentalnih životinja ječmom iz jodoprivnih terena, korišćenje rastvorenih tableta tiroksina za injekcionu aplikaciju miševima, merenje radioaktivnosti u improvizovanom brojaču itd. Mada je metoda bila vrlo zametna a mi neiskusni eksperimentatori, dobili smo zadovoljavajuće i reproducibilne rezultate. Metodu iz brojnih organizacionih i tehničkih razloga nismo dalje primenjivali a rezultate u to vreme nismo nigde publikovali smatrajući da je broj testiranih bolesnika mali.

b) Stimulacija generisanja cAMP u tireocitima in vitro

Kao i kod većine drugih membranskih receptora, nakon stimulacije agonističkim hormonom, generiše se kao »second messenger« ciklični AMP. Na ovom efektu se zasniva testiranje delovanja tireostimulantnih autoantitela (TSAb) na isečke tireoidnog tkiva ili još bolje na izolovanje tireocite u in vitro sistemu (20,21,22).



Grafikon 5 *Uticaj seruma obolelih od Graves-ove bolesti i zdravih osoba na stvaranje cAMP*

Poslednjih nekoliko godina mi smo razvili metodo koja se ukratko sastoji u sledećem: iz tek zaklanih svinja vadi se tireoideja i iz nje se kolagenaznom digestijom izdvajaju tireociti u suspenziji (u modifikovanom Henkovom puferu). Tireostimulantna antitela se određuju iz globulinske frakcije ispitivanog seruma bolesnika (dobijene taloženjem PEG-om) koja se inkubira sa predhodno pripremljenom tireocitnom suspenzijom. Odgovarajućim RIA određuje se novonastala koncentracija cAMP koja je merilo tireostimulirajuće aktivnosti. Detalji metode se mogu naći na drugom mestu (23). Ovaj sistem reaguje na dodate »tireostimulantne supstance« (bovini TSH, pomenuti B.65/122 standard) ali naravno i na prisustva TSAb u serumu (grafikon 5).

Malom modifikacijom, tj. dodavanjem još jedne faze ovom sistemu za generisanje cAMP, dobija se metod za određivanje autoantitela koja samo blokiraju TSH receptor (TSBAb), tj. ometaju delovanje dodatog TSH, a da sama ne izazivaju aktivaciju receptora. Ovo je krupna dopuna razlikovanju antireceptorskih antitela koja se detektuju radioreceptorskim testom – TBII.

c) Testovi akumulacije radiojoda u tireocite in vitro

Aktiviranjem TSH-R počinje čitav niz postreceptorskih događaja od kojih je jedan od prvih testiran predhodnim testom (generacija cAMP). Događaji koji slede nakon toga vezani su za metabolizam jodida i biosintezu tireoidnih hormona. Akumulacija jodida može da se koristi u testovima in vitro - iseći tireoideje ili tireociti u suspenziji i kulturi (24,25). Mi smo koristili preseke i ćelijsku suspenziju svinjskih štitnjača da bismo dobili podesan sistem za testiranje TSAb. Mada se vrši značajna stimulacija akumulacije dodatog ^{131}I u ćelijski sistem poznatim tireoidnim stimulatorima (TSH, B.65/122 standard), dodavanjem seruma ili koncentrovanog IgG ispitivanih bolesnika, ne dobijaju se merljivi efekti (23). Serum sam po sebi blokira ulazak radiojoda, pa taj metodološki nedostatak treba rešiti pre primene (25).

d) »Trapping« $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pertehnetata u štitnjaču in vivo

Ulazak drugih jednovalentnih anjona (pehlorat, pertehnetat) analogno je uplivanu tireoidnim stimulatorima slično ulasku jodida u štitnjaču. U dijagnostičkom postupku često se koriste testiranja štitaste žlezde $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pertehnetatom, ali tim testovima se meri tireoidna funkcija (26,27). Mi smo razradili test za merenje akumulacije radioaktivnog pertehnetata kod bolesnika in vivo u »ranj fazi« (28). Tehnikom »normalizovanog slope-a« meri se indeks tireoidnog »uptake-a« (TcU index) koji po našem mišljenju korelira sa autoimunom stimulacijom. Sa ovim mišljenjem slažu se i autori koji su ovaj naš test primenjivali (29). Rezultati ovog testiranja prikazani su na grafikonu u citiranom članku (na slici 2).

Analogno dokazivanje autoimune stimulacije

Imajući u vidu činjenicu da je nalaz stimulatornih autoantitela u cirkulaciji obolelih od autoimune hipertireoze posledica poremećenog celularnog imuniteta (30), logično je pretpostaviti da će se naći i druga autoantitela u serumu obolelih. Ovim »analognim postupkom« može da se pokuša procena autoimune stimulacije štitaste žlezde.

a) Dokazivanje autoantitela na tireocitne mikrozome (TMAb)

I pored toga što se danas zna da je tireocitni mikrozomni antigen bar većim delom porekla tireocitne peroksidaze (31), što je najvećim delom jasna uloga TMAb u Hashimoto tireoiditisu (32), nalaz ovih autoantitela u obolelih od Graves-ove bolesti nije dovoljno razjašnjen (33). Ni naša ispitivanja nisu nam razjasnila značaj ovih autoantitela u autoimunoj hipertireozu. Njihova incidenca je znatno niža u novodijagnostikovanoj bolesti od nalaza TBII (67% u odnosu na

87%), niti ista iščezavaju u remisiji. Mi smo stoga mišljenja da nalaz TMAb za sada samo može da potvrdi autoimunu prirodu hipertireoze a ne može da se koristi za predikciju remisije ili relapsa (34).

b) Antitela na dezoksiribonukleinsku kiselinu (anti DNA)

Krajem osamdesetih godina pojavili su se izveštaji o nalazu antitela na dvolančanu DNK kod Graves-ove bolesti (35). Mada su nalažena u nižem titru nego kod SLE, incidenca je bila vrlo visoka, praktično kao i za TBII i TMAb. Kasniji izveštaji su korišćenjem specifičnijih metoda (imunofluorescencija umesto RIA) zaključili da se radilo o nespecifičnom vezivanju anti DNA u RIA testu (36). Mi smo u to vreme koristeći RIA (Amersham) odredili koncentraciju anti DNA u 30 osoba (10 zdravih, 10 sa nelečenom Bazedovljevom bolešću i 10 sa evolutivnim sistemskim lupusom) i dobili sledeće nalaze: zdravi 6,87 (st.dev 3,1); M.Basedowi 22,9 (st.dev 6,2) i SLE 91,8 (st.dev 9,9) U/ml (37). Ove nalaze smo dobili pre drugog citiranog rada (36), nismo ih publikovali a ni dalje istraživali u tom smeru, uglavnom iz finansijskih razloga.

Testiranje celularnog imuniteta

Mada je prva karika u etiopatogenezi Graves-Bazedovljeve bolesti poremećaj celularnog imuniteta (poremećen odnos T »supresora« i »helpera«) i mada ima puno izveštaja iz ove oblasti (38), još uvek nije na raspolaganju neka rutinska metoda iz ove grupe. Slično se odnosi i na kariku koja povezuje celularni sa humoralnim imunitetom u imunogenoj hipertireozii – testiranje interleukina i njihovih receptora (39), kao i na onu koja predhodi celularnom imunitetu, tj. determinisanost imunog odgovora u vezi sa genetskim činiocima. Sem nekih pokušaja mi sa ovom grupom testova nemamo iskustva.

ZAKLJUČNE NAPOMENE

Graves-Bazedovljeva bolest je autoimuna hipertireoza u čijoj patogenezi bitnu ulogu ima cirkulatorni tireoidni stimulator. Danas se zna da je taj činilac autoantitelo upravljeno na receptor za TSH na membrani tireocita i da ima stimulatorno dejstvo na njega.

Dokazivanje postojanja ovih autoantitela najjednostavnije se vrši radioreceptorskim testom. Široka primena ovog korisnog testa zahteva korisnicima stavljanje na raspolaganje kvalitetnih i jeftinih komponenti. Našim ispitivanjem dobijena je solidna osnova za ovu namenu.

Kako se radioreceptorskim testom dokazuje samo prisustvo autoantitela na TSH receptor, a ne i njihovo dejstvo (tj. ne potvrđuje se stimulacija) to je neophodno koristiti i neki test iz druge grupe. Mada je najspecifičniji i najsenzitivniji test merenje generacije cAMP, čiju smo jednu od modifikacija i mi razvili, njegova primena ipak nije jednostavna za rutinski rad. Možda će komercijalne preparacije tireocitnih kultura (FRTL₅) rešiti ove nedostatke? Mi za sada rutinski primenjujemo našu metodu »rane akumulacije« ^{99m}Tc pertehnetata sa kojom smo uglavnom zadovoljni. I dalje radimo na usavršavanju testiranja cAMP i razmatramo otklanjanje nedostataka metoda za in vitro ugradnju jodida.

Odredjivanje drugih autoantitwela smatramo da za sada ne može da bude adekvatna zamena za detekciju TRAb. Naravno za ovo su potrebna dalja iskustva kao i za testiranje celularnog imuniteta i genetskih činilaca.

LITERATURA

- 1 Adams D.D., Purves H.D. Abnormal responses in the assay of thyrotropin. *Proc Univ Otago Med Sch* 1956, 34:11.
- 2 Kriss J.P., Pleshakov V., Chien J.R. Isolation and identification of the long acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroidism and circumscribed pretibial myxedema. *J Clin Endocrinol Metab* 1964, 24:1005.
- 3 Smith B.R., Ricards C.R., Davies J.E., et al. The thyrotropin receptor and its role in Graves' disease. *J Endocrinol Invest* 1985, 8:175.
- 4 Zakarija M., McKenzie J.M., Clafin A. Humoral aspects of Graves' disease, In: Walfish P.G., Wall J.R., Wolpe R. Autoimmunity and the thyroid. Academic Press, Toronto, 1985,109.
- 5 Volpe R. The aetiology of thyroid disease, In: Rational Diagnosis of Thyroid disease, Verlag H.Egermann, Vienna,1977,9-41.
- 6 McKenzie J.M. Delayed thyroid response to serum from thyrotoxic patients. *Endocrinology*,1958,62:865.
- 7 Smith B.R., Hall R. Thyroid-stimulating immunoglobulines in Graves' disease. *Lancet*,1974,2:427.
- 8 Onaya T., Kotani M., Yamada T., Ochi Y. New in vitro test to detect the thyroid stimulator in sera from hyperthyroid patients by measuring colloid droplet formation and cyclic AMP in human thyroid slices. *J Clin Endocrinol Metab* 1973,36:859.
- 9 Rapoport B, Greenspan S, Foletti S, Pepitone M. Clinical experience with a human thyroid cell bioassay for thyroid stimulating immunoglobulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58:332.
- 10 Kasagi K., Iida Y., Konishi J., et al. Human thyroid stimulator (HTS) assay using cultured human thyroid cells. 6th International Congress of Endocrinology, Melbourne 1980,210.
- 11 Smith B.R., Hall R. Measurement of thyrotropin receptor antibodies. *Method Enzymol* 1981,74:405.
- 12 Shewring G., Smith B.R. An improved radioreceptor assay for TSH-receptor antibodies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1982,17:409.
- 13 Paunkovic N., Miladinovic J., Nikolic K. Radioreceptorski test za tireotropin – priprema i testiranje komponenti. *Radiol*,23:383 Jugosl 1989.
- 14 Paunkovic N., Miladinovic J., Pavlovic O. Determination of anti-TSH receptor autoantibodies in different phases of Graves-Basedow disease. *Nucl Med* 1986; 25:29.
- 15 Becker W., Borner W.: Therapeutische Konsequenzen aus der Pathogenese der Hyperthyreose, *Die Medizinische Welt*, (1986), 37:649.
- 16 Becker W., Borner W.: Therapeutische Konsequenzen aus der Pathogenese der Hyperthyreose, *Die Medizinische Welt*, (1986), 37:649.
- 17 Adanja G., Paunkovic N. Razvoj metode za testiranje LATS-a, Beograd, 1974, nepublikovani radovi.
- 18 Karanfilski B., et al. Nasa prva iskustva u testiranju LATS-a. II jugoslovenski simpozijum o štitastoj zlezdi, Zlatibor-Tara, 1971.
- 19 McKenzie J.M. Humoral factors in the pathogenesis of Graves' disease. *Physiol Rew* 1968,38:252.
- 20 Orgiazzi J., Chopra I.J., Williams D.E., Solomon D.H. Evidence for normal thyroid adenyl cyclase, cyclic AMP-binding and protein kinase activities in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1975,40:248.
- 21 Rapoport B., Adams R.J. Bioassay od TSH using dog thyroid cells in monolayer culture. *Metabolism* 1978,27:1732.
- 22 Kasagi K., Konishi J., Iida Y., et al. A new in vitro assay for human thyroid stimulator using cultured thyroid cells: effect of sodium chloride on adenosine 3'5' monophosphate increase. *J Clin Endocrinol Metab* 1982,54:108.
- 23 Paunković Dž. Izučavanje postreceptorskih događaja u kulturi tireocita in vitro nakon stimulacije receptora za tireotropin. Doktorska disertacija, Beograd, 1993.
- 24 Marcocci C., Valente W.A., Pinchera A., et al. Graves' IgG stimulation of iodide uptake in FRTL-5 rat thyroid cells: a clinical assay complementing FRTL-5 assay measuring adenylate cyclase and growth-stimulating antibodies in autoimmune thyroid disease. *J Endocrinol Invest* 1983,6:463.
- 25 Zakarija M., McKenzie J.M. Variations in the culture medium for FRTL-5 cells: effects on growth and iodine uptake. *Endocrinology* 1989,125:1253.
- 26 Higgins H.P., Ball D., Eastham S. 20-min Tc thyroid uptake: A simplified method using gamma camera. *J Nucl Med* 1973, 14:907.
- 27 Hilditch T.E. Kinetics of thyroidal uptake of pertechnetate. *J Nucl Med* 1980, 21:704.
- 28 Paunkovic N., Paunkovic J., Pavlovic O. Evaluation of autoimmune stimulation of thyroid by ^{99m}Tc pertechnetate uptake test. *Europ J Nucl Med* 1989,15:524.
- 29 Antevska E., Richter W.S., Cordes M. Initial thyroidal pertechnetate kinetics. *Europ J Nucl Med* 1994,21:809.
- 30 Strakosh C.R., Wenzel B.E., Row V.V., Volpe R. Immunology of autoimmune thyroid disease. *N Eng J Med* 1982,307:1488.
- 31 Tamai H., Uno H., Hirota Y., et al. Immunogenetics of Hashimoto' and Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1985,6:62

- 32 Hamada N., Ito K., Mimura T., et al. Retrospective evaluation of the significance of thyroid microsomal antibody in the treatment of Graves' disease. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1987,114:328.
- 33 Paunković N., Paunković Dž. Učestalost nalaza antitela na TSH receptore (TRAb) i tireoidnih mikrozosmskih antitela (TMAB) u Graves-ovoj bolesti. *Medicinski pregled* 1995, 1-2:10-14.
- 34 Katakura M., Yamada T., Aizawa T., et al. Presence of antideoxyribonucleic acid antibody in patients with hyperthyroidism of Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1987,64:405.
- 35 Baethge B.A., Levine S.N., Wolf R.E. Antibodies to nuclear antigens in Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1988,66:485.
- 36 Paunkovic N., Miladinovic J. Nalazi anti DNA u hipertireozii. Nepublikovani podaci.
- 37 Burman K.D., Baker J.R.Jr. Immune mechanisms in Graves' disease. *Endocrine Reviews* 1985,6:183.
- 38 Chow C.C., Lai K.N., Leung J.C.K., et al. Serum soluble interleukin 2 receptor in hyperthyroid Graves' disease and effect of carbimazole therapy. *Clinical Endocrinology* 1990,33:317.
- 39 Dahlberg P.A., Holmlund G., Karlsson F.A., et al. HLA-A, -B, -C and DR antigens in patients with Graves' disease and their correlation with signs and clinical course. *Acta Endocrinol* 1981,97:42.

Prvi naučni skup o štitastoj žlezdi, Zlatibor, 1994.

Monografija, Beograd 1996, 115-124.