

AUTOIMUNSKE BOLESTI ŠTITASTE ŽLEZDE: *IN VITRO* DIJAGNOSTIKA

Snežana T. Živančević-Simonović¹, Aleksandar L. Đukić¹, Milovan D. Matović¹, Ljiljana A. Dimitrijević²
¹Medicinski fakultet u Kragujevcu, Kragujevac, ²Institut za imunologiju i virusologiju „Torlak“, Beograd

AUTOIMMUNE THYROID DISEASES: *IN VITRO* DIAGNOSTICS

Snežana T. Živančević-Simonović¹, Aleksandar L. Đukić¹, Milovan D. Matović¹, Ljiljana A. Dimitrijević²
¹School of Medicine, University of Kragujevac, ²Institute of Immunology and Virology „Torlak“, Belgrade

Primljen/Received: 01. 09. 2003.

Prihvaćen/Accepted: 03. 11. 2003.

ABSTRACT

In diagnostics of autoimmune thyroid diseases a number of *in vitro* methods is used to evaluate thyroid function or examine the presence of antithyroid antibodies which may be included in pathogenesis of the disease or only represent „silent witnesses“ of autoimmune processes. During the evaluation of thyroid function serum concentrations of thyroid-stimulating hormone (TSH) and thyroid hormones are determined and due to these concentrations the diagnosis of manifested or subclinical disturbances of thyroid gland is set. Detection of antibodies specific in dominant thyroid autoantigenes represents confirmation of autoimmune pathogenesis of the disease. The concentration of TSH and thyroid hormones in blood may be influenced by some diseases and drugs, so abnormal values can be detected in absence of diseases of thyroid gland. In the serum of a tested person heterophilic antibodies, rheumatoid factors or other antibodies may occur, which reduce the number of specific interactions in the assay, causing increased or decreased concentrations of hormones or autoantibodies. A great number of methods used in *in vitro* diagnostics differs very much by sensitivity which should be considered during the interpretation of laboratory results. This study presents the most important methods used in diagnostics of autoimmune thyroid diseases.

Key words: Autoimmune thyroid disease, Graves disease, Hashimoto thyroiditis, *in vitro* diagnostics

Abbreviations: Ab – antibody, CHO – cell line (express TSHR), FACS – fluorescence activated cells sorter, FRTL-5 – cell line (express TSHR), FT3 – free triiodothyronine, FT4 – free thyroxine, HAMA – human anti-mouse antibodies, IgG – immunoglobulin G, K 562 – leukemia cell line (express TSHR), RIA – radioimmunoassay, RF – rheumatoid factor, Tg – thyroglobulin, TPO – thyroperoxidase, TSH – thyroid-stimulating hormone, TSHR – thyroid-stimulating hormone receptor, T3 – triiodothyronine, T4 – thyroxine

SAŽETAK

U dijagnostici autoimunskih bolesti štitaste žlezde koriste se brojne *in vitro* metode kojima se procenjuje tireoidna funkcija ili ispituje prisustvo antitireoidnih autoantitela koja mogu biti uključena u patogenezu bolesti ili samo predstavljati "neme svedoke" autoimunskog procesa. Pri proceni funkcije štitaste žlezde određuju se serumske koncentracije tireostimulišućeg (TSH) i tireoidnih hormona i na osnovu njihove koncentracije postavlja dijagnoza ispoljenih ili subkliničkih poremećaja funkcije štitaste žlezde (hipertireoze ili hipotireoze). Potvrdu autoimunske patogeneze bolesti predstavlja detekcija antitela specifičnih za dominantne tireoidne autoantigene (receptor za TSH, tireoidnu peroksidazu i tireoglobulin). Na koncentraciju TSH i tireoidnih hormona u krvi mogu uticati neka fiziološka stanja, bolesti i lekovi, tako da se abnormalne vrednosti mogu detektovati i u odsustvu bolesti štitaste žlezde. U serumu ispitanika mogu biti prisutna heterofilna antitela, reumatoidni faktori ili druga autoantitela koja smanjuju broj specifičnih interakcija u testu, prouzrokujući povećanu ili smanjenu koncentraciju hormona ili autoantitela. Veliki broj metoda koje se koriste u *in vitro* dijagnostici veoma se razlikuju prema osetljivosti, što treba imati u vidu prilikom interpretacije laboratorijskih rezultata. U ovom radu su prikazane najvažnije metode koje se koriste u dijagnostici autoimunskih bolesti štitaste žlezde: Graves-ove bolesti i Hashimoto tireoiditisa.

Cljučne reči: autoimunska bolest, štitasta žlezda, Graves-ova bolest, Hashimoto tireoiditis, dijagnostika, *in vitro*

Skraćenice: At – antitelo, CHO – ćelijska linija (ekspirira TSHR), FACS – metoda protočne citofluorimetrije (engl. fluorescence activated cells sorter), FRTL-5 – ćelijska linija (ekspirira TSHR), FT3 – slobodni (engl. free) trijodtironin, FT4 – slobodni (engl. free) tiroksin, HAMA – humana anti-mišja antitela (engl. human anti-mouse antibodies), IgG – imunoglobulin klase G, K 562 – leukemijska ćelijska linija (ekspirira TSHR), RIA – radioimunološke analiza (engl. radioimmunoassay), RF – reumatoidni faktor, Tg – tireoglobulin, TPO – tireoperoksidaza (peroksidaza tireocita), TSH – tireostimulišući hormon (engl. thyroid-stimulating hormone), TSHR – receptor za tireostimulišući hormon (TSH), T3 – trijodtironin, T4 – tiroksin

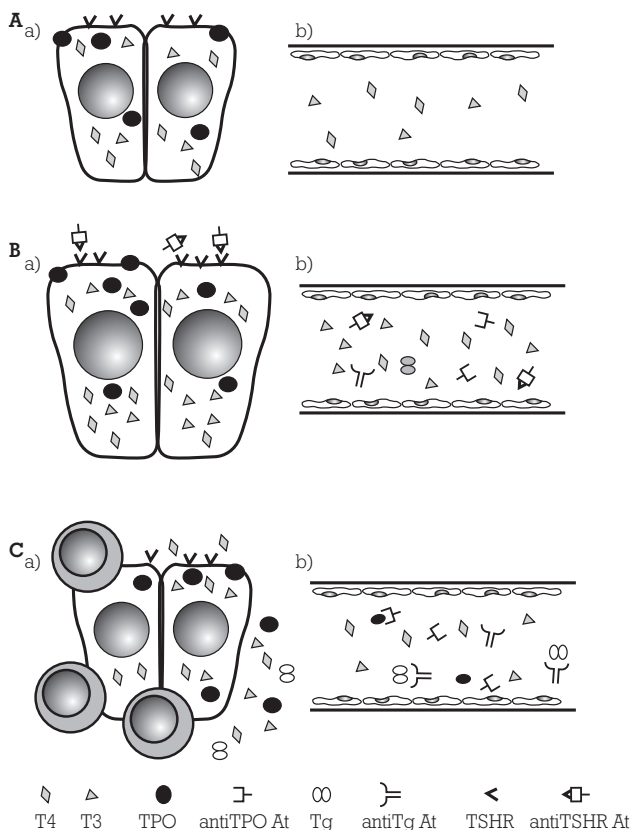
PATOGENEZA AUTOIMUNSKIH BOLESTI ŠTITASTE ŽLEZDE

Autoimunske bolesti štitaste žlezde, Graves-ova bolest i Hashimoto tireoiditis nastaju usled pokretanja imunskog odgovora koji je usmeren prema antigenima sopstvenih tireocita (1). Nakon inicijacije autoimunskog procesa, u patogenezi bolesti ključnu ulogu imaju autoantitela usmerena prema receptoru za TSH (TSHR) u Graves-ovoj bolesti i T limfociti u Hashimoto tireoiditisu. Tokom bolesti mogu nastati promene u funkciji štitaste žlezde: hipertireoza kod obolelih od Graves-ove bolesti ili hipotireoza kod Hashimoto tireoiditisa. Veoma retko, usled intenzivnog zapaljenjskog procesa kod obolelih od Hashimoto tireoiditisa može da se javi tireotoksikoza (hashitoxicosis).

Nekad se autoimunske bolesti štitaste žlezde mogu detektovati screening-om (2), posebno u populacijama sa pove-

ćanim rizikom za njihov nastanak (3, 4), ali znatno češće autoimunski proces u štitastoj žlezdi započinje neprimetno i protiče bez izraženih tegoba, tako da su struma i/ili simptomi prouzrokovani poremećajem funkcije štitaste žlezde (hipertireozom ili hipotireozom) prvi znaci bolesti (5). Klinički simptomi koji prate blage poremećaje funkcije štitaste žlezde su nespecifični (6, 7). Kasnije, hipertireoza prouzrokuje gubitak telesne težine, ubrzan srčani rad, smanjenu toleranciju toplote, apatiju, tremor i mišićnu slabost, a hipotireoza otkoše, mišićne grčeve, suhu kožu, konstipaciju, mentalnu usporenost i smanjenu toleranciju hladnoće. Zbog toga se dijagnostika najčešće započinje testovima kojima se određuje tireoidni status, a posle detekcije poremećaja u koncentraciji tireoidnih hormona (T4 i/ili T3) i TSH, da bi se postavila dijagnoza autoimunskih bolesti štitaste žlezde, ispituje prisustvo antitela koja predstavljaju markere autoimunskog procesa. Prema tome, la-

laboratorijski testovi za dijagnozu autoimunskih bolesti štitaste žlezde obuhvataju određivanje koncentracije cirkulišućih hormona štitaste žlezde, ocenu integriteta hipotalamusno-hipofizno-tireoidne osovine i merenje koncentracije autoantitela na tireoidne antigene budući da je koncentracija tireoidnih hormona, kao i prisustvo antitireoidnih autoantitela u krvi odraz autoimuskog procesa u štitastoj žlezdi (slika 1).



Slika 1. Koncentracija tireoidnih hormona i prisustvo antitireoidnih autoantitela u krvi kao odraz autoimuskog procesa u štitastoj žlezdi. U fiziološkim uslovima (Aa) tireociti sintetisaju tireoidne hormone (T4 i T3) i njihova koncentracija u krvi je normalna (Ab). Pri patološkoj stimulaciji TSHR antiTSHR autoantitelima u Gravesovoj bolesti nastaje hiperplazija tireocita i povećava se sinteza tireoidnih hormona (Ba) koja je praćena povećanjem koncentracije T4 i T3 u krvi, i prisustvom antiTSHR antitela, kao i drugih antitela na antigene tireocita (TPO i Tg), (Bb). Usled autoimuskog Hashimoto tireoiditisa u neposrednoj blizini tireocita nakupljaju se limfociti, a iz oštećenih tireocita oslobađaju sintetisani hormoni i autoantigeni TPO i Tg (Ca), koji prouzrokuju aktivaciju specifičnih limfocita i sintezu antiTPO i antiTg autoantitela koja se nalaze u krvi (Cb).

Pored opštih principa laboratorijske dijagnostike koji se primenjuju i u dijagnozi autoimunskih bolesti štitaste žlezde (poznavanja osetljivosti, specifičnosti i prediktivne vrednosti primenjenih testova), optimalna upotreba dijagnostičkih testova zavisi od vrste i stadijuma bolesti, kao i drugih medicinskih uslova i specifična je za svakog pacijenta (8). Zbog toga je za pravilnu interpretaciju rezultata tireoidnih dijagnostičkih testova neophodno dobro poznavanje patofizioloških procesa u štitastoj žlezdi, mogućnosti i ograničenja pojedinih testova, i uticaja mnogobrojnih bioloških faktora koji mogu interferirati pri izvođenju pojedinih metoda i otežati tumačenje dobijenih rezultata. U ovom radu će biti prikazani laboratorijski testovi koji se koriste u *in vitro* dijagnostici autoimunskih bolesti štita-

ste žlezde, sa posebnim osvrtom na uslove koji mogu uticati na vrednost dobijenih rezultata i koji, nepravilno protumačeni, mogu dovesti do pogrešne dijagnoze i terapije. Posebno će biti istaknut značaj pojedinih testova u utvrđivanju tireoidne disfunkcije i postavljanju dijagnoze Graves-ove bolesti i Hashimoto tireoiditisa.

TESTOVI KOJIMA SE ISPITUJE FUNKCIJA ŠTITASTE ŽLEZDE

Određivanje koncentracije TSH u serumu

U područjima u kojima ne postoji nedostatak joda (9), kod pacijenata kod kojih je tireoidni status stabilan i funkcija hipotalamusa i hipofize očuvana, određivanje koncentracije TSH u serumu je najosetljiviji pokazatelj funkcije štitaste žlezde (10) budući da senzitivne ćelije koje sekretuju TRH i TSH reaguju na promene u koncentraciji tireoidnih hormona (11).

Testovi kojima se određuje koncentracija TSH pripadaju grupi *in vitro* metoda sa obeleženim antitelima, odnosno imunometrijskih testova, koji su visoko specifični, ali je njihov nedostatak mala senzitivnost u diskriminaciji vrednosti koje su ispod donje granične, tako da postoji potreba za korišćenjem visokosenzitivnih testova za TSH. Ovi testovi se mogu koristiti u dijagnostici (kod osoba čiji se simptomi mogu povezati sa tireoidnom disfunkcijom), i u screening-u (7, 12) radi procene tireoidnog statusa u populacijama sa povećanim rizikom za nastanak autoimunskih bolesti štitaste žlezde (3, 4). Iako preporuke za određivanje TSH u screening-u autoimunskih bolesti štitaste žlezde nisu ujednačene, postoji saglasnost da screening ne treba raditi pre dvadesete godine života (2) zbog male incidence ovih bolesti kod mladih osoba, kao i da kod starijih osoba treba povremeno određivati serumsku koncentraciju TSH. Na primer, prema vodiču Američkog udruženja za štitastu žlezdu (American Thyroid Association), TSH treba određivati svakih 5 godina kod osoba koje su starije od 35 godina (13).

Kada je osetljivost ćelija koje sekretuju TSH na promene u koncentraciji tireoidnih hormona dobra, nalaz fizioloških vrednosti TSH ukazuje na to da je funkcija štitaste žlezde normalna (14). Međutim, ovakav pristup u laboratorijskoj dijagnostici štitaste žlezde nekad može biti put do pogrešne dijagnoze, zato što je koncentracija TSH normalna i kod pacijenata sa izraženom hipotireozom koja je prouzrokovana oboljenjem hipotalamusa ili hipofize (sekundarna hipotireoza) (15), a hipertireoza nekad (kod TSH produkujućih tumora hipofize, rezistencije na tireoidne hormone ili interferencije sastojaka seruma u imunoradiometrijskom testu za TSH) može biti praćena normalnom koncentracijom TSH (16). Zbog toga nekad nije dovoljno postupiti po preporuci Američkog udruženja za štitastu žlezdu (17), već je neophodno odrediti koncentracije tireoidnih hormona, pre svega T4 a nekad i T3, što je praksa u mnogim evropskim zemljama. I nalaz koncentracije TSH koja je blizu gornje granične vrednosti, uz normalan FT4, može ukazati na autoimunska bolest štitaste žlezde (11).

Na sekreciju TSH uticaj mogu imati neki lekovi, i u takvim slučajevima abnormalne vrednosti TSH koje se detektuju u serumu nisu odraz procesa u štitastoj žlezdi. Agonisti dopamina na početku primene mogu (privremeno) inhibisati sekreciju TSH do vrednosti ispod graničnih, ali još uvek detektabilnih (18). I amfetamini imaju sličan efekat (posredstvom oslobođenog dopamina), dok antagonisti dopamina prouzrokuju suprotan efekat, povećavaju sekreciju i koncentraciju TSH u serumu.

Na tačnost određivanja koncentracije TSH u serumu ispitanika mogu uticati sastojci seruma, autoantitela specifična za TSH i heterofilna antitela (humana antimišja antitela, HAMA, antiidiotipska antitela i reumatoidni faktori, RF) pristuna u serumu pacijenata kod kojih su ranije primenjeni mišji imunoglobulini i kod različitih autoimunskih bolesti (19, 20). Kako HAMA mogu prouzrokovati povećanje vrednosti TSH koje ne odgovara stvarnoj koncentraciji hormona (21, 22), njihov efekat se može sprečiti pethodnom inkubacijom seruma koji se testira sa neimunizovanim (normalnim) mišjim serumom ili komercijalnim blokirajućim reagensima (23). Kod oko 8% pacijenata sa reumatoidnim faktorom u serumu detektuje se lažno povećana koncentracija TSH usled interferencije RF sa reagensima (24), ali se samo deo interakcija RF sa reagensima (oko 20%) može sprečiti upotrebom blokirajućeg reagensa.

Iako je pokazano da postoji log/linear odnos između koncentracije serumskog TSH i tiroksina, zbog individualnih varijacija u nagibu krivulje i velike varijabilnosti u senzitivnosti TSH testova u opsegu vrednosti koje su manje od normalnih (25), kao i ozbiljnosti stanja koja su prouzrokovana smanjenom ili povećanom koncentracijom tiroidnih hormona (koja se odražava u abnormalnom TSH), funkciju štitaste žlezde nije moguće proceniti samo na osnovu TSH.

Određivanje koncentracije ukupnih tiroidnih hormona

Budući da svaka individua ima osobenu tiroidnu funkciju i da varijacije u koncentraciji tiroidnih hormona kod zdravih osoba iznose do +/- 25% (26), koncentracija T4 i T3 u krvi nije konstantna. Biološke varijacije u koncentraciji tiroidnih hormona u krvi posledica su ritmičkih promena (27) i mogu se detektovati određivanjem koncentracije T4 i T3 u krvi ispitanika.

RIA metode, zasnovane na principima saturacije, pri ograničenoj količini reagensa (28, 29) i elektroforeza (30) predstavljaju prve eseje za merenje koncentracije hormona i malih molekula u biološkim uzorcima. Kasnije su metode usavršene, posebno nakon otkrića hibridomske tehnologije (31) kojom se specifična monoklonska antitela mogu obezbediti u dovoljnoj količini, što je omogućilo rutinsko određivanje koncentracije supstanci male molekulske težine.

S obzirom na to da na koncentraciju proteina za koje se vezuju tiroidni hormoni mogu uticati mnogi lekovi (estrogen i kontraceptivni lekovi koji sadrže estrogen, tamoksisfen-citrat, heroin, metadon-hidrohlorid, fluouracil, mitotan, androgeni i anabolički steroidi, nikotinska kiselina

i glikokortikoidi) ili stanja (npr., nefrotski sindrom), izmerena koncentracija ukupnih tiroidnih hormona reflektuje promene u sadržaju proteina plazme. Zbog hormonskih promena koje povećavaju nivo proteina (nosača) za T4 i T3, u trudnoći se detektuje povećana koncentracija TT4 i TT3 koja nije prouzrokovana patološkim procesom u štitastoj žlezdi.

Iako lekovi koji ubrzavaju metabolizam tiroidnih hormona u jetri (rifampicin, rifabutin, fenitoin, karbamazepin i fenobarbital), indukcijom enzimskog sistema citohroma P-450, mogu ubrzati metaboličku eliminaciju T4 i T3, oni nemaju značaja kod eutireoidnih pacijenata (32), ali ako je sekrecija tiroidnih hormona smanjena ubrzan metabolizam može prouzrokovati smanjenje izmerene koncentracije ispod donje referentne vrednosti. Lekovi koji utiču na perifernu konverziju T4 u T3 (inhibicijom monodejodinaze u jetri i bubrežima), mogu da prouzrokuju smanjenje koncentracije T3.

Cirkulišuća antitela na tiroidne hormone, opisana kako kod tiroidnih, tako i kod netireoidnih bolesnika, heterofilna antitela (HAMA i RF), mogu prouzrokovati agregaciju imunoglobulina i/ili ukršteno reagovati sa antitelima iz eseja. Prisustvo cirkulišućih autoantitela može prouzrokovati lažno povećane ili lažno smanjene vrednosti tiroidnih hormona, što zavisi od prirode (specifičnosti) antitela i od dizajna eseja, tj. od tehnike separacije (33). Antitela na tiroidne hormone su opisana kako kod tiroidnih (34, 35, 36), tako i kod nekih netireoidnih bolesti (37, 38, 39) i obično su poliklonska. Titar antitela (35), njihova specifičnost i afinitet određuju klinički značaj interferencije u određenom testu (eseju). U testovima u kojima postoji samo jedno antitelo, usled prisustva autoantitela koja su specifična za tiroidne hormone detektovana koncentracija će biti manja od stvarne koncentracije hormona u krvi/serumu (zbog toga što se obeleženi hormon vezuje za autoantitelo, kao i za antitelo iz test-kompleta stvarajući sa njima imunske komplekse). Budući da se meri aktivnost ukupno formiranih kompleksa biće detektovana veća aktivnost obeleživača, što u RIA i srodnim analizama znači manju koncentraciju merene supstancije (što je shematski predstavljeno u ref. 40).

Određivanje koncentracije slobodnih tiroidnih hormona

Uticaj proteina nosača na koncentraciju ukupnih tiroidnih hormona u cirkulaciji nametnuo je potrebu određivanja slobodnih frakcija (FT4 i FT3). Budući da su biološki aktivni jedino slobodni hormoni, određivanje njihove koncentracije bolje odražava metaboličke promene koje su prouzrokovane nedostatkom ili viškom tiroidnih hormona.

Ne postoji opšteprihvaćen princip ili vodič koji bi precizno definisao indikacije za određivanje koncentracije slobodnih tiroidnih hormona. U nekim zemljama se preporučuje određivanje koncentracije FT4 ukoliko je prethodno detektovana abnormalna serumska koncentracija TSH, dok se u drugim za procenu tiroidnog statusa istovremeno određuje koncentracija TSH i FT4. U nekim insitucijama se FT3 određuje rutinski kada postoji povećan TSH (41), dok se u drugim FT3 određuje jedino ako je

FT4 u granici normalnih vrednosti. Kada je suspektna hipertireoza, nekad je pored FT4 neophodno odrediti i FT3, zbog mogućnosti "T3 toksikoze". Smatramo da je radi procene tireoidnog statusa, a posebno kod pacijenata kod kojih se po prvi put ispituje funkcija štitaste žlezde, neophodno odrediti FT4 i TSH, a ako je detektovana normalna koncentracija FT4 uz suprimiran TSH, potrebno je odrediti i koncentraciju FT3.

Na koncentraciju slobodnih tireoidnih hormona mogu uticati neki lekovi: nesteroidni antiinflamatorni lekovi (42) i heparin (43) indukuju oslobađanje tireoidnih hormona od vezujućih proteina i prouzrokuju povećanje koncentracije slobodnih T4 i T3 u serumu, a fenitoin i karbamazepin interferiraju u testovima za određivanje slobodnih tireoidnih hormona, prouzrokujući smanjene vrednosti FT4 i FT3 (17). Amiodaron i kontrastna sredstva koja sadrže jod, beta blokatori i kortikosteroidi, inhibišu centralnu i perifernu konverziju T4 u T3, čiji je efekat povećana koncentracija FT4 u serumu, a smanjena koncentracija FT3.

Pri određivanju koncentracije cirkulišućih slobodnih hormona (FT4 i FT3) uticaj autoantitela na tireoidne hormone ima daleko manji značaj (44). Međutim, povećana koncentracija FT4, FT3, T4 ili T3 udružena sa povećanom koncentracijom TSH ukazuje na interferenciju. Pokazana je povećana koncentracija FT4 kod pacijenata sa velikom koncentracijom RF u serumu (45).

PROCENA FUNKCIJE ŠTITASTE ŽLEZDE

Dijagnoza klinički manifestnih i subkliničkih poremećaja štitaste žlezde postavlja se na osnovu koncentracije tireoidnih hormona i TSH u serumu. Jasan laboratorijski nalaz, povećana koncentracija FT4 i/ili FT3 uz suprimiran TSH ukazuje na manifestnu, a normalne koncentracije tireoidnih hormona i smanjena vrednost TSH na subkliničku hipertireozu. Analogno tome, smanjene koncentracije hormona štitaste žlezde i povećana koncentracija TSH potvrđuje dijagnozu hipotireoze, a normalne koncentracije FT4 (i eventualno FT3) i povećan nivo TSH na postojanje subkliničke hipotireoze. Subklinički oblici tireoidne disfunkcije najčešće prelaze u klinički manifestne oblike, vreme do ispoljavanja poremećaja funkcije štitaste žlezde može da bude veoma različito (46). Kod 3-18% pacijenata sa subkliničkom hipotireozom godišnje se razvije klinički manifestna hipotireoza (47), 90% hipotireoze prouzrokovano je Hashimoto tireoiditisom, a najveća je verovatnoća prelaska subkliničke u manifestnu hipotireozu ako je vrednost TSH veća od 20 mU/L.

Postoji shvatanje da subklinička hipotireoza i hipertireoza predstavljaju najlakše oblike tireoidne insuficijencije i tireotoksikoze (11) budući da kod pacijenata sa subkliničkom hipotireozom pri supstitucionoj terapiji levotiroksinom nastaje poboljšanje (48), a kod osoba sa subkliničkom hipertireozom postoji povećan rizik za nastanak osteoporoze ili fibrilacije pretkomora srca (49).

Pri interpretaciji laboratorijskih rezultata kojima se potvrđuje dijagnoza subkliničkih ili klinički manifestnih poremećaja funkcije štitaste žlezde posebnu pažnju treba pokloniti rezultatima teško bolesnih pacijenata, zbog mo-

gućnosti da su vrednosti izvan opsega referentnih prouzrokovane drugim, netireoidnim bolestima ili terapijom, što se označava kao "euthyroid sick syndrome" (50).

Kada se laboratorijskim testovima ustanovi abnormalna koncentracija TSH i/ili tireoidnih hormona i potvrdi postojanje tireoidne disfunkcije, to je samo prvi korak u dijagnozi autoimunskih bolesti štitaste. Za potvrdu autoimunske patogeneze bolesti neophodno je detektovati aktivnost autoreaktivnih limfocita usmerenih prema sopstvenom tireoidnom tkivu, što se u praksi najčešće ostvaruje neinvazivnim metodama, određivanjem koncentracije autoantitela specifičnih za tireoidne antigene u serumu ispitivanja.

ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE ANTITIREOIDNIH AUTOANTITELA

Autoantitela, kao markeri autoimunskog procesa, mogu odražavati prisustvo, prirodu i intenzitet autoimunskog procesa (51), a detekcija cirkulišućih autoantitela može da ukaže na bolest u prekliničkom periodu (52). Obeležje (žig) autoimunskih bolesti štitaste žlezde je prisustvo cirkulišućih antitireoidnih autoantitela, od kojih su najznačajnija autoantitela specifična za tireoidnu peroksidazu (antiTPO At, raniji naziv "antimikrozomalna antitela"), tireoglobulin (antiTg At) i TSH receptor (antiTSHR At) (53). Veliki titar antitireoidnih autoantitela pokazatelj je aktivnosti i težine bolesti (51).

Da bi se testovi kojima se ispituje prisustvo autoantitela u serumu mogli koristiti u kliničkoj praksi neophodno je kvantifikovati i poznavati njihove parametre: osetljivost (broj osoba sa pozitivnim autoantitelima u kojih će se razviti bolest prema ukupnom broju osoba kod kojih će se razviti bolest), specifičnost (šansa osobe koja nema autoantitela u serumu da se ne razvije data autoimunska bolest) i pozitivnu prediktivnu vrednost (test ima visoku pozitivnu prediktivnu vrednost ako se kod svake osobe sa autoantitelima u serumu razvije bolest). Prediktivna vrednost testa se određuje prospektivnim studijama.

Za merenje antitireoidnih autoantitela mogu se koristiti brojne tehnike: hemaglutinacija (koja nije specifična za imunoglobuline klase G (IgG), male je osetljivosti i zavisi od izvršioaca), eseji koji se zasnivaju na aktivnosti enzima (i zbog toga nisu dovoljno precizni) i tehnike koje se zasnivaju na direktnom merenju koncentracije ispitivane supstance, kao što su radioimunološke (RIA) i srodne analize. Iako to izgleda paradoksalno, najosetljiviji eseji nekad nisu i najkorisniji u postavljanju dijagnoze autoimunskih bolesti štitaste žlezde budući da postoji obrnut odnos senzitivnosti i specifičnosti testa i da je utvrđeno da zdrave osobe mogu imati malu koncentraciju antitireoidnih autoantitela u serumu.

Određivanje koncentracije antiTPO antitela

U intratireoidnim limfocitima se sintetišu antiTPO antitela (54). Ta antitela su uslov bez koga nema autoimunskog tireoiditisa i prisutna su u serumu u relativno velikoj koncentraciji, koja se meri mikrogramima, ili čak miligramima po mililitru (55).

Iako je semi-kvantitativni aglutinacioni test najstariji test kojim su detektovana «antimikrozomalna antitela» (56) zbog nedovoljne osetljivosti uglavnom je zamenjen imunoesejom kojim se određuje koncentracija antiTPO antitela. Zbog znatne razlike u senzitivnosti i specifičnosti ta dva testa, između njih se ne može staviti znak jednakosti.

Koncentracija antiTPO At se može određivati u screening-u autoimunskih bolesti štitaste žlezde, radi postavljanja dijagnoze bolesti kod osoba kod kojih je pokazan poremećaj tireoidne funkcije (hipotireoza ili hipertireoza) i u praćenju efekata terapije. U screening-u se antitireoidna autoantitela određuju kod starijih osoba (4) i u toku trudnoće (screening antiTPO antitela u ranoj trudnoći može omogućiti otkrivanje osoba sa povećanim rizikom za nastanak poremećaja funkcije štitaste žlezde posle porođaja) (3). Kada je suspektna hipotireoza, antiTPO antitela se određuju da se potvrdi autoimunska priroda bolesti, dok je određivanje koncentracije ovih antitela od manjeg značaja u praćenju bolesti u toku terapije.

Kod autoimuskog tireoiditisa antiTPO antitela pozitivna su kod skoro 100% obolelih. U klinički nerazjašnjenim situacijama veliki titar antiTg i antiTPO potvrđuje dijagnozu bolesti i ukazuje da će se razviti klinički manifestna forma bolesti (sa incidencom od 5% godišnje). U studijama koje su ispitivale učestalost autoimuskog tireoiditisa kod osoba sa povećanim vrednostima TSH pokazano je da bar 50% osoba sa TSH većim od 5 mU/L i 80% osoba sa TSH većim od 10 mU/L sadrži autoantitela na tireoidne antigene (9, 57, 58). AntiTPO i antiTg At prisutna su u serumu 50-90% obolelih od Graves-ove bolesti, smatra se da predstavljaju marker pridruženog tireoiditisa, a visok titar ovih antitela može ukazati na kasniji razvoj hipotireoze. Autoantitela na tireoidne antigene mogu se detektovati kod bolesnika sa drugim bolestima štitaste žlezde, drugim autoimunskim bolestima (Diabetes mellitus tip 1) i u normalnoj populaciji, više kod žena. Dok veliki titar antitireoidnih autoantitela omogućava predikciju bolesti u prekliničkom periodu (52) do sada nije utvrđen značaj malog titra ovih antitela, posebno ako je funkcija štitaste žlezde nepromenjena.

Određivanje koncentracije antiTg antitela

Tireoglobulin je najzastupljeniji protein tireocita, tokom autoimuskog procesa se oslobađa iz ćelija i dostupan je ćelijama imunskog sistema. Posle aktivacije specifičnih limfocita indukuje sintezu antiTg At. Prihvaćeno je shvaćanje da antiTg At nemaju značajniju ulogu u patogenezi bolesti i da najverovatnije predstavljaju samo markere autoimuskog procesa. U nekim studijama u kojima je ispitivano prisustvo antiTPO i antiTg antitela pokazano je da izolovano povećanje antiTg antitela ne postoji (59) što sugerira da u dijagnozi autoimunskih bolesti štitaste žlezde treba određivati samo antiTPO, a ne i antiTg antitela. Međutim, na osnovu svog iskustva Kaplan (8) sugerira da antiTg At treba određivati. Različiti zaključci proizašli iz primene različitih dijagnostičkih testova još jednom ukazuju na to da dobijeni rezultati laboratorijskih testova zavise od primenjene metode i da ih zbog toga treba veoma oprezno tumačiti.

Određivanje koncentracije antiTSHR antitela

Još 1956. godine utvrđeno je da Graves-ovu bolest prouzrokuje stimulišuća supstanca koja se nalazi u serumu obolelih, čije je dejstvo dugotrajnije od dejstva TSH (60), a označena je kao Long Acting Thyroid Stimulator (LATS). Kasnije je pokazano da je stimulišuća supstanca IgG (61, 62), što je ukazalo da humoralna autoimunost (tj. autoantitela) može biti uzrok glandularne hiperfunkcije. Većina antiTSHR antitela ima stimulišuće dejstvo na tireocite (63), ali postoje podaci o postojanju inhibišućih i „neutralnih“ antitela (55). Iako kod autoimunskih bolesti štitaste žlezde postoji koegzistencija stimulišućih i inhibišućih autoantitela (64), stimulišuća antitela predominantno su zastupljena kod obolelih od Graves-ove bolesti, a inhibišuća kod Hashimoto tireoiditisa. Inhibišuća autoantitela mogu prouzrokovati hipotireozu, a u izvesnim slučajevima i atrofični tireoiditis (primarni mikse-dem).

AntiTSHR antitela su u serumu prisutna u nanogramskim koncentracijama (65, 66). Danas su dostupni brojni testovi kojima se određuje njihova koncentracija (radioreceptorski test, imunoprecipitacija, imunofluorescencija) i priroda (biološki testovi, u kulturi ćelija koje ispoljavaju TSHR).

U radioreceptorskom testu koncentraciju autoantitela meri se na osnovu inhibicije vezivanja TSH (67) za ekstrakt membrane svinjskih tireocita. Izolovanje humanog TSHR (iz kulture ćelijske linije K562, koja eksprimira TSHR) i monoklonskog antitela koje prepoznaje nativnu konformaciju TSHR omogućilo je dobijanje izuzetno osetljivog imunoeseja (66) koji predstavlja osnov savremenih dijagnostičkih testova za detekciju antiTSHR antitela.

Prisustvo antiTSHR u serumu može se ispitivati imunocitohemijski (68), metodom protočne citofluorimetrije (engl. fluorescence activated cells sorter, FACS) kojom se najsavremenijom tehnologijom (uz korišćenje FACScan analizera) ispituje vezivanje antiTSHR antitela za membranu ćelija koje ispoljavaju TSHR (69, 70). Imunoprecipitacijom (71) se ispituje vezivanje autoantitela seruma za rekombinantni TSHR (72).

AntiTSHR antitela u serumu ispitanika potvrda su autoimuskog procesa koji je usmeren prema TSHR tireocita. Da bi se odredila priroda antitela (stimulišuća ili blokirajuća) neophodni su dodatni testovi, u čijoj je osnovi ispitivanje efekta antitela na ćelije koje na membrani ispoljavaju TSH receptor (u ćelijskoj kulturi, u uslovima in vitro). Diskriminacija između stimulišućih i inhibišućih antiTSHR antitela moguća je u kulturi humanih tireocita ili TSHR-transformisanih ćelija (CHO ili FRTL-5), ali se ovaj test ne može koristiti u rutinskoj dijagnostici autoimunskih bolesti štitaste žlezde.

Biološki test meri aktivaciju (na pr., sintezu cAMP) ćelija u kulturi u prisustvu antiTSHR antitela. Efekat autoantitela testira se u kulturi humanih tireocita (73, 74) ili drugih (transformisanih) ćelija koje ispoljavaju TSHR (75, 76).

S obzirom na to da su u upotrebi veoma raznovrsni testovi za otkrivanje prisustva antiTSHR antitela u serumu is-

pitanika, koji se znatno razlikuju prema osjetljivosti, rezultati pojedinih kliničkih studija međusobno se ne mogu porediti, već samo prikazati (uz neophodan prikaz metode ispitivanja). Dobijeni rezultati upotpunjuju znanje o patogenezi autoimunskih bolesti štitaste žlezde.

Upotrebom standardnog radioreceptorskog testa anti-TSHR At detektovana su kod 70-90% pacijenata sa Graves-ovom bolesti (77, 78), ali je izvestan broj rezultata bio «lažno negativan». Testovima «druge generacije» (sa izolovanim humanim TSHR i monoklonskim antitelima specifičnim za TSHR) anti-TSHR At su detektovana kod skoro 100% obolelih. Ovim testovima su kod 15% osoba sa Hashimoto tireoiditisom detektovana anti-TSHR At (u poređenju sa 6% obolelih, otkrivenih standardnim radioreceptorskim testom), a mali titar anti-TSHR antitela detektovan je i kod zdravih osoba (1:282), pacijenata sa bolestima štitaste žlezde koje nemaju autoimunsku genu (3:115) i sa drugim autoimunskim bolestima (2:69).

Imunoprecipitacijom je pokazano da se najveći deo anti-TSHR antitela iz seruma obolelih od Graves-ove bolesti vezuje za nativni molekul, a manji deo (oko 30%) za epitope u delu molekula koji nije ekspimiran u trodimenzionalnoj konformaciji receptora.

Biološkim testovima je utvrđeno da su stimulišuća anti-TSH receptor antitela prisutna kod 80-100% pacijenata sa hipertireozom u neleženoj Graves-ovoj bolesti (55), da se njihov titar smanjuje tokom tireosupresivne terapije, a titar inhibišućih autoantitela povećava posle terapije radioaktivnim jodom.

ZAKLJUČAK

U ovom radu su prikazane mogućnosti i ograničenja *in vitro* metoda bez kojih se ne može postaviti dijagnoza autoimunskih bolesti štitaste žlezde. Tim metodama se procenjuje funkcija tireoidne žlezde i ispituje prisustvo autoantitela specifičnih za tireoidne antigene u krvi. Na osnovu povećane koncentracije T4 i/ili T3, uz inhibisanu vrednost TSH i prisustvo anti-TSHR autoantitela u serumu postavlja se dijagnoza Graves-ove bolesti, dok smanjene koncentracije tireoidnih hormona, povećana koncentracija TSH i prisustvo anti-TPO (i/ili antiTg) antitela potvrđuje dijagnozu autoimunskog Hashimoto tireoiditisa. Određivanje koncentracije antitireoidnih autoantitela ima poseban značaj kod subkliničkih poremećaja funkcije štitaste žlezde (posebno kod subkliničke hipotireoze) i može ukazati na pojavu klinički manifestnih oblika bolesti. Pored anti-TSH At, kod obolelih od Graves-ove bolesti najčešće se detektuju i anti-TPO i/ili antiTg At koja predstavljaju «svedoke» autoimunskog procesa, a kod obolelih od Hashimoto tireoiditisa mogu biti prisutna (uglavnom inhibišuća) anti-TSHR At. Pri izvođenju i interpretaciji tireoidnih *in vitro* testova u vidu treba imati brojne faktore koji su prisutni u serumu ispitanika, a mogu interferirati sa reagensima i biti izrok «lažno» pozitivnih ili negativnih rezultata. Zbog toga je posebno važna saradnja lekara kliničara sa laboratorijom i klinička kontrola kvaliteta, kako bi se izbegla mogućnost nepravilnog tumačenja rezultata laboratorijskih testova, koja može voditi pogrešnoj dijagnozi bolesti i terapiji.

LITERATURA

- Zivancević-Simonović S, Đukić A, Arsenijević N, Dimitrijević Lj. Autoimunska bolest štitaste žlezde: patogeneza Graves-ove bolesti i Hashimoto tireoiditisa. *Medicus* 2003; 4: 21-6.
- Hunter I, Greene SA, MacDonald TM, Morris AD. Prevalence and aetiology of hypothyroidism in the young. *Arch Dis Child* 2000 83: 207-10.
- Nohr SB, Jorgensen A, Pedersen KM, Laurberg P. Postpartum thyroid dysfunction in pregnant thyroid peroxidase antibody-positive women living in an area with mild to moderate iodine deficiency: Is iodine supplementation safe? *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 3191-8.
- Diez JJ. Hypothyroidism in patients older than 55 years: an analysis of the etiology and assessment of effectiveness of therapy. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002; 57: 315-20.
- Feldt-Rasmussen U. Laboratory diagnosis and control of thyroid diseases. International course in thyroidology «Contemporary problems in clinical thyroidology». 18-19 Oct, 2002, Plovdiv.
- Canaris GJ, Steiner JE, Ridgway EC. Do traditional symptoms of hypothyroidism correlate with biochemical disease? *J Gen Intern Med* 1997; 12: 544-50.
- Helfand M and Redfern, CC. Screening for thyroid disease. An update. *Ann Intern Med* 1998; 129: 144-58.
- Kaplan MM. Clinical perspectives in the diagnosis of thyroid disease. *Clinical Chemistry* 1999; 45: 1377-83.
- Dayan CM, Daniels GH. Chronic autoimmune thyroiditis. *N Engl J Med* 1996; 335: 99-107.
- Carr D, McLeod DT, Parry G, Thornes HM. Fine adjustment of thyroxine replacement dosage: comparison of the thyrotrophin releasing hormone test using a sensitive thyrotrophin assay with measurement of free thyroid hormones and clinical assessment. *Clin Endocrinol* 1988; 28: 325-33.
- Toft AD, Beckett GH. Thyroid function tests and hypothyroidism. *BMJ* 2003; 326: 295-6.
- Singer PA, Cooper DS, Levy EG, et al. Treatment guidelines for patients with hyperthyroidism and hypothyroidism. *JAMA* 1995; 273: 808-12.
- Ladenson PW, Singer PA, Ain KB, et al. American thyroid association guidelines for detection of thyroid dysfunction. *Arch Intern Med* 2000; 160: 1573-5.
- Caldwell G, Kellett HA, Gow SM, et al. A new strategy for thyroid function testing. *Lancet* 1985; 1: 1117-9.
- Wardle CA, Fraser WD, Squire CR. Pitfalls in the use of thyrotrophin concentration as a first-line thyroid-function test. *Lancet* 2001; 357: 1013-4.
- Despres N, Grant AM. Antibody interference in thyroid assays: a potential for clinical misinformation. *Clin Chem* 1998; 44: 440-54.
- Surks MI, Chopra IJ, Mariash CN, Nicoloff JT, Solomon DH. American Thyroid Association guidelines for use of laboratory tests in thyroid diseases. *JAMA* 1990; 263: 1529-32.
- Davies PH, Franklyn JA. The effects of drugs on tests of thyroid function. *Eur J Clin Pharmacol* 1991; 40: 439-51.
- Boscato LM, Stuart MC. Incidence and specificity of interference in two-site immunoassays. *Clin Chem* 1986; 32: 1491-5.
- Cusick CF, Mistry K, Addison GM. Interference in a two-site immunoradiometric assay for thyrotrophin in a child. *Clin Chem* 1985; 31: 348-9.
- Kahn BB, Weintraub BD, Csako G, Zweig MH. Factitious elevation of thyrotrophin assay: implications for the use of monoclonal antibodies in «sandwich» immunoassay. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 66: 526-33.
- Wood JM, Gordon DL, Rudinger AN, Brooks MM. Artifactual elevation of thyroid-stimulating hormone. *Am J Med* 1991; 90: 261-2.
- Reinsberg J. Different efficacy of various blocking reagents to eliminate interferences by human antitumor antibodies with a two-site immunoassay. *Clin Biochem* 1996; 29: 145-8.
- Marks, V. False-positive immunoassay results: A multicenter survey of erroneous immunoassay results from assays of 74 analytes

- in 10 donors from 66 laboratories in seven countries. *Clin Chem* 2002; 48: 2008-16.
25. Spencer CA, LoPresti JS, Patel A, et al. Applications of a new chemiluminometric thyrotropin assay to subnormal measurements. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70: 453-60.
 26. Andersen S, Pedersen KM, Bruun NH, Laurberg P. Narrow individual variations in serum T4 and T3 in normal subjects: a clue to the understanding of subclinical thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 1068-72.
 27. Maes M, Mommen K, Hendrickx D, et al. Components of biological variation, including seasonality, in blood concentrations of TSH, TT3, FT4, PRL, cortisol and testosterone in healthy volunteers. *Clin Endocrinol* 1997; 46: 587-98.
 28. Yalow RS, Berson SA. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest* 1960; 39: 1157-75.
 29. Ekins RP. Radioimmunoassay and saturation analysis: basic principles and theory. *Br Med Bull* 1974; 30: 3-11.
 30. Ekins R. The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique. *Clin Chim Acta* 1960; 5: 553-9.
 31. Kohler G, Milstein C. *Nature* 1975; 256: 495-7.
 32. Tseng A, Fletcher D. Interaction between ritonavir and levothyroxine. *AIDS* 1998; 12: 2235-6.
 33. Kohse KP, Wisser H. Antibodies as a source of analytical errors. *J Clin Chem Clin Biochem* 1990; 28: 881-92.
 34. Sakata S, Nakamura S, Miura K. Autoantibodies against thyroid hormones or iodothyronine. *Ann Intern Med* 1985; 103: 579-89.
 35. Wang PW, Huang MJ, Liu RT, Chen CD. Triiodothyronine autoantibodies in Graves' disease: their changes after antithyroid therapy and relationship with the thyroglobulin antibodies. *Acta Endocrinol* 1990; 122: 22-8.
 36. Ogawa T, Sakata S, Nakamura S, et al. Thyroid hormone autoantibodies in patients with Graves' disease: effect of anti-thyroid drug treatment. *Clin Chim Acta* 1994; 228: 113-22.
 37. Sakata S. Autoimmunity against thyroid hormones. *Crit Rev Immunol* 1994; 14: 157-91.
 38. Sakata S, Matsuda M, Ogawa T, et al. Prevalence of thyroid hormone autoantibodies in healthy subjects. *Clin Endocrinol* 1994; 41: 365-70.
 39. Vyas SK, Wilkin TJ. Thyroid hormone autoantibodies and their implications for free thyroid hormone measurement. *J Endocrinol Invest* 1994; 17: 15-21.
 40. S. Živančević-Simonović. Primena in vitro metoda nuklearne medicine u gastroenterohepatologiji. U: Mijatović LjC, Obradović VB, ur Nuklearna medicina u gastroenterohepatologiji. Kragujevac: Medicinski fakultet, 2001: 125-44.
 41. Klee GG, Hay ID. Biochemical testing of thyroid function. *Endocrinol Metab Clin N Am* 1997; 26: 763-75.
 42. Bishnoi A, Carlson HE, Gruber BL, et al. Effects of commonly prescribed nonsteroidal anti-inflammatory drugs on thyroid hormone measurements. *Am J Med* 1994; 96: 235-8.
 43. Stevenson HP, Pooler G, Archbold R, et al. Misleading serum free thyroxine results during low molecular weight heparin treatment. *Clin Chem* 1998; 44: 1002-7.
 44. John R, Othman S, Parkes AB, Lazarus JH, Hall R. Interference in thyroid-function tests in postpartum thyroiditis. *Clin Chem* 1991; 37: 1397-400.
 45. Norden AGW, Jackson RA, Norden LE, Griffin AJ, Barnes MA, Little JA. Misleading results from immunoassays of serum free thyroxine in the presence of rheumatoid factor. *Clin Chem* 1997; 43: 957-62.
 46. Duntas LH. Subclinical hypothyroidism: a misnomer in search of a new name. *Thyroid* 2001; 11: 361-2.
 47. McDermott MT, Ridgway EC. Subclinical hypothyroidism is mild thyroid failure and should be treated. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 4585-90.
 48. Cooper DS. Subclinical hypothyroidism. *N Engl J Med* 2001; 345: 260-5.
 49. Toft AD. Subclinical hyperthyroidism. *N Engl J Med* 2001; 345: 512-6.
 50. Dong BJ. How medications affect thyroid function. *West J Med* 2000; 172: 102-6.
 51. Leslie D, Lipsky P, Notkins AL. Autoantibodies as predictors of disease *J Clin Invest*; 2001, 108: 1417-22.
 52. Lernmark D. Series introduction. Autoimmune diseases: are markers ready for prediction? *J Clin Invest* 2001; 108: 1091-6.
 53. Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. *Williams textbook of endocrinology*. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1998.
 54. McLachlan SM, McGregor A, Rees Smith B, Hall R. Thyroid-autoantibody synthesis by Hashimoto thyroid lymphocytes. *Lancet* 1979; 1: 162-3.
 55. Rapoport B, McLachlan SM. Thyroid autoimmunity. *J Clin Invest* 2001; 108: 1253-9.
 56. Mariotti S, Caturegli P, Piccolo P, Barbesino G, Pinchera A. Anti-thyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 661-9.
 57. Tunbridge WM, Evered DC, Hall R, et al. The spectrum of thyroid disease in a community: the Whickham survey. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1977; 7: 481-93.
 58. Parle JV, Franklyn JA, Cross KW, Jones SC, Sheppard MC. Prevalence and follow-up of abnormal thyrotrophin (TSH) concentrations in the elderly in the United Kingdom. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1991; 34: 77-83.
 59. Nordyke RA, Gilbert FI, Miyamoto LA, Fleury KA. The superiority of antimicrosomal over antithyroglobulin antibodies for detecting Hashimoto's thyroiditis. *Arch Intern Med* 1993; 153: 862-5.
 60. Adams DD, Purves HD. Abnormal responses in the assay of thyrotropins. *Proc Univ Otago Sch Med* 1956; 34: 11-2.
 61. Meek JC, Jones AE, Lewis UJ, Vanderlaan WP. Characterization of the long-acting thyroid stimulator of Graves disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964; 52: 342-9.
 62. Kriss JP, Pleshakov V, Chien JR. Isolation and identification of the long-acting thyroid stimulator and its relation to hyperthyroidism and circumscribed pretibial myxedema. *J Clin Endocrinol Metab* 1964; 24: 1005-28.
 63. Balazs C. Thyroid autoimmunity update role of autoimmune mechanism in Graves' disease. International course in thyroidology «Contemporary problems in clinical thyroidology». 18-19 Oct, 2002, Plovdiv.
 64. Prabhakar BS, Fan JL, Seetharamaiah GS. Thyrotropin-receptor-mediated diseases: a paradigm for receptor autoimmunity. *Immunol Today* 1997; 18: 437-42.
 65. Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM, Rapoport B. Engineering the human thyrotropin receptor ectodomain from a nonsecreted form to a secreted, highly immunoreactive glycoprotein that neutralizes autoantibodies in Graves' patients' sera. *J Biol Chem* 1997; 272: 18959-65.
 66. Costagliola S, Morgenthaler NG, Hoermann R, et al. Second generation assay for thyrotropin receptor antibodies has superior diagnostic sensitivity for Graves' disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 90-7.
 67. Shewring G, Rees Smith B. An improved radioreceptor assay for TSH receptor antibodies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1982; 17: 409-14.
 68. De Forteza R, Smith CU, Amin J, McKenzie JM, Zakarija M. Visualization of the thyrotropin receptor on the cell surface by potent autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 376.
 69. Jaume JC, Kakinuma A, Chazenbalk GD, Rapoport B, McLachlan SM. Thyrotropin receptor autoantibodies in serum are present at much lower levels than thyroid peroxidase autoantibodies: analysis by flow cytometry. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 500-7.
 70. Patibandla SA, Dallas JS, Seetharamaiah GS, Tahara K, Kohn LD, Prabhakar BS. Flow cytometric analyses of antibody binding to Chinese hamster ovary cells expressing human thyrotropin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1885-93.
 71. Morgenthaler NG, Tremble J, Huang GC, Scherbaum WA, McGregor AM, Banga JP. Binding of anti-thyrotropin receptor autoantibodies in Graves' disease serum to nascent, in vitro trans-

- lated thyrotropin receptor; ability to map epitopes recognised by antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 700–6.
72. Huang GC, Collison KC, Page MJ, McGregor AM, Banga JP. Expression of human thyrotropin receptor in *E coli*, purification of recombinant protein and its interaction with autoantibodies from Graves' disease patients. *J Mol Endocrinol* 1992; 8: 137-44.
73. Rapoport B, Greenspan FS, Filetti S, Pepitone M. Clinical experience with a human thyroid cell bioassay for thyroid stimulating immunoglobulin. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 58: 332–5.
74. Ludgate M, Perret J, Gerard C, et al. Use of recombinant human thyrotropin receptor expressed in mammalian cell lines to assay TSH-R autoantibodies. *Mol Cell Endocrinol* 1992; 73: R13–R18.
75. Michelangeli VP, Munro DS, Poon CW, Frauman AG, Colman PG. Measurement of thyroid stimulating immunoglobulins in a new cell line transfected with a functional human TSH receptor (JP09 cells) compared with an assay using FRTL-5 cells. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 40: 645–52.
76. Morgenthaler NG, Pampel I, Aust G, Seissler J, Scherbaum WA. Application of a bioassay with CHO cells for the routine detection of stimulating and blocking autoantibodies to the TSH-receptor. *Horm Metab Res* 1998; 30: 162–8.
77. Ilicki A, Gamstedt A, Karlsson FA. Hyperthyroid Graves' disease without detectable thyrotropin receptor antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74: 1090–4.
78. Kawai K, Tamai H, Matsubayashi S, et al. A study of untreated Graves' patients with undetectable TSH binding inhibitor immunoglobulins and the effect of anti-thyroid drugs. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43: 551–6.