مجله‌ی غدد درون‌ریز و متابولیسم ایران
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی شهید بهشتی
دوره‌ی بیست و دوم، شماره‌ی ۱، صفحه‌های ۴۰ ـ ۳۰ (فروردین ـ اردیبهشت ۱۳۹۹)

مقاله‌ی پژوهشی

فناوری‌های سنجش آنتی‌بادی علیه گیرنده تیروتروپین از گذشته تا حال

دکتر صفورا پاکیزه کار، دکتر سمانه حسین‌زاده، دکتر مهدی هدایتی

مرکز تحقیقات سلولی مولکولی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، **نشانی مکاتبه‌ی نویسنده‌ی مسئول:** مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی غدد درون‌ریز، پژوهشکده علوم غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دکتر مهدی هدایتی؛ e-mail: hedayati47@gmail.com

چکیده

اتو آنتی‌بادی علیه گیرنده تیروتروپین (**TSH-R**) عامل اصلی بیماری گریوز و تظاهرات برون تیروئیدی آن مانند افتالموپاتی و درماتوپاتی می‌باشد. این آنتی‌بادی‌ها با نام عمومی **TRAbs**، مجموعه‌ای از آنتی‌بادی‌ها با عملکرد متفاوت، شامل آنتی‌بادی‌های تحریک‌کننده گیرنده **TSH** (**TSAbs**)، آنتی‌بادی‌های مسدودکننده گیرنده **TSH** (**TBAbs**) و آنتی‌بادی‌های خنثی می‌باشند. برای سنجش میزان **TRAbs** فارغ از عملکرد، آزمون‌های سنجش ایمنی به روش اتصال رقابتی استفاده می‌شوند. این روش مبتنی بر توانایی **TRAbs** موجود در نمونه زیستی بیماران برای رقابت و جلوگیری از اتصال لیگاند (**TSH** یا آنتی‌بادی مونوکلونال علیه **TSH-R**) به گیرنده است. از آنجایی که **TSAbs** و **TBAbs** دارای اپی‌توپ‌های مشترک هم‌پوشان با محل اتصال **TSH** به گیرنده هستند، با روش‌های اتصال رقابتی قابل تمایز از یکدیگر نیستند. در مقابل اگر هدف بررسی عملکرد آنتی‌بادی و تمایز بین **TSAbs** و **TBAbs** باشد از روش زیست‌سنجشی مبتنی بر سلول استفاده می‌شود. اساس این روش استفاده از سلول‌های زنده برای تشخیص افتراقی **TSAbs** و **TBAbs** بر اساس افزایش و کاهش **cAMP** داخل سلولی است. با توجه به نقش پاتوژنیک متفاوت **TSAbs** و **TBAbs** و وجود پروتکل‌های متفاوت درمانی در بیماران مبتلا به بیماری‌های خود ایمنی تیرویید، با توجه به نوع آنتی‌بادی، تشخیص افتراقی این آنتی‌بادی‌ها از لحاظ بالینی دارای اهمیت است. در این مقاله مروری، نسل‌های مختلف فناوری‌های سنجش آنتی‌بادی علیه گیرنده **TSH** به ترتیب روند تکامل، بر اساس روش سنجش ایمنی و روش زیست‌سنجشی مبتنی بر سلول معرفی گردیده و مورد بحث قرار گرفته است.

واژگان کلیدی: آنتی‌بادی علیه گیرنده TSH، اتوآنتی‌بادی، تیروئید، بیماری خود ایمن، بیماری گریوز

دریافت مقاله: ۹۹/۲/۱۶ـ دریافت اصلاحیه: ۹۹/٤/۲۱ ـ پذیرش مقاله: ۹۹/۵/۱۳

مقدمه

بیماری‌های خود ایمنی تیروئید[i] (AITD) با تولید آنتی‌بادی‌هایی علیه آنتی‌ژن‌های مختلف تیروئید از جمله گیرنده تیروتروپین[ii](TSH-R)، آنزیم پراکسیداز تیروئیدی و تیروگلوبولین مرتبط است.[۱،۲] آنتی‌بادی علیه TSH-R[iii](TRAbs) به عنوان یکی از مهم‌ترین اتوآنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های مختلف تیروئید، گروهی ناهمگن از آنتی‌بادی‌هاست که بر اساس عملکرد به سه دسته آنتی‌بادی‌های تحریک‌کننده گیرنده هورمون تیروئید[iv] (TSAbs)، آنتی‌بادی‌های مسدودکننده گیرنده هورمون تیروئید[v] (TBAbs) و آنتی‌بادی‌های خنثی[vi] (N-TRAbs) تقسیم می‌شوند.[۳] آنتی‌بادی‌های تحریک‌کننده و مسدودکننده به بخشی از دومن خارج سلولی TSH-R وصل می‌شوند که در صورت اتصال TSH به آن، سبب تولید تیروکسین و تری‌یدوتیرونین می‌گردد. اتصال این آنتی‌بادی‌ها به TSH-R به ترتیب، سبب تولید بیش از حد یا کاهش cAMP[vii] داخل سلولی و القاء مسیرهای پیام‌رسان مربوطه می‌گردد و لذا علائم بالینی متفاوت به شکل پرکاری و یا کم‌کاری تیروئید را ایجاد می نماید.[٤] آنتی‌بادی‌های خنثی نیز به علت ایجاد برش

i- Autoimmune Thyroid Disease
ii- Thyroid Stimulating Hormone Receptor
iii- TSH Receptor Antibodies
iv- TSH-R Stimulatory Antibodies
v -TSH-R-blocking Antibodies
vi -Neutral Antibodies
vii -Cyclic Adenosine Monophosphate

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.3.0]

در دومن خارج سلولی TSH-R و تغییر ساختار آن ممکن است در پیشبرد سلول به سمت آپوپتوز نقش داشته باشند. آنتی‌بادی از نوع TSAbs در پاتوژنز پرکاری تیروئید خود ایمن یا بیماری گریوز و تظاهرات خارج تیروئیدی آن مانند افتالموپاتی گریوز[i] (GO) و درماتوپاتی گریوز[ii] (GD) نقش اساسی دارد و به عنوان شاخص این بیماری تقریباً در تمامی بیماران قابل تشخیص است.[۵،۶] لیکن در کم‌کاری تیروئید خود ایمن یا بیماری هاشیموتو[iii] (HT) به علت وجود التهاب حاد در تیروئید، هنوز مشخص نیست که در چند درصد بیماران، بروز کم‌کاری تیروئید به علت وجود TBAbs می‌باشد.[۴] آزمون‌های تشخیصی TRAbs بر پایه روش سنجش ایمنی رقابتی[iv] و روش زیست‌سنجی مبتنی بر سلول[v] انجام می‌شوند.[۷] از آنجایی که آنتی‌بادی‌های علیه TSH-R از نوع TSAbs و TBAbs هر دو دارای اپی‌توپ‌های مشترک هم پوشان با محل اتصال TSH به گیرنده هستند، به همین دلیل با روش‌های اتصال رقابتی قابل تمایز از یکدیگر نیستند. خلاف روش اتصال رقابتی، روش‌های مبتنی بر سلول، بر پایه استفاده از سلول‌های زنده برای ارزیابی عملکرد اتو آنتی‌بادی‌ها و تشخیص افتراقی TSAbs و TBAbs، بر اساس افزایش و یا کاهش cAMP در سلول استوار هستند. شیوع بالای بیماری‌های خود ایمن تیروئید و نظاهرات خارج تیروئیدی آن‌ها، علت نیاز ضروری به تشخیص دقیق بیماری‌های خود ایمن تیروئید و تشخیص افتراقی آنتی‌بادی‌های تحریک‌کننده و مسدودکننده را روشن می‌سازد.[۸،۹]

۱- گیرنده TSH

۱-۱ ساختار گیرنده TSH

گیرنده هورمون TSH (گیرنده تیروتروپین) متعلق به ابرخانواده گیرنده‌های همراه پروتئین G[vi] (GPCR) است.[۱۰،۱۱] خانواده GPCRs بزرگترین خانواده‌ی پروتئین‌های غشایی کدگذاری شده در ژنوم انسان را تشکیل می‌دهند.[۱۲] همه GPCR ها دارای ساختار مشترکی متشکل از هفت دومین ترا غشایی[vii] هستند، ولی از آنجایی که همسانی توالی بسیار اندکی در بین آن‌ها وجود دارد به چهار گروه اصلی A، B، C و F تقسیم می‌شوند.[۱۳،۱۴] گیرنده TSH متعلق به گروه A از خانواده GPCR ها است و در غشای پلاسمایی سلول‌های فولیکول تیروئید[viii] (TFC) و سایر سلول‌ها، از جمله سلول‌های چربی و فیبروبلاست‌ها وجود دارد.[۱۵] این پروتئین غشایی از لحاظ ساختاری از یک دومن خارج سلولی غنی از لوسین[ix] (LRR)، که توسط یک ناحیه لولایی شکل به دومن تراغشایی[x] اتصال دارد، تشکیل شده است و هم‌چنین دارای یک دومن داخل سلولی در سیتوزول است که به زیر واحدهای پروتئین G اتصال یافته است.[۱۶] پروتئین G دارای سه زیر واحد آلفا (α)، بتا (β) و گاما (γ) است و زیر واحدهای بتا و گاما می توانند یک کمپلکس دوتایی پایدار را تشکیل دهند که به آن کمپلکس بتا-گاما (Gβγ) گفته می‌شود.[۱۷] در پستانداران، زیر واحد آلفا بر حسب توالی اسیدهای آمینه و عملکرد به چهار نوع Gαi/o،Gαs ، Gαq/11و Gα12/13 تقسیم می‌شود[۱۸] و نوع زیر واحد آلفا، اساس تفاوت ایزوفرم‌های پروتئین G (Gs، Gq،Gi و G12/13) می‌باشد.[۱۹] دومن درون سلولی (اندودومن) TSH-R به زیر واحدهای پروتئین G، به طور عمده Gα، Gαq و Gβγ متصل است: به محض اتصال لیگاند به گیرنده، این زیرواحدها فعال شده وآبشارهای پیام رسانی را راه‌اندازی می‌کنند که در آخر منجر به تغییر بیان برخی ژن‌ها می‌گردد.[۱۵]

۱-۲ عملکرد زیستی گیرنده TSH

گیرنده TSH پروتئین کلیدی در کنترل تولید هورمون‌های تیروئیدی و رشد سلول‌های فولیکولی تیروئید است و این عمل از طریق القاء پیامبرهای ثانویه[xi] سیتوزولی صورت می‌گیرد.[۱۵،۲۰] اتصال لیگاند به گیرنده‌TSH، باعث تغییر ساختار فضایی گیرنده می‌شود و گیرنده به عنوان یک عامل تبادل نوکلئوتید گوانین[xii] (GEF) عمل نموده و سبب تبادل گوانوزین تری‌فسفات[xiii] (GTP) با گوانوزین دی‌فسفات[xiv] (GDP) در زیر واحد α و فعال شدن پروتئین G می‌گردد. سپس Gβγ از Gα-GTP جداشده و هر کدام

i -Graves' Ophthalmopathy
ii -Graves' Dermopathy
iii -Hashimoto's Disease
iv -Competitive Immunoassay
v -Cell-based Bioassays
vi -G protein-Coupled receptors
vii -Transmembrane domain

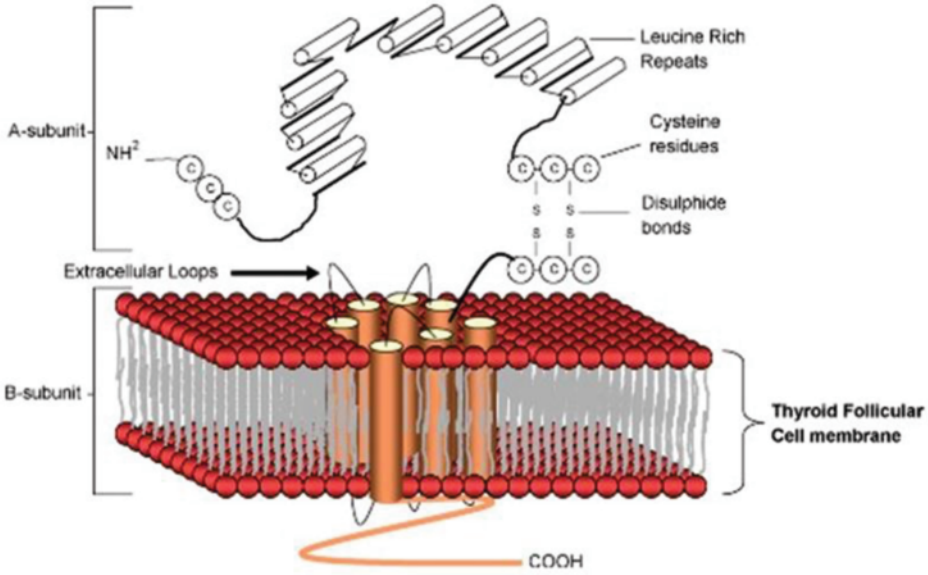
viii -Thyroid follicular cells
ix -Leucine-rich repeat
x -"Hinge" region
xi- Second Messengers
xii- Guanine Nucleotide Exchange Factors
xiii- Guanosine Triphosphate
xiv - Guanosine Diphosphate

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.3.0]

می‌توانند آبشارهای پیام‌رسان متفاوتی را فعال کنند.[۲۳-۲۱] در سلول‌های تیروئید فعال شدن گیرنده TSH منجر به فعال شدن زیرواحد α از نوع Gαs می‌شود که فعال شدن آن منجر به فعال شدن آنزیم آدنیلات سیکلاز[i] و در نتیجه افزایش آدنوزین منوفسفات حلقوی (cAMP) در سیتوپلاسم سلول می گردد.[۲۴] آنزیم بعدی در این مسیر، پروتئین کیناز A (PKA) است که در حالت غیر فعال دارای دو زیر واحد تنظیمی و دو زیر واحد کاتالیتیکی متصل به هم است. به هر کدام از زیر واحدهای تنظیمی دو مولکول cAMP اتصال می‌یابد و به این ترتیب زیر واحدهای کاتالیتیکی از زیر واحدهای تنظیمی جدا شده و از طریق کمپلکس منافذ هسته‌ای[ii] وارد هسته می‌گردند و پروتئین CREB[iii] را فسفریله و فعال می‌کنند. سپس پروتئین دیگری به نام CBP[iv] به CREB متصل شده و سپس کمپلکس CREB-CBP به عنوان فعال‌کننده رونویسی به توالی‌هایی بر روی ژنوم به نام CREB binding elements متصل شده و باعث تنظیم بیان ژن می‌گردد.[۲۵] در صورتی که زیر واحد α از خانواده Gαq/11 باشد، فعال شدن آن منجر به فعال شدن ایزوفرم β از آنزیم فسفولیپاز C (PLCβ) می‌شود که هیدرولیز فسفاتیدیل اینوزیتول ٤ و ٥ بیس فسفات[v] (PIP2) را به دی آسیل‌گلیسرول[vi] (DAG) و فسفاتیدیل اینوزیتول ۱،٤،٥ تری‌فسفات[vii] (IP3) کاتالیز می‌نماید. مولکول DAG باعث فعال شدن آنزیم پروتئین کیناز C (PKC) می‌گردد و IP3 باعث افزایش غلظت کلسیم داخل سلولی می‌شود.[۲۴]

۱-۳ ایمونوبیولوژی گیرنده TSH

گیرنده TSH در طی تغییرات پس از ترجمه به دو زیر واحد A یا α و B یا β شکسته می‌شود. این دو زیر واحد ابتدا توسط پیوند دی‌سولفید به هم وصل هستند. زیر واحد A بخش N ترمینال خارج سلولی و زیر واحد B بخش تراغشایی و دومین کوچک داخل سلولی است (شکل ۱).



شکل ۱- گیرنده هورمون تیروتروپین در سطح سلول‌های فولیکولی تیروئید[۲۶]

i- Adenylate cyclase
ii - Nuclear Pore Complexes
iii - cAMP Response Element-binding protein
iv - CREB-binding protein
v - Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
vi - Diacylglycerol
vii- Inositol trisphosphate

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.3.0]

گاهی تعدادی از این پیوندهای دی‌سولفید توسط آنزیم دی‌سولفید ایزومراز شکسته می‌شود و زیر واحد A از زیر واحد B جدا شده و به صورت نا به جا در مکان دیگری از غشاء سلول قرار می‌گیرد و می‌تواند به عنوان یک اتو آنتی‌ژن تحریک‌کننده سیستم ایمنی عمل کند.[۲۶]

۲- اتوآنتی‌بادی‌های علیه آنتی‌ژن‌های تیروئید

بیماری‌های خودایمنی تیروئید تقریباً ۵ درصد از جمعیت جهان را تحت تأثیر خود قرار داده است و به حضور آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن‌های تیروئید؛ شامل آنزیم پراکسیداز، تیروگلوبولین و گیرنده هورمون TSH اطلاق می‌شود. بررسی اتوآنتی‌بادی‌ها علیه آنتی‌ژن‌های تیروئید نقش اساسی در تشخیص این دسته از بیماری‌های خود ایمنی دارد. در این میان اتوآنتی‌بادی علیه گیرنده TSH، اتوآنتی‌بادی اصلی در پرکاری تیروئیدی اتوایمیون و دلیل اصلی تظاهرات بالینی بیماری گریوز، افتالموپاتی ناشی از گریوز و درماتو پاتی ناشی از گریوز است.[۲۷،۲۸] بیماری گریوز نوعی سندرم پرکاری تیروئیدی اتوایمیون است که در آن اتوآنتی‌بادی‌ها علیه گیرنده TSH پس از اتصال به گیرنده، آن را فعال می‌کنند و باعث هایپرپلازی تیروئید و بیوسنتز هورمون می‌شوند.[۱۵] هم‌چنین بیماری‌های اتو ایمیون تیروئید می‌تواند تیروئیدیت هاشیموتو باشد که اغلب منجر به کم‌کاری تیروئید می‌گردد و در آن نوعی اتوآنتی‌بادی علیه گیرنده TSH که دارای عملکرد مهاری است در بیماران یافت می‌شود.[۲۹] هم در بیماران مبتلا به گریوز و هم در بیماران مبتلا به هاشیموتو، شیوع تیترمثبت آنتی‌بادی علیه پراکسیداز[i] (anti-TPO) و آنتی‌بادی علیه تیروگلوبین[ii] (anti-Tg) مشاهده می‌شود ولی تمام بیماران مبتلا به هاشیموتو یا گریوز TPO-Ab و Tg-Ab مثبت نیستند.[۳۰،۳۱]

۲-۱ نام‌گذاری آنتی‌بادی‌های علیه گیرنده TSH

اصطلاحات مختلفی برای توصیف آنتی‌بادی‌ها علیه گیرنده TSH به کار رفته است و اهمیت این موضوع از آنجاست که نام‌گذاری انواع مختلف این آنتی‌بادی ها، نشانگر روش سنجشی است که در آزمایشگاه مورد استفاده قرار می‌گیرد (جدول ۱).

i -Anti-thyroid peroxidase
ii- Anti-Thyroglobulin

جدول ۱- نام‌گذاری آنتی‌بادی‌های علیه گیرنده TSH در روش زیست‌سنجی مبتنی بر سلول و روش اتصال رقابتی[۲۵]

	Abbreviation
Cell-based bioassay	
• TSH-R stimulation antibodies	TSAb
• TSH-R stimulating immunoglobulins	TSI
• TSH-R blocking antibodies	TBAb,TSB-Ab,TRB-Ab
• TSH-R blocking immunoglobulins	TBI
Competitive-binding assay	
• TSH-R autoantibodies	TRAb
• TSH-R binding inhibitory immunoglobulins	TBII

به طور خلاصه هر نوع آنتی‌بادی که به طور خاص به گیرنده TSH اتصال می‌یابد، TRAbs نامیده می‌شود و از آن جایی که انواع این آنتی‌بادی‌ها بدون در نظر گرفتن نوع عملکرد، در یک روش اتصال رقابتی مورد ارزیابی قرار می‌گیرند، به آن‌ها TBII[iii] نیز گفته می‌شود. از سوی دیگر این آنتی‌بادی‌ها در روش‌های زیست‌سنجش مبتنی بر سلول بسته به نوع عملکرد، به شکل آنتی‌بادی‌های تحریک‌کننده گیرنده هورمون تیروئید (TSAbs) یا ایمونوگلوبین‌های تحریک‌کننده گیرنده هورمون تیروئید[iv] (TSI)، آنتی‌بادی‌های مسدودکننده گیرنده هورمون تیروئید (TBAbs، TRBAb، TSB-Abs) یا ایمونوگلوبین‌های مسدودکننده گیرنده هورمون تیروئید[v] (TBI) نیز نام‌گذاری می‌شوند.[۳۲]

۲- ۲ تفاوت عملکردی انواع آنتی‌بادی علیه گیرنده TSH

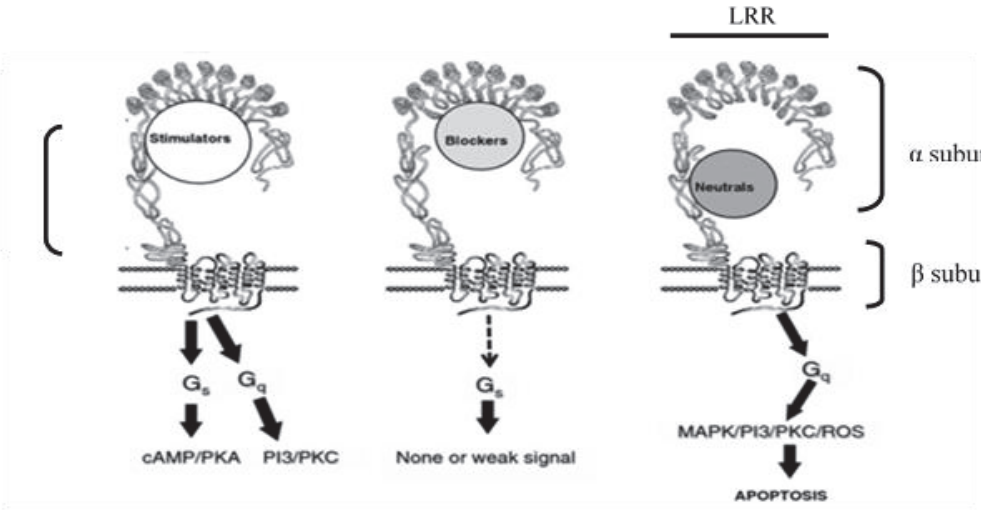
ایمونوگلوبین‌های تحریک‌کننده گیرنده هورمون تیروئید (TSI)، به اپی‌توپ‌های وابسته به آرایش فضایی[vi] واقع در ناحیه LRR و قسمت کوچکی از ناحیه لولا در زیر واحد α درقسمت N ترمینال TSH-R (اسید آمینه ۱۶۵-۹) اتصال می‌یابند (شکل ۲).[۱۵] اتصال این آنتی‌بادی‌ها، اتصال TSHرا شبیه‌سازی می‌کنند و از آنجایی که میل اتصال آن‌ها به گیرنده بسیار زیاد است باعث افزایش غلظت cAMP در سلول‌های فولیکولار تیروئید و افزایش اثرات بیولوژیک TSH می‌شوند.[۳۳] از سوی دیگرایمونوگلوبین‌های

iii- TSH-R-binding inhibitory immunoglobulin
iv- TSH-R-stimulating immunoglobulin
v -TSH-R-blocking immunoglobulin
vi -Conformational epitope

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.3.0]

مسدودکننده گیرنده هورمون تیروئید (TBI) به اپی‌توپ‌های وابسته به آرایش فضایی و اپی توپ‌های وابسته به توالی[i] در ناحیه C- ترمینال زیر واحد α و N ترمینال زیر واحد β (اسید امینه ۴۱۵-۲۱۶) اتصال می‌یابند.[۱۰] این آنتی‌بادی‌ها باعث جلوگیری از اتصال هورمون به گیرنده و در نتیجه کاهش اثرات بیولوژیک هورمون TSH و کاهش غلظت cAMP می‌شوند.[۱۱]

آنتی‌بادی‌های خنثی به اپی‌توپ‌های وابسته به توالی واقع در منطقه N ترمینال گیرنده (اسید آمینه ۳۶۵-۳۱۵) اتصال می‌یابند. این آنتی‌بادی‌ها عملکرد سلول تیروئید را تحت تأثیر قرار نمی‌دهند چون اپی‌توپ‌های آن‌ها خارج از محل اتصال TSH هستند و نمی‌توانند اتصال TSH به گیرنده را مسدود کنند.[۱۰]

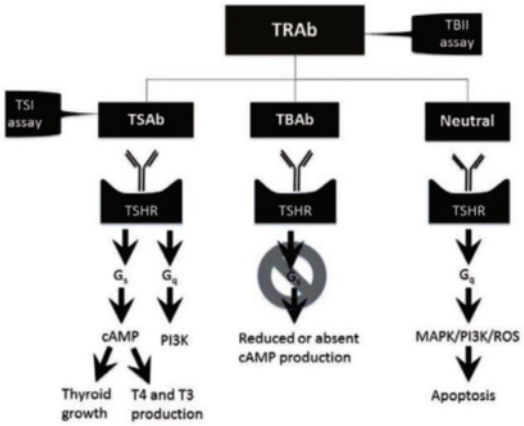


شکل ۲- آنتی‌بادی‌های TSAbs و TBAbs هردو دارای اپی‌توپ‌های مشترک هم‌پوشان با محل اتصال TSH به گیرنده هستند. محل اتصال آنتی‌بادی‌های خنثی خارج از محل اتصال TSHبه گیرنده است.[۱۵]

۳-آزمون‌های تشخیصی آنتی‌بادی علیه گیرنده تیروئید

۳-۱ آزمون‌های غیر وابسته به عملکرد آنتی‌بادی[ii]

این آزمون‌ها بر مبنای سنجش ایمنی استوار است و به روش اتصال رقابتی انجام می‌شود. در اوایل دهه ۱۹۸۰، برای اولین بار، بر اساس این یافته‌ها: ۱) ایمونوگلوبولین‌های موجود در سرم بیماران مبتلا به بیماری گریوز، می‌توانند مانع از اتصال TSH نشاندار شده با رادیوایزوتوپ‌ها به غشای سلول‌های تیروئیدی انسانی و خوکی شوند. ۲) گیرنده‌های محلول انسانی و خوکی پاسخ یکسان به تیروتروپین انسانی نشان می‌دهند، روش اتصال رقابتی مطرح گردید. با گذر زمان استفاده از گیرنده‌های گونه‌ها و بافت‌های مختلف، تغییر منبع آنتی‌ژنی، روش‌های شستشو، ردیاب و غیره باعث توسعه این روش گردیده است.[۱۰] این روش‌ها مبتنی بر توانایی TRAbs در سرم بیماران در رقابت و جلوگیری از اتصال لیگاند TSH-R (TSH یا آنتی‌بادی مونوکلونال علیه TSHR) به TSH-R است.[۲۸] از آنجایی که آنتی‌بادی‌های علیه گیرنده TSH از نوع TSI و TBI هر دو دارای اپی‌توپ‌های مشترک هم‌پوشان با محل اتصال TSH به گیرنده هستند (شکل ۳)، به همین دلیل ***این آنتی‌بادی‌ها با روش‌های اتصال رقابتی قابل تمایز از یکدیگر*** *نیستند* و در این روش اتوآنتی‌بادی‌ها، فارغ از عملکرد مورد سنجش قرار می‌گیرند. تا کنون سه نسل از آزمون‌های مبتنی بر روش اتصال رقابتی در تشخیص سرولوژیکی بیماری گریوز مورد استفاده قرار گرفته است[۸] (جدول ۲).



شکل ۳- انواع اتو آنتی‌بادی‌های علیه گیرنده TSH بر اساس نوع عملکرد. اتوآنتی‌بادی‌ها با نام کلی TRAbs به سه دسته آنتی‌بادی‌های تحریک‌کننده (TSAbs)، مسدودکننده (TBAbs) و آنتی‌بادی‌های خنثی(Neutral Abs) تقسیم می‌شوند.[۲۶]

i- Sequential epitope
ii-Non-functional assays

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.3.0]

جدول ۲ -خلاصه روش‌های سنجش ایمنی برای سنجش اتوآنتی‌بادی‌ها علیه TSH-R[۱۵]

منبع TSH-R	نشانگر	مدت زمان آزمون	بازه زمانی
نسل اول (فاز مایع)			
عصاره غشای تیروئید خوکی	TSH گاوی نشانه‌گذاری شده با I	چند روز	۱۹۹۵-۱۹۸۲
عصاره غشای تیروئید انسانی	TSHگاوی نشانه‌گذاری شده با آنزیم	چند روز	۱۹۹۹-۱۹۹۵
نسل دوم (فاز جامد)			
TSH-Rخوکی تثبیت شده در فاز جامد	TS گاوی نشانه‌گذاری شده با آنزیم	چند ساعت	۲۰۱۲-۱۹۹۹
TSH-R انسانی نوترکیب تثبیت شده در فاز جامد	پراکسیداز متصل به کمپلکس بیوتین- استرپتاویدین استر اکرینیدیوم،I ^{125}	چند ساعت	۲۰۱۲-۱۹۹۹
نسل سوم (آنتی‌بادی منوکلونال M22)			
TSH-R خوکی	M22 متصل به بیوتین-اویدین- پراکسیداز	چند ساعت (بیشتر دستی)	۲۰۱۲-۲۰۰۴
TSH-R خوکی	M22 متصل به روتنیوم	چند دقیقه (کاملاً اتوماتیک)	۲۰۱۲-۲۰۰۸

۳-۱-۱ نسل اول

نسل اول مبتنی بر ممانعت TRAbs از اتصال TSH نشاندار شده به گیرنده TSH موجود در فاز مایع یعنی عصاره غشای تیروئید خوکی است.[۸،۳۴] بر اساس اینکه این نشاندارسازی توسط رادیو ایزوتوپ‌ها و یا توسط آنزیم صورت گرفته باشد به ترتیب از سنجش ایمنی رادیواکتیویته[i] (RIA) و یا سنجش ایمنی آنزیمی[ii] (EIA) استفاده می‌شود. در بازه سال‌های ۱۹۸۲ تا ۱۹۹۹ از منابع متفاوت TSHR شامل گیرنده‌های خوکی و انسانی نوترکیب و TSH نشانه‌گزاری شده با نشانگرهای متفاوت شامل I ^{125}و آنزیم‌های گاوی استفاده شده است. این نسل از آزمون‌ها با وجود ویژگی[iii] بالا، از حساسیت[iv] تشخیصی و تکرارپذیری خوبی برخوردار نبودند و به منظور افزایش حساسیت آزمون‌های تشخیصی TRAb، در اواخر دهه ۱۹۹۰ نسل دوم این آزمون‌ها در دسترس قرار گرفت [۱۵]

۳-۱-۲ نسل دوم

نسل دوم مبتنی بر ممانعت TRAbs از اتصال TSH نشاندار شده به گیرنده TSH تثبیت شده در فاز جامد است که جایگزینی فاز جامد به جای فاز مایع سبب سهولت و افزایش دقت شده است.[۸،۳۴] با تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، تثبیت گیرنده TSH در سطوح از جنس پلاستیک (پلیت‌های الایزا) ممکن گردید و در این نسل، گیرنده TSH خوکی و یا انسانی نوترکیب تثبیت شده در سطح جامد، TSH گاوی نشاندار شده با نشانگرهای متفاوت رادیو اکتیوی یا آنزیمی شامل I ^{125}، استر اکرینیدیوم و پراکسیداز متصل به کمپلکس بیوتین-استرپتاویدین[v] مورد استفاده قرار گرفت. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که حساسیت بالینی این سنجش‌ها نسبت به نسل اول کمی افزایش یافته است درحالی که ویژگی با کاهش مواجه شده است.[۱۵،۳۵]

۳-۱-۳ نسل سوم

در نسل سوم که در سال ۲۰۰۴ به دنبال تولید آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی محرک گیرنده TSH (M22) از لنفوسیت بیماران مبتلا به بیماری گریوز معرفی گردید، آنتی‌بادی مونوکلونال نشاندار شده با پراکسیداز متصل به کمپلکس اویدین-بیوتین[vi] یا آنتی‌بادی مونوکلونال نشاندار شده با روتنیوم جایگزین TSH گاوی نشانه‌گزاری شده مورد استفاده در نسل دوم گردید. هدف از این جایگزینی افزایش حساسیت بود زیراکه M22 و TRAb موجود در سرم بیماران به اپی‌توپ‌های یکسانی از گیرنده TSH متصل می‌شوند.[۳۴] به بیان دیگر این روش به دو صورت قابل انجام است: روش مستقیم (direct) که M22 مستقیماً به نشانگراتصال می‌یابد و روش غیر مستقیم (indirect) که در این روش M22 به بیوتین اتصال می‌یابد و سپس کمپلکس اویدین-پراکسیداز و سوبسترای تترامتیل بنزین به محیط افزوده می گردد.[۳۵] روش‌های مبتنی بر آنتی‌بادی مونوکلونال

i -Radioimmunoassay
ii -Enzyme immunoassay
iii -Specificity
iv -Sensitivity
v -Biotin-streptavidin peroxidase
vi -Avidin-biotin peroxidase

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.3.0]

M22 ابتدا به صورت دستی انجام می‌شد اما از آنجایی که روش‌های دستی ماهیتاً حساسیت و دقت پایینی دارند به تدریج روش‌های اتوماتیک جایگزین روش‌های دستی شد.[۲۷] درحال حاضر روش‌های اتوماتیک براساس ایمنی‌سنجی الکتروشیمیایی لومینوسانس[i] (ECLIA) توسط شرکت‌های مختلف مانند Roche Diagnostics و Thermo Fischer طراحی، ساخت و روانه بازار شده است.[٤]

۳-۲ آزمون‌های وابسته به عملکرد آنتی‌بادی[ii]

باوجود اینکه با پیشرفت نسل‌های مختلف آزمون‌های مبتنی بر سنجش ایمنی، ویژگی و حساسیت آزمون‌ها به میزان قابل قبولی افزایش یافت، اما عدم توانایی این آزمون‌ها در تمایز بین TSI و TBI و در نتیجه ناتوانی در تعیین فنوتیپ بیماری گریوز و توضیح علت عدم ارتباط بین سطح TRAb اندازه‌گیری شده با این آزمون‌ها و شدت بالینی و بیو شیمیایی بیماری، محدودیت مهم این آزمون‌هاست. در مقابل آزمون‌های وابسته به عملکرد آنتی‌بادی قادر به تمایز بین TSI و TBI هستند و به روش زیست‌سنجشی مبتنی بر سلول انجام می‌شوند (جدول ۳).[۳]

جدول۳- خلاصه روش‌های زیست‌سنجی مبتنی بر سلول برای سنجش عملکردی اتوآنتی‌بادی‌ها علیه TSH-R [۱۵،۳۸]

منبع TSH-R	اساس سنجش	آنالیت	زمان آزمون	بازه زمانی
نسل اول (استفاده از مدل‌های حیوانی)				
خوک	IT3,T4 [۱۳۱]	LATS	چند هفته	۱۹۵٦
موش	IT3,T4 [۱۳۱]	LATS	چند روز	۱۹۵۸
نسل دوم (استفاده از سلول‌های بیان‌کننده TSH-R)				
سلول‌های تیروئیدی موش	IT3,T4 [۱۳۱]	LATS	چند هفته	۱۹٦۷
سلول‌های تیروئیدی خوک	cAMP (ایمنی‌سنجی پرتوی)	LATS	چند روز	۱۹۷۳-۱۹۷۵
سلول‌های تیروئیدی انسان	cAMP (ایمنی‌سنجی پرتوی)	TSAb	٤ روز	۱۹۷۳-۱۹۸۸
سل لاین FRTL-5	cAMP (ایمنی‌سنجی پرتوی)	TSAb	۳ روز	۱۹۸۳-۱۹۹٤
سل لاین TSH-R + CHO انسانی	cAMP (ایمنی‌سنجی پرتوی)	TSAb	٤-۲ روز (JP09، JP14، JP26، JP28، JP209) ۲۰ ساعت (K1)	۱۹۹٤۰-۱۹۹۸
نسل سوم (استفاده از سل لاین CHO ترنسفورم شده با پلاسمید حاوی ژن لوسیفراز)				
سل لاین TSH-R +CHO انسانی	cAMP (لوسیفراز)	TSAb	۲٦-۲٤ ساعت	۱۹۹۸-۲۰۰٦
سل لاین Mc1+2 + CHO	cAMP (لوسیفراز)	TSAb	۲۰ ساعت	۲۰۰٦-۲۰۱۰
سل لاین Mc2 + CHO	cAMP (لوسیفراز)	TSAb	۲۰ ساعت	۲۰۰٦-۲۰۱۰
سل لاین Mc4 + CHO	cAMP (لوسیفراز)	TSAb	۲۰ ساعت	۲۰۰٦-۲۰۱۰

۳-۲-۱ آزمون‌های زیست‌سنجشی مبتنی برسلول

بر خلاف روش اتصال رقابتی، روش‌های مبتنی بر سلول بر پایه استفاده از سلول‌های زنده برای ارزیابی عملکرد اتوآنتی‌بادی‌ها و تشخیص افتراقی TSI و TBI بر اساس افزایش و کاهش cAMP در سلول استوار است[٤] پس از کشف عامل بیماری گریوز و ماهیت ایمونوگلوبولینی آن (LATS)[iii] در سال ۱۹۵٦،[۳٦] تا اوایل دهه ۱۹۷۰ تنها از روش‌های درون تنی[iv] برای ارزیابی وجود آنتی‌بادی بر علیه گیرنده TSH استفاده می‌شد. این روش‌ها به علت پرزحمت و وقت‌گیر بودن برای استفاده رایج تشخیصی مناسب نبود و به مرور زمان براساس پیشرفت فناوری، سه نسل (جدول ۳) از آزمون‌های مبتنی بر سلول پا به عرصه ظهور گذاشت.[۱۵]

۳-۲-۱-۱ نسل اول

درنسل اول از روش‌های زیست‌سنجشی مبتنی بر سلول از مدل‌های حیوانی (ابتدا خوک و سپس موش) که تحت رژیم غذایی بدون ید جهت مهار TSH درون‌زا، استفاده شد. به این

i-Electro-chemiluminescent immunoassays
ii-Functional assays
iii-Long-acting thyroid stimulator
iv-In vivo

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.3.0]

مدل‌های حیوانی تیروکسین و I^{131} تزریق شد و در فواصل زمانی منظم، ۲ تا ۲٤ ساعت پس از تزریق داخل وریدی سرم بیمار، میزان $IT3,T4^{131}$ اندازه‌گیری گردید و ارتباط مستقیمی بین سطح LATS در سرم و بزرگی و افزایش فعالیت غده تیروئید در بیماران مبتلا به گریوز مشاهده شد.[۳۷]

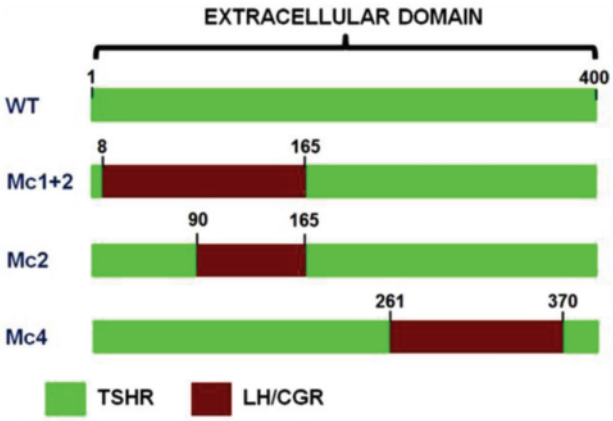
۳-۲-۱-۲ نسل دوم

در نسل دوم از آزمون‌های زیست‌سنجشی مبتنی بر سلول، به کارگیری سلول‌های بیان کننده گیرنده TSH، جایگزین استفاده از مدل‌های حیوانی گردید.[۱۵] در این آزمون‌ها از دو گونه سلول استفاده می شود: الف) سلول‌هایی که ذاتا توانایی بیان گیرنده‌ی TSH را دارا هستند، شامل سلول‌های کشت داده شده تیروئید موش، خوک، انسان و سل لاین تیروئید موش صحرایی (FRTL-5) که با وجود کشت‌های مکرر خصوصیات سلول‌های تیروئید نرمال را حفظ می‌کنند. ب) سلول‌هایی که با دستکاری ژنتیک توانایی بیان گیرنده‌ی TSH را کسب کرده‌اند؛ همچون سلول‌های تخمدان همستر چینی[i] (CHO) ترنسفکت شده با TSH-R انسانی، بیان‌کننده TSH-R نوترکیب حاصل از کلونینگ TSH-R انسانی هستند.[۳۸] انواع مختلف این سل لاین (JP09، JP14، JP26، JP28، JP209، k1) از نظر تعداد گیرنده TSH که در هر سلول بیان می‌شود با هم متفاوت هستند.[۳۹] اساس سنجش مقدار آنتی‌بادی در این آزمون‌ها اندازه‌گیری میزان تولید cAMP پس از انکوبه کردن سرم بیمار با سلول‌های سل لاین مورد نظر از طریق سنجش ایمنی پرتوی و ایمنی سنجی نورافشانی شیمیایی[ii] است.[۳]

۳-۲-۱-۳ نسل سوم

در نسل سوم از روش‌های زیست‌سنجی مبتنی بر سلول، از سلول های CHO ترنسفورم شده که حاوی ژن لوسیفراز کنترل شونده عناصر پاسخ‌دهنده به cAMP بود. هم‌چنین با پیشرفت تکنولوژی DNA نوترکیب، زمینه ساخت گیرنده‌های کایمریک فراهم شد و سه نوع گیرنده کایمریک TSHR–LH/CGR[iii] با نام Mc1+ 2 ، Mc2 و Mc4 سنتز و راهی نو در پیشرفت آزمون‌های زیست سنجی گشوده شد (شکل ٤). در راستای استفاده بالینی از آزمون‌های زیست سنجی مبتنی بر گیرنده‌های کایمریک در نسل سوم علاوه بر سل لاین CHO ترنسفکت شده با TSHR انسانی و ژن لوسیفراز، در ابتدا از سل لاین CHO ترنسفکت شده با ژن لوسیفراز و گیرنده‌های کایمریک Mc1 + 2 ، Mc2 استفاده شد که Mc1+ 2 و Mc2 هر دو فاقد محل اتصال TSI هستند (جدول٤).

مشاهدات نشان داد که TSI موجود در سرم ۳۰٪ از بیماران مبتلا به گریوز می‌توانست گیرنده‌های Mc1+ 2 و یا Mc2 را فعال نماید و این بیماران که محل اتصال TSI به گیرنده ناهمگن[iv] دارند، پاسخ به درمان بهتری دارند و این یافته برای پیش‌بینی نتایج بالینی درمان مورد استفاده قرار گرفت.[۳۸]



شکل۴- نمای شماتیک بخش خارج سلولی سه رسپتور کایمریک Mc1+2، Mc2 و Mc4 در مقایسه با TSH-R انسانی. قسمت‌های جایگزین شده توسط LH/CGR موشی با رنگ قرمز نمایش داده شده است. اعداد نشانگر جایگاه اسید آمینه در مقایسه با اسید آمینه متیونین آغازین است.[۳۸]

جدول۴- سه نوع گیرنده کایمریک TSHR–LH/CGR

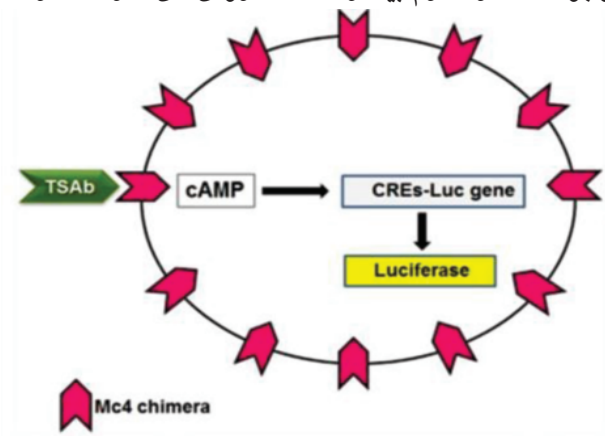
Receptor/chimera	TSH binding	TSAb binding	TBAb binding
TSHR wide-type	+	+	+
Mc1+2	+	-	+
Mc2	+	-	+
Mc4	+	+	–

در گام بعدی با هدف طراحی روش زیست‌سنجی برای سنجش میزان TSI و حذف تداخلTBI، سل لاین CHO ترنسفورم شده با ژن لوسیفراز با گیرنده کایمریک Mc4 که دارای محل اتصال TSI و فاقد محل اتصال TBI (جدول٤) است ترنسفکت گردید (شکل٥). در این روش ($Thyretain^{TM}$)، TSIدر صورت وجود در سرم بیمار، به گیرنده Mc4 در سطح سلول اتصال می‌یابد و تولید cAMP داخل سلولی و سپس بیان ژن لوسیفراز افزایش می‌یابد. سپس پس از لیز

i -Chinese hamster ovary
ii -Chemiluminescent Immonoassay
iii - Human TSHR–rat Luteinizing Hormone/chorionic Gonadotropin Receptor
iv -Heterogeneous TSI Binding Site

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-04]
[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.3.0]

سلولی، مقدار لوسیفراز با نورسنج اندازه‌گیری و در صورت افزایش معنی‌دار نسبت به کنترل، وجود TSI در سرم بیمار تأیید می‌گردد. حساسیت و ویژگی این روش نسبت به دیگر روش‌های ذکر شده از مقادیر بالاتری برخوردار است.[۱۵،۳۸]



شکل ۵- روش زیست‌سنجی مبتنی بر سلول با استفاده از رسپتور کایمریک Mc4. در این روش سل لاین‌های فاقد TSH-R با رسپتور کایمریک Mc4 و ژن لوسیفرازی که رونویسی آن تحت کنترل عناصر پاسخ‌دهنده به cAMP است، ترنسفکت گردید. در صورت وجود TSAbدر سرم بیمار، به گیرنده Mc4 اتصال می‌یابد و تولید cAMP داخل سلولی وسپس بیان ژن لوسیفراز افزایش می‌یابد.[۳۸]

۴-مقایسه آزمون‌های مبتنی بر سنجش ایمنی و آزمون‌های زیست‌سنجشی مبتنی برسلول

مزایا و معایب آزمون‌های مبتنی بر سنجش ایمنی و آزمون‌های زیست‌سنجشی مبتنی برسلول در جدول ۵ و حساسیت و ویژگی آزمون‌های مهم هر روش در جدول ٦ با هم مقایسه شده است.

جدول ۵- مقایسه روش ایمنی‌سنجی و زیست‌سنجی مبتنی بر سلول

روش	ایمنی‌سنجی	زیست‌سنجی مبتنی بر سلول
مزایا	تجاری سازی شده و دسترسی آسان	تمایز تشخیصی بین TBAb وTSAb
	ارزان بودن	
	سهولت کاربرد	
	حساسیت قابل قبول	
معایب	عدم تمایز تشخیصی بین TBAb وTSAb	گرانی
	عدم وجود ارتباط قطعی بین آزمون و فنوتیپ بیماری	پیچیدگی روش
	عدم وجود ارتباط بین آزمون و وخامت بیماری	وقت‌گیر بودن روش

جدول ۶- مقایسه بین حساسیت و ویژگی نسل‌های دوم وسوم از روش ایمنی‌زیستی و روش زیست‌سنجی مبتنی بر سلول

		حساسیت (٪)	ویژگی (٪)
روش زیست‌سنجی مبتنی بر سلول	سل لاین Mc4 +CHO	۱۰۰	۹۸/۵
	سل لاین TSH-R +CHO انسانی	۹۷/۳	۹۳/۱
روش ایمنی‌زیستی	فاز جامد	۸٦/۵	۹۷
	آنتی‌بادی مونوکلونال M22	۹۷/٤	۹۹/۲

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.3.0]

نتیجه‌گیری

با وجود در دسترس بودن روش‌های بسیار کارآمد خودکار، مبتنی بر سنجش ایمنی مانند ECLIA با حساسیت و ویژگی بیشتر از ۹۸ درصد برای TRAbs به عنوان مهم‌ترین اتوآنتی‌بادی با نقش اساسی در پاتوژنز پرکاری تیروئید اتوایمیون یا بیماری گریوز،[۴] اما همچنان از آنجایی که TSAbs و TBAbs هر دو دارای اپی‌توپ‌های مشترک هم‌پوشان با محل اتصال TSH به گیرنده هستند، این روش‌ها هنوز توانایی تشخیص افتراقی TSAbs و TSAbs را ندارند.[۸]

این در حالی است که روش‌های زیست‌سنجی مبتنی بر سلول مانند Thyretain ™ که درآن با استفاده از سل لاین CHO ترنسفورم شده با ژن لوسیفراز و ترنسفکت شده با گیرنده کایمریک Mc4 که دارای محل اتصال TSAbs و فاقد محل اتصال TSAbs است، با حساسیت و ویژگی بیشتر از ۹۸ درصد توانایی تشخیص افتراقی TSAbs و TSAbs را دارند و برای تشخیص پرکاری و کم‌کاری اتو ایمیون تیروئید بر آزمون‌های مبتنی بر سنجش ایمنی برتری دارند.[۳۸] در نتیجه استفاده از روش‌های زیست‌سنجی مبتنی بر سلول امکان بررسی اتو آنتی‌بادی‌ها بر اساس عملکرد تحریک‌کننده یا مسدودکننده را در بیماران مبتلا به افتالموپاتی و درماتوپاتی گریوز و بیماری هاشیموتو به پزشک می‌دهد و علاوه بر این پزشک می‌تواند تصمیمات بهتری در مورد از سوی دیگر با توجه به اینکه در بیماران مبتلا به بیماری‌های خود ایمنی تیروئید، کلون‌های لنفوسیت B ترشح‌کننده TSAbs و TSAbs هر دو فعال می‌گردد،[۴] تمایز آنتی‌بادی‌های فعال‌کننده از آنتی‌بادی مسدودکننده با روش‌های ایمنی‌سنجی فاز جامد فعلی غیرقابل تحقق است.[۱۵] بنابر این تاکنون تلاش برای تمایز آنتی‌بادی‌ها بر اساس عملکرد، با استفاده از روش‌های ایمنی سنجی ناموفق بوده و هرگونه گزارش آزمایشگاهی در این زمینه کاملاً اشتباه است.[۴]

پرکاری تیروئید نوزادان در بارداری‌ها بگیرد.[۳] در آینده استفاده از فناوری‌های نوینی مانند نانوتکنولوژی، میکرو ربات‌ها و شبیه‌سازی‌های رایانه ایی نیروهای دخیل در اتصال گیرنده به پروتئین G و مکانیزم‌های فعال‌سازی یا مهار مسیرهای انتقال پیامcAMP، ممکن است فناوری‌های نوینی را در دسترس بشر قرار دهد ولی تا زمان دسترسی به این فناوری‌ها پیش‌بینی می‌شود روش‌های زیست‌سنجی مبتنی بر سلول‌های ترنسفکت شده با گیرنده‌های کایمریک به عنوان استاندارد طلایی تمایز آنتی‌بادی‌های علیهTSH-R بر اساس عملکرد باقی بماند و همچنان به عنوان بخشی جدایی‌ناپذیر در تشخیص و تعیین اقدامات بالینی بیماری‌های خود ایمنی تیروئید باشد.[۴۰،۴۱،۴]

References

1. Hedayati M, Jahromi MS, Yeganeh MZ, Danesh- MS, Rad LH, Azizi F. Association between serum level of anti-TPO titer and polymorphisms G1193/C Exon 8 and C2145/T Exon 12 of thyroid peroxidase gene in an Iranian population. International Journal Of Endocrinology And Metabolism 2010; 8: 64-7.
2. Jorgensen GH, Ornolfsson AE, Johannesson A, Gudm undsson S, Janzi M, Wang N, et al. Association of immunoglobulin A deficiency and elevated thyrotropin-receptor autoantibodies in two Nordic countries. Hum Immunol 2011; 72: 166-72.
3. Bucci I, Giuliani C, Napolitano G. Thyroid-stimulating hormone receptor antibodies in pregnancy: Clinical relevance. Front Endocrinol (Lausanne)2017; 8(JUN): 1-11.
4. Lytton SD, Schlüter A, Banga PJ. Functional diagnostics for thyrotropin hormone receptor autoantibodies: bioa ssays prevail over binding assays. Front Biosci - Landmark 2018; 23: 2028-43.
5. Azizi F, Amouzegar A, Tohidi M, Hedayati M, Cher aghi L, Mehrabi Y. Systemic thyroid hormone status in treated Graves' disease. Int J Endocrinol Metab 2019; 17: 95385
6. Furmaniak J, Sanders J. Blocking type TSH receptor antibodies 2013; 4: 11-26.
7. Tozzoli R, Bagnasco M, Giavarina D, Bizzaro N. TSH receptor autoantibody immunoassay in patients with Graves' disease: Improvement of diagnostic accuracy over different generations of methods. Systematic rev iew and meta-analysis. Autoimmun Rev 2012; 12: 107-13.
8. Roggenbuck JJ, Veiczi M, Conrad K, Schierack P, Wunderlich G, Kotzerke J, et al. A novel third-gene ration TSH receptor antibody (TRAb) enzyme-linked immunosorbent assay based on a murine monoclonal TSH receptor-binding antibody. Immunol Res 2018; 66: 768-76.
9. Fröhlich E, Wahl R. Thyroid autoimmunity: Role of anti-thyroid antibodies in thyroid and extra-thyroidal diseases. Front Immunol 2017; 8: 521.
10. Ordookhani A, Mirmiran P, Najafi R, Hedayati M, Azizi F. Congenital hypothyroidism in Iran. Indian J Pediatr 2003; 70: 625-8.
11. Michalek K, Morshed SA, Latif R, Davies TF. TSH receptor autoantibodies. Autoimmun Rev 2009; 9: 113-6.
12. Quast RB, Margeat E. Studying GPCR conformational dynamics by single molecule fluorescence. Mol Cell Endocrinol 2019; 493: 110469.
13. Shakiba E, Movahedi M, Majd A, Hedayati M. Inve stigating the expression and promoter methylation of RET gene in patients with medullary thyroid cancer with unmutated RET. J Cell Physiol 2019; 234: 16304-11.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.3.0]

14. Katritch V, Fenalti G, Abola EE, Roth BL, Cherezov V, Stevens RC. Allosteric sodium in class A GPCR signaling. Trends Biochem Sci 2014; 39: 233-44.
15. Tozzoli R, Bagnasco M, Villalta D. Chapter 45– Thyrotropin Receptor Antibodies. Third Edit. Elsevier; 2014. doi:10.1016/B978-0-444-56378-1.00045-9
16. Chen CR, Salazar LM, McLachlan SM, Rapoport B. Novel information on the epitope of an inverse agonist monoclonal antibody provides insight into the structure of the TSH receptor. PLoS One 2012; 7.
17. Kleinau G, Jaeschke H, Worth CL, et al. Principles and Determinants of G-Protein Coupling by the Rhodopsin-Like Thyrotropin Receptor. PLoS One 2010; 5: 1-10.
18. Sandhu M, Touma AM, Dysthe M, Sadler F, Sivaramakrishnan S, Vaidehi N. Conformational plasticity of the intracellular cavity of GPCR−G-protein complexes leads to G-protein promiscuity and selectivity. Proc Natl Acad Sci U S A 2019; 116: 11956-65.
19. Eps N Van, Altenbach C, Caro LN, Latorraca NR, Hollingsworth SA. G i - and G s -coupled GPCRs show different modes of G-protein binding 2018; 115: 2383-8.
20. Teama SH, Agwa SHA, Fawzy A, Sayed MM, Ibrahim WA, Eid YM. Molecular detection of circulating thyroid specific transcripts (TSHR/Tg-mRNAs) in thyroid cancer patients: Their diagnostic significance. Egypt J Med Hum Genet 2011; 12: 201-9.
21. Seyedabadi M, Ghahremani MH, Albert PR. Biased signaling of G protein coupled receptors (GPCRs): Molecular determinants of GPCR/transducer selectivity and therapeutic potential. Pharmacol Ther 2019; 200: 148-78.
22. Urano D, Jones JC, Wang H, Matthews M, Bradford W, Bennetzen J, et al. G protein activation without a GEF in the plant kingdom. PLoS Genet 2012; 8.
23. Hinrichs MV, Torrejón M, Montecino M, Olate J. Ric-8: Different cellular roles for a heterotrimeric G-protein GEF. J Cell Biochem 2012; 113: 2797-805.
24. Rivas M, Santisteban P. TSH-activated signaling pathw ays in thyroid tumorigenesis. Mol Cell Endocrinol 2003; 213: 31-45.
25. Giovanna M, Marta EF. Best Practice and Research Clinical Endocrinology & Metabolism Multiple hor mone resistance and alterations of GPCRs signaling. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2018: 1-14.
26. Gozu HI, Lublinghoff J, Bircan R, Paschke R. Genetics and phenomics of inherited and sporadic non-autoimmune hyperthyroidism. Mol Cell Endocrinol 2010; 322: 125-34.
27. Tozzoli R, Kodermaz G, Villalta D, Bagnasco M, Pesce G, Bizzaro N. Accuracy of receptor-based methods for detection of thyrotropin-receptor autoantibodies: A new automated third-generation immunoassay shows higher analytical and clinical sensitivity for the differential diagnosis of hyperthyroidism. Autoimmun Highlights 2010; 1: 95-100.
28. Kotwal A. Thyrotropin Receptor Antibodies-An Over view. 2018.
29. Braverman LE, Brown RS. and Graves ' Disease. Am J Med Sci 299: 291-7.
30. Ã RHS. Autoimmune Hypothyroidism and Hyperthyroidism in Systemic Autoimmune Disease. 2008; 9:199-210.
31. Daneshpour MS, Hedayati M, Sedaghati-Khayat B, Guity K, Zarkesh M, Akbarzadeh M, et al. Genetic Identification for Non-Communicable Disease: Findings from 20 Years of the Tehran Lipid and Glucose Study. Int J Endocrinol Metab 2018; 16: 84744.
32. Kahaly GJ. Bioassays for TSH Receptor Antibodies: Quo Vadis? Eur Thyroid J 2015; 4: 3-5.
33. Kamath C, Adlan MA, Premawardhana LD. The role of thyrotrophin receptor antibody assays in Graves' disease. J Thyroid Res 2012; 2012.
34. Barbesino G, Tomer Y. Clinical utility of TSH receptor antibodies. J Clin Endocrinol Metab 2013; 98: 2247-55.
35. Zöphel K, Roggenbuck D, Schott M. Clinical review about TRAb assay's history. Autoimmun Rev 2010; 9: 695-700.
36. Lytton SD, Kahaly GJ. Bioassays for TSH-receptor auto antibodies: An update. Autoimmun Rev 2010; 10: 116-22.
37. Yasunori Ozawa, Rui M. Relationships among Immunoglobulin Markers in Graves' Disease: Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2015; 48: 381-7.
38. Giuliani C, Saji M, Bucci I, Napolitano G. Bioassays for TSH receptor autoantibodies, from FRTL-5 cells to TSH receptor-LH/CG receptor chimeras: The contribution of Leonard D. Kohn. Front Endocrinol (Lausanne) 2016; 7: 1-10.
39. Wallaschofski H, Paschke R. Detection of thyroid stimulating (TSAB)- and thyrotropin stimulation block ing (TSBAB) antibodies with CHO cell lines expressing different TSH- receptor numbers. Clin Endocrinol (Oxf) 1999; 50: 365-72.
40. Pakizehkar S, Ranji N, Sohi AN, Sadeghizadeh M. Polymersome-assisted delivery of curcumin: A suitable approach to decrease cancer stemness markers and regulate miRNAs expression in HT29 colorectal cancer cells. Polym Adv Technol November 2019: pat.4759.
41. Hossainzadeh S, Ranji N, Naderi Sohi A, Najafi F. Silib inin encapsulation in polymersome: A promising ant icancer nanoparticle for inducing apoptosis and decre asing the expression level of miR-125b/miR-182 in human breast cancer cells. J Cell Physiol 2019: jcp.28795.

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.3.0]

Original Article

Measurement Technologies of Thyrotropin-Receptor Antibodies from the Past until Present

Pakizehkar S, Hosseinzadeh S, Hedayati M

Cellular and Molecular Endocrine Research Center (CMERC), Research Institute for Endocrine Sciences of Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

e-mail: hedayati@endocrine.ac.ir

Received: 05/05/2020 **Accepted**: 03/08/2020

Abstract

Introduction: Thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR) autoantibodies are the main cause of Graves' disease and its thyroid manifestations, such as ophthalmopathy and dermopathy. These antibodies, commonly known as TSH receptor antibodies (TRAbs), are functionally different. TRAbs are a set of autoantibodies, including thyroid-stimulating autoantibodies (TSAbs), thyroid stimulating-blocking antibodies (TBAbs), and neutral antibodies. The measurement of TRAbs is clinically important, and various commercial tests with high sensitivity and specificity are available for diagnostic purposes. If the diagnostic purpose of TRAb assays is the non-functional evaluation of autoantibodies, competitive binding immunoassays are used. These methods are based on the ability of TRAbs to compete and prevent ligand binding (TSH or anti-TSHR monoclonal antibodies) to the receptor. TSAbs and TBAbs appear to have overlapping epitopes of TSH-binding sites, which prevent them from being differentiated by competitive TRAb assays. On the other hand, if the diagnostic purpose is to evaluate the antibody function and differentiate between TSAbs and TBAbs, cell-based bioassays are used. These methods are based on the use of living cells to evaluate the function of autoantibodies and distinguish TSAbs and TBAbs, depending on the increase or decrease of intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP). Since TSAbs and TBAbs play different pathogenic roles and are associated with different treatment protocols in patients with thyroid autoimmune diseases, differentiation of TSAbs and TBAbs is of great clinical importance, depending on the antibodies. Therefore, in this review, different generations of competitive binding immunoassays and cell-based bioassays were discussed.

Keywords: TSH Receptor Antibodies, Autoantibodies, Thyroid, Autoimmune Disease, Graves' Disease

[Downloaded from ijem.sbmu.ac.ir on 2025-07-04]

[DOR: 20.1001.1.16834844.1399.22.1.3.0]