

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 تیروئید، 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: ۹۹/۲/۱۶ - دریافت اصلاحیه: ۹۹/۴/۲۱ - پذیرش مقاله: ۹۹/۵/۱۲

مقدمه

بیماری‌های خود ایمنی تیروئیدⁱ (AITD) با تولید آنتی‌بادی‌هایی علیه آنتی‌ژن‌های مختلف تیروئید از جمله گیرنده تیروتروپینⁱⁱ (TSH-R)، آنزیم پراکسیداز تیروئیدی و تیروگلوبولین مرتبط است.^{۱,۲} آنتی‌بادی علیه TSH-R (TRAbs)ⁱⁱⁱ 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.^۲ 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 می‌نماید.^۴ آنتی‌بادی‌های خنثی نیز به علت ایجاد برش

v - TSH-R-blocking Antibodies

vi - Neutral Antibodies

vii - Cyclic Adenosine Monophosphate

i- Autoimmune Thyroid Disease

ii- Thyroid Stimulating Hormone Receptor

iii- TSH Receptor Antibodies

iv- TSH-R Stimulatory Antibodies

اصلی A، B، C و F تقسیم می‌شوند.^{۱۲،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 می‌توانند یک کمپلکس دوتایی پایدار را تشکیل دهند که به آن کمپلکس بتا-گاما ($G\beta\gamma$) گفته می‌شود.^{۱۷} در پستانداران، زیر واحد آلفا بر حسب توالی اسیدهای آمینه و عملکرد به چهار نوع *Gai/o*، *Gas*، *Gaq/11* و *Ga12/13* 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 *Ga*، *Gaq* و *G\beta\gamma* متصل است: به محض اتصال لیگاند به گیرنده، این زیرواحدها فعال شده و آبشارهای 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 گیرنده TSH، 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 $G\beta\gamma$ از $G\alpha$ -GTP جدا شده و هر کدام

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 گریوزⁱ (GO) و درماتوپاتی گریوزⁱⁱ (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 هاشیموتوⁱⁱⁱ (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 تظاهرات 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}

۱-۱ گیرنده TSH

۱-۱-۱ 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 تراغشایی^{vii} هستند، ولی از آنجایی که همسانی توالی بسیار اندکی در بین آن‌ها وجود دارد به چهار گروه

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

i -Graves' Ophthalmopathy

ii -Graves' Dermopathy

iii -Hashimoto's Disease

iv -Competitive Immunoassay

v -Cell-based Bioassays

vi -G protein-Coupled receptors

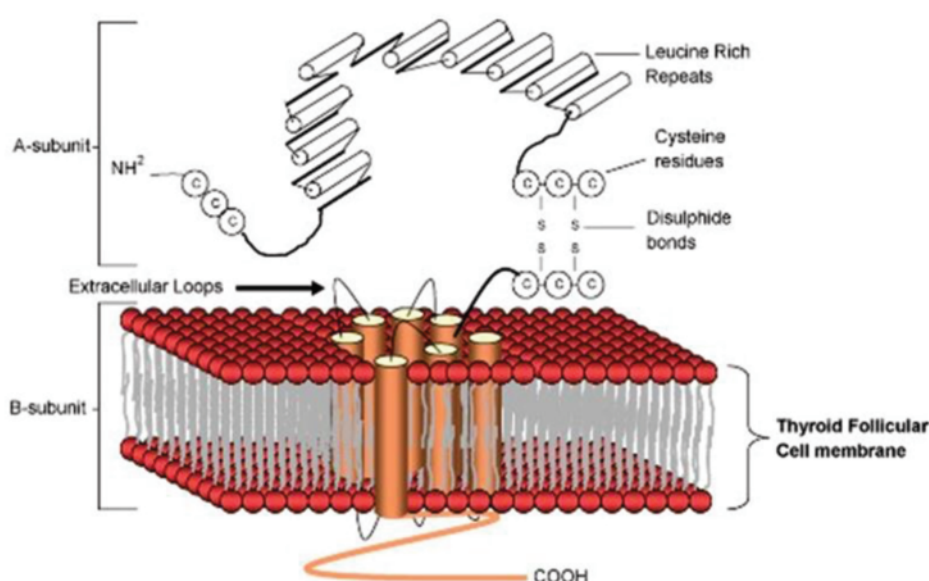
vii -Transmembrane domain

می‌توانند آبشارهای پیام‌رسان متفاوتی را فعال کنند.^{۲۱-۲۳} در سلول‌های تیروئید فعال شدن گیرنده TSH منجر به فعال شدن زیرواحد α از نوع Gas می‌شود که فعال شدن آن منجر به فعال شدن آنزیم آدنیلات سیکلازⁱ و در نتیجه افزایش آدنوزین منوفسفات حلقوی (cAMP) در سیتوپلاسم سلول می‌گردد.^{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 هسته‌ایⁱⁱ وارد هسته می‌گردند و پروتئین CREBⁱⁱⁱ 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 ایزوفرمر β از آنزیم فسفولیپاز C (PLC β) می‌شود که هیدرولیز فسفاتیدیل اینوزیتول ۴ و ۵ بیس فسفات^v (PIP2) را به دی آسیل‌گلیسرول^{vi} (DAG) و فسفاتیدیل اینوزیتول^{vii} (IP3) 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}

۳-۱ 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

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

Abbreviation	
Cell-based bioassay	
• TSH-R stimulation antibodies	TSAb
• TSH-R stimulating immunoglobulins	TSI
• TSH-R blocking antibodies	TBAbs, TSB-Abs, TRB-Abs
• 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 TBIIⁱⁱⁱ 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 (TSI)، آنتی‌بادی‌های مسدودکننده گیرنده هورمون تیروئید (TSB-Abs, TRBAbs, TBABs) یا ایمونوگلوبین‌های مسدودکننده گیرنده هورمون تیروئید (TBI) نیز نام‌گذاری می‌شوند.^{۲۲}

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 در قسمت N ترمینال TSH-R (اسید آمینه ۹-۱۶۵) اتصال می‌یابند (شکل ۲).^{۱۰} اتصال این آنتی‌بادی‌ها، اتصال TSH را 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.^{۲۳} از سوی دیگر ایمونوگلوبین‌های

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.^{۱۰} 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 تیرمیت آنتی‌بادی علیه پراکسیدازⁱ (anti-TPO) و آنتی‌بادی علیه تیروگلوبولینⁱⁱ (anti-Tg) مشاهده می‌شود ولی تمام بیماران مبتلا به هاشیموتو یا گریوز TPO-Ab و Tg-Ab مثبت نیستند.^{۳۰،۳۱}

۱-۲ 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 آنتی‌بادی‌ها، نشانگر روش سنجشی است که در آزمایشگاه مورد استفاده قرار می‌گیرد (جدول ۱).

iii- TSH-R-binding inhibitory immunoglobulin

iv- TSH-R-stimulating immunoglobulin

v -TSH-R-blocking immunoglobulin

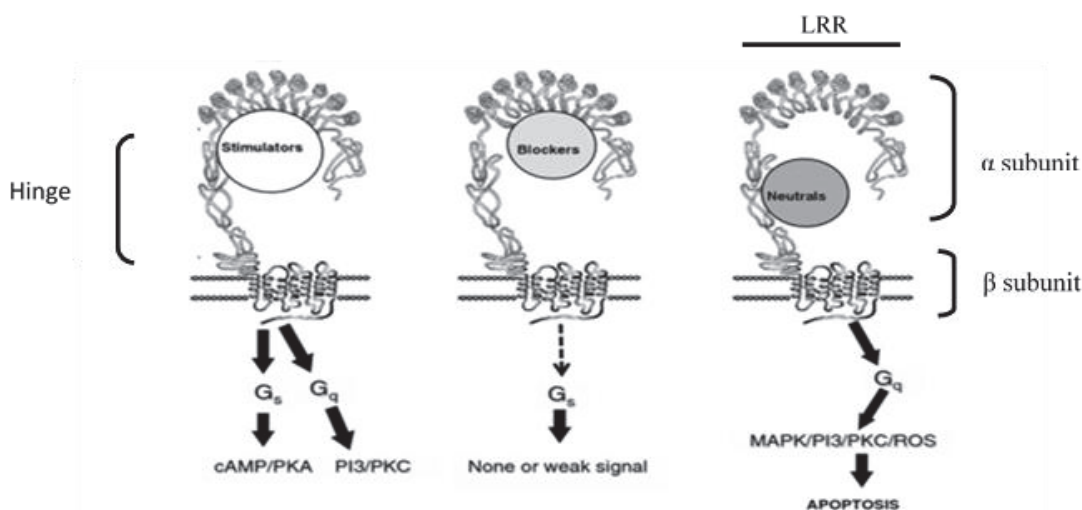
vi -Conformational epitope

i -Anti-thyroid peroxidase

ii- Anti-Thyroglobulin

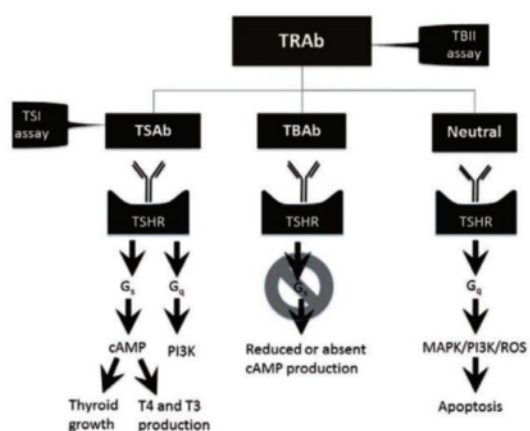
آنتی‌بادی‌های خنثی به اپی‌توپ‌های وابسته به توالی واقع در منطقه N ترمینال گیرنده (اسید آمینه ۳۶۵-۳۱۵) اتصال می‌یابند. این آنتی‌بادی‌ها عملکرد سلول تیروئید را تحت تأثیر قرار نمی‌دهند چون اپی‌توپ‌های آن‌ها خارج از محل اتصال TSH هستند و نمی‌توانند اتصال TSH به گیرنده را مسدود کنند.^{۱۵}

مسدودکننده گیرنده هورمون تیروئید (TBI) به اپی‌توپ‌های وابسته به آرایش فضایی و اپی‌توپ‌های وابسته به توالی^۱ در ناحیه C- ترمینال زیر واحد α و N ترمینال زیر واحد β (اسید آمینه ۴۱۵-۲۱۶) اتصال می‌یابند.^{۱۵} این آنتی‌بادی‌ها باعث جلوگیری از اتصال هورمون به گیرنده و در نتیجه کاهش اثرات بیولوژیک هورمون TSH و کاهش غلظت cAMP می‌شوند.^{۱۱}



شکل ۲- آنتی‌بادی‌های TSABs و TBABs هر دو دارای اپی‌توپ‌های مشترک هم‌پوشان با محل اتصال TSH به گیرنده هستند. محل اتصال آنتی‌بادی‌های خنثی خارج از محل اتصال TSH به گیرنده است.^{۱۵}

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^{۱۶} (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}

۳- آزمون‌های تشخیصی آنتی‌بادی علیه گیرنده تیروئید

۳-۱ آزمون‌های غیر وابسته به عملکرد آنتی‌بادیⁱⁱ

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.^{۱۵} 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

i- Sequential epitope

ii-Non-functional assays

جدول ۲- خلاصه روش‌های سنجش ایمنی برای سنجش اتوانتی‌بادی‌ها علیه TSH-R^{۱۵}

منبع TSH-R	نشانگر	مدت زمان آزمون	بازه زمانی
نسل اول (فاز مایع)			
عصاره غشای تیروئید خوک	TSH گاوی نشانه‌گذاری شده با I	چند روز	۱۹۸۲-۱۹۹۵
عصاره غشای تیروئید انسانی	TSH گاوی نشانه‌گذاری شده با آنزیم	چند روز	۱۹۹۵-۱۹۹۹
نسل دوم (فاز جامد)			
TSH-R خوک تثبیت شده در فاز جامد	TS گاوی نشانه‌گذاری شده با آنزیم	چند ساعت	۱۹۹۹-۲۰۱۲
TSH-R انسانی نو ترکیب تثبیت شده در فاز جامد	پراکسیداز متصل به کمپلکس بیوتین-استرپتاویدین استر اکریلیدوم، I ^{۱۲۵}	چند ساعت	۱۹۹۹-۲۰۱۲
نسل سوم (آنتی‌بادی مونوکلونال M22)			
TSH-R خوک	M22 متصل به بیوتین-اویدین-پراکسیداز	چند ساعت (بیشتر دستی)	۲۰۰۴-۲۰۱۲
TSH-R خوک	M22 متصل به روتنیوم	چند دقیقه (کاملاً اتوماتیک)	۲۰۰۸-۲۰۱۲

۱-۱-۳ نسل اول

نسل اول مبتنی بر ممانعت TRAbs از اتصال TSH نشاندار شده به گیرنده TSH موجود در فاز مایع یعنی عصاره غشای تیروئید خوک است.^{۸،۳۴} بر اساس اینکه این نشاندارسازی توسط رادیو ایزوتوپ‌ها و یا توسط آنزیم صورت گرفته باشد به ترتیب از سنجش ایمنی رادیواکتیویتهⁱ (RIA) و یا سنجش ایمنی آنزیمیⁱⁱ (EIA) استفاده می‌شود. در بازه سال‌های ۱۹۸۲ تا ۱۹۹۹ از منابع متفاوت TSHR شامل گیرنده‌های خوک و انسانی نو ترکیب و TSH نشانه‌گذاری شده با نشانگرهای متفاوت شامل I^{۱۲۵} و آنزیم‌های گاوی استفاده شده است. این نسل از آزمون‌ها با وجود ویژگیⁱⁱⁱ 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}

۲-۱-۳ 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

خوک و یا انسانی نو ترکیب تثبیت شده در سطح جامد، TSH گاوی نشاندار شده با نشانگرهای متفاوت رادیو اکتیوی یا آنزیمی شامل I^{۱۲۵}، استر اکریلیدوم 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^{۱۵،۳۵} 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 نشانه‌گذاری شده مورد استفاده در نسل دوم گردید. هدف از این جایگزینی افزایش حساسیت بود زیرا که 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 نشانگر اتصال می‌یابد و روش غیر مستقیم (indirect) که در این روش M22 به بیوتین اتصال می‌یابد و سپس کمپلکس اویدین-پراکسیداز و سوبسترای تترامیتیل بنزین به محیط افزوده می‌گردد.^{۳۵} روش‌های مبتنی بر آنتی‌بادی مونوکلونال

v -Biotin-streptavidin peroxidase

vi -Avidin-biotin peroxidase

i -Radioimmunoassay

ii -Enzyme immunoassay

iii -Specificity

iv -Sensitivity

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} در حال حاضر روش‌های اتوماتیک براساس ایمنی‌سنجی الکتروشیمیایی لومینوسانسⁱ (ECLIA) توسط شرکت‌های مختلف مانند Thermo Fischer و Roche Diagnostics طراحی، ساخت و روانه بازار شده است.^۴

۲-۳ آزمون‌های وابسته به عملکرد آنتی‌بادیⁱⁱ

با وجود 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 بیوشیمیایی 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).^۲

جدول ۳- خلاصه روش‌های زیست‌سنجی مبتنی بر سلول برای سنجش عملکردی اتوآنتی‌بادی‌ها علیه TSH-R^{۱۵،۲۸}

منبع TSH-R	اساس سنجش	آنالیت	زمان آزمون	بازه زمانی
نسل اول (استفاده از مدل‌های حیوانی)				
خوک	^{۱۳۱} IT3,T4	LATS	چند هفته	۱۹۵۶
موش	^{۱۳۱} IT3,T4	LATS	چند روز	۱۹۵۸
نسل دوم (استفاده از سلول‌های بیان‌کننده TSH-R)				
سلول‌های تیروئیدی موش	^{۱۳۱} IT3,T4	LATS	چند هفته	۱۹۶۷
سلول‌های تیروئیدی خوک	cAMP (ایمنی‌سنجی پرتوی)	LATS	چند روز	۱۹۷۳-۱۹۷۵
سلول‌های تیروئیدی انسان	cAMP (ایمنی‌سنجی پرتوی)	TSAb	۴ روز	۱۹۷۳-۱۹۸۸
سل لاین FRTL-5	cAMP (ایمنی‌سنجی پرتوی)	TSAb	۳ روز	۱۹۸۳-۱۹۹۴
سل لاین TSH-R + CHO انسانی	cAMP (ایمنی‌سنجی پرتوی)	TSAb	۲-۴ روز (JP209, JP28, JP26, JP14, JP09)	۱۹۹۴-۱۹۹۸
نسل سوم (استفاده از سل لاین CHO ترنسفورم شده با پلاسمید حاوی ژن لوسیفران)				
سل لاین TSH-R + CHO انسانی	cAMP (لوسیفران)	TSAb	۲۴-۲۶ ساعت	۱۹۹۸-۲۰۰۶
سل لاین Mc1+2 + CHO	cAMP (لوسیفران)	TSAb	۲۰ ساعت	۲۰۰۶-۲۰۱۰
سل لاین Mc2 + CHO	cAMP (لوسیفران)	TSAb	۲۰ ساعت	۲۰۰۶-۲۰۱۰
سل لاین Mc4 + CHO	cAMP (لوسیفران)	TSAb	۲۰ ساعت	۲۰۰۶-۲۰۱۰

۱-۲-۳ آزمون‌های زیست‌سنجشی مبتنی بر سلول

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.^۴ پس از کشف عامل بیماری گریوز و ماهیت ایمونوگلوبولینی آن (LATS)ⁱⁱⁱ در سال ۱۹۵۶،^{۳۶} 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}

۱-۲-۳ نسل اول

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

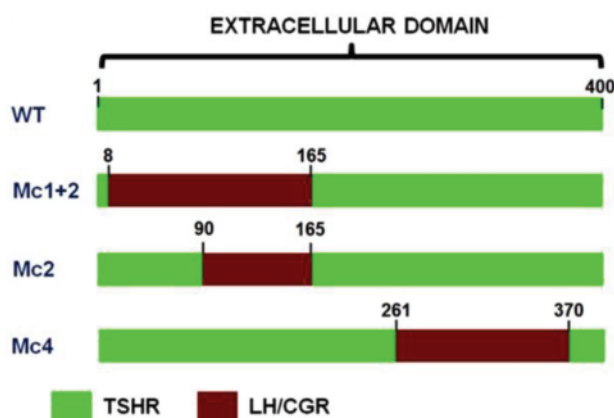
iii-Long-acting thyroid stimulator

iv-In vivo

i-Electro-chemiluminescent immunoassays

ii-Functional assays

ابتدا از سل لاین CHO ترنسفکت شده با ژن لوسیفراز و گیرنده‌های کایمیریک Mc1 + 2، Mc2، استفاده شد که Mc1+ و Mc2 هر دو فاقد محل اتصال TSI هستند (جدول ۴). مشاهدات نشان داد که TSI موجود در سرم ۳۰٪ از بیماران مبتلا به گریوز می‌توانست گیرنده‌های Mc1 + 2 و 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}



شکل ۴- نمای شماتیک بخش خارج سلولی سه رسیپتور کایمیریک 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}

جدول ۴- سه نوع گیرنده کایمیریک TSHR-LH/CGR

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

در گام بعدی با هدف طراحی روش زیست‌سنجی برای سنجش میزان TSI و حذف تداخل TBI، سل لاین CHO ترنسفورم شده با ژن لوسیفراز با گیرنده کایمیریک Mc4 که دارای محل اتصال TSI و فاقد محل اتصال TBI (جدول ۴) است ترنسفکت گردید (شکل ۵). در این روش (ThyretainTM)، TSI در 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

مدل‌های حیوانی تیروکسین و ^{۱۲۵}I تزریق شد و در فواصل زمانی منظم، ۲ تا ۲۴ ساعت پس از تزریق داخل وریدی سرم بیمار، میزان ^{۱۲۵}I T3, T4 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- نسل دوم

در نسل دوم از آزمون‌های زیست‌سنجشی مبتنی بر سلول، به کارگیری سلول‌های بیان‌کننده گیرنده TSH، جایگزین استفاده از مدل‌های حیوانی گردید.^{۱۵} در این آزمون‌ها از دو گونه سلول استفاده می‌شود: الف) سلول‌هایی که ذاتاً توانایی بیان گیرنده 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 بیان‌گیرنده TSH را کسب کرده‌اند؛ همچون سلول‌های تخمدان همستر چینیⁱ (CHO) ترنسفکت شده با TSH-R انسانی، بیان‌کننده TSH-R نو ترکیب 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 شیمیاییⁱⁱ است.^۲

۳-۲-۱- نسل سوم

در نسل سوم از روش‌های زیست‌سنجی مبتنی بر سلول، از سلول‌های CHO ترنسفورم شده که حاوی ژن لوسیفراز کنترل شونده عناصر پاسخ‌دهنده به cAMP بود. همچنین با پیشرفت تکنولوژی DNA نو ترکیب، زمینه ساخت گیرنده‌های کایمیریک فراهم شد و سه نوع گیرنده کایمیریک-TSHR LH/CGRⁱⁱⁱ با نام Mc1 + 2، Mc2، و Mc4 سنتز و راهی نو در پیشرفت آزمون‌های زیست‌سنجی گشوده شد (شکل ۴). در راستای استفاده بالینی از آزمون‌های زیست‌سنجی مبتنی بر گیرنده‌های کایمیریک در نسل سوم علاوه بر سل لاین CHO ترنسفکت شده با TSHR انسانی و ژن لوسیفراز، در

i - Chinese hamster ovary

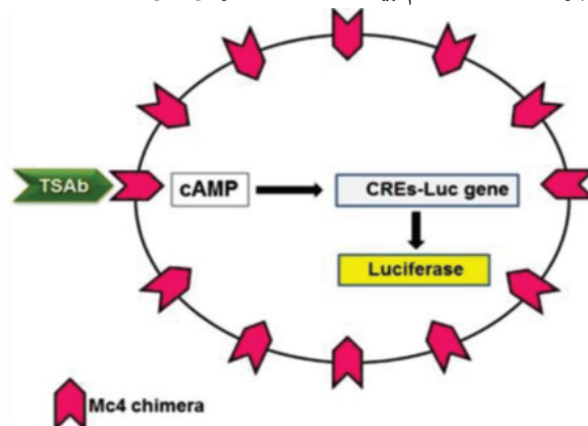
ii - Chemiluminescent Immunoassay

iii - Human TSHR-rat Luteinizing Hormone/chorionic Gonadotropin Receptor

iv - Heterogeneous TSI Binding Site

تأیید می‌گردد. حساسیت و ویژگی این روش نسبت به دیگر روش‌های ذکر شده از مقادیر بالاتری برخوردار است.^{۱۵،۳۸}

سلولی، مقدار لوسیفراز با نورسنج اندازه‌گیری و در صورت افزایش معنی‌دار نسبت به کنترل، وجود TSI در سرم بیمار



شکل ۵- روش زیست‌سنجی مبتنی بر سلول با استفاده از رسیپتور کایمیریک Mc4. در این روش سل‌لاین‌های فاقد TSH-R با رسیپتور کایمیریک Mc4 و ژن لوسیفراز که رونویسی آن تحت کنترل عناصر پاسخ‌دهنده به cAMP است، ترنسفکت گردید. در صورت وجود TSAb در سرم بیمار، به گیرنده Mc4 اتصال می‌یابد و تولید cAMP داخل سلولی و سپس بیان ژن لوسیفراز افزایش می‌یابد.^{۳۸}

حساسیت و ویژگی آزمون‌های مهم هر روش در جدول ۶ با هم مقایسه شده است.

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

مزایا و معایب آزمون‌های مبتنی بر سنجش ایمنی و آزمون‌های زیست‌سنجشی مبتنی بر سلول در جدول ۵ و

جدول ۵- مقایسه روش ایمنی‌سنجی و زیست‌سنجی مبتنی بر سلول

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

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

روش	حساسیت (%)	ویژگی (%)
روش زیست‌سنجی مبتنی بر سلول	۱۰۰	۹۸/۵
سل لاین Mc4 + CHO	۹۷/۳	۹۳/۱
سل لاین TSH-R + CHO انسانی	۸۶/۵	۹۷
فاز جامد	۹۷/۴	۹۹/۲
آنتی‌بادی مونوکلونال M22		

روش ایمنی‌زیستی

سل لاین TSH-R + CHO انسانی

سل لاین Mc4 + CHO

آنتی‌بادی مونوکلونال M22

فاز جامد

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 TSAb و TBAb هر دو دارای اپی‌توپ‌های مشترک همپوشان با محل اتصال TSH به گیرنده هستند، این روش‌ها هنوز توانایی تشخیص افتراقی TSAb و TSAb را ندارند.^۸ این در حالی است که روش‌های زیست‌سنجی مبتنی بر سلول مانند Thyretain™ که در آن با استفاده از سل لاین CHO ترنسفورم شده با ژن لوسیفران و ترنسفکت شده با گیرنده کایمیک Mc4 که دارای محل اتصال TSAb و فاقد محل اتصال TSAb است، با حساسیت و ویژگی بیشتر از ۹۸ درصد توانایی تشخیص افتراقی TSAb و TSAb را دارند و برای تشخیص پرکاری و کم‌کاری اتوایمیون تیروئید بر آزمون‌های مبتنی بر سنجش ایمنی برتری دارند.^{۲۸} در نتیجه استفاده از روش‌های زیست‌سنجی مبتنی بر سلول امکان بررسی اتوآنتی‌بادی‌ها بر اساس عملکرد تحریک‌کننده یا مسدودکننده را در بیماران مبتلا به افتالموپاتی و درمان‌توپاتی 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 TSAb و TSAb هر دو فعال می‌گردد،^۴ تمایز آنتی‌بادی‌های فعال‌کننده از آنتی‌بادی مسدودکننده با روش‌های ایمنی‌سنجی فاز جامد فعلی غیرقابل تحقق است.^{۱۰} بنابر این تاکنون تلاش برای تمایز آنتی‌بادی‌ها بر اساس عملکرد، با استفاده از روش‌های ایمنی‌سنجی ناموفق بوده و هرگونه گزارش آزمایشگاهی در این زمینه کاملاً اشتباه است.^۴

پرکاری تیروئید نوزادان در بارداری‌ها بگیرد.^۲ در آینده استفاده از فناوری‌های نوینی مانند نانوتکنولوژی، میکرو ربات‌ها و شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای نیروهای دخیل در اتصال گیرنده به پروتئین G و مکانیزم‌های فعال‌سازی یا مهار مسیرهای انتقال پیام cAMP، 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 کایمیک به عنوان استاندارد طلایی تمایز آنتی‌بادی‌های علیه TSH-R بر اساس عملکرد باقی بماند و همچنان به عنوان بخشی جدایی‌ناپذیر در تشخیص و تعیین اقدامات بالینی بیماری‌های خود ایمنی تیروئید باشد.^{۴،۱۰،۴۱}

References

- 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.
- Jorgensen GH, Ormolfsson AE, Johannesson A, Gudmundsson 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.
- Bucci I, Giuliani C, Napolitano G. Thyroid-stimulating hormone receptor antibodies in pregnancy: Clinical relevance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2017; 8(JUN): 1-11.
- Lytton SD, Schlüter A, Banga PJ. Functional diagnostics for thyrotropin hormone receptor autoantibodies: bioassays prevail over binding assays. *Front Biosci - Landmark* 2018; 23: 2028-43.
- Azizi F, Amouzegar A, Tohidi M, Hedayati M, Cheraghi L, Mehrabi Y. Systemic thyroid hormone status in treated Graves' disease. *Int J Endocrinol Metab* 2019; 17: 95385.
- Furmaniak J, Sanders J. Blocking type TSH receptor antibodies 2013; 4: 11-26.
- 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 review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2012; 12: 107-13.
- Roggenbuck JJ, Veiczi M, Conrad K, Schierack P, Wunderlich G, Kotzerke J, et al. A novel third-generation TSH receptor antibody (TRAb) enzyme-linked immunosorbent assay based on a murine monoclonal TSH receptor-binding antibody. *Immunol Res* 2018; 66: 768-76.
- Fröhlich E, Wahl R. Thyroid autoimmunity: Role of anti-thyroid antibodies in thyroid and extra-thyroidal diseases. *Front Immunol* 2017; 8: 521.
- Ordookhani A, Mirmiran P, Najafi R, Hedayati M, Azizi F. Congenital hypothyroidism in Iran. *Indian J Pediatr* 2003; 70: 625-8.
- Michalek K, Morshed SA, Latif R, Davies TF. TSH receptor autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2009; 9: 113-6.
- Quast RB, Margeat E. Studying GPCR conformational dynamics by single molecule fluorescence. *Mol Cell Endocrinol* 2019; 493: 110469.
- Shakiba E, Movahedi M, Majd A, Hedayati M. Investigating the expression and promoter methylation of RET gene in patients with medullary thyroid cancer with unmutated RET. *J Cell Physiol* 2019; 234: 16304-11.

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 pathways in thyroid tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2003; 213: 31-45.
25. Giovanna M, Marta EF. Best Practice and Research Clinical Endocrinology & Metabolism Multiple hormone 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 Overview. 2018.
29. Braverman LE, Brown RS. and Graves ' Disease. *Am J Med Sci* 299: 291-7.
30. Å 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 autoantibodies: 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 blocking (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. Silibinin encapsulation in polymersome: A promising anticancer nanoparticle for inducing apoptosis and decreasing the expression level of miR-125b/miR-182 in human breast cancer cells. *J Cell Physiol* 2019: jcp.28795.

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