

FARMACEUTICKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY

V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA ONEMOCNĚNÍ ŠTÍTNÉ ŽLÁZY

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Tereza Vaculíková

Hradec Králové 2007

Magdalena Malinová

Děkuji Ing. Tereze Vaculíkové za odborné vedení a cenné poznatky, které jsem během vypracování bakalářské práce získala. Ráda bych také poděkovala Prof. MUDr. Jaroslavu Dršatovi a Bc. Blance Hynkové za ochotné zodpovězení všech mých dotazů.

Zvláštní dík patří kolegyním z laboratoře TV. BIO za zástup v době mé nepřítomnosti z důvodu vypracování práce.

OBSAH

1	ÚVOD.....	5
2	CÍL PRÁCE.....	6
3	VLASTNÍ REŠERŠNÍ PRÁCE.....	7
3.1	Anatomie štítné žlázy.....	7
3.2	Histologie štítné žlázy.....	7
3.3	Fyziologie štítné žlázy.....	8
3.3.1	Biochemické pochody tvorby hormonů T ₄ a T ₃	10
3.3.2	Hormony št. žlázy v cirkulaci a mechanismus jejich působení v buňce... 10	10
3.3.3	Regulace funkce štítné žlázy.....	12
3.3.3.1	Hypotalamo-hypofyzární regulace.....	12
3.3.3.2	Regulace pomocí enzymů – dejódáz.....	13
3.3.3.3	Autoregulace závislá na příjmu jódu.....	13
3.3.3.4	Imunitní systém jako regulátor.....	13
3.3.3.5	Regulace růstovými hormony.....	13
3.4	Přehled onemocnění štítné žlázy.....	14
3.5	Možnosti diagnostiky onemocnění štítné žlázy.....	15
3.6	Laboratorní diagnostika.....	17
3.6.1	Důvody nutnosti spolupráce mezi endokrinologem a laboratoří.....	17
3.6.2	Preanalytická fáze.....	18
3.6.2.1	Interference.....	19
3.6.3	Vyšetřované analyty – stručný přehled.....	21
3.6.4	Doporučený algoritmus vyšetření jednotlivých analytů.....	22
3.6.5	Diagnostika k odlišení jednotlivých forem hypertyreózy.....	24
3.6.6	Diagnostika k odlišení jednotlivých forem hypotyreózy.....	25
3.7	Analýza jednotlivých parametrů.....	26
3.7.1	Stanovení hormonů.....	26
3.7.1.1	Tyreotropin.....	26
3.7.1.2	TRH test.....	29
3.7.1.3	Stanovení celkového tyroxinu.....	29
3.7.1.4	Stanovení volného tyroxinu.....	31
3.7.1.5	Stanovení celkového trijodtyroninu.....	32
3.7.1.6	Stanovení volného trijodtyroninu.....	34
3.7.1.7	Stanovení reverzního trijodtyroninu.....	35
3.7.1.8	Stanovení tyreoglobulinu.....	35
3.7.1.9	Stanovení kalcitoninu.....	37
3.7.2	Stanovení protilátek.....	38
3.7.2.1	Stanovení protilátek proti tyreoidální peroxidáze.....	38
3.7.2.2	Stanovení protilátek proti tyreoglobulinu.....	39
3.7.2.3	Stanovení protilátek proti TSH receptorům.....	40
3.7.3	Ostatní prováděná vyšetření u tyreopatií.....	41
3.7.3.1	Stanovení tyroxin vázajícího globulinu.....	41
3.7.3.2	Stanovení jodurie.....	42
3.7.4	Změny běžných biochemických vyšetření a EKG.....	44
3.7.5	Metody využívané při stanovení tyreoidálních markerů.....	45
3.7.5.1	Radioimunoanalýza.....	46
3.7.5.2	Enzymoimunoanalýza.....	46
3.7.5.3	Fluoroimunoanalýza.....	47

	3.7.5.4 Chemiluminiscenční imunoanalýza	48
4	ZÁVĚR	49
5	SOUHRN	50
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	51
7	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	53

1 ÚVOD

Protože onemocnění štítné žlázy nepatří mezi přímé příčiny úmrtí mohlo by se zdát, že diagnostika tyreopatií bude patřit mezi okrajové lékařské disciplíny. Je ovšem neodiskutovatelným faktem, že tyreopatie jsou hned po diabetu mellitu nejčastější endokrinopatie na celém světě.

Ve světě převažují tyreopatie vzniklé následkem nedostatku jodu. Podle novějších statistik WHO žije 2,2 miliardy lidí v podmínkách jodového deficitu, nejméně 700 milionů lidí má strumu, a ročně se narodí asi 100 tisíc osob s těžkými somatickými a psychickými defekty vzniklými následky nedostatku jodu během nitroděložního vývoje (1).

Výsledky získané epidemiologickým průzkumem Endokrinologického ústavu prokazují, že obyvatelstvo České republiky lze od roku 2002 přiřadit k 15 evropským zemím s dostatečným zásobením jodem (2). Je však nutné tuto skutečnost stále připomínat a informovat občany ČR o nutnosti dostatečného a zároveň optimálního přísunu jodu, protože i příliš vysoký přísun může vyvolat onemocnění typu tyreotoxikózy nebo aktivaci autoimunitní tyreopatie.

Onemocnění štítné žlázy postihuje asi 5 % populace, asi 5x častější je u žen než u mužů a s přibývajícím věkem dochází k nárůstu počtu nemocných, takže v populaci žen nad 45 let tvoří nemocné 15-25 %. Mezi nejčastější tyreopatie patří autoimunitně podmíněné tyreoiditidy (chronické záněty) a autoimunitně podmíněná tyreotoxikóza Graves-Basedowova typu.

Současná diagnostika má dostatek spolehlivých ukazatelů, jak onemocnění štítné žlázy odhalit a diferencovat, mezi tyto ukazatele patří i laboratorní vyšetření hormonů, protilátek a ostatních parametrů přítomných v krvi. A hlavně těmto jsou věnovány následující stránky.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce je na základě studia samostatně vyhledané literatury vytvořit přehledné shrnutí základních poznatků o štítné žláze. Popsat hlavně postupy, jak volit jednotlivá vyšetření laboratorní diagnostiky a jaký význam mají jednotlivé zvýšené či snížené hodnoty tyreoidálních markerů a jaké mezi nimi existují souvislosti. Dalším cílem je popsat problematiku preanalytické fáze a zdůraznit nutnost spolupráce mezi biochemikem a endokrinologem.

3 VLASTNÍ REŠERŠNÍ PRÁCE

3.1 Anatomie štítné žlázy

Štítná žláza (glandula thyreoidea) je žláza s vnitřní sekrecí, která je tvořena levým a pravým lalokem (lobus sinister a dexter), které jsou spojeny v dolní části před průdušnicí úzkým můstkem (isthmem). Tento může být rudimentární nebo může vzácněji i chybět. Isthmus je zpravidla ve výši 2.- 4. prstence průdušnice.

Laloky se nacházejí na přední straně krku v úrovni obratlů C5 – Th1 před štítnou chrupavkou. Laloky štítné žlázy mají tvar trojboké pyramidy 5-8 cm dlouhé, 2-4 cm široké a 1,5-2 cm tlusté a naléhají na hrtan a průdušnici. Nejčastěji z levého laloku v blízkosti isthmusu, méně často z pravého laloku a isthmusu vystupuje úzký zpravidla do 1 cm tlustý lobus pyramidalis (3). Na zadní ploše laloků (někdy však i uvnitř tyreoidální tkáně subkapsulárně) jsou umístěna 4 příštítná tělíska, často je jich i více.

Hmotnost štítné žlázy v dospělém věku je mezi 25-40 g. Velikost je ovlivněna hlavně geografickými (množství jodu v potravě), pohlavními a věkovými rozdíly. Větší bývá u žen než u mužů, ve stáří atrofuje.

Krevní zásobení je velmi bohaté, párové artérie přicházejí ze zevní arteria carotis a arteria subclavia. Inervace je vegetativního původu.

3.2 Histologie štítné žlázy

Na povrchu št. žlázy je vazivové pouzdro (capsula fibrosa), které se dělí na průsvitnou capsula externa (ta souvisí přímo s krční facií a vazivovou pochvou nervově cévního svazku) a capsula propria (ta přiléhá přímo na parenchym žlázy). Mezi těmito obaly jsou žilní pleteně. K okolí je žláza fixována pomocí laminae vasculares a ligamenty.

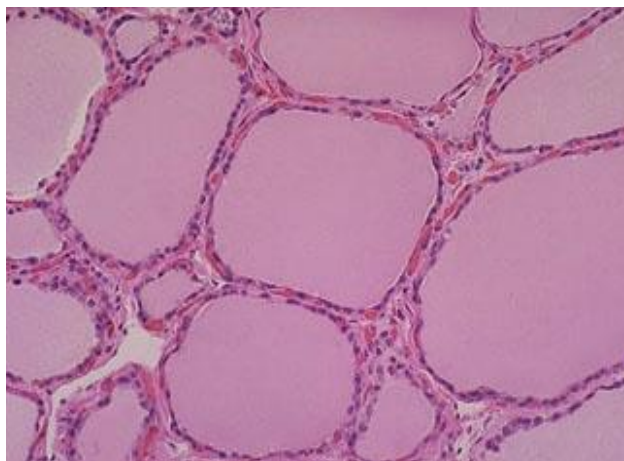
Pravým pouzdrém je označována pouze pojivová tkáň obalující povrch žlázy, na který pevně přiléhá a vysílá vazivová septa mezi jednotlivé lalůčky (lobuly). Tyto nejsou od sebe úplně odděleny, ale částečně spolu souvisí. Jsou zásobeny jednou arterií a každý obsahuje asi 20-40 váčků (folikuly), které jsou vyplněny koloidem.

Jednotlivé folikuly nejsou stejně velké, velikost se pohybuje mezi 50-200 μm , liší se také svým tvarem. Jsou ohraničeny jednovrstevným žlázovým epitelem (folikulární epiteliální buňky). Folikulární buňky jsou výrazně polarizované, mohou být ploché až

cylindrické, což závisí na funkčním stavu žlázy. V bazálním úseku jsou proteosyntetické organely a jádro, v apikální části se nacházejí struktury odpovídající vysoké exo- a endocytotické aktivitě, na povrchu jsou mikrovilli.

V této úplně uzavřené dutině folikulu se nachází sekret folikulárních buněk – koloid. Jedná se o viskozni tekutinu jejíž hlavní složkou je glykoprotein tyreoglobulin. Tyreoglobulin tvoří 50-75 % hmotnosti štítné žlázy a podílí se hlavně na tvorbě i transportu hormonů štítné žlázy (4).

Mezi buňkami folikulů se vyskytují buňky difúzního endokrinního systému (označované také jako APUD – systém), tzv. *parafolikulární buňky* neboli *C-buňky*. C-buňky se nacházejí na vnitřní straně bazální membrány, nikdy však nedosahují svým vrcholem dutiny folikulu, vyskytují se jednotlivě nebo ve shlucích a jsou morfologicky i funkčně odlišné. Tyto buňky produkují hormon kalcitonin, který se významnou měrou účastní regulace kalciofosfátového metabolismu.



Obrázek 3-1 Histologický obraz normální štítné žlázy (5)

3.3 Fyziologie štítné žlázy

Štítná žláza je integrální součástí endokrinního systému. Podle potřeb organismu produkuje chemické látky nazývané tyreoidální hormony. Tyto hormony podporují vývoj a růst, zesilují procesy látkové výměny a přeměny energie, mají velký význam pro vývoj duševní a centrální nervové soustavy. Jejich tvorba je složitá, na počátku syntézy je důležitá inkorporace jodu, jeho přísun ze zevního prostředí může být limitujícím faktorem pro správnou funkci této žlázy. V oblastech, kde je snížený obsah jodu

v přirozeném prostředí, je nutno jeho přísun do organismu uměle zvyšovat. Denní příjem jodu by měl být v rozmezí mezi 150-200 μg , pokud je denní příjem jodu dlouhodobě pod 50 μg dojde k nedostatečné produkci hormonů.

Jsou produkovány tyto hormony:

a) V buňkách folikulů :

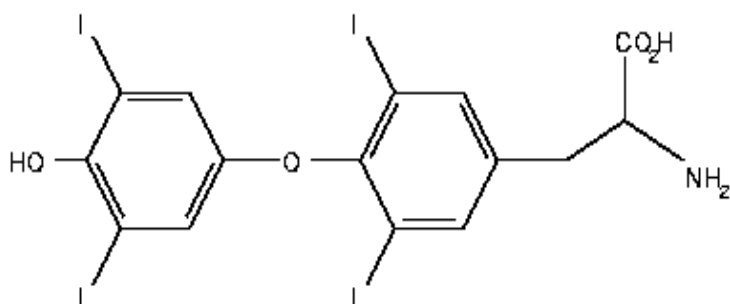
- Tyroxin (3,5,3',5'-tetrajodthyronin, T_4)
- Trijodthyronin (3,5,3'-trijodthyronin, T_3)

b) Parafolikulární buňky tvoří:

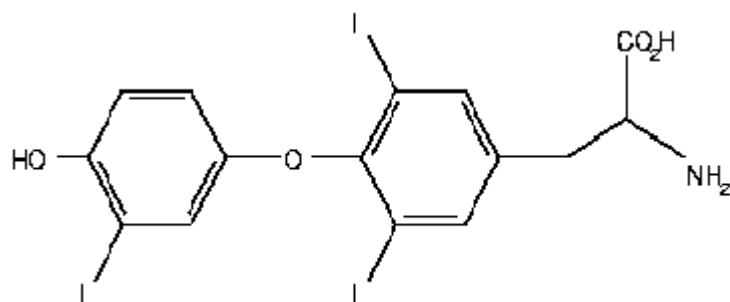
- Kalcitonin (thyreokalcitonin, TC)

c) V periférii je část T_4 přeměněna na:

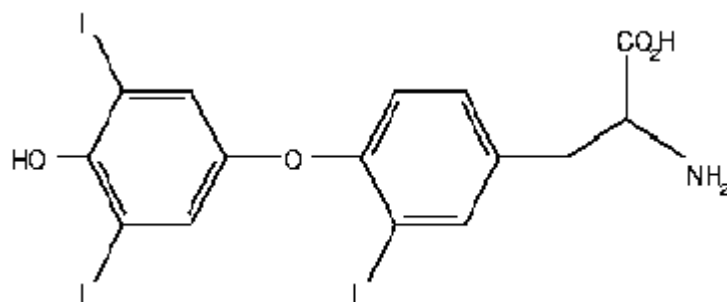
- Reverzní trijodthyronin (3, 3', 5'-trijodthyronin, rT_3)



Obrázek 3-2 T_4 (3,5,3',5'-tetrajodthyronin)



Obrázek 3-3 T_3 (3,5,3'-trijodthyronin)



Obrázek 3-4 rT₃ (3,3',5'-trijodthyronin reverzní)

3.3.1 Biochemické pochody tvorby hormonů T₄ a T₃

Z hlediska chemické struktury hormonů se jedná o jodované deriváty aromatické aminokyseliny tyrosinu, které jsou složeny ze dvou zbytků tyrosylu. Výchozím bodem pro tvorbu těchto hormonů je proteosyntéza glykoproteinu tyreoglobulinu (Tg), jehož tyrosylové skupiny se za katalýzy jodtransferázou jodují molekulárním jodem v poloze 3 a 5. Monojodfenylová nebo dijodfenylová část (donor) se váže etherovou vazbou na další jodovanou tyrosylovou skupinu (akceptor) za vzniku příslušné jodtyroninové struktury stále ještě vázané jako součást peptidového řetězce tyreoglobulinu. Ten přestupuje v této podobě z buňky do lumina folikulu, do koloidu, kde se skladuje (6).

Jodidové anionty jsou buňkami štítné žlázy z cirkulace aktivně vychytávány, pravděpodobně kotransportem s Na⁺, jsou koncentrovány v cytoplazmě asi 25násobně.

Peroxidáza (jodidperoxidáza, tyreoperoxidáza, TPO) je klíčovým enzymem, který katalyzuje oxidaci jodidových aniontů (přinášejících cirkulací) na molekulární jod.

Systém proteáz zajišťuje podle potřeb organismu uvolňování obou hormonů z koloidu štítné žlázy.

3.3.2 Hormony št. žlázy v cirkulaci a mechanismus jejich působení v buňce

Prostřednictvím krevního oběhu se tyroxin dostane k cílové tkáni, následuje energeticky závislý přenos do nitrobuňčného prostoru. V cytoplazmě buňky je tzv. *pool* hormonů štítné žlázy, který je tvořen převážně trijodtyroninem s vyšší biologickou aktivitou (ten je v buňce tvořen z tyroxinu monodejodací). Trijodtyronin je pak pravděpodobně ve volné formě přenášen do buňčného jádra, kde se specificky váže s vazebným místem proteinu

– receptorem, který je součástí euchromatinu a je umístěn v intranukleozomové oblasti chromozomu (7). Po navázání pak ovlivňuje proteosyntézu, fosforylační a další procesy v buňce.

Tyreoidální hormony v cirkulaci se vyskytují buď vázané na transportní bílkoviny nebo nevázané, které tvoří hlavní biologicky účinnou složku.

Procentuální zastoupení vázané formy T_3 a T_4 :

- 99,7 % T_3 je ve formě vázané
- 99,97 % T_4 je ve formě vázané

Typy transportních bílkovin na které jsou T_3 a T_4 v krevním oběhu vázány:

- z 60-70 % je to tyroxin vázající globulin (thyroxin binding globulin, TBG)
- ze 30 % je to tyroxin vázající prealbumin (thyroxin binding prealbumin, TPA, transthyrenin)
- nepatrné množství je vázáno na albumin

Procentuální zastoupení volných forem T_3 a T_4 :

- 0,3 % volného T_3 (free T_3 , fT_3)
- 0,03 % volného T_4 (free T_4 , fT_4)

Rozdíl v procentuálním zastoupení fT_3 a fT_4 je způsoben tím, že vazba T_3 na transportní bílkoviny je o něco slabší než u T_4 .

Názvem celkový T_3 (total T_3 , tT_3) a celkový T_4 (total T_4 , tT_4) je vyjadřován součet koncentrací volné a vázané formy příslušného hormonu.

3.3.3 Regulace funkce štítné žlázy

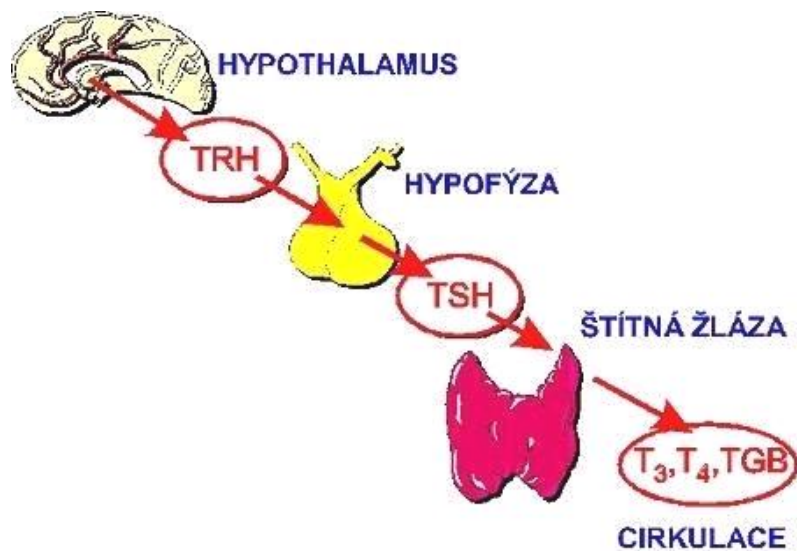
Správná tyreoidální funkce je závislá na několika organizačních jednotkách:

3.3.3.1 Hypotalamo-hypofyzární regulace

V hypotalamu, který stojí na počátku centrálního řízení sekreční aktivity štítné žlázy, je uvolňován tyreoliberin (thyreotropin releasing hormon, TRH). Tyreoliberin patří do skupiny neurosekrečních hormonů a spouštěcích faktorů, jelikož jeho vlivem dochází k sekreci tyreotropního hormonu (thyroid stimulating hormon, TSH) v adenohypofýze. Jeho antagonistou je somatostatin, který naopak sekreci TSH snižuje.

TSH je vyplavován do krevního oběhu, kterým se dostane až k buňkám štítné žlázy – tyreocytům. Na membráně tyreocytů se váže na své specifické receptory, tím urychlí vstup jodovaného tyreoglobulinu z koloidu folikulu do buňky, jeho proteolytické štěpení, a tím i uvolnění hormonů štítné žlázy do krevního oběhu.

Koncentrace tyreoidálních hormonů v periferní krvi je ovlivněna tzv. negativní zpětnou vazbou, vysoká koncentrace T_3 a T_4 tlumí sekreci TSH a TRH, naopak pokud dojde poklesu T_3 a T_4 je sekrece stimulována k tvorbě TSH a TRH.



Obrázek 3-5 Schema řízení sekrece hormonů hypotalamo-hypofyzární regulací (8)

3.3.3.2 Regulace pomocí enzymů – dejódáz

Dejódazy, které jsou ve tkáních přítomné v různém množství modifikují účinek T_4 a T_3 jak na periférii, tak v hypofýze (9).

Existují tři typy dejódáz:

- 1,5' - dejódáza
- 2,5' - dejódáza
- 3,5 – dejódáza

3.3.3.3 Autoregulace závislá na příjmu jódu

Při jodopenii se akcentují mechanismy šetřící jód a zároveň se zvyšuje citlivost tyreocytů vůči TSH.

3.3.3.4 Imunitní systém jako regulátor

Protilátky imunitního systému stimulují nebo inhibují tyreoidální funkci.

3.3.3.5 Regulace růstovými hormony

Podílí se svým působením na růstu a funkci štítné žlázy, uvažuje se zejména o významu faktoru EGF (Epithelial Growth Factor).

3.4 Přehled onemocnění štítné žlázy

1. Vrozené poruchy:

- úplné chybění nebo ektopické uložení
- kongenitální struma
- novorozenecká hypotyreóza

2. Eufunkční struma:

- jedná se o změnu velikosti a struktury štítné žlázy při zatím normální funkci, bez známek přítomnosti autoimunitního procesu nebo nádoru

3. Porucha funkce štítné žlázy:

- hypertyreóza, tyreotoxikóza – zvýšená činnost štítné žlázy
- hypotyreóza – snížená činnost štítné žlázy

4. Záněty štítné žlázy

- lze dělit podle průběhu na:
 - akutní tyreoiditidy
 - subakutní tyreoiditidy (granulomatózní, epiteloidní, deQuervainova)
 - chronické tyreoiditidy (autoimunitní)
- lze dělit podle původu na:
 - virové
 - bakteriální

5. Onemocnění způsobené nedostatkem jódu

6. Maligní nádory štítné žlázy:

- vycházející z tyreocytů (karcinomy):
 - diferencované (papilární, folikulární a jejich podtypy)
 - nediferencované (anaplastické)
- vycházející z C-buněk – medulární karcinom
- vycházející z ostatních struktur št. žlázy:
 - sarkomy
 - lymfomy (B lymfom)
- metastatické nádory
(ca mammy, bronchogenní, Grawitzův tumor, ca zažívacího traktu, hemoblastomy)

7. Autoimunitně podmíněné tyreopatie:

- autoimunitně podmíněná tyreotoxikóza (Gravesova-Basedowova choroba)
- autoimunitně podmíněná tyreoiditida:
 - klasická Hashimotova forma
 - juvenilní autoimunitní tyreoiditida
 - atrofická forma
 - tyreoiditidy projevující se výhradně poruchou funkce (silentní a poporodní)

8. Poruchy funkce vzniklé jinými mechanismy:

- tyreotoxikóza na podkladě tyreoidální autonomie (plumerovská) včetně independentního adenomu, obvykle po zátěži jodem (jodová tyreotoxikóza), na podkladě destrukce tyreoidální tkáně, na podkladě funkčně aktivní tumorózní tkáně, na podkladě lékových vlivů (amiodaronová tyreotoxikóza)
- hypotyreóza na podkladě enzymatických defektů a vlivem léčby (tyreoidektomie, léčba radiojodem, tyreostatiky, lithiem, amiodaronem)(10)

3.5 Možnosti diagnostiky onemocnění štítné žlázy

Vyšetření poruch štítné žlázy je podmínkou včasného zajištění správné léčby.

U diagnostiky dochází k vzájemnému prolínání klinických a laboratorních činností. Pro správnou identifikaci různých klinických projevů dysfunkcí štítné žlázy jsou důležité výsledky laboratorních testů, které indikují praktičtí lékaři, kteří pak na základě výsledků produkovaných spolehlivou metodou určí diagnózu. Při podezření na onemocnění štítné žlázy má lékař možnost volit nejenom laboratorní vyšetření, ale i další z následujících tří základních okruhů:

1. Posouzení funkce štítné žlázy

Zde je nutno vycházet z klinických poznatků v podobě subjektivních obtíží a objektivních příznaků (jsou shrnuty v následující tabulce 1), na základě kterých pak volíme adekvátní laboratorní vyšetření ke zjištění typu funkční poruchy.

	Hypotyreóza	Tyreotoxikóza
Subjektivní potíže		
tolerance tepla	zimomřivost	termofobie, pocení
spánek	spavost	nespavost
pocit výkonnosti	snížený, hlavně psychické	zpočátku pocit výkonnosti, u těžších forem vyčerpanost
chuť k jídlu	snížená či normální	obvykle zvýšená (i výrazně)
zažívací potíže	obstipace, meteorismus	průjmy či častější stolice
oběhové potíže	0	palpitace, pocity nepravidelnosti tepu
pohybové potíže	ztuhlost, bolesti kloubů, svalů	svalová slabost, třes, bolesti ramen
Objektivní potíže		
změny tělesné hmotnosti	obvykle růst	pokles (až o 5-10 kg za měsíc)
psychické a nervové změny	zpomalenost, ztížené vybavování, zpomalení reflexů	překotnost, neklid, dráždivost, snadno vybavitelné reflexy
oběhové změny	bradykardie, tiché ozvy, ↓systolicko-diastolický rozdíl TK	tachykardie, arytmie (fibrilace síní) ↑systolicko-diastolický rozdíl TK
kožní změny	hrubá suchá kůže, myxedém	jemná, teplá, opocená kůže, prořídlé ochlupení, dermatografismus
oční změny	otoky víček	vyšší lesk bulbů, retrakce víček, u GB tyreotoxikózy známky orbitopatie

tabulka 1 Příznaky a nálezy při poruše funkce štítné žlázy (11)

2. Posouzení velikosti a tvaru št. žlázy, jejích strukturálních změn a vztahu k okolí

Zde je využíváno hlavně ultrasonografické vyšetření. Posuzují se také změny echogenity tyreoidálního parenchymu a průtoku krve v jednotlivých oddílech št. žlázy. K pomocným metodám je zařazena scintigrafie, rtg a CT vyšetření krku a mediastina.

3. Posouzení etiopatogeneze onemocnění

Zde je důležité vyšetření jodurie, které pomáhá odhalit jodopenii jako příčinu vzniku onemocnění. Dále se provádí stanovení protilátek proti tyreoidální peroxidáze (anti-TPO) a protilátek proti tyreoglobulinu (anti-Tg), které umožní diagnostiku autoimunitního zánětu. Pro diagnostiku maligních onemocnění není dostatečné žádné z předchozích uvedených vyšetření. Provádí se cytologické vyšetření tkáně št. žlázy získané punkcí tenkou jehlou, nejlépe pod sonografickou kontrolou. Takto lze spolehlivě diagnostikovat většinu tyreoidálních uzlů, nelze ji však pokládat za dostatečně spolehlivou pro zhodnocení folikulárních neoplazií (12).

3.6 Laboratorní diagnostika

3.6.1 Důvody nutnosti spolupráce mezi endokrinologem a laboratoří

Výsledky laboratorní diagnostiky mohou být pro indikujícího lékaře významným přínosem, je-li k nim přiložen komentář založený na znalosti metody a na relevantní klinické informaci. Pokud po vyšetření není zcela jasná diagnóza, je vhodné odeslat pacienta ke klinickému endokrinologovi, který si vyžádá další vyšetření, která budou spíše zaměřena na potvrzení abnormalit. I tady je však nutná úzká spolupráce mezi endokrinologem a klinickým biochemikem, jejíž výhodou je, že umožňuje vyvinutí optimální strategie tyreoidálního testování. Spolupráce snižuje frekvenci nadbytečných vyšetření a možnost nevhodné léčby.

Je velmi důležité, aby laboratoř měla k dispozici data o funkční citlivosti TSH testu, o detekčním limitu tyreoglobulinového testu a o případné interferenci tyreoglobulinových protilátek a také o faktorech, které ovlivňují metody pro měření celkového a volného T₄ a o původu svých referenčních intervalů.

Při zavádění jakýchkoli nových testů by mělo být samozřejmostí provedení validace a srovnání s již dříve používanými metodami. Zároveň by se laboratoř neměla dopouštět častých a neohlášených změn v metodologii testů.

Naopak klinický biochemik má důvod očekávat, že mu endokrinolog poskytne relevantní klinické informace a bude mít realistické nároky na možnosti laboratorních testů.

3.6.2 Preanalytická fáze

Pro diagnostiku tyreopatií jsou laboratorně vyšetřovány hormony štítné žlázy a protilátky, jedná se o analyty které jsou poměrně odolné a jejich koncentrace se vlivem okolních podmínek mění jen minimálně. Nejcitlivějším parametrem je fT_4 , stabilita všech ostatních je vyšší.

Ke stanovení je používáno sérum, které je nutno separovat do 48 hodin po odběru. Při laboratorní teplotě se měřená koncentrace nemění minimálně po dobu 2 dnů, při uchování v lednici (4-8 °C) je stabilní minimálně týden, ve zmraženém stavu (-20 °C) je stabilní více než rok.

Toto je všeobecné doporučení, pokud si pracovník provádějící odběr není jistý způsobem uchovávání a odeslání vzorku, je nutno toto zjistit (nejlépe u laboratoře kde je vyšetření prováděno) ještě před provedením odběru, aby se zamezilo vzniku chybných výsledků.

Test	Vzorek
tyreotropní hormon (TSH)	sérum – po dobu 24 h možno uchovávat 2-8 °C, při delším skladování -20 °C
celkový tyroxin (tT_4)	sérum - po dobu 48 h možno uchovávat 2-8 °C, při delším skladování -20 °C
volný tyroxin (fT_4)	sérum – po dobu 48 h možno uchovávat 2-8 °C, při delším skladování -20 °C
celkový trijotyronin (tT_3)	sérum – po dobu 24 h možno uchovávat 2-8 °C, při delším skladování -20 °C
volný trijotyronin (fT_3)	sérum – po dobu 48 h možno uchovávat 2-8 °C, při delším skladování -20 °C
tyreoglobulin (Tg)	sérum – ihned zmrazit
vazebný globulin pro tyroxin (TBG)	sérum – ihned zmrazit

Pokračování tabulky na další straně.

Test	Vzorek
protilátky proti tyreoidální peroxidáze (TPO Ab)	sérum konzervovat při teplotě -20 °C
protilátky proti tyreoglobulinu (TG Ab)	sérum konzervovat při teplotě -20 °C
protilátky proti TSH receptoru (TSH-R Ab, TR Ab, TRAK)	sérum – po dobu 72 h možno uchovávat 4-8 °C, při delším skladování -20 °C
kalcitonin	sérum nebo plazma (heparin) ihned zmrazit na -20 °C

tabulka 2 Některé vybrané analyty, typ materiálu ke zpracování a způsob jeho uchování

3.6.2.1 Interference

U pacientů léčených heterofilními protilátkami může dojít k interferenci těchto protilátek při stanovení imunochemickou metodou. Při neočekávaném výsledku je vhodné u těchto pacientů zkontrolovat vyšetření systémem od jiného výrobce.

Koncentrace T_4 a T_3 je ovlivněna relativně často, vhodnější je používat vyšetření jejich volných frakcí, u kterých jsou interference minimální. Koncentrace TSH je ovlivněna minimálně a význam má především u hraničních hodnot. Například suprimovaná hodnota bývá diagnostikována při některých akutních stavech u starších pacientů, je také možné ovlivnění léky, hormonálními změnami a tyto stavy musíme znát při hodnocení subklinických stavů. Uvedené interference jsou shrnuty v tabulce na následující straně.

Hodnocení funkce štítné žlázy by nemělo být prováděno v případě akutních stavů, dokud neodezní těžké onemocnění, s výjimkou případů, kdy klinická pozorování svědčí pro pravděpodobnou tyreoidální dysfunkci, která by mohla negativně ovlivnit uzdravení.

	Odběr vzorku a preanalyt. fáze	Netyreoidální choroby a stavy		Lékové interference	
		snížení	zvýšení	snížení	zvýšení
T₃, fT₃	venózní sráživá krev	těžká onem., energetická malnutrice, stáří, alkoholismus, hladovění, stres, kouření, spánek, horečnaté stavy, tělesné cvičení	zatažení paže při odběru nad 3 min., ↑ příjem potravy (sacharidy), těhotenství, estrogény, nádory hypofýzy produkující TSH	β-blokátory, glukokortikoidy, amiodaron, fenytoin, carbamazepin	amiodaron, kontraceptiva, methadon
T₄, fT₄	venózní sráživá krev	↓ katabolismu, jaterní onem., stáří, alkoholismus, hladovění, kouření, spánek, horečnaté stavy, tělesné cvičení, renální insuficience, pravidelná dialyzační léčba	zatažení paže při odběru nad 3 min., ↑ příjem potravy, těhotenství, estrogény, nádory produkující TSH, hospitalizace	nesteroidní antirevmatika, furosemid, amiodaron, fenytoin, carbamazepin, lithiové preparáty	kys. acetylsalicylová, amiodaron, kontraceptiva, methadon, heparin, heroin
TSH	venózní sráživá krev	akutní těžká onem., stáří, hladovění, kouření, těhotenství,	cvičení, menopauza, menstruační cyklus (max. 16 den), stres, těhotenství, kouření, jaterní choroby	amiodaron, dopamin, glukokortikoidy, heparin, morfin, somatostatin, carbamazepin, cyproheptadin	amiodaron, antagonisté dopaminu (metoklopramid, fytoestrogény, neuroleptika (vzrůst až o 50 %), klomifen, tricyklická antidepresiva,
TBG	venózní sráživá krev	chronické jaterní choroby, vrozená deficience TBG, malnutrice, dysproteinémie	vrozené zvýšení TBG, hypotyreóza, akutní hepatitida, těhotenství, tělesná zátěž, menopauza	androgeny, anabolické steroidy, glukokortikoidy, kys. nikotinová	hormon. antikoncepce, HRT, estrogény, tamoxifen, methadon
Tg	venózní sráživá krev, je vhodné současně stanovovat i Tg Ab	pokles od narození do dospělosti	benigní onemocnění št. žlázy (záněty, eufunkční struma), těhotenství,		

	Odběr vzorku a preanalyt. fáze	Netyreoidální choroby a stavy		Lékové interference	
		snížení	zvýšení	snížení	zvýšení
Kalcitonin	sérum separovat v chlazené centrifuze co nejdříve, transport na ledové tříšti, diurnální variabilita s max. mezi 24. a 2. h	tělesné cvičení, menopauza, pokles s věkem	alkohol, laktace, pokročilejší těhotenství, sacharidy		

tabulka 3 Interference některých okolností, které mají vliv na výsledek vyšetřovaného analytu (13)

3.6.3 Vyšetřované analyty – stručný přehled

- 1) Tyreotropin (TSH)
- 2) Trijodtyronin (T_3), celkový trijodtyronin (t T_3) a volný (f T_3)
- 3) Reverzní trijodtyronin (r T_3) – pouze na speciálních pracovištích (např. Endokrinologický ústav Praha)
- 4) Tetrajotyronin (T_4), celkový tyroxin (t T_4) a volný (f T_4)
- 5) Tyreoglobulin (Tg)
- 6) Protilátky proti tyreoglobulinu (anti-Tg, TgAb)
- 7) Protilátky proti peroxidáze (anti-TPO, TPOAb)
- 8) Protilátky proti TSH receptorům (anti-rTSH)
- 9) Protilátky proti orbitální tkáni – pouze výzkumně (anti- T_3 , anti- T_4 , anti-TSH)
- 10) Thyreokalcitonin (kalcitonin)
- 11) Tyroxin vázající globulin v séru (TBG)
- 12) Jodurie

3.6.4 Doporučený algoritmus vyšetření jednotlivých analytů

Spektrum tyreoidálních markerů je v současné době velmi široké, mnohdy jsou prováděna vyšetření, která o konkrétním onemocnění nemají dostatečnou vypovídací hodnotu. Pouze cílený způsob výběru jednotlivých vyšetření umožní stanovit spolehlivě diagnózu bez současného neefektivního provádění relativně finančně náročných metod (14).

V České republice zatím neexistuje přesně stanovený doporučený postup vyšetření jednotlivých parametrů štítné žlázy. V USA tento postup vypracován je (Laboratory Support for the Diagnosis and Monitoring of Thyroid Disease vydaný National Academy of Clinical Biochemistry) mimo jiné jsou zde definovány podmínky pro screening onemocnění št. žlázy v populaci. Základní podmínkou je, že musí být prováděn u ambulantních nemocných. Horním kritériem pro „normu“ je pro nás nezvyklá hladina TSH (2,5 mU/l) a je doporučeno při překročení této meze doplnit vyšetření anti-TPO a kontrolovat hladinu TSH každé 3 měsíce. Takový screening by měl zajistit své opodstatnění u rizikových populačních skupin. Zatím však není prováděn ani v USA (15).

Přestože existují snahy o vypracování a zavedení doporučeného postupu i u nás, probíhá vyšetření při podezření na onemocnění štítné žlázy v praxi převážně podle rutinních návyků jednotlivých lékařů, převážně tímto způsobem.

Základním vyšetřením se stává stanovení TSH (pomocí vysoce citlivých metod 3. generace), je-li výsledek ve fyziologickém referenčním rozmezí, je možno s vysokou pravděpodobností říci, že se nejedná o hypertyreózu nebo hypotyreózu.

Při patologicky nízkých hodnotách je nutno doplnit vyšetření stanovením fT_4 pro potvrzení diagnózy hypertyreózy. Pokud je hodnota fT_4 normální je třeba ještě stanovit T_3 nebo fT_3 , protože hladina T_3 se někdy u hypertyreózy zvyšuje dříve než hladina fT_4 . K tomuto dochází např. u stavu označovaného jako T_3 -hypertyreóza (T_3 -tyreotoxikóza).

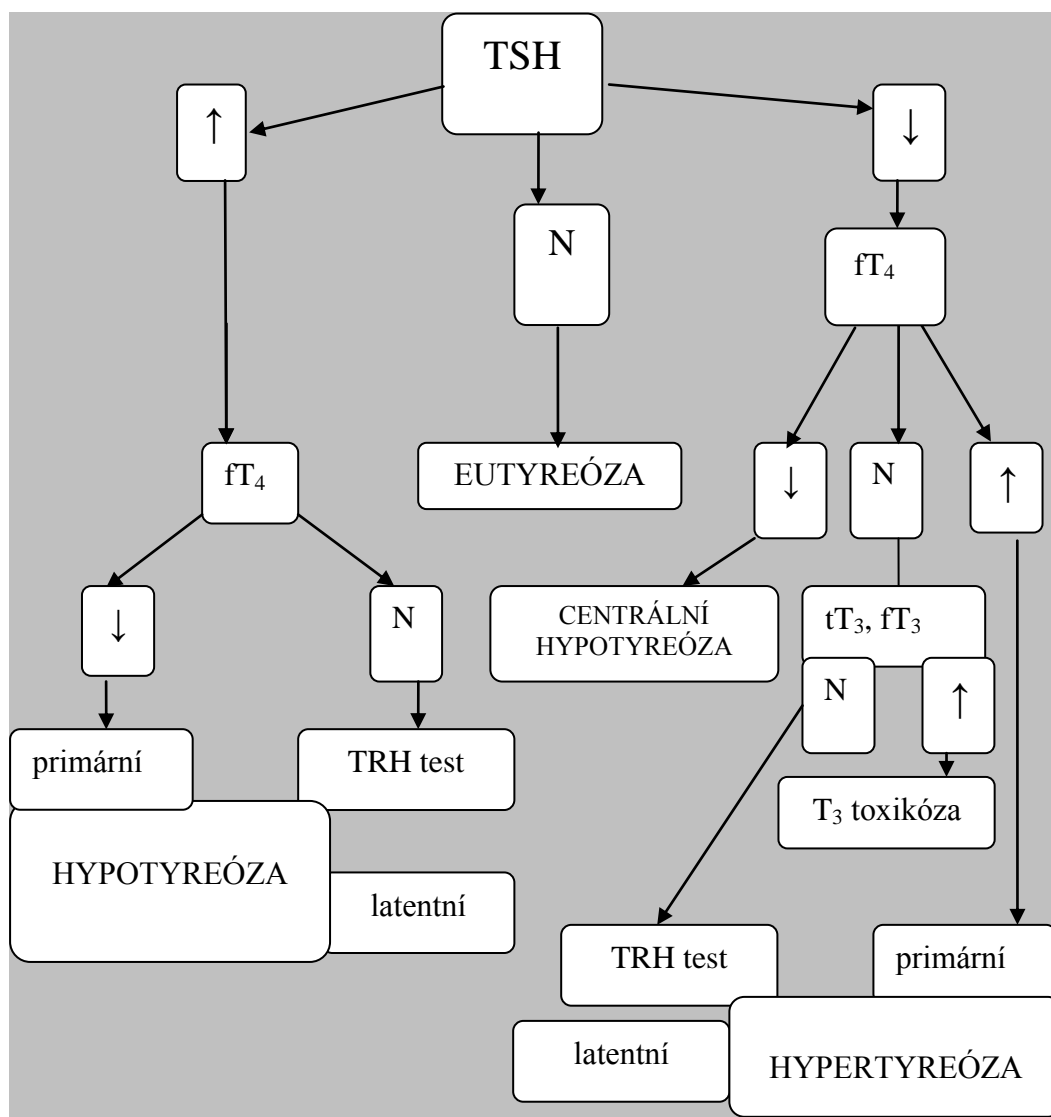
U subnormálních hodnot TSH je doporučováno ještě vyšetřit TRH/TSH stimulační test pro odhalení latetní hypotyreózy.

Při zvýšení TSH nad 10 mU/l je potvrzena diagnóza hypotyreózy. Další vyšetření je vhodné při nejasnostech, chybění klinické symptomatologie, potvrzení etiologie (protilátky), eventuálně při potřebě podrobnějšího upřesnění saturace tkání periferními

hormony. Pro diagnózu centrální etiologie hypotyreózy je nutné vyšetřit fT_4 (T_4), popřípadě fT_3 (T_3), protože hodnoty TSH u těchto nemocných nejsou informativní.

Rizikovými faktory hypotyreózy a tedy i indikací k vyšetření št. žlázy jsou: ženy s věkem nad 45 let, muži nad 60 let, rodinný výskyt autoimunitního onemocnění štítné žlázy, neplodnost, potrat, přítomnost strumy, jiná autoimunitní onemocnění (diabetes mellitus 1. typu, vitiligo, Addisonova choroba, perniciózní anemie, vystavení hlavy a krku radiaci, léky (lithium, amiodaron), dyslipidemie (16).

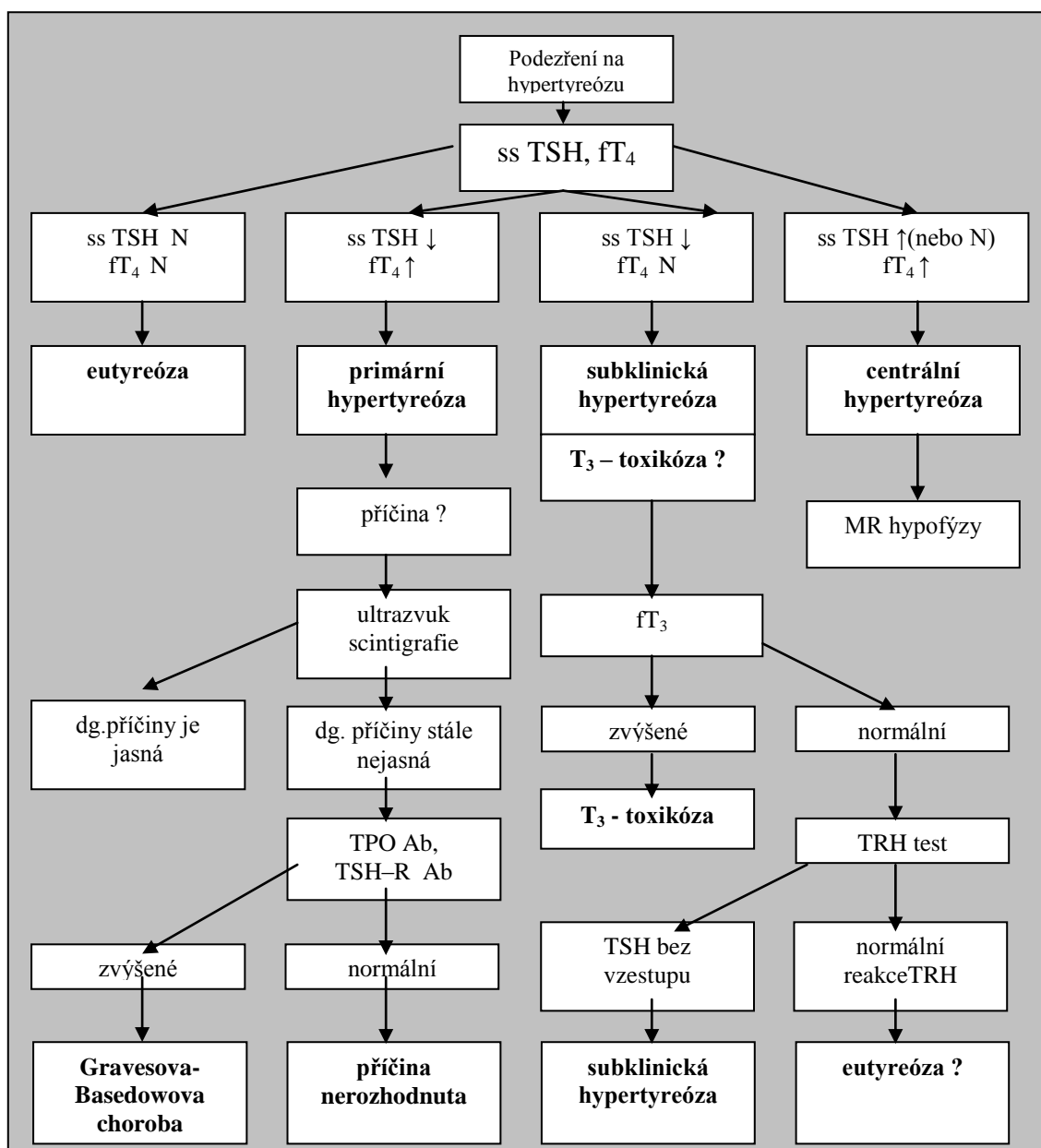
Na následujícím schématu je naznačený výše uvedený postup při diagnostice.



Obrázek 3-6 Schéma doporučeného algoritmu pro funkční vyšetření št. žlázy. N-normální nález (17)

3.6.5 Diagnostika k od odlišení jednotlivých forem hypertyreózy

Prevalence hypertyreózy je udávána od 0,2 do 1 % populace (18). Laboratorní screening na hypertyreózu se nedoporučuje bez klinické indikace. Teprve po naměření hodnot TSH < 0,01 mU/l testem s vysokou funkční citlivostí by měly být dovyšetřeny další analyty, které umožní určit přesnou diagnózu. Jednotlivé kroky postupu stanovení konečné diagnózy znázorňuje následující schéma.

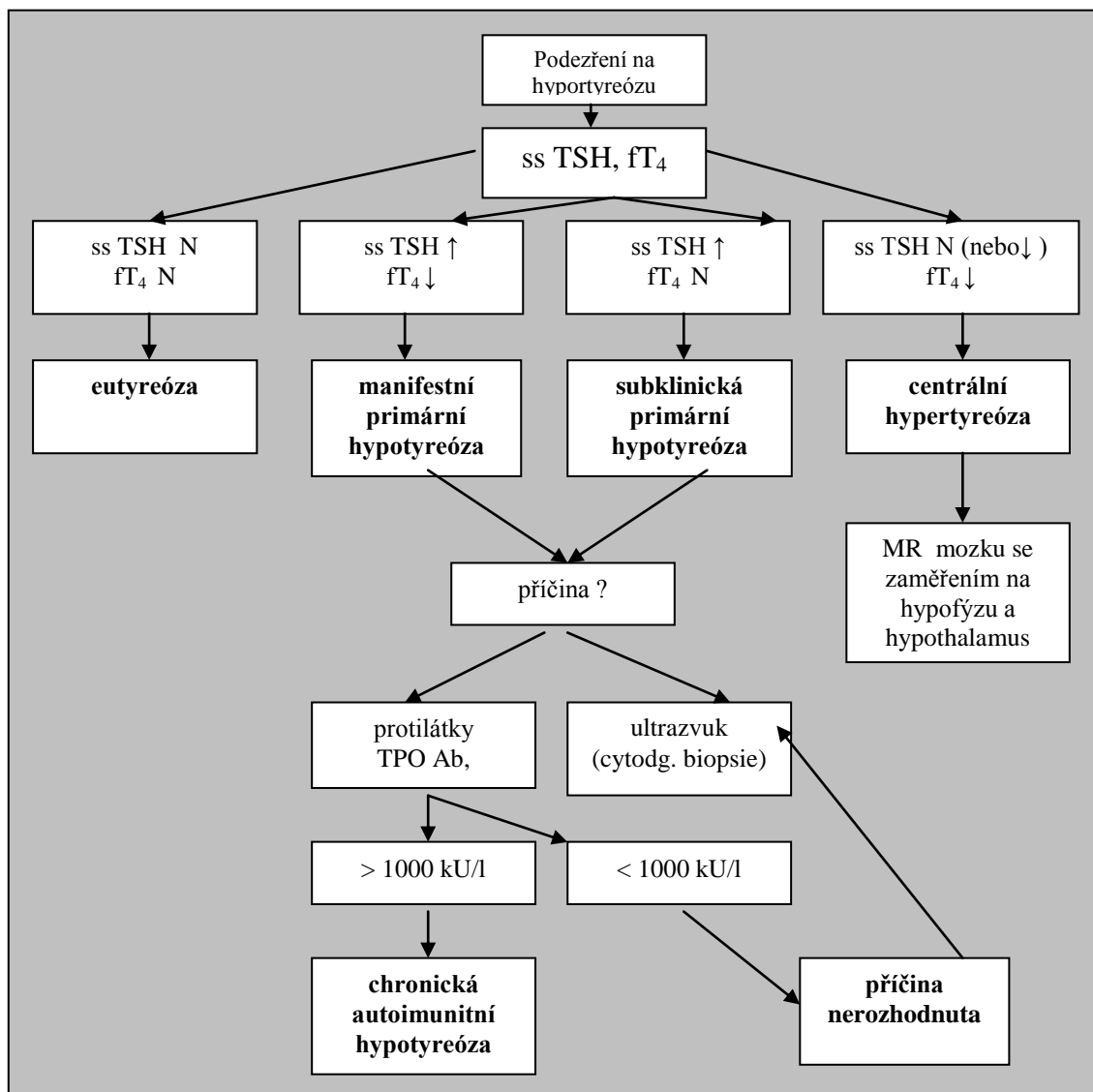


obrázek 3-7 Scéma diagnostických postupů při průkazu a rozlišení jednotlivých forem hypertyreózy, N = normální hodnota, ssTSH = vyšetření pomocí supersenzitivních metod (19)

Zvláštní pozornost je třeba věnovat vyšetření u těhotných žen, kdy se může v prvním trimestru objevit tzv. *biochemická hypertyreóza gravidních*, která je způsobena rostoucí hladinou choriového gonadotropinu (HCG), který má strukturálně podobnou podjednotku s TSH, takže se při vysokých titrech váže na receptory pro TSH a stimuluje tyreocyty k tvorbě hormonů.

Také onemocnění GB chorobou u těhotných je důležité pečlivě sledovat, neboť protilátky proti TSH receptoru jsou schopny přecházet přes placentární bariéru, což může vést k tyreopatii a vzniku endokrinní orbitopatie u plodu (20).

3.6.6 Diagnostika k odlišení jednotlivých forem hypotyreózy



Obrázek 3-8 Schéma diagnostických postupů při průkazu a rozlišení jednotlivých forem hypotyreózy (21)

Od hypotyreózy je nutno odlišit syndrom nízkého T_3 neboli *sick thyroid syndrom*, který je projevem odlišné periferní dekodace a dalších metabolických změn při běžných chorobách (sepsa, infarkt myokardu, závažný úraz atd.), ale i při radikální redukční dietě (22).

3.7 Analýza jednotlivých parametrů

3.7.1 Stanovení hormonů

Pro stanovení celkových koncentrací hormonů T_3 a T_4 je nutné jejich uvolnění z vazby na transportní bílkoviny, k tomu je používán například NaOH. Tento tzv. *uvolňovací krok* a koncentrace vazebných bílkovin může výrazně ovlivnit konečný výsledek vyšetření.

Pro stanovení volných forem hormonů fT_3 a fT_4 je zase komplikací skutečnost, že jsou měřeny hodnoty koncentrací přibližně o tři řády nižší než u celkových koncentrací.

Pro stanovení celkové koncentrace hormonů existují referenční metody (plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií), kterými jsou testovány komerčně dostupné standardy, přesto však různé imunochemické reakční systémy mohou poskytovat poněkud odlišné výsledky. Proto i všechny následující uváděné fyziologické hodnoty (referenční meze) nelze pokládat za přísně stanovené, ale jsou uvedeny spíše pro představu o rozmezí jednotlivých hodnot. Pro lékaře jsou vždy rozhodující referenční meze stanovené laboratoří, která stanovení prováděla. Ze stejného důvodu se doporučuje provádět vyšetření vždy ve stejné laboratoři.

Pro volné formy hormonů není standardizace možná, protože zatím neexistuje referenční materiál.

3.7.1.1 Tyreotropin

Měření sérových koncentrací tyreotropinu (TSH) spolu s fT_4 má zásadní význam v diagnostice tyreopatií. Využívá se hlavně logaritmicko-lineárního vztahu mezi koncentrací fT_4 a produkcí TSH, jehož koncentrace vzrůstá až 160x při poklesu fT_4 na poloviční hodnoty.

Relativně významná je diurnální variabilita TSH s pulsní sekrecí, s maximem mezi půlnocí a 4. hod.ranní a minimem mezi 7.-13. hodinou. Pro klinickou praxi to věršinou

nemá význam, protože odběry krve by měly být prováděny ráno, tedy mimo období peaku. Denní hodnoty jsou až poloviční proti nejvyšší noční koncentraci (23).

Funkční senzitivita metody pro stanovení TSH

Pro výběr metody stanovení a její posouzení je rozhodující funkční senzitivita (citlivost) metody.

Funkční citlivost je veličina založená na přesnosti mezi sériemi při měření nízkých hodnot získaných pomocí standardizovaného protokolu. Obecně to je vyšší hodnota než analytická citlivost a je klinicky významnější, protože odráží citlivost testu při používání v průběhu určité doby.

Funkční citlivost je definována jako hodnota TSH, při níž je variační koeficient (CV) mezi sériemi roven 20 %. Tato procentní hodnota, i když je poněkud náhodná, obsahuje jak analytické, tak biologické odchylky v čase a odráží tak praktickou použitelnost testu.

Z tohoto důvodu by bylo méně zavádějící, kdyby k popisu citlivosti testu byla používána právě funkční citlivost než často používané rozdělení podle tzv. *generace testu*. Nebo alespoň, aby testem 3. generace byly nazývány skutečně jen ty, které mají funkční citlivost $< 0,02$ mU/l.

Pro radioimunotesty vyvinuté před 30 lety byla typická citlivost 1-2 mU/l. Dnešní běžné neizotopové imunochemické metody mají citlivost 0,01 až 0,02 mU/l.

Tyto nové metody využívají monoklonálních protilátek proti TSH, které jsou navázány na pevné fázi, jejichž použitím byl eliminován problém nedostatku specifity způsobený dalšími glykoproteinovými hormony.

Specifičnost metod pro stanovení TSH

Dalším požadavkem na TSH metody je specifita. V tomto případě se vztahuje ke schopnosti testu měřit vše co deklaruje a nic jiného. Struktura molekuly TSH cirkulující v krvi není úplně shodná se strukturou přítomnou v hypofýze nebo v hypofyzárním extraktu používaném pro standardizaci. Záchytné monoklonální protilátky na pevné fázi používané v běžných imunochemických metodách na měření TSH mohou mít v některých sérech rozdílnou specifitu pro epitopy izoform sérového TSH ve srovnání s TSH z hypofyzárního extraktu. Tyto rozdíly jsou však zjevně klinicky nepodstatné a nevedou k rozdílu v referenčním rozsahu.

Standardizace by přesto byla přesnější, kdyby bylo možné použít zvážený a chemicky definovaný standard místo tkáňového extraktu definovaného v arbitrálních jednotkách. Proto je do budoucna cílem použití rekombinantního lidského TSH pro gravimetrickou standardizaci metod k měření sérového TSH (24).

Pokles specifičnosti mohou způsobit heterofilní protilátky a jiné méně dobře definované složky v séru u některých vzorků. Tento problém se pak může projevit výsledkem neodpovídajícím klinickému stavu pacienta. Laboratoř by pak, po upozornění od lékaře, měla být schopna zkontrolovat identitu vzorku, zopakovat test s novým vzorkem, použít jinou metodu, zkontrolovat linearitu ředění nebo navrhnout zopakování testu po supresi orálním T₄ nebo po stimulaci pomocí TRH.

Fyziologické hodnoty TSH (25) – dle Tietze, 1994:

- novorozenci (1-4 dny) 1,0-38,9 mU/l
- kojenci (2 týdny-2 roky) 0,8-9,1 mU/l
- děti (2-20 let) 0,7-5,7 mU/l
- dospělí (21-54 let) 0,4-4,2 mU/l
- dospělí (55-87 let) 0,5-8,9 mU/l

Patologické zvýšení:

- primární hypotyreóza (poškození št. žlázy a neschopnost produkovat adekvátní množství T₄ a tím i T₃)
- kongenitální hypotyreóza (vrozená ageneza št. žlázy)
- sekundární hypotyreóza (hypofyzární nebo hypothalamová léze s defektem tvorby TSH nebo obojího)

Patologické snížení:

- hypertyreóza
- non-tyreoidální hypertyreóza - hodnoty se často pohybují mezi 0,02-0,15 mU/l

3.7.1.2 TRH test

Dnes se tohoto testu využívá spíše ojediněle, ale může být použit tam, kde není zcela potvrzena diagnóza subklinické hypertyreózy. Test spočívá ve stimulaci TSH hypothalamickým hormonem uvolňujícím TSH – thyreoliberinem (TRH).

Provádí se tak, že se pacientovi aplikuje intra venózně 200 µg TRH jako bolus. Je doporučeno provádět test vleže, protože po i.v. aplikaci léku může dojít ke kolapsovému stavu, pocitu náhlého horka a alergické reakci. Krev na stanovení je odebírána před aplikací, za 20-30 minut a za 60 minut po aplikaci.

Hladina TSH dosahuje vrcholu již za 20 minut, výjimkou jsou hypothalamické hypotyreózy.

Přírůstek v hladinách TSH se pohybuje mezi 4-15 mU/l a závisí na věku a pohlaví (s přibývajícím věkem klesá a je menší u mužů).

3.7.1.3 Stanovení celkového tyroxinu

Tyroxin (T_4) je hlavním hormonem secernovaným št. žlázou v denním množství asi 80 µg. Jeho biologický poločas v krevním oběhu je asi 190 hodin a nástup plného účinku je 2-3 týdny. Je vlastně prohormonem, protože působením dejodáz je ve tkáních přeměňován na T_3 . Jeho měření není nutné při diagnostice primární hypotyreózy, jeho stanovení se používá k diagnostice některých nezvyklých tyreoidálních dysfunkcí. Jeho hladina je výrazně ovlivňována změnami koncentrací sérových proteinů.

Metody pro stanovení T_4

Testy ke stanovení obsahují vysoce afinitní protilátky specifické pro testovaný hormon. Endogenní hormony v séru soutěží s daným množstvím přidaného, značeného hormonu o dané množství vazebných míst na přidaných protilátkách. Výsledný signál se liší podle množství hormonu ve vyšetřovaném séru, může být přímo nebo nepřímo úměrné tomuto signálu v závislosti na stavbě testu. Během analýzy musí být zabráněno vazbě endogenních i značených hormonů na thyronin vazebné-proteiny. Reakce zahrnuje kompetitivní vznik vazby mezi přidanými a endogenními hormony k přidaným protilátkám. Endogenní hormony přitom zahrnují i ty původně vázané na sérové proteiny. (Platí i pro T_3)

Požadavky na metody pro stanovení T₄

Variabilita měření je složena z analytických odchylek metod, z biologických odchylek mezi jednotlivci (intraindividuální) a z biologických odchylek mezi jedinci (interindividuální).

Při měření pro potvrzení nebo vyloučení choroby je relevantní biologická odchylka složená z intraindividuálních a interindividuálních odchylek.

Pro monitorování změn u jednoho jedince v čase (monitorování léčby) je relevantní pouze intraindividuální odchylka.

Požadavky na systematickou odchylku a přesnost lze vypočítat, pro diagnostiku je doporučena syst. odchylka < 3 % , pro monitorování < 1 % . Hodnota přesnosti je pak doporučena pro diagnostiku < 6 % , pro monitorování < 3 % (26).

Pracovní rozsahy

Rozsahem je rozumněno rozpětí mezi dolní a horní hranicí kalibrace. Ideální by bylo, kdyby rozsah zahrnoval všechny hodnoty pacientů. Testy které jsou v současné době na trhu ale tuto vlastnost nemají, jsou nastaveny alespoň tak, aby zahrnovaly co nejširší skupinu nemocných. Doporučený pracovní rozsah vzhledem k referenčním hodnotám je 20 % dolního limitu a 200 % horního limitu. Vzorek který obsahuje vyšší hladinu hormonu než je pracovní rozsah, je možno naředit tak, aby bylo dosaženo měřitelné hodnoty.

Fyziologické hodnoty (27):

- novorozenci 120-200 nmol/l
- kojenci (1-2dny) 180-240 nmol/l
- kojenci (3-30dnů) 140-220 nmol/l
- kojenci (1-12měs.) 110-170 nmol/l
- děti (1-6let) 90-140 nmol/l
- děti (7-12let) 80-130 nmol/l
- děti (13-17let) 70-120 nmol/l
- dospělí 50-170 nmol/l

Patologické zvýšení:

- hypertyreóza

- GB-choroba
- autonomní adenom št. žlázy
- diseminované adenomy
- časná stadium subakutní Quervainovy tyroiditidy
- časná stadium chronické Hashimotovy tyroiditidy
- předávkování hormonem št. žlázy

Patologické snížení:

- hypotyreóza
- chronická Hashimotova tyroiditida
- léčba radioizotopy jódu
- tyreostatická léčba
- snížený obsah nosičových proteinů

3.7.1.4 Stanovení volného tyroxinu

Protože pouze tato nevázaná frakce z celkového množství T_4 je biologicky účinná dáváme tomuto vyšetření přednost, jeho hladina není ovlivněna sérovými proteiny.

Metody pro stanovení fT_4

Během analýzy musí být zachována endogenní rovnováha mezi vázanými a volnými hormony, aby s přidanými reagensy interagovali pouze volné hormony.

Požadavky na metody stanovení fT_4

Doporučená systematická odchylka pro diagnostiku je $< 4 \%$, pro monitorování $< 2 \%$. Hodnota přesnosti je doporučena pro diagnostiku $< 8 \%$, pro monitorování $< 5 \%$.

Pracovní rozsahy

Doporučený pracovní rozsah vzhledem k referenčním hodnotám je 15 % dolního limitu až 550 % horního limitu.

Vzorky s vysokými hodnotami nelze ředit, protože v tomto případě vede naředění séra k nelineární změně hodnot. Výjimku tvoří pouze metody s přímou dialýzou, protože

dialyzát může být před imunostanovením koncentrací volných hormonů ředěn. (Platí i pro stanovení fT_3)

Fyziologické hodnoty:

- novorozenci (1-5 dní) 29,6-72,1 pmol/l
- děti (2 měs.-14 r.) 10,3-28,3 pmol/l
- dospělí (21-87 r.) 10,3-34,7 pmol/l
- těhotné (1. trimestr) 9,0-25,7 pmol/l
- těhotné (2. a 3. trimestr) 6,4-20,6 pmol/l

Patologické zvýšení:

- hypertyreóza (vzestup nemusí nasadit ihned při nálezu nízké hodnoty TSH)

Patologické snížení:

- hypotyreóza

Přímé stanovení fT_4 lze nahradit:

- poměrem celkového T_4 /TBG
- indexem celkového T_4 /TBI (TBI stanovíme pomocí hodnoty „ T_4 -uptake“ = tyroxine-binding capacity)

Test	Eutyroidismus	Hypertyroidismus	Hypotyroidismus
T_4/TBG	3,9-6,5	> 7,7	< 3,4
T_4/TBI	3,7-13,5	> 13,5	< 3,7

tabulka 4 Interpretace hodnot nepřímých testů(28)

3.7.1.5 Stanovení celkového trijodtyroninu

Štítnou žlázou je denně secernováno asi 20 μ g trijodtyroninu (T_3), jeho biologický poločas v krevním oběhu je 19 hodin a nástup plného účinku je 3-5 dní. Větší část T_3 ovšem vzniká extratyreoidálně z tyroxinu. Jeho hladina v krevním oběhu je vhodná pro diagnostiku hypertyreózy, ale není vhodná pro posuzování hypotyreózy.

V plasmě se také váže na vazebné proteiny, ale ovlivnění koncentrací transportními proteiny již není tak výrazné.

Metody pro stanovení T₃ a požadavky na metody pro stanovení T₃

Tyto se ztotožňují s metodikou pro stanovení celkového T₄.

Pro diagnostiku je doporučena syst. odchylka < 6 % , pro monitorování < 5 %.

Hodnota přesnosti je pak doporučena pro diagnostiku < 12 % , pro monitorování < 5 %.

Pracovní rozsahy

Doporučený pracovní rozsah vzhledem k referenčním hodnotám je 50 % dolního limitu až 200 % horního limitu. Vzorek, který obsahuje vyšší hladinu hormonu než je pracovní rozsah, je možno naředit tak, aby bylo dosaženo měřitelné hodnoty.

Fyziologické hodnoty:

- pupečník 0,08-2,17 nmol/l
- děti (1-3 dny) 1,54-11,4 nmol/l
- děti (1-11 měs.) 1,62-3,77 nmol/l
- děti (1-5 roků) 1,62-4,14 nmol/l
- děti (6-10 r.) 1,45-3,71 nmol/l
- děti (11-15 r.) 1,26-3,28 nmol/l
- děti (16-20 r.) 1,23-3,23 nmol/l
- dospělí (20-50 r.) 1,08-3,14 nmol/l
- dospělí (50-90 r.) 0,62-2,79 nmol/l
- těhotné (po 5. měsíci) 1,79-3,80 nmol/l

Patologické zvýšení:

	současné ↑ T₄	současné ↓ T₄ nebo normální
↑ T₃	- dekompenzovaná hypertyreóza - dekompenzovaný autonomní adenom - ↑ hladina transportních proteinů (těhotenství, estrogeny, inhibitory ovulace)	- izolovaný T ₃ -hypertyreoidismus - hypertyreóza léčená tyreostatiky - struma z nedostatku jódu - Hashimotova tyreoiditida - terapie trijodtyroninem - deficiencie TBG s hypertyreózou - interference protilátek

Patologické snížení:

	současné ↓ T ₄	současné normální T ₄
↓ T ₃	-dekompenzovaná primární nebo sekundární hypotyreóza -ztráta TBG -dekompenzovaná cirhóza jater -genetický defekt TBG	-stáří -neonatální perioda -hladovění -terapie kortikoidy -větší operace

3.7.1.6 Stanovení volného trijodtyroninu

Právě tato volná frakce je biologicky nejúčinnější, proto opět preferujeme vyšetření volného trijodtyroninu (fT₃) před T₃. Stanovení fT₃ je indikováno při diagnostice T₃-toxikózy, hypertyreózy s převážnou sekrecí trijodtyroninu, kdy je sice suprimován TSH, ale fT₄ je normální. U centrální hypotyreózy lze využít fT₃ spolu s fT₄ ke kontrole adekvátní léčby.

Metody pro stanovení a požadavky na metody pro stanovení fT₃

Metodika je stejná jako u stanovení fT₄.

Pro diagnostiku je doporučena syst. odchylka < 6 %, pro monitorování < 2 %.

Hodnota přesnosti je pak doporučena pro diagnostiku < 12 %, pro monitorování < 4 %.

Pracovní rozsahy

Doporučený pracovní rozsah vzhledem k referenčním hodnotám je 50 % dolního limitu až 550 % horního limitu. Vzorek s vyššími hodnotami, než je pracovní rozsah nelze ředit.

Fyziologické hodnoty:

- 3-9 pmol/l

Patologické zvýšení:

- hypertyreóza (nástup je rychlejší a výraznější než zvýšení T₄)
- T₃-tyreotoxikóza (snížení TSH s normálním T₄)

3.7.1.7 Stanovení reverzního trijodtyroninu

Reverzní trijodtyronin (rT_3) je metabolicky neaktivní forma. Zvyšuje se v první fázi tzv. *syndromu nízkého T_3/T_4* . Tento syndrom vzniká při silném stresu (těžká, protahovaná onemocnění organismu s katabolismem), kdy dojde k nadměrnému uvolnění T_4 z vazby na transportní bílkoviny, nadměrné množství vzniklého fT_4 vstupuje do buněk, ale přeměně na fT_3 je zabráněno blokací deiodázy typu 1 a naopak aktivací deiodázy typu 3, která modifikuje fT_4 na rT_3 . Takto je organismus chráněn před vznikem metabolické (tyreotoxické) krize. (29) Vyšetření rT_3 se však v běžné praxi neprovádí.

Fyziologické hodnoty:

- pupečník 2,0-4,62 nmol/l
- dospělí 0,15-0,43 nmol/l

3.7.1.8 Stanovení tyreoglobulinu

Tyreoglobulin (Tg) je prohormonem pro intratyreoidální syntézu T_4 a T_3 , po chemické stránce se jedná vysokomolekulární glykoprotein (650 kDa). Přestože cirkulující Tg pochází pouze z tyreoidální tkáně, jeho zvýšená hladina není specifická pro určitou chorobu, její měření má pouze omezené klinické využití. U pacientů s určenou diagnózou diferencovaného nádoru št. žlázy je po léčbě (operace, ozáření) využíván jako nádorový marker.

Také je využíván v pediatrické endokrinologii při diagnóze úplného kongenitálního chybění št. žlázy a při diagnostice předávkování tyreoidálních hormonů, kde jsou jeho hladiny potlačené.

U stanovení Tg je doporučeno současně provádět vyšetření anti-Tg. Pokud je test koncentrace protilátek proti Tg pozitivní, měla by laboratoř udávat, zda tato interference u použité metody způsobuje podhodnocení nebo nadhodnocení sérových koncentrací Tg.

Metody pro stanovení Tg

Dříve využívaná radioimunoanalýza (RIA) je nahrazována neizotopovými imunochemickými metodami, které mají kratší inkubační časy, širší pracovní rozsah a stabilnější reagentie se značenou protilátkou méně náchylnou k poškození značky.

Požadavky na metody pro stanovení Tg

Variabilita mezi metodami je způsobena používáním protilátek proti Tg s rozdílnou specifíčností. Tato variabilita je zatím neodstranitelná, protože nelze vyžadovat, aby všechny metody používaly stejné protilátky.

Citlivost a přesnost je důležitá hlavně u onkologických pacientů, u kterých by měla být hladina Tg po totální tyreoidéktomii nulová.

V případě, že vzorek obsahuje velmi vysokou koncentraci analytu, je nebezpečí, že dojde k naměření nepřiměřeně nízkého výsledku což je označováno jako *háčkový efekt*. Vydání takového falešně nízkého výsledku má závažné důsledky u onkologických pacientů, proto se doporučuje kontrolovat shodu výsledků pro dvě analýzy (neřaděný vzorek, vzorek řaděný 1:10) nebo po každé sérii provést analýzu směsného séra všech měřených vzorků (30).

Fyziologické rozmezí: 0,3-42 µg/l

Hladiny Tg po chirurgem deklarované totální tyreoidéktomii (31):

- 0-15 µg/l (jsou považovány za dokonalou atyreózu)
- 15-80 µg/l (svědčí spíše pro perzistenci normální tyreoidní tkáně, ale mohou být také způsobeny přítomností lokálních uzlinových metastáz)
- 80-200 µg/l (jsou považovány za známku přítomnosti nádorové tkáně)
- nad 200 µg/l (jsou považovány za jednoznačný laboratorní průkaz přítomnosti nádorového procesu, zejména vzdálených metastáz)

Patologické zvýšení:

- folikulární a papilární karcinom tyreoidy
- adenom tyreoidy
- subakutní tyreoiditida
- Hashimotova tyreoiditida
- GB choroba

3.7.1.9 Stanovení kalcitoninu

Kalcitonin je peptidový hormon, který je za normálních okolností produkován v parafolikolárních C-buňkách štítné žlázy. Jeho účinky v organismu spočívají v osteoklastické aktivitě, snižuje sérový vápník a je tedy antagonistou parathyreoidálního hormonu.

V diagnostice onemocnění št. žlázy se jeho hladina stanovuje při podezření na medulocelulární karcinom (MTC). U nemocných s MTC jsou nacházeny vysoké hladiny nebo vzestup kalcitoninu (> 300 pg/ml) (32). Někteří nemocní s medulárním karcinomem však mají bazální hladiny normální, v tomto případě je nutno použít stimulační test s kalcie a pentagastrinem.

Provedení pentagastrinového testu

Pacientovi se aplikuje i.v. kalcium (2mg/kg v průběhu jedné minuty) a následně pentagastrin (0,5 μ g/kg v průběhu 5-10 s). Odběr krve se provádí před aplikací (kalcia a pentagastrinu) a po aplikaci za 2 a 5 minut. Vrchol stimulace bývá již za 2 minuty po aplikaci pentagastrinu.

Hladina kalcitoninu je závislá na použité metodice, lze jej stanovovat v plazmě i séru, zde jsou hodnoty vyšší. Snižují se s věkem a stoupají v graviditě a laktaci.

Fyziologické hodnoty (sérum):

- Muži 3-26 ng/l
- Ženy 2-17 ng/l

3.7.2 Stanovení protilátek

Vzhledem k tomu, že většina primárních onemocnění štítné žlázy se vyvine jako důsledek autoimunitního procesu, při kterém jsou produkovány protilátky proti jednomu nebo více specifickým antigenům št. žlázy jsou prováděna následující vyšetření.

3.7.2.1 Stanovení protilátek proti tyreoidální peroxidáze

Vyšetřování koncentrací autoprottilátek má diagnostický a prognostický význam, protilátky proti tyreoidální peroxidáze (TPOAb, anti-TPO) jsou přítomny v séru 80-90 % pacientů s autoimunitními tyreoiditidami.

Jsou detekovatelné u Hashimotovy choroby, atrofické tyreoiditidy, poporodní tyreoiditidy nebo GB choroby (stanovení protilátek má zde význam pro diferenciální diagnostiku a kontrolu terapie). Spolu s TSH a fT_4 je doporučováno stanovit TPOAb v I. trimestru těhotenství, protože zvýšení může upozornit na nebezpečí rozvoje poporodní tyreoiditidy.

Metody pro stanovení TPOAb

Starší metody stanovovaly antimikrosomální protilátky namířené proti mikrosomálnímu antigenu, který byl ztožňován s TPO. Byly však nespecifické a náchylné k interferenci různých faktorů.

V dnešní době jsou více preferovány metody specifické stanovující TPOAb pomocí lidského, prasečího nebo rekombinantního lidského TPO jako antigenu.

Vyšetřování by mělo být prováděno stále stejnou metodikou, každá laboratoř by měla mít vlastní referenční meze získané ze zdravé populace odpovídajících věkových skupin a pohlaví, protože zatím nelze sjednotit ani referenční meze mezi jednotlivými výrobci dodávaných diagnostických souprav.

Požadavky na metody pro stanovení TPOAb

Specifičnost různých testů je rozdílná, i když používají stejný standard, výkonnost testu je dále ovlivněna metodologickými principy, na nichž je test založen a čistotou antigenu.

Při standardizaci metod je hlavním problémem heterogenita tyreoidálních autoprottilátek, různé metody vycházejí kvantitativně odlišně i tehdy, jsou-li

standardizované za použití mezinárodního standardu (MCR 66/387). Proto se doporučuje, aby u každého testu bylo uvedeno, jaký byl použit standard (33).

Fyziologické hodnoty: 69 ± 15 U/ml nebo < 50 mU/l

Patologické zvýšení:

- Hashimotova tyreoiditida (prakticky u všech pacientů)
- GB choroba
- idiopatický myxedém
- souvisí s možností abortu v těhotenství a neúspěšnými pokusy in vitro fertilizace

3.7.2.2 Stanovení protilátek proti tyreoglobulinu

Vyšetření je využíváno ze stejných důvodů jako TPOAb, ale má menší vypovídací hodnotu. Koncentraci protilátek proti tyreoglobulinu (TgAb, anti-Tg) je důležité znát při stanovení Tg, aby se vyloučil jejich rušivý vliv na toto stanovení.

Metody pro stanovení TgAb

Jsou používány chemiluminiscenční imunochemické techniky.

Požadavky na metody pro stanovení TgAb

Některé metody jsou kalibrovány na referenční standard (MRC 65/93), zatímco ostatní využívají afinitní chromatografii nebo vlastní kalibrátory vyrobené ze směsných sér pozitivních na TgAb.

Standardizace je komplikována stejným způsobem jako u TPOAb, ani použití stejných standardů nezajistilo, aby různé metody byly kvantitativně podobné.

Fyziologické hodnoty: $< 0,2$ kU/l

Patologické zvýšení:

- Hashimotova tyreoiditida (autoimunitní, lymfocytární tyreoiditida) TSH ani T₄ nebo T₃ nejsou zvýšeny, s postupnou destrukcí tkáně št. žlázy se vyvíjí hypotyreóza, pak TSH stoupá a T₄ klesá
- přechodné zvýšení je u de Quervainovy tyreoiditidy

3.7.2.3 Stanovení protilátek proti TSH receptorům

Jedná se opět o autoimunitní protilátky, které jsou namířeny proti TSH receptorům přítomným v buněčných membránách buněk št. žlázy. Na TSH receptory mohou mít dvojí účinek a dochází tak buď ke stimulaci nebo inhibici činnosti št. žlázy.

Protilátky proti TSH receptorům (anti-rTSH, TRAK, TRAb) lze tedy rozdělit do dvou podskupin:

- 1) TSI – *immunoglobulin stimulating antibodies*, jejichž účinek spočívá v imitaci funkce TSH, pokud má TSI větší afinitu k receptorům než TSH, dojde k déletrvající stimulaci buněk št. žlázy a tím ke zvýšené produkci T₄ a T₃. Tyto protilátky jsou rozhodujícím faktorem při vzniku GB choroby.
- 2) TBII – *thyroid binding and inhibiting immunoglobulin* jsou autoprottilátky, které po navázání na receptor blokují jeho funkci. TSH se nemůže navázat na takto zablokovaný receptor, receptor přestává být po čase funkční a dochází ke vzniku atrofické tyreoiditidy.

Vyšetření anti-rTSH je vhodné pro diferenciální diagnostiku hypertyreózy (autoimunitního a neautoimunitního původu a vzniklé na podkladě rezistence vůči tyreoidálním hormonům) a sledování její léčby. Používá se také u těhotných žen s přítomnou nebo prodělanou GB chorobou, protože napomáhá ke zhodnocení rizika fetální nebo neonatální tyreotoxikózy.

Metody pro stanovení anti-rTSH

V současné době jsou na trhu pro rutinní vyšetření prováděné v klinické praxi pouze soupravy, které umožňují stanovit oba dva typy protilátek. Nelze pomocí nich rozlišit, zda se jedná o TSI nebo TBII, je důležité připomínat tuto skutečnost, protože i lékaři se

často mylně domnívají, že jde pouze o stanovení TSI. Zvýšené hodnoty anti-rTSH pak mohou být nesprávně interpretovány a využity pro diagnózu GB choroby (34).

Požadavky na metody pro stanovení anti-rTSH

Specifitu metod velmi ovlivňuje fakt, že většina sér s protilátkami proti štítné žláze obsahuje množství antigen specifických imunoglobulinů různých tříd a podtříd.

Standardizace je také velmi ztížena heterogenitou protilátek podobně jako u TPOAb.

Fyziologické hodnoty: < 9,0 U/l

Patologické zvýšení (35):

- Hashimotova tyreoiditida 9-15 U/l
- Hypotyreóza 9-400 U/l
- M.Basedow začínající < 50 U/l
- M.Basedow pokročilý 9-70 U/l
- Struma (eutyoidní) 9-15 U/l
- Tyreotoxická struma 9-15 U/l
- Izolovaný adenom 9-15 U/l
- Karcinom štítné žlázy 9-50 U/l

3.7.3 Ostatní prováděná vyšetření u tyreopatií

3.7.3.1 Stanovení tyroxin vázajícího globulinu

Tyroxin vázající globulin (TBG) je transportní glykoprotein na který je navázáno až 70 % celkového T₄ a T₃, vazba mezi TBG a T₄ je desetinásobně vyšší než vazba mezi TBG a T₃.

Koncentrace TBG v séru se stanovuje při nálezů neočekávaných hodnot T₄ a T₃ v porovnání s koncentrací TSH v séru a klinickým stavem nebo při diskrepancích mezi koncentracemi volného a vázaného T₄. Vyšetření je prováděno také při podezření na nízkou afinitu (geneticky podmíněné varianty).

V případech familiární dyslipidémie je současně s TBG vyšetřen i T_4 , aby bylo možno posoudit funkci štítné žlázy. Rozhodovacím kritériem je pak poměr T_4 /TBG. Vysoké koncentrace TBG v séru mohou být podmíněny geneticky.

Pomalá tvorba nebo úplné absence TBG v krvi (což způsobí nedostatečnou koncentraci T_3 a T_4 , ale nezměněnou koncentraci volných frakcí) může být způsobena vrozenou poruchou tvorby TBG, která je obvykle vázaná na chromozom X.

Malá přenosová funkce TBG pro tyreoidální hormony může být způsobena jeho nízkou koncentrací, ale také obsazením jeho transportní kapacity léčivými salicyláty. Další důvody snížení nebo zvýšení hladiny TBG lékovými interferencemi a z nontyreoidálních příčin jsou uvedeny v tabulce č. 3 na straně 20.

Fyziologické hodnoty: 13-30 mg/l (220-510 nmol/l)

Přepočítací faktor: $17 \cdot \text{mg/l} = \text{nmol/l}$

3.7.3.2 Stanovení jodurie

Stanovení jodidového aniontu v moči je vyšetření, které umožňuje posoudit dostatečný přívod jodu do organismu. V diagnostice tyreopatií je důležité zjistit zda příčinou onemocnění je nedostatek jodu, protože tento stopový prvek je nezbytný pro tvorbu hormonů štítné žlázy.

Ve studii prováděné během let 1995-2002 v ČR byla sledována souvislost mezi jodurií a koncentracemi Tg, TSH, fT_4 a fT_3 v krvi. Bylo zjištěno, že změny koncentrace Tg dobře korespondují se změnami koncentrace jodu v moči. Spolehlivé závěry však nebylo možno vyvodit v případě TSH, fT_4 a fT_3 jako laboratorních ukazatelů stavu zásobení organismu jodem.

Tyreoglobulin je tak tedy lepším ukazatelem deficitu jodu v porovnání s TSH, fT_4 a fT_3 , nevýhodou ale samozřejmě je, že se koncentrace Tg zvyšuje i u dalších patofyziologických stavů souvisejících se štítnou žlázou (36).

Při krátkodobém deficitu není tvorba hormonů ohrožena, jelikož v tyreoglobulinu folikulů je uložena zásoba jodu (asi 2mg), kterým je nízký příjem korigován.

Při delším deficitu (několik měsíců) dojde k vyčerpání této zásoby a manifestaci funkční poruchy.

Ovšem i při dostatečném jodovém zásobení se může objevit porucha funkce vzhledem ke složitosti enzymatických reakcí, které jsou nutné k vychytávání jodu z cirkulace a jeho hromadění proti koncentračnímu spádu v buňkách štítné žlázy (NIS-Natrium Iodine Symporter). Dalšími enzymatickými systémy ovlivňující funkci mohou být TPO, proteázy a dejodázy.

Dostatečný přívod je nutný hlavně u dětí, těhotných a kojících žen. Následující tabulka udává nutný denní příjem pro jednotlivé skupiny populace.

Skupina	µg/l
kojenci a děti do 6 let	90
dospívající	200
dospělí	150-200
těhotné a kojící ženy	200-250

tabulka 5 Nutný denní přívod jodu (WHO, ICCIDD, UNICEF) (37)

Jak již bylo řečeno dostatečné zásobení organismu jodem lze zjistit pomocí jodurie. Vyšetření lze provádět ze vzorku ranní moči nebo moči sbírané za 24 hodin, moč není nutné konzervovat.

Metody pro stanovení jodu v moči

Sandellova-Kolthoffova metoda je laboratorní metodou, která využívá katalytického působení jodidových iontů v redox systému Ce^{4+}/As^{3+} a vzniklé Ce^{3+} ionty jsou měřeny fotometricky. Před stanovením je nutné vzorek mineralizovat. V současné době není tato metoda laboratořemi příliš používána z důvodu časové náročnosti.

Pro stanovení jodidového aniontu v moči byla nově vypracována metoda založená na iontové výměnné chromatografii využívající elektrochemickou detekci.

Vztah mezi zjištěnými hodnotami jodurie a klinickými projevy ukazuje tabulka na následující straně.

Jodurie (µg/l)	Kategorie zásobení jódem	Klinické projevy
pod 20	těžká jodopenie	kretenismus, struma, hypotyreóza
20-49	závažná jodopenie	struma, poruchy poruchy intelektu, jodová tyreotoxikóza
50-99	lehká jodopenie	struma, možné psychické změny, jodová tyreotoxikóza
nad 100	dostatečná saturace jódem	0

tabulka 6 Hodnocení stavu zásobení jódem pomocí jodurie ve vzorku ranní moči (WHO, ICCIDD) (38)

3.7.4 Změny běžných biochemických vyšetření a EKG

Kromě již popsaných charakteristických ukazatelů onemocnění štítné žlázy, dochází ke změnám koncentrací u běžných biochemických stanovení a interních vyšetření, tyto jsou stručně shrnuty v následující tabulce.

Laboratorní nálezy	Hypotyreóza	tyreotoxikóza
lipidogram	↑ cholesterolu, triacylglycerolu ↓ kyselina vanilmandlová (VMK)	↓ lipidů včetně cholesterolu, ↑ VMK
glukózová tolerance	sklon k hypoglykémii na lačno, ploché OGTT	sklon k hyperglykémii a glykosurii, prudký vzestup a pokles glykémie při OGTT
enzymatické změny	↑ ALT, AST, CK, LDH (převážně svalové)	↑ ALT, AST, ALP v pokročilých fázích (hlavně hepatální)
změny na EKG	bradykardie, nízká voltáž ploché až negativní T vlny	tachykardie, vysoká voltáž, síňové ES, paroxysmální či trvalé fibrilace síní

tabulka 7 Změny běžných biochemických testů a EKG (39)

3.7.5 Metody využívané při stanovení tyreoidálních markerů

Tak jako při ostatních biochemických vyšetřeních dělíme tyto metody na:

- *Kvalitativní* – pouze průkaz zda se vyšetřovaný analyt v séru vyskytuje či nikoliv, v problematice tyreoidálních markerů není těchto metod využíváno.
- *Semikvantitativní* – hodnocení je prováděno ve smyslu menší či větší než.
- *Kvantitativní* – výsledek je vydáván jako přesná koncentrace analytu v séru.

Jak již bylo uvedeno u jednotlivých stanovení tyreoidálních hormonů, protilátek a vazebných proteinů jsou dnes využívány převážně vysoce citlivé imunoanalytické (imunochemické) metody.

Principem těchto metod je specifická reakce mezi antigenem a protilátkou, vzniklý komplex je pak detekován různými způsoby, detekce tak patří k faktorům, které ovlivňují výslednou senzitivitu stanovení.

Antigenem nazýváme struktury, které jsou schopny vyvolat imunitní odpověď. Jako epitopy jsou nazývány konkrétní vazebná místa na molekule antigenu proti, kterým se protilátka vytvářejí.

Z tohoto důvodu jsou pak protilátka děleny na:

- *Polyklonální* – jedná se o směs protilátek proti jednotlivým epitopům antigenu, směs je získávána imunizací zvířete. Tyto protilátka jsou schopny rozpoznat i izoformy antigenu, jejich výhodou je teda vyšší citlivost. Nevýhodou však zůstává závislost na imunizovaném zvířeti, a tím i někdy nemožnost získat protilátku opakovaně.
- *Monoklonální* – tato protilátka je produkována hybridomy připravenými fúzí imunizovaných slezinných buněk s buňkami nádorovými, po fúzi pak následuje čištění a selekce. Tento postup je finančně nákladný, ale pokud je k vyšetření použita monoklonální protilátka, zvyšuje se tím specifičnost probíhající reakce, která probíhá pouze s jedním epitopem antigenu.

Podle systému uspořádání reakce jsou imunoanalytické metody děleny na:

- *Kompetitivní* – souprava obsahuje značený antigen, který je stejný se stanovovaným antigenem, tyto antigeny spolu soutěží o omezené množství protilátky. Ptáí zde nepřímá závislost mezi koncentrací stanovovaného analytu a intenzitou odezvy.

- *Nekompetitivní (sendvičové)* – v reakční směsi soupravy jsou přítomny protilátky v nadbytku, stanovovaný antigen je vychytáván mezi dvě protilátky, jeho koncentrace je přímo úměrná velikosti měřeného signálu.

Jednotlivé metody jsou nazývány převážně podle způsobu detekce a použitého značení.

3.7.5.1 Radioimunoanalýza

Radioimunoanalýza (RIA) jako první umožnila měřit fyziologické hladiny hormonů v krvi. Princip RIA metod spočívá v označení některé z komponent reakce radioaktivním prvkem a následného měření radioaktivity. Jako radioaktivní prvek je používán nejčastěji ^{125}I (γ -zářič, poločas rozpadu 60 hod.) nebo tritium ^3H (β -zářič, poločas rozpadu 12let).

Výhodou RIA metod je vysoká citlivost a zároveň nízká cena vyšetření. Možnost stanovit vzácné analyty, jejichž vyšetření není běžné na automatických analyzátoch.

Neodstranitelnou nevýhodou však zůstávají zdravotní rizika při práci s radioaktivním materiálem.

Podle uspořádání dělíme metody radioimunoanalýzy na:

- *Klasické RIA metody* – jsou založeny na principu kompetice mezi izotopem označeným antigenem a antigenem stanovovaným o protilátku.
- *Sendvičové IRMA metody* – jejich principem je ukotvení jedné protilátky na pevné fázi na kterou se váže svým epitopem stanovovaný antigen. Na jiný epitop stanovovaného antigenu se pak váže druhá protilátka značená izotopem. Nadbytečné nenavázané komponenty jsou odstraněny promytím.

3.7.5.2 Enzymoimunoanalýza

Enzymoimunoanalýza (EIA) je metoda založená na stejném principu jako RIA metody, pro označení antigenu nebo protilátky se využívají různé enzymy (křenová peroxidáza, alkalická fosfatáza, glukosaoxidáza, β -galaktosidáza). Po proběhnutí reakce antigenu s protilátkou se provede promytí a teprve potom se přidá specifický substrát enzymu. Reakcí enzymu se substrátem vzniká obvykle barevný produkt, koncentrace tohoto

produktu je měřena na fotometru jako absorbance. Výhodou této metody je odstranění zdravotních rizik při práci s radioaktivitou a taky stálejší reagentie.

Používané typy enzymoimunoanalýzy v endokrinologii:

- *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)* – oblíbená metoda, kterou lze snadno automatizovat.
- *Microparticle Enzyme ImmunoAssay (MEIA)* – je sendvičová technika, konečným produktem u této metody je fluorogenní substrát. Měří se intenzita fluorescence, která je přímo úměrná koncentraci stanovovaného antigenu (40).

3.7.5.3 Fluoroimunoanalýza

Fluoroimunoanalýza (FIA) je metoda, která využívá schopnosti některých látek (fluorofory) absorbovat po ozáření energii a tuto následně se zpožděním vyzářit (fluorescence).

Metody FIA používané v endokrinologii:

- *Dissociation-Enhanced LanthanideFluoroImmunoAssay (DELFLIA)* – je sendvičová technika, při které nejprve vzniká imunokomplex mezi stanovovaným antigenem a specifickou protilátkou ukotvenou na pevné fázi, po inkubaci a promytí je přidána druhá protilátka značená chelátem europia (Eu) nebo samaria (Sm). Po inkubaci je dále přidáno silnější chelatační činidlo a vzniká tak silně fluoreskující chelát, jehož fluorescence je měřena. Platí zde přímá úměra, čím více bude stanovovaného antigenu, tím větší bude naměřená fluorescence.
- *Fluorescence Polarization ImmunoAssay (FPIA)* – je homogenní kompetitivní metoda, při níž je měřena fluorescence v polarizovaném světle. Ke značení se používá fluorescein a platí zde nepřímá úměra mezi intenzitou naměřeného polarizovaného světla a koncentrací stanovovaného antigenu. Metoda je vhodná pro automatické analyzátoři.

3.7.5.4 Chemiluminiscenční imunoanalýza

V současné době je v endokrinologii tato metoda široce využívána, protože patří k nejcitlivějším, používané lumifory jsou stabilní a v biologickém materiálu nemají interference.

- *ChemiLuminiscence ImmunoAssay (CLIA)* – metoda využívá schopnosti luminiscenčních látek emitovat světlo v průběhu chemické reakce. K přímému značení je používán akridinový ester, který se např. při zvýšení pH (v alkalickém prostředí) štěpí na nestálý meziprodukt, který emituje „záblesk“ světla (41).

4 ZÁVĚR

Onemocnění štítné žlázy patří k velmi rozšířeným endokrinopatiím a přestože v České republice zatím nebyl vypracován doporučený postup laboratorní diagnostiky, je možno považovat současnou diagnostiku tyreopatií za dobře propracovanou.

V oblasti laboratorní diagnostiky je k dispozici velké množství specifických a citlivých testů, díky rozvoji imunochemických metod a možnosti automatizace na analyzátorech je možné provádět tyto testy prakticky ve všech laboratořích. Došlo tedy k velkému zpřístupnění těchto testů, odpadá tak dlouhá čekací doba na výsledky testů, ale zároveň s tímto faktem roste i ekonomická nákladnost, která je mnohdy ještě zbytečně zvyšována neracionální indikací těchto vyšetření.

Je tedy nutné, aby lékaři vhodně vybírali z široké nabídky dnes dostupných laboratorních vyšetření určených k diagnostice onemocnění štítné žlázy.

5 SOUHRN

Na začátku práce jsou uvedeny základní poznatky o štítné žláze, je stručně popsána anatomie, histologická struktura a fyziologie. Pozornost je také věnována tvorbě hormonů a v jakých formách se v organismu nacházejí. Jednotlivá onemocnění štítné žlázy nejsou detailně rozepisována, je uveden pouze stručný přehled.

Ve stručnosti jsou naznačeny jednotlivé možnosti diagnostiky, problematika laboratorní diagnostiky je popsána podrobněji a zahrnuje také vlivy preanalytické fáze na jednotlivé vyšetření, ukazuje důvody proč je nutná spolupráce mezi lékaři a pracovníky laboratoří.

Je naznačeno pořadí jak stanovovat jednotlivé tyreoidální markery a tyto postupy jsou přehledně shrnuty do schémat. Následně jsou popsány jednotlivé parametry (vlastní hormony štítné žlázy, protilátky proti hormonům, transportní bílkoviny pro hormony, jodurie) které lze u tyreopatií vyšetřovat, jsou uvedeny jejich referenční meze a možné příčiny zvýšení či snížení těchto mezí.

V závěru práce jsou pak ve stručnosti uvedeny laboratorní metody, kterých je nejčastěji využíváno v endokrinologii a tedy i tyreologii.

6 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

anti-rTSH	protilátky proti TSH receptorům (TRAK)
anti-Tg	protilátky proti tyreoglobulinu (TgAb)
anti-TPO	protilátky proti tyreoidální peroxidáse (TPOAb)
CLIA	chemiluminiscenční imunoanalýza (ChemiLuminiscence ImmunoAssay)
DELFI	disociací zvýšená fluoroimunianalýza s lantanoidy (Dissociation-Enhanced LanthanideFluoroImmunoAssay)
EGF	epitelový růstový faktor (Epitelial Growth Factor)
ELISA	enzymoimunoanalýza (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
FIA	fluoroimunoanalýza (Fluoro ImmunoAssay)
FPIA	fluorescenční polarizační imunoanalýza (Fluorescence Polarization ImmunoAssay)
fT ₃	volný trijodtyronin
fT ₄	volný tyroxin
GB choroba	Gravesova-Basedowova choroba
i.v.	intra venózně
ICCIDD	Mezinárodní komise pro řešení chorob z nedostatku jodu(International Council for Control of Iodine Deficiency Disorders)
IRMA	imunoradiometrická analýza (ImmunoRadioMetric Assay)
MEIA	Microparticle Enzyme ImmunoAssay
MTC	medulocelulární karcinom štítné žlázy
NIS	natrium jodidový symportér (jodidová pumpa)
RIA	radioimunoanalýza (Radio ImmunoAssay)
rT ₃	reverzní trijodtyronin
T ₃	trijodtyronin
T ₄	tetraiodtyronin, tyroxin

TBG	tyroxin vázající globulin (thyroxin binding globulin)
TBII	thyreoid vázající a inhibující imunoglobulin
Tg	tyreoglobulin
TPO	peroxidáza hormonu štítné žlázy (thyreoid peroxidase)
TRH	hormon uvolňující thyreotropin (thyreotrophin-releasing hormone)
TSH	tyreotropní hormon (thyroid stimulating hormone)
TSI	protilátky proti TSH receptorům – stimulující
UNICEF	Dětský fond Organizace spojených národů (United Nations Children's Fund)
WHO	World Health Organization

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Zamrazil V.: Onemocnění štítné žlázy v ordinaci praktického lékaře, Praktický lékař, 2007, roč. 87, č. 3, s. 142-149.
2. Čerovská J., Bílek R., Zamrazilová H., Hoskovcová P., Vosátková M.: Změny v zásobení jodem české dospělé populace po eradikaci jodového deficitu a jejich příčiny, Vnitřní lékařství, 2006, roč. 52, č.10, s. 858-863.
3. Vlček P., Neumann J.: Karcinom štítné žlázy, pooperační sledování nemocných, Maxdorf, 2002, s. 14.
4. Dvořák J.: Štítná žláza, chirurgická anatomie, operační technika, Serifa, 2000, s. 64.
5. Jette Junge: Glandula thyreoidea, dostupné (5/2007) na: <http://www.mdb.ku.dk/manan/patologi/3>
6. Schneiderka P. a kol.: Kapitoly z klinické biochemie, Karolinum, 2000, s. 169.
7. Brtko J.: Mechanismus vnitřobunkového posobenía hormonův štítné žlázy, Vnitřní lékařství, 2006, roč. 52, č. 10, s.935-940.
8. Schneiderka P.: Biochemická vyšetření u chorob štítné žlázy, dostupné (5/2007) na: <http://www1.lf1.cuni.cz/~kocna/biochem/index2.htm>
9. Límanová Z, Němec J., Zamrazil V.: Nemoci štítné žlázy, diagnostika a terapie, Galén, 1995, s.20.
10. Zamrazil V.: Základní poznatky o štítné žláze, Postgraduální medicína, 2003, roč. 5, č. 2, s.165-174.
11. Zamrazil V., Holub V., Kasalický P.: Endokrinologie, Triton, 2003, s. 38.
12. Blahoš J., Zamrazil V. (ed.): Endokrinologie – Interdisciplinární obor, Triton, 2006, s. 29-31.
13. Límanová Z. (por.), Bezdíčková D.: Štítná žláza, Trendy soudobé endokrinologie, Galen, 2006, s.26-27.
14. Lukeš J., Koranda P.: Laboratorní diagnostika onemocnění štítné žlázy. Interní medicína pro praxi, 2001, roč. 3, č.3, s.120-123.
15. Topolčan O.: Doporučený postup laboratorního vyšetřování funkce štítné žlázy – ano či ne? Vnitřní lékařství, 2006, roč. 52, č. 10, s. 985-987.
16. Janet E. Hall, Lynnette K. Nieman: Handbook of Dignostic Endocrinology, Humana Press, 2003, s. 116.

-
17. Límanová Z. (por.), Bezdíčková D.: Štítná žláza, Trendy soudobé endokrinologie, Galen, 2006, s. 29.
18. Holub V.: Tyreotoxikóza, Postgraduální medicína, 2003, roč. 5, č. 2, s.196-201.
19. Zima T (por.), Marek J.: Laboratorní diagnostika, Galén, 2002, s. 175.
20. Kubrová I.: Štítná žláza a její dysfunkce ve vztahu k reprodukci, Postgraduální medicína, 2001, roč. 3, č. 9, s.1009-1018.
21. Zima T (por.), Marek J.: Laboratorní diagnostika, Galén, 2002, s. 176.
22. Stárka L., Zamrazil V. a kol.: Základy klinické endokrinologie, Maxdorf, 2005, str.93.
23. Límanová Z. (por.), Bezdíčková D.: Štítná žláza, Trendy soudobé endokrinologie, Galen, 2006, s. 21.
24. Clark T. Sawin (ed): Thyroid monograph, přeloženo - Tyreoidální markery, Medicínské novinky, Abbott Laboratories, 1999, č. 7, s. 7.
25. Masopust J.: Klinická biochemie požadování a hodnocení biochemických vyšetření, Karolinum, 1998, s. 716.
26. Clark T. Sawin (ed): Thyroid monograph, přeloženo - Tyreoidální markery, Medicínské novinky, Abbott Laboratories, 1999, č. 7, s. 10.
27. Kessler S.: Memorix – Laboratorní diagnostika, Scientia medica, 1993, s. 174.
28. Masopust J.: Klinická biochemie požadování a hodnocení biochemických vyšetření, Karolinum, 1998, s. 717.
29. Hrnčiar J.: Racionálna diagnostika funkčných porúch štítném žľazy v klinickej praxi, Interní medicína pro praxi, 2006, roč 8, č. 1, s. 18-23.
30. Clark T. Sawin (ed): Thyroid monograph, přeloženo - Tyreoidální markery, Medicínské novinky, Abbott laboratories, 1999, č. 8, s. 4.
31. Vlček P., Neumann J.: Karcinom štítné žlázy, pooperační sledování nemocných, Maxdorf, 2002, s. 149.
32. Astl J.: Diagnostika a chirurgická léčba nemocí štítné žlázy, Lékařské listy, 2004, dostupné (5/2007) na: <http://www.zdn.cz/scripts/detail.php?id=162345>
33. Clark T. Sawin (ed): Thyroid monograph, přeloženo - Tyreoidální markery, Medicínské novinky, Abbott Laboratories, 1999, č. 8, s. 7.
34. Langer P., Klimeš I., Šeboková E.: Súčasný trendy v laboratórnej diagnostike ochorení štítné žľazy, DMEV, 2002, roč. 5, č. 2, 91-97.

-
35. Šafarčík K.: Anti-TSH receptor, 1998, dostupné (5/2007) na:
<http://www.mzcr.cz/data/c764/lib/mzacd.htm>
36. Bílek R., Čeřovská J.: Jod a tyreoidální hormony, Vnitřní lékařství, 2006, roč. 52, č.10, s. 881-886.
37. Zamrazil V.: Problematika jodového deficitu a jeho následků, Postgraduální medicína, 2003, č. 2, s.176.
38. Zamrazil V.: Problematika jodového deficitu a jeho následků, Postgraduální medicína, 2003, roč. 5, č. 2, str.176.
39. Zamrazil V., Holub V., Kasalický P.: Endokrinologie, Triton, 2003, s. 39.
40. Doležalová V. a kol. autorů: Laboratorní technika v klinické biochemii a toxikologii, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví Brno, 1995, s.234.
41. Podroužek P.: Laboratorní metody v gynekologické endokrinologii, Postgraduální medicína, 2001, roč. 3, č. 9, s.1003-1008.