

چالش‌های سنجش هورمون PTH

● دکتر هاله حکمتی

دکترای علوم آزمایشگاهی، مرکز جراحی
حضرت فاطمه زهرا (س)، آزمایشگاه



● دکتر سید قاسم مصطفوی

دکترای علوم آزمایشگاهی، عضو هیئت مدیره انجمن
دکترای علوم آزمایشگاهی تشخیص طبی ایران



□ مقدمه

غدد پاراتیروئید شامل ۴ عدد غده کوچک و ظریف که هر کدام به اندازه تقریبی یک دانه برنج می‌باشند، این غدد پشت تیروئید و چسبیده به آن هستند و وزن هر کدام حدود ۳۰ میلی گرم است و هر کدام قطری بین ۳ الی ۴ میلی متر دارند.



این غدد تولید هورمونی به نام PTH می‌کنند که به آن پاراتورمون هم می‌گویند.

PTH مهم‌ترین هورمون تنظیم کننده کلسیم سرم است و باعث افزایش کلسیم سرم می‌شود. هورمون کلسی تونین که از تیروئید به داخل خون ترشح می‌شود هم در تنظیم مقدار کلسیم خون نقش دارد و هم سبب کاهش کلسیم سرم می‌شود.

کلمات کلیدی: هورمون پاراتیروئید، روش‌های سنجش PTH، پپتیدهای PTH، متغیرهای پیش از آنالیز

□ بیماری‌های غده بارانیروئید

غده پاراتیروئیدی تولیدکننده پاراکالسی‌تونین (hypoparathyroidism) و یا پاراکالسی‌تونین (hyperparathyroidism) می‌گردند.

□ کم کاری غده بارانیروئید

مهم‌ترین علت ایجاد کم کاری غدد پاراتیروئید جراحی‌های تیروئید است. از آنجا که غدد پاراتیروئید چسبیده به بافت تیروئید هستند، بسیاری از لوقات متعاقب جراحی‌های تیروئید یک یا چند تا از غدد پاراتیروئید هم برداشته می‌شوند.

یکی دیگر از عوامل مهم و شایع کم کاری پاراتیروئید، وجود بیماری اتولیمون و ترشح اتو آنتی بادی علیه غدد پاراتیروئید است.

گاهی هم ممکن است به صورت مادرزادی غدد پاراتیروئید اصلاً در نوزاد وجود نداشته باشند و یا بسیار کوچک بوده و توانایی تولید و ترشح هورمون را نداشته باشند. (ستدروم دی جورج)

Hypoparathyroidism reasons

- surgical removal of the gland
- autoimmune destruction
- Di George's syndrome

□ علائم کم کاری غدد بارانیروئید

مهم‌ترین نتیجه کم کاری غدد پاراتیروئید، کاهش کلسیم سرم است در حالی که دفع فسفات از کلیه‌ها کاهش یافته و مقدار فسفات سرم افزایش می‌یابد.

از آنجا که کلسیم مهم‌ترین یون برای انقباض عضلانی است، لذا در کم کاری پاراتیروئید عضلات دچار انقباض غیر ارادی شده و حالت تشنجی پیش می‌آید.

در کاهش کلسیم خون، عضله قلبی ریتم ضربان خود را

□ پرکاری ثانویه بارانبروئید

(Secondary hyperparathyroidism)

به مواردی گفته می‌شود که کلسیم خون به علل مختلف کاهش دارد و برای جبران آن، مقدار PTH خون افزایش می‌یابد (PTH بالا همراه Ca پایین) در واقع علت بیماری خارج از غده پاراتیروئید است. مهم‌ترین علل ایجاد کننده هیپرپاراتیروئیدیسم ثانویه، نقص عملکرد کلیه (kidney failure) و کمبود ویتامین D3 است.

□ پرکاری ثالثیه بارانبروئید

(Tertiary hyperparathyroidism) چنانچه پرکاری ثانویه پاراتیروئید مدت زیادی طول بکشد، به تدریج غده پاراتیروئید عادت به تولید مستمر PTH پیدا می‌کند (PTH بالا به همراه Ca بالا)

Type	Serum calcium	Parathyroid hormone
Primary Single adenoma (90%) Multiple adenomata (4%) Nodular hyperplasia (5%) Carcinoma (1%)	Raised	Not suppressed
Secondary Chronic renal failure Malabsorption Osteomalacia & rickets	Low	Raised
Tertiary	Raised	Not suppressed

□ علائم پرکاری غدد بارانبروئید

مهم‌ترین نتیجه پرکاری غدد پاراتیروئید افزایش کلسیم سرم است. قسمت اعظم این کلسیم ناشی از برداشت کلسیم از بافت استخوانی است. لذا در پرکاری پاراتیروئید به تدریج با پوکی استخوان مواجه می‌شویم. بروز دردهای استخوانی نیز شایع است. همچنین افزایش کلسیم سبب کلسیوکلکسیون بافتها شده. در سیستم ادراری سبب هیپرکلسیوری و تشکیل سنگهای ادراری می‌شود. در غالب موارد بیمار دچار تشنگی‌های مداوم شده و حجم ادرار افزایش می‌یابد. پرکاری تیروئید همچنین سبب دردهای شکمی و از بین رفتن اشتها و بروز تهوع می‌شود. مهم‌ترین علائم بالینی پرکاری پاراتیروئید در جدول زیر مشاهده می‌شود:

Hyperparathyroidism symptoms
Digestive system Nervous system
 -Loss of appetite -Fatigue

از دست داده و دچار آریتمی شده و در نوار قلبی اخذ شده از بیمار موج QT طولانی می‌شود. همچنین از آنجا که وجود کلسیم برای کارکرد صحیح سیستم عصبی ضروری است، کمبود کلسیم سبب ایجاد پارستزی (خواب رفتگی و گزگز شدن انگشتان و اندامهای تحتانی) می‌شود. مهم‌ترین علائم بالینی کم کاری غدد پاراتیروئید در جدول زیر مشاهده می‌شود:

Hypoparathyroidism symptoms and signs
Hypocalcemia and hyperphosphatemia
 -Tetany - Cardiac arrhythmia
 -Muscle weakness -Cataracts
 -Sensitive nerves -Tooth problems
 -Numbness, tingling, cramps -Hair loss

□ پرکاری غدد بارانبروئید

چند شکل دارد که مهم‌ترین اشکال آن عبارتند از: پرکاری اولیه پاراتیروئید

(Primary hyperparathyroidism)

پرکاری ثانویه پاراتیروئید

(Secondary hyperparathyroidism)

پرکاری ثالثیه پاراتیروئید

(Tertiary hyperparathyroidism)

گاهی اوقات هم وجود بدخیمی و سرطان غدد پاراتیروئید سبب افزایش نلیجای PTH و پرکاری پاراتیروئید می‌شود.

□ پرکاری اولیه بارانبروئید

(Primary hyperparathyroidism)

به مواردی گفته می‌شود که غده پاراتیروئید بدون توجه به مقدار کلسیم خون، هورمون PTH ترشح می‌کند. در واقع در پرکاری اولیه ترشح هورمون به طور مداوم انجام می‌گیرد و متعاقب آن مقدار کلسیم خون هم بالا می‌رود. (PTH بالا به همراه Ca بالا) مهم‌ترین علت ایجاد پرکاری اولیه پاراتیروئید وجود آنوم غده پاراتیروئید است.



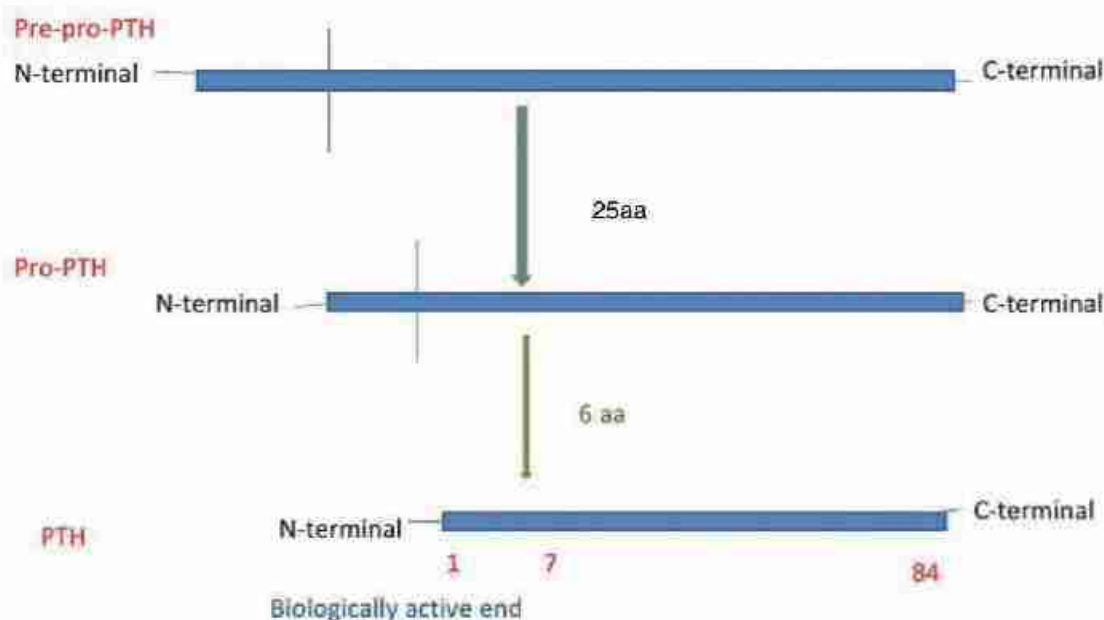
می‌شود، ساختار اولیه به شکل یک PRE-PRO-PTH است که از ۱۱۵ اسید آمینه تشکیل شده است. سپس از انتهای N-ترمینال (Amino-terminal) دچار شکستگی شده و یک قطعه ۲۵ اسید آمینه‌ای جدا می‌شود. باقیمانده pro-PTH نام دارد. نهایتاً از همان سمت N-ترمینال یک قطعه ۶ اسید آمینه‌ای دیگر هم جدا می‌گردد و شکل نهایی که دارای ۸۴ اسید آمینه است همان فرم فعال یا Intact PTH است که دارای فعالیت بیولوژیک است (شکل ۱).

- Nausea -Depression
- Vomiting -Confusion
- Constipation
- Musculoskeletal system Urinary system
- Muscle weakness -Kidney stones
- Bone pains -Increased urination

□ ساختمان هورمون PTH

هورمون PTH یک پلی پپتید ساده است که در غده پاراتیروئید سنتز شده و در همان جا به فرم فعال تبدیل

SYNTHESIS OF PTH



(شکل ۱)

به قطعات کوچک‌تر متعددی شکسته می‌شود که هیچ کدام فعالیت بیولوژیکی ندارند ولی خاصیت آنتی ژنیک دارند و در نتیجه قابلیت دتکت شدن در آزمایش را دارا می‌باشند (شکل ۲)

فرم فعال یا همان i-PTH از درون غده پاراتیروئید خارج شده و وارد گردش خون می‌شود. نیمه عمر این مولکول بسیار کوتاه و در حد چند دقیقه است. این هورمون درون گردش خون

The PTH Molecule

- Peptide consisting of 84 Amino acids.
- Breaks into small fragments.
- Intact PTH is the whole molecule – 1 to 84.



(شکل ۲)

۲- تأثیر PTH بر روی کلیه: PTH باعث باز جذب کلسیم از لوله‌های ادراری می‌شود و از این طریق از دفع کلسیم جلوگیری نموده و سبب افزایش کلسیم سرم می‌گردد. بیشترین محل اثر PTH بر روی لوله‌های پروگزیمال ادراری است اما بر روی قوس هتله (loop of henle) و لوله‌های صعود کننده (ascending tubules) هم با شدت کمتر اثر می‌گذارد.

۳- تأثیر PTH بر روی روده: اثر PTH بر روی روده کوچک به طور غیر مستقیم است. بدین شکل که PTH در کلیه سبب تبدیل فرم غیر فعال ویتامین D به فرم فعال می‌شود. سپس ویتامین D فعال در روده کوچک سبب افزایش جذب کلسیم موجود در مواد غذایی می‌شود.

□ عملکرد PTH در بدن

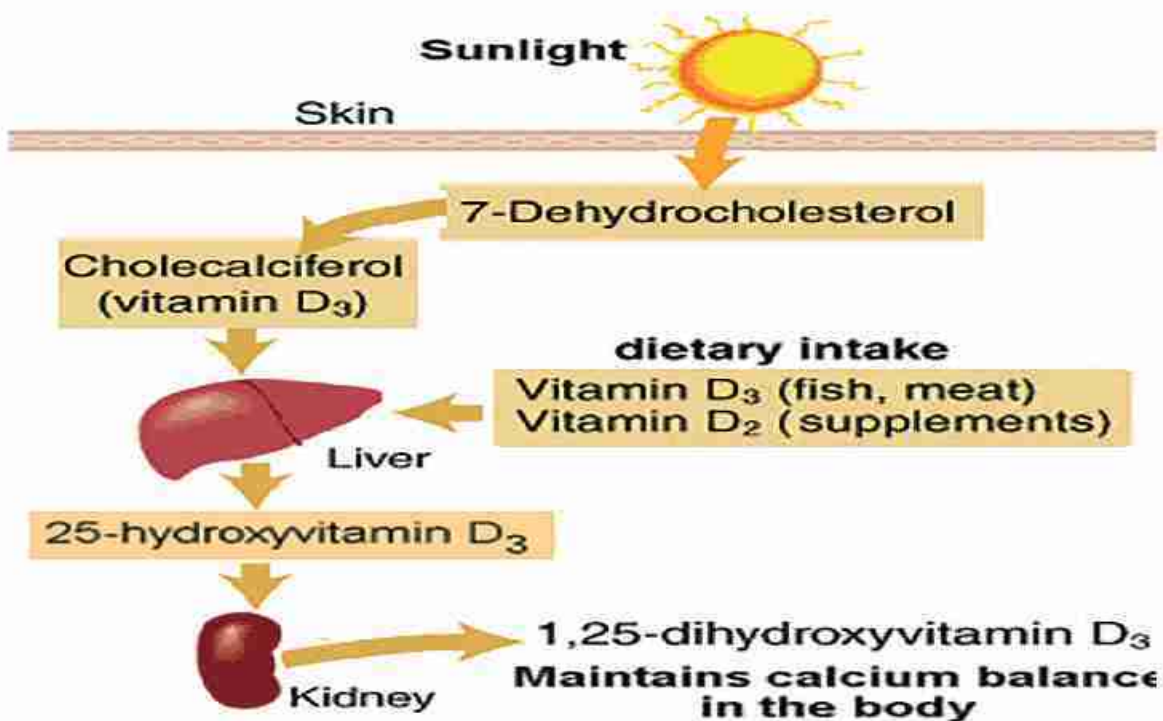
ترشح PTH در پاسخ به کاهش سطح کلسیم سرم روی می‌دهد. PTH مهم‌ترین نقش را در حفظ تعادل (homeostasis) کلسیم سرم دارد.

PTH از طریق ۳ مکانیسم زیر سبب افزایش کلسیم سرم می‌شود:

۱- تأثیر PTH بر روی استخوان: PTH در استخوان باعث فعال شدن سلول‌های osteoclast می‌شود و در نتیجه کلسیم از بافت استخوانی برداشت شده و به داخل خون می‌ریزد. لذا فعالیت بیش از اندازه پارائتیروئید و افزایش PTH سبب کاهش مواد معدنی استخوان و نهایتاً پوکی استخوان‌ها می‌گردد.

ویتامین D3 در کبد به 25-hydroxyvitamin D3 تبدیل شده و نهایتاً در کلیه با کمک آنزیم الفاهیدروکسیلاز تبدیل به فرم فعال یا 1,25hydroxyvitamine D3 می‌شود (شکل ۳).

□ سنتز و فعال شدن ویتامین D مولکول اولیه ویتامین D در سطح پوست و تحت تأثیر اشعه نور خورشید از پیش ساز کلسترولی ساخته می‌شود. سپس این پیش-



(شکل ۳)

(شبهه مکتسیم روی داده در مورد کلیه). از این طریق سبب کاهش املاح معدنی استخوان شده و قدری فسفر خون را بالا می‌برد.
۳- تأثیر PTH بر روی روده کوچک: PTH در روده سبب افزایش جذب فسفات از مواد غذایی می‌شود. اما تأثیر نهایی و برآیند اثر PTH به صورت net کاهش فسفر خون می‌باشد زیرا اثر PTH در کلیه بسیار شدیدتر و بارزتر از تأثیر آن بر روی استخوان و روده است.

□ اثر PTH بر روی تنظیم فسفات‌ها
۱- تأثیر PTH بر روی کلیه: در مورد فسفات‌ها، بیشترین تأثیر PTH بر روی کلیه است. در واقع PTH در کلیه باعث افزایش ترشح فسفات به درون ادرار می‌شود (برعکس مکتسیم روی داده در مورد کلیه). لذا سبب کاهش سطح فسفر خون می‌شود.
۲- تأثیر PTH بر روی استخوان: PTH در استخوان‌ها سبب افزایش برداشت فسفات از بافت استخوان می‌شود.

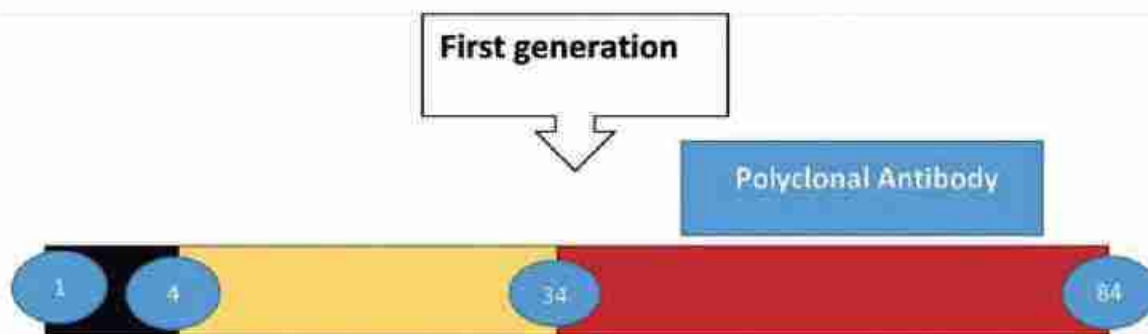
هستند
در یخچال ۴ درجه هم نمونه پلاسما تا ۷۲ ساعت و نمونه سرم تا ۲۴ ساعت پایداری دارند.
چنانچه امکان انجام آزمایش در این زمان میسر نباشد باید نمونه فریز شود (۲۰-)
البته در مورد فریز کردن هم هنوز بحث‌هایی وجود دارد و تحقیقات بیشتری در حال انجام است.

□ روش‌های سنجش PTH

روش‌های سنجش و اندازه‌گیری PTH در طی ۵۰ سال گذشته به طور مداوم مسیر تکاملی را طی نموده است. نخستین بار در سال ۱۹۶۳ میلادی روش‌های رادیوایموتواسی برای سنجش PTH طراحی شدند.
نسل اول (First Generation) کیت‌های سنجش PTH از تکنیک‌های رقابتی (competitive assay) بهره می‌برند. در این گروه هورمون PTH گلولی یا خوکی برای تهیه آنتی بادی ضد PTH به کار گرفته می‌شوند. این تکنیک‌ها بر اساس واکنش متقاطع آنتی بادی تولید شده علیه PTH حیوانی، با PTH انسانی بنا نهاده شده بودند و عمدتاً دارای ۲ مشکل اصلی بودند:
اول این که تهیه آنتی بادی‌ها از این روش بسیار سخت بود و مقدار بسیار محدودی آنتی بادی ساخته می‌شد و دوم این که ویژگی این آنتی بادی‌ها بسیار متغیر بود و چندان رضایت بخش نبود. آنتی بادی‌های مذکور پلی کلونال بودند و بر علیه گربوکی ترمیتال عمل می‌کردند و لذا اختصاصاً فرم بیولوژیک هورمون را دتکت نمی‌کردند بلکه بسیاری از قطعات شکسته شده و پپتیدهای بدون فعالیت بیولوژیکی را هم اندازه‌گیری می‌کردند.

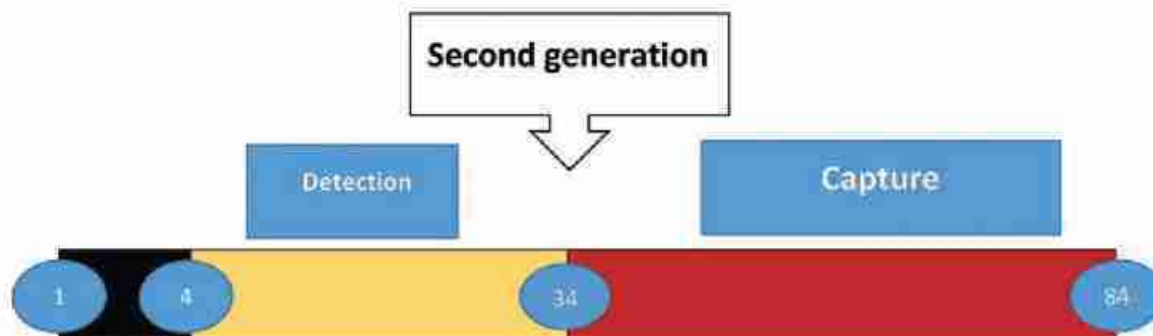
□ دستورالعمل‌های توصیه شده برای نمونه‌گیری PTH

هورمون PTH دارای نیمه عمر کوتاه و پایداری بسیار کمی است لذا هنگام جمع‌آوری نمونه باید توجه بسیار زیادی به متغیرهای preanalytic مبذول داشت:
۱- ناشنایی: توصیه شده که بیمار قبل از انجام آزمایش پروتکل کامل ناشنایی (حدود ۱۰ ساعت) را رعایت نماید.
۲- زمان نمونه برداری (sampling time): PTH دارای سیکل شگله روزی (circadian cycle) است بدین شکل که بیشترین مقدار ترشح PTH در نیمه شب و کمترین مقدار در mid-morning یعنی بین طلوع آفتاب و ظهر است. توصیه شده که بهترین زمان نمونه‌گیری بین ۱۰ صبح تا ۴ بعد از ظهر است.
۳- نوع نمونه (specimen type): کارگروه پره آنلیتیک EFLM توصیه نمودند که نمونه پلاسما جدا شده با EDTA پایداری بیشتری دارند. پلاسما EDTA در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد تا ۷۲ ساعت پایدار است حال آن که نمونه سرم جدا شده از لوله لخته فقط ۲۴ ساعت در ۴ درجه پایدار است.
۴- آماده‌سازی نمونه (sample preparation): نمونه اخذ شده از بیمار باید در اولین فرصت ممکن سلتریفیوژ شود. توصیه ارجح آن است که از سلتریفیوژهای یخچال دار استفاده شود. حتی بهتر است که لوله‌های جمع‌آوری در یخچال نگهداری و فقط بلافاصله قبل از نمونه‌گیری از یخچال خارج گردد.
۵- نگهداری نمونه (storage condition): بهتر است حتی المقدور نمونه در کمترین زمان ممکن مورد آزمایش قرار گیرد. در حرارت آزمایشگاه نمونه پلاسما EDTA نهایتاً تا ۸ ساعت و نمونه سرم نهایتاً ۲ تا ۳ ساعت پایدار



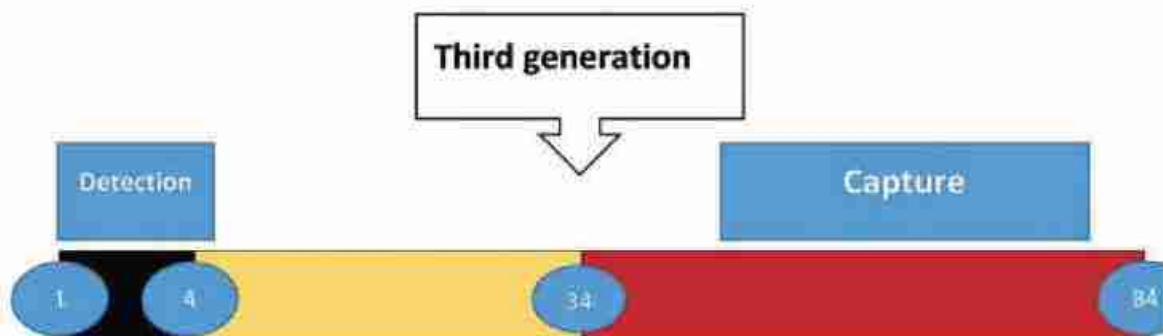
در کیت‌های این گروه از ۲ آنتی بادی استفاده می‌گردد؛ اول، Capture Ab که با قسمت‌های نزدیک به C-ترمینال اتصال می‌یابد و دوم Detection Ab که به قسمت نزدیک به N-ترمینال اتصال می‌یابد.

به تدریج آنتی بادی‌های مونوکلونال ابداع شدند و نسل بعدی کیت‌های سنجش PTH رونق بازار شدند. نسل دوم کیت‌های اندازه‌گیری PTH یا (Second Generation) اساساً از تکنیک‌های غیر رقابتی یا non competitive استفاده می‌کنند.



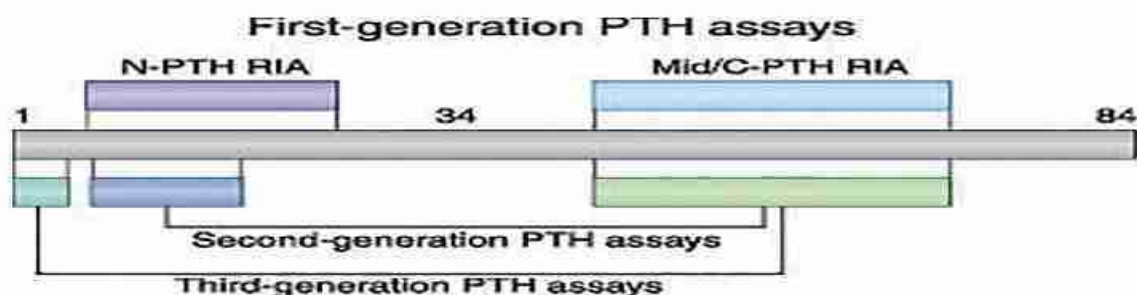
نسل سوم به بازار عرضه شدند. در این کیت‌ها آنتی بادی detection بر علیه اسید آمینه‌های شماره ۱ الی ۴ قسمت N-terminal عمل می‌نمایند و لذا قادر هستند که صرفاً هورمون فعال یا همان i-PTH را شناسایی کنند.

کیت‌های نسل دوم هم با وجود آن که ویژگی بسیار بیشتری در مقایسه با کیت‌های نسل اول داشتند، اما هنوز قادر نبودند که صرفاً i-PTH یا فرم فعال بیولوژیک هورمون را دتکت کنند، لذا پس از چندین سال کیت‌های



در تصویر زیر مشاهده می‌نمایید:

مقایسه نسل‌های مختلف کیت‌های اندازه‌گیری PTH را



تا همه آزمایشگاه‌ها به صورت هماهنگ و استاندارد از این گایدلاین‌ها پیروی نمایند.

همه نمونه‌گیرها و پرسنل قتی آزمایشگاه‌ها باید آموزش لازم برای رعایت استانداردهای قبل از انجام آنالیز (pre-analytical phase) و حین آنالیز (analytical phase) را گذرانده باشند و دستورالعمل‌های مکتوب در بخش نمونه‌گیری و قتی آزمایشگاه‌ها موجود باشد.

در صورتی که نمونه‌ای شرایط لازم را نداشت و یا بیمار آمادگی قبل از انجام آزمایش را نداشت، فرم‌های رد نمونه تکمیل و از انجام آزمایش جلوگیری گردد.

□ نتیجه‌گیری

سنجش هورمون PTH اهمیت بسیار زیادی در پزشکی بالینی دارد زیرا PTH نقش بسیار مهمی در تنظیم متابولیسم کلسیم خون و فیزیولوژی استخوان‌ها دارد.

با آن که بیش از ۵۰ سال از ابداع اولین روش‌های سنجش PTH با روش رادیو ایمتواسی می‌گذرد، اما کماکان چالش‌های زیادی در استانداردسازی روش‌های سنجش PTH وجود دارد.

بسیار ضروری است که تجمیع‌های آزمایشگاهی دستورالعمل‌های دقیقی برای سنجش PTH تدوین نمایند.

References

- 1- Parathyroid Hormone Assay: Problems and Opportunities by KJ Martin-2007
- 2- PTH Assay: understanding What We Have and Forecasting by JGH Vieira-2012
- 3- Evolution of PTH Assays-Sci Elo by JGH Vieira-2006
- 4- Parathyroid Disorders-Karger Publishers by Brandi, Maria Luisa-2019
- 5- Primary Hyperparathyroidism by John P Bilezikian MD-Jan-2017
- 6- Problems With the PTH assays/Request PDF Article in Annales d'Endocrinologie-April 2015