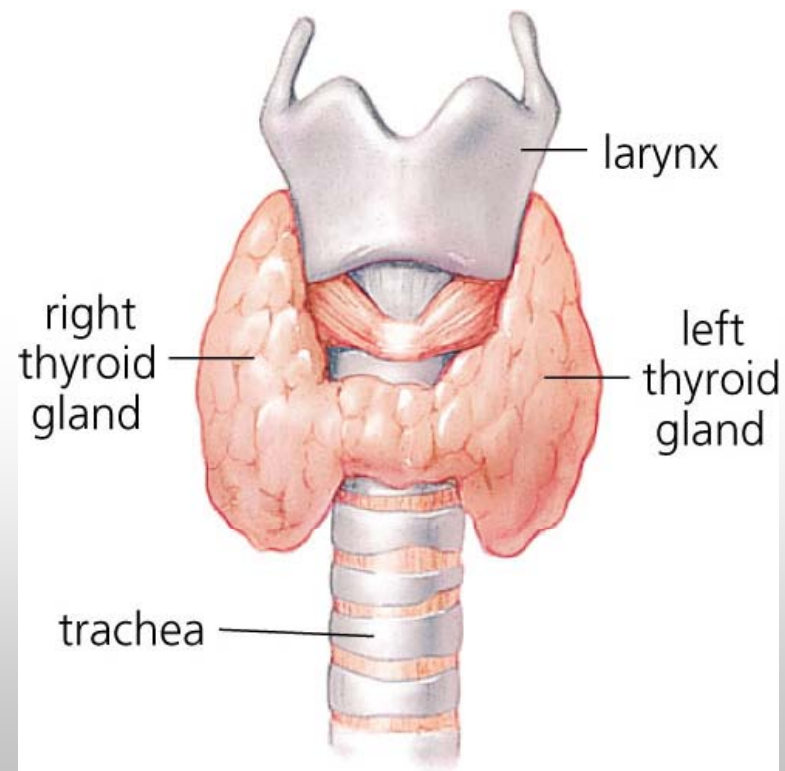


# ŠTÍTNÁ ŽLÁZA

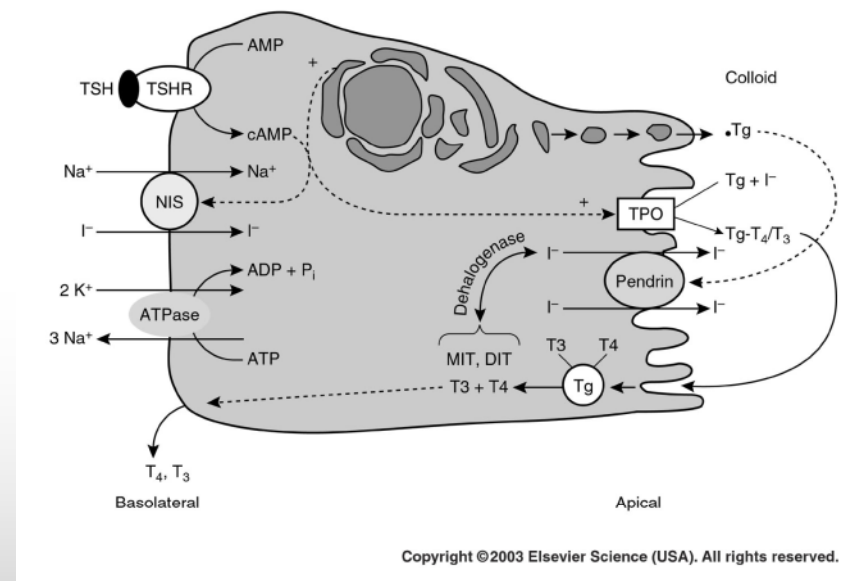
Doc. Ing. R. Bílek, CSc.

Endokrinologický ústav, Praha

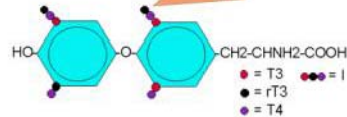
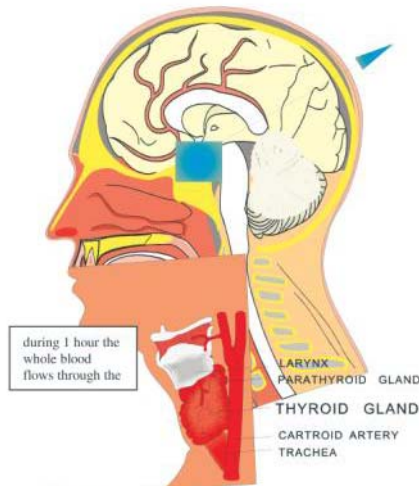


# Thyroid gland and thyroid follicular cells (thyrocytes)

- ❖ **THYROID GLAND:** 20-30 g, consists of thyroid follicles (50-500  $\mu\text{m}$  e.d.), a layer of cells arranged around a big central cavity filled with TG
- ❖ **perifollicular endothelial cells** (blood supply) from entoderm
- ❖ **follicular cells** (affinity for  $\text{I}^-$ , synthesise TH) from entoderm
- ❖ **parafollicular cells** (produce CT) from ectoderm
- ❖ **fibroblasts, lymphocytes, adipocytes**
- ❖ **FOETUS:** thyroid follicles are in 9-10 weeks old embryo, hormone synthesis begins at 10 weeks



# Thyroid Gland

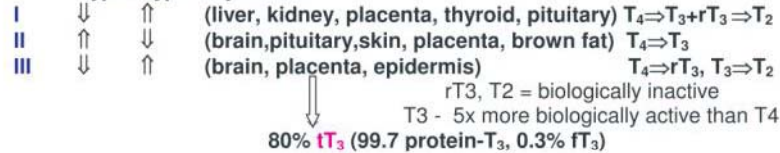


TH control the generation of chemical energy, of metabolism, are essential for normal development, and development of sex

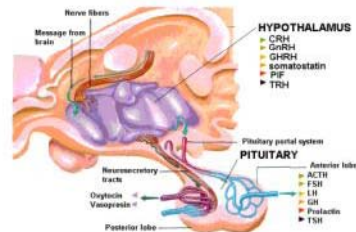
i.e. control the rate growth, brain organs.



deiodinase: I = selenoprotein, II, III  
 hypo-/hyper-thyroidism



THYROID GLAND: 15-25 g, consists of thyroid follicles filled with TG, perifollicular endothelial cells (blood supply) and follicular cells (affinity for I<sup>-</sup>, synthesise TH) from endoderm, parafofollicular cells (produce CT) from ectoderm, fibroblasts, lymphocytes, adipocytes



## hypothalamus

somatost.(-) ↑ FT<sub>4</sub> (-), FT<sub>3</sub> (-)  
 TRH (+) ↑ FT<sub>4</sub> (-), FT<sub>3</sub> (-)

## pituitary gland

TSH (+) ↑ FT<sub>4</sub> (-), FT<sub>3</sub> (-)

## thyroid gland

TH control the generation of chemical energy, of metabolism, are essential for normal development, and development of sex

i.e. control the rate growth, brain organs.

TH control the generation of chemical energy, of metabolism, are essential for normal development, and development of sex

i.e. control the rate growth, brain organs.

TH control the generation of chemical energy, of metabolism, are essential for normal development, and development of sex

i.e. control the rate growth, brain organs.

TH control the generation of chemical energy, of metabolism, are essential for normal development, and development of sex

i.e. control the rate growth, brain organs.

TH control the generation of chemical energy, of metabolism, are essential for normal development, and development of sex

i.e. control the rate growth, brain organs.

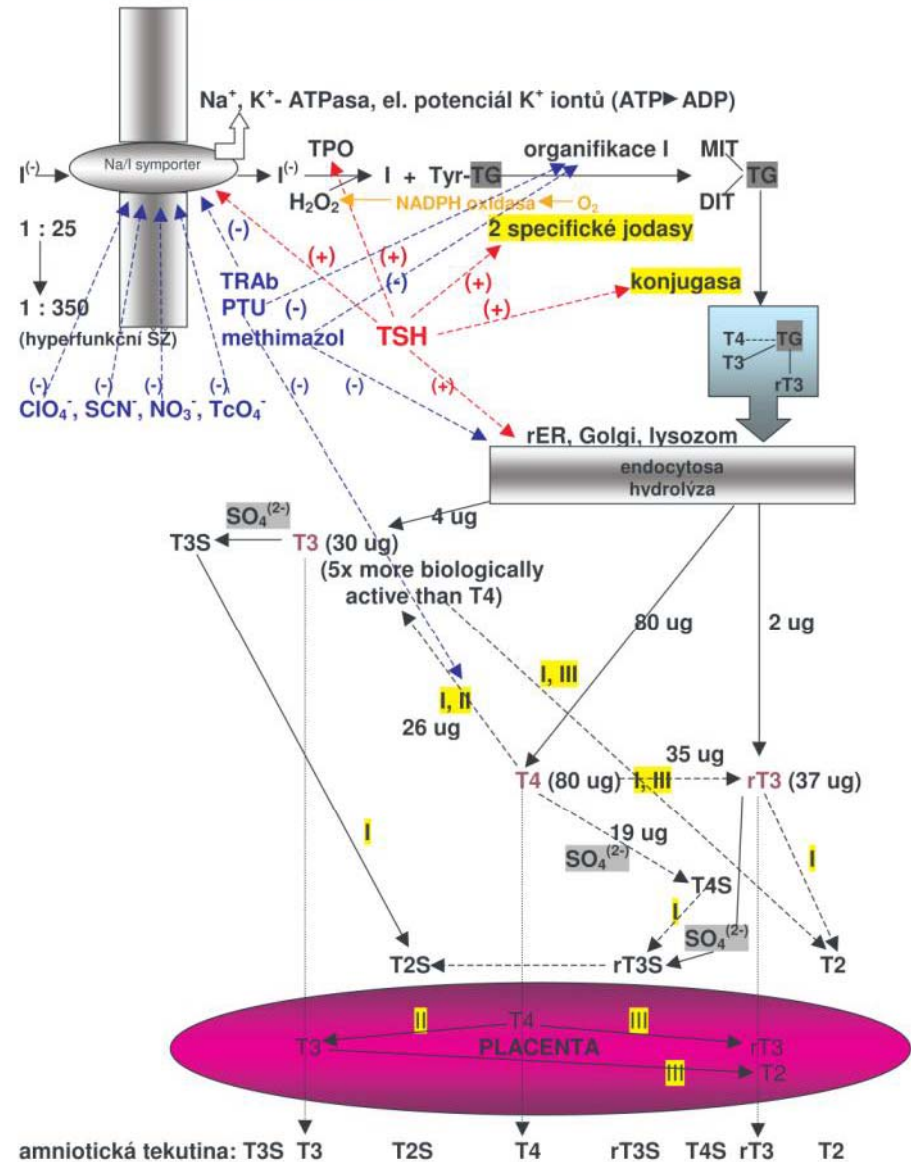
TH control the generation of chemical energy, of metabolism, are essential for normal development, and development of sex

i.e. control the rate growth, brain organs.

TH control the generation of chemical energy, of metabolism, are essential for normal development, and development of sex

i.e. control the rate growth, brain organs.

## membrána folikulární buňky



FETUS: thyreoidální folikuly jsou v 9-10 týdnů starém embryu, syntéza TH začíná v 10. týdnu

# Mechanismus účinku TRH, TSH

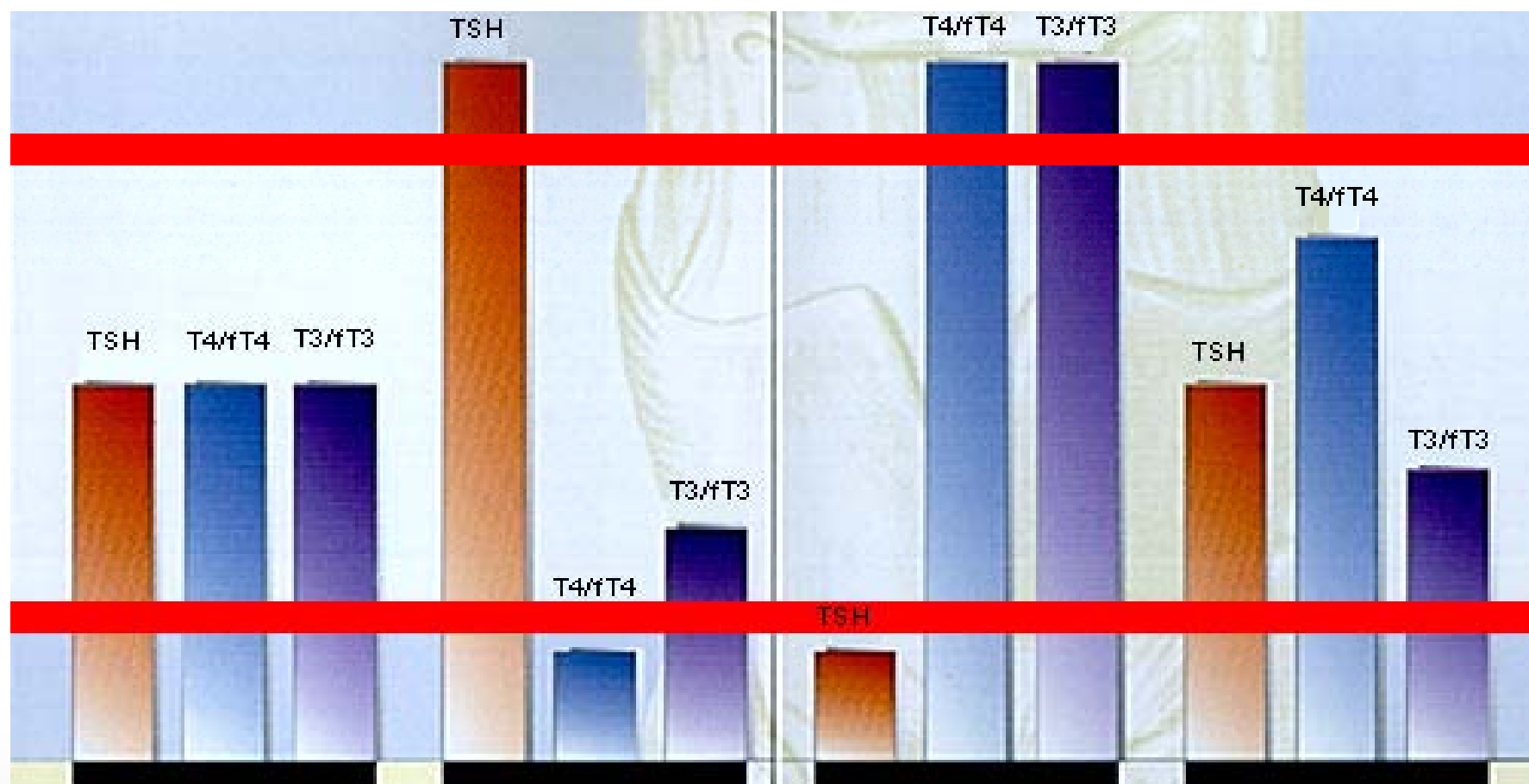
- ✿ interakce s receptory na povrchu buněk
- ✿ změna konformace heterotrimérních G-proteinů ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  podjednotky)
  - ✿ vazba GTP místo GDP
  - ✿ disociace ( $\alpha+\beta\gamma$ ) a přeskupení podjednotek, štěpení GTP
  - ✿ energie získaná štěpením GTP vede k aktivaci adenylátcyklasy
  - ✿ z ATP se vytvoří cAMP - druhý posel
    - ✿ aktivace nitrobuněčných enzymů (kinazy=fosfotransferasy)
    - ✿ nastartování řady biochemických dějů zahajovaných fosforylací substrátu
  - ✿ energie získaná štěpením GTP vede k aktivaci fosfolipasy C
    - ✿ fosfatidylinositol  $\Rightarrow$  diacylglycerol + inositoltrifosfát
  - ✿ aktivace  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů přes inositoltrifosfát
    - ✿  $\text{Ca}^{2+}$ , komplex  $\text{Ca}^{2+}$ -kalmodulin

# Mechanismus účinku TH

- ❖ interakce s jadernými receptory = hormon-senzitivními transkripčními faktory ( $\alpha$ ,  $\beta$ )
  - ❖ regulátory genové exprese = ovlivňují transkripci genů (pomalejší odezva)
    - ❖ po prostupu membránou vazba na intracelulární receptor
    - ❖ změna konformace, aktivovaný komplex TH-receptor je schopen se vázat na hormon-responsivní elementy DNA
    - ❖ ve spolupráci s dalšími jadernými proteiny dochází k iniciaci transkripce
- ❖ ovlivnění proteosyntézy a dalších procesů
- ❖ zrychlení metabolismu, zajištění adekvátního vývoje organismu

# Biologická funkce TH

- ✿ podstatné pro normální růst, vývoj CNS (intelekt)
  - ✿ ↓ TH u fetu a novorozence = ireverzibilní poškození mozku
    - ✿ růst dendritů a axonů, tvorba synapsí, myelinizace, vývoj glie
- ✿ ↑ bazálního metabolismu, ↑ metabolického obratu
  - ✿ ↑ spotřeby kyslíku (↑ sekrece erytropoetinu), ↑ tělesné teploty
  - ✿ ↑ proteosyntézy
    - ✿ ↑ proteolytických enzymů => převaha proteolýzy, ubývání svalové hmoty
  - ✿ ↑ glykogenolýzy, ↑ glukoneogeneze => ↑ glykémie
    - ✿ ↑ glykolýzy
  - ✿ ↑ lipolýzy, ↑ odbourávání VLDL, LDL
  - ✿ ↑ rozklad cholesterolu na žlučové kyseliny, ↑ vylučování žk žlučí
  - ✿ senzibilizace cílových orgánů na katecholaminy
    - ✿ ↑ srdeční síly (↑ systol. krev. tlak), ↑ tepové frekvence (fibrilace), vasodilatace
  - ✿ stimulace střevní motility, transportních procesů ve střevě a v ledvinách (průjmy)
  - ✿ stimulace přestavby kostí a svalů – převaha katabolického působení
    - ✿ osteoporosa, hyperkalcemie, hyperkalciurie (↓ TH = nanismus)
  - ✿ ↑ neuromuskulární dráždivosti (třes, svalová slabost)



**EUTHYREOSA**  
endemická struma

+KI, +KI/T4, +T4

**HYPOTHYREOSA**  
thyreoiditida  
stav po operaci

+T4, +T4/KI

**HYPERTHYREOSA**  
Graves-Basedow  
funkční autonomie

+karbimazol, +PTU

**EUTHYREOSA**  
špatná periferní  
konverse

+T4/T3, +T3



# HYPERTHYREOSA

□ TSH, v 90 % ○ T3, ○ T4; v 5% ○ T3, norm. T4

✿ prevalence: 4 : 1000, 0.4 : 1000

✿ únava, pocení, dušnost, ztráta váhy, ztráta svalové hmoty, zvýšená chuť k jídlu, oftalmopatie, struma, kardiologické problémy

- ✿ **GRAVES-Basedow:** aAb mimikující TSH a stimulující TSH receptor, ↓TSH, ↑T3, ↑T4,
  - ✿ dlouhodobě karbimazol, propylthiouracil, methimazol, radiojod, chirurgie
- ✿ **TOXICKÁ VÍCEUZLOVÁ STRUMA:** dlouhý vývoj, deficiencie jodu, může vést k autonomitě
- ✿ **TOXICKÝ ADENOM:** konstituční aktivace genet. pozměněn. TSH receptoru, často T3 toxik., chirurgie
- ✿ **SUBKLINICKÁ HYPERTHYREOSA** = ↓TSH, norm. T4, T3
- ✿ **THYROTOXICOSIS FACTITIA:** z exogenního podávání TH
- ✿ **SYNDROM JOD-BASEDOW:** podávání I pacientům se strumou
- ✿ **DE QUERVAINOVA SUBAKUTNÍ THYROIDITIDA:** virový, mikrobiální zánět ŠŽ
- ✿ **NEPŘIMĚŘENÁ SEKRECE TSH** = norm. až ↑TSH, ↑T4
- ✿ **EUTHYROIDNÍ HYPERTHYREOXINEMIE** = norm. TSH, ↑T4, (↑T3)



# HYPOTHYREOSA

## ○ TSH; □T4, (□T3)

- ✿ únava, letargie, netolerance chladu, zvýšená menstruace, zácpa, vzrůst váhy, suchá pokožka, edemy, hluchota, ztráta rovnováhy, hyperprolaktinemie ( $\uparrow$  TRH), struma ( $\uparrow$  TSH), poruchy fertility ( $\downarrow$  gonadotropiny)
  - ✿ podávání L-T4
- ✿ **KONGENITÁLNÍ:** incidence 1:3500
  - ✿ vadný vývoj ŠŽ, méně enzymová deficeience
  - ✿ zástava růstu, ireverzibilní poškození CNS
  - ✿ screenening na TSH (T4) – do 48 hod. po porodu  $\downarrow$  na normální
- ✿ **DĚTSKÁ:** Hashimoto, poruchy růstu
- ✿ **PRIMÁRNÍ:** autoimunní Hashimotova thyroiditida
  - ✿ prevalence 2%,  $\uparrow$  stáří, 4x častěji než
- ✿ **SUBKLINICKÁ:** mírně  $\uparrow$  TSH; norm. T3, T4
  - ✿ prevalence 15-20% starších
- ✿ **SEKUNDÁRNÍ:** poruchy sekrece TSH (někdy biologicky méně aktivní), TRH
  - ✿ prevalence 1%

# ↓ / ↑ thyreoidální hormony, laboratorní diagnostika

## ✿ EUTHYROIDNÍ SICK SYNDROM - LOW T3 SYNDROM

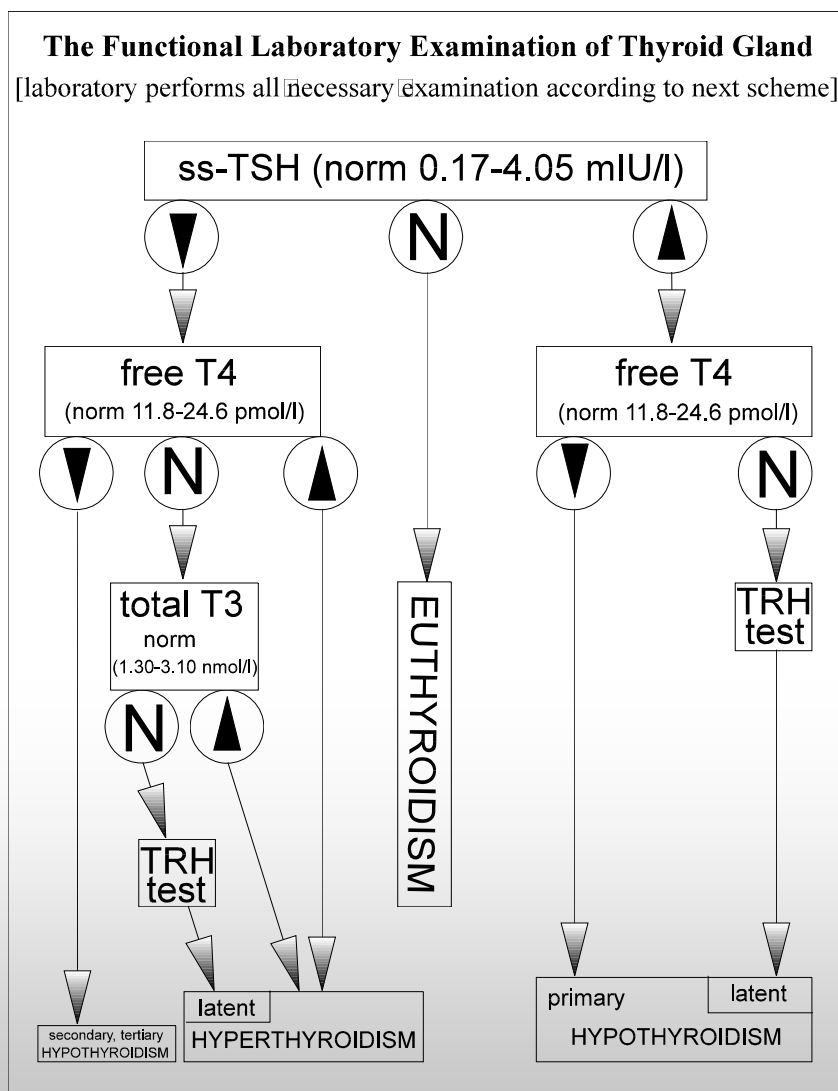
✿ u nethyroidálních onemocnění

✿ porucha sekrece liberinů

✿ inhibice konverze T4 na T3, velmi vážná onemocnění mají ↓TSH, ↓T4, ↓T3 – korelace se špatnou prognosou

## ✿ FAMILIÁRNÍ DISALBUMINEMICKÁ HYPERTHYROXINEMIE

✿ autosomálně dominantní, až 80x↑ afinita albuminu k T4 (T3) = TT4 je ↑



subclinical hypothyroidism: + TSH, normal fT4

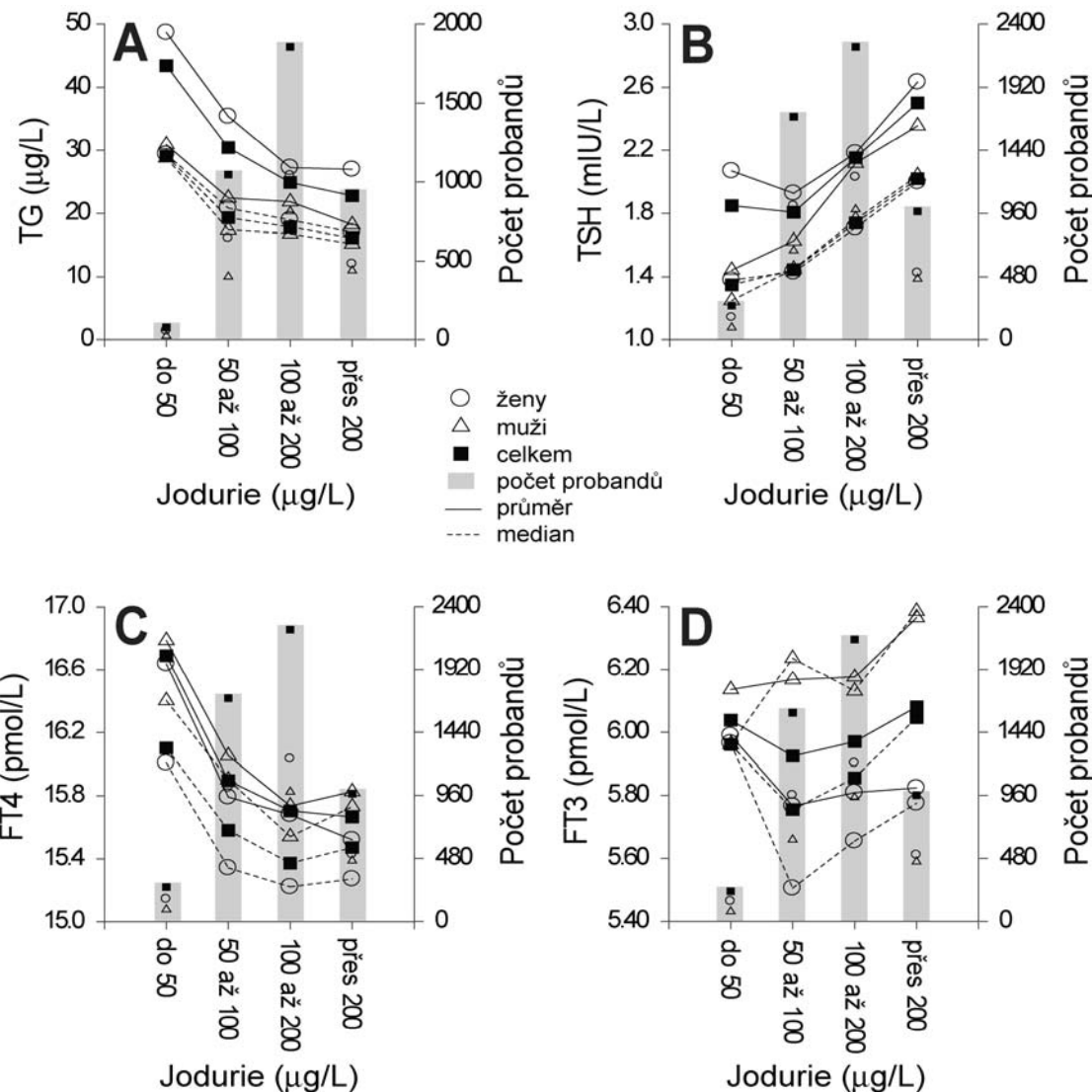
subcl. hyperthyroidismus: - TSH, normal fT4, T3

low T3 syndrom: 83% normal fT3

# Parametry ovlivňující štítnou žlázu

- ✿ jod a TSH patří mezi dva hlavní fyziologické regulátory funkce i objemu štítné žlázy
  - ✿ TSH stimuluje funkci štítné žlázy cestou aktivace cAMP kaskády
  - ✿ jod snižuje odezvu štítné žlázy na TSH cestou inhibice své vlastní oxidace v procesu biosyntézy thyreoidálních hormonů (Wolff-Chaikoffův efekt)
    - ✿ příliš velký příjem jodu zvyšuje incidenci jodem indukovaného hypothyreoidismu, hyperthyreoidismu, autoimunních onemocnění a zřejmě zde existuje i souvislost s karcinomem štítné žlázy
    - ✿ příliš malý přísun jodu do organismu vede k mentální retardaci, ke vzniku strumy, hypothyreoidismu a k řadě dalších onemocnění souhrnně označovaných jako nemoci z nedostatku jodu
  - ✿ při nedostatečném zásobení organismu jodem vykazují thyreocyty zvýšenou citlivost na TSH
    - ✿ se vzrůstající hodnotou jodurie dochází ke snížení citlivosti thyreocytů na stimulaci TSH, tím i k poklesu hodnot FT4 a koncentrace TSH vzrůstá

Bílek R, Čerovská J: Jod a tyreoidální hormony. Vnitr Lek 52(10)(2006)881-6  
 Populační studie prováděné v letech 1995 – 2002 v České republice



# Iodine (I) and thyroid gland

## ❄ I inhibits acutely its own oxidation

- ❄ Wolff-Chaikoff effect - inhibition of  $H_2O_2$  generation
- ❄ reduction of I trapping after a delay
  - ❄ adaptation to the Wolff-Chaikoff effect
    - ❄ the inhibition of NIS gene expression and later of its synthesis
- ❄ I inhibits thyroid hormone secretion at high concentrations

## ❄ the modulation by iodide of the thyroid response to TSH plays a major role in the negative feedback loop

- ❄ reduction of mRNA for thyroid peroxidase (TPO) and the Na/I symporter (NIS)
- ❄ inhibition of cAMP cascade at the level of  $G_s$  proteins or cyclase
- ❄ inhibition  $Ca^{2+}$ -PIP2 cascade at level of  $G_q$  proteins, phospholipase C
  - ❄ inhibition of  $H_2O_2$  generation

# The Elimination of Iodine Deficiency in the Czech Republic

Zamrazil V, Bilek R, Čerovská J, Delange F: The elimination of iodine deficiency in the Czech Republic: the steps towards success. *Thyroid* 14(1)(2004)49-56  
Bilek R, Bednář J, Zamrazil V: Spectrophotometric determination of urinary iodine by Sandell-Kolthoff's reaction subsequent to dry alkaline ashing. Results from the Czech Republic in period 1994–2002. *Clin Chem Lab Med* 43(6)(2005)573-580

## ■ Czech Republic is region with iodine deficiency

- 1947: cooking salt is supplemented KI (5 or 12 ppm)
- Law No. 20/1966, SN 580910: 18 mg I/kg of salt
- Law No. 110/1997, Regulations No 298/1997, 446/2004: 20 - 34 mg I/kg of salt
- Regulations 293/1997, 450/2004:
  - recommended iodine daily intake 150 µg
  - Iodine in the form of iodate or iodide

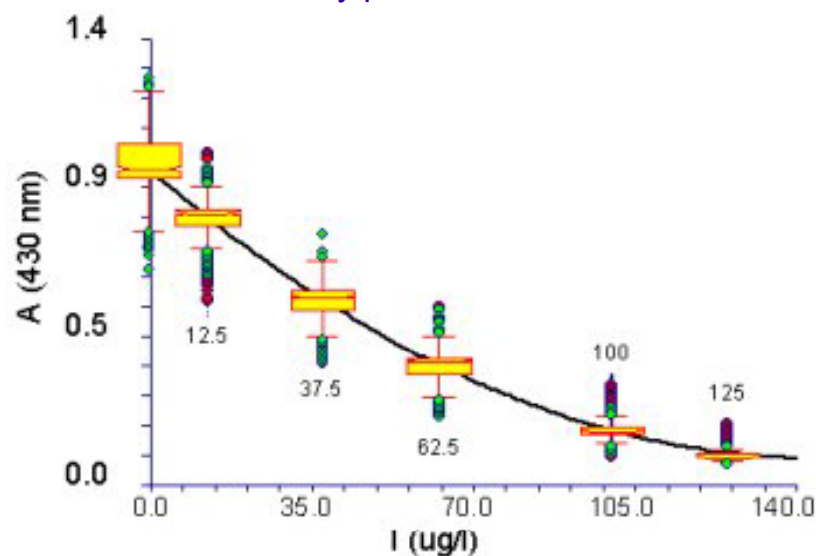


# Laboratory procedure for spectrophotometric determination of iodine in urine

Mean of 834 calibration curves demonstrated as a notched box plot with lower/upper adjacent values and with outliers is described by equation:

$$Y = 0.98615 - 0.01246 * X + 0.00004 * X^2.$$

analytical sensitivity 2.6 µg I/L  
limit of quantification 11.7 µg I/L  
intraassay precision 4 %  
interassay precision 4.9 %



- mineralization by alkaline ashing
- Sandell-Kolthoff's reaction - iodine transformed to iodide acts as a catalyst of reaction:
  - $2 \text{Ce}^{4+}(\text{yellow colour}) + \text{As}^{3+} \rightarrow 2 \text{Ce}^{3+}(\text{colourless}) + \text{As}^{5+}$
  - brucine reduced the remaining  $\text{Ce}^{4+}$  ions and itself creates an reddish oxidized chinoid form suitable for detection

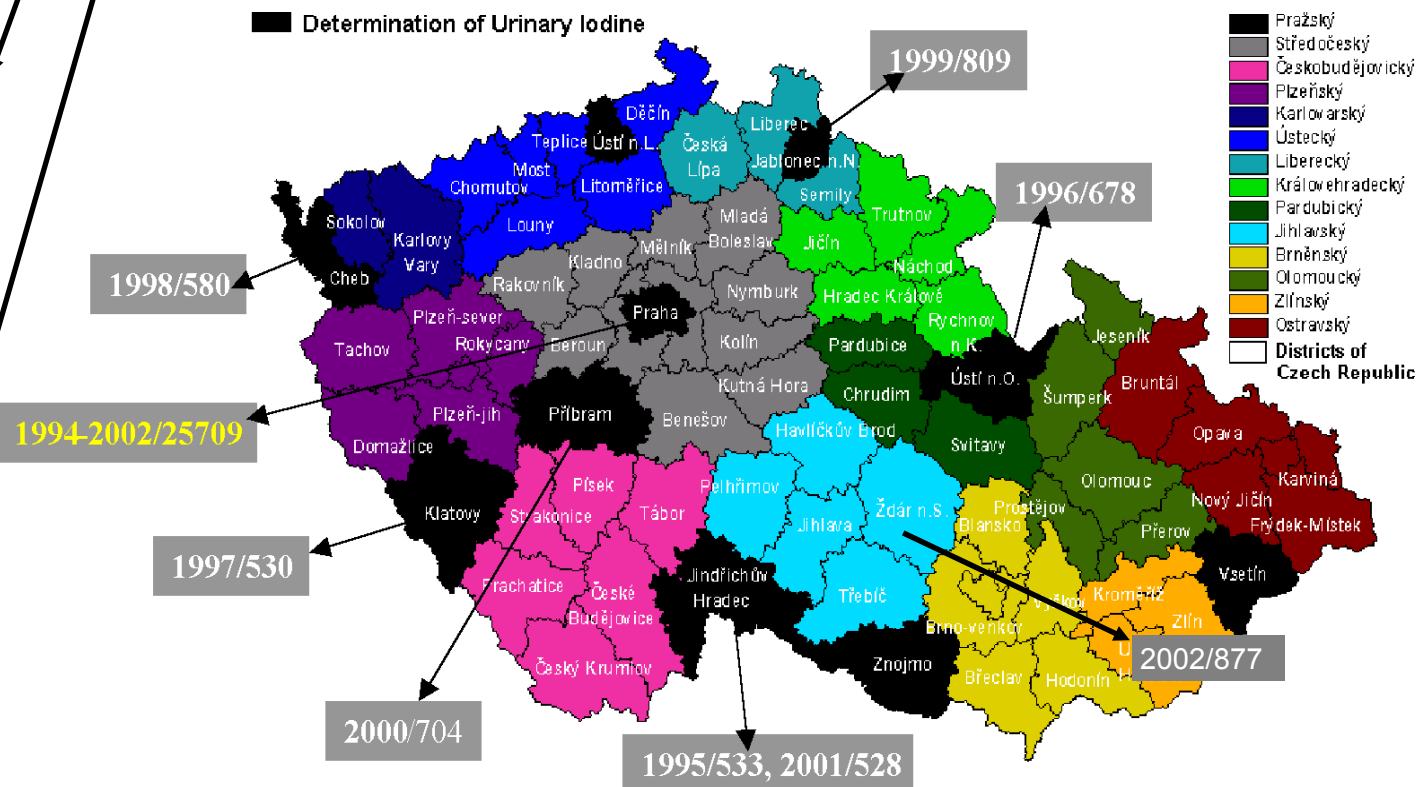
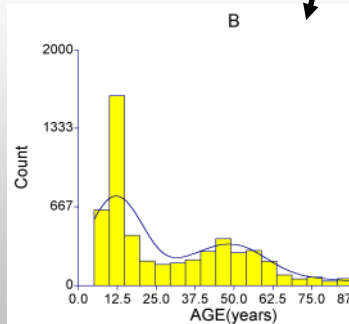
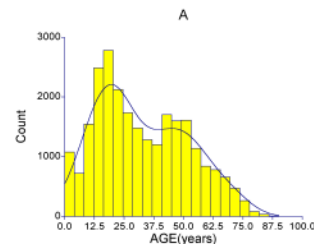


# Collection of morning or other casual urine specimens, histograms of age

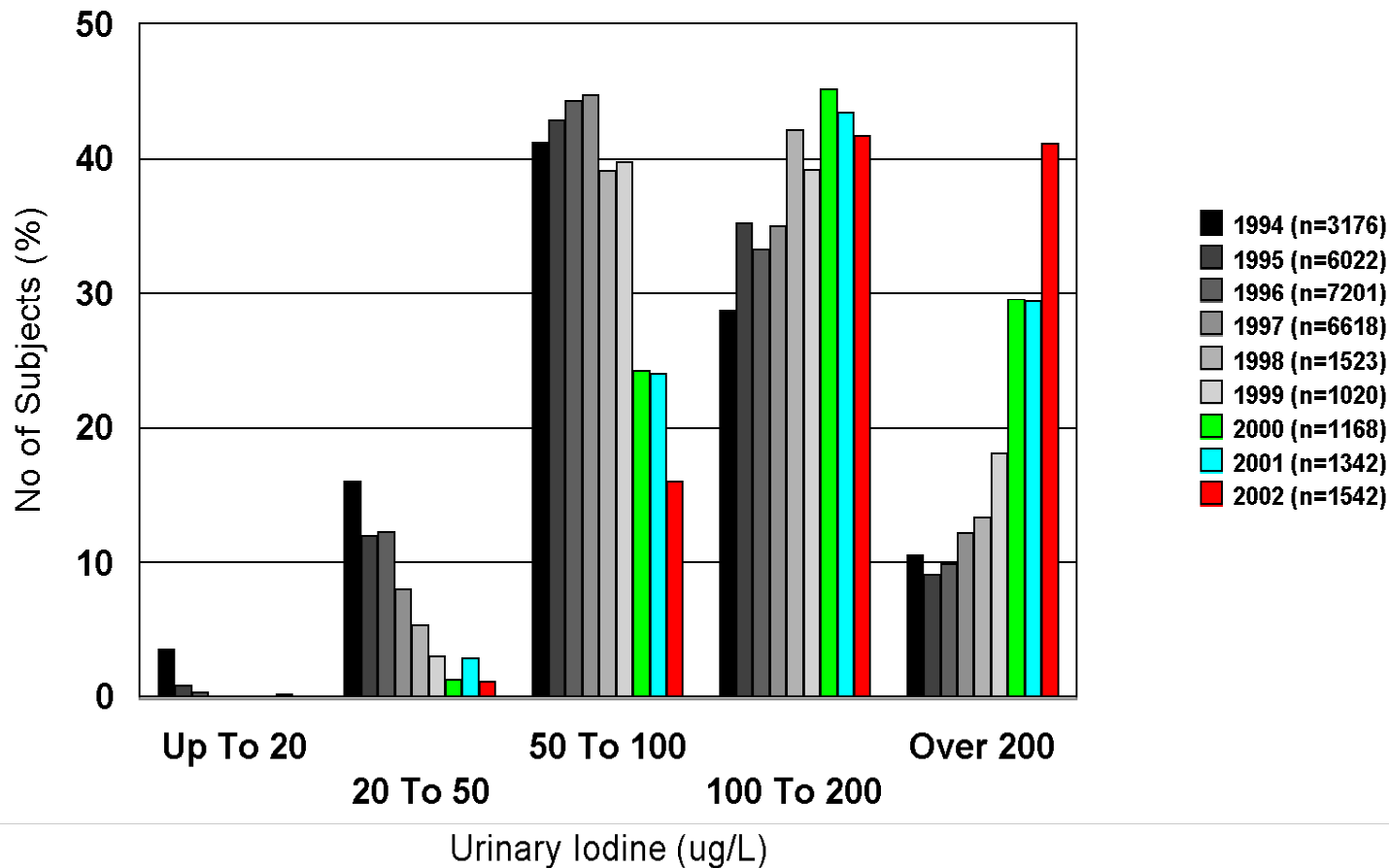
total population: n=29612, 23399 females, 6213 males

hospital population: n=24349, 20412 females, 3937 males

general population: n=5263, 2987 females, 2276 males



Frequency distribution of iodine intake according the WHO-UNICEF-ICCIDD recommendation in % of total population belong to individual ranges of **severe** (<20 µg I/L), **moderate** (20-50 µg I/L) , **mild** (50-100 µg I/L), **adequate** (100-200 µg I/L) and **more than adequate** (>200 µg I/L) urinary iodine concentrations among years 1994 - 2002.

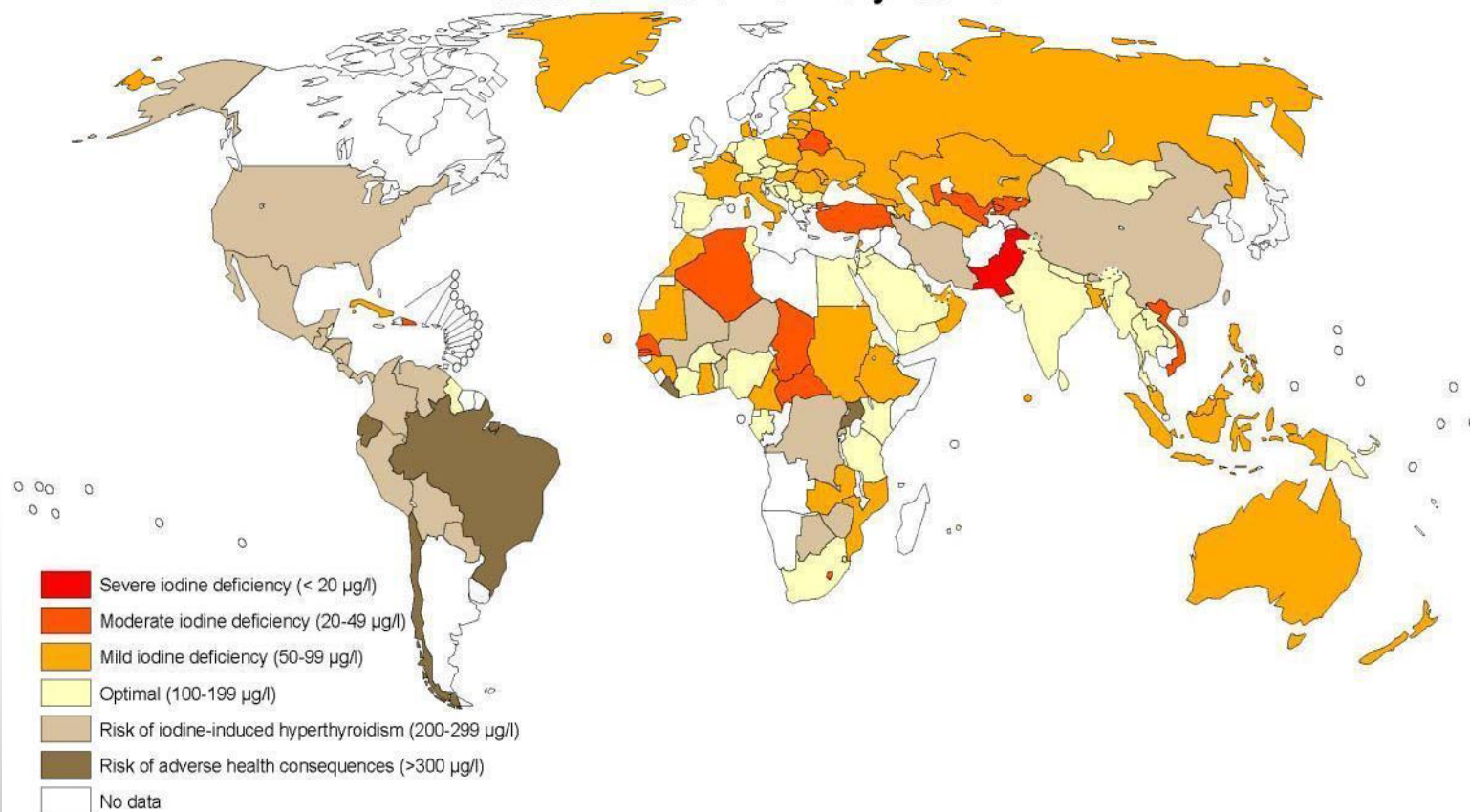


# WHO



Department of Nutrition  
World Health Organization

## Degree of Public Health Significance of Iodine Nutrition Based on Median Urinary Iodine



Source: WHO Global Database on Iodine Deficiency, 1993-2003

Data was produced by WHO using the best available evidence and do not necessarily correspond to the official statistics of Member States.

The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

© WHO 2003. All rights reserved.

# Iodine deficiency

- ✿ WHO estimated the worldwide prevalence of iodine deficiency using urinary iodine data collected for 92 % of the world's population in the period from 1993 to 2003
  - ✿ Nearly 2 billion individuals have inadequate ( $< 100 \mu\text{g I/L}$  urine) iodine nutrition
  - ✿ Occurrence of iodine deficiency was observed in 36.4 % of school-aged children
- ✿ A major indicator corresponding to iodine nutrition
  - ✿ iodine in urine reflects recent changes
  - ✿ thyroid volumes reflect a population's history
  - ✿ thyroglobulin is a valuable indicator of iodine nutrition in a population, where thyroid disorders are not frequent
  - ✿ TSH ?



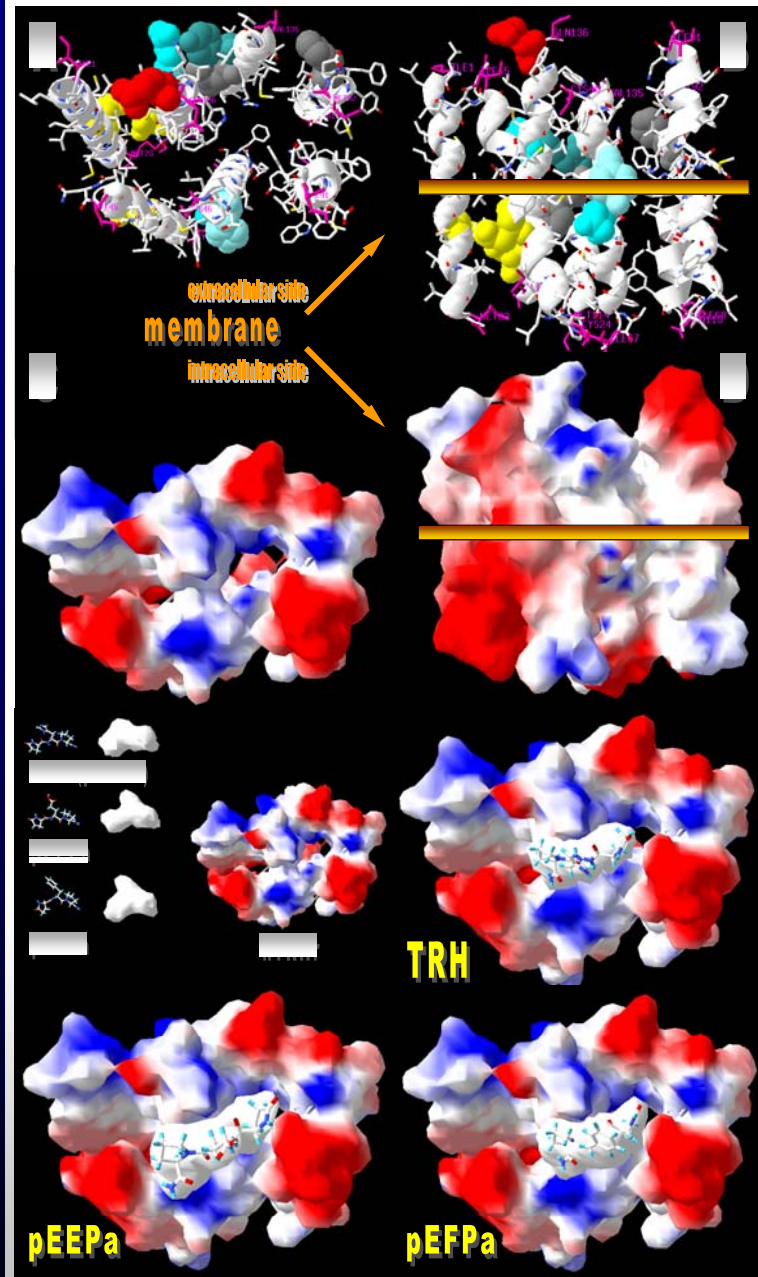
Struma s parakretinismem. Centrální oblast .

# Vliv jodu na štítnou žlázu

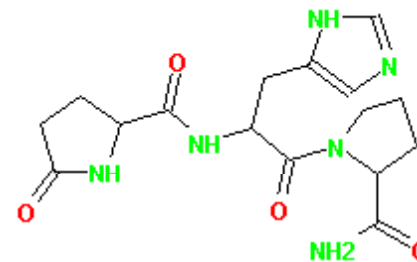
Prof. MUDr. V. Zamrazil, DrSc., Endokrinologický ústav

- ✿ Dostatečný přívod jodu je nezbytný k zajištění normálního růstu a funkce štítné žlázy
- ✿ Nepoškozená štítná žláza se adaptuje na vysoký přívod jodu bez závažných poruch
  - ✿ Japonsko, 3000–4000 ug/den
- ✿ Zvýšení přívodu jodu zvýší přechodně výskyt tyreotoxikozy při funkční autonomii
  - ✿ nodozní struma vzniká na podkladě jodového deficitu v mládí
- ✿ Aktivace autoimunitního procesu je prokázána u predisponovaných živočichů; u člověka je k tomu pravděpodobně nutná zátěž vyšší dávkou jodu (autoimunitní tyreoiditida, Graves-Basedowovou tyreotoxikozou)
- ✿ Gravidita je spojena se zvýšenou imunotolerancí; přidání jodu v dávce 100 ug/den nevede obvykle k aktivaci tyreoidální autoimunity
- ✿ Dlouhodobé příznivé účinky dostatečného přívodu jodu převažují nad potencionálními nepříznivými vlivy
  - ✿ nemění se celkový výskyt, ale stoupá poměr papilárního (méně nebezpečného) k folikulárnímu karcinomu štítné žlázy





## TRH (thyreoliberin, thyrotropin-releasing hormone)



pyroGLU-HIS-PRO.NH<sub>2</sub> (pEHPa)

- ✿ 3D-model of human TRH receptor generated by SwissMod server (front and side view)
  - ✿ terminal amino acids of individual 7 TM chains are coloured in violet
  - ✿ negative charge in red, positive in blue
    - ✿ TRHr IS MEDIATED BY G PROTEINS WHICH ACTIVATE A PHOSPHATIDYLINOSITOL-CALCIUM SECOND MESSENGER SYSTEM.
    - ✿ INTEGRAL MEMBRANE PROTEIN, BELONGS TO FAMILY 1 OF G-PROTEIN COUPLED RECEPTORS
- ✿ probable structural interactions between TRH or TRH-like peptides and extracellular domains of hTRHr transmembrane regions.

# The primary structure of human TRH receptor

```

                                1           2
                                chain A: e-12 3456789012 3456789012 3-i
1  menetvseln qtqlgpravv aleygvvtil lvliicglgi vgnimvvlvv mrtkhmrtp
                                3           4           5           6
chain B: i-456789012 3456789012 345-e chain C: e-6 7890123456 7890123456
61 ncylvslava dlmvlvaagl pntdsiygs wvygyvgclc itylgylgin asscsitaft
                                7           8           9
7-i chain D: i-890123 4567890123 45678901-e
121 ieryiaichp ikagflctfs rakkiifvw aftsllycmw fflldlnist ykdaiviscg
                                1           1
                                0           1
chain E: e-2345678 9012345678 90123-i
181 ykisirnyysp iylmdfgvfy vvpmlatvl ygfiarilfl npipsdpken sktwkndsth
                                1           1
                                2           3 chain
chain F: i-4567 8901234567 89012345-e G: e-6789
241 gntnlvntts nrcfnstvss rkqvtkmlav vvilfallwm pyrtlvvvns flsspfqenw
1           1
4           5
0123456789 012345678-i
301 fllfericiy lnsainpviy nlmsgkfraa frklcnckgk ptekpanysv alnysvikes
361 dhfstelddi tvtdtylsat kvsfddtcla sevsfsgs

```

- Primary structure of human TRH receptor (yellow background) with transmembrane regions (chains A - G, red characters)
- Amino acids of transmembrane regions were used for generation of hTRHr computer model with numbering according the line above the primary structure of hTRHr, e- means extracellular, i- intracellular end of chains.



# TSH (thyreotropin)

- ❖ **29 kDa glykoprotein**

- ❁ alfa-podjednotka společná s LH, FSH, hCG

- ❁ beta podjednotka specifická

- ❖ **logaritmická odezva na TH**

- ❁ prodloužená odpověď na podávání/vysazení TH

- ❖ **ANALYTIKA**

- ❁ do 1986 1 generace (RIA)

- citl.~1 mIU/l HYPOthyreosa

- ❁ po 1984 2 generace (IRMA)

- citl.~0.1 mIU/l EU-, HYPOtyreosa

- ❁ od 1989 3 generace

- citl.~0.01 mIU/l HYPER-, EU-tyreosa

- ❁ od 1992 4 generace

- citl.~0.001 mIU/l (subkl.)HYPER-, EU-

- ❁ non-radio ♦ radioimunoanalýzy

- ❁ problémy s revmatickým faktorem, heterofilními protilátkami

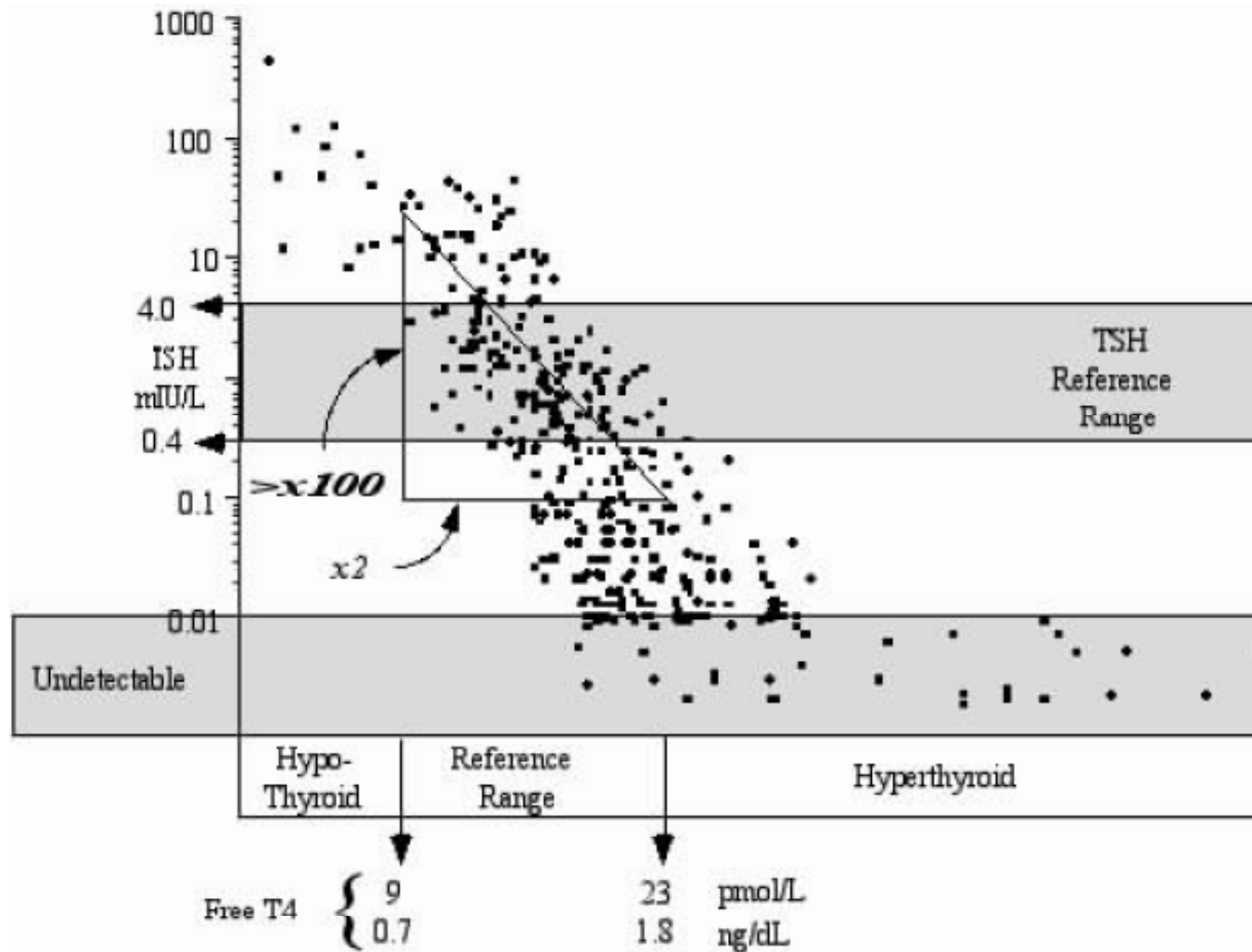
- ❖ **nejlépe postihuje funkci štítné žlázy: □fT4 o 50% ™ 100x ○ TSH**

- ❁ ?TRH-test

- ❖ **↓TSH=těžké nethyroidální onemocnění, hladovění, deprese, cirkadiánní variace**

# log/linear inverse relationship between serum TSH and free T4

Demers LM, Spencer CA (Eds): LABORATORY MEDICINE PRACTICE GUIDELINES. the National Academy of Clinical Biochemistry, USA, 2002



# CELKOVÉ THYREOIDÁLNÍ HORMONY

- ✿ 50-100x ↑ T4 než T3 v cirkulaci, T3 vznik hlavně dejodací T4 (20% v ŠŽ)
- ✿ T3 má nižší afinitu k vazebným proteinům, asi 4x vyšší biologickou aktivitu.
- ✿  $T_{0.5} = 1 \text{ den (T3), 7 dnů (T4)}$

do 1967: PBI = protein bound iodine, BEI = butanol-extractable iodine (T4, T3...)

do 1975: RIA s extrakcí TH z vazebných proteinů

od 1977: bezextrakční imunoanalýzy s uvolněním vázaných TH 8-anilinnafthalensulfonovou kyselinou v prostředí veronalového pufru, někdy se používají i saliciláty

- ✿ **vazebné proteiny**  $K_a$  (TBG) pro T4= $10^{10}$  l/mol, pro T3= $5 \times 10^8$  l/mol

- ✿ ↑ i ↓ vazebných proteinů => ↑ nebo ↓ tTH, ale normální free TH

- ✿ ↑ vazebných prot.

- ✿ estrogeny, těhotenství, kontraceptiva

- ✿ mutace genu kodujícího albumin => 80x ↑  $K_a$  k T4

- ✿ ↓ vazebných prot.

- ✿ androgeny, glukokortikoidy, poruchy proteosyntézy, jaterní onemocnění

- ✿ **autoprotilátky** = maskují TH (RIA s PEG => ↓ TH), většinou ↑ TH

- ✿ **léky:**

- ✿ fenytoin, fenylobutazon, barbituráty, diazepam, propranolol, heparin, furosemid, saliciláty ↓ TH

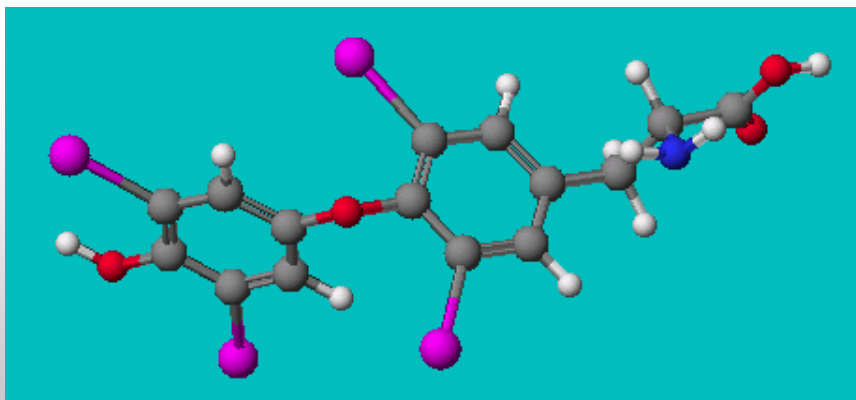
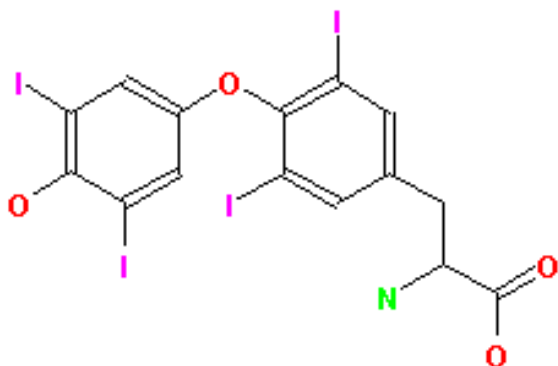
- ✿ vytěsňují TH z vazby na vazebné proteiny

- ✿ D/L-T4, amiodaron ↑ TH.

- ✿ tT3 více závislý na podmínkách: = teplota, stress, léky, nemoc

- ✿ nižší konc. v oběhu, syntéza hlavně na periférii, dejodázy

# Thyroxine (T4)



✿ Molecular formula = C<sub>15</sub> H<sub>11</sub> I<sub>4</sub> N O<sub>4</sub>

✿ Molecular Weight = 776.870

✿ Composition

✿ C(23.19%)

✿ H(1.43%)

✿ I(65.34%)

✿ N(1.80%)

✿ O(8.24%)

✿ Molar Refractivity = 125.44 0.3 cm<sup>3</sup>

✿ Molar Volume = 294.7 3.0 cm<sup>3</sup>

✿ Parachor = 880.4 4.0 cm<sup>3</sup>

✿ Index of Refraction = 1.795 0.02

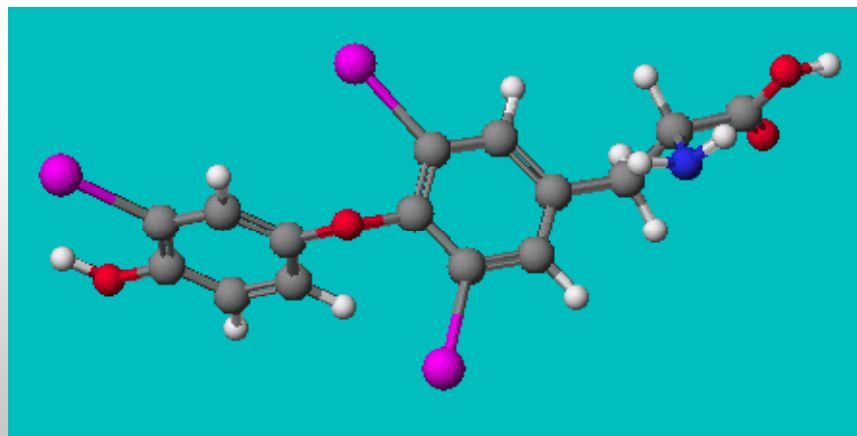
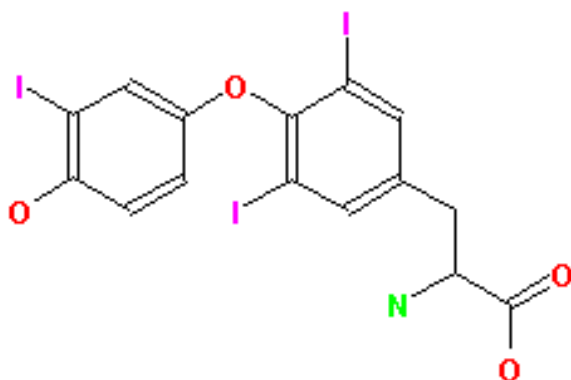
✿ Surface Tension = 79.6 3.0 dyne/cm

✿ Density = 2.635 0.06 g/cm<sup>3</sup>

✿ Dielectric Constant = Not available

✿ Polarizability = 49.73 0.5 10<sup>-24</sup>cm<sup>3</sup>

# Triiodothyronine (T3)



✿ Molecular formula =  $C_{15}H_{12}I_3NO_4$

✿ Molecular Weight = 650.974

✿ Composition

✿ C(27.68%)

✿ H(1.86%)

✿ I(58.48%)

✿ N(2.15%)

✿ O(9.83%)

✿ Molar Refractivity = 112.53 0.3 cm<sup>3</sup>

✿ Molar Volume = 272.6 3.0 cm<sup>3</sup>

✿ Parachor = 804.8 4.0 cm<sup>3</sup>

✿ Index of Refraction = 1.763 0.02

✿ Surface Tension = 75.9 3.0 dyne/cm

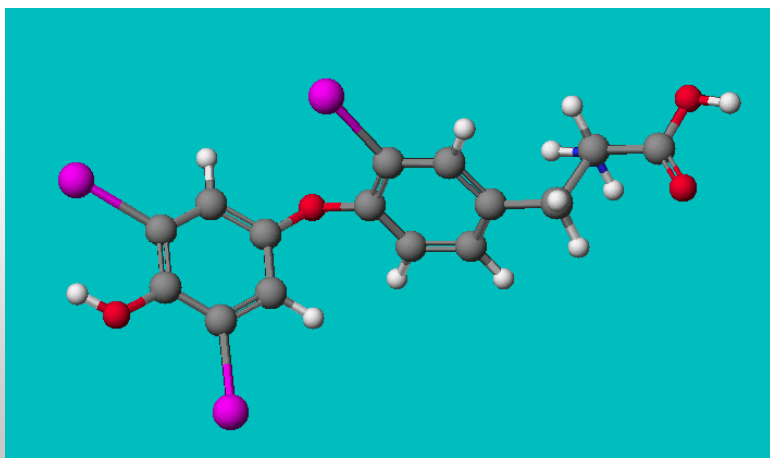
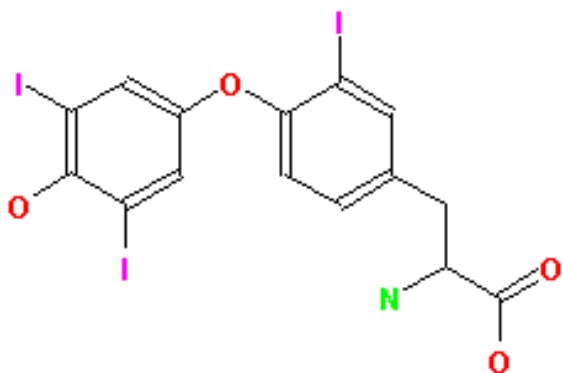
✿ Density = 2.387 0.06 g/cm<sup>3</sup>

✿ Dielectric Constant = Not available

✿ Polarizability = 44.61 0.5 10<sup>-24</sup>cm<sup>3</sup>

# Reverse Triiodothyronine (rT3)

↑ rT3, (↓ T3) – fasting, serious physical stress, ↓ rT3 (↓ T3) - hypothyroidism



✿ Molecular formula =  $C_{15}H_{12}I_3NO_4$

✿ Molecular Weight = 650.974

✿ Composition

✿ C(27.68%)

✿ H(1.86%)

✿ I(58.48%)

✿ N(2.15%)

✿ O(9.83%)

✿ Molar Refractivity = 112.53 0.3 cm<sup>3</sup>

✿ Molar Volume = 272.6 3.0 cm<sup>3</sup>

✿ Parachor = 804.8 4.0 cm<sup>3</sup>

✿ Index of Refraction = 1.763 0.02

✿ Surface Tension = 75.9 3.0 dyne/cm

✿ Density = 2.387 0.06 g/cm<sup>3</sup>

✿ Dielectric Constant = Not available

✿ Polarizability = 44.61 0.5 10<sup>-24</sup>cm<sup>3</sup>

# PROTEINY VÁZAJÍCÍ THYREOIDÁLNÍ HORMONY

**TBG, transthyretin (TBPA, thyroid binding prealbumin), albumin**

❄ produkovány v játrech

❄ syntéza ovlivňována řadou nethyroidálních stavů

❄  $\uparrow$  estrogény,  $\downarrow$  androgeny,  $\downarrow$  kortikoidy,  $\downarrow$  poruchy proteosyntesy

změněné koncentrace mají za následek změnu koncentrace celkových TH

mutace vedou ke změně afinity vazebných míst pro TH

léčiva mohou vytěsnit TH z vazby na TBG (saliciláty, barbituráty)

❄ **TBG: 58 kDa glykoprotein s 1 vysoce afinitním místem pro T4 nebo T3**

❄ afinita k T4 vyšší než k T3, reservoár cirkulujících TH

❄ syntéza v játrech,  $T_{0.5}=5$  dnů, serpin rodina SER antiproteas, 395 aa (chr.X)

❄  $\downarrow$  TBG  $\Rightarrow \downarrow$  total TH, ( $\uparrow$  free TH)

❄ u vážně nemocných pacientů:  $\downarrow$  TBG způsobuje  $\uparrow$  fT4 o 30%

❄ **TBG:**  $c=3,57 \cdot 10^{-7}$  mol/l,  $K_a$  (T4)= $2,2 \cdot 10^{10}$  l/mol, M=58kDa

❄ **TBPA:**  $c=5,56 \cdot 10^{-6}$  mol/l,  $K_a$  (T4)= $3,9 \cdot 10^7$  l/mol, M=54kDa

❄ **HSA:**  $c=6,18 \cdot 10^{-4}$  mol/l,  $K_a$  (T4)= $1,3 \cdot 10^6$  l/mol, M=68kDa

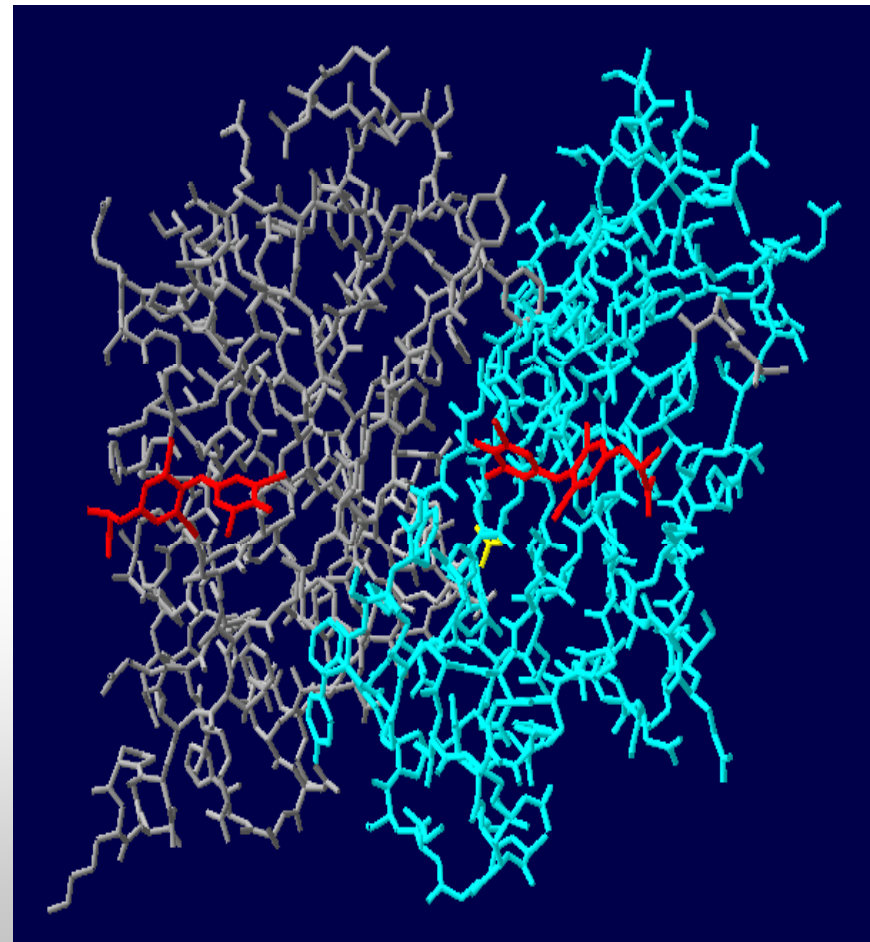
❄ monomer, chromosom 4, 609 aa



# Transthyretin (prealbumin)

## X-Ray Diffraction (2ROX .pdb)

- ✿ 4 identické podjednotky
- ✿ tetramer 55 kDa,  
neglykosylován
- ✿ vazba 1x T4 (vysoká  
afinita) + 1x T4 (nízká  
afinita)
- ✿  $T_{0.5}=2$  dny
- ✿ částečně v komplexu s  
retinol (vit.A)-vazebným  
proteinem



# VOLNÉ THYREOIDÁLNÍ HORMONY

❖ **Biologická funkce štítné žlázy je realizována volnými TH.**

❖ **ANALYTIKA:** všechny měřicí metody porušují rovnováhu

❖ **PŘÍMÉ METODY:** rovnovážná dialýza (referenční metoda), ultrafiltrace

❖ nejlepší, ale nevhodné pro rutinu

❖ odstranění 1 mM TT4 ze séra ↓ fT4 v séru o max. 2%

❖ **NEPŘÍMÉ INDEXOVÉ METODY:** založené na stanovení vazebné kapacity séra

❖  $fT4I = tT4 * THBR$ ,  $THBR = T3U(\text{pacient}) / T3U(\text{normál})$ ,  $T3U = \text{sérum} + [125\text{-I}]\text{-T3} + \text{nesp. separátor}$

❖ měří se, jaká část  $125\text{-I-T3}$  se zadrží na iontoměniči

❖ vysoké zadržení = nízká koncentrace neobsazených míst na vazebných proteinech

❖ T3 nižší  $K_a$  = vyšší signál na IEC

❖ **dvoukroková nekompetiční ZPĚTNÁ TITRACE**

❖ krátká inkubace séra s imobilisovanou Ab, promytí, přidavek traceru s nižší afinitou (aby nedošlo k vytěsnění vazby Ag na Ab), který obsadí nenavázaná místa Ab

❖  $\text{imm.Ab} + \text{Ag} \leftrightarrow \text{imm.Ab-Ag} + \text{imm.Ab}$ , promytí,  $+ \text{Ag}^* \leftrightarrow \text{imm.Ab-Ag} + \text{imm.Ab-Ag}^*$

❖ **jednokroková kompetiční ANALOGOVÁ METODA**

❖ využití značeného analogu vázajícího se na Ab, ale ne na vazebné proteiny = nejméně přesné,

❖ analog může interagovat s vazebnými proteiny, ruší léky jako furosemid, karbamazepin, D/L-T4, salicyláty, (biotin)

❖ **jednokroková kompetiční METODA ZNAČENÉ Ab**

❖ více robustní vůči interferencím

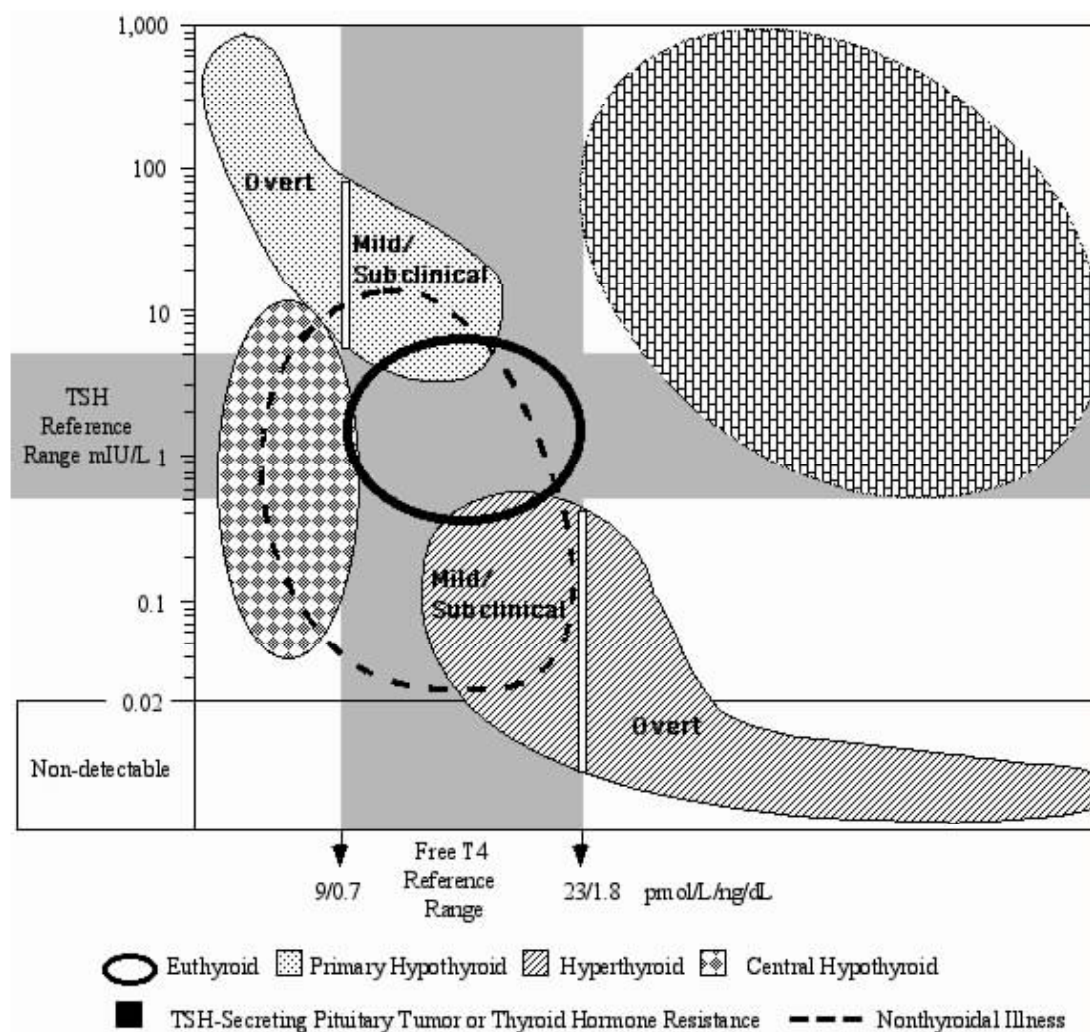
❖  $\text{imm.Ag} + \text{Ag} + \text{Ab}^* \leftrightarrow \text{imm.Ag-Ag} + \text{Ab}^*$

❖ ↑ fTH: heparin stimulující produkci nenasycených MK, které vytěsňují TH z albuminu, léčiva vytěsňující TH z vazebných proteinů (furosemid, ketoprofen, fenylbutazon, salicyláty), exogenní T4, T3, euthyroid sick syndrom, (↓ TBG)

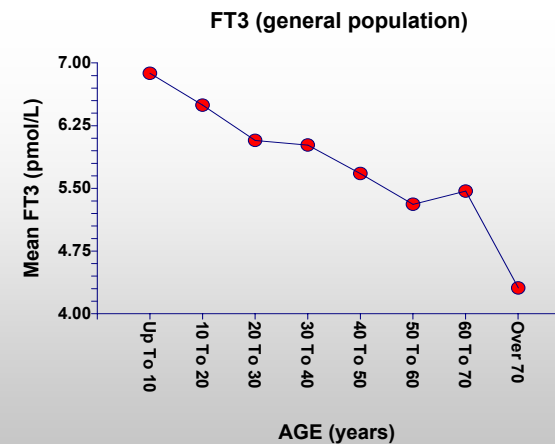
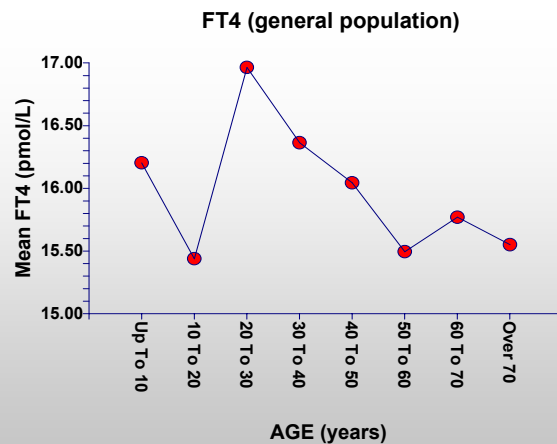
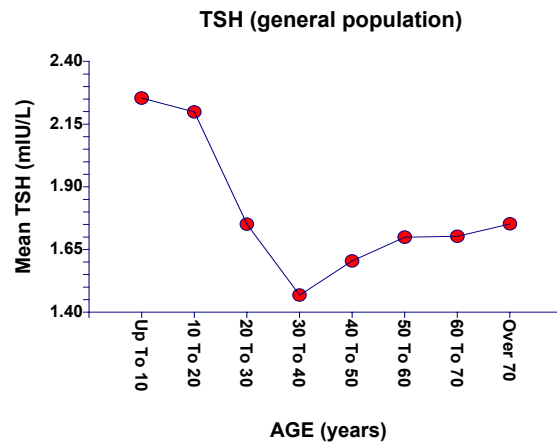
❖ ↓ fTH: 2, 3 trimestr těhotenství, vážná nethyroidální onemocnění

# TSH/FT4 Relationship in Different Clinical Conditions

Demers LM, Spencer CA (Eds): LABORATORY MEDICINE PRACTICE GUIDELINES. the National Academy of Clinical Biochemistry, USA, 2002



# The influence of age to concentrations of thyroid hormones



# THYREOIDÁLNÍ AUTOPROTILÁTKY

## ❖ interagující s TSH receptorem

### ❖ TSHr aAb (TRAb)

- ❖ stimulující (TSAb)/ inhibující (TBAb) TSH receptor
- ❖ Graves = TSAb, myxedem = TBAb
- ❖ v současnosti nahrazovány stanovením anti TPO
  - ❖ **přímé metody:** buněčná kultura thyrocytů, měří se změna cAMP
  - ❖ **nepřímé metody:** inhibice vazby hovězího 125I-TSH na isol. rTSH
  - ❖ TRAK: vepř./lidský rTSH - není možné rozlišit TBAb od TSAb

## ❖ neinteragující s TSHr

### ❖ **anti TG** (thyroglobulin), **anti TPO** (thyroidální peroxidasa)

- ❖ sekundární odpověď autoimunitního systému na poškození ŠŽ, korelují s lymfocytární infiltrací, mají komplement fixující cytotoxickou aktivitu
- ❖ alespoň 1 je přítomna v téměř 100% pacientů s Gravesem, Hashimotem.
- ❖ antiTPO (↑ autoimunní Hashimotova thyreoiditida, subklinický hypothyroidismus) citlivější než antiTG

## ❖ interferující (anti TH, heterofilní Ab, revmatické faktory)





# Thyroid hormone biosynthesis is dependent on:

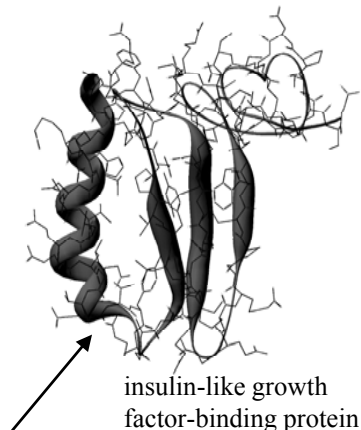
- ✿ iodide uptake and its incorporation into the thyroglobulin
- ✿ Major factors determining the thyroid hormone biosynthesis:
  - ✿ thyroglobulin – matrix for biosynthesis
  - ✿ TSH
  - ✿ expression of TSH receptor
  - ✿ sodium-iodine symporter (NIS)
  - ✿ pendrin
  - ✿ thyroid peroxidase (TPO)
  - ✿ NADPH-oxidase family (thyroid oxidase I (THOX1) and 2 (THOX2))
  - ✿ iodothyronine deiodinases I, II, III



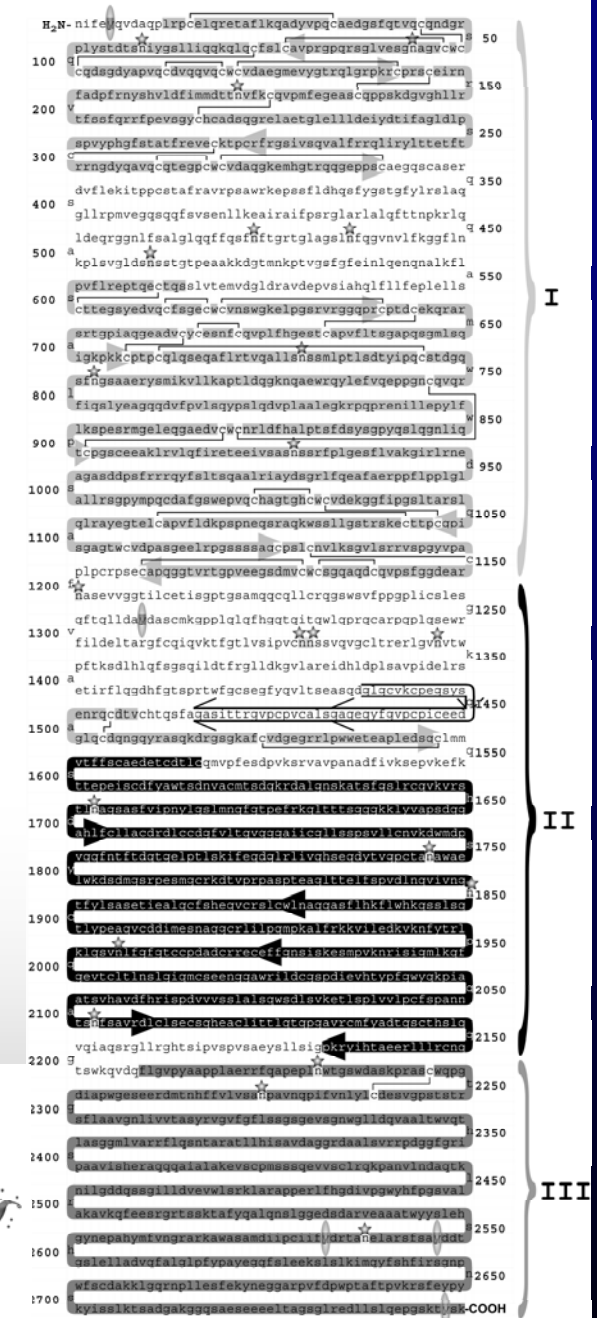
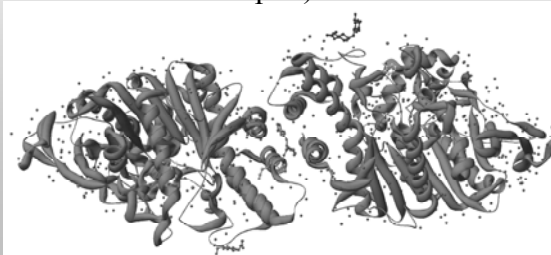
# Thyroglobulin (Tg)

## ✿ Tg homodimer subunit (2749 aa)

- ✿ primary structure according the ExPASy proteomics server of the Swiss Institute of Bioinformatics (access number P01266)
- ✿ narrow ellipses - **homonogenic tyrosines (y, 5 from total 66)**
- ✿ black lines - disulfide bridges connecting cysteines
- ✿ stars - potential glycosylation sites
- ✿ Part I of Tg subunit contains 10 Tg type 1 domains (part II has 1) marked as light shadow arrows (**inhibition of proteases**)
- ✿ Part II contains 3 Tg type 2 domains (bold lined arrows) and 5 Tg type 3 domains (solid black arrows) with internal homology
- ✿ Part III of the Tg subunit, shown as shaded arrow, shares approximately 30 % homology with cholinesterases
  - ✿ **binding to the cell membrane**
  - ✿ **Tg dimerization domain)**



3D structure of mouse acetylcholinesterase homodimer complex homological to part III of human Tg (X-ray diffraction, 1N5M.pdb)



# Thyroglobulin

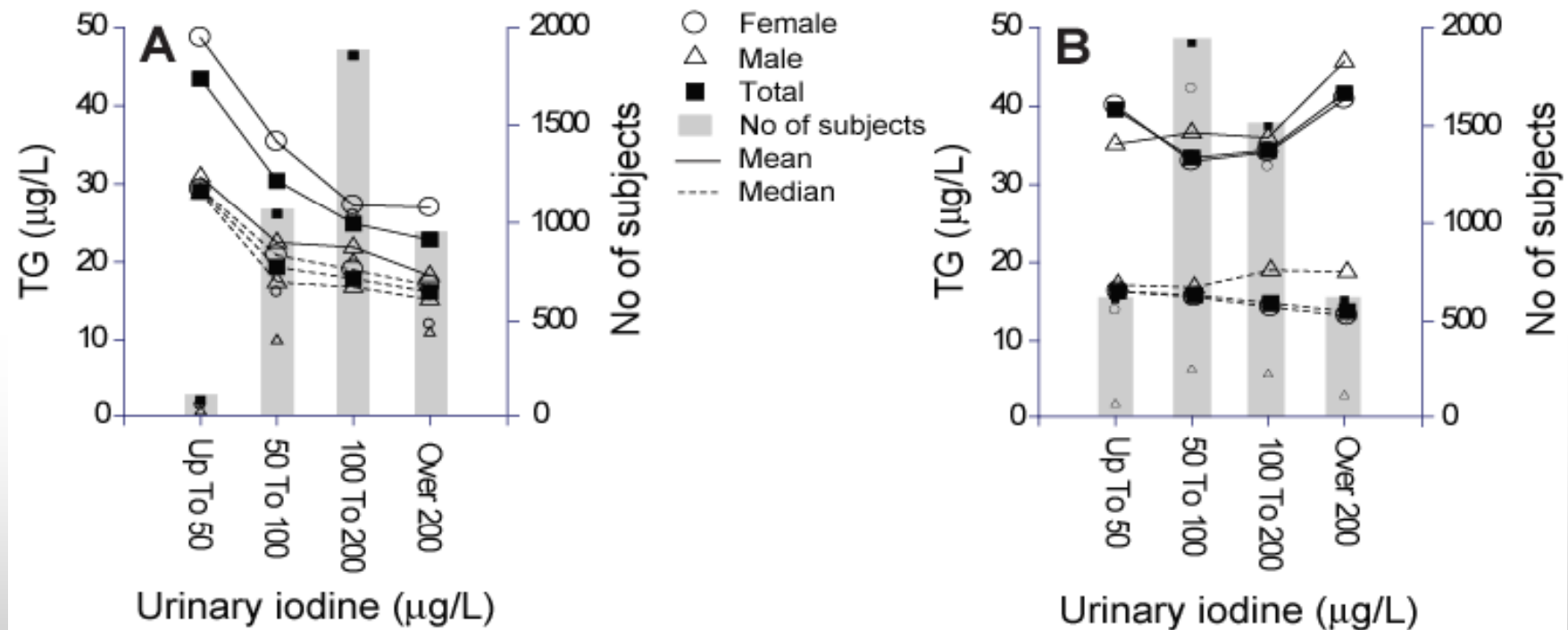
## ❁ Tg: one of the largest proteins in the body

- ❁ Mw of soluble dimer about 660 kDa, sedimentation coefficient of 19 S, pI of 4.4-4.7
- ❁ Tg gene: 48 exons on chromosome 8 (8q24.2 and q24.3)

## ❁ Tg: the major iodoglycoprotein of the thyroid gland

- ❁ 0.1-2.0% iodine; 8-10% total carbohydrate with galactose, mannose, fucose, N-acetyl glucosamine and sialic acid residues
- ❁ Tg consists of two identical subunits (**homodimer**)
- ❁ Tg belongs to the type-B **carboxylesterase/lipase family**
- ❁ Tg is a potent **suppressor of thyroid-specific gene expression** and can overcome TSH-increased gene expression - a negative feedback, autoregulatory mechanism that counterbalances TSH stimulation of follicular function
- ❁ thyroid hormone is liberated from Tg through endocytosis and complete lysosomal proteolysis of Tg
- ❁ endocytosis of human thyroglobulin
  - ❁ no-specific macropinocytosis due to TSH activation of the cAMP cascade
  - ❁ no-specific micropinocytosis without modulation of the regulatory cascades
  - ❁ receptor-mediated endocytosis using asialoglycoprotein megalin
- ❁ Tg is released from the thyroid by transcytosis
  - ❁ stimulation by TSH activation of the cAMP cascade
  - ❁ inhibition by  $\text{Ca}^{2+}$  and protein kinase C activation

# The relation of mean and median concentrations of serum thyroglobulin (Tg) on urinary iodine in general (A) and hospital (B) populations



# Clinical Uses of Serum Tg Measurement

- ❖ The serum Tg concentration integrates three major factors:
  - ❖ the mass of differentiated thyroid tissue present
  - ❖ any inflammation or injury to thyroid tissue which causes the release of Tg
  - ❖ the amount of stimulation of the TSH receptor (by TSH, hCG or TRAb).
- ❖ primary use of serum Tg measurements - tumor marker for differentiated thyroid cancer
  - ❖ approximately two thirds of patients have an elevated pre-operative serum Tg level
  - ❖ important post-operative tumor marker

# NIS

- ❁ human chromosome 19p13.2-p12, 15 exons, 643 aa, 13 TM segments
- ❁ thyroid cells, salivary and mammary gland, gastric mucosa
- ❁ thyroid iodine uptake is mediated by NIS at the basolateral side of the follicular cells
  - ❁ active transport by the iodide  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter (NIS) against the electrical gradient of sodium gradient across the basal membrane of the thyrocyte
    - ❁ 2  $\text{Na}^+$  ions = 1 iodide atom
    - ❁ also transport of  $\text{TcO}_4^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{SCN}^-$  with higher affinity than iodide

# Pendrin

- ❖ diffusion of iodide by a specialized channel - pendrin from the cell to the lumen at the apical membrane
- ❖ human chromosome 7q31, 21 exons, 780 aa, 11-12 TM domains, member of the sulfate protein transport family
- ❖  $\text{Na}^+$  independent iodine transport at the apical side of the follicular cells
  - ❖ also transport of sulfate, chloride and bicarbonate ions

# Thyroid peroxidase (TPO)

- ❖ using  $\text{H}_2\text{O}_2$  as a substrate TPO catalyzes:
  - ❖ iodide oxidation to free I or  $\text{I}^{(+)}$  (iodonium)
  - ❖ binding of I to thyroglobulin
  - ❖ iodotyrosine coupling in iodothyronines
- ❖ coupling requires that suitable tyrosyl groups in thyroglobulin are iodinated (the level of Tg iodination is sufficient)
- ❖ stimulation of iodination in human by intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  after activation of the  $\text{Ca}^{2+}$ -PIP2 cascade, inhibition by cAMP
- ❖ human chromosome 2p25, 17 exons, 933 aa, heme-containing glycoprotein



# NADPH-oxidase family

## thyroid oxidase 1 (THOX1), 2 (THOX2)

- ❖ generation of hydrogen peroxide
  - ❖ the limiting factor of iodide oxidation and thyroid hormone formation
  - ❖ iodination is a  $\text{H}_2\text{O}_2$  substrate-driven process controlled mainly by  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation
- ❖ human chromosome 15q14
  - ❖ 33 exons
  - ❖ 7 TM domains
  - ❖ 3 NADPH and 1 FAD binding site

# Iodothyronine deiodinases I, II, III

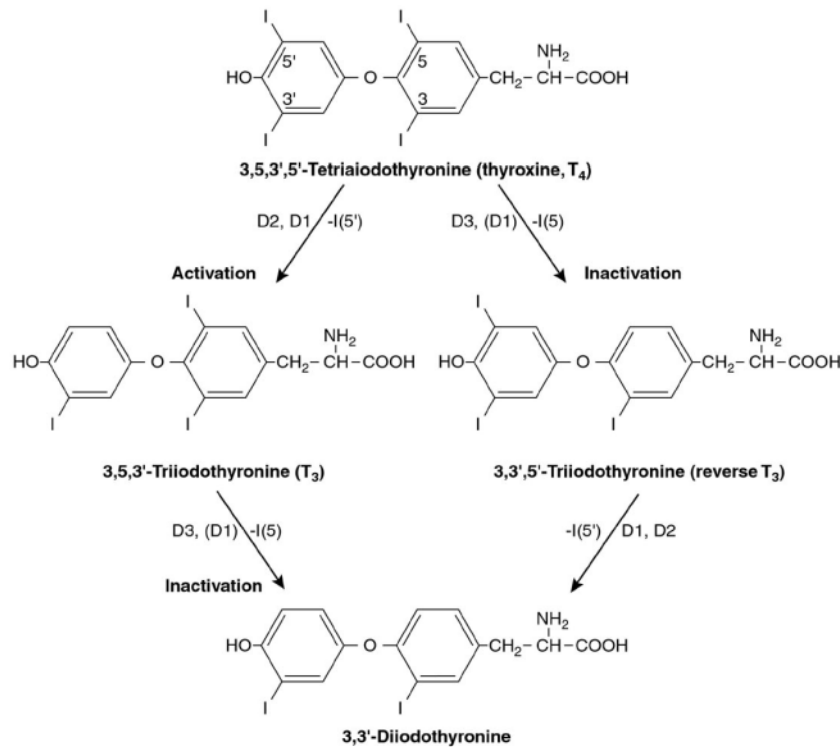
- selenoproteins

- outer ring (5') monodeiodination of T4 => active T3 (I, II)

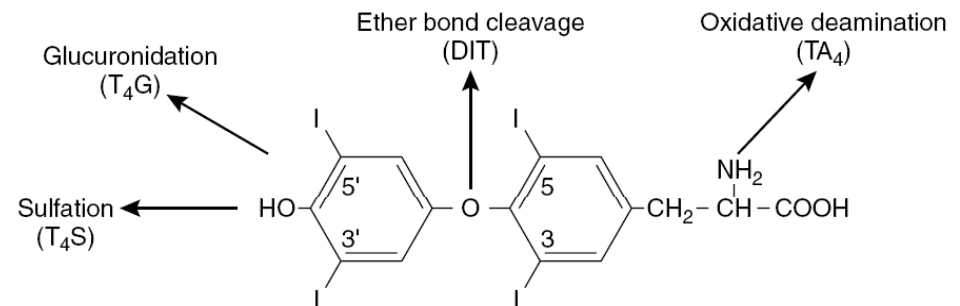
- inner ring (5) monodeiodination of T4 => inactive rT3 (III, I)

	hypo-	hyper-thyroidism	
I	↓	↑	T4 => T3+rT3=>T2 , $T_{0.5}=12$ h <b>liver, kidney</b> , placenta, thyroid, pituitary
II	↑	↓	T4 => T3, $T_{0.5}=0.5$ h skeletal and cardiac muscles, CNS, pituitary, skin, brown fat
III	↓	↑	T4 => rT3, T3 => T2 placenta, CNS – infant's T3 homeostasis

# Thyroid hormones activation/deactivation



Copyright ©2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.



# Medications and thyroid gland

- ✿ Estrogen-induced TBG elevations raise serum TT4 levels but do not affect the serum TSH and FT4
- ✿ Glucocorticoids in large doses can lower the serum T3 level and inhibit TSH secretion
- ✿ Dopamine inhibits TSH secretion
- ✿ Propranolol has an inhibitory effect on T4 to T3 conversion and it can increase TSH
- ✿ Iodide can cause both hyper and hypothyroidism
- ✿ Iodine-containing cardiac drug Amiodarone has complex effects on thyroid gland function that may induce either hypothyroidism or hyperthyroidism
- ✿ Lithium can cause hypo- or hyperthyroidism
  
- ✿ Severe Nonthyroidal Illness (NTI) can result in low T3 syndrome due to central maladjusted inhibition of hypothalamic releasing hormones, including TRH

<10%	10-25%	25-75%	75-90%	>90%	Wild D (Ed): The Immunoassay Handbook, 2001						
TSH			TSH		TSH			TSH			
low	normal	high	low	normal	high	low	normal	high	low	normal	high
Graves'			secondary hypothyroidism			nontoxic goiter			primary hypothyroidism		
toxic multinodular goiter			pituitary failure			sick euthyroid syndrome			congenital hypothyroidism		
thyrotoxicosis factitia			hypothalamus failure			T3/T4 aAb			child hypothyroidism		
toxic adenoma			euthyroid ophtalmic Graves			familial disalbuminemic hypertx			iodine deficiency		
subacute thyroiditis			T3 toxicosis						Hashimoto's thyroiditis		
									subclinical hypothyroidism		
									pituitary tumor		
T4			T4		T4						
low	normal	high	low	normal	high	low	normal	high			
primary hypothyroidism			euthyroid ophthalmic Graves'			hyperthyroidism					
congenital hypothyroidism			T3-toxicosis			Graves'					
child hypothyroidism			nontoxic goiter			toxic multinodular goiter					
iodine deficiency						thyrotoxicosis factitia (T4 intake)					
Hashimoto's thyroiditis						thyrotropic pituitary tumor					
secondary hypothyroidism						Jod-Basedow					
thyrotoxicosis factitia (T3 intake)						T4 toxicosis					
thyroiditis (hypothyrr.phase)						familial disalbuminemic hypertx					
						thyroiditis (hyperthyr.phase)					
FT4			FT4		FT4						
low	normal	high	low	normal	high	low	normal	high			
primary hypothyroidism			euthyroid ophthalmic Graves'			hyperthyroidism					
congenital hypothyroidism			T3-toxicosis			Graves'					
child hypothyroidism			nontoxic goiter			toxic multinodular goiter					
iodine deficiency						thyrotoxicosis factitia (T4 intake)					
Hashimoto's thyroiditis						thyrotropic pituitary tumor					
secondary hypothyroidism						Jod-Basedow					
thyrotoxicosis factitia (T3 intake)						T4 toxicosis					
thyroiditis (hypothyrr.phase)						thyroiditis (hyperthyr.phase)					

<10%			10-25%			25-75%			75-90%			>90%			Wild D (Ed): The Immunoassay Handbook, 2001		
<b>T3</b>									<b>T3</b>						<b>T3</b>		
<b>low normal high</b>									<b>low normal high</b>			<b>low normal high</b>					
primary hypothyroidism						euthyroid ophthalmic Graves'			hyperthyroidism								
congenital hypothyroidism						nontoxic goiter			Graves'								
child hypothyroidism									toxic multinodular goiter								
iodine deficiency									thyrotoxicosis factitia								
Hashimoto's thyroiditis									T3 toxicosis								
secondary hypothyroidism									thyrotropic pituitary tumor								
									Jod-Basedow								
									subacute thyroiditis								
<b>FT3</b>									<b>FT3</b>						<b>FT3</b>		
<b>low normal high</b>									<b>low normal high</b>			<b>low normal high</b>					
primary hypothyroidism						euthyroid ophthalmic Graves'			hyperthyroidism								
congenital hypothyroidism						nontoxic goiter			Graves'								
child hypothyroidism									toxic multinodular goiter								
iodine deficiency									thyrotoxicosis factitia								
Hashimoto's thyroiditis									T3 toxicosis								
secondary hypothyroidism									thyrotropic pituitary tumor								
									Jod-Basedow								
									subacute thyroiditis								
<b>TRAb</b>																	
<b>low normal high</b>																	
Graves'																	
<b>antiTPO</b>									<b>antiTPO</b>								
ne						ne											
<b>low normal high</b>						<b>low normal high</b>											
Graves'						Hashimoto's thyroiditis											
<b>antiTG</b>						<b>antiTG</b>											
ne						ne											
<b>low normal high</b>						<b>low normal high</b>											
Graves'						Hashimoto's thyroiditis											

# THYREOIDÁLNÍ HORMONY - analytika

## ✿ **IMUNOANALÝZA VYJADŘUJE IMUNOLOGICKOU KVANTITU, NEVYJADŘUJE BIOLOGICKOU AKTIVITU**

- ✿ preanalytika - skladování, separační gely
- ✿ standardisace - proteiny, protilátky
- ✿ sofistikace analytického systému
- ✿ pracovní protokol (promývání)
- ✿ stabilita činidel
- ✿ přesnost mechanických částí
- ✿ výpočetní technika
- ✿ mez detekce: nejnižší možná koncentrace analytu statisticky významně odlišná od nulového vzorku
- ✿ mez stanovitelnosti: kvantita s určitým stupněm jistoty (do 20% cv)
- ✿ Hookův efekt