

In Vitro Yüksek Sıcaklıkların Biyokimyasal Tiroid Fonksiyon Testleri Üzerine Etkisi

[Effects of in Vitro High Temperatures on Biochemical Thyroid Function Tests]

Fehime Benli Aksungar¹

Aynur Eren²

Işıl Kengil³

Esra Özcan⁴

¹ Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul

² Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul

³ Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı

⁴ Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Yard. Doç. Dr. Fehime Benli AKSUNGAR
Maltepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı
Atatürk Caddesi, Çam Sokak, No 3/A
Maltepe, İstanbul
Tel: 0 (216) 399 9750
Fax: 0 (216) 370 9719
E-mail: fehimebenli@hotmail.com

Kayıt tarihi 20.12.2004; kabul tarihi 05.05.2005
[Received 20.12.2004; accepted 05.05.2005]

ÖZET

Serum serbest triiodotironin (sT3), serbest tiroksin (sT4) ve tiroidi uyarıcı hormon (TSH) düzeyleri biyokimyasal olarak tiroid fonksiyonlarını araştırmak için majör testlerdir. Bu çalışmada *in vitro* yüksek sıcaklıkların (39°C) total T3, total T4, sT3, sT4 ve TSH düzeyleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışmaya tiroid fonksiyonları normal olan 97 hasta dahil edilmiştir. Her hastadan 3 ayrı tüp örnek alınmıştır. Örnekler 15 dakika 3000 g'de 25°C'de (grup I), 39°C'de (grup II) santrifüj edilmiştir. Üçüncü tüpler ise pıhtılaşma sonrasında, 20 dakika 39°C sıcaklıkta sıcak su banyosunda bekletilmiştir (grup III). Grup I, II ve III örneklerinde ELFA ve kemilüminesans yöntemleriyle serum total T3, total T4, sT3, sT4 ve TSH düzeyleri ayrı ayrı çalışılmıştır. Çalışılan Grup II ve Grup III örnekleri, +4°C'de 2 saat bekletildikten sonra aynı testler, tekrar iki ayrı yöntemle çalışılmıştır. Tüm gruplarda serum total T3, total T4, sT4 ve TSH düzeylerinde sıcaklık değişikliklerine bağlı olarak istatistiksel anlamda fark bulunamamıştır. Ancak serum sT3 düzeyleri yüksek sıcaklıktan etkilenmiştir. Sonuçlarımızda gördüğümüz *in vitro* sıcaklık artışıyla serum sT3 düzeylerinin değişim mekanizması, *in vivo* olarak vücudun yüksek ısıya maruz kaldığı durumlardaki ile aynı olabilir. Yüksek ateşle seyreden infeksiyonlarda tiroksin bağlayıcı globulinin T4'e olan afinitesinde azalma olduğu gösterilmiştir. Bu şekilde serbestlenen T4'ün, antibakteriyel amaçlarla iodin kaynağı olarak kullanıldığı düşünülmektedir. Bir iyodunu bırakan T4 ise serbest sT3 halini almaktadır. Bu bulgularla serum sT3 ölçümlerinde sıcaklığın çok iyi kontrol edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: TSH, T3, T4, Sıcaklık

ABSTRACT

Free triiodothyronine (fT3), free thyroxine (fT4) and thyroid stimulating hormone (TSH) are the major biochemical tests for the evaluation of thyroid function. In this study we have investigated the effects of *in vitro* high temperatures (39°C) on Total T3, total T4, fT3, fT4, TSH determination. Ninety seven sera from the patients who had normal thyroid functions were studied with two different methods: Chemiluminescence and ELFA. After the venipuncture, blood samples were centrifuged (g=3000) at 25°C (Group I), 39°C (Group II) for 15 minutes and the third samples were incubated at 39°C in water bath for 20 minutes (Group III) and studied. Group II and Group III samples were left at 4°C for two hours (Group III) and studied again. Total T3, Total T4, fT4 and TSH were not affected from temperature changes but fT3 was highly affected. In group I, all the tests were in reference limits. In group II and Group III, while the other tests did not change, fT3 levels were significantly higher than group I. In samples incubated at 4°C for two hours, fT3 levels fell into reference limits again. These concentration changes in fT3, can be due to the same reasons with high temperature states in body. In infections with high body temperature, thyroid hormone binding globuline's affinity for T4 decreases. With these findings we conclude that, a strict temperature control must be done in fT3 determinations.

Key Words: TSH, T3, T4, Temperature

GİRİŞ

Tiroid bezinin başlıca hormonları tiroksin (3,5,3',5'-L-tetraiyodotironin, T4) ve triiyodotironin (3, 3',5-L-triiodotironin, T3) dir. Ayrıca tiroid bezinden az miktarda inaktif (3,5,3'-L-triiodotironin-ters T3) de salgılanır. Salgılanan T4'ün % 40 kadarı periferik dokularda T3'e çevrilir (1). Daha aktif olan T3'ün büyük bir kısmı doğrudan tiroid bezinden değil, periferik dokularda T4'den oluşmaktadır. Dolaşımdaki T3 ve T4'ün büyük bir kısmı taşıyıcı proteinlerle geri dönüşlü şekilde bağlanarak taşınır. Buna göre, bu hormonların çok az bir bölümü serbest halde bulunur. Taşıyıcı proteinler tiroksin bağlayıcı globulin, tiroksin bağlayıcı prealbumin (transtiretin) ve albumindir (1).

Tiroid bezi, hipotalamus ve hipofiz arasında çok sıkı bir ilişki vardır. Bir tripeptid olan tirotropin salgılatıcı hormon (TRH), hipotalamusdan salgılanmakta ve hipofize etki ederek tiroidi uyarıcı hormon (TSH) salgılanmasını sağlamaktadır. Kanda tiroid hormonlarının seviyesinin artması, negatif geri beslenme ile hipofizin hipotalamusa olan cevabını baskılamakta, aksine, tiroid hormonlarının azalması, TRH ve TSH'nin salgılanmasını uyarmaktadır (1).

Günümüzde serum TSH ve total T4 veya serbest T4 (sT4) düzeylerinin ölçümü, tiroid hastalıkları açısından birinci basamak tarama testleri olarak kullanılmaktadır. Daha yüksek maliyete yol açmasına rağmen birçok hekim hastalarını bir defada değerlendirmek amacıyla serum sT3, sT4 ve TSH düzeylerini bir arada görmeyi tercih etmektedir. Ayrıca, hipotiroidi hipofiz hastalığına bağlı ise (TSH genellikle normal sınırlardadır), tirotoksikoz tedavisinin ilk 12 ayında hipotiroidi gelişmesi halinde (TSH genellikle baskılanmış halde kalır), TSH salgılayan bir tümör nedeniyle tirotoksikoz geliştiğinde ve tiroid hormonuna dirençli kişilerde (TSH normal sınırlardadır) sadece TSH ölçümü, tanıyı yanlış yönlendirebilir. Diğer yandan, beslenme bozukluklarında, hepatik sirozda, kronik renal hastalıklarda ve akut ateşli hastalıklarda tiroid fonksiyonlarında altta yatan hastalığa bağlı olarak değişiklikler gözlenebilmektedir. Bu değişiklikler, tiroid hormonlarının metabolizması ile ilgilidir.

Tiroid bezinden salgılanan majör hormon T4 olduğundan, tiroid bezi fonksiyonu ve çalışması monitorize edilmek istendiğinde özellikle sT4 ve TSH beraber değerlendirilmelidir. Bu iki parametrede bir patoloji saptandığında ise sT3 veya total T3 testleri de eklenerek hastayı bir kez daha değerlendirmek tercih edilmesi gereken yoldur.

Laboratuvar testlerinde, preanalitik şartların, sonuçları etkilediği iyi bilinen bir olgudur. Preanalitik dönemde gözden kaçan bir hata sonuçları etkileyebilir ve farkına varılmazsa hekimi yanlış teşhis ve tedaviye yönlendirebilir. Çalışmamızda bu bilgilerden yola çıkarak biyokimyasal olarak tiroid fonksiyon testleri ölçümlerine etki edebilecek preanalitik şartlar araştırılmış ve ön çalışmalarda yüksek sıcaklığın sonuçları etkileyebildiği ortaya çıkmıştır. Bunun üzerine biyokimyasal ölçümlerde, tüm

tiroid fonksiyon testleri üzerine *in vitro* yüksek sıcaklığın etkileri prospektif bir çalışma yapılarak araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya normal tiroid fonksiyonu olan, 21-47 yaş arasında 97 hasta dahil edildi (68 kadın, 29 erkek). Hastalarımız, hastanemiz "check-up" polikliniğinden laboatuvarımıza yönlendirilen ve klinik olarak, tiroid fonksiyonlarının tamamen normal olduğu düşünülen hastalardan seçilmiştir. Antekübital venden standart kan alma prosedürleri uygulanarak jelsiz kuru tüplere kan örnekleri alındı. Daha önceki çalışmalarda, pıhtılaşmanın hızlanması ve hücrelerle serum arasında güvenli bir bariyer oluşturmak amacıyla kullanılan jellerin hormon ölçümlerinde yanlış sonuçlara neden olabileceği gösterilmiştir. Bundan dolayı, çalışmamızda jelsiz kuru tüpler kullanıldı. Her hastadan 3 ayrı tüp örnek alındı ve pıhtılaşmanın (fibrin oluşumunun) hızlı ve tam olarak gerçekleşmesi için 37°C'de 20-30 dakika bekletildi. Örneklerden I. grup, 25°C'de, II. grup 39°C'de 15 dakika 3000 x g'de santrifüj edildi. Üçüncü tüpler (III. grup) ise pıhtılaşma sonrasında 20 dakika 39°C sıcaklıkta sıcak su banyosunda bekletildi. I., II., ve III. grup örneklerinde ELFA (Enzyme Linked Fluorescence Assay), (VIDAS-Bio-Mérieux Fransa) ve kemilüminesans (Acces-Beckman Coulter İngiltere) yöntemleriyle serum total T3, total T4, sT3, sT4 ve TSH düzeyleri ayrı ayrı çalışıldı. Çalışılan II. grup ve III. Grup örnekleri, +4°C'de 2 saat bekletildikten sonra tekrar iki ayrı yöntemle çalışıldı. Ayrıca, deneyler sırasında protein kaybı olup olmadığını kontrol etmek amacıyla, bütün serum örneklerinde total protein ve albumin seviyeleri biüret yöntemiyle (Dimension RxL-Dade Behring ABD) çalışıldı.

Tek tip, ölçüm yöntemine bağlı oluşabilecek hataları ortadan kaldırmak amacıyla ile çalışma iki ayrı yöntemle yapılmıştır. Testlerin referans aralıkları, her iki yöntemin kendi içerisinde değerlendirildiği göz önüne alınarak, ticari kitlerin insertlerinin sağladığı bilgiye göre düzenlenmiştir. İstatistiksel analizler, her grup diğerlerinin kontrolü olarak değerlendirilebileceğinden eşleştirilmiş (paired repeated measures) ANOVA testi ile yapıldı ve p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Tüm gruplarda serum total T3, total T4, sT4 ve TSH düzeylerinde ısı değişikliklerine bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (Tablo 1, Tablo 2). Ancak serum sT3 düzeyleri yüksek sıcaklıktan etkilendi. Birinci grup serumlarında fizyolojik sınırlarda bulunan serum serbest T3 düzeyleri, II. ve III. grupta her iki yöneme göre de yüksek bulundu (p<0.05), (Şekil 1). 4°C'de bekletilen örneklerde ise serbest T3 seviyeleri, I. Grup düzeylerine yakın değerlere ulaştı (Şekil 1).

Tüm testlerde, aynı örnekten elde edilen sonuçlar arasındaki farklar araştırıldığında ise, sadece sT3 seviyeleri

Tablo 1

Kemilüminesans	Grup I	Grup II	Grup III	+4°C Grup II	+4°C Grup III
TSH μ IU/mL	3.56±0.95	4.25±1.12	3.92±1.08	3.71±0.86	4.32±1.43
Total T3 ng/mL	1.52±0.94	1.63±0.78	1.72±0.82	1.79±0.98	1.43±0.86
Total T4 μ g/dL	8.17±2.17	8.57±2.01	9.12±3.13	9.46±3.97	8.23±2.47
Serbest T3 pg/mL	5.22±1.06	6.94±1.16**	6.72±1.97**	5.35±1.96	5.13±2.01
Serbest T4 ng/dL	0.95±0.43	1.42±0.57	1.13±0.76	0.93±0.34	1.17±0.69

Kemilüminesans ile immünoassay yöntemi kullanılarak ölçülen parametrelerin ortalama \pm SD değerleri

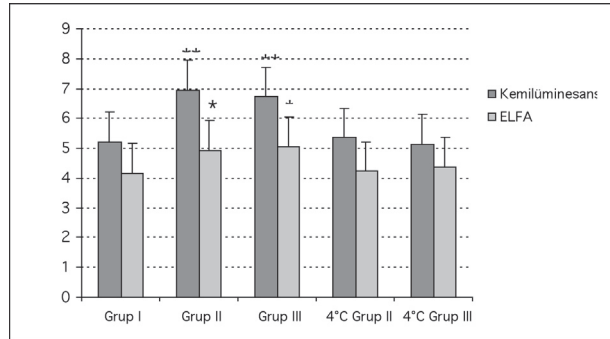
** Grup I ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında $p < 0.01$. Tiroid fonksiyon testlerinin referans ve güven aralıkları sırasıyla aşağıda verilmiştir. TSH (0.34-5.60, 0.30-6.89 μ IU/mL), TT3 (0.78-1.87, 0.71-2.92 ng/mL), TT4 (6.09-12.23, 5.21-14.42 μ g/dL), sT3 (2.39-7.69, 1.43-8.29 pg/mL), sT4 (0.58-1.64, 0.43-2.13 ng/dL)

Tablo 2

ELFA	Grup I	Grup II	Grup III	+4°C Grup II	+4°C Grup III
TSH μ IU/mL	3.12±1.21	3.08±1.42	3.21±1.17	3.15±1.31	3.02±0.98
Total T3 nmol/L	1.57±0.77	1.62±0.56	1.69±0.46	1.17±0.79	1.43±0.61
Total T4 nmol/L	86.08±11.35	77.12±21.15	82.56±17.10	79.41±16.13	88.29±26.42
Serbest T3 pg/mL	4.17±0.92	4.92±1.17*	5.06±1.12*	4.22±0.94	4.35±0.97
Serbest T4 pmol/L	13.36±2.15	12.37±3.13	13.16±2.42	13.58±1.17	13.97±3.57

ELFA ile immünoassay yöntemi kullanılarak ölçülen parametrelerin ortalama \pm SD değerleri

*Grup I ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında $p < 0.05$. Tiroid fonksiyon testlerinin referans ve güven aralıkları sırasıyla aşağıda verilmiştir. TSH (0.25-5.0, 0.19-6.02 μ IU/mL), TT3 (0.9-2.5, 0.72-3.17 nmol/L), TT4 (60-120, 55-128 nmol/L), sT3 (2.6-5.4, 2.25-6.21 pg/mL), sT4 (9-20, 7.8-23 pmol/L)



Şekil 1. Kemilüminesans ve ELFA yöntemleriyle saptanan serum serbest T3 değerlerinin karşılaştırılması. **Grup I** kontrol grubudur. **Grup II** örnekleri 39°C'de 15 dk. Santrifüj edilmiştir. **Grup III** örnekleri ise 20 dakika 39°C'de sıcak su banyosunda bekletilmiştir. **+4°C Grup II** örnekleri, grup II örneklerinin +4°C'de 2 saat bekletildikten sonra tekrar çalışılan sonuçlarıdır. **+4°C Grup III** örnekleri ise, grup III örneklerinin +4°C'de 2 saat bekletildikten sonra tekrar çalışılan sonuçlarıdır. Grup I ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

arasında, grup II ve grup III'de, grup I'e göre aynı yönde (yüksek) ve istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmiştir. 4°C'de bekletilen ve tekrar çalışılan grup II ve grup III örneklerinde ise bu fark kaybedilmiştir. Tablo 3'de sT3 seviyeleri için grup II ve grup III örneklerinin, grup I ile olan farkları, ortalama fark ve standart sapma (SD) değerleri, ayrıca her grup için en az fark ve en fazla fark değerleri gösterilmiştir.

Serum total protein ve albumin değerleri tüm örneklerde

Tablo 3

	Grup II	En az fark	En fazla fark	Grup III	En az fark	En fazla fark
Kemilüminesans	1.58±0.33	0.95	2.49	1.72±0.39	0.98	2.96
ELFA	0.92±0.12	0.78	1.72	1.06±0.17	0.82	1.97

ELFA ve Kemilüminesans ile immünoassay yöntemi kullanılarak ölçülen sT3 değerleri için, grup II ve grup III serumlarının, grup I serumları ile olan farkları, ortalama fark \pm SD olarak verilmiştir. Ayrıca fark dağılımının anlaşılabilmesi için her iki gruba ait, en az fark ve en fazla fark değerleri belirtilmiştir.

Tablo 4

	Grup I	Grup II	Grup III	+4°C Grup II	+4°C Grup III
Albumin g/dL	4.42±1.08	4.12±0.97	4.98±1.23	4.57±1.26	4.14±0.93
Total protein g/dL	7.16±1.13	7.56±1.42	7.87±1.03	7.43±1.42	7.54±1.97

Tüm grupların serum albümin ve protein seviyeleri. Değerler, ortalama \pm SD olarak verilmiştir. İstatistiksel olarak gruplar arası fark yoktur.

yaklaşık olarak aynı seviyelerde bulundu (Tablo 4). İstatistiksel olarak incelendiğinde total protein ve albumin açısından gruplar arasında fark yoktu.

TARTIŞMA

Serumda TSH ve tiroid hormonlarının ölçümü iki amaçla yapılmaktadır: 1.Tiroid fonksiyonunu incelemek, 2. Tiroid hastalığını sınıflandırmak. TSH tek başına da tiroid fonksiyonu açısından iyi bir göstergedir çünkü henüz tiroid hormonları fizyolojik sınırları geçmeden TSH konsantrasyonu farklılaşabilmektedir. Yine de birçok kez ve özellikle tedavi takibi yapılan hastalardan sT3, sT4 ve TSH bir arada değerlendirilmekte ve bu hormonların seviyelerine göre tiroid ilaçlarının dozları düzenlenmektedir. Böyle durumlarda, klinik laboratuvarların verdiği sonuçlar tedaviyi yönlendirmek açısından daha da önem kazanmaktadır.

Tiroid bezinden salgılanan T4'ün yaklaşık % 0.03'ü plazmada serbest halde iken, T3'ün % 0.1-0.3'ü serbest halde bulunur. T3, plazmada % 33 albumine, % 27 prealbumine, % 40 TBG'e bağlı olarak bulunmaktadır. T4'ün % 78'i TBG'e bağlıdır (2).

Çalışmamızda, sT3 düzeyleri *in vitro* yüksek sıcaklıktan etkilenmiştir. Diğer tiroid fonksiyon parametrelerinde ise sıcaklık değişimiyle paralel bir konsantrasyon değişikliği gözlenmemiştir. Çalışmada, aynı zamanda, sıcaklıkla protein kaybı olup olmadığını kontrol etmek amacıyla soğutulan örnekler dahil olmak üzere, bütün örneklerde serum total protein ve albumin düzeyleri ölçülmüştür. Her iki parametrede de belirgin bir değişikliğe rastlanmamıştır. Bu sonuçlar da göz önüne alındığında, yüksek sıcaklıklarda sT3 seviyelerinin artması ve aynı örneklerin soğukta (+4°C) bekletilmesi ile tekrar seviyelerin düşmesi, *in vitro* olarak, taşıyıcı proteinlerle reversibl ayrılıp-bağlanma olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuçlarımızda gördüğümüz *in vitro* yüksek sıcaklık

la (39°C) serum sT3 düzeylerinin yükselme nedeni ise, *in vivo* olarak vücudun yüksek sıcaklığa maruz kaldığı durumlardaki ile aynı olabilir: Yüksek ateşle seyreden infeksiyonlarda TBG'nin T4'e olan afinitesinde azalma olduğu gösterilmiştir (3,4). Bu şekilde inflamasyon bölgesinde, serbestlenen T4'ün antibakteriyel amaçlarla iyot kaynağı olarak kullanıldığı ve bir iyodunu bırakan T4'ün ise sT3 halini aldığı düşünülmektedir (3,5,6). Sepsis veya kardiyopulmoner operasyonlardan sonra TBG'de posttranslasyonel değişiklikler gösterilmiştir (3,5,7). Akut lezyon ya da inflamasyon bölgesinde polimorfonükleer lökositler tarafından salgılanan serin proteazların TBG'nin COOH terminal halkasından 5k-dA'luk bölümün ayrılmasına neden olduğu ve bunun sonucunda TBG'nin T4'e afinitesinin azaldığı gösterilmiştir (5,7). Aynı mekanizmayla inflamasyon bölgesine kortizol bağlayıcı proteinin kortizol bıraktığı düşünülmektedir (8). Yine hastalık sırasında T4 bağlayıcı pre-albüminin plazma yarı ömrünün azaldığı bilinmektedir (8). Serumda polimorfonükleer lökositler olmadığından bu hücrelerden salgılanan serin proteazlar da bulunmaz. Ancak serumda da yüksek ısıyla aktive olabilecek proteazlar olabilir (örneğin pankreatik elastaz). Bu durumda, *in vitro* olarak da, T4 serbestlenip bir iyodunu bırakarak sT3 haline dönüşüyor olabilir. Çalışmamızda, total T3 düzeylerinde yüksek sıcaklıkla, belirgin bir düşme

olmayışı, sT3 yüksekliğinin total T3'den sT3 dönüşümü ile olmadığını düşündürmektedir. *In vitro* olarak, deney şartlarımızda deiyodinasyon aktivitesinin devam ettiği ve yüksek sıcaklığın etkisiyle sT4'den, sT3 oluştuğu düşünülmektedir. Ancak bu durumda sT4 düzeylerinde yüksek sıcaklıkla azalma olması beklenir; olmaması, sT4 ve sT3 arasındaki konsantrasyon farkının 100 kat olması ile açıklanabilir. Ölçüm yöntemlerimiz ile sT4'deki bu minimal değişimleri doğru şekilde tespit edemezken, sT3 seviyelerindeki değişiklikleri tespit edebilmekteyiz. Tiroksin metabolizmasında, sT3'ün olduğu kadar, rT3'ün de yeri olduğu bilinmektedir ancak çalışmamızda sT3 için kullanılan her iki ölçüm yönteminin de rT3 ile çapraz etkileşimleri düşük olduğundan (kemilüminesans < %1, ELFA < % 0.1), rT3 düzeylerinin ölçümü yapılmamıştır.

Elde ettiğimiz bulgularla, çalışmamızda, klinik biyokimya laboratuvarlarında serum sT3 ölçümlerinde pre-analitik hataları önlemek ve doğru sonuç verebilmek amacıyla ortam sıcaklığının, santrifüj sıcaklığının ve otoanalizörlerin inkübasyon ve ölçüm bölümlerinin sıcaklığının çok iyi kontrol edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Kaynaklar

1. Larsen, Kronenberg, Melmed, Polonsky. (2003) Williams Text book of Endocrinology, s.331-365, Saunders, USA
2. Thomas L. (1998) Clinical laboratory diagnostics, s. 1014, TH Books, Germany
3. Afandi B, Vera R, Schussler GC, et al. (2000) Concordant decreases of thyroxine and thyroxine-binding protein concentrations during sepsis. *Metabolism* 49,1753-1754.
4. Robbins J. (2000) New ideas in thyroxine-binding globulin biology (editorial). *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 3994-3995.
5. Jirasakuldech B, Schussler GC, Yap MG, et al. (2000) A character-

- istic serpin cleavage product of thyroxine-binding globulin appears in sepsis sera. *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 3996-3999.
6. Schussler GC. (2000) The thyroxine-binding proteins. *Thyroid* 10, 141-149.
7. Afandi B, Schussler GC, Arafeh AH, Boutros A, Yap MG, Finkelstein A. (2000) Selective consumption of thyroxine-binding globulin during cardiac bypass surgery. *Metabolism* 49(2), 270-274
8. Rosen HN, Moses AC, Murrell JR, et al. (1993) Thyroxine interactions with transthyretin: a comparison of 10 different naturally occurring human transthyretin variants. *J Clin Endocrinol Metab* 77,370-374