

# Тиреотропный гормон человека

Тиреотропный гормон (ТТГ) вырабатывается гипофизом у основания головного мозга. Его молекулярная масса составляет около 28 000 Да. ТТГ является членом семейства гликопротеиновых гормонов, которое состоит из ТТГ, лютеинизирующего гормона (ЛГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и хорионического гонадотропина (ХГ). Гликопротеиновые гормоны представляют собой гетеродимеры, состоящие из  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц.  $\alpha$ -субъединица одинакова для всех гликопротеиновых гормонов,  $\beta$ -субъединица же специфична для каждого гормона. Однако между последовательностями  $\beta$ -субъединиц человеческого ТТГ, ЛГ, ФСГ и ХГ существует высокая степень гомологии.

## «Золотой стандарт» для диагностики дисфункции щитовидной железы

Измерение уровня ТТГ в крови – тест с наивысшей чувствительностью и специфичностью из всех тестов, используемых для диагностики различных дисфункций щитовидной железы, включая гипотиреоз и гипертиреоз (1). Нормальный диапазон ТТГ в сыворотке составляет 0,58–4,1 мкМЕ/мл (2). Концентрация ТТГ в крови увеличивается у больных гипотиреозом и снижается у больных гипертиреозом.

## Чувствительные анализы ТТГ

Для определения концентрации ТТГ в образцах сыворотки крови человека использовали иммуноанализ сэндвич-типа. Для этого одно антитело иммобилизуют на твердой фазе, а второе антитело конъюгируют с меткой. Большинство современных тестов на ТТГ представляют собой тесты третьего поколения с функциональной

чувствительностью 0,01–0,02 мкМЕ/мл или ниже. Подобные анализы позволяют различать пациентов с гипертиреозом от пациентов с эутиреозом.

Анализ на ТТГ четвертого поколения обладает функциональной чувствительностью на уровне 0,001–0,002 мкМЕ/мл, что превышает показатели предыдущего поколения в 10 раз и предоставляет еще больше возможностей для диагностики.

Чувствительность анализа определяется аффинностью используемых антител и чувствительностью, которую может обеспечить система обнаружения. Поэтому для разработки тестов четвертого поколения необходимы высокоаффинные антитела.

## Высокая специфичность

Для точного определения концентрации ТТГ в образцах сыворотки необходимо, чтобы пара антител, используемых в анализе, не реагировала на другие гликопротеиновые гормоны (ЛГ, ФСГ и ХГ). Кроме того, для одноэтапного сэндвич-иммуноанализа на ТТГ, в котором антитела для захвата и обнаружения одновременно инкубируются с образцами сыворотки, оба антитела, используемые в иммуноанализе, не должны вступать в перекрестную реакцию с ЛГ, ФСГ и ХГ.

## КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Дисфункция щитовидной железы  
Скрининг щитовидной железы во время беременности, послеродового периода и для новорожденных

## Мутация ТТГ R55G

Чтобы точно измерить концентрацию ТТГ в сыворотке, анализ должен позволять измерять все формы ТТГ в крови.

В 2014 году была установлена новая точечная мутация в  $\beta$ -субъединице ТТГ, которая привела к замене аргинина глицином в положении 55 (R55G) (3). Эта мутация изменила эпитоп ТТГ, что нарушило связывание антител, специфичных к этому эпитопу. У пациентов, гомозиготных по мутации R55G, ТТГ не обнаруживался четырьмя широко используемыми иммуноанализами, одобренными Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA). Таким образом, при тестировании пациентов, несущих мутацию ТТГ R55G, одним из подобных тестов невозможно отличить пациентов с субклиническим гипертиреозом. В результате, у пациентов сложно неопределяемым уровнем ТТГ был ошибочно диагностирован гипертиреоз.

Для точного измерений ТТГ у пациентов, гомозиготных по мутации R55G, анализы на ТТГ должны позволять выявлять вариант ТТГ R55G. Это возможно, если оба антитела, используемые в анализе, не распознают эпитоп  $\beta$ -субъединицы ТТГ, содержащий аргинин в положении 55 (R55G).

## Рекомендации по парам антител

Хайтест предлагает шесть новых моноклональных антител (МоАт) для разработки чувствительных и специфичных иммуноанализов на ТТГ. Эти МоАт были разработаны для создания анализов на ТТГ четвертого поколения, не обладающих перекрестной реактивностью с другими гликопротеиновыми гормонами и способных распознавать мутацию ТТГ R55G.

МоАт TS13, TS18 и TS25 специфичны к одному эпитопу на молекуле ТТГ (группа А), тогда как МоАт TS21, TS31 и TS32 специфичны к другому эпитопу (группа В). Антитела не проявляют кросс-реактивность как со свободной общей  $\alpha$ -субъединицей гликопротеиновых гормонов человека, так и с самими человеческими гормонами ЛГ, ФСГ и ХГ (см. Рис.1).

Эффективность МоАт оценивали с помощью хемилюминесцентного сэндвич-иммуноанализа. Детектирующие антитела были помечены щелочной фосфатазой. Захватывающие антитела биотинилировали и конъюгировали с покрытыми стрептавидином магнитными шариками. Рекомендуемые пары захвата и детекции для сэндвич-иммуноанализа ТТГ представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Рекомендуемые пары моноклональных антител для обнаружения ТТГ.

Захват	Обнаружение
TS21	TS18
TS21	TS13
TS21	TS25
TS32	TS13
TS31	TS13

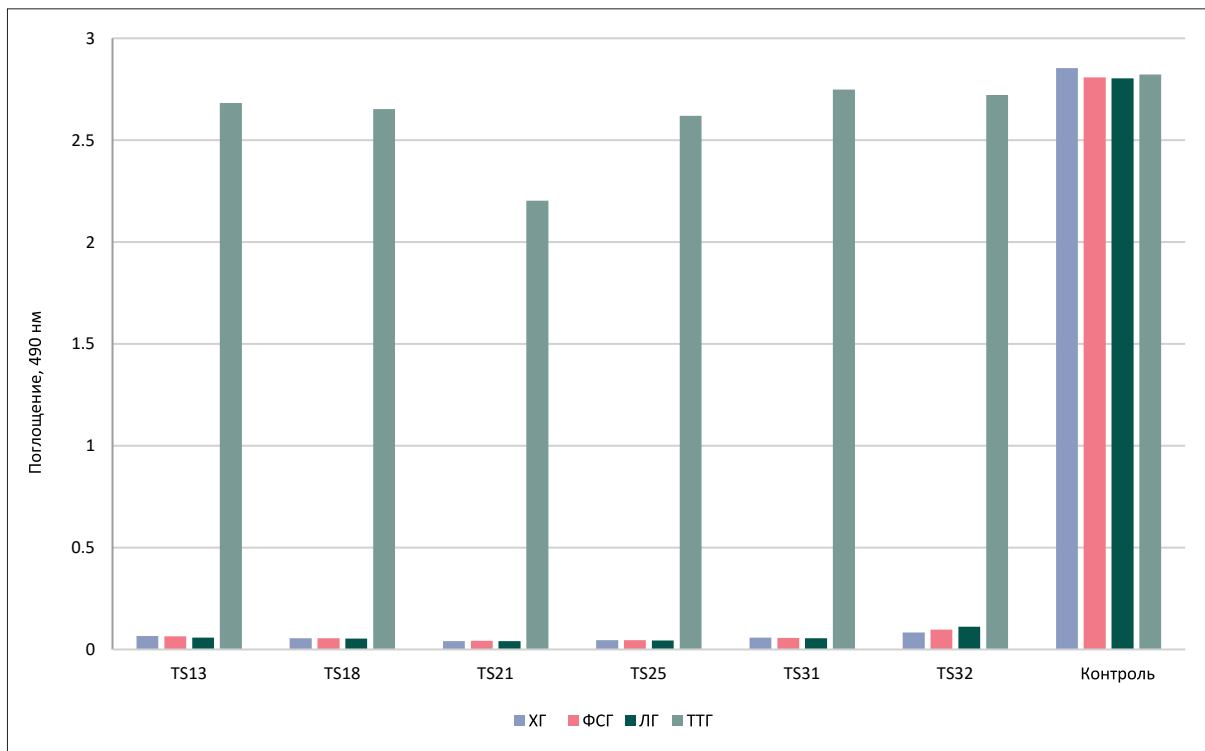
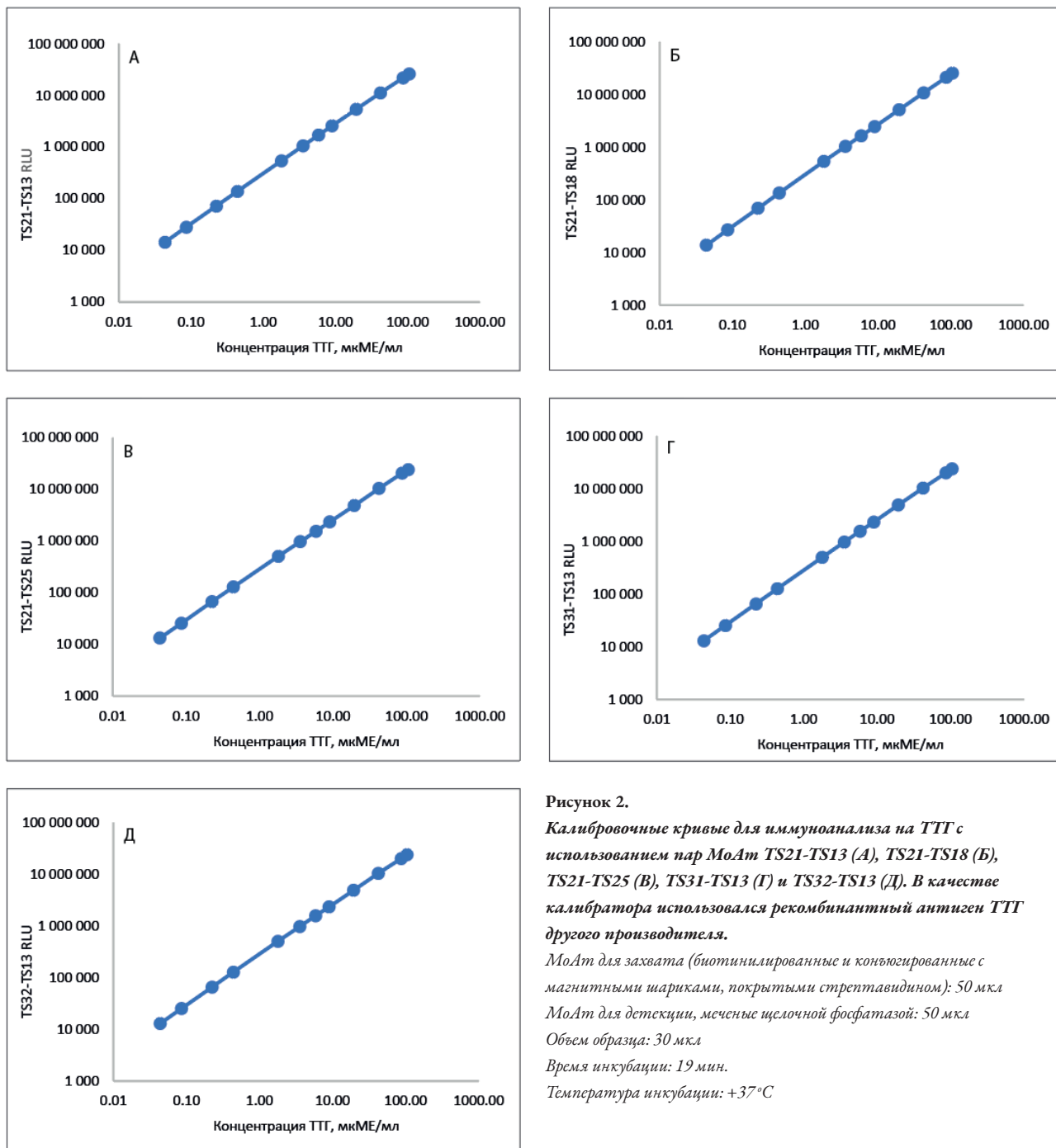


Рисунок 1.

Тестирование кросс-реактивности МоАт с человеческими гликопротеиновыми гормонами ТТГ, ФСГ, ЛГ и ХГ.

Специфичность МоАт определяли с помощью ИФА. Антитело, специфичное к общей  $\alpha$ -субъединице гликопротеиновых гормонов, использовали в качестве положительного контроля иммунореактивности ФСГ, ЛГ и ХГ.

Типичные калибровочные кривые для рекомендуемых пар представлены на рисунке 2.



**Рисунок 2.**  
Калибровочные кривые для иммуноанализа на ТТГ с использованием пар МоАт TS21-TS13 (А), TS21-TS18 (Б), TS21-TS25 (В), TS31-TS13 (Г) и TS32-TS13 (Д). В качестве калибратора использовался рекомбинантный антиген ТТГ другого производителя.

МоАт для захвата (биотинилированные и конъюгированные с магнитными шариками, покрытыми стрептавидином): 50 мкл  
МоАт для детекции, меченые щелочной фосфатазой: 50 мкл  
Объем образца: 30 мкл  
Время инкубации: 19 мин.  
Температура инкубации: +37°C

## Определение предела обнаружения (ПО)

Для определения ПО для выбранных пар антител мы использовали нативный ТТГ человека (код международного стандарта ВОЗ NIBSC 81/565), разведенный в аналитическом буфере до концентраций 0,0024, 0,0018, 0,0014, 0,001, 0,00077 и 0,00059 мкМЕ/мл. В рамках эксперимента двадцать разведений ТТГ в аналитическом буфере протестировали в хемилюминесцентном сэндвич-иммуноанализе.

Пределы рассчитывали по формулам, представленным ниже:

Предел бланка = “среднее значение бланка” + 1,645 (стандартное отклонение)

Пределобнаружения=Пределбланка+1,645(стандартное отклонение образца с низкой концентрацией)

Эксперименты проводили в следующих условиях:

МоАт для захвата (биотинилированные и конъюгированные с магнитными шариками, покрытыми стрептавидином): 50 мкл.

МоАт для детекции, меченые щелочной фосфатазой: 50 мкл

Объем образца: 50 мкл

Время инкубации: 16 мин.

Температура инкубации: +37 °С

ПО для ТТГ, разведенного в буфере, для всех пар моноклональных антител был одинаковым и составил 0,00077 мкМЕ/мл. Коэффициент вариаций составлял <2,16% для всех протестированных разведений ТТГ. Эти данные показывают, что выбранные пары антител демонстрируют чувствительность уровня анализов ТТГ четвертого поколения.

## Корреляция концентраций ТТГ в сыворотке

Концентрацию ТТГ в образцах сыворотки человека (n = 50) определяли с использованием рекомендованных пар МоАт и сравнивали с концентрациями ТТГ, определенными с помощью эталонного анализа Roche Elecsys TSH. Мы наблюдали хорошую корреляцию между концентрациями ТТГ, определенными с использованием рекомендуемых пар и эталонного анализа (рис. 3).

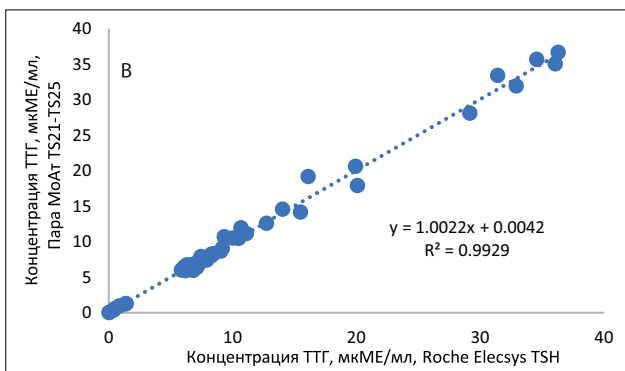
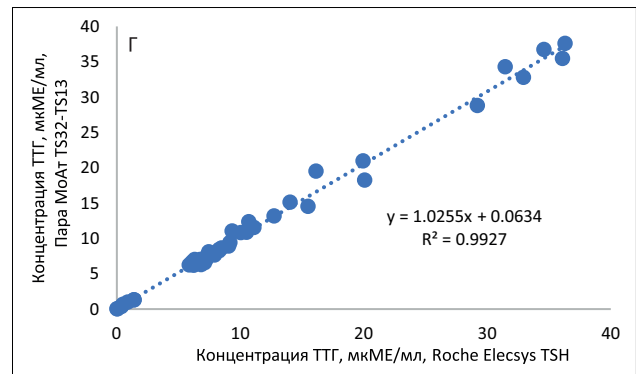
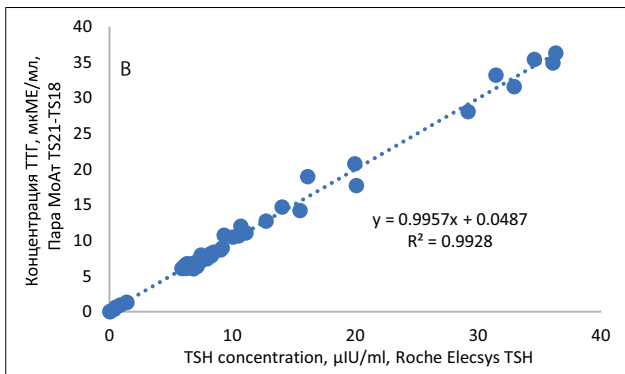
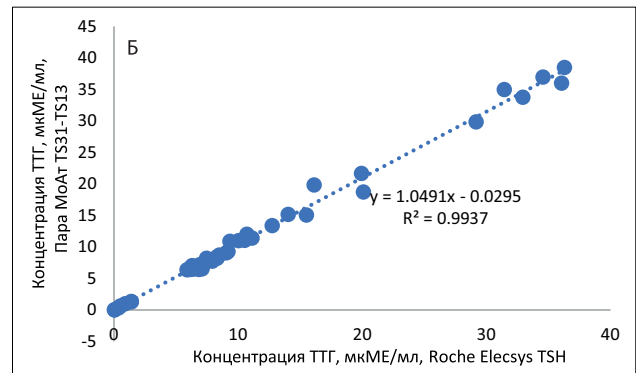
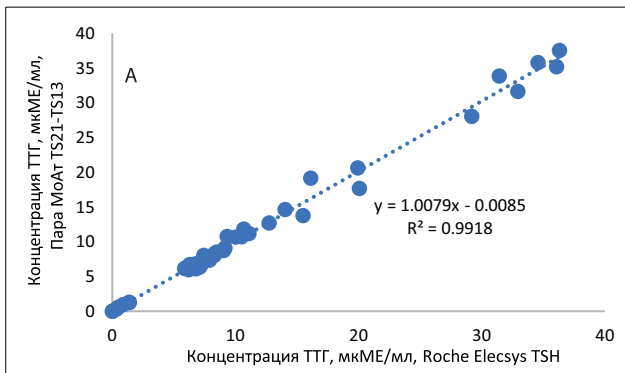


Рисунок 3.

Концентрации ТТГ измеряли в образцах сыворотки человека с использованием рекомендованных пар МоАт TS21-TS13 (А), TS31-TS13 (Б), TS21-TS18 (В), TS32-TS13 (Г), TS21-TS25 (Д) и эталонного теста Roche Elecsys TSH.

МоАт для захвата (биотинилированные и конъюгированные с магнитными шариками, покрытыми стрептавидином): 50 мкл.

МоАт для детекции, меченые щелочной фосфатазой: 50 мкл

Объем образца: 30 мкл

Время инкубации: 19 мин.

Температура инкубации: +37 °С

## Тестирование перекрестной реактивности с мутацией ТТГ R55G.

Для проведения внутренних исследований мы разработали рекомбинантный человеческий ТТГ, содержащий аргинин вместо глицина в положении 55 (мутация ТТГ R55G). Кроме того, мы самостоятельно произвели рекомбинантный ТТГ дикого типа, используя тот же протокол. Все отобранные антитела распознавали вариант R55G ТТГ аналогично ТТГ дикого типа в ИФА. Обнаружение ТТГ дикого типа и варианта ТТГ R55G с использованием рекомендуемых комбинаций показано на рисунке 4.

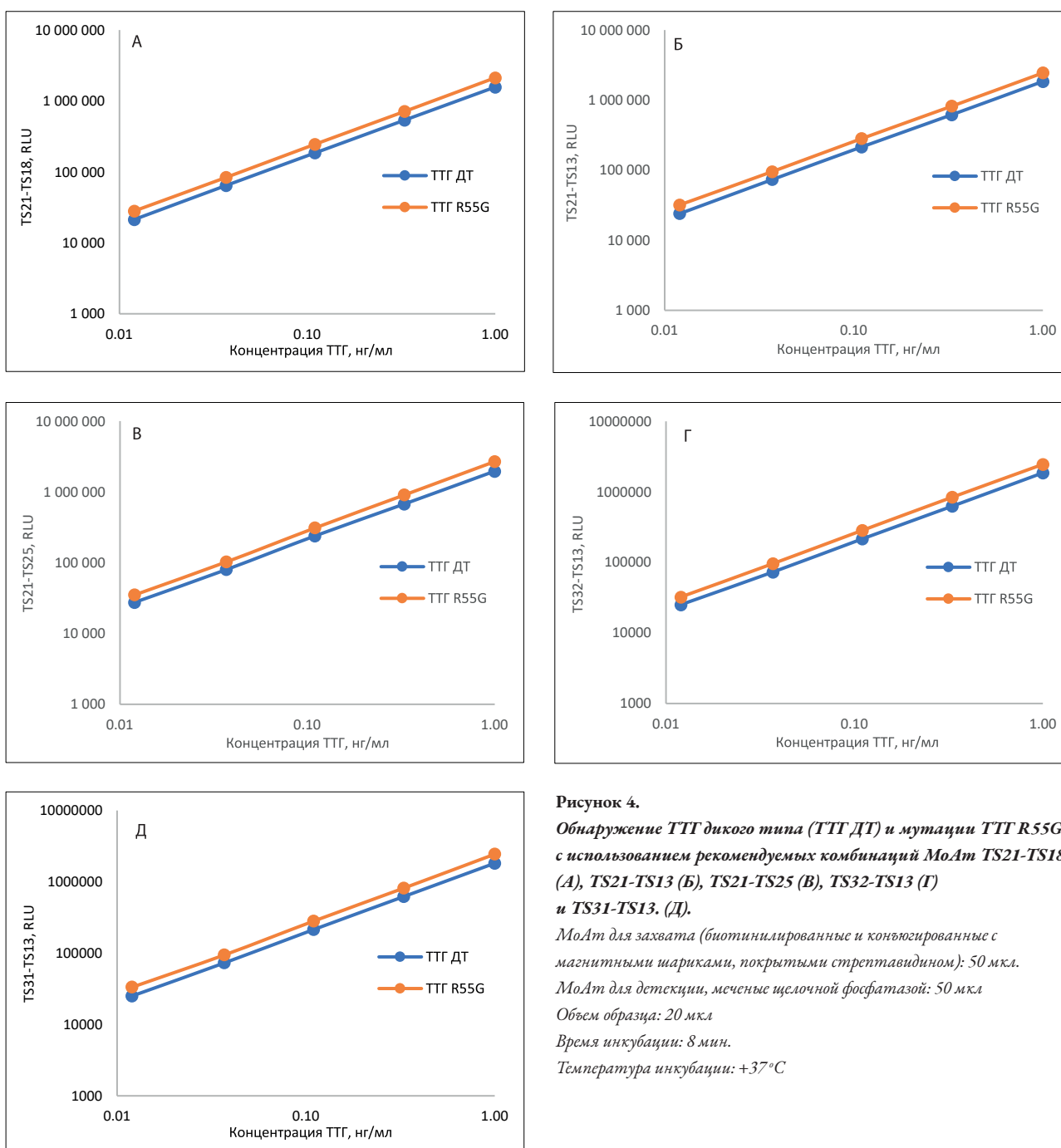


Рисунок 4.

Обнаружение ТТГ дикого типа (ТТГ ДТ) и мутации ТТГ R55G с использованием рекомендуемых комбинаций МоАт TS21-TS18 (А), TS21-TS13 (Б), TS21-TS25 (В), TS32-TS13 (Г) и TS31-TS13. (Д).

МоАт для захвата (биотинилированные и конъюгированные с магнитными шариками, покрытыми стрептавидином): 50 мкл.

МоАт для детекции, меченые щелочной фосфатазой: 50 мкл

Объем образца: 20 мкл

Время инкубации: 8 мин.

Температура инкубации: +37°C

## Тестирование кросс-реактивности с человеческими гормонами ЛГ, ФСГ, ХГ.

Человеческие ЛГ, ФСГ и ХГ разводили в аналитическом буфере до концентрации 10 МЕ/мл (ЛГ, ФСГ) или 1000 МЕ/мл (ХГ) и тестировали в хемилюминесцентном сэндвич-иммуноанализе. Перекрестная реактивность составляла <0,000% для всех рекомендуемых пар с ЛГ, ФСГ и ХГ.

## Измерение аффинности антител

Константу ассоциации ( $K_A$ ), константу диссоциации ( $K_d$ ) и константу равновесной диссоциации ( $K_D$ ) определяли с помощью Octet Bio-Layer Interferometry platform (Таб. 2).

Таблица 2.

*Константы аффинности антител.*

Антитело	$K_A$ (1/Мс)	$K_d$ (1/с)	$K_D$ (М)
TS13	3.73E+05	3.09E-05	8.27E-11
TS18	3.10E+05	2.98E-05	9.58E-11
TS21	2.36E+05	1.08E-05	4.58E-11
TS25	2.89E+05	1.83E-05	6.31E-11
TS31	2.57E+05	6.32E-05	2.46E-10
TS32	2.57E+05	1.05E-05	4.08E-11

## ЛИТЕРАТУРА

1. **Ladenson PW, Singer PA, Ain KB, Bagchi N, Bigos ST, Levy EG, Smith SA, Daniels GH, Cohen HD.** American Thyroid Association guidelines for detection of thyroid dysfunction. Arch Intern Med. 2000 Jun 12;160(11):1573-5.
2. **Jensen E, Hyltoft Petersen P, Blaabjerg O, Hansen PS, Brix TH, Kyvik KO, Hegedüs L.** Establishment of a serum thyroid stimulating hormone (TSH) reference interval in healthy adults. The importance of environmental factors, including thyroid antibodies. Clin Chem Lab Med. 2004;42(7):824-32.
3. **Drees JC, Stone JA, Reamer CR, Arboleda VE, Huang K, Hrynkow J, Greene DN, Petrie MS, Hoke C, Lorey TS, Dlott RS.** Falsely undetectable TSH in a cohort of South Asian euthyroid patients. J Clin Endocrinol Metab. 2014 Apr;99(4):1171-9.

## ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

### МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Изотип	Примечания
Тиреотропный гормон (ТТГ)	2TS11cc	TS13	IgG1	ИХЛА, β-субъединица, рекомбинантное химерное антитело, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		TS18	IgG1	ИХЛА, β-субъединица, рекомбинантное химерное антитело, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		TS21	IgG1	ИХЛА, целая молекула, рекомбинантное химерное антитело, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		TS25	IgG1	ИХЛА, β-субъединица, рекомбинантное химерное антитело, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		TS31	IgG1	ИХЛА, целая молекула, рекомбинантное химерное антитело, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		TS32	IgG1	ИХЛА, целая молекула, рекомбинантное химерное антитело, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		10C7cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, целая молекула, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		11E4cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, β-субъединица, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		1CT1cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ в невозстанавливающих условиях, β-субъединица, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
		7G12cc	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, целая молекула, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ
2TS11	7CT8	IgG1	ЕИА, β-субъединица, нет к/р с человеческими ЛГ, ФСГ, ХГ	