

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОМЕНА МАКРОТИРОТРОПИНЕМИИ У ПАЦИЕНТОВ С АУТОИММУННЫМ ТИРЕОИДИТОМ И СУБКЛИНИЧЕСКИМ ГИПОТИРЕОЗОМ

**Биктагирова Э.М.¹, Вагапова Г.Р.², Семаков Г.П.¹,
Золотоверхова Н.И.², Невзорова Т.А.¹, Андрианова И.А.¹,
Евтюгина Н.Г.¹, Акберова Н.И.¹, Хисамутдинов А.Н.³, Абрамова З.И.¹**

¹ ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

² ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

³ ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Резюме. Уровень тиреотропного гормона является одним из диагностических показателей функции щитовидной железы. При субклиническом гипотиреозе его концентрация в сыворотке крови повышается, тогда как уровень гормонов щитовидной железы остается в норме. Одна из причин этого — феномен макротиротропинемии, при котором в крови присутствуют макроизоформы тиреотропина (комплекс тиреотропного гормона с иммуноглобулином). Предполагается, что биологическая активность макротиротропина низкая и может накапливаться в циркуляции, вызывая ложноповышенный уровень тиреотропного гормона в сыворотке.

Данное исследование направлено на выявление природы и характер распространенности феномена макротиротропинемии среди больных субклиническим гипотиреозом на фоне аутоиммунного тиреоидита и группы здоровых доноров.

Материалом для исследования служили 50 образцов сывороток венозной крови: 30 пациентов с субклиническим гипотиреозом на фоне аутоиммунного тиреоидита, 10 с манифестным гипотиреозом, 10 условно здоровых доноров без патологий щитовидной железы (группа контроля). Выборка была сформирована на базе клинической лаборатории при НУЗ «Отделенческая клиническая больница на ст. Казань ОАО «РЖД», г. Казань. Сыворотка крови больных была подвергнута скринингу на наличие макротиротропина методом полиэтиленгликоль-преципитации с последующим анализом ее гель-фильтрационной хроматографией.

В результате проведения скрининга сывороток крови методом гель-фильтрационной и аффинной хроматографии установлено, что полиэтиленгликоль осаждает от 50 до 100% сывороточного тиреотропина, из которого 56-98% — истинный макротиротропин. У пациентов с субклиническим гипо-

Адрес для переписки:

Биктагирова Эльнара Маулетовна
ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ
420008, Россия, Республика Татарстан, г. Казань,
ул. Кремлевская, 18.
Тел.: 8 (987) 069-83-58.
Факс: 8 (843) 233-78-14.
E-mail: elnarabik@gmail.com

Address for correspondence:

Biktagirova Elnara M.
Kazan (Volga) Federal University
420008, Russian Federation, Republic of Tatarstan, Kazan,
Kremlevskaya str., 18.
Phone: 7 (987) 069-83-58.
Fax: 7 (843) 233-78-14.
E-mail: elnarabik@gmail.com

Образец цитирования:

Э.М. Биктагирова, Г.Р. Вагапова, Г.П. Семаков, Н.И. Золотоверхова, Т.А. Невзорова, И.А. Андрианова, Н.Г. Евтюгина, Н.И. Акберова, А.Н. Хисамутдинов, З.И. Абрамова «Определение феномена макротиротропинемии у пациентов с аутоиммунным тиреоидитом и субклиническим гипотиреозом» // Медицинская иммунология, 2019. Т. 21, № 6. С. 1063-1072. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1063-1072
© Биктагирова Э.М. и соавт., 2019

For citation:

E.M. Biktagirova, G.R. Vagapova, G.P. Semakov, N.I. Zolotoverkchova, T.A. Nevzorova, I.A. Andrianova, N.G. Evtuygina, N.I. Akberova, A.N. Khisamutdinov, Z.I. Abramova "Detection of macro-thyrotropinaemia in patients with Hashimoto's thyroiditis and subclinical hypothyroidism", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2019, Vol. 21, no. 6, pp. 1063-1072. doi: 10.15789/1563-0625-2019-6-1063-1072
DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1063-1072

тиреозом, с уровнем тиреотропного гормона более 10 мкМЕ/мл, показана тенденция к увеличению уровня макротиротропина. Содержание макротиротропинового комплекса у пациентов с субклиническим гипотиреозом, у которых уровень антител к тиреопероксидазе > 500 ед/л, достоверно выше по сравнению с пациентами с манифестным гипотиреозом. Повышенный уровень антител к тиреопероксидазе может приводить к генерации макротиротропина.

Наше исследование показало феномен макротиротропинемии достаточно часто встречается как у пациентов с субклиническим и манифестным гипотиреозом на фоне тиреоидита Хашимото (53,3%), так и в группе контроля (25%). Макротиротропиновый комплекс, вероятно, состоит из тиреотропина и IgG. Пациенты с уровнем тиреотропного гормона более 10 мкМЕ/мл являются кандидатами для проведения скрининга на наличие макротиротропинового комплекса. Активность аутоиммунного процесса может коррелировать с феноменом макротиротропинемии. Полученные результаты могут быть использованы для разработки дополнительного инструмента при выборе терапии в клинической практике.

Ключевые слова: макротиротропинемия, аутоиммунный тиреоидит, субклинический гипотиреоз, гель-фильтрационная хроматография, аффинная хроматография

DETECTION OF MACRO-THYROTROPINAEMIA IN PATIENTS WITH HASHIMOTOS THYROIDITIS AND SUBCLINICAL HYPOTHYROIDISM

**Biktagirova E.M.^a, Vagapova G.R.^b, Semakov G.P.^a,
Zolotoverkchova N.I.^b, Nevzorova T.A.^a, Andrianova I.A.^a,
Evtyugina N.G.^a, Akberova N.I.^a, Khisamutdinov A.N.^c, Abramova Z.I.^a**

^a Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

^b Kazan State Medical Academy, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

^c Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abstract. The level of thyroid stimulating hormone is one of the diagnostic indicators of thyroid function. In subclinical hypothyroidism, its concentration in the blood serum increases, while the level of thyroid hormones remains normal. One of the reasons for this is the phenomenon of macrothyrotropinemia, in which the macro isoforms of thyrotropin (a complex of thyrotropic hormone with immunoglobulin) are present in the blood. It is assumed that the biological activity of macrothyrotropin is low, and may accumulate in the circulation, causing a falsely elevated level of thyroid-stimulating hormone in serum. The aim of this study is to identify the nature and prevalence of the macrothyrotropinemia phenomenon among patients with subclinical hypothyroidism in presence of autoimmune thyroiditis and a group of healthy donors. Materials and methods: Fifty serum samples of venous blood served as the material for the study: 30 patients with subclinical hypothyroidism in presence of autoimmune thyroiditis; 10, with manifesting hypothyroidism, 10 conditionally healthy donors without thyroid gland pathology (control group). The group was derived from results of the clinical laboratory at the Clinical Hospital at the Kazan station railway. Patients' blood serum was screened for the presence of macrothyrotropin by polyethylene glycol precipitation method, followed by analysis by gel filtration chromatography. Results of this study were as follows: screening of blood sera was performed by gel filtration and affinity chromatography. Polyethylene glycol was shown to precipitate 50 to 100% serum thyrotropin, of which true macrothyrotropin makes 56-98%. In the patients with subclinical hypothyroidism with a thyroid-stimulating hormone level of more than 10 μ IU/ml, a trend towards an increase in the level of macrothyrotrophinaemia has been shown. The content of macrothyrotropin complex in patients with subclinical hypothyroidism, in whom the level of antibodies to thyroperoxidase is > 500 U/L, is significantly higher if compared to the patients with manifesting hypothyroidism. Elevated levels of antibodies to thyroperoxidase can lead to the generation of macrothyrotropin. Our findings have shown that the phenomenon of macrothyrotropinemia is quite common in patients with subclinical and manifesting hypothyroidism with Hashimoto thyroiditis (53.3%) and in control group (25%). Macrothyrotropin complex probably consists of thyrotropin and IgG. Patients with a thyroid-stimulating hormone level of > 10 μ IU/ml are candidates for screening for the presence of the macrothyrotropin complex.

The activity of the autoimmune process may correlate with the phenomenon of macrothyrotropinemia. The results can be used to develop an additional tool when choosing therapy in clinical practice.

Keywords: macrothyrotropinaemia, thyroiditis, autoimmune hypothyreosis, subclinical, gel-filtration chromatography, affine chromatography

Введение

Тиреотропный гормон (тиреотропин; ТТГ) является ключевым параметром для оценки состояния щитовидной железы (ЩЖ) [12]. В зависимости от клинических и лабораторных проявлений выделяют два варианта течения гипотиреоза: манифестный и субклинический [17]. Субклинический гипотиреоз диагностируется при условии, когда определяется нормальный уровень свободного трийодтиронина (св. Т4) в сочетании с умеренно повышенным уровнем ТТГ. Заместительная терапия тиреоидными гормонами, как правило, начинается при уровне ТТГ, превышающем 10 мЕд/л [2, 4, 7].

В настоящее время в литературе обсуждается феномен макропролактинемии [1, 6], при этом биологическая активность макропролактина (макро-ПРЛ) (комплекс пролактина и иммуноглобулина) низкая [1]. По аналогии с макропролактинемией встречаются случаи, когда в крови циркулируют макроизоформы других гормонов, в частности гонадотропинов [11]. Так, в литературе описан феномен макро-ТТГ, при котором в крови присутствуют макроизоформы ТТГ, значительно повышен уровень ТТГ без повышения св. Т4 и клинических проявлений [16]. Молекула макро-ТТГ представляет собой комплекс ТТГ с иммуноглобулином G (IgG) большого молекулярного размера [7]. Предполагается, что биологическая активность макро-ТТГ может быть такой же низкой, как и у макро-ПРЛ, при этом макро-ТТГ может накапливаться в циркуляции, вызывая ложноповышенный уровень ТТГ в сыворотке. Таким образом, макро-ТТГ, вероятно, обнаруживается у пациентов с субклиническим гипотиреозом. Анализ результатов определения уровня ТТГ часто проводится с использованием иммунометрических методов и не лишен недостатков. Определение биохимической основы феномена макро-ТТГ позволит дифференцировать ложное повышение уровня ТТГ вследствие присутствия гетерофильных антител (АТ) от повышения концентрации гормона, обусловленного снижением функции ЩЖ. Определение макро-ТТГ играет важную роль в клинической практике, так как может изменить терапевтическую стратегию для пациентов с субклиническим гипотиреозом [7].

Определение биохимической основы феномена макро-ТТГ позволит усовершенствовать алгоритм диагностики и лечения субклинического

гипотиреоза [1, 7]. На сегодняшний день распространенность феномена макро-ТТГ в общей популяции остается неизученной [11].

В данном исследовании мы проверили нашу гипотезу, изучив распространенность макро-ТТГ у пациентов с субклиническим гипотиреозом и природу макро-ТТГ. Таким образом, **целью данной работы** была оценка частоты встречаемости феномена макро-ТТГ и характеристика процентного соотношения клинического показателя ТТГ и связанного комплекса ТТГ с IgG (ТТГ + IgG) для пациентов с субклиническим гипотиреозом на фоне аутоиммунного тиреоидита (АИТ, тиреоидит Хашимото). Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Оптимизировать метод выделения макро-ТТГ из сывороток крови контрольной группы и больных субклиническим и манифестным гипотиреозом на фоне АИТ.

2. Изучить состав макро-ТТГ методом аффинной хроматографии на Protein G-сефарозе и гель-фильтрации на суперозе 12.

3. Установить характер и уровень зависимости между частотой встречаемости макро-ТТГ, уровнем св. Т4 и активностью аутоиммунного процесса (уровень АТ к тиреопероксидазе (АТ к ТПО)).

Материалы и методы

Скрининг макро-ТТГ осуществлялся на 50 образцах сывороток венозной крови (из них пациентов с субклиническим гипотиреозом на фоне АИТ (ТТГ выше верхней границы нормы, свободный Т4 в референсном интервале, св. Т4 = $11,69 \pm 1,07$ пмоль/л) – 30, с манифестным гипотиреозом – 10, условно здоровых донора без патологий ЩЖ (группа контроля) – 10), полученной из клинической лаборатории при НУЗ «Отделенческая клиническая больница на ст. Казань ОАО „РЖД“», г. Казань (табл. 1). Во всех образцах сывороток крови пациентов с субклиническим гипотиреозом на фоне АИТ и манифестным гипотиреозом отмечался повышенный уровень антитиреоидных аутоантител (АТ к тиреопероксидазе (АТ к ТПО)).

Диагноз «АИТ» устанавливался на основании общепринятых лабораторно-инструментальных исследований: результатов ультразвукового исследования и оценки функционального состояния ЩЖ, по содержанию ТТГ, свободного тироксина (св. Т3), св. Т4 и определения титра АТ к ТПО в сыворотке крови. Диагноз «субклиниче-

ТАБЛИЦА 1. КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

TABLE 1. CLINICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS

Диагноз Diseases	Возраст Age	Уровень св. Т4 (пмоль/л) Free T4 (pmol/l)	Уровень АТ к ТПО (Ед/л) ТРОАb (IU/l)	Уровень ТТГ (мкМЕ/мл) Serum TSH (μ IU/ml)	Св.ТТГ*** (мкМЕ/ мл) Free TSH (μ IU/ml)	ТТГ в осадке**** PEG prep TSH (%)	ТТГ + IgG***** TSH + IgG (%)
Субклинический гипотиреоз (№ 1)* Subclinical hypothyroidism (No. 1)* n = 10	58,90 \pm 14,93	11,26 \pm 1,29	243,67 \pm 223,50	5,53 \pm 1,07	2,64 \pm 0,83	53,4 \pm 16,9	22,4 \pm 7,1
Субклинический гипотиреоз (№ 2) Subclinical hypothyroidism (No. 2) n = 10			465,89 \pm 89,04	12,26 \pm 1,30	2,07 \pm 0,65	83,6 \pm 26,4	56,4 \pm 17,8
Субклинический гипотиреоз (№ 3) Subclinical hypothyroidism (No. 3) n = 10			> 500	34,10 \pm 16,79	3,42 \pm 1,08	93,34 \pm 29,50	24,4 \pm 7,8
Манифестный гипотиреоз Manifest hypothyroidism n = 10	55,2 \pm 13,2	8,93 \pm 1,01	377,38 \pm 223,90	30,2 \pm 24,8	3,20 \pm 1,01	0,88 \pm 0,28	16,52 \pm 5,23
Контроль Control n = 10	54,80 \pm 14,83	14,41 \pm 1,70	в пределах нормы** normal**	1,56 \pm 0,24	0,89 \pm 0,28	55,4 \pm 17,5	39,52 \pm 12,50

Примечание. * – в зависимости от уровня ТТГ пациенты были поделены на 3 группы: № 1 – ТТГ 4,0-10,0 мкМЕ/мл; № 2 – ТТГ 10,0 – 15,0 мкМЕ/мл; № 3 – ТТГ выше 15,0 мкМЕ/мл. ** – референсные критерии: ТТГ 0,3-4,0 мкМЕ/мл, св Т4 10,2-23,2 пмоль/л, АТ к ТПО 0,0-30,0 Ед/л. *** – свободный ТТГ в супернатанте после 12,5% ПЭГ (полиэтиленгликоль)-преципитации. **** – ТТГ в осадке = (исходный ТТГ – ТТГ в супернатанте) / исходный ТТГ \times 100%. ***** – ТТГ + IgG (ТТГ связанный с IgG) = ТТГ в комплексе с IgG (связанный с PrG сепарозой) / (свободный ТТГ + ТТГ в комплексе с IgG) \times 100%.

Note. *, depending on the level of TSH, the patients were divided into 3 groups: No. 1 – TSH 4.0-10.0 μ IU/ml; No. 2 – TSH 10.0-15.0 μ IU/ml; No. 3 – TSH above 15.0 μ IU/ml. **, reference criteria: TSH 0.3-4.0 μ IU/ml, fT4 10.2-23.2 pmol/l, TPOAb 0.0-30.0 IU/l. ***, ratio of free TSH in supernatant after 12.5% PEG (polyethylene glycol)-precipitable. **** PEG prep TSH = (Serum TSH – free TSH in supernatant) / Serum TSH \times 100%. *****, TSH + IgG = TSH bound IgG (PrG sepharose bound) / (free TSH + TSH bound IgG) \times 100%.

ский гипотиреоз» устанавливался по уровню ТТГ выше верхней границы нормы и св. Т3 в интервале референсных значений.

Все лица, включенные в исследование, дали информированное согласие на участие в нем.

Концентрация ТТГ в сыворотках крови пациентов определялась методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов реагентов для количественного иммуноферментного определения тиреотропного гормона в сыворотке крови человека «Тиротид ИФА-ТТГ» (ООО «Алкор Био»,

Санкт-Петербург) согласно инструкции фирмы-производителя.

Для идентификации макро-ТТГ использовался метод осаждения иммунных комплексов полиэтиленгликолем (ПЭГ). Для этого равные объемы сыворотки крови пациентов (200 мкл) смешивались с 12,5% ПЭГ 6000 (Merck, Schuchardt) на фосфатно-солевом буфере (ФСБ, pH = 6,8) и инкубировались 24 часа при +4 °С с дальнейшим центрифугированием при 3000 g в течение 5 мин [16]. В полученном супернатанте измеряли уровень ТТГ, осадок разводили 0,1М глициновым

буфером (0,1М глицин-НСl, рН = 2,3), в котором также измеряли уровень ТТГ методом ИФА.

Полученный осадок иммунных комплексов растворяли в ФСБ и исследовали гель-фильтрационной (Superose 12 10/300) и аффинной хроматографией (HiTrap Protein G HP).

Гель-фильтрационная хроматография проводилась на колонке с суперозой 12 (superose 12 10/300 GL) (GE Healthcare, Швеция). На колонку наносили 500 мкл образца иммунных комплексов (осадок, содержащий ТТГ и IgG), растворенных в ФСБ, с последующей элюцией биомолекул ФСБ (рН 7,4) [5, 7, 14, 16]. Колонка superose 12 10/300 GL была откалибрована маркерами с различными молекулярными массами. Детекцию ТТГ проводили при 280 нм. В полученных фракциях проводили анализ содержания ТТГ методом ИФА.

Для аффинной хроматографии использовали колонку с HiTrap Protein G HP (GE Healthcare, Швейцария), на которую наносили 0,5-2 мг образца иммунных комплексов (осадок, содержащий ТТГ и IgG) и последовательно промывали колонку со скоростью 1 мл/мин: ФСБ для элюции не связывающихся биомолекул и 0,1 М глицин-НСl (рН 2,3) для элюции связанного IgG с Protein G. Элюированные пробы сразу нейтрализовали буфером 1 М ТрисNaOH (рН = 10,4). В полученных фракциях анализировали содержание ТТГ методом ИФА.

Статистическая обработка данных проводилась в статистической среде R с использованием программы RStudio. Данные представлены в виде Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), графически боксплотами. Нормальность распределения признаков определя-

ли по критерию Шапиро–Уилка. Для сравнения вариантов использовали критерии Краскела–Уоллиса, для последующего попарного сравнения применяли ранговый критерий Вилкоксона с поправкой Бонферрони, для выявления различия в вариабельности признаков использовали F-критерий Фишера [2].

Результаты

В ходе исследования осаждение ПЭГ-6000 показало низкую восстановительную способность ТТГ, что может указывать на присутствие в полученном ПЭГ-6000 осадке связанных с ТТГ крупных молекул, таких как IgG [5, 7, 14, 16]. У 8 пациентов с субклиническим гипотиреозом результаты гель-фильтрационной хроматографии показали, что пик иммунореактивности ТТГ с молекулярной массой 28 кДа располагался на хроматограмме правее пика выхода IgG, молекулярная масса которого составляла 150 кДа (рис. 1А). В полученных после проведения хроматографии пробах была определена концентрация ТТГ методом ИФА и соотнесена с полученными пиками на графике. Максимальная концентрация ТТГ приходилась на объем, равный 11 мл, что соответствовало пику выхода IgG (рис. 1Б). Это свидетельствовало о том, что в данных комплексах содержался как свободный ТТГ, так и макро-ТТГ комплекс.

Также были проанализированы образцы, не содержащие комплекс ТТГ с IgG (рис. 1Б)

Для доказательства наличия комплекса ТТГ с IgG в сыворотке крови больных была проведена аффинная хроматография на протеин G-сефарозе, поскольку Fc-фрагмент челове-

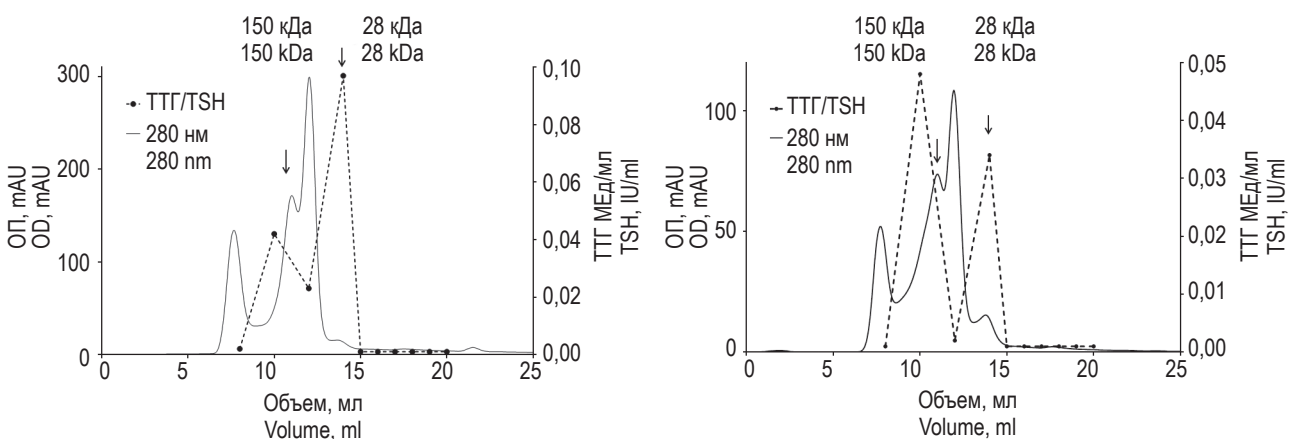


Рисунок 1. Измерение ТТГ во фракциях с использованием гель-фильтрационной хроматографии

Примечание. Основной пик иммунореактивности ТТГ был показан в виде молекулярной массы 28 кДа, тогда как фракция другого пика ТТГ обнаруживалась в виде молекулярной массы 150 кДа.

Figure 1. Measure TSH in fractions using GFC

Note. The main peak of TSH immunoreactivity was shown as a molecular weight of 28 kDa, while a fraction of the other TSH peak was detected as a molecular weight of 150 kDa.

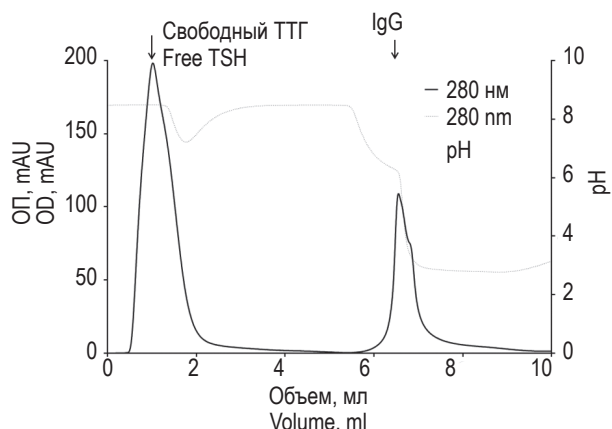


Рисунок 2. Показано 2 пика, первый соответствует несвязанным биомолекулам, второй – IgG

Примечание. Полученные пики были собраны и проанализированы на содержание ТТГ методом ИФА. Максимальная концентрация ТТГ наблюдалась во втором пике, из этого следует, что ТТГ связан с IgG.

Figure 2. Shown 2 peaks, the first corresponds to unbound biomolecules, the second – IgG

Note. The resulting peaks were collected and analyzed for the content of TSH by ELISA. The maximum concentration of TSH was observed in the second peak, it follows that TSH is associated with IgG.

ского IgG имеет большое сродство к протеин G-сефарозе (рис. 2.) [5].

Статистический анализ данных показал, что ПЭГ осаждает от 50 до 100% сывороточного ТТГ, из которого от 56 до 98% – истинный макро-ТТГ (табл. 1). Таким образом, можно предположить, что данные диагностических лабораторий по определению концентрации ТТГ методом ИФА могут быть ложноположительными, и, как следствие, пациент получает неадекватное лечение [16]. Расчет показал, что во всех сыворотках больных субклиническим гипотиреозом присутствует ТТГ, связанный с IgG, следовательно, имеет место феномен макро-ТТГ

Для определения распространенности феномена макро-ТТГ был проведен сравнительный анализ трех групп: пациентов (с субклиническим и манифестным гипотиреозами на фоне АИТ) и условно здоровых доноров по процентному содержанию макро-ТТГ в исходной сыворотке. Была показана тенденция к снижению уровня комплекса ТТГ + IgG в группе больных манифестным гипотиреозом 13,37% (5,13-27,56) по сравнению с контрольной группой 43,06% (14,3-54,38) и больных субклиническим гипотиреозом 21,74% (4,21-60,27) ($p = 0,228$) (рис. 3). Распространенность феномена макро-ТТГ среди пациентов с субклиническим и манифестным гипотиреозом является достаточно высокой и составляет 53,33% (22 случая из 40).

У группы контроля в 25% случаев (4 случая из 10) также выявлен макрокомплекс ТТГ + IgG,

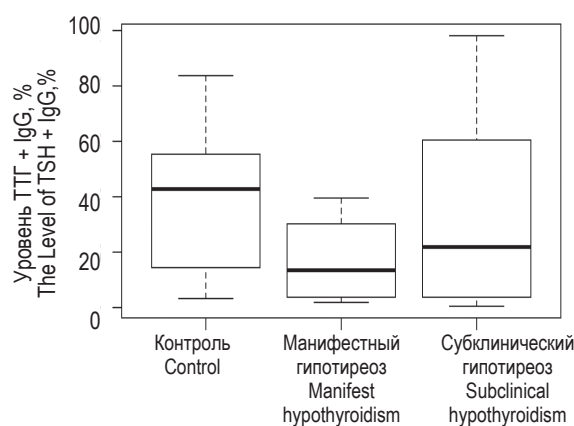


Рисунок 3. Распределение уровня ТТГ + IgG,% среди групп контроля и пациентов с субклиническим и манифестным гипотиреозом

Примечание. Сравнительный анализ трех групп: пациентов (с субклиническим и манифестным гипотиреозами на фоне АИТ) и условно здоровых доноров по процентному содержанию макро-ТТГ в исходной сыворотке. Показана тенденция к снижению уровня комплекса ТТГ + IgG в группе больных манифестным гипотиреозом 13,37% (5,13-27,56) по сравнению с контрольной группой 43,06% (14,3-54,38) и больных субклиническим гипотиреозом 21,74% (4,21-60,27) ($p = 0,228$). Данные уровня макро-ТТГ представлены боксплотами. Каждый столбец представляет интерквартильный размах, где верхняя граница – 75-ый перцентиль, нижняя – 25-ый перцентиль, жирная черта – медиана. Верхняя и нижняя граница разброса – 1,5 × интерквартильный размах.

Figure 3. Distribution of TSH bound IgG levels, % among control groups and patients with subclinical and manifest hypothyroidism

Note. Distribution of TSH bound IgG levels, % among control groups and patients with subclinical and manifest hypothyroidism. The tendency to a decrease in the level of the macroTSH in the group of patients with manifest hypothyroidism of 13.37% was shown (5.13-27.56) compared with the control group 43.06% (14.3-54.38) and patients with subclinical hypothyroidism 21.74% (4.21-60.27) (p value = 0.228). The data of the level of macroTSH are represented by boxplots. Each column represents the interquartile range, where the upper boundary is the 75th percentile, the lower boundary is the 25th percentile, and the bold line is the median. The upper and lower scatter limits are 1.5 × interquartile range.

что свидетельствует о возможности существования феномена макротиротропинемии среди здоровых лиц.

Для определения зависимости между содержанием макрокомплекса ТТГ + IgG и уровнем ТТГ группы исследуемых пациентов были разделены на 3 подгруппы в зависимости от уровня ТТГ (№ 1 – ТТГ 4,0-10,0 мкМЕ/мл; № 2 – ТТГ 10,0-15,0 мкМЕ/мл; № 3 – ТТГ выше 15,0 мкМЕ/мл). Сравнительный анализ данных подгрупп показал тенденцию к увеличению уровня макро-ТТГ у пациентов с субклиническим гипотиреозом в подгруппе № 2 60,42% (33,18-91,55) по сравнению с группами № 1 и № 3 (6,82% (1,84-43,96) vs

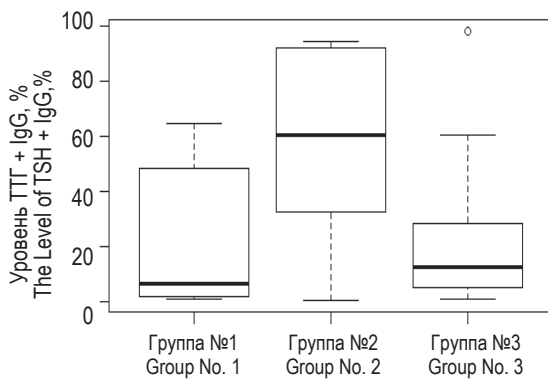


Рисунок 4. Распределение уровня ТТГ + IgG, % в группе пациентов с субклиническим гипотиреозом в зависимости от концентрации ТТГ сыворотки крови
Примечание. Сравнительный анализ групп пациентов по уровню ТТГ + IgG, % с субклиническим гипотиреозом в зависимости от концентрации ТТГ сыворотки крови (№ 1 – 4,0-10,0 мкМЕ/мл; № 2 – 10,0-15,0 мкМЕ/мл; № 3 – выше 15,0 мкМЕ/мл). Наибольшая встречаемость комплекса макро-ТТГ показана в подгруппах № 2 и № 3 (ТТГ 10,0-15,0 мМЕ/л и выше ТТГ 15,0 мМЕ/л). Данные уровня макро-ТТГ представлены боксплотами. Каждый столбец представляет интерквартильный размах, где верхняя граница – 75-ый перцентиль, нижняя – 25-ый перцентиль, жирная черта – медиана. Верхняя и нижняя граница разброса – 1,5 × интерквартильный размах.

Figure 4. Distribution of the level of TSH bound IgG, % in the group of patients with subclinical hypothyroidism depending on the serum TSH concentration

Note. Comparative analysis of patient groups according to the level of TSH bound IgG, % in the group of patients with subclinical hypothyroidism depending on the serum TSH concentration (No. 1 – 4,0-10,0 μ MU/ml; No. 2 – 10,0-15,0 μ MU/ml; No. 3 – above 15,0 μ IU/ml). The highest occurrence of the macroTSH complex is shown in subgroups No. 2 and No. 3. Each column represents the interquartile range, where the upper boundary is the 75th percentile, the lower boundary is the 25th percentile, and the bold line is the median. The upper and lower scatter limits are 1.5 × interquartile range.

12,785 (5,57-25,15)) (рис. 4) ($p = 0,06$) (тест Вилкоксона с поправкой Бонферрони).

В 16 образцах сыворотки крови из 30 пациентов с АИТ и субклиническим гипотиреозом выявлен комплекс ТТГ + IgG, что соответствует 53,33% и свидетельствует о высокой распространенности феномена макротиротропинемии. Шесть сывороток с выявленным макрокомплексом соответствовали повышению уровня ТТГ в пределах 4,0-10,0 мкМЕ/мл (№ 1). В подгруппе № 2 (ТТГ 10,0-15,0 мкМЕ/мл) выявлено также 6 образцов с комплексом ТТГ + IgG, в подгруппе № 3 (ТТГ выше 15,0 мкМЕ/мл) – в четырех сыворотках. Наибольшая встречаемость комплекса макро-ТТГ наблюдалась в подгруппах № 2 и № 3 (ТТГ 10,0-15,0 мМЕ/л и выше ТТГ 15,0 мМЕ/л).

Для определения зависимости распространенности феномена макротиротропинемии от ак-

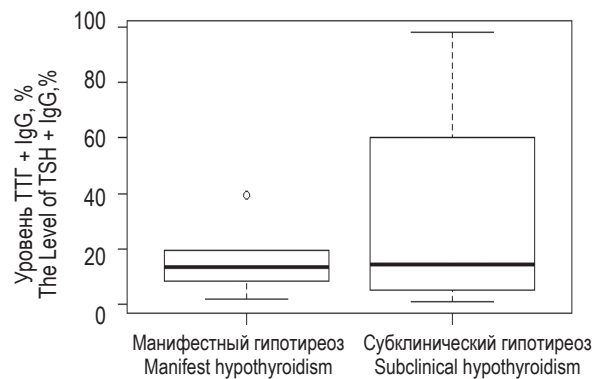


Рисунок 5. Распределение уровня ТТГ + IgG, % между группами пациентов с субклиническим и манифестным гипотиреозом по содержанию АТ к ТПО > 500 Ед/л

Примечание. Сравнительный анализ пациентов по уровню ТТГ + IgG, % между группами с субклиническим и манифестным гипотиреозом по содержанию АТ к ТПО > 500 Ед/л. Показано, что вариабельность содержания макро-ТТГ достоверно меньше у пациентов с манифестным гипотиреозом по сравнению с субклиническим гипотиреозом (13,37 (9,53-17,99) vs 14,3 (5,3-54,11), $p = 0,049$). Данные уровня макро-ТТГ представлены боксплотами. Каждый столбец представляет интерквартильный размах, где верхняя граница – 75-ый перцентиль, нижняя – 25-ый перцентиль, жирная черта – медиана. Верхняя и нижняя граница разброса – 1,5 × интерквартильный размах.

Figure 5. Distribution of the level of TSH bound IgG, % between groups of patients with subclinical and manifest hypothyroidism according to the content of to TPO Ab > 500 IU/l

Note. Comparative analysis of patients by the level of TSH bound IgG, % between groups with subclinical and manifest hypothyroidism in the content of antibodies to TPO > 500 IU/l. It was shown that the variability of the content of macroTSH was significantly less in patients with manifest hypothyroidism compared with subclinical hypothyroidism (13,37 (9,53-17,99) vs 14,3 (5,3-54,11), $p = 0,049$). Each column represents the interquartile range, where the upper boundary is the 75th percentile, the lower boundary is the 25th percentile, and the bold line is the median. The upper and lower scatter limits are 1.5 × interquartile range.

тивности аутоиммунного процесса пациенты были разделены на группы по уровню АТ к ТПО (№ 1 АТ к ТПО 30,0-500,0 Ед/л; № 2 АТ к ТПО выше 500,0 Ед/л).

Статистический анализ данных по процентному содержанию макрокомплекса ТТГ + IgG у пациентов двух групп (пациенты с манифестным и субклиническим гипотиреозом) по содержанию АТ к ТПО более 500 Ед/л показал, что вариабельность содержания макро-ТТГ достоверно меньше у пациентов с манифестным гипотиреозом по сравнению с субклиническим гипотиреозом (13,37 (9,53-17,99) vs 14,3 (5,3-54,11), $p = 0,049$). Таким образом, исходя из вышеизложенного, можно предположить, что активность аутоиммунного процесса может коррелировать с феноменом макро-ТТГ.

Обсуждение

Диагностика макро-ТТГ очень важна для клиники, так как ее результат может повлиять на тактику лечения для пациентов с субклиническим гипотиреозом.

Аналогично макро-ПРЛ, наши результаты показали, что макро-ТТГ, вероятно, состоит из ТТГ и IgG. Во всех образцах наряду с макрокомплексами обнаружены как мономерный ТТГ, так и свободный от связи с IgG.

В норме молекула ТТГ имеет низкий молекулярный вес (28 кДа) и легко проникает через почечный барьер, выходясь из организма. Учитывая, что молекулярный вес комплекса ТТГ с IgG значительно превышает молекулярный вес ТТГ (150 кДа), проникнуть сквозь почечный барьер макро-ТТГ не может и длительно сохраняется в сыворотке крови, что создает значительные помехи при ИФА [16]. У всех пациентов с выявленным макро-ТТГ фоновым заболеванием является АИТ. Можно предположить, что аутоиммунный механизм также принимает непосредственное участие в образовании макрокомплексов.

Полученные результаты согласуются с данными, полученными Sakai и соавт. (2009). Они анализировали пациента с очень высоким уровнем ТТГ, определенным с помощью иммуохемилюминесцентного анализа, без симптомов гипотиреоза и нормальными показателями св. Т3 и св. Т4. В результате изучения состава сыворотки методами гель-фильтрационной и аффинной хроматографии было показано, что пик выхода ТТГ находился в положении выше молекулярной массы, чем у IgG. После проведения ПЭГ-преципитации данный макрокомплекс исчезал на хроматограмме. Таким образом, они пришли к выводу, что ТТГ в сыворотке был представлен в виде комплекса аутоантител к ТТГ и анти-ТТГ IgG [16].

Нами показано, что погрешности при ИФА могут быть обусловлены именно комплексами ТТГ с IgG – макро-ТТГ, которые имеют низкую биологическая активность по сравнению с мономерным ТТГ. Это связано с тем, что комплекс ТТГ с IgG может конкурировать с молекулой ТТГ за связывание с рецептором ТТГ [1, 11]. Nattori и соавт. также показали, что природа макро-ТТГ была гетерогенна, представлена восемью типами аутоантител против ТТГ класса IgG, и обладала низкой биологическую активностью [7].

На сегодняшний день большая часть данных о распространенности феномена макротиротропинемии представлена в работах Nattori и соавт. [6-10]. В одном из исследований они показали, что в 117 образцах из 681 сыворотки пациентов с субклиническим гипотиреозом ПЭГ-осажденного ТТГ превышает 75%, далее

они подвергли полученный комплекс ТТГ гель-фильтрационной хроматографии. Оказалось, что основной пик иммунореактивности ТТГ приходился на массу более 100 кДа, 11 пациентам с субклиническим гипотиреозом был поставлен диагноз «макротиротропинемия», все они имели показатель уровня ТТГ более 10 мкМЕ/л [7].

По нашим данным, наибольшая частота встречаемости комплекса макро-ТТГ наблюдалась у пациентов с уровнем ТТГ более 10,0 мЕд/л. Полученный результат согласуется с результатами скрининга Nattori и соавт. [7]. В другом исследовании Nattori и соавт. также было обнаружено, что у пациентов с тиреоидитом Хашимото без признаков гипотиреоза с уровнем ТТГ выше 40 мЕд/л достоверно чаще встречался феномен макро-ТТГ [3].

В работе 2016 года Nattori и соавт. был проведен скрининг макро-ТТГ 1901 пациента с субклиническим гипотиреозом с помощью ПЭГ-преципитации с последующей гель-фильтрационной хроматографией. У 174 образцов сыворотки крови 75% ТТГ осаждался ПЭГ, в 20 из них содержался ТТГ с большим молекулярным весом. Распространенность феномена макро-ТТГ составила 0,79% (15/1901) [8]. Аналогичная распространенность данного феномена была отмечена в исследовании Mills и соавт. на 495 сыворотках с уровнем ТТГ выше 10 мЕд/мл и составляла 0,6% [15].

Большинство пациентов с субклиническим гипотиреозом в нашем исследовании с высоким уровнем макро-ТТГ также имели высокий уровень сывороточного ТТГ (выше 10 мкМЕ/мл). Это уровень гормона, при котором чаще всего назначается заместительная терапия. Следовательно, пациенты с субклиническим гипотиреозом, у которых уровень ТТГ в сыворотке 10 мкМЕ/мл и более, являются кандидатами на скрининг макро-ТТГ.

Nattori и соавт. в исследовании 2016 года предположили, что феномен макро-ТТГ преобладает в образцах от пожилых пациентов и что аутоиммунные механизмы могут способствовать генерации макро-ТТГ [7].

В заключение следует отметить, что метод осаждения ПЭГ, широко используемый для скрининга макро-ПРЛ, следует ввести и для диагностики макро-ТТГ [1, 6]. Во всех образцах сывороток пациентов после осаждения ПЭГ большая часть ТТГ обнаруживалась именно в осадке, а на гель-фильтрационной хроматографии выявлялись комплексы макро-ТТГ. Это связано с тем, что ТТГ является гликопротеином и, так же как и ПРЛ, может частично гликозилироваться. Предполагается, что гликозилирование может способствовать агрегации гормона, что может привести

к увеличению количества осадка с ПЭГ. Уровень ПЭГ-осажденного ТТГ у пациентов с субклиническим гипотиреозом составил 77%, и феномен макро-ТТГ для них не редкость. Поэтому мы рекомендуем исследовать подробнее на наличие комплексов те образцы, в которых уровень ТТГ после осаждения ПЭГ превышает референсные значения.

Так как макро-ТТГ имеет низкую биологическую активность, пациенты с данным феноменом не нуждаются в заместительной гормональной терапии, кроме пациентов с высоким уровнем

свободного ТТГ в сыворотке. Полученные результаты могут быть использованы для разработки дополнительного инструмента при выборе терапии в клинической практике.

Благодарности

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

Список литературы / References

1. Мاستицкий С.Э., Шитиков В.К. Статистический анализ и визуализация данных с помощью R. [Электронный ресурс]: Электронная книга, 2014. 400 с. Режим доступа: <http://r-analytics.blogspot.com> [Mastitsky S.E., Shitikov V.K. Statistical analysis and data visualization using R [Electronic resource]. E-book, 2014. 400 p. Access mode: <http://r-analytics.blogspot.com>.
2. Сорокин М.Ю. Феномен макротиропинемии в современной клинической практике // Клиническая и экспериментальная тиреодология, 2012. Т. 8, № 4. С. 25-26. [Sorokin M.Yu., Macrotyropinemia in clinical practice. *Klinicheskaya i eksperimentalnaya tireoidologiya = Clinical and Experimental Thyroidology*, 2012, Vol. 8, no. 4, pp. 25-26. (In Russ.)]
3. Balazs C., Racz K. Diagnostic and therapeutical significance of macro-TSH in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Orv. Hetil.*, 2017, Vol. 158, no. 34, pp. 1346-1350.
4. Biondi B., Cooper D.S. The clinical significance of subclinical thyroid dysfunction. *Endocr. Rev.*, 2008, Vol. 29, no. 1, pp. 76-131.
5. Halsall D.J., Fahie-Wilson M.N., Hall S.K., Barker P., Anderson J., Gama R., Chatterjee V.K. Macro thyrotropin-IgG complex causes factitious increases in thyroid stimulating hormone screening tests in a neonate and mother. *Clin. Chem.*, 2006, Vol. 52, no. 10, pp. 1969-1970.
6. Hattori N., Ishihara T., Saiki Y. Macroprolactinaemia: prevalence and aetiologies in a large group of hospital workers. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2009, Vol. 71, no. 5, pp. 702-708.
7. Hattori N., Ishihara T., Yamagami K., Shimatsu A. Macro TSH in patients with subclinical hypothyroidism. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, 2015, Vol. 83, no. 6, pp. 923-930.
8. Hattori N., Ishihara T., Shimatsu A. Variability in the detection of macro TSH in different immunoassay systems. *Eur. J. Endocrinol.*, 2016, Vol. 174, no. 1, pp. 9-15.
9. Hattori N., Ishihara T., Matsuoka N., Saito T., Shimatsu A. Anti-thyrotropin autoantibodies in patients with macro-thyrotropin and long-term changes in macro-thyrotropin and serum thyrotropin levels. *Thyroid*, 2017, Vol. 27, no. 2, pp. 138-146.
10. Hattori N., Aisaka K., Chihara K., Shimatsu A. Current thyrotropin immunoassays recognize macrothyrotropin leading to hyperthyrotropinemia in females of reproductive age. *Thyroid*, 2018, Vol. 28, no. 10, pp. 1252-1260.
11. Ismail A.A., Walker P.L., Barth J.H., Lewandowski K.C., Jones R., Burr W.A. Wrong biochemistry results: two case reports and observational study in 5310 patients on potentially misleading thyroid stimulating hormone and gonadotropin immunoassay results. *Clin. Chem.*, 2002, Vol. 48, no. 11, pp. 2023-2029.
12. Keffer J.H. Preanalytical considerations in testing thyroid function. *Clin. Chem.*, 1996, Vol. 42, no. 1, pp. 125-134.
13. Leslie H., Courtney C.H., Bell P.M., Hadden D.R., McCance D.R., Ellis P.K., Sheridan B., Atkinson A.B. Laboratory and clinical experience in 55 patients with macroprolactinemia identified by a simple polyethylene glycol precipitation method. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2001, Vol. 86, no. 6, pp. 2743-2746.
14. Loh T.P., Kao S.L., Halsall D.J., Toh S.A., Chan E., Ho S.C., Tai E.S., Khoo C.M. Macro-thyrotropin: a case report and review of literature. *J. Clin. Endocrin. Metab.*, 2012, Vol. 97, no. 6, pp. 1823-1827.
15. Mills F., Jeffery J., Mackenzie P., Cranfield A., Ayling R.M. An immunoglobulin G complexed form of thyroid-stimulating hormone (macro thyroid-stimulating hormone) is a cause of elevated serum thyroid-stimulating hormone concentration. *Ann. Clin. Biochem.*, 2013, Vol. 50, no. 5, pp. 416-420.
16. Sakai H., Fukuda G., Suzuki N., Watanabe C., Odawara M. Falsely elevated thyroid-stimulating hormone (TSH) level due to macro-TSH. *Endocr. J.*, 2009, Vol. 56, no. 3, pp. 435-440.
17. Shapira Y., Agmon-Levin N., Shoefeld Y. Defining and analyzing geoepidemiology and human autoimmunity. *J. Autoimmun.*, 2010, Vol. 34, no. 3, pp. 168-177.

Авторы:

Биктагирова Э.М. — к.б.н., старший научный сотрудник кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Вагапова Г.Р. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой эндокринологии ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Семаков Г.П. — аспирант кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Золотоверхова Н.И. — аспирант кафедры эндокринологии ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Невзорова Т.А. — к.б.н., доцент, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Андрианова И.А. — младший научный сотрудник кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Евтюгина Н.Г. — бакалавр кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Акберова Н.И. — к.б.н., старший научный сотрудник, доцент кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Хисамутдинов А.Н. — к.м.н., доцент, доцент кафедры общественного здоровья и организации здравоохранения ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Абрамова З.И. — д.б.н., профессор, профессор кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» Министерства науки и высшего образования РФ, г. Казань, Республика Татарстан, Россия

Authors:

Biktagirova E.M., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Vagapova G.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Endocrinology, Kazan State Medical Academy, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Semakov G.P., Postgraduate Student, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Zolotoverkchova N.I., Postgraduate Student, Department of Endocrinology, Kazan State Medical Academy, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Nevezorova T.A., PhD (Biology), Associate Professor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Andrianova I.A., Junior Research Associate, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Evtuygina N.G., Bachelor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Akberova N.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Associate Professor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Khislamutdinov A.N., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Public Health and Healthcare Management, Kazan State Medical University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Abramova Z.I., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Biochemistry, Biotechnology and Pharmacology, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga) Federal University, Kazan, Republic of Tatarstan, Russian Federation

Поступила 11.06.2019

Отправлена на доработку 19.06.2019

Принята к печати 16.09.2019

Received 11.06.2019

Revision received 19.06.2019

Accepted 16.09.2019