

Тиреоглобулин человека

Тиреоглобулин — это гликопротеин, который вырабатывается исключительно фолликулярными клетками щитовидной железы. Он секретируется в просвет фолликулов, где служит резервуаром для хранения тиреоидных гормонов тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3). Тиреоглобулин представляет собой димер белка размером 660 кДа, он имеет большое количество (около 60) дисульфидных связей на мономер и 17 участков гликозилирования (1). Выработка тиреоглобулина стимулируется тиреод-стимулирующим гормоном (TSH), внутритиреоидным дефицитом йода и присутствием тиреод-стимулирующих иммуноглобулинов.

В клинической практике измерение тиреоглобулина в сыворотке крови применяется в основном для наблюдения за пациентами с дифференцированным раком щитовидной железы (ДРЩЖ) после тотальной тиреоидэктомии и абляции радиоактивным йодом (2, 3). Измерение тиреоглобулина не рекомендуется для скрининга или первичной диагностики рака щитовидной железы из-за схожих уровней тиреоглобулина у пациентов с доброкачественными заболеваниями щитовидной железы и ДТЗ.

Тиреоглобулин является потенциально аутоантигенным, и повышенные концентрации аутоантител к тиреоглобулину в сыворотке крови обнаруживаются у людей с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы (АИЗЩЖ) (4). Болезнь Грейвса и тиреоидит Хашимото являются двумя наиболее частыми клиническими проявлениями при диагностике АИЗЩЖ. Отсутствие антител к тиреоглобулину при тестировании позволяет исключить тиреоидит Хашимото при поставке диагноза. Ставить этот диагноз при наличии антител к тиреоглобулину также не рекомендуется, так как их появление может быть вызвано другими заболеваниями (5, 6).

Кроме того, для уточнения результатов измерения уровня тиреоглобулина часто измеряют уровень аутоантител к тиреоглобулину (7, 8). Антитела к тиреоглобулину могут связывать циркулирующий тиреоглобулин, что может привести к заниженным показателям измерения или даже ложноотрицательному результату. Следует отметить, что тиреоглобулин и антитела к нему проявляют взаимную интерференцию в иммуноанализах.

Нативный и рекомбинантный тиреоглобулин

Мы предлагаем как нативный, так и рекомбинантный человеческий тиреоглобулин, экспрессированный в клеточной линии млекопитающих, для использования при разработке тестов для обнаружения аутоантител к тиреоглобулину. Эти антигены также можно использовать в качестве калибраторов для иммуноанализа тиреоглобулина.

КЛИНИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Дифференциальные заболевания щитовидной железы

Аутоиммунные заболевания щитовидной железы

Нативный тиреоглобулин очищают из щитовидной желез до гомогенности, высаливая сульфатом аммония. Окончательная очистка проводится методом гель-фильтрационной хроматографии с использованием носителя Sephacryl S-200. Чистота белка составляет >90 % (рис. 1А). Несколько видимых полос белка относятся к тиреоглобулину, поскольку они распознаются специфическими моноклональными антителами при Вестерн-блоттинге. Рекombинантный тиреоглобулин представляет собой полноразмерную субъединицу человеческого тиреоглобулина (аминокислотные остатки 1-2768, номер доступа UniProtKB P01266), содержащую С-концевой GlyAlaProGly4SerHis10-тер. Белок очищен до гомогенности с помощью металл-аффинной хроматографии. Белок с добавлением 5,4% сахарозы поставляется в лиофилизированной форме. Чистота белка составляет >95% (рис. 1В).

При проведении анализов сравнивались иммунохимические свойства рекомбинантного тиреоглобулина и нативного тиреоглобулина, очищенного из щитовидной железы человека. Они оба наносились на плашки в качестве антигенов для тестирования с образцами сыворотки пациентов с АИЗЩЖ. Как видно из рис. 2, нативный и рекомбинантный тиреоглобулин обладают сходной иммуореактивностью к аутоантителам к тиреоглобулину (коэффициент корреляции 0,99 (n=23)).

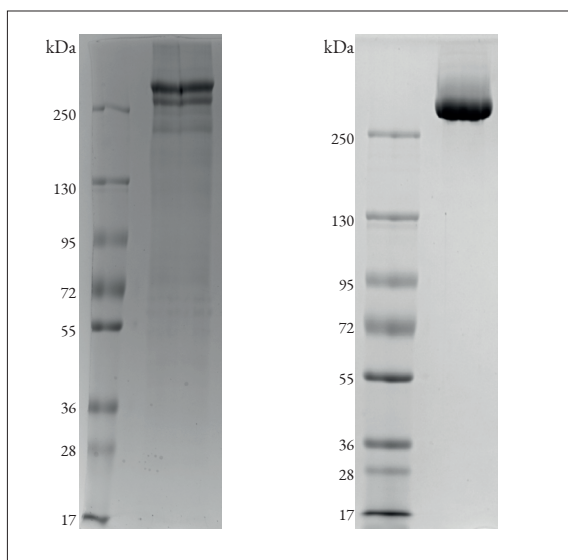


Рисунок 1.

Анализ SDS-PAGE (5-15%) очищенного человеческого тиреоглобулина в восстановительных условиях.

А. Нативный тиреоглобулин из щитовидной желез человека, 3 мкг.

В. Рекombинантный тиреоглобулин, экспрессированный в линии клеток млекопитающих, 4 мкг.

Нативный и рекомбинантный тиреоглобулин человека можно использовать в качестве калибратора в сэндвич-иммуноанализе для обнаружения тиреоглобулина в образцах сыворотки или плазмы. Как показано на рис. 3, и оба иммунохимически активны в сэндвич-иммуноанализе.

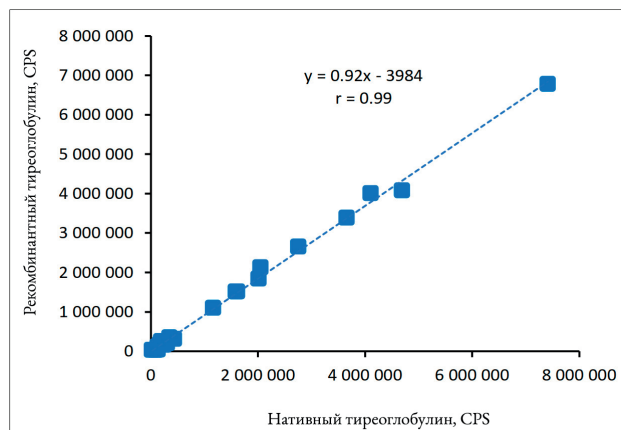


Рисунок 2.

Диаграмма рассеяния интенсивности флуоресценции для нативного человеческого тиреоглобулина и рекомбинантного человеческого тиреоглобулина, использованных в качестве антигенов для нанесения на плашки (0,1 мкг на лунку) с образцами сыворотки пациентов с АИЗЩЖ. Образцы сыворотки развели 1/50 и инкубировали в лунках в течение 30 минут. Аутоантитела выявляли с помощью антител к IgG человека, меченных стабильным хелатом Eu3+. Флуоресцентный сигнал выражен в CPS.

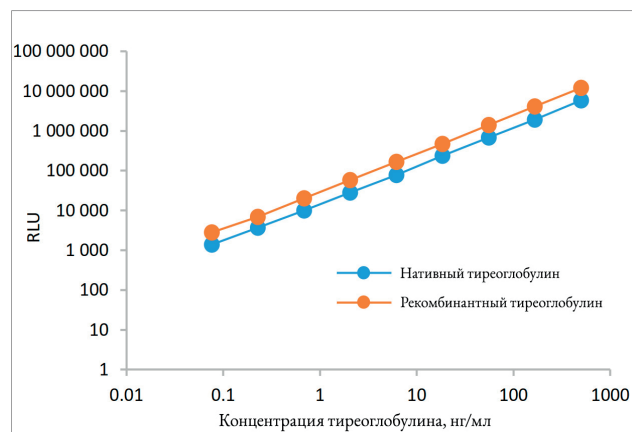


Рисунок 3.

Калибровочная кривая с нативным и рекомбинантным тиреоглобулином для сэндвич-хемилюминесцентного иммуноанализа на базе пар антител 5F9cc-5E6cc (захват-детекция). Смесь захватывающих антител, меченных биотином, антигена и детекторных антител, меченных щелочной фосфатазой, инкубировали в течение 15 минут при 37 °С. Люминесцентный сигнал выражен в CPS.

Моноклональные антитела для разработки иммуноанализов на тиреоглобулин

Хайтест предлагает различные комбинации моноклональных антител для разработки высокоспецифичных, чувствительных и быстрых иммуноанализов для количественного измерения тиреоглобулина в образцах сыворотки или плазмы человека. В таблице 1 показаны рекомендуемые пары антител.

Репрезентативные калибровочные кривые для иммуноанализов на основе пар антител TG47-TG64 и G16-TG12 представлены на рисунке 4. Другие пары также демонстрируют высокую чувствительность ($LoD \leq 0,02$ нг/мл в хемилюминесцентных иммуноанализах).

Таблица 1.

Рекомендованные пары МоАт для разработки иммуноанализов на тиреоглобулин.

Захват	Детекция	Захват	Детекция
TG47	TG16	TG64	TG16
TG47	TG64	TG23	TG12
TG16	TG12	5F9cc	5E6cc
TG64	TG23		

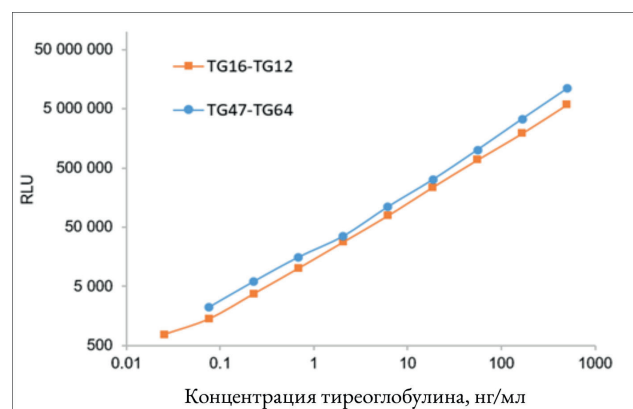


Рисунок 4.

Калибровочные кривые для иммуноанализов на основе пар МоАт TG47-TG64 и TG16-TG12.

Смесь захватывающих антител, меченных биотином, антигеном и детектирующих антител, меченных щелочной фосфатазой, инкубировали в течение 15 минут при 37°C. Люминесцентный сигнал выражен в относительных световых единицах (RLU).

Низкая интерференция с аутоантителами к тиреоглобулину

Присутствие аутоантител в образцах сыворотки или плазмы может привести к ложно заниженным уровням тиреоглобулина. Чтобы избежать такого рода помех в иммуноанализе, все разработанные МоАт были протестированы с образцами сыворотки с высоким уровнем аутоантител к тиреоглобулину - чтобы отобрать те МоАт, которые либо не имели, либо имели относительно низкую интерференцию аутоантител к тиреоглобулину.

Обнаружение тиреоглобулина в клинических образцах

Иммуноанализы на тиреоглобулин на базе рекомендуемых пар МоАт показали высокую корреляцию с широко используемым коммерчески доступным анализом Roche Elecsys TG II.

Концентрацию тиреоглобулина измеряли в 50 образцах сыворотки иммуноанализами на основе пар МоАт TG47-TG64 и TG16-TG12 в сравнении с анализом Roche Elecsys TG II. Как показано на рисунке 5, результаты измерений показали высокую корреляцию с результатами измерений, полученных с помощью анализа Roche Elecsys TG II ($R^2=0,99$ для анализа TG47-TG64 и $R^2=0,96$ для анализа TG16-TG12 анализ).

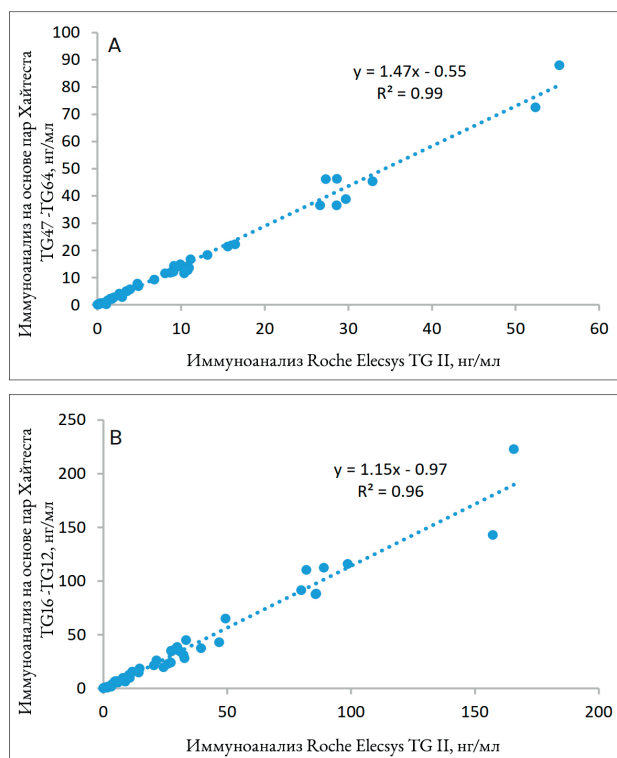


Рисунок 5

Диаграмма рассеяния уровней тиреоглобулина, измеренных в 50 образцах сыворотки с помощью двух иммуноанализов на основе пар МоАт TG47-TG64 (A) и TG16-TG12 (B) в сравнении с анализом Roche Elecsys TG II. Смесь захватывающих антител, меченных биотином, калибратором или образцами сыворотки, и детектирующих антител, меченных щелочной фосфатазой, инкубировали в течение 15 минут при 37°C.

Моноклональные антитела для разработки иммуноанализов на аутоантитела к тиреоглобулину

Компания Хайтест разработала антитела с высокой чувствительностью к аутоантител к тиреоглобулину, что предполагает наличие у них общего или сходного эпитопа с аутоантителами. Работа анализа для количественного определения аутоантител к тиреоглобулину основана на принципе конкуренции: аутоантитела к тиреоглобулину из образца связываются с антигеном, после чего добавленные меченные антитела к тиреоглобулину конкурируют за связывание с аутоантителами. Интенсивность сигнала обратно пропорциональна концентрации аутоантител к тиреоглобулину. Репрезентативные калибровочные кривые для двух последовательных конкурентных анализов на основе МоАт TG08 или TG61 и рекомбинантного тиреоглобулина представлены на рисунке 6.

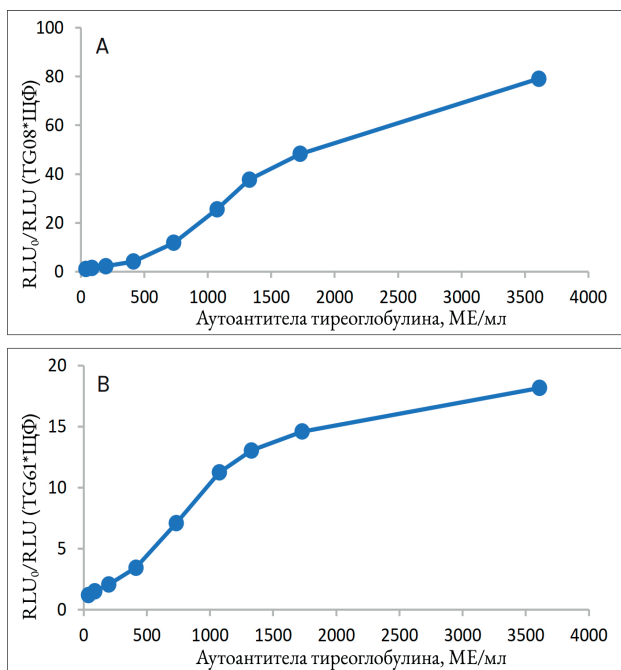


Рисунок 6.

Калибровочные кривые для двух анализов на основе МоАт TG08 (А) или TG61 (В), меченных щелочной фосфатазой, и рекомбинантного тиреоглобулина. Захватываемый антиген биотинилировали, а детектирующие антитела метили щелочной фосфатазой. В качестве калибратора использовали серийные разведения смешанных образцов сыворотки с уровнем аутоантител к тиреоглобулину, измеренным с помощью анализа Roche Elecsys Anti-Tg. Люминесцентный сигнал выражен как отношение RLU в пустом образце к RLU в исследуемом образце.

Обнаружение антител к тиреоглобулину в клинических образцах

Мы проанализировали 45 образцов сыворотки пациентов с АИЗЩЖ с помощью двух анализов на основе МоАт TG08 или TG61 и рекомбинантном тиреоглобулине и сравнили их с анализом Roche Elecsys Anti-Tg. Согласно результатам, представленным на рисунке 7, анализы, основанные на МоАт TG08 или TG61 и рекомбинантном тиреоглобулине, показали относительно хорошую корреляцию с Roche Elecsys Anti-Tg. Примечательно, что использование пары TG08 (в качестве основного антитела) с TG66 (в качестве дополнительного антитела) или TG61 (в качестве основного антитела) с TG66 (в качестве дополнительного антитела) в соотношении 3 к 1 приводило к увеличению корреляции с анализом Roche Elecsys Anti-Tg ($R^2 > 0,9$).

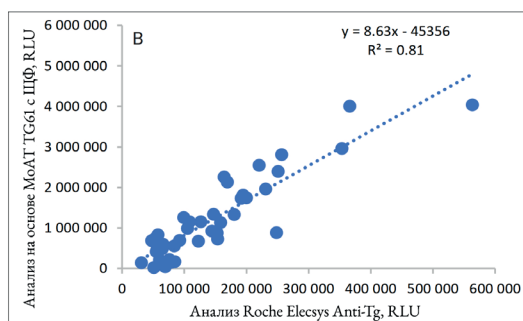
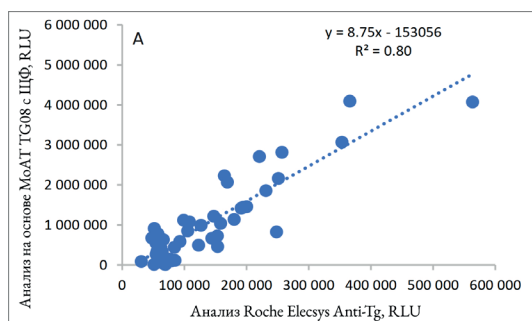


Рисунок 7.

Диаграмма рассеяния уровней аутоантител к тиреоглобулину, измеренных в 45 образцах сыворотки с помощью двух последовательных анализов на основе МоАт TG08 (А) или TG61 (В) и рекомбинантного тиреоглобулина в сравнении с анализом Roche Elecsys Anti-Tg. Захватываемый антиген биотинилировали, а детектирующие антитела метили щелочной фосфатазой. Люминесцентный сигнал выражен в RLU.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Coscia F, Taler-Vercic A, Chang VT, Sinn L, O'Reilly FJ, Izore T, et al.** The structure of human thyroglobulin. *Nature*. 2020 Feb; 578(7796):627-30. PubMed PMID: 32025030. PubMed Central PMCID: 7170718.
- Di Jeso B, Arvan P.** Thyroglobulin From Molecular and Cellular Biology to Clinical Endocrinology. *Endocrine Reviews*. 2016 Feb; 37(1):2-36. PubMed PMID: 26595189. PubMed Central PMCID: 4740344.
- Spencer CA, Lopresti JS.** Measuring thyroglobulin and thyroglobulin autoantibody in patients with differentiated thyroid cancer. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*. 2008 Apr; 4(4):223-33. PubMed PMID: 18268520.
- Clark P, Franklyn J.** Can we interpret serum thyroglobulin results? *Annals of Clinical Biochemistry*. 2012 Jul; 49 (Pt 4):313-22. PubMed PMID: 22589360.
- Frohlich E, Wahl R.** Thyroid Autoimmunity: Role of Anti-thyroid Antibodies in Thyroid and Extra-Thyroidal Diseases. *Frontiers in Immunology*. 2017; 8:521. PubMed PMID: 28536577. PubMed Central PMCID: 5422478.
- Spencer CA, Takeuchi M, Kazarosyan M, Wang CC, Guttler RB, Singer PA, et al.** Serum thyroglobulin autoantibodies: prevalence, influence on serum thyroglobulin measurement, and prognostic significance in patients with differentiated thyroid carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1998 Apr; 83(4):1121-7. PubMed PMID: 9543128.
- Antonelli A, Ferrari SM, Corrado A, Di Domenicantonio A, Fallahi P.** Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmunity Reviews*. 2015 Feb; 14(2):174-80. PubMed PMID: 25461470.
- Erali M, Bigelow RB, Meikle AW.** ELISA for thyroglobulin in serum: recovery studies to evaluate autoantibody interference and reliability of thyroglobulin values. *Clinical Chemistry*. 1996 May; 42(5):766-70. PubMed PMID: 8653905.
- Kitamura Y, Narita S, Kuroda Y, Yagi S, Aoyagi K.** A Novel Thyroglobulin Immunoassay Using the Specimen-Pretreatment Process Improves the Accuracy of Thyroglobulin Measurements in Anti-Thyroglobulin Positive Specimens. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*. 2021 Nov 1; 6(6):1463-75. PubMed PMID: 34580727.

ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ ЗАКАЗА

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА

Название продукта	Кат. №	Клон	Подкласс	Примечания
Тиреоглобулин	2TG12cc	TG61	IgG1	ИФА, ВБ, рекомбинантное химерное антитело
		TG64	IgG1	ИФА, ВБ, рекомбинантное химерное антитело
		TG66	IgG1	ИФА, ВБ, рекомбинантное химерное антитело
		TG12	IgG1	ИФА, ВБ, рекомбинантное кроличье антитело
		TG08	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ
		TG16	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ
		TG23	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ
		TG47	IgG1	<i>In vitro</i> , ИФА, ВБ
		5E6cc	IgG2b	<i>In vitro</i> , ИФА,
		5F9cc	IgG2b	<i>In vitro</i> , ИФА, ИГХ

АНТИГЕНЫ

Название продукта	Кат. №	Чистота	Источник
Тиреоглобулин человека	8TG52	>90%	Щитовидная железа человека
Тиреоглобулин человека, рекомбинантный	8RTG4	>95%	Рекомбинантный