

М.С. Михина\*, В.А. Иоутси, Е.А. Трошина

Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии, Москва, Российская Федерация

# Роль высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии в оптимизации диагностики и лечения заболеваний щитовидной железы

Гормоны щитовидной железы играют неотъемлемую роль в росте, гомеостазе, поддержании физиологических функций и необходимы для нормального развития организма. Именно поэтому точная оценка функции щитовидной железы путем измерения уровней тиреотропного гормона (ТТГ) и гормонов щитовидной железы — общих и свободных фракций тироксина ( $T_4$ ) и трийодтиронина ( $T_3$ ) — важна как для диагностики, так и для лечения заболеваний щитовидной железы. Концентрация тиреоидных гормонов у пациентов без патологии щитовидной железы остается постоянной и коррелирует с уровнем гормонов в тканях и их биологическими эффектами. Однако большинство циркулирующих гормонов связаны с белками плазмы, и только небольшая их часть находится в свободной форме, в связи с чем наиболее часто применяемые в практике методы иммуноанализа имеют ограничения. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии — тандемной масс-спектрометрии успешно справляется с данной проблемой, надежно улучшая специфичность и точность определения уровня гормонов щитовидной железы, повышая при этом диагностические возможности. Этот метод особенно важен при наличии патологии щитовидной железы и факторах, влияющих на связывание гормонов с белком.

**Ключевые слова:** гормоны щитовидной железы, белок, высокоэффективная жидкостная хроматография – тандемная масс-спектрометрия. (Для цитирования: Михина М.С., Иоутси В.А., Трошина Е.А. Роль высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии в оптимизации диагностики и лечения заболеваний щитовидной железы. Вестник РАМН. 2018;73(4):279–284. doi: 10.15690/vramn984)

279

## Актуальность

Основным гормоном, секретируемым щитовидной железой, является тироксин ( $T_4$ ); лишь небольшая часть трийодтиронина ( $T_3$ ) образуется в щитовидной железе, большая же часть образуется на периферии под действием дейодиназ [1, 2]. Дейодиназа I типа активирует  $T_3$  в печени, почках, щитовидной железе и гипофизе. Дейодиназа

II типа локализуется в эндоплазматическом ретикулуме. Дейодиназа III типа инактивирует  $T_4$  и  $T_3$  посредством дейодирования йодтиронинов на тирозильном кольце, приводя к образованию реверсивных трийодтиронина ( $rT_3$ ) и дейодтиронина ( $rT_2$ ) [1, 3, 4].

В сыворотке большая часть  $T_4$  и  $T_3$  циркулирует в связанном состоянии с белками; самым большим сродством с гормонами щитовидной железы обладает тироксин-

M.S.Mikhina\*, V.A. Ioutsy, E.A. Troshina

Endocrinology Research Centre, Moscow, Russian Federation

## The Role of High-Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry in Optimizing Diagnosis and Treatment of Thyroid Diseases

Thyroid hormones play an integral role in growth, homeostasis, and maintenance of physiological functions and are necessary for normal development. Therefore, an accurate assessment of thyroid function is important for both diagnosis and treatment of thyroid disorders. Thyroid function is assessed by measuring thyroid-stimulating hormone (TSH) and thyroid hormones: thyroxine ( $T_4$ ), triiodothyronine ( $T_3$ ), total and free fractions. The concentration of thyroid hormones in patients without pathology of the thyroid gland remains constant and correlates with the level of hormones in tissues and their biological effects. However, most circulating hormones are bound to plasma proteins and only a small part is in free form, the most commonly used methods of immunoassay in this connection have limitations. The method of high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) successfully copes with this problem, which allows improving the specificity and accuracy of measurement of thyroid hormones. High performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry allows to achieve specificity, accuracy for reliable determination of the level of thyroid hormones, increasing diagnostic capabilities. This method is especially important in the presence of thyroid gland pathology and factors affecting the binding of hormones to the protein.

**Key words:** thyroid hormones, protein, high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry.

(For citation: Mikhina MS, Ioutsy VA, Troshina EA. The Role of High-Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry in Optimizing Diagnosis and Treatment of Thyroid Diseases. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2018;73(4):279–284. doi: 10.15690/vramn984)

связывающий глобулин: при невысокой концентрации в плазме он связывает около 80% всех тиреоидных гормонов. Альбумин имеет наименьшую аффинность, но его концентрация в плазме больше; также тиреоидные гормоны могут находиться в связи с транстиретином [5]. Связывание с этими белками увеличивает длительность биологического полураспада и позволяет транспортировать гормоны в ткани-мишени. Только небольшой процент от общего количества тиреоидных гормонов находится в свободном состоянии. Свободные фракции тиреоидных гормонов обладают большей метаболической активностью, что представляет особый интерес в процессе мониторинга пациентов с нарушениями функции щитовидной железы [5–7].

Точное определение концентрации общих и свободных фракций тироксина и трийодтиронина важно для диагностики, лечения и оценки проводимой терапии при заболеваниях щитовидной железы.

Анализы для измерения свободных фракций тиреоидных гормонов могут быть разделены на две категории: с этапом отделения свободного гормона щитовидной железы от белка (ультрафильтрация и равновесный диализ) и без такового. Первые исследования свободных фракций тиреоидных гормонов проводились с помощью равновесного диализа с целью отделения сывороточных белков перед определением концентрации тиреоидных гормонов методом радиоиммуноанализа [8, 9], однако такой способ является достаточно трудоемким. Большинство клинических лабораторий в настоящее время для измерения свободных фракций  $T_4$  и  $T_3$  используют прямые (аналоговые) методы иммуноанализа [10–12]. Достоверность измерения свободного тиреоидного гормона прямым аналоговым иммуноанализом, без предварительного разделения связывающих белков до сих пор является спорной и имеет множество ограничений, поскольку зависит от способа разведения, температурного режима, буферного состава,  $T_3$ - и  $T_4$ -связывающих способностей сыворотки, концентрации белка в сыворотке и концентрации применяемых антител [13–15].

### Обратная линейная связь между свободным тироксином и тиреотропным гормоном

Гормоны щитовидной железы регулируются секрецией тиреотропного гормона и находятся в отрицательной обратной связи: при снижении уровня тиреоидных гормонов происходит стимуляция гипоталамо-гипофизарной системы, и наоборот [11, 16, 17].

Свободный  $T_4$  ( $_{св.}T_4$ ), определенный ультрафильтрацией или равновесным диализом с последующим определением методом высокоэффективной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС), гораздо лучше коррелирует с уровнем тиреотропного гормона (ТТГ) по сравнению с методами иммуноанализа [18, 19].

По данным клинического исследования M. Serdar получена низкая корреляция свободного тироксина и ТТГ при использовании трех различных платформ иммуноанализа [20]. В аналогичных исследованиях [15], продемонстрировавших большую корреляцию, участвовали пациенты с эутиреозом, из них лишь немногие имели сниженную функцию щитовидной железы, при этом корреляция между  $_{св.}T_4$  и ТТГ была хуже, чем при определении данных показателей путем ультрафильтрации и высо-

коэффициентной жидкостной хроматографии – тандемной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). Однако стоит отметить, что корреляция  $_{св.}T_4$  и ТТГ зависит от установленного в каждой конкретной лаборатории референсного интервала показателя  $_{св.}T_4$ . Кроме того, существуют индивидуальные колебания  $_{св.}T_4$  и ТТГ, определяемые генетикой и факторами окружающей среды [15, 16].

Существуют некоторые условия, при которых обратная логарифмическая зависимость между  $_{св.}T_4$  и ТТГ нарушается, а именно: гипоталамическая и гипофизарная недостаточность, резистентность к гормонам щитовидной железы или ТТГ, ТТГ-секретирующие опухоли, синдром нетиреоидной патологии, а также прием препаратов, которые подавляют секрецию ТТГ (допамин, глюкокортикостероиды), прием левотироксина натрия без достижения эутиреоза [21], феномен макротиреотропинеми [22].

### Корреляция $T_3$ и ТТГ

Методы иммунного анализа дают более низкую корреляцию  $T_3$  и ТТГ по сравнению с ВЭЖХ-МС/МС [23]. Кроме того, продемонстрированы более низкая медиана и среднее значение  $T_3$  при измерении с помощью ВЭЖХ-МС/МС в сравнении с методом иммуноанализа в группе лиц с ТТГ >4,5 мМЕ/л и более высокий средний  $T_3$  при ТТГ <0,35 мМЕ/л [24].

Методы иммуноанализа для определения  $_{св.}T_4$  становятся ненадежными, когда связывание белка плазмы различается между стандартом и образцом, как и происходит при изменении связывающего белка или конкурирующих белков.

Таким образом, методы определения свободных фракций должны точно отражать концентрацию без какого-либо вклада связанной фракции. Однако при определении свободного тироксина общая (связанная) фракция также значимо влияет на результаты. Кроме того, анализ определения свободных фракций должен быть валидным для всего диапазона концентраций связывающего белка сыворотки, что не всегда удается достичь рутинными методами [25]. В этой связи методы иммунологических анализов имеют ограничения, поскольку зависят от концентрации белка [26–28].

### Состояния, влияющие на концентрацию белка

Понимание причин и факторов, оказывающих влияние как на связывание  $T_4$  и  $T_3$  с белками, так и на концентрацию этих связывающих белков, имеет решающее значение для разработки и оценки анализов свободных фракций. Наиболее частыми причинами, влияющими на концентрацию белка и тем самым на точность измерения свободных фракций тиреоидных гормонов, являются беременность, почечная недостаточность, синдром нетиреоидной патологии, а также наличие избыточной массы тела.

#### Беременность

Во время беременности снижена функция щитовидной железы отмечается у 2,5% женщин [29].

Щитовидная железа начинает развиваться и синтезировать гормоны на 12-й неделе беременности, до этого времени гормонами щитовидной железы плод обеспечи-

вается за счет матери [30, 31]. Доказано, что гипотиреоз во время беременности связан с нарушениями нейропсихологического развития, а также с акушерскими осложнениями [32–34]. Субклинический гипотиреоз во время беременности также может вызвать осложнения, такие как отслойка плаценты, преждевременные роды и недостаточный вес ребенка при рождении [35, 36]. При этом своевременная диагностика и выявление сниженной функции щитовидной железы позволяют предотвратить неблагоприятные последствия для матери и плода.

При беременности возникают сложности с определением уровней свободных фракций тиреоидных гормонов рутинными методами иммуноанализа [37], в связи с чем обязательно должны использоваться специфические диапазоны значений для каждого триместра беременности.

Кроме изменения концентрации альбумина при беременности, стоит обратить внимание на наличие дейодиназы III типа в плаценте, что также вносит определенный вклад в метаболизм тиреоидных гормонов [38].

Анализ общего  $T_3$  при беременности и в послеродовом периоде имеет плохую корреляцию с измерением методом ВЭЖХ-МС/МС, что свидетельствует о необходимости применения более точного метода, учитывая возможные осложнения при несвоевременном выявлении сниженной функции щитовидной железы [39, 40]. Без сомнений, необходимо дальнейшее исследование у данной группы пациенток для определения триместрспецифичных референсных интервалов при использовании ВЭЖХ-МС/МС.

#### Почечная недостаточность

Хроническая болезнь почек влияет на функцию щитовидной железы различными способами: снижает концентрацию циркулирующих гормонов щитовидной железы, изменяет метаболизм на периферии и снижает связывание тиреоидных гормонов с белками [41].

#### Синдром нетиреоидной патологии

Жизнеугрожающие состояния (инфаркт, инсульт) могут приводить к изменению метаболизма гормонов щитовидной железы (синдром эутиреоидного больного, или синдром нетиреоидной патологии). По разным оценкам, нарушение гормонов щитовидной железы встречается почти у 70% таких больных, из них наиболее частые — снижение  $T_3$  и  $T_4$  и повышение реверсивного  $T_3$  и ТТГ [42]. Этот вопрос принципиален, поскольку тяжесть состояния пациентов требует адекватного и своевременного лечения. Методы иммуноанализа в таких случаях использовать опасно, поскольку они часто дают ложнонизкие показатели свободных фракций тиреоидных гормонов и, как следствие, приводят к назначению терапии без необходимости, что может ухудшить состояние пациентов [43].

Точное измерение свободных  $T_4$  и  $T_3$ , а также реверсивного  $T_3$  с использованием ультрафильтрации и ВЭЖХ-МС/МС, вероятно, позволит понять механизмы развития дисфункции щитовидной железы при синдроме нетиреоидной патологии и улучшить таким образом прогноз эутиреоидных больных.

#### Генетические аномалии связывающих белков

Семейная дисальбуминемическая гипертироксинемия проявляется значительным повышением уровней общих  $T_4$  и  $T_3$  при сохранении нормального уровня ТТГ и эутиреоидного статуса пациента. Это состояние связано с наследуемой мутацией гена альбумина, при которой повышается его аффинность к тиреоидным гормонам

[44, 45]. Для постановки данного диагноза необходимо измерение свободных фракций тиреоидных гормонов путем ультрафильтрации и определения уровня гормонов методом ВЭЖХ-МС/МС.

#### Антитела

Аутоантитела являются одним из источников потенциально ложных результатов для уровней  $T_3$  и  $T_4$  [46, 47]. Кроме того, наличие ревматоидного фактора также может привести к ошибочным результатам при определении свободных фракций тиреоидных гормонов [48].

#### Избыточная масса тела

Недостаточно изученной проблемой остается связь между ожирением и риском аутоиммунной дисфункции щитовидной железы — основной причиной гипотиреоза у взрослых. Сообщается, что распространенность аутоиммунного тиреоидита при ожирении составляет 12,4% у детей и 10–60% у взрослых [49].

Р. Marzullo и соавт. [49] обратились к интригующей гипотезе о связи между ожирением, лептином, аутоиммунностью и гипотиреозом. Исследование показало, что ожирение является фактором риска аутоиммунного заболевания щитовидной железы, тем самым устанавливая связь между основной причиной приобретенной недостаточности щитовидной железы и ожирением [49]. Таким образом, избыточная масса тела также должна быть учтена в оценке уровня ТТГ.

Метод ВЭЖХ-МС/МС дает более уверенную корреляцию между  $T_4$  и уровнем ТТГ в случае наличия у пациента жалоб, характерных для нарушений функции щитовидной железы, а также при отсутствии дисфункции щитовидной железы или предположения ложных показателей по результатам иммунного анализа.

#### Особенности подготовки материала

Выделение свободных фракций тиреоидных гормонов является ключевой задачей в анализе данных объектов. В настоящее время эта задача решается при помощи ультрафильтрации (30–40 мин) и равновесного диализа (несколько часов). Первый метод благодаря ускоренной реализации и вследствие этого возможности постановки его на поток является более предпочтительным. После подготовки материала возможно точное определение уровня свободных форм тиреоидных гормонов высокочувствительными методами, например ВЭЖХ-МС/МС [14, 50, 51]. Несмотря на то, что метод ВЭЖХ-МС/МС является наиболее селективным по сравнению с иммуноанализом, необходимо учитывать, что этап концентрирования (при равновесном диализе или ультрафильтрации) может вносить существенный вклад в точность определения за счет адсорбции анализируемых компонентов на материалах фильтров, приводя к неверной трактовке результатов количественного анализа. Обоснованность применения пробоподготовки не вызывает сомнений, несмотря на увеличение стоимости (при использовании ультрафильтрации стоимость незначительно возрастает) и времени выполнения исследования. В связи с этим необходимо соблюдение четких алгоритмов на каждом этапе определения уровня концентрации гормонов [27, 52, 53].

#### Технические особенности ВЭЖХ-МС/МС

Метод ВЭЖХ-МС/МС представляет собой сочетание высокоэффективной жидкостной хроматографии с чув-

ствительным и селективным масс-спектрометрическим детектированием. Совмещение двух технически разных приборов, первый из которых работает под повышенным давлением жидкости (до 1300 бар), а второй — под высоким вакуумом (до  $10^{-8}$  бар), происходит через источники ионизации при атмосферном давлении (химическая ионизация, фотоионизация, электрораспыление). Электрораспыление широко применяется для так называемых ионогенных соединений, которые способны находиться в растворе в виде ионных солей. За счет этого образование ионов из таких соединений происходит легче, чем для неионных веществ, что повышает общую чувствительность метода.

Тиреоидные гормоны относятся к ионогенным соединениям, в связи с чем большая часть работ по их анализу с применением метода ВЭЖХ-МС/МС была проведена на источниках ионизации посредством электрораспыления [14, 54]. Разделение компонентов происходит обычно на обращенно-фазовых аналитических колонках, детектирование осуществляется масс-спектрометром в режиме мониторинга множественных реакций. Этот режим предусматривает выбор молекулярного или псевдомолекулярного иона анализируемого соединения, его фрагментацию и детектирование наиболее интенсивного и в то же время наиболее характерного фрагментного иона. За счет этого достигается высочайшая селективность, чувствительность метода при этом определяется соотношением сигнал–шум.

Количественный анализ основан на хроматографии, поскольку площади под хроматографическими пиками пропорциональны концентрациям соответствующих веществ независимо от метода детектирования. Для разделения тиреоидных гормонов и получения качественных хроматограмм используют обращенно-фазовые хроматографические колонки, чаще всего C18. Для повышения точности анализа и учета возможных погрешностей применяется метод внутреннего стандарта, который предусматривает добавление в образец вещества, близкого по свойствам к анализируемым компонентам. Градуировка по концентрациям при этом производится в относительных координатах, то есть построением зависимости отношения площадей хроматографических пиков аналита к внутреннему стандарту от отношения их концентраций. Если во все образцы добавляется одинаковое количество внутреннего стандарта, то его концентрацию можно принять за единицу, упростив тем самым расчеты. Масс-спектрометрическое детектирование в данном случае дает уникальную возможность применять внутренние стандарты, имеющие метки стабильных изотопов (D или  $^{13}C$ ). Преимущество перед другими внутренними стандартами заключается в том, что их химические и физические свойства являются практически полностью одинаковыми с анализируемыми компонентами. Изменяется только аналитический сигнал, то есть молеку-

лярная масса, которую можно детектировать тандемным масс-спектрометром независимо от аналитов. Этот подход существенно увеличивает точность количественного анализа, выводя его на принципиально новый уровень по сравнению с любым другим аналитическим методом.

### Заключение

Измерение концентраций свободных фракций тиреоидных гормонов с помощью методов иммуноанализа (иммуноферментный и иммунохемилюминесцентный) у определенных групп пациентов, в том числе с нарушениями связывания белка, с избыточной массой тела и у беременных, является недостаточно точным. Врачи должны знать о существующих ограничениях этих методов, поскольку в настоящее время они являются наиболее используемыми в клинической практике.

Использование ВЭЖХ-МС/МС в рутинной практике кажется сомнительным вследствие высокой стоимости исследования, однако, с экономической точки зрения, само определение уровня свободных фракций тиреоидных гормонов на практике оказывается более выгодным, чем применяемые рутинные методы. В настоящее время компромиссом выглядит определение показаний по уровню ТТГ.

Кроме вышеперечисленных групп больных, пациенты с ТТГ ниже 10-го или выше 90-го перцентиля с наибольшей вероятностью имеют тиреотоксикоз и гипотиреоз и таким образом также являются претендентами для определения тиреоидных гормонов методом ВЭЖХ-МС/МС для точной постановки диагноза и оценки адекватности проводимой терапии.

### Источник финансирования

Поисково-аналитическая работа и публикация статьи осуществлены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант РНФ 17-75-30035).

### Конфликт интересов

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

### Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией.

### ЛИТЕРАТУРА

- Little AM. Local regulation of thyroid hormone signaling. *Vitam Horm.* 2018;106:1–17. doi: 10.1016/bs.vh.2017.06.004.
- Oetting A, Yen PM. New insights into thyroid hormone action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007;21(2):193–208. doi: 10.1016/j.beem.2007.04.004.
- Al-azzam SI, Alkhateeb AM, Al-Azzeh O, et al. The role of type II deiodinase polymorphisms in clinical management of hypothyroid patients treated with levothyroxine. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2013;121(05):300–305. doi: 10.1055/s-0032-1331695.
- Maia AL, Kim BW, Huang SA, et al. Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma  $T_3$  in euthyroid humans. *J Clin Invest.* 2005;115(9):2524–2533. doi: 10.1172/jci25083.
- Schussler GC. The thyroxine-binding proteins. *Thyroid.* 2000;10(2):141–149. doi: 10.1089/thy.2000.10.141.
- Mendel CM, Weisiger RA. Thyroxine uptake by perfused rat liver. No evidence for facilitation by five different thyroxine-binding proteins. *J Clin Invest.* 1990;86(6):1840–1847. doi: 10.1172/jci114914.

7. Christofides ND, Midgley JE. Inaccuracies in free thyroid hormone measurement by ultrafiltration and tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2009;55(12):2228–2229. doi: 10.1373/clinchem.2009.134593.
8. Symons RG, Wellby ML. Assay of serum free T<sub>4</sub>, free T<sub>3</sub> and free rT<sub>3</sub> by equilibration dialysis and radioimmunoassay. *Pathology.* 1979;11(2):321–322. doi: 10.1016/s0031-3025(16)39965-2.
9. Weeke J, Orskov H. Ultrasensitive radioimmunoassay for direct determination of free triiodothyronine concentration in serum. *Scand J Clin Lab Invest.* 1975;35(3):237–244. doi: 10.1080/00365517509095735.
10. Stockigt JR. Free thyroid hormone measurement. A critical appraisal. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2001;30(2):265–289. doi: 10.1016/s0889-8529(05)70187-0.
11. Baloch Z, Carayon P, Conte-Devolx B, et al. Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease. *Thyroid.* 2003;13(1):3–126. doi: 10.1089/105072503321086962.
12. Nelson JC, Wang R, Asher DT, Bruce Wilcox RB. The nature of analogue-based free thyroxine estimates. *Thyroid.* 2004;14(12):1030–1036. doi: 10.1089/thy.2004.14.1030.
13. Wilcox RB, Nelson JC. Counterpoint: legitimate and illegitimate factors of free-analyte assay function: we need to identify the factors that influence free-analyte assay results. *Clin Chem.* 2009;55(3):442–444. doi: 10.1373/clinchem.2008.120154.
14. Soldin OP, Soldin SJ. Thyroid hormone testing by tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2011;44(1):89–94. doi: 10.1016/j.clin-biochem.2010.07.020.
15. Jonklaas J, Kahric-Janjic N, Soldin OP, Soldin SJ. Correlations of free thyroid hormones measured by tandem mass spectrometry and immunoassay with thyroid-stimulating hormone across 4 patient populations. *Clin Chem.* 2009;55(7):1380–1388. doi: 10.1373/clinchem.2008.118752.
16. Hoermann R, Eckl W, Hoermann C, Larisch R. Complex relationship between free thyroxine and TSH in the regulation of thyroid function. *Eur J Endocrinol.* 2010;162(6):1123–1129. doi: 10.1530/eje-10-0106.
17. Hansen PS, Brix TH, Sorensen TI, et al. Major genetic influence on the regulation of the pituitary-thyroid axis: a study of healthy Danish twins. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(3):1181–1187. doi: 10.1210/jc.2003-031641.
18. van Deventer HE, Mendu DR, Remaley AT, Soldin SJ. Inverse log-linear relationship between thyroid-stimulating hormone and free thyroxine measured by direct analog immunoassay and tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2010;57(1):122–127. doi: 10.1373/clinchem.2010.154088.
19. Clark PM, Holder RL, Haque SM, et al. The relationship between serum TSH and free T<sub>4</sub> in older people. *J Clin Pathol.* 2012;65(5):463–465. doi: 10.1136/jclinpath-2011-200433.
20. Serdar MA, Ozgurtas T, Ispir E, et al. Comparison of relationships between FT<sub>4</sub> and log TSH in Access DXI 800 Unicel, Modular E170 and ADVIA Centaur XP Analyzer. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50(10):1849–1852. doi: 10.1515/cclm-2012-0193.
21. Fritz KS, Wilcox RB, Nelson JC. A direct free thyroxine (T<sub>4</sub>) immunoassay with the characteristics of a total T<sub>4</sub> immunoassay. *Clin Chem.* 2007;53(5):911–915. doi: 10.1373/clinchem.2006.083915.
22. Loh TP, Kao SL, Halsall DJ, et al. Macro-thyrotropin: a case report and review of literature *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(6):1823–1828. doi: 10.1210/jc.2011-3490.
23. Soukhova N, Soldin OP, Soldin SJ. Isotope dilution tandem mass spectrometric method for T<sub>4</sub>/T<sub>3</sub>. *Clin Chim Acta.* 2004;343(1–2):185–190. doi: 10.1016/j.cccn.2004.01.007.
24. Jonklaas J, Davidson B, Bhagat S, Soldin SJ. Triiodothyronine levels in athyreotic individuals during levothyroxine therapy. *JAMA.* 2008;299(7):769–777. doi: 10.1001/jama.299.7.769.
25. Midgley JE. Spurious conclusions on analog free thyroxine assay performance. *Clin Chem.* 2007;53(9):1714–1714. doi: 10.1373/clinchem.2007.090878.
26. Sapin R, d'Herbomez M. Free thyroxine measured by equilibrium dialysis and nine immunoassays in sera with various serum thyroxine-binding capacities. *Clin Chem.* 2003;49(9):1531–1535. doi: 10.1373/49.9.1531.
27. Wang R, Nelson JC, Weiss RM, Wilcox RB. Accuracy of free thyroxine measurements across natural ranges of thyroxine binding to serum proteins. *Thyroid.* 2000;10(1):31–39. doi: 10.1089/thy.2000.10.31.
28. Christofides ND, Wilkinson E, Stoddart M, et al. Serum thyroxine binding capacity-dependent bias in an automated free thyroxine assay. *J Immunoassay.* 1999;20(4):201–221. doi: 10.1080/01971529909349351.
29. Vaidya B, Anthony S, Bilous M, et al. Detection of thyroid dysfunction in early pregnancy: universal screening or targeted high-risk case finding? *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(1):203–207. doi: 10.1210/jc.2006-1748.
30. Utiger R. Maternal hypothyroidism and fetal development. *N Engl J Med.* 1999;341(8):601–602. doi: 10.1056/nejm199908193410809.
31. Escobar G, Obregón M, Rey F. Maternal thyroid hormones early in pregnancy and fetal brain development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2004;18(2):225–248. doi: 10.1016/j.beem.2004.03.012.
32. Lazarus JH, Premawardhana LD. Screening for thyroid disease in pregnancy. *J Clin Pathol.* 2005;58(5):449–452. doi: 10.1136/jcp.2004.021881.
33. Pop VJ, Brouwers EP, Vader HL, et al. Maternal hypothyroxinaemia during early pregnancy and subsequent child development: a 3-year follow-up study. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003;59(3):282–288. doi: 10.1046/j.1365-2265.2003.01822.x.
34. Li Y, Shan Z, Teng W, et al. Abnormalities of maternal thyroid function during pregnancy affect neuropsychological development of their children at 25–30 months. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;72(6):825–829. doi: 10.1111/j.1365-2265.2009.03743.x.
35. Casey B, Dashe J, Wells C, et al. Subclinical hypothyroidism and pregnancy outcomes. *Obstet Gynecol.* 2005;105(2):239–245. doi: 10.1097/01.aog.0000152345.99421.22.
36. Leung AS, Millar LK, Koonings PP, et al. Perinatal outcome in hypothyroid pregnancies. *Int J Gynaecol Obstet.* 1993;43(2):230–230. doi: 10.1016/0020-7292(93)90343-u.
37. Lee RH, Spencer CA, Mestman JH, et al. Free T<sub>4</sub> immunoassays are flawed during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2009;200(3):260.e1–260.e6. doi: 10.1016/j.ajog.2008.10.042.
38. Huang SA, Dorfman DM, Genest DR, et al. Type 3 iodothyronine deiodinase is highly expressed in the human uteroplacental unit and in fetal epithelium. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(3):1384–1388. doi: 10.1210/jc.2002-021291.
39. Soldin O, Hilakivi-Clarke L, Weiderpass E, Soldin S. Trimester-specific reference intervals for thyroxine and triiodothyronine in pregnancy in iodine-sufficient women using isotope dilution tandem mass spectrometry and immunoassays. *Clin Chim Acta.* 2004;349(1–2):181–189. doi: 10.1016/j.cccn.2004.06.021.
40. Soldin O, Tractenberg R, Soldin S. Differences between measurements of T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> in pregnant and nonpregnant women using isotope dilution tandem mass spectrometry and immunoassays: are there clinical implications? *Clin Chim Acta.* 2004;347(1–2):61–69. doi: 10.1016/j.cccn.2004.03.033.
41. Lim VS. Thyroid function in patients with chronic renal failure. *Am J Kidney Dis.* 2001;38(4 Suppl 1):S80–S84. doi: 10.1053/ajkd.2001.27410.
42. Kaptein E, Macintyre S, Weiner J, et al. Free thyroxine estimates in nonthyroidal illness: comparison of eight methods. *J Clin Endocrinol Metab.* 1981;52(6):1073–1077. doi: 10.1210/jcem-52-6-1073.
43. Ross HA, de Rijke YB, Sweep FC. Spuriously high free thyroxine values in familial dysalbuminemic hyperthy-

- roxinemia. *Clin Chem*. 2010;57(3):524–525. doi: 10.1373/clinchem.2010.158170.
44. Cartwright D, O'Shea P, Rajanayagam O, et al. Familial dysalbuminemic hyperthyroxinemia: a persistent diagnostic challenge. *Clin Chem*. 2009;55(5):1044–1046. doi: 10.1373/clinchem.2008.120303.
45. Martel J, Després N, Ahnadi C, et al. Comparative multicentre study of a panel of thyroid tests using different automated immunoassay platforms and specimens at high risk of antibody interference. *Clin Chem Lab Med*. 2000;38(8):785–793. doi: 10.1515/cclm.2000.112.
46. Sakata S. Autoantibodies against thyroid hormones or lodothyronine. *Ann Intern Med*. 1985;103(4):579–589. doi: 10.7326/0003-4819-103-4-579.
47. Sapin R. Serum thyroxine binding capacity-dependent bias in five free thyroxine immunoassays: assessment with serum dilution experiments and impact on diagnostic performance. *Clin Biochem*. 2001;34(5):367–371. doi: 10.1016/s0009-9120(01)00241-7.
48. Rotondi M, Leporati P, La Manna A, et al. Raised serum TSH levels in patients with morbid obesity: is it enough to diagnose subclinical hypothyroidism? *Eur J Endocrinol*. 2008;160(3):403–408. doi: 10.1530/eje-08-0734.
49. Marzullo P, Minocci A, Tagliaferri MA, et al. Investigations of thyroid hormones and antibodies in obesity: leptin levels are associated with thyroid autoimmunity independent of bioanthropometric, hormonal, and weight-related determinants. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(8):3965–3972. doi: 10.1210/jc.2009-2798.
50. Holm SS, Hansen SH, Faber J, Staun-Olsen P. Reference methods for the measurement of free thyroid hormones in blood. *Clin Biochem*. 2004;37(2):85–93. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2003.09.009.
51. Gu J, Soldin OP, Soldin SJ. Simultaneous quantification of free triiodothyronine and free thyroxine by isotope dilution tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*. 2007;40(18):1386–1391. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2007.08.007.
52. Tikanoja S. Ultrafiltration devices tested for use in a free thyroxine assay validated by comparison with equilibrium dialysis. *Scand J Clin Lab Invest*. 1990;50(6):663–669. doi: 10.3109/00365519009089185.
53. Langton JE, Brent GA. Nonthyroidal illness syndrome: evaluation of thyroid function in sick patients. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2002;31(1):159–172. doi: 10.1016/s0889-8529(01)00008-1.
54. Gounden V, Jonklaas J, Soldin S. A pilot study: subclinical hypothyroidism and free thyroid hormone measurement by immunoassay and mass spectrometry. *Clin Chim Acta*. 2014;430:121–124. doi: 10.1016/j.cca.2013.12.034.

## КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

\**Михина Маргарита Сергеевна* [Margarita S. Mikhina, MD];

Адрес: 117036, Москва, ул. Дмитрия Ульянова, д. 11 [address: 11 Dm. Ulyanova street, 117036 Moscow, Russia],

e-mail: docmikhina@mail.ru, SPIN-код: 3172-5538, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4382-0514>

*Иютси Виталий Алексеевич*, к.х.н. [Vitaliy A. Ioutsi, PhD];

e-mail: vitalik\_org@mail.ru, SPIN-код: 9734-0997, ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-9002-1662>

*Трошина Екатерина Анатольевна*, д.м.н., профессор, член-корр. РАН [Ekaterina A. Troshina, MD, PhD, Professor];

e-mail: troshina@inbox.ru, SPIN-код: 8821-8990, ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-8520-8702>