

Analiza podataka o utjecaju fizičke aktivnosti na određivanje prolaktina

Drenški, Valentina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:921739>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Valentina Drenški

**Analiza podataka o utjecaju fizičke aktivnosti na
određivanje prolaktina**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Imunokemija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju i u Endokrinološkom laboratoriju KBC-a Sestre milosrdnice u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Anite Somborac Bačura i dr. sc. Domagoja Marijančevića.

Zahvaljujem svojim dragim mentorima doc. dr. sc. Aniti Somborac Bačura i dr. sc. Domagoju Marijančeviću na stručnom vodstvu, savjetima i uloženom trudu tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala Vam na ukazanom povjerenju i strpljenju!

Hvala mojim curkama na nikad uskraćenoj podršci i pomoći te na svim zajedničkim usponima i padovima. Hvala što ste mi uljepšale studiranje!

Najveća hvala mojoj cijeloj obitelji, posebno roditeljima, bratu Josipu i dečku Danijelu. Hvala što ste uvijek vjerovali u mene, hvala na neizmjernej motivaciji, potpori i prvenstveno razumijevanju i hvala na svemu što se riječima ne može opisati. Svaki vaš savjet vodio je bliže ovom cilju i bez vas ovo ne bi bilo moguće!

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. PROLAKTIN	1
1.1.1. Uloga i biokemijska obilježja prolaktina	1
1.1.2. Sekrecija prolaktina	3
1.1.2.1. Regulatorni faktori	3
1.1.2.2. Cirkadijalni ritam	3
1.2. HIPERPROLAKTINEMIJA	4
1.2.1. Epidemiološke značajke	4
1.2.2. Uzroci	4
1.2.3. Klinička slika	6
1.2.4. Laboratorijska dijagnostika	7
1.2.5. Interpretacija i dijagnostički značaj	8
1.3. PREDANALITIČKE ZNAČAJKE KOD ODREĐIVANJA PROLAKTINA	9
1.3.1. Mehanizam utjecaja fizičke aktivnosti na koncentraciju prolaktina	9
1.3.2. Ostali predanalitički čimbenici koji utječu na koncentraciju prolaktina	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. ISPITANICI	12
3.2. UZORKOVANJE	12
3.3. ODREĐIVANJE PROLAKTINA	13
3.3.1. Reagensi.....	13
3.3.2. Načelo i postupak	13
3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	15
4. REZULTATI	16

5. RASPRAVA	21
6. ZAKLJUČCI.....	24
7. LITERATURA	25
8. SAŽETAK/ SUMMARY	28
8.1. SAŽETAK.....	28
8.2. SUMMARY	29
9. PRILOZI.....	30
9.1. POPIS KRATICA.....	30
10. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD ..	31

1. UVOD

1.1. PROLAKTIN

1.1.1. Uloga i biokemijska obilježja prolaktina

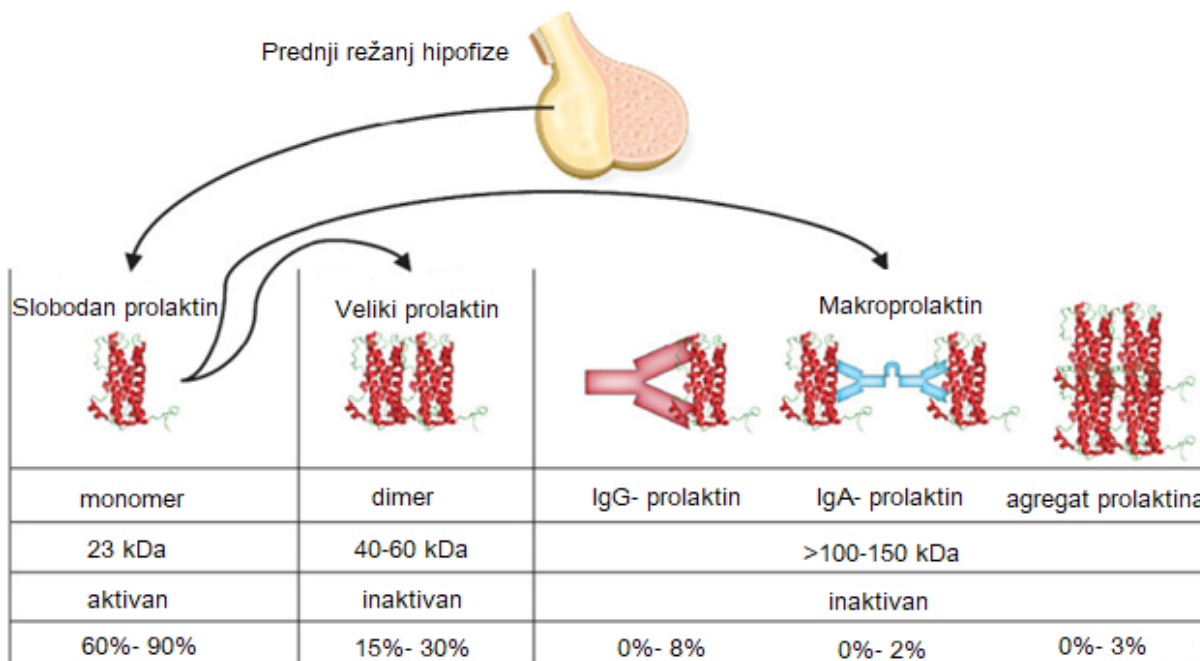
Prolaktin je polipeptidni hormon od 23 kDa koji se sastoji od 199 aminokiselina tvoreći jednostruki polipeptidni lanac s tri intramolekularne disulfidne veze. Sintetizira se u prednjem režnju hipofize i prvenstveno je identificiran kao glavni stimulirajući faktor za započinjanje i održavanje laktacije u postporođajnom razdoblju. Međutim, utječe i na druge aspekte homeostaze uključujući osmoregulaciju, metabolizam te regulaciju imunološkog i središnjeg živčanog sustava (Ignacak i sur., 2012). Pretpostavlja se da sudjeluje u više od 300 različitih bioloških djelovanja (Rojas Vega i sur., 2011).

Prolaktin (PRL) uglavnom luče laktotrofi, stanice koje čine 20-50 % prednjih stanica hipofize, no postoje i mnogi ekstrapituitarni izvori PRL-a kao što su limfociti, kožni fibroblasti, mozak, dojke, prostata i stanice masnog tkiva. Gen za prolaktin nalazi se na kromosomu 6, a sastoji se od 5 egzona i 5 introna. Nakon sinteze prolaktin može podlijegati raznim posttranslacijskim modifikacijama koje smanjuju njegovu biološku aktivnost ili procesu alternativnog spajanja mRNA zbog čega nastaju specifični oblici PRL-a s različitim ulogama. Tako, na primjer, djelovanjem proteaze slične katepsinu D nastaje fragment prolaktina od 16 kDa koji ima puno manji afinitet vezanja za klasični PRL receptor nego nativni oblik prolaktina, koji inhibira proliferaciju i migraciju endotelnih stanica, inhibira rast tumora te ima antiangiogeni učinak. Djelovanjem kalikreina nastaje fragment prolaktina od 22 kDa, no njegova uloga još nije otkrivena (Ignacak i sur., 2012).

PRL koji nalazimo u cirkulaciji i hipofizi postoji u više molekularnih oblika kao rezultat proteolitičkog cijepanja, glikozilacije, fosforilacije, deamidacije i agregacije (**Slika 1**). Različiti molekularni oblici imaju različitu imunoreaktivnost i biološku aktivnost (Štraus i Plavšić, 2009). Uz monomerni prolaktin od 23 kDa, u cirkulaciji su prisutna još dva glavna oblika: "veliki prolaktin" i "veliki-veliki prolaktin" (makroprolaktin). Veliki prolaktin je dimer monomernog oblika, a veliki-veliki prolaktin je kompleks velike molekulske mase (> 150 kDa) koji je građen od monomernog PRL-a i imunoglobulina G (IgG). Ovi oblici imaju minimalnu biološku aktivnost (Saleem i sur., 2018). Prisutnost makroprolaktina povisuje ukupnu koncentraciju

prolaktina, a neprepoznavanje makroprolaktina može dovesti do neodgovarajuće dijagnoze hiperprolaktinemije (Winter i sur., 2018).

Prolaktinski receptor (PRLR) pripada klasi I superobitelji hematopoetskih citokinskih receptora. Sastoji se od izvanstanične domene, jedne transmembranske domene i unutarstanične domene koja prenosi signal (Saleem i sur., 2018). Može se pronaći u tkivima kao što su mliječna žlijezda, spolne žlijezde, jetra, bubreg, nadbubrežna žlijezda, mozak, srce, pluća, hipofiza, maternica, skeletni mišići, koža i stanice imunološkog sustava. Gen za PRLR nalazi se na kromosomu 5 i sastoji se od 11 egzona. Opisano je nekoliko izoformi PRLR-a koje su rezultat alternativnog spajanja i proteolitičkog cijepanja, a imaju različite unutarstanične domene i određene razlike u funkciji. Stimulacija PRL receptora uključuje velik broj puteva prijenosa signala kao na primjer JAK2/STAT, MAPK, c-src i kaskadu Fyn kinaze, a ti se putevi u različitim tkivima mogu razlikovati. Vezanjem prolaktina dolazi do dimerizacije prolaktinskog receptora i aktivacije JAK/STAT signalnog puta te drugih puteva čime se inducira sinteza proteina uključenih u staničnu proliferaciju i diferencijaciju te brojnih drugih (Ignacak i sur., 2012). Uz prolaktin humani PRLR također može vezati placentni laktogen i hormon rasta (Saleem i sur., 2018).



Slika 1. Različiti oblici prolaktina (preuzeto i prilagođeno iz Saleem i sur., 2018)

1.1.2. Sekrecija prolaktina

1.1.2.1. Regulatorni faktori

Glavna kontrola sinteze i sekrecije prolaktina temelji se na inhibitornom učinku dopamina podrijetlom iz hipotalamusa. Dopamin se prenosi aksonima do živčanih završetaka gdje se oslobađa u hipofiznu portalnu cirkulaciju (Serri i sur., 2003). To mu omogućuje da dođe do prednjeg režnja hipofize i inhibira oslobađanje prolaktina vezanjem na D2 receptor laktotropnih stanica (Ignacak i sur., 2012).

Lučenje prolaktina regulirano je djelovanjem različitih stimulativnih i inhibitornih faktora. S obzirom da je dopamin glavni inhibitorni faktor sekrecije prolaktina, molekule koje potiču sintezu i otpuštanje dopamina klasificiraju se kao faktori inhibicije prolaktina (PIF-ovi) (Rojas Vega i sur., 2011). Navedenoj grupi pripadaju prolaktin, noradrenalin, gama-aminomaslačna kiselina, histamin, somatostatin, kolekistokinin, oreksin-A, dušikov oksid i dr. Suprotni učinak imaju faktori otpuštanja prolaktina (PRF-ovi) kao što su hormon koji oslobađa tireotropin (TRH), vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP), angiotenzin II, estradiol, endogeni opioidi, ali i serotonin, vazopresin (antidiuretski hormon), neurotenzin, supstanca P, oksitocin, neuropeptid Y i kalcitonin (Ignacak i sur., 2012).

1.1.2.2. Cirkadijalni ritam

Poznato je da koncentracija prolaktina u krvi oscilira tijekom 24 sata jer se prolaktin luči epizodno. U normalnim uvjetima koncentracija je minimalna oko podneva (2-3 sata nakon buđenja), povećava se tijekom popodneva, a najviša je tijekom noći i u ranim jutarnjim satima potvrđujući utjecaj sna na sekreciju PRL-a. Brojnim istraživanjima dokazana je povezanost između početka sna i povećanja koncentracije PRL-a. Odogodom sna odgađa se i povećanje koncentracije (Spiegel i sur., 1994). Koncentracija PRL-a veća je kod žena u odnosu na muškarce, a tijekom ovulacije se još značajnije povećava (Ignacak i sur., 2012). Kod zdravih muškaraca dnevno se bilježi otprilike 14 impulsa sekrecije PRL-a s prosječnim interpulsnim intervalom od 95 minuta. Dakle, kod određivanja PRL-a treba uzeti u obzir činjenicu da izmjerena koncentracija ovisi o vremenu uzimanja krvi, a referentni intervali razlikuju se s obzirom na spol (Rojas Vega i sur., 2011).

1.2. HIPERPROLAKTINEMIJA

1.2.1. Epidemiološke značajke

Pod patološkom hiperprolaktinemijom podrazumijevamo trajno povišenu koncentraciju serumskog prolaktina uz odsutnost trudnoće i laktacije. Hiperprolaktinemija se javlja i kod muškaraca, ali mnogo rjeđe (Vrhovac i sur., 2008). Istraživanja pokazuju da je u općoj populaciji zastupljena kod 10 % ljudi. U praksi, sve žene s dijagnozom oligomenoreje, amenoreje, galaktoreje ili neplodnosti, a muškarci s hipogonadizmom, impotencijom ili neplodnosti moraju redovito pratiti koncentraciju prolaktina u krvi jer imaju povišen rizik za hiperprolaktinemiju (Serri i sur., 2003).

Prevalenciju hiperprolaktinemije teško je utvrditi zbog nespecifične prirode simptoma i zbog toga što nisu svi bolesnici simptomatski i ne podvrgavaju se svi bolesnici određivanju prolaktina (Saleem i sur., 2018). Zabilježene prevalencije variraju od 0,4 % kod neselektirane zdrave odrasle populacije u Japanu do 5 % kod populacije u klinikama za planiranje obitelji. Udio je još veći kod pacijenata sa specifičnim simptomima hiperprolaktinemije. Procjene pokazuju da hiperprolaktinemiju ima 9 % žena s amenorejom, 25 % žena s galaktorejom i 70 % žena s amenorejom i galaktorejom. Kod muškaraca s dijagnozom impotencije ili neplodnosti prevalencija iznosi oko 5 % (Serri i sur., 2003). Jasna je rodna predispozicija za hiperprolaktinemiju, a žene su pogođene šest puta češće od muškaraca (www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com).

1.2.2. Uzroci

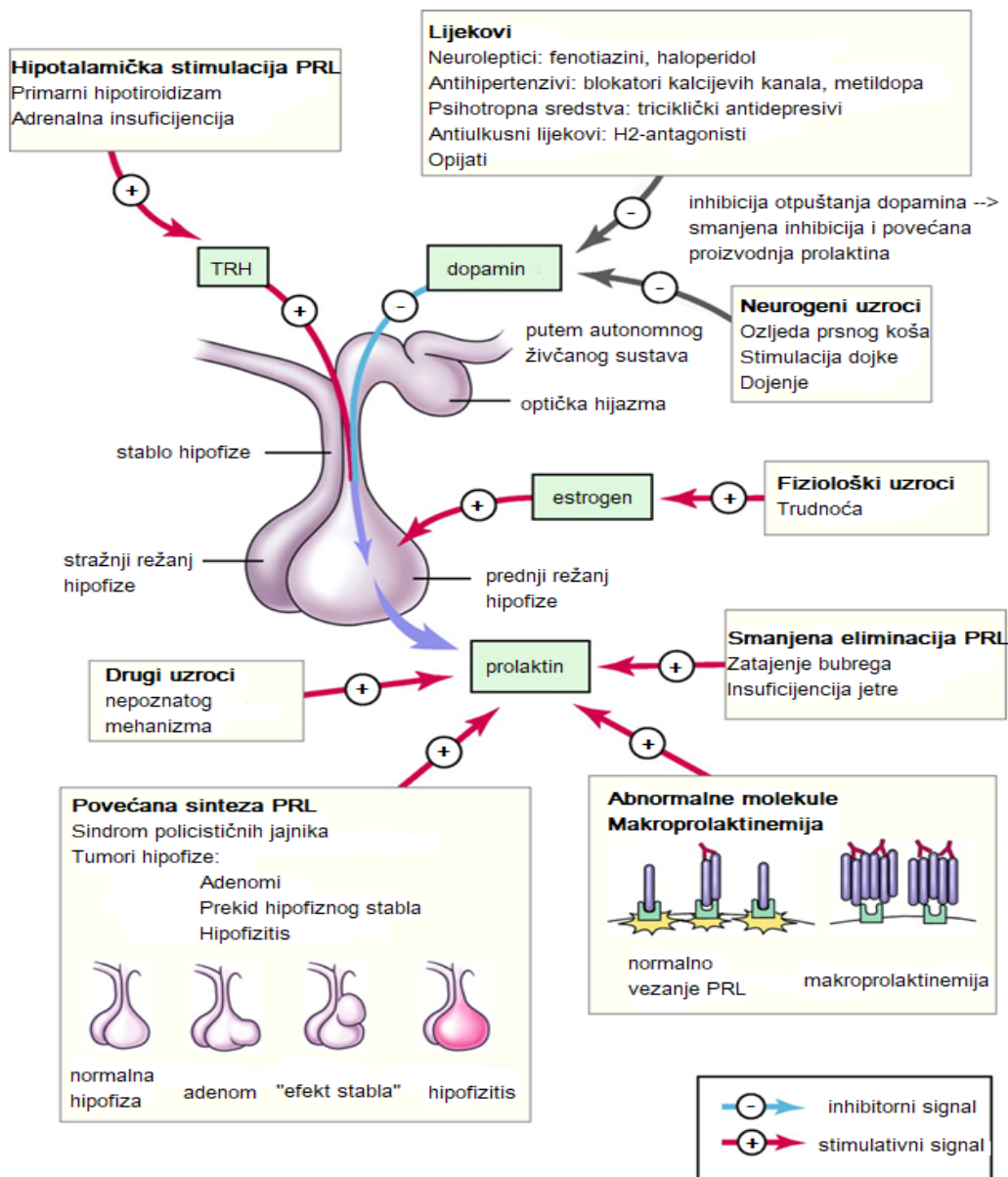
Hiperprolaktinemija je najčešći endokrini poremećaj hipotalamo-hipofizne osi (Lacković i Bach-Rojecky, 2010). S obzirom na etiopatogenezu, hiperprolaktinemiju možemo podijeliti na funkcionalnu i organsku (Ignacak i sur., 2012). Funkcionalna se još dodatno dijeli na fiziološku i farmakološku (**Slika 2**).

Primjer fiziološke hiperprolaktinemije je izrazito povećanje prolaktina zabilježeno u trudnoći i tijekom dojenja. Povećane koncentracije mogu se javiti i kod dijeta s visokim udjelom proteina, uslijed stresa (uključujući venepunkciju), tjelesnog napora, hipoglikemije ili spolnog odnosa, a koncentracija prolaktina u tim je situacijama obično niža od 1000 mIU/L. Uobičajena je farmakološka hiperprolaktinemija uslijed primjene terapijskih lijekova koji inhibiraju

izlučivanje dopamina ili njegovo djelovanje u hipofizi; mogu se primijetiti povećanja do deset puta veća u odnosu na početne koncentracije. Neki od lijekova za koje je poznato da uzrokuju hiperprolaktinemiju uključuju prvu i drugu generaciju antipsihotika, antidepresive, antihipertenzive, opioidne analgetike i dr (Saleem i sur., 2018).

Organska/patološka hiperprolaktinemija uglavnom je posljedica adenoma hipofize ili ne-hipofiznih tumora te infiltrativnih stanja kao što su sarkoidoza, vaskularne malformacije i metastaze na hipofizi. Prolaktinomi su najčešći organski uzrok viška prolaktina i najčešći tumori hipofize koji luče hormone. Oni predstavljaju približno 40 % svih tumora hipofize s procijenjenom prevalencijom od 100 na 1 milijun osoba u populaciji. Uglavnom se dijagnosticiraju kod žena u dobi od 20 do 40 godina (Saleem i sur., 2018).

Moguća je također i idiopatska hiperprolaktinemija za koju se dijagnoza postavlja u slučajevima kada se ne može otkriti uzrok povišene koncentracije prolaktina u krvi. Kod većine takvih pacijenata ne radi se o pravoj hiperprolaktinemiji, tj. nije povišena koncentracija monomernog prolaktina u krvi već je povišen makroprolaktin (Kasum i sur., 2017). Makroprolaktinemija je prisutna kod 3,7 % opće populacije i kod 10-25 % bolesnika s povišenim koncentracijama prolaktina (Saleem i sur., 2018).



Slika 2. Uzroci hiperprolaktinemije (preuzeto i prilagođeno iz Serri i sur., 2003)

1.2.3. Klinička slika

Budući da su fiziološki inhibicijski mehanizmi koji kontroliraju lučenje PRL-a regulirani na razini hipotalamusa, stanje hipoprolaktinemije gotovo ne postoji. Nasuprot tome, hiperprolaktinemija je vrlo čest uzrok amenoreje i drugih menstrualnih poremećaja, neplodnosti, kao i galaktoreje izvan razdoblja laktacije (Topić i sur., 2004).

Iako je hiperprolaktinemija povezana s hipogonadotropnim hipogonadizmom kod oba spola, kliničke manifestacije hiperprolaktinemije su varijabilne i razlikuju se između žena i muškaraca (Saleem i sur., 2018). Kod žena klinički znakovi hiperprolaktinemije prvenstveno su povezani s reprodukcijom i uključuju: cikluse bez ovulacije (uzrokovane inhibicijom luteinizirajućeg hormona i pulsirajućim lučenjem folikulostimulirajućeg hormona), oligomenoreju i amenoreju, neplodnost, galaktoreju, hirsutizam, sklonost ka anksioznosti i depresiju. Osteoporoza ili osteopenija nastaju zbog smanjenja lučenja estrogena, a kao posljedica hipogonadizma javlja se progresivna ateroskleroza. S druge strane, kod muškaraca simptomi hiperprolaktinemije su suptilni i zato se često dijagnosticiraju tek u poodmakloj fazi. Uključuju gubitak libida, impotenciju, neplodnost, galaktoreju, aterosklerozu, osteoporozu/osteopeniju te sklonost tjeskobi i depresiji što su uobičajene posljedice hipogonadizma (Ignacak i sur., 2012). Hiperprolaktinemija uzrokovana makroadenomom hipofize popraćena je oštećenjima vidnog polja i glavoboljama izazvanim povišenim intrakranijalnim tlakom (Saleem i sur., 2018).

1.2.4. Laboratorijska dijagnostika

Prvi korak u dijagnozi i procjeni hiperprolaktinemije je detaljno proučavanje povijesti bolesti kao i mogućih uzroka hiperprolaktinemije, uključujući lijekove, prisutne bolesti i čimbenike životnog stila. Klinički pregled usmjeren je na procjenu znakova hipotireoze, hipogonadizma, zatajenja bubrega i oštećenja vidnog polja. Također je potrebno isključiti trudnoću i moguće endokrinopatije (Saleem i sur., 2018).

Dijagnoza hiperprolaktinemije postavlja se na temelju ponovljenog nalaza s povišenom koncentracijom prolaktina u krvi. Uzorke krvi treba uzimati ujutro, natašte, u ugodnom okruženju nakon dobrog sna, najmanje 2-3 sata nakon buđenja jer uzorci prikupljeni ranije mogu pokazivati vršne koncentracije izazvane spavanjem (Ignacak i sur., 2012).

Eliminacija moguće prisutnosti makroprolaktina i ispitivanje mogućnosti utjecaja prozonskog učinka važne su točke u dijagnostičkom pristupu. Laboratorijske metode za određivanje monomernog prolaktina istovremeno mjere i makroprolaktin, zbog čega prisutnost makroprolaktina koja nije ustanovljena može dovesti do pogrešne dijagnoze hiperprolaktinemije. Kod sumnje na prisustvo makroprolaktina isti uzorak treba obraditi metodom taloženja s polietilen-glikolom (Ignacak i sur., 2012). Prozonski učinak (engl. *hook-effect*) je fenomen koji

se javlja kod imunokemijskih metoda kada su koncentracije određivanog analita jako visoke. Tada u reakciji ostaje suvišak analita koji nisu stvorili kompleks s antitijelima i kao posljedica toga dolazi do lažno snižene koncentracije određivanog analita, u ovom slučaju prolaktina. Problem se dokazuje serijskim razrjeđivanjem uzorka u omjeru 1:100 potom ponovljenim određivanjem prolaktina (www.uptodate.com.; www.researchgate.net).

Nakon konačne laboratorijske potvrde hiperprolaktinemije potrebno je snimanje magnetskom rezonancom ili kompjutoriziranom tomografijom (CT) kako bi se utvrdila prisutnost lezije koja odgovara tumoru hipofize (Saleem i sur., 2018).

1.2.5. Interpretacija i dijagnostički značaj

Hiperprolaktinemija je potencijalni uzrok oligomenoreje, amenoreje, galaktoreje i neplodnosti kod žena te hipogonadizma i erektilne disfunkcije kod muškaraca, stoga prolaktin treba određivati redovito kod svih osoba koje imaju neke od ovih simptoma (www.uptodate.com).

Određivanje koncentracije prolaktina u krvi ima najveći značaj u dijagnostici prolaktinoma jer postoji relativno linearna veza između stupnja povišenja prolaktina i veličine prolaktinoma (Serri i sur., 2003). Najprije je potrebno isključiti druge moguće uzroke hiperprolaktinemije te slikovnim metodama (MR ili CT) utvrditi prisutnost tumora hipofize. U slučaju hiperprolaktinemije bez kliničkih simptoma ili kod sumnje na hiperprolaktinemiju uzrokovanu stresom preporučuje se višekratno ponoviti određivanje prolaktina uzorkovanjem primjenom kanile iz antekubitalne vene (Whyte i sur., 2015).

Povišene koncentracije prolaktina u serumu do 1000 mIU/L obično se manifestiraju kroz blaže simptome (smanjen libido, smanjena plodnost), koncentracije od 1000-2000 mIU/L prati oligomenoreja, a koncentracije iznad 2000 mIU/L amenoreja, hipogonadizam i galaktoreja (Basić, 2019).

Ciljevi liječenja hiperprolaktinemije su obnavljanje i održavanje normalne funkcije/plodnosti spolnih žlijezda i prevencija osteoporoze, a uspješnost ovisi o otklanjanju temeljnog uzroka. Kao najčešća i najuspješnija terapija koriste se agonisti dopamina koji dovode do biokemijskih i kliničkih poboljšanja (Samperi i sur., 2019).

1.3. PREDANALITIČKE ZNAČAJKE KOD ODREĐIVANJA PROLAKTINA

1.3.1. Mehanizam utjecaja fizičke aktivnosti na koncentraciju prolaktina

Dobro razumijevanje izvora predanalitičkih varijacija kod laboratorijskih testiranja vrlo je važno za pouzdano tumačenje rezultata. Taj aspekt postaje posebno važan u određenim okolnostima kao što su određivanje koncentracije hormona kod fizički aktivnih osoba, kada niz različitih metaboličkih prilagodbi izazvanih fizičkom aktivnošću može uzrokovati značajne varijacije hormonskog profila. Iako je opće prihvaćeno da fizička aktivnost, ovisno o njenom intenzitetu, trajanju i tjelesnoj kondiciji osobe, ima čitav niz heterogenih učinaka na reproduktivnu funkciju, objavljeno je dosta proturječnih podataka o utjecaju redovite tjelovježbe na bazalnu koncentraciju prolaktina kod fizički aktivnih osoba (Lippi i sur., 2009).

Učinak fizičke aktivnosti na izlučivanje PRL-a može odražavati djelovanje različitih neurona na aktivnost osi hipotalamus-hipofiza. Endokrini sustav je nevjerojatno sofisticirani sustav kontrole. Kada naše tijelo izložimo jačoj fizičkoj aktivnosti, hipotalamus se aktivira kako bi oslobodio hormon koji oslobađa tireotropin koji zauzvrat potiče hipofizu na lučenje dva hormona: tireostimulirajući hormon (TSH) i prolaktin. Prema većini istraživanja fizička aktivnost naglo povećava koncentraciju prolaktina koja se unutar 12 do 24 sata vraća na razinu bazalnih (normalnih) koncentracija. Akutna reakcija na fizičku aktivnost izaziva fizički oblik stresa, zbog čega dolazi do ubrzanog pulsa i hipoksije koji mogu povećati koncentraciju prolaktina. Povećanje koncentracije tijekom vježbanja može se uočiti kroz nekoliko mehanizama kao što su smanjen protok krvi u jetri i bubrezima, povećanje tjelesne temperature, povećanje koncentracije laktata i hipoksija (Tworoger i sur., 2007). Temeljni biološki putevi za ove mehanizme su nejasni, no pretpostavka je da su učinci fizičke aktivnosti na PRL vjerojatno posredovani oslobađanjem PRF-a (engl. *prolactin releasing factor*). Također je dokazana povećana sinteza i metabolizam dopamina tijekom i nakon fizičke aktivnosti sugerirajući da su PRF-ovi odgovorni za trenutno oslobađanje PRL-a. Dakle, pretpostavlja se da učinak PRF-ova nadjačava snažni inhibicijski učinak dopamina. Međutim, nije poznato koji oblik PRF-ova prevladava u regulaciji lučenja PRL-a tijekom fizičke aktivnosti (Rojas Vega i sur., 2011).

Osim trenutnih učinaka fizičke aktivnosti malo je podataka dostupno o dugoročnom utjecaju redovitog vježbanja na bazalnu koncentraciju prolaktina, ali se pretpostavlja da dugotrajna tjelovježba može dovesti do adaptivnih promjena u koncentraciji (Lippi i sur., 2009).

1.3.2. Ostali predanalitički čimbenici koji utječu na koncentraciju prolaktina

Na koncentraciju PRL-a utječe i dio dana kad je uzeta krv za analizu, a svaka stresna situacija (venepunkcija, ginekološki pregled, pregled dojke) može dodatno pojačati izlučivanje PRL-a iz hipofize (Topić i sur., 2004). PRL se otpušta u cirkadijalnom ritmu zbog kojeg mu je koncentracija najviša noću tijekom spavanja i neposredno nakon buđenja. Stoga vađenje krvi za određivanje prolaktina treba obaviti između 8 i 10 sati ujutro, nekoliko sati nakon buđenja (barem dva) uz prethodno mirovanje od 30 minuta (Županić i sur., 2013).

Koncentracija prolaktina može se povisiti tijekom psihičkog i emocionalnog stresa te nakon uzimanja različitih lijekova (Basić, 2019). Prolazno povećanje koncentracije može se zamijetiti oko ovulacije, tj. manje promjene u izlučivanju događaju se i kod zdravih žena. U normalnom menstrualnom ciklusu nije klinički značajan utjecaj ovakvih promjena koncentracije PRL-a, no u slučajevima izostanka mjesečnice potrebna je opsežnija dijagnostička obrada (Topić i sur., 2004).

Postoje određene razlike u koncentraciji prolaktina u serumu ovisno o spolu, dobi i indeksu tjelesne mase. Niža je kod muškaraca nego kod žena. Kod žena u premenopauzi ovisi i o fazi menstrualnog ciklusa, viša je u drugoj polovici ciklusa (Basić, 2019).

Trenutno je točnost određivanja prolaktina otežana nedostatkom komutabilnog primarnog referentnog standarda prema kojem su umjerene sve korištene metode, kao i heterogenom specifičnosti antitijela u prepoznavanju različitih izoformi prolaktina. Također, svi rutinski testovi do neke mjere otkrivaju makroprolaktin, a laboratorijska praksa otkrivanja i izvještavanja o makroprolaktinu još nije u potpunosti usklađena (Saleem i sur., 2018).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Prolaktin je polipeptidni hormon koji se sastoji od 199 aminokiselina te ima molekularnu masu od približno 23 kDa. Sintetizira se u prednjem režnju hipofize, a izlučuje epizodno. U serumu se pojavljuje u tri različita oblika među kojima prevladava biološki i imunološki aktivni monomerni („mali“) oblik. Prolaktin sudjeluje u više od 300 različitih bioloških djelovanja, a najznačajniji je u poticanju i održavanju laktacije u postporođajnom razdoblju. Stanje povišene koncentracije prolaktina u krvi karakterizirano koncentracijom prolaktina iznad gornje granice referentnog intervala naziva se hiperprolaktinemija. Navedeno stanje je čest uzrok poremećaja plodnosti kod muškaraca i žena. Određivanje prolaktina koristi se za postavljanje dijagnoze hiperprolaktinemije i peritonealne endometrioze, no treba imati na umu da na koncentraciju prolaktina utječu brojni predanalitički čimbenici kao što su cirkadijalni ritam (koncentracija prolaktina je najviša tijekom noći i neposredno nakon buđenja), stres, dojenje, fizička aktivnost te lijekovi (antipsihotici, estrogeni, triciklički antidepresivi). Prema većini istraživanja fizička aktivnost naglo povećava koncentraciju prolaktina, stoga se vađenje krvi za određivanje prolaktina u laboratoriju treba obaviti između 8 i 10 sati ujutro, nekoliko sati nakon buđenja (barem dva) uz prethodno mirovanje od 30 minuta.

Cilj ovog rada bio je ispitati postoji li statistički značajna razlika u koncentraciji prolaktina neposredno nakon fizičke aktivnosti u odnosu na koncentraciju prolaktina nakon 20 i 30 minutnog mirovanja. Također je cilj bio utvrditi značajnost razlike u ponovljenim mjerenjima koncentracije prolaktina nakon 20 minutnog mirovanja u odnosu na koncentraciju prolaktina nakon 30 minutnog mirovanja, kako bi se ispitala mogućnost revidiranja postupka pripreme pacijenta za vađenje krvi. Za određivanje koncentracije prolaktina u serumu koristila se metoda elektrokemiluminiscencije (ECLIA) prema sendvič principu.

Specifični ciljevi ovog rada bili su:

1. Ispitati učinke fizičke aktivnosti na lučenje prolaktina.
2. Definirati prikladan postupak pripreme pacijenta prije određivanja koncentracije prolaktina.
3. Ispitati može li mirovanje u trajanju od 20 minuta stabilizirati koncentraciju prolaktina nakon fizičke aktivnosti jednako kao mirovanje u trajanju od 30 minuta.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICI

Istraživanje je provedeno prospektivno u vremenskom periodu od studenog 2020. do veljače 2021. godine u KBC-u Sestre milosrdnice, Zagreb, na malom uzorku odraslih dobrovoljaca kojima je određivana koncentracija prolaktina u krvi odmah nakon fizičke aktivnosti, a potom nakon perioda mirovanja od 20 ili 30 minuta. Obuhvaćen je 21 ispitanik, od kojih je 17 bilo ženskog, a 4 muškog spola. Dob ispitanika bila je u rasponu od 23 do 46 godina s medijanom od 28 godina.

Od ispitanika se tražilo da prije dolaska na vađenje krvi hodaju 15-30 minuta ili da dođu biciklom, sve s ciljem ispitivanja utjecaja različitih oblika fizičke aktivnosti na određivanje koncentracije prolaktina. Zapravo su se na taj način simulirali stvarni scenariji koji se događaju u predanalitičkoj fazi prije određivanja prolaktina. Nakon dolaska ispitanicima je krv uzeta tri puta: prvi put odmah nakon dolaska, drugi put nakon 20 minutnog mirovanja, a treći put nakon 30 minutnog mirovanja. Također je bilo bitno da su ispitanici natašte, budni 2 sata prije vađenja krvi, nisu trudnice i dojilje, da ne boluju i nemaju opterećenu obiteljsku anamnezu bolestima hipofize i da ne uzimaju lijekove/dodatke prehrani koji mogu utjecati na koncentraciju prolaktina u krvi.

3.2. UZORKOVANJE

Koncentracija prolaktina ovisi o brojnim prethodno spomenutim predanalitičkim čimbenicima stoga emocionalni stres, dojenje, fizička aktivnost ili prehrana bogata proteinima povećavaju njegovu koncentraciju u krvi (Winter i sur., 2018). Zbog toga pacijenti prije vađenja krvi moraju biti 8 do 10 sati natašte, a preporučeno je da im se krv uzima najmanje 2 sata nakon buđenja zbog cirkadijalnog ritma izlučivanja prolaktina. 30 minuta prije samog vađenja krvi pacijent treba biti u stanju mirovanja zbog utjecaja fizičke aktivnosti na koncentracije prolaktina u krvi (Županić i sur., 2013; Ignacak i sur., 2012).

Za uzorkovanje krvi korištene su epruvete s aktivatorom zgrušavanja bez gela (Greiner Bio-One GmbH od 6 mL, Kremsmuenster, Austria). Nakon 30-minutnog stajanja uzorci su

centrifugirani 10 minuta na 3100 okretaja po minuti korištenjem centrifuge Hettich Rotanta 460RC.

3.3. ODREĐIVANJE PROLAKTINA

3.3.1. Reagensi

Radne otopine potrebne za metodu određivanja koncentracije prolaktina su:

- Elecsys Prolactin II reagens koji se sastoji od sljedećih sastavnica:
 - 1) M - streptavidinom obložene mikročestice
 - 2) R1- biotinom obilježeno monoklonsko anti-PRL antitijelo (mišjeg podrijetla) u 50 mmol/L fosfatnom puferu, pH=7,0
 - 3) R2 - monoklonsko anti-PRL antitijelo (mišjeg podrijetla) obilježeno kompleksom s rutenijem u 50 mmol/L fosfatnom puferu, pH=7,0
- Diluent Universal reagens - pufer za razrjeđivanje uzoraka
- polietilen-glikol (PEG) 6000 (Millipore, Sigma) - 25 % otopina u destiliranoj ili deioniziranoj vodi

Elecsys Prolactin II reagens stabilan je do isteka roka trajanja ako je neotvoren i ako se čuva na 2-8 °C, a 16 tjedana ako se nalazi u analizatoru. 25 % otopina PEG-a stabilna je 7 dana na 20-25°C.

Postupci kalibracije i unutarnje kontrole kvalitete provode se u skladu s unutarnjom politikom laboratorija za automatizirane sustave.

3.3.2. Načelo i postupak

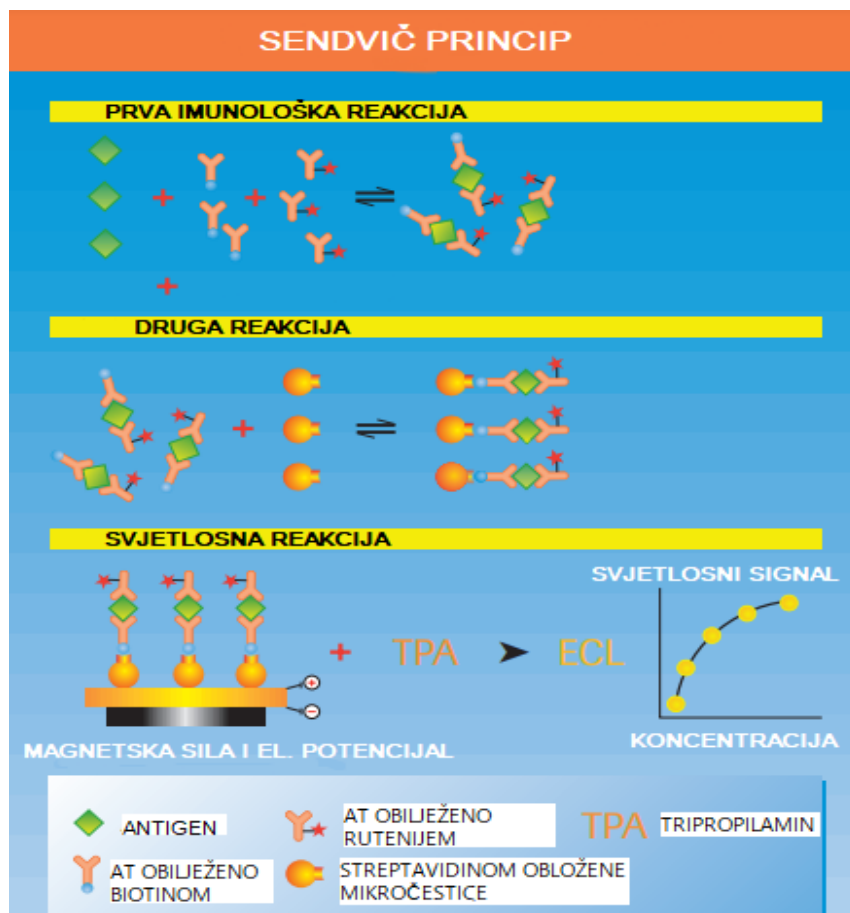
Koncentracija prolaktina u serumu određena je elektrokemiluminiscentnom metodom ECLIA (engl. *Electrochemiluminescence Immunoassay*) na automatskom analizatoru Cobas e 801 tvrtke Roche Diagnostics. Mjerenje je ukupno trajalo 18 minuta, a analizator mjeri prolaktin sendvič principom korištenjem dva monoklonska mišja antitijela specifično usmjerena na humani prolaktin (**Slika 3**).

U prvom koraku miješa se 10 µL uzorka s reagensom koji sadrži rutenijem obilježena anti-prolaktin specifična antitijela i biotinom obilježena anti-prolaktin antitijela. Nakon toga slijedi 9

minutna inkubacija tijekom kojih nastaje sendvič kompleks prolaktina s navedenim obilježenim antitijelima. U drugom koraku dodaju se paramagnetske mikročestice obložene streptavidinom i slijedi druga inkubacija u trajanju od 9 minuta tijekom koje se sendvič kompleks preko biotina veže za paramagnetske čestice obložene streptavidinom. Nakon druge inkubacije u reakciji se nalaze imunokemijski kompleksi koji se prenose u mjernu ćeliju gdje su magnetski zarobljeni na radnoj elektrodi, a nevezani reagens i uzorak se ispiru.

ECLIA metoda koristi dvije elektrokemijski aktivne tvari koje vode do emisije svjetlosti: rutenijev(II)-tris(bipiridil) $[\text{Ru}(\text{byp})_3]^{2+}$ kompleks i tripropilamin (TPA). Obje tvari su stabilne dok god se ne primijeni napon. Primjenom napona odvija se kemiluminiscentna reakcija između rutenijevog kompleksa i tripropilamina na površini elektrode od platine. Stvara se električno polje na koje reagiraju sve tvari koje se nalaze unutar njega, pa tako dolazi do oksidacije TPA pri čemu nastaje slobodni TPA radikal koji uzrokuje prijelaz rutenijevog kompleksa iz osnovnog u pobuđeno stanje. S obzirom da je pobuđeni oblik vrlo nestabilan, brzo dolazi do prelaska u osnovno stanje uz emisiju fotona na 620 nm. Tako završeni reakcijski ciklus može se ponavljati. Budući da se rutenijev kompleks u osnovnom stanju kontinuirano obnavlja, može se koristiti i u idućim ciklusima. Emisija fotona mjeri se pomoću luminometra, a količina proizvedenog zračenja proporcionalna je koncentraciji prolaktina u uzorku.

Koncentracija prolaktina izračunava se prema kalibracijskoj krivulji koja je uspostavljena na temelju standarda poznate koncentracije prolaktina.



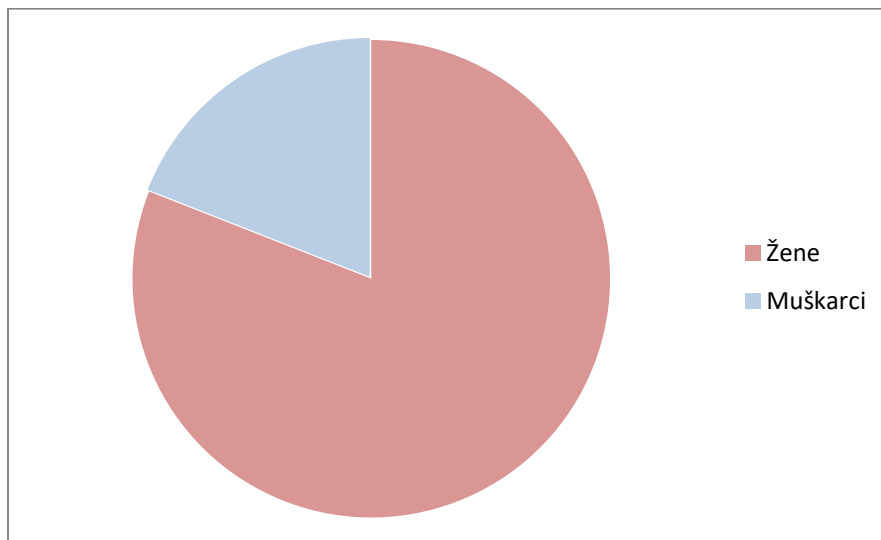
Slika 3. Sendvič princip ECLIA metode (preuzeto i prilagođeno s <https://toaz.info-roche-elecsys-2010-user-guide/doc-viewer>)

3.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2007, Microsoft office (Microsoft USA) i MedCalc® Statistical Software version 19.8 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2021). S obzirom na mali broj ispitanika, vodeći se preporukama koje se odnose na veličinu uzorka (Šimundić, 2012), statistički značajna razlika između uzastopnih kvantitativnih, zavisnih mjerenja procijenjena je neparametrijskim Wilcoxonovim parnim testom, a podaci su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon (IQR). Dob je, bez obzira na raspodjelu, prikazana medijanom i rasponom (minimum-maksimum). Wilcoxonov parni test neparametrijski je analog parnog t-testa kojim se uspoređuju zavisni podaci. Svi rezultati interpretirani su na razini statističke značajnosti $P < 0,05$.

4. REZULTATI

U istraživanju je dobrovoljno sudjelovao 21 ispitanik odrasle dobi od kojih je 17 bilo ženskog, a 4 muškog spola. Dob ispitanika bila je u rasponu od 23 do 46 godina s medijanom od 28 godina. Raspodjela ispitanika prema spolu prikazana je na **Slici 4**.



Slika 4. Raspodjela ispitanika prema spolu

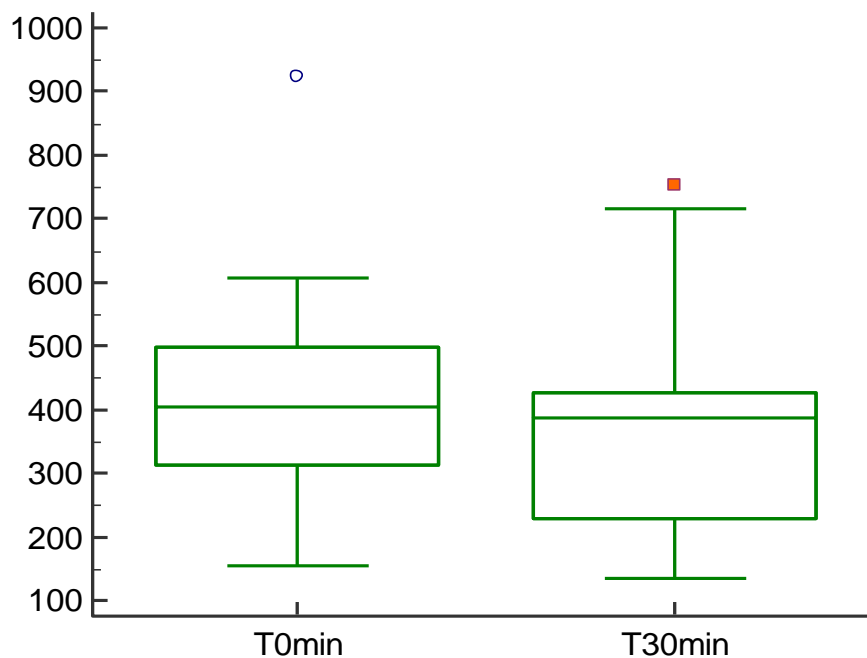
U **Tablici 1** prikazane su koncentracije prolaktina netom nakon fizičke aktivnosti i nakon 30 minuta mirovanja na uzorku od 20 ispitanika. Prikazane su najniže i najviše vrijednosti koncentracija prolaktina, medijan te interkvartilni raspon. Raspon koncentracija prolaktina u uzorku grafički je prikazan na **Slici 5** na kojoj se također vidi da postoje dvije stršeće vrijednosti koje smo isključili od ostalih podataka. Statistički značajna razlika u koncentracijama prolaktina nakon fizičke aktivnosti u odnosu na koncentracije dobivene nakon 30 minutnog mirovanja utvrđena je Wilcoxonovim parnim testom te je dobivena P vrijednost iznosila 0,014. Interpretirajući dinamiku promjene koncentracije prolaktina zamjetna je statistički značajno veća koncentracija prolaktina nakon fizičke aktivnosti, tj. fizička aktivnost uzrokovala je statistički značajno povećanje koncentracije prolaktina u odnosu na koncentracije dobivene nakon 30 minutnog mirovanja (405 vs. 388 mIU/L, P=0,014; **Slika 5**).

Tablica 1. Prikaz koncentracija prolaktina netom nakon fizičke aktivnosti i nakon 30 minuta mirovanja

	PRL 0` min (mIU/L)	PRL 30` min (mIU/L)
Najniža vrijednost	154	134
Najviša vrijednost	924	753
Medijan (interkvartilni raspon)	405 (313 - 499)	388 (230 - 427)

PRL 0` min - koncentracija prolaktina netom nakon fizičke aktivnosti

PRL 30` min - koncentracija prolaktina nakon 30 minuta mirovanja



Slika 5. Razlika u koncentraciji prolaktina netom nakon fizičke aktivnosti (T0 min) i nakon 30 minuta mirovanja (T30 min)

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Narančasti kvadratić i krug iznad ručica predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 1,5 puta.

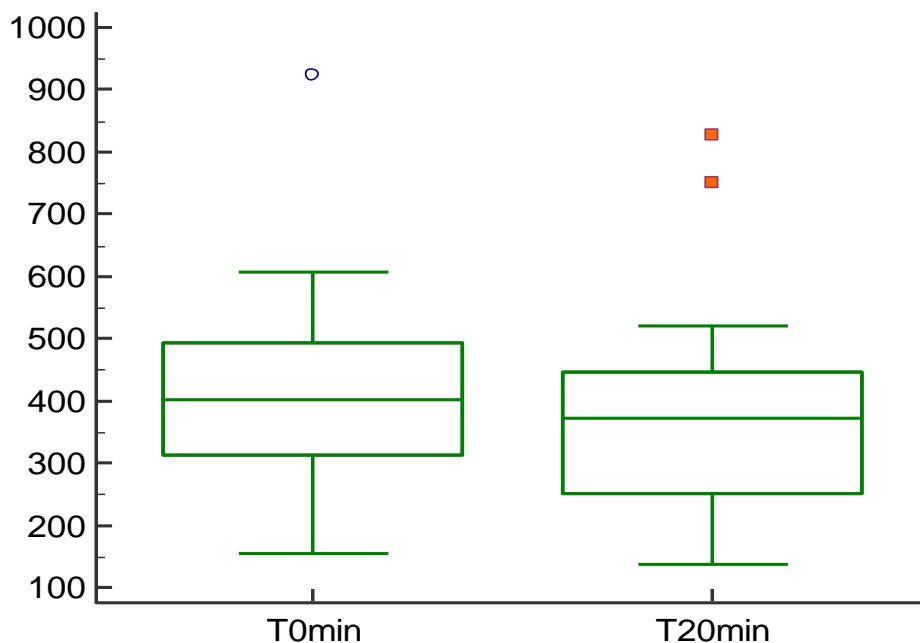
U **Tablici 2** dan je prikaz koncentracija prolaktina netom nakon fizičke aktivnosti i nakon 20 minuta mirovanja na uzorku od 21 ispitanika. Prikazane su najniže i najviše vrijednosti koncentracija prolaktina, medijan te interkvartilni raspon, a razlika u koncentracijama grafički je prikazana na **Slici 6** na kojoj se također vidi da postoje tri stršće vrijednosti koje smo isključili od ostalih podataka. Wilcoxonovim parnim testom, kojeg smo koristili za ispitivanje statistički značajne razlike u koncentracijama, dobivena je P vrijednost koja je iznosila 0,007. To znači da postoji statistički značajno povećanje koncentracije prolaktina nakon fizičke aktivnosti, tj. fizička aktivnost uzrokovala je statistički značajno povećanje koncentracije prolaktina u odnosu na koncentracije nakon 20 minutnog mirovanja (401 vs. 371 mIU/L, P=0,007; **Slika 6**).

Tablica 2. Prikaz koncentracija prolaktina netom nakon fizičke aktivnosti i nakon 20 minuta mirovanja

	PRL 0` min (mIU/L)	PRL 20` min (mIU/L)
Najniža vrijednost	154	138
Najviša vrijednost	924	826
Medijan (interkvartilni raspon)	401 (314 - 494)	371 (250 - 446)

PRL 0` min - koncentracija prolaktina netom nakon fizičke aktivnosti

PRL 20` min - koncentracija prolaktina nakon 20 minuta mirovanja



Slika 6. Razlika u koncentraciji prolaktina netom nakon fizičke aktivnosti (T0 min) i nakon 20 minuta mirovanja (T20 min)

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Narančasti kvadratići i krug iznad ručica predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 1,5 puta.

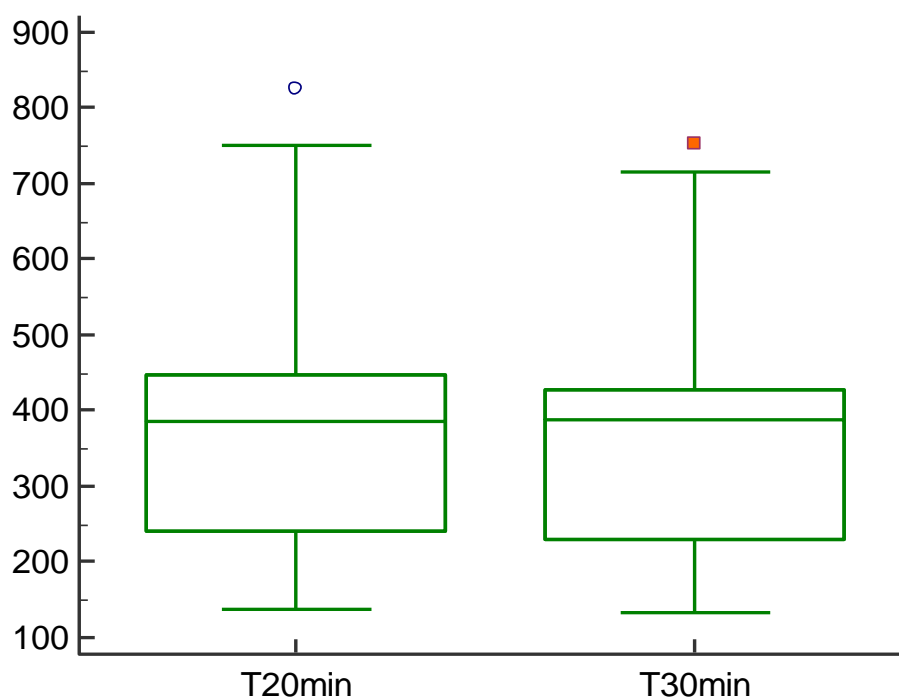
U **Tablici 3** prikazane su koncentracije prolaktina nakon 20 minutnog i nakon 30 minutnog mirovanja. Prikazane su najniže i najviše vrijednosti koncentracija prolaktina, medijan te interkvartilni raspon na uzorku od 20 ispitanika. Grafički prikaz razlika u koncentracijama prolaktina prikazan je na **Slici 7** na kojoj se također vidi da postoje dvije stršeće vrijednosti koje smo isključili od ostalih podataka. Statističkom analizom koristeći Wilcoxonov parni test dobivena P vrijednost iznosila je 0,006, što znači da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji prolaktina nakon 20 minuta mirovanja u odnosu na 30 minuta mirovanja (T20min vs. T30min). Međutim, kako se radi o gotovo jednakim medijanima koncentracije prolaktina koje nisu klinički značajno različite, možemo zaključiti kako su dva protokola mirovanja izazvala identičan predanalitički učinak stabilizacije koncentracije prolaktina (386 vs. 388 mIU/L, P=0,006; **Slika 7**).

Tablica 3. Prikaz koncentracija prolaktina nakon 20 minuta mirovanja u odnosu na koncentracije nakon 30 minuta mirovanja

	PRL 20` min (mIU/L)	PRL 30` min (mIU/L)
Najniža vrijednost	138	134
Najviša vrijednost	826	753
Medijan (interkvartilni raspon)	386 (242 - 448)	388 (230 - 427)

PRL 20` min- koncentracija prolaktina nakon 20 minuta mirovanja

PRL 30` min- koncentracija prolaktina nakon 30 minuta mirovanja



Slika 7. Razlika u koncentraciji prolaktina nakon 20 minuta mirovanja (T20 min) i nakon 30 minuta mirovanja (T30 min)

Rezultati su prikazani medijanom i interkvartilnim rasponom koristeći grafikon okvira s ručicama. Narančasti kvadratić i krug iznad ručica predstavljaju vrijednosti koje premašuju interkvartilni raspon za 1,5 puta.

5. RASPRAVA

Opće je prihvaćeno da fizička aktivnost, ovisno o njenom intenzitetu, trajanju i tjelesnoj kondiciji osobe, izaziva čitav niz heterogenih učinaka na reproduktivne funkcije. Kod fizički aktivnih osoba niz različitih metaboličkih prilagodbi izazvanih vježbanjem mogu dovesti do značajnih varijacija hormonskog profila. Međutim, objavljeno je dosta proturječnih podataka o utjecaju redovite tjelovježbe na bazalnu koncentraciju prolaktina kod fizički aktivnih osoba (Lippi i sur., 2009).

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je ispitati učinke fizičke aktivnosti na lučenje prolaktina kako bi se temeljem dobivenih spoznaja mogao definirati prikladan postupak pripreme pacijenta prije određivanja koncentracije prolaktina. Prema dosadašnjim spoznajama pacijenti prije vađenja krvi moraju biti 8 do 10 sati natašte, a preporučeno je da im se krv uzima najmanje 2 sata nakon buđenja zbog cirkadijalnog ritma izlučivanja prolaktina. 30 minuta prije samog vađenja krvi pacijent treba biti u stanju mirovanja zbog utjecaja fizičke aktivnosti na koncentracije prolaktina (Županić i sur., 2013; Ignacak i sur., 2012). Hipoteza ovog istraživanja bila je da fizička aktivnost statistički značajno utječe na povećanje koncentracije prolaktina. S obzirom da je u oba slučaja utvrđivanjem značajnosti razlike u koncentracijama prolaktina nakon fizičke aktivnosti i nakon 20 minutnog odnosno 30 minutnog mirovanja ustanovljena statistički značajna razlika (P vrijednost je bila manja od 0,05), potvrdili smo da fizička aktivnost zaista uzrokuje statistički značajno povećanje koncentracije prolaktina u ispitivanom uzorku. Tworoger i sur. (2007) su u svojoj studiji potvrdili da je akutna reakcija na fizičku aktivnost karakterizirana kao fizički oblik stresa zbog čega dolazi do ubrzanog pulsa i hipoksije koji mogu povećati koncentraciju prolaktina. Otkrili su da se povećanje koncentracije prolaktina tijekom vježbanja može uočiti kroz nekoliko mehanizama kao što su smanjen protok krvi u jetri i bubrezima, povećanje tjelesne temperature, povećanje koncentracije laktata i hipoksija. S obzirom na sve navedene informacije, uključujući rezultate ovog istraživanja, može se zaključiti kako je obvezujuće da pacijent bude u stanju mirovanja prije samog vađenja krvi. Dakle, jedino uz pravilan nadzor predanalitičke pripreme pacijenata, laboratoriji mogu biti potpuno odgovorni za izdavanje točnih i pouzdanih rezultata koncentracije prolaktina.

Drugi cilj ovog istraživanja bio je ispitati može li mirovanje u trajanju od 20 minuta stabilizirati koncentraciju prolaktina nakon fizičke aktivnosti jednako kao mirovanje u trajanju od 30 minuta. Temeljem dobivenih spoznaja mogao bi se revidirati postupak pripreme pacijenta i

smanjiti vrijeme ambulantnog čekanja za vađenje krvi, čime bi se u konačnici unaprijedila obrada pacijenata koji dolaze na određivanje koncentracije prolaktina. Stoga je druga hipoteza ovog istraživanja bila da nema statistički značajne razlike u koncentraciji prolaktina nakon 20 minutnog mirovanja u odnosu na 30 minutno mirovanje. Dobivena P vrijednost bila je manja od 0,05 što znači da je mirovanje u trajanju od 20 minuta doprinijelo stabilizaciji koncentracije prolaktina koja je statistički značajno različita u odnosu na koncentraciju prolaktina nakon 30 minutnog mirovanja. Međutim, kako se radi o gotovo jednakim medijanima koncentracije prolaktina koje nisu klinički značajno različite, možemo zaključiti kako su dva protokola mirovanja izazvala identičan predanalitički učinak i mogu se jednakovrijedno primjenjivati. To u konačnici znači da bi se moglo smanjiti vrijeme ambulantnog čekanja za vađenje krvi s 30 na 20 minuta, tj. za 10 minuta čime bi se unaprijedila i ubrzala obrada pacijenata.

Na grafičkim prikazima razlika u koncentracijama prolaktina (**Slika 5**, **Slika 6** i **Slika 7**) bijelim kružićem i narančastim kvadratićima prikazane su stršeće vrijednosti (eng. *outliers*) koje smo tim oznakama isključili od ostalih podataka jer se značajno razlikuju od ostalih vrijednosti koncentracija prolaktina. S obzirom da su te stršeće vrijednosti puno veće u odnosu na druge podatke, odbacuju se zbog osjetljivosti prosjeka i preciznijeg prikaza statističke analize. U početnoj fazi istraživanja sudjelovalo je ukupno 24 ispitanika, ali su odmah nakon vađenja krvi isključene vrijednosti koncentracija za tri ispitanika zbog njihove neadekvatne pripreme prije vađenja krvi, tj. zbog neprihvatljivih predanalitičkih značajki koje su dovele do značajno lažno povišenih koncentracija prolaktina. Zbog toga je istraživanje zaključeno s ukupnim brojem od 21 ispitanika. Međutim, analize vezane za određivanje koncentracije prolaktina nakon 30 minutnog mirovanja izvedene su na uzorku od 20 ispitanika zbog toga što je jednom ispitaniku pozlilo nakon drugog vađenja krvi (nakon 20 minutnog mirovanja) i nije mu bilo moguće odrediti koncentraciju prolaktina nakon 30 minutnog mirovanja. U sve ostale analize uključen je ukupan broj od 21 ispitanika. Manji broj ispitanika mogući je nedostatak ovog istraživanja. Nažalost, radi pandemije i pridržavanja epidemioloških mjera bilo je teško organizirati i motivirati ispitanike na uključivanje u istraživanje. Zbog toga se ispitivane teze i ciljevi istraživanja trebaju potvrditi u budućim studijama koje će se provesti na puno većem broju ispitanika.

Kako je već prethodno spomenuto, koncentracija prolaktina ovisi o brojnim predanalitičkim čimbenicima stoga je poznato kako emocionalni stres, dojenje ili prehrana bogata proteinima povećavaju njegovu koncentraciju u krvi (Winter i sur., 2018; Saleem i sur., 2018). U studiji iz

2012. pokazano je da se koncentracija prolaktina povećava tijekom jednog sata nakon konzumacije obroka kod zdravih osoba i trudnica (Ignacak i sur., 2012). Zbog toga je od ispitanika traženo da prije vađenja krvi budu 12 sati natašte te je bilo bitno da se zabilježi podatak o dojenju, mogućoj trudnoći i uzimanju proteinskih dodataka prehrani kako bi točnije interpretirali dobivene rezultate.

S obzirom da se uslijed primjene terapijskih lijekova koji inhibiraju izlučivanje dopamina ili njegovo djelovanje u hipofizi mogu primijetiti povećanja koncentracije prolaktina do deset puta veća u odnosu na početne koncentracije (Saleem i sur., 2018), također smo bilježili da li ispitanici uzimaju neke od tih lijekova koji mogu utjecati na rezultate. Nakon obrade zabilježenih podataka uočili smo da samo jedan ispitanik uzima lijek koji može interferirati s koncentracijom prolaktina, ali s obzirom da je tom ispitaniku predmetni lijek dugogodišnja terapija zapravo je stalna varijabla koja nije utjecala na točnost rezultata. Stoga su vrijednosti koncentracija tog ispitanika uključene u daljnju obradu.

S ciljem ispitivanja utjecaja različitih oblika fizičke aktivnosti na određivanje koncentracije prolaktina, od ispitanika se tražilo da prije dolaska na vađenje krvi hodaju 15-30 minuta ili da voze bicikl. Zapravo su se na taj način simulirali stvarni scenariji koji se događaju u predanalitičkoj fazi prije samog određivanja prolaktina. S obzirom na dobivene rezultate, tj. povišene koncentracije prolaktina u prvoj točki mjerenja (odmah po dolasku u laboratorij) u odnosu na koncentracije nakon mirovanja, zaključujemo da je cijeli postupak mirovanja prije uzorkovanja apsolutno opravdan i da fizička aktivnost uzrokuje lažno povišene rezultate.

6. ZAKLJUČCI

1. Postoji statistički značajna razlika u koncentraciji prolaktina neposredno nakon fizičke aktivnosti u odnosu na koncentracije prolaktina nakon 20 i 30 minutnog mirovanja.
2. Fizička aktivnost uzrokuje statistički značajno povećanje koncentracije prolaktina u krvi, tj. uzrokuje lažno povišene rezultate.
3. Obvezujuće je da pacijent bude u stanju mirovanja prije samog vađenja krvi za određivanje koncentracije prolaktina kako bi se dobili točni i pouzdani rezultati.
4. Mirovanje u trajanju od 20 minuta može stabilizirati koncentraciju prolaktina nakon fizičke aktivnosti podjednako kao mirovanje u trajanju od 30 minuta.
5. Vrijeme ambulantnog čekanja za vađenje krvi zbog određivanja koncentracije prolaktina moglo bi se smanjiti s 30 na 20 minuta, tj. za 10 minuta čime bi se unaprijedila i ubrzala obrada pacijenata u ambulantama.

7. LITERATURA

Basić N. Utjecaj antipsihoticima izazvane hiperprolaktinemije na rizik pojave karcinoma dojke i prostate. Završni specijalistički. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2019, str. 12-18.

Clinical Laboratory Diagnostics, 2020., <https://www.clinical-laboratory-diagnostics-2020.com/index.html>, pristupljeno 7.4.2021.

Clinical manifestations and evaluation of hyperprolactinemia, 2020., <http://www.uptodate.com>, pristupljeno 12.4.2021.

Elecsys 2010 Operator's Manual, 2010., <https://toaz.info-roche-elecsys-2010-user-guide/doc-viewer>, pristupljeno 11.05.2021.

Ignacak A, Kasztelnik M, Sliwa T, Korbut RA, Rajda K, Guzik TJ. Prolactin – not only lactotrophin. A „new“ view of the „old“ hormone. *J Physiol Pharmacol*, 2012, 63(5), 435-443.

Kasum M, Orešković S, Čehić E, Šunj M, Lila A, Ejubović E. Laboratory and clinical significance of macroprolactinemia in women with hyperprolactinemia. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2017, 56, 719-724.

Laboratorijska medicina: Predanalitička pogreška, interferencije i interpretacija nalaza, 2014., https://www.researchgate.net/publication/265847111_Laboratorijska_medicina_Predanaliticka_pogreska_interferencije_i_interpretacija_nalaza, pristupljeno 22.04.2021.

Lacković Z, Bach-Rojecky L. Neurotransmitori, prolaktin i mogućnosti farmakološke manipulacije. U: Prolaktinomi - medikamentozno ili kirurško liječenje. Gnjidić Ž, urednik, Zagreb, Hrvatska akademija znanosti i umjetnosti i Klinička bolnica "Sestre milosrdnice", 2010, str. 39-63.

Lippi G, De Vita F, Salvagno GL, Montagnana M, Targher G, Guidi GC. Serum prolactin in professional soccer players. *Biochem Med*, 2009, 19 (2), 177-181.

- Rojas Vega S, Hollmann W, Struder HK. Influences of exercise and training on the circulating concentration of prolactin in humans. *J Neuroendocrinol*, 2011, 24, 395-402.
- Saleem M, Martin H, Coates P. Prolactin biology and laboratory measurement. An update on physiology and current analytical issues. *Clin Biochem Rev*, 2018, 39 (1), 3-12.
- Samperi I, Lithgow K, Karavitaki N. Hyperprolactinaemia. *J Clin Med*, 2019, 8 (12), 2203-2227.
- Serri O, Chik CL, Ur E, Ezzat S. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *Can Med Assoc J*, 2003, 169(6), 575-581.
- Spiegel K, Follenius M, Simon C, Saini J, Ehrhart J, Brandenberger G. Prolactin Secretion and Sleep. *Sleep*, 1994, 17(1), 20-27.
- Šimundić AM, Practical recommendations for statistical analysis and data presentation in Biochemia Medica journal. *Biochem Med*, 2012, 22(1), 15–23.
- Štraus B, Plavšić V. Hormoni. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednice, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 350-351.
- Topić E, Primorac D, Janković S. Medicinskobiokemijska dijagnostika u kliničkoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 116-117.
- Twohoger SS, Sorensen B, Chubak J, Irwin M, Stanczyk FZ, Ulrich CM, Potter J, McTiernan A. Effect of a 12-month randomized clinical trial of exercise on serum prolactin concentrations in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2007, 16 (5), 895-899.
- Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. Interna medicina. Zagreb, Naklada Ljevak, 2008, str. 1189-1191.
- Whyte MB, Pramodh S, Srikugan L, Gilbert JA, Miell JP, Sherwood RA, McGregor AM, Aylwin SJB. Importance of cannulated prolactin test in the definition of hyperprolactinaemia. *Pituitary*, 2015, 18(3), 319-325.

Winter WE, McCormack A, Bertholf RL. Pituitary Function and Pathophysiology. U: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 6th edition. Rifai N, Horvath RA, Wittwer TC, urednici, Elsevier, St. Louis, Missouri, 2018, str. 1509-1512.

Županić D, Crnokrak S, Mujagić R, Honović L. Određivanje ukupnog prolaktina i prolaktina nakon taloženja s 25% otopinom polietilen glikola. *Glasnik pulske bolnice*, 2013, 10(10), 45.

8. SAŽETAK/ SUMMARY

8.1. SAŽETAK

Određivanje prolaktina koristi se za postavljanje dijagnoze hiperprolaktinemije, no treba imati na umu da na koncentraciju prolaktina utječu brojni predanalitički čimbenici kao što su cirkadijalni ritam (koncentracija prolaktina je najviša tijekom noći i neposredno nakon buđenja), stres, dojenje, fizička aktivnost te lijekovi (antipsihotici, estrogeni, triciklički antidepressivi). Prema većini istraživanja fizička aktivnost naglo povećava koncentraciju prolaktina.

Cilj ovog rada bio je ispitati postoji li statistički značajna razlika u koncentraciji prolaktina neposredno nakon fizičke aktivnosti u odnosu na koncentracije prolaktina nakon 20 i 30 minutnog mirovanja. Dodatan cilj bio je utvrditi značajnost razlike u ponovljenim mjerenjima koncentracije prolaktina nakon 20 minutnog mirovanja u odnosu na koncentraciju prolaktina nakon 30 minutnog mirovanja.

U istraživanju je dobrovoljno sudjelovao 21 ispitanik odrasle dobi. Od ispitanika se tražilo da prije dolaska na vađenje krvi hodaju 15-30 minuta ili dođu biciklom. Nakon dolaska ispitanicima je krv uzeta tri puta: prvi put odmah nakon dolaska, drugi put nakon 20 minutnog mirovanja, a treći put nakon 30 minutnog mirovanja. Za određivanje koncentracije prolaktina u serumu koristila se metoda elektrokemiluminiscencije (ECLIA) prema sendvič principu. Statistički značajne razlike u koncentracijama prolaktina utvrđene su Wilcoxonovim parnim testom.

Utvrđeno je da je koncentracija prolaktina neposredno nakon fizičke aktivnosti veća u odnosu na koncentracije prolaktina nakon 20 i 30 minutnog mirovanja. Daljnji rezultati pokazali su da je mirovanje u trajanju od 20 minuta doprinijelo stabilizaciji koncentracije prolaktina koja je statistički značajno različita u odnosu na koncentraciju prolaktina nakon 30 minutnog mirovanja. Međutim, kako se radi o gotovo jednakim medijanima koncentracije prolaktina koje nisu klinički značajno različite, možemo zaključiti kako su dva protokola mirovanja izazvala identičan predanalitički učinak i mogu se jednakovrijedno primjenjivati.

S obzirom na dobivene rezultate, tj. povišene koncentracije prolaktina u prvoj točki mjerenja (odmah po dolasku u laboratorij) u odnosu na koncentracije nakon mirovanja, zaključujemo da je cijeli postupak mirovanja prije uzorkovanja krvi za određivanje koncentracije prolaktina apsolutno opravdan i da fizička aktivnost uzrokuje lažno povišene rezultate.

8.2. SUMMARY

Determination of serum prolactin concentration is used to diagnose hyperprolactinemia; however, it should be kept in mind that prolactin levels are affected by several preanalytical factors, such as circadian rhythm (prolactin levels are highest during the night and immediately after waking up), stress, breastfeeding, physical activity and drugs (antipsychotics, estrogens, tricyclic antidepressants). According to the most of studies, physical activity instantly increases the concentration of prolactin.

This study aimed to examine whether there was a statistically significant difference in the prolactin concentration immediately after physical activity in comparison with the prolactin concentrations after 20 or 30 minutes of rest. The aim was also to determine the significance of the difference in repeated measurements of prolactin concentration after 20 minutes of rest compared to prolactin concentration after 30 minutes of rest.

21 adult respondents voluntarily participated in the study. Participants were asked to walk for 15-30 minutes or come by bicycle before arriving for a blood sampling. Upon arrival, the blood was drawn for three times: the first time was immediately upon arrival, the second time was after 20 minutes of rest, and the third time was after 30 minutes of rest. The sandwich electrochemiluminescence method (ECLIA) was used for determination of the serum prolactin concentrations. Statistically significant differences in the prolactin concentrations were determined with the use of Wilcoxon signed - rank test.

The concentration of prolactin immediately after physical activity was found to be higher than the concentrations of prolactin after 20 and 30 minutes of rest. Further results showed that resting for 20 minutes contributed to the stabilization of prolactin concentration, which was statistically significantly different from the prolactin concentration after 30 minutes of resting. However, as medians of prolactin concentrations were almost equal and were not clinically significantly different, we could conclude that the two resting protocols caused an identical preanalytical effect and can be applied equally.

Considering the obtained results, which showed elevated prolactin concentrations at the first measurement point (immediately upon arrival to the laboratory) compared with the post-resting concentrations, we conclude that the whole resting procedure before blood sampling for determination of prolactin concentration is justified and that physical activity causes falsely elevated results.

9. PRILOZI

9.1. POPIS KRATICA

ECLIA- elektrokemiluminiscentna imunokemijska metoda

IgG - imunoglobulin G

PEG - polietilen-glikol

PIF - faktori inhibicije prolaktina

PRF - faktori otpuštanja prolaktina

PRL - prolaktin

PRLR - prolaktinski receptor

TPA - tripropilamin

TRH - hormon koji oslobađa tireotropin

VIP - vazoaktivni intestinalni polipeptid

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ANALIZA PODATAKA O UTJECAJU FIZIČKE AKTIVNOSTI NA ODREĐIVANJE PROLAKTINA

Valentina Drenški

SAŽETAK

Određivanje prolaktina koristi se za postavljanje dijagnoze hiperprolaktinemije, no treba imati na umu da na koncentraciju prolaktina utječu brojni predanalitički čimbenici kao što su cirkadijalni ritam (koncentracija prolaktina je najviša tijekom noći i neposredno nakon buđenja), stres, dojenje, fizička aktivnost te lijekovi (antipsihotici, estrogeni, triciklički antidepresivi). Prema većini istraživanja fizička aktivnost naglo povećava koncentraciju prolaktina. Cilj ovog rada bio je ispitati postoji li statistički značajna razlika u koncentraciji prolaktina neposredno nakon fizičke aktivnosti u odnosu na koncentracije prolaktina nakon 20 i 30 minutnog mirovanja. Dodatan cilj bio je utvrditi značajnost razlike u ponovljenim mjerenjima koncentracije prolaktina nakon 20 minutnog mirovanja u odnosu na koncentraciju prolaktina nakon 30 minutnog mirovanja. U istraživanju je dobrovoljno sudjelovao 21 ispitanik odrasle dobi. Od ispitanika se tražilo da prije dolaska na vađenje krvi hodaju 15-30 minuta ili dođu biciklom. Nakon dolaska ispitanicima je krv uzeta tri puta: prvi put odmah nakon dolaska, drugi put nakon 20 minutnog mirovanja, a treći put nakon 30 minutnog mirovanja. Za određivanje koncentracije prolaktina u serumu koristila se metoda elektrokemiluminiscencije (ECLIA) prema sendvič principu. Statistički značajne razlike u koncentracijama prolaktina utvrđene su Wilcoxonovim parnim testom. Utvrđeno je da je koncentracija prolaktina neposredno nakon fizičke aktivnosti veća u odnosu na koncentracije prolaktina nakon 20 i 30 minutnog mirovanja. Daljnji rezultati pokazali su da je mirovanje u trajanju od 20 minuta doprinijelo stabilizaciji koncentracije prolaktina koja je statistički značajno različita u odnosu na koncentraciju prolaktina nakon 30 minutnog mirovanja. Međutim, kako se radi o gotovo jednakim medijanima koncentracije prolaktina koje nisu klinički značajno različite, možemo zaključiti kako su dva protokola mirovanja izazvala identičan predanalitički učinak i mogu se jednakovrijedno primjenjivati. S obzirom na dobivene rezultate, tj. povišene koncentracije prolaktina u prvoj točki mjerenja (odmah po dolasku u laboratorij) u odnosu na koncentracije nakon mirovanja, zaključujemo da je cijeli postupak mirovanja prije uzorkovanja krvi za određivanje koncentracije prolaktina apsolutno opravdan i da fizička aktivnost uzrokuje lažno povišene rezultate.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 30 stranica, 7 grafičkih prikaza, 3 tablice i 22 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: fizička aktivnost, predanalitika, prolaktin

Mentori: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Domagoj Marijančević, *spec. med. biokemije i lab. medicine, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Anita Somborac Bačura**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Domagoj Marijančević, *spec. med. biokemije i lab. medicine, Klinički bolnički centar Sestre milosrdnice.*

Dr. sc. Marija Grdić Rajković, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
Kneza Domagoja 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

ANALYSIS OF DATA ON THE INFLUENCE OF PHYSICAL ACTIVITY ON PROLACTIN DETERMINATION

Valentina Drenški

SUMMARY

Determination of serum prolactin concentration is used to diagnose hyperprolactinemia; however, it should be kept in mind that prolactin levels are affected by several preanalytical factors, such as circadian rhythm (prolactin levels are highest during the night and immediately after waking up), stress, breastfeeding, physical activity and drugs (antipsychotics, estrogens, tricyclic antidepressants). According to the most of studies, physical activity instantly increases the concentration of prolactin. This study aimed to examine whether there was a statistically significant difference in the prolactin concentration immediately after physical activity in comparison with the prolactin concentrations after 20 or 30 minutes of rest. The aim was also to determine the significance of the difference in repeated measurements of prolactin concentration after 20 minutes of rest compared to prolactin concentration after 30 minutes of rest. 21 adult respondents voluntarily participated in the study. Participants were asked to walk for 15-30 minutes or come by bicycle before arriving for a blood sampling. Upon arrival, the blood was drawn for three times: the first time was immediately upon arrival, the second time was after 20 minutes of rest, and the third time was after 30 minutes of rest. The sandwich electrochemiluminescence method (ECLIA) was used for determination of the serum prolactin concentrations. Statistically significant differences in the concentrations of prolactin were determined with the Wilcoxon signed - rank test. The concentration of prolactin immediately after physical activity was found to be higher than the concentrations of prolactin after 20 and 30 minutes of rest. Further results showed that resting for 20 minutes contributed to the stabilization of prolactin concentration, which was statistically significantly different from the prolactin concentration after 30 minutes of resting. However, as medians of prolactin concentrations were almost equal and were not clinically significantly different, we could conclude that the two resting protocols caused an identical preanalytical effect and can be applied equally. Considering the obtained results, which showed elevated prolactin concentrations at the first measurement point (immediately upon arrival to the laboratory) compared with the post-resting concentrations, we conclude that the whole resting procedure before blood sampling for determination of prolactin concentration is justified and that physical activity causes falsely elevated results.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 30 pages, 7 figures, 3 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: physical activity, preanalytics, prolactin

Mentors: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Domagoj Marijančević, Ph.D. European Specialist in Laboratory Medicine, Sestre milosrdnice University Hospital Center

Reviewers: **Anita Somborac Bačura, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Domagoj Marijančević, Ph.D. European Specialist in Laboratory Medicine, Sestre milosrdnice University Hospital Center

Marija Grdić Rajković, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2021.