

Makroprolaktin - racionalna upotreba probirnog testa u dijagnostici hiperprolaktinemije

Šostarić, Milica

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:163:610752>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2023-06-05**



Repository / Repozitorij:

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



Milica Šostarić

**Makroprolaktin – racionalna upotreba probirnog
testa u dijagnostici hiperprolaktinemije**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Endokrinološkom laboratoriju KBC Sestre Milosrdnice u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr.sc. Nade Vrkić i suvoditeljstvom Ivane Zec, mag. med. biochem., specijalistice medicinske biokemije i laboratorijske medicine.

Zahvaljujem izv. prof. dr.sc. Nadi Vrkić i Ivani Zec, mag. med. biochem., specijalistici medicinske biokemije i laboratorijske medicine na pristupačnosti, velikodušnoj pomoći i korisnim savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Posebice zahvaljujem svojim roditeljima i bratu Nikoli na neizmjerne podršci i bezuvjetnoj ljubavi. Zbog vas se sav trud isplatio!

Veliko hvala mom dragom dečku Luki koji je uvijek bio tu za mene i uljepšao mi svih pet godina studiranja.

Također zahvaljujem svojim prijateljima na velikoj podršci i lijepim druženjima.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. PROLAKTIN	1
1.1.1. Uloga i biokemijska obilježja prolaktina	1
1.1.2. Sekrecija prolaktina	1
1.1.2.1. Cirkadijalni ritam	1
1.1.2.2. Regulatorni faktori	2
1.2. HIPERPROLAKTINEMIJA	2
1.2.1. Epidemiološke značajke hiperprolaktinemije	2
1.2.2. Uzroci hiperprolaktinemije	3
1.2.3. Klinička slika hiperprolaktinemije	4
1.2.4. Laboratorijska dijagnostika hiperprolaktinemije	5
1.2.5. Interpretacija i dijagnostički značaj hiperprolaktinemije	6
1.3. MAKROPROLAKTINEMIJA	6
1.3.1. Metode eliminacije makroprolaktina	8
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE	13
3.1. ISPITANICI	13
3.2. UZORKOVANJE	13
3.3. TALOŽENJE PROLAKTINA POLIETILEN GLIKOLOM	13
3.3.1. Pribor i materijali	13
3.3.2. Načelo i postupak	14
3.4. ODREĐIVANJE PROLAKTINA	16
3.4.1. Reagensi	16
3.4.2. Načelo i postupak	16
3.5. STATISTIČKE METODE	18
4. REZULTATI	19
4.1. DESKRIPTIVNA STATISTIKA REZULTATA MJERENJA	19
4.2. STATISTIČKA ANALIZA PONAVLJANIH MJERENJA	21
5. RASPRAVA	22

6. ZAKLJUČCI.....	25
7. LITERATURA.....	26
8. SAŽETAK/SUMMARY	31
8.1. SAŽETAK.....	31
8.2. SUMMARY.....	32
9. PRILOZI.....	33
9.1. POPIS KRATICA.....	33

1. UVOD

1.1. PROLAKTIN

1.1.1. Uloga i biokemijska obilježja prolaktina

Prolaktin je jednolančani globularni polipeptidni hormon kojeg primarno sintetiziraju i luče laktotropne stanice adenohipofize, ali ga mogu proizvoditi i mnoge druge stanice (limfociti, kožni fibroblasti, stanice mozga, dojke i prostate, adipozne stanice). Glavna uloga mu je stimulacija i održavanje laktacije kod sisavaca u postpartalnom razdoblju, iako ima i druge bitne funkcije poput regulacije imunološkog sustava, steroidogeneze jajnika (antigonadotropni učinak), osmoregulacije, regulacije metabolizma subkutane masti i ugljikohidrata te fetalnog razvoja pluća (Burtis i Bruns, 2015; Ignacak i sur., 2012). Osim navedenih uloga, također se smatra da pridonosi neurogenezi budući da stimulira proliferaciju, diferencijaciju i migraciju neuronskih matičnih stanica (Capozzi i sur, 2015). Djeluje kao ostali hormoni hipofize vezanjem na specifične receptore na membrani stanica ciljnih organa kao što su dojka, nadbubrežne žlijezde, jajnici, testisi, prostata, bubrezi i jetra (Burtis i Bruns, 2015). Prolaktinski receptor (PRL-R) je membranski vezani protein koji pripada klasi I superobitelji citokinskih receptora. Vezanjem prolaktina dolazi do dimerizacije prolaktinskog receptora i aktivacije JAK/STAT signalnog puta (Freeman i sur., 2000; Ignacak i sur., 2012).

Molekulu prolaktina kodira *GHI* gen. Inicijalno translacijom nastaje preprolaktin, polipeptidni lanac od 227 aminokiselina (26 kDa), iz kojeg cijepanjem vodeće sekvence nastaje monomerni prolaktin od 199 aminokiselina. Aminokiselina na poziciji 59 je glavno mjesto N-glikozilacije, a unutar strukture postoje 3 disulfidne veze. U krvi cirkulira u više različitih oblika: monomerni prolaktin („little“ PRL, 23 kDa), dimerni prolaktin („big“ PRL, 48-56 kDa) te polimerni oblik prolaktina, tzv. makroprolaktin („big-big“ PRL, > 150 kDa). (Burtis i sur., 2012). Monomerni oblik se smatra najviše biološki aktivnim i čini 80-95% ukupnog cirkulirajućeg prolaktina kod osoba s normoprolaktinemijom i pravom hiperprolaktinemijom. U normalnim serumima manje od 10% čini dimerna izoforma, a manje od 1% polimerna izoforma prolaktina (Kasum i sur., 2014).

1.1.2. Sekrecija prolaktina

1.1.2.1. Cirkadijalni ritam

Prolaktin se luči epizodično ovisno o budnosti organizma. Koncentracije mu rastu 60-90 minuta nakon ulaska u san, a porast nije ovisan o specifičnoj fazi sna niti o kvaliteti spavanja.

Najviše koncentracije postiže između 4 i 7 sati ujutro, a koncentracije mu padaju ubrzo nakon buđenja. Najniže koncentracije postiže 2-3 sata nakon buđenja. Dokazano je da za razliku od npr. ACTH, porast koncentracije prolaktina nakon ulaska u san nije vezan za cirkadijalni ritam, već samo za period spavanja, neovisno o tome kada se tijekom dana odvija (Gardner i Shoback, 2007; Spiegel i sur., 1994).

1.1.2.2. Regulatorni faktori

Lučenje prolaktina regulirano je djelovanjem različitih stimulativnih i inhibitornih faktora. Oni djeluju na tri razine: putem dopaminergičnih neurona na razini hipofize, vezanjem za specifične receptore na laktotropnim stanicama hipofize te lokalno kao autokrini i parakrini čimbenici. Najznačajniju ulogu u regulaciji ima neurotransmiter dopamin koji inhibira lučenje prolaktina vezanjem na D2 receptore na laktotropnim stanicama. Molekule koje potiču sintezu i otpuštanje dopamina klasificiramo kao faktore inhibicije prolaktina (PIF). Tu ubrajamo sam prolaktin, bombezin, peptid koji oslobađa gastrin, neurotenzin, acetilkolin, kalcitonin, atrijski natrijuretski peptid i dr. hormone koji stimuliraju aktivnost tirozin hidroksilaze. Suprotni učinak imaju faktori otpuštanja prolaktina (PRF) kao što su noradrenalin, TRH, oksitocin, VIP,olecistokinin, serotonin, grelin i dr. (Reinhoffer i sur., 2013).

1.2. HIPERPROLAKTINEMIJA

1.2.1. Epidemiološke značajke hiperprolaktinemije

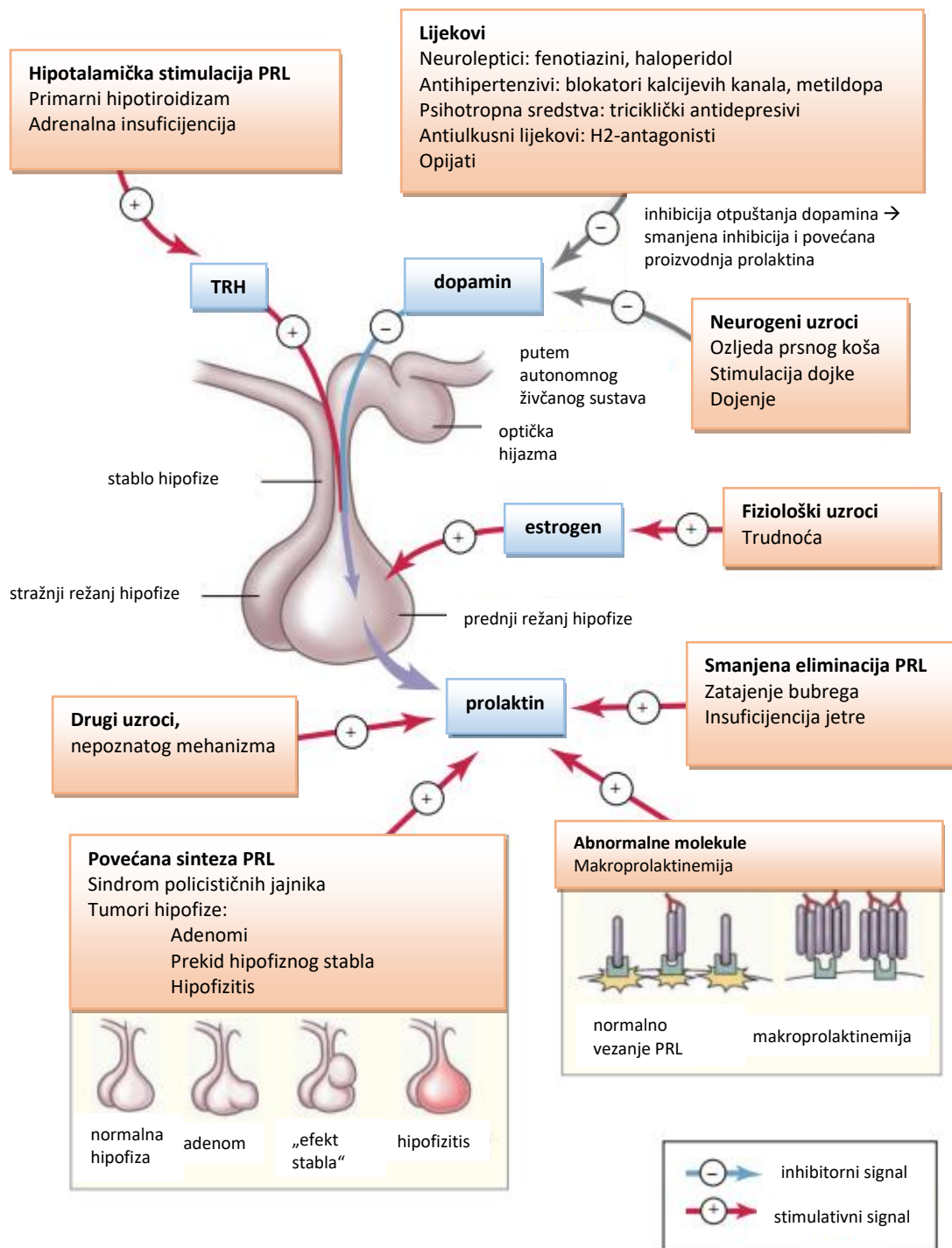
Stanje u kojemu je koncentracija prolaktina u krvi povećana, tj. iznad gornje granice referentnog intervala, zove se hiperprolaktinemija. U ukupnoj populaciji je zastupljena kod 10% ljudi, iako učestalost klinički vidljive hiperprolaktinemije prema studijama ovisi o obilježjima odabrane populacije. Zabilježene prevalencije variraju od 0,4% kod neselektirane zdrave odrasle populacije u Japanu do 5% kod klijenata u klinikama za planiranje obitelji. Udio je još veći kod pacijenata sa specifičnim simptomima koji prate hiperprolaktinemiju. Procjenjuje se da hiperprolaktinemiju ima oko 9% žena među pacijenticama s amenorejom, 25% žena s galaktorejom te čak do 70% žena s amenorejom i galaktorejom. Kod muške populacije prevalencija je oko 5% za muškarce koji su impotentni ili neplodni (Serri i sur., 2003).

1.2.2. Uzroci hiperprolaktinemije

S obzirom na etiopatogenezu, hiperprolaktinemiju možemo klasificirati u dvije skupine: funkcionalnu i organsku hiperprolaktinemiju. Jedan od najčešćih uzroka funkcionalne blage do srednje hiperprolaktinemije su farmakoterapijska sredstva koja inhibiraju lučenje ili djelovanje dopamina na razini hipofize. Tu ubrajamo razne antipsihotike (fenotiazini, haloperidol, risperidon, reserpin), antidepresive (triciklički i tetraciklički antidepresivi, inhibitori monoaminooksidaze, selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina), antihipertenzive (α -metildopa, verapamil), antiemetike (metoklopramid, domperidon), opijate (morfin, metadon), estrogene i dr. Funkcionalna hiperprolaktinemija se često javlja i kod pacijenata sa sindromom policističnih jajnika, bubrežnim zatajenjem, jetrenom cirozom te karcinomom bubrega i pluća. Također je prisutna kod endokrinopatija poput primarnog hipotiroidizma i primarne insuficijencije nadbubrežne žlijezde (Capozzi i sur., 2015). Osim patoloških i farmakoloških uzroka, javlja se i kao posljedica fizioloških čimbenika kao što su razni oblici stresa (veliki fizički napor, hipoglikemija, operacije, ozljeda zida prsnog koša), trudnoća, snošaj te stimulacija dojke sisanjem (Gardner i Shoback, 2007).

Glavni uzrok organske hiperprolaktinemije su prolaktinomi koji čine 40-50% tumora hipofize. Osim prolaktinoma, mogući uzroci mogu biti sarkoidoza, kraniofaringeom, sindrom praznog turskog sedla, vaskularne malformacije, metastaze hipofize ili nefunkcionalni adenomi koji pritišću stablo hipofize (Capozzi i sur., 2015).

Kod određenih pacijenata se ne može naći točan uzrok povišenih vrijednosti prolaktina zbog čega im se postavlja dijagnoza idiopatske hiperprolaktinemije. Smatra se da se u većini takvih slučajeva ne radi o pravoj hiperprolaktinemiji, tj. o povišenoj koncentraciji monomernog oblika prolaktina, nego o povećanoj koncentraciji polimernog oblika kojeg čini kompleks monomernog prolaktina i imunoglobulina G, tzv. makroprolaktina (Kasum i sur., 2011).



Slika 1. Uzroci hiperprolaktinemije (preuzeto i prilagođeno s <http://www.cmaj.ca/content/169/6/575/F1.large.jpg>)

1.2.3. Klinička slika hiperprolaktinemije

Simptomi hiperprolaktinemije su isti bez obzira na uzrok, a razlikuju se s obzirom na spol. Kod premenopausalnih žena sa značajno povišenim koncentracijama prolaktina javlja se galaktoreja i amenoreja kao posljedica hipogonadizma, a nerijetko se javlja i osteopenija. Stupanj hipogonadizma je generalno proporcionalan stupnju povećanja koncentracije

prolaktina. Umjereno povećane koncentracije prolaktina uzrokuju skraćenje luteinske faze, smanjen libido i neplodnost.

Za muškarace s hiperprolaktinemijom je karakterističan smanjen libido, impotencija, smanjena proizvodnja sperme, neplodnost, ginekomastija te u rijetkim slučajevima galaktoreja. Impotencija u ovom slučaju ne odgovara na terapiju testosteronom i javlja se zajedno sa smanjenom mišićnom masom, smanjenom dlakavošću i osteoporozom (Serri i sur., 2003). Budući da su simptomi kod muškaraca teže uočljivi u odnosu na poremećaje menstrualnog ciklusa kod žena, većina prolaktinoma u muškaraca se ne dijagnosticira sve do kasne faze kada se javljaju glavobolje, oštećenje vida zbog pritiska tumora na optičku hijazmu te hipopituitarizam. (Gardner i Shoback, 2007; Burtis i Bruns., 2015).

1.2.4. Laboratorijska dijagnostika hiperprolaktinemije

Za dijagnosticiranje hiperprolaktinemije preporučuje se jedno mjerenje prolaktina iz seruma (Melmed i sur., 2011). Prve metode kojima se određivao prolaktin bile su radioimunokemijske metode koje su danas zamijenile imunokemijske metode na sendvič principu. One se temelje na korištenju dva različita monoklonska protutijela usmjerena na različite epitope molekule prolaktina (Burtis i sur., 2012). U većini laboratorija koriste se automatizirani imunokemijski analizatori koji rade na principu kemiluminiscencije (Beda-Maluga i sur., 2014; Can i sur., 2011; Županić i sur., 2013). Oni su uglavnom standardizirani na treći internacionalni standard za prolaktin (54/500) Svjetske zdravstvene organizacije pročišćen iz humanih ekstrakta hipofize, sastavljen od isključivo monomernog prolaktina molarne mase 23 kDa (Smith i sur., 2007). U praksi se susrećemo s dva glavna analitička izazova koja interferiraju s određivanjem koncentracije prolaktina, makroprolaktinemijom i prozonskim učinkom (Fliers i sur., 2014).

Prozonski učinak (engl. *hook-effect*) je poznati fenomen koji se javlja kod imunokemijskih mjerenja. Kada su koncentracije antigena vrlo visoke dolazi do zasićenja protutijela u tekućoj fazi što sprječava formiranje sendvič kompleksa s protutijelima vezanih na čvrstu fazu. Dolazi do gubitka obilježenog protutijela iz tekuće faze što posljedično vodi do lažno sniženih vrijednosti prolaktina (Fliers i sur., 2014). Ovaj problem se ne javlja na svim analizatorima, a rješava se serijskim razrjeđivanjem uzorka u omjeru 1:100 prije ponavljanja mjerenja (Melmed i sur., 2011).

1.2.5. Interpretacija i dijagnostički značaj hiperprolaktinemije

Zbog velikog broja mogućih uzroka hiperprolaktinemije, prije postavljanja dijagnoze potrebno je dobiti uvid u detaljnu povijest bolesti pacijenta uz fizikalni pregled te podatke o svim lijekovima koje je pacijent primao. Određivanje koncentracije prolaktina u krvi ima najveći značaj u dijagnostici prolaktinoma. Prije svega, potrebno je isključiti druge moguće uzroke hiperprolaktinemije te slikovnim metodama (MRI ili CT) utvrditi prisutnost tumora hipofize. U slučaju hiperprolaktinemije bez kliničkih simptoma ili kod sumnje na hiperprolaktinemiju uzrokovanu stresom preporučuje se ponoviti višekratno određivanje prolaktina uzorkovanjem kroz kanilu iz antekubitalne vene (Whyte i sur., 2015).

Koncentracije prolaktina između 20 µg/L (425 mIU/L) i 200 µg/L (4255 mIU/L) javljaju se kod pacijenata s različitim uzrocima hiperprolaktinemije. Općenito vrijedi da koncentracija prolaktina linearno raste s veličinom prolaktinoma (Serri i sur., 2003). Vrijednosti prolaktina u serumu iznad 6000-8000 mIU/L gotovo uvijek upućuju na laktotropni adenom. Na temelju velike serije histološki potvrđenih slučajeva pacijenata s nefunkcionalnim makroadenomima utvrđeno je da koncentracije prolaktina kod takvih pacijenata gotovo nikada (< 2%) nisu iznad 2500 mIU/L. Koncentracije prolaktina u serumu između 2500 i 8000 mIU/L čine tzv. sivu zonu prema kojoj se ne može sa sigurnošću postaviti dijagnoza (Karavitaki i sur., 2006). Koncentracije iznad 500 µg/L (10638 mIU/L) ukazuju na makroprolaktinom (Capozzi i sur., 2015). Rano postavljanje dijagnoze prolaktinoma je od kritične važnosti jer terapija dopaminskim agonistima poput bromokriptina može značajno smanjiti veličinu tumora i kontrolirati njegovu daljnju progresiju (Burtis i sur., 2012).

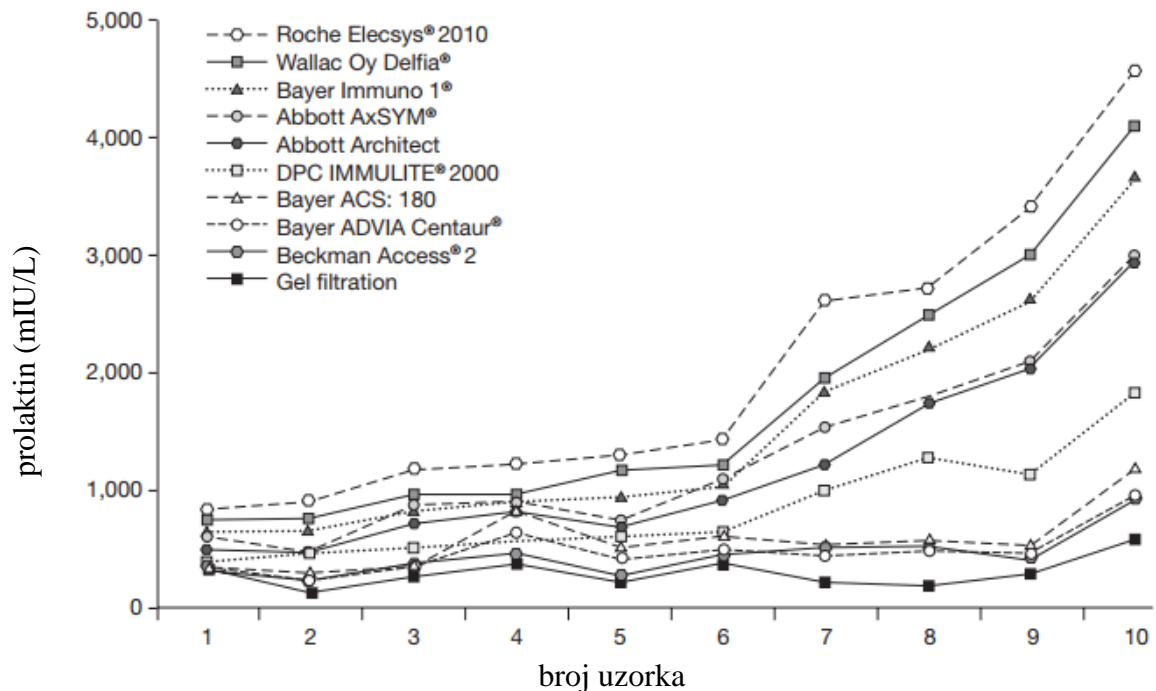
1.3. MAKROPROLAKTINEMIJA

Makroprolaktinemija je stanje u kojemu su koncentracije kompleksa prolaktina i imunoglobulina G značajno povećane u serumu. Zbog svoje velike molekularne mase i promijenjene tercijarne strukture, takav oblik ima duže vrijeme polueliminacije te nema značajnu aktivnost jer se ne može normalno vezati za prolaktinske receptore niti proći kroz endotel krvnih žila do mjesta djelovanja (Can i sur., 2011). Većina pacijenata s makroprolaktinemijom zbog toga nema izražene simptome karakteristične za hiperprolaktinemiju. Unatoč tome, zabilježeni su slučajevi pacijenata s amenorejom, galaktorejom i neplodnošću kod pacijenata u kojih se događa intermitentna disocijacija između auto-protutijela i prolaktina (Lippi i Plebani, 2016;). Dakle, samo na temelju simptoma ne možemo razlikovati pravu hiperprolaktinemiju od makroprolaktinemije zbog

čega se preporučuje uvođenje rutinskih pretraživanja na makroprolaktin za sve pacijente s hiperprolaktinemijom (Jamaluddin i sur., 2013).

Makroprolaktin se stvara u krvi nakon sekrecije monomernog prolaktina, a vjerojatno je posljedica genetičke predispozicije ili posttranslacijskih modifikacija nativnog hormona (glikozilacija, fosforilacija, deamidacija) koje uzrokuju stvaranje auto-protutijela usmjerenih na nove epitope (Vaishya i sur., 2010). Anti-prolaktinska protutijela su pretežno IgG4 podklase imunoglobulina koji nastaju kao posljedica kronične stimulacije antigenima (Hattori i sur., 2005). Iako nema biološki značajan učinak u organizmu, makroprolaktin zadržava imunoreaktivnost na anti-prolaktinska protutijela koja se koriste u komercijalnim imunokemijskim metodama (Lippi i Plebani, 2016).

Zbog nemogućnosti imunokemijskih analizatora da razlikuju monomerni prolaktin i makroprolaktin javlja se problem prividne hiperprolaktinemije. Ukoliko se on ne ukloni, može doći do pogrešne dijagnoze i liječenja pacijenata kojima terapija zapravo nije potrebna (Hattori i sur., 2016). S obzirom na broj i vrstu epitopa koje prepoznaju anti-prolaktinska protutijela, razlikujemo nisko-, srednje i visoko-interferirajuće metode (Vaishya i sur., 2010). Makroprolaktin je pokazao sljedeću križnu reaktivnost kod najčešće korištenih metoda za određivanje koncentracije prolaktina: Roche Elecsys > Bayer Immuno 1 > Abbott AxSYM > Bayer Centaur > Beckman Access, pri čemu je Cenatur pokazao veću varijabilnost u odnosu na druge analizatore (Schneider i sur., 2001). Dokazano je da na imunoreaktivnost utječu i drugi čimbenici jer postoji razlika između reaktivnosti na makroprolaktin kod Roche Enzymun i Elecsys metode koje koriste ista protutijela, ali na različitim čvrstim fazama i sustavima za stvaranje signala. Osim toga, bitno je i vrijeme inkubacije koje je direktno povezano s reaktivnošću na makroprolaktin što je dokazano na Wallacovoj DELFIA (engl. *Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay*) metodi (Fahie-Wilson i sur., 2005). Na slici 2. prikazana je velika varijabilnost u mjerenjima koncentracija prolaktina u uzorcima seruma pacijenata s makroprolaktinemijom komercijalnim imunokemijskim analizatorima.



Slika 2. Srednje koncentracije prolaktina izmjerenih u 10 uzoraka pacijenata s makroprolaktinemijom na 9 različitih imunokemijskih analizatora (preuzeto i prilagođeno iz Smith i sur., 2007).

Unatoč opsežnom znanju i trudu uloženom u rješavanje ovog analitičkog problema, proizvođači još uvijek nisu uspjeli proizvesti protutijelo koje bi bilo usmjereno na epitop specifičan za monomerni prolaktin. Prepoznavanje predanalitičkih čimbenika koji uzrokuju hiperprolaktinemiju (makroprolaktinemija, lijekovi, stres i sl.) značajno smanjuje broj zahtjeva za upotrebu slikovnih tehnika ili primjenu terapije agonistima dopamina (Whyte i sur., 2015). Upravo zbog toga dobra laboratorijska praksa nalaže da je potrebno obaviti pretraživanje na makroprolaktin kod svih pacijenata s hiperprolaktinemijom i odrediti koncentracije prolaktina nakon uklanjanja makroprolaktina iz uzoraka (Kasum i sur., 2012).

1.3.1. Metode eliminacije makroprolaktina

Pretraživanje makroprolaktinemije, odnosno probir na makroprolaktin, provodi se metodom taloženja s polietilen glikolom, a potvrđne i kvalitativne metode uključuju gel filtraciju, afinitetnu kromatografiju na kolonama s proteinom A/G te uporabu prolaktina obilježenog radioaktivnim jodom (^{125}I -PRL). Prednosti i nedostaci spomenutih metoda navedeni su u Tablici 1. (Shimatsu i Hattori, 2012).

Tablica 1. Prednosti i nedostaci metoda koje se koriste za dijagnozu makroprolaktinemije (preuzeta i prilagođena iz Shimatsu i Hattori, 2012)

	<i>Prednosti</i>	<i>Nedostaci</i>
<i>Polietilen glikol</i>	Jednostavna i jeftina metoda Pretraživanje na makroprolaktin	Niska specifičnost
<i>Gel filtracija</i>	Precizna za potvrdu makroprolaktinemije	Dugotrajna i skupa metoda
<i>Protein A/G</i>	Identifikacija prolaktina vezanog za IgG	Skupa metoda
<i>¹²⁵I-PRL vezanje</i>	Identifikacija anti-PRL autoprotutijela	Dugotrajna, korištenje radioaktivnih izvora

Gel filtracija je zlatni standard za otkrivanje makroprolaktinemije i kvantifikaciju molekularnih oblika prolaktina iz seruma, uključujući monomerni oblik, ali je vrlo dugotrajna i skupa zbog čega se u laboratorijima primarno koriste alternativne metode (Parlant-Pinet i sur., 2015; Baban i Farid, 2009). Ukoliko nakon gel filtracije makroprolaktin čini 30-60% ukupnog prolaktina, možemo sa sigurnošću potvrditi da se radi o makroprolaktinemiji (Shimatsu i Hattori, 2012).

U laboratorijima se najčešće koristi metoda taloženja makroprolaktina polietilen glikolom budući da je brza, jednostavna i jeftina. Polietilen glikol je inertni polimer koji uklanja otapalo iz otopine povećavajući efektivnu koncentraciju proteina do prelaska granice topljivosti zbog čega dolazi do njegovog taloženja (Veljkovic i sur., 2012). Nedostaci ove metode su analitička interferencija polietilen glikola s metodama analizatora određenih proizvođača (npr. AxSym (Abbott), Access 2 (Beckman Coulter) i Immulite 2000 (Siemens)) te nedovoljna preciznost u mjerenjima (Quinn i sur., 2006; Beltran i sur., 2008). Dodatni problem koji se javlja je sutaloženje monomernog prolaktina čak do 20% uz makroprolaktin zbog čega je potrebno izraditi posebne referente intervale za prolaktin nakon taloženja prema reprezentativnoj zdravoj populaciji (Overgaard i Møller Pedersen, 2017). Drugo predloženo rješenje je određivanje monomernog prolaktina iz koncentracija prolaktina poslije taloženja polietilen glikolom preko regresijske jednadžbe izvedene iz korelacije između prolaktina nakon taloženja i koncentracija monomernog oblika određenih gel filtracijom. Ovaj pristup bi kompenzirao gubitak monomernog oblika tijekom taloženja PEG-om i omogućio uporabu

uspostavljenih referentnih intervala za prolaktin (McCudden i sur., 2010). U praksi se postupak probira na makroprolaktin na nalazu izvještava na dva načina:

- a) Omjer izmjerenog prolaktin monomera u supernatantu nakon taloženja PEG-om i inicijalno izmjerenog prolaktina u serumu prije taloženja (iskorištenje, engl. *Recovery*). Iskorištenje prolaktina iznad 60% nakon taloženja s PEG-6000 potvrđuje odsutnost makroprolaktina. Područje između 40 i 60% čini sivu zonu u kojoj ne možemo sa sigurnošću reći je li makroprolaktin prisutan ili odsutan. Iskorištenje manje ili jednako 40% govori o prisutnosti značajnih količina makroprolaktina u uzorku (Jamaluddin i sur., 2013).
- a) Koncentracija izmjerenog prolaktin monomera uz prikaz posebnih referentnih intervala za prolaktin koji su izračunati na koncentracijama prolaktina u supernatantu nakon taloženja PEG-om u zdravoj populaciji, tzv. post-PEG referentni intervali (Beda-Maluga i sur., 2014; Smith i Fahie-Wilson, 2010).

Međutim način izvještavanja koncentracije prolaktina nakon provedenog postupka taloženja PEG-om još uvijek nije harmoniziran. U Endokrinološkom laboratoriju KBC Sestre milosrdnice se rezultati izvještavaju samo u obliku koncentracija prije i nakon taloženja prolaktina polietilen glikolom uz pripadni referentni interval za Elecsys imunokemijski analizator (Tablica 2).

Tablica 2. Referentni intervali za prolaktin i prolaktin nakon taloženja polietilen glikolom (preuzeta i prilagođena iz Beltran i sur., 2008)

	<i>Ž</i>	<i>M</i>
<i>PRL (mIU/L)</i>	102-496	86-324
<i>PRL-PEG (mIU/L)</i>	75-381	63-245

Dosada su uspostavljeni referentni intervali za monomerni prolaktin nakon taloženja PEG-om za šest različitih imunokemijskih analizatora pri čemu je korišten PEG molekularne mase 6000 (PEG-6000). Bitno je uzeti u obzir vrstu polietilen glikola koja se koristi za taloženje makroprolaktina jer postoji značajna razlika između koncentracija nakon taloženja s PEG-6000 i PEG-8000. Budući da PEG-8000 nema neku značajnu prednost u odnosu na PEG-6000, preporučuje se korištenje PEG-6000 kako bi se olakšala interpretacija dobivenih rezultata (Veljkovic i sur., 2012).

Druge metode uklanjanja makroprolaktina iz seruma uključuju predobradu uzorka proteinom A ili G, anti-humanim imunoglobulinom G i ultrafiltraciju. U studiji provedenoj

2006. godine Kavanagh i suradnici su usporedili sve prethodno navedene metode s obzirom na zlatni standard. Dokazali su da je srednja vrijednost koncentracija prolaktina određena ultrafiltracijom najbliža onoj dobivenoj gel filtracijom, ali unatoč tome ta metoda ima najniži koeficijent korelacije te je vrlo neprecizna. Predobrada s proteinima A i G te anti-humanim imunoglobulinom G vodi do značajnog precjenjivanja koncentracija monomernog prolaktina. Iako su sve tri metode prihvatljive preciznosti, veliko odstupanje u rezultatima od točne vrijednosti i varijabilnost između uzoraka ograničava njihovu uporabu za uklanjanje makroprolaktina. Mjerenje preostalog prolaktina nakon taloženja polietilen glikolom pokazalo je najbolji koeficijent korelacije s gel filtracijom, iako se rezultati tih dviju metoda i dalje razlikuju zbog sutaloženja monomernog prolaktina polietilenglikolom (Kavanagh i sur., 2006).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Prolaktin je proteinski hormon koji obavlja brojne funkcije u organizmu. Njegovo lučenje je visoko reguliran proces na koji utječu brojni čimbenici. Poremećaj u nekom od tih čimbenika dovodi do stanja hiperprolaktinemije koje je u većini slučajeva posljedica pretjeranog lučenja prolaktina zbog postojećeg tumora hipofize, tj. prolaktinoma. Laboratorijski nalazi su od ključne važnosti za isključivanje određenih mogućih uzroka hiperprolaktinemije i uspostavljanje točne dijagnoze i terapije. Jedan od glavnih analitičkih problema predstavlja makroprolaktinemija koja uzrokuje lažnu hiperprolaktinemiju. Kako bi se spriječilo iracionalno liječenje pacijenata kod kojih se javlja ovakvo benigno stanje potrebno je prethodno obraditi uzorak jednom od metoda za eliminaciju makroprolaktina kako bi se uklonila moguća potencijalna interferencija. U Endokrinološkom laboratoriju probir na prisutnost makroprolaktina provodi se za svaki uzorak kod kojeg je koncentracija prolaktina iznad gornje granice referentnog intervala prema prikazanom protokolu (Slika 3.). U postupku se primjenjuje metoda taloženja makroprolaktina polietilen glikolom. Ciljevi ovog rada bili su:

1. Ispitati incidenciju makroprolaktina u odabranoj populaciji pacijenata s hiperprolaktinemijom.
2. Utvrditi postoji li razlika u prevalenciji makroprolaktinemije između spolova.
3. Usporediti načine izvještavanja rezultata nakon taloženja makroprolaktina.
4. Ispitati mogućnosti racionalizacije postupka taloženja makroprolaktina polietilen glikolom podizanjem granične vrijednosti. Predloženi kriteriji za probir na makroprolaktin su izmjerene koncentracije prolaktina od 700 mIU/L i 1000 mIU/L.
5. Ispitati postoji li statistički značajna razlika u testu iskorištenja kod ispitanika koji su došli ponovno na vađenje krvi nakon godinu dana i kod kojih je postupak taloženja PEG-om ponovljen.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISPITANICI

Istraživanje je provedeno retrospektivno u periodu od siječnja 2016. do rujna 2017. na odraslim pacijentima s koncentracijom prolaktina iznad gornje granice referentnog intervala kod kojih je napravljen probir na makroprolaktin. Obuhvaćeno je 1136 ispitanika, od kojih je 994 bilo ženskog, a 142 muškog spola. Dob ispitanika bila je u rasponu od 18 do 88 godina, s medijanom od 32 godine.

Rutinski su taloženi svi uzorci s koncentracijama prolaktina iznad gornje granice referentnog intervala za odgovarajući spol (Tablica 2.), osim za pacijente čije su vrijednosti prolaktina iznad 10 000 mIU/L. Isključeni su pacijenti s poznatim uzrokom hiperprolaktinemije poput trudnica, dojilja i pacijenata kojima je dijagnosticiran prolaktinom ili onih na terapiji lijekovima koji mogu uzrokovati hiperprolaktinemiju. Prema protokolu na Slici 3. taloženje makroprolaktina se ne ponavlja kod pacijenata kojima su unutar godinu dana ponovljeni zahtjevi s omjerom $> 40\%$. Pacijentima s omjerom $\leq 40\%$ se ponovno provodi taloženje bez obzira na učestalost zahtjeva.

3.2. UZORKOVANJE

Koncentracije prolaktina ovise o brojnim prethodno spomenutim čimbenicima pa tako emocionalni stres, vježbanje ili npr. prehrana bogata proteinima povećavaju njegovu koncentraciju u krvi (Burtis i sur., 2012). Zbog toga pacijenti prije vađenja krvi moraju biti 8 do 10 sati natašte, a preporučeno vrijeme uzorkovanja je najmanje 2 sata nakon buđenja. 30 minuta prije samog vađenja krvi pacijent treba biti u stanju mirovanja (Ignacak i sur., 2012).

Za uzorkovanje krvi korišteni su spremnici Greiner Bio-One GmbH od 4 ili 6 mL, Kremsmuenster, Austria. Uzorci su centrifugirani na centrifugi Hettich Rotanta 460RC 10 minuta na 3100 okretaja po minuti.

3.3. TALOŽENJE PROLAKTINA POLIETILEN GLIKOLOM

3.3.1. Pribor i materijali

Postupak taloženja provodi se prema radnoj uputi za taloženje makroprolaktina polietilen glikolom. U njoj su navedeni potrebni materijali:

- PEG molekularne mase 6000
- staklena čaša 20-50 mL

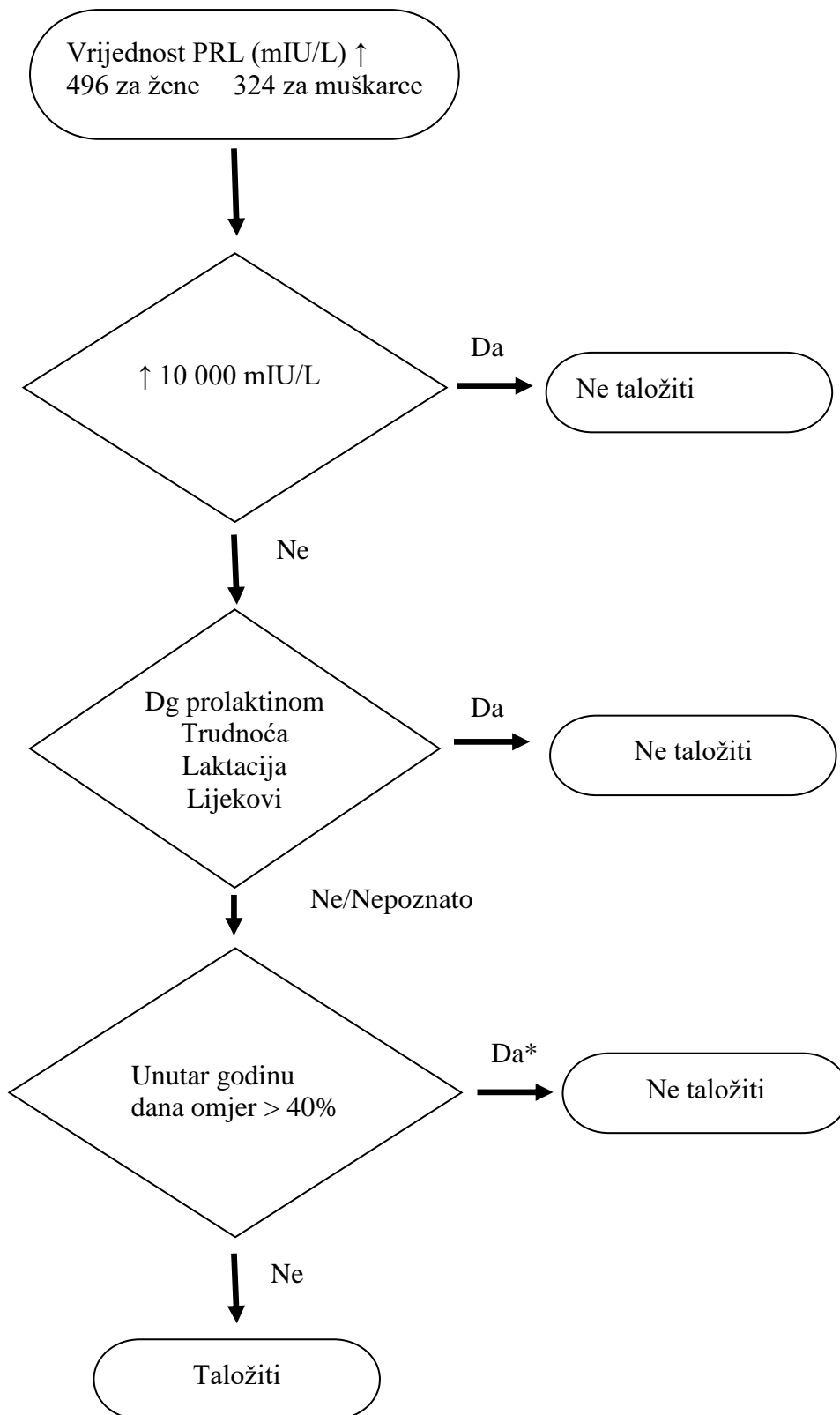
- pipeta od 10 mL
- analitička vaga
- magnetska miješalica i magnet
- epruveta 10-15 mL

- otopina 25% PEG
- pipeta 100-1000 μ L
- Vortex
- prazna plastična epruveta (13x75 mm)
- sample cup/hitachi

Za pripremu 25% otopine polietilen glikola potrebno je odvagati 2,5 grama PEG-a molekularne mase 6000 te ga dodati u 10 mL destilirane vode. Tako pripremljena otopina se stavi na magnetsku miješalicu oko 10 minuta. Pripremljenu otopinu treba staviti u epruvetu označenu s 25% PEG i datumom pripreme.

3.3.2. Načelo i postupak

Prije taloženja potrebno je u LIS-u zadati prolaktin nakon taloženja te ispisati barkod. Njime se označi epruveta u koju se stavi 300 μ L seruma i 300 μ L 25% otopine polietilen glikola. Dobivena smjesa stavi se na Vortex 10 sekundi te potom centrifugira 10 minuta pri 3100 okretaja po minuti. Dobiveni supernatant se odpipetira u hitachi cup koji se prethodno obilježi novim barkodom.



Slika 3. Kriteriji za probir taloženjem polietilen glikolom; *odluca o ponovljenom taloženju za omjer 40-60% po odluci odgovorne osobe

3.4. ODREĐIVANJE PROLAKTINA

3.4.1. Reagensi

Radne otopine potrebne za metodu određivanja prolaktina su:

- Roche Elecsys Prolactin II reagens
- Pomoćne otopine: ProCell M, CleanCell M, Preclean M
- *PreciControl Universal* za provođenje unutarnje kontrole kvalitete
- *Prolactin CalSet II* za kalibraciju reagensa

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

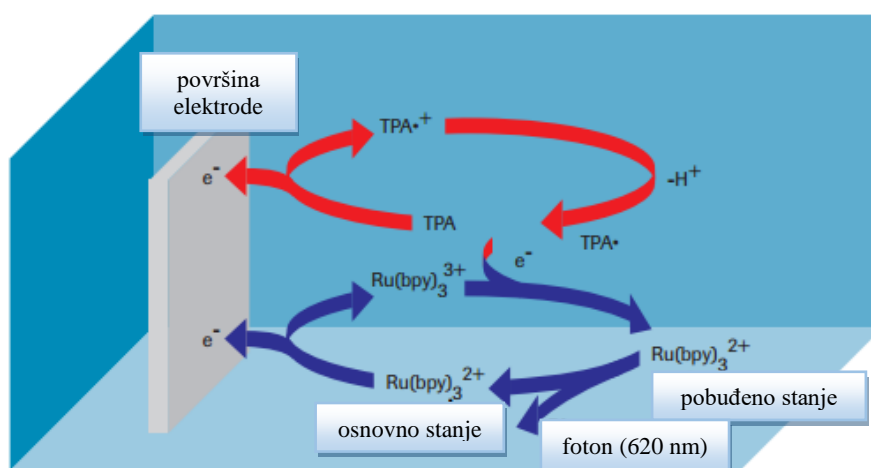
3.4.2. Načelo i postupak

Vrijednosti prolaktina određene su elektrokemiluminescentnom metodom na automatskom analizatoru Cobas e 601 tvrtke Roche Diagnostics. Mjerenje ukupno traje 18 minuta. Analizator mjeri prolaktin na sendvič principu ECLIA (engl. *Electrochemiluminescence Immunoassay*) metode korištenjem dva monoklonska protutijela specifično usmjerena na humani prolaktin (Slika 5.).

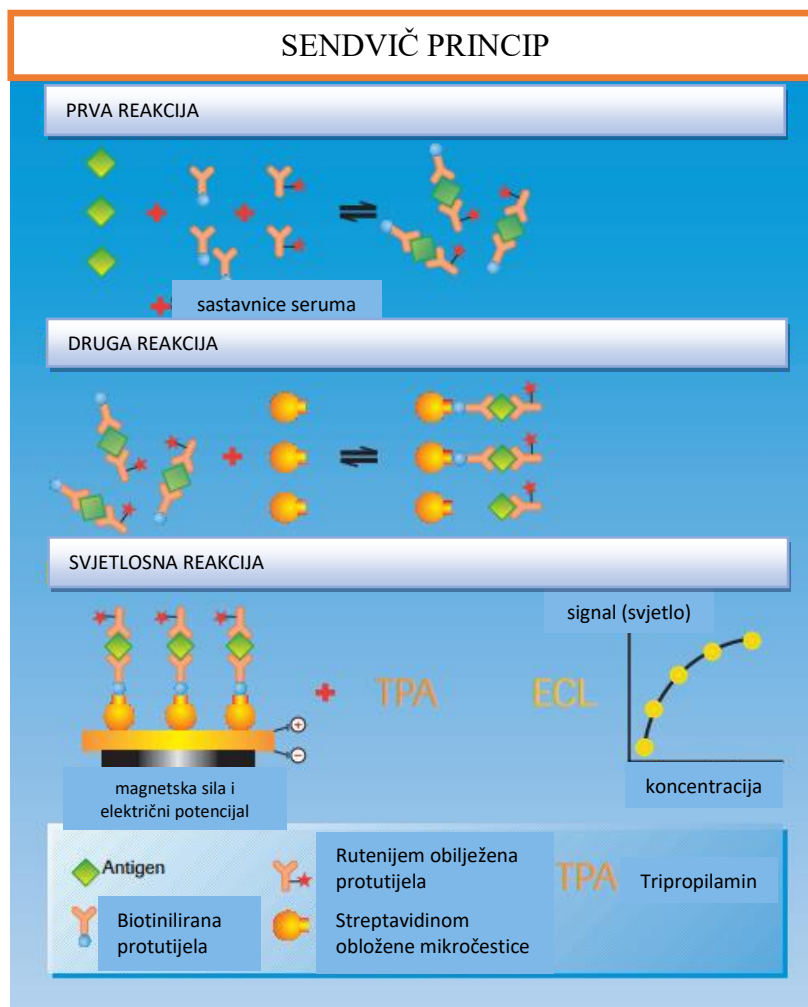
U prvom koraku miješa se 10 μL uzorka s reagensom koji sadrži biotinom obilježena anti-prolaktin protutijela i rutenijem obilježena anti-prolaktin specifična protutijela. Slijedi inkubacija od 9 minuta pri čemu dolazi do vezanja protutijela za molekulu prolaktina u uzorku. U drugom koraku dodaju se streptavidinom obložene paramagnetske mikročestice te potom slijedi inkubacija od 9 minuta. Dolazi do vezanja biotinom obilježenih protutijela na streptavidinom presvučenu površinu mikročestica. Nakon druge inkubacije reakcijska smjesa koja sadrži imunokemijske komplekse prenosi se u mjernu ćeliju. Imunokemijski kompleksi su magnetski zarobljeni na radnoj elektrodi, a nevezani reagens i uzorak se ispiru s ProCell otopinom.

ECLIA metode koriste rutenijev(II)-tris(bipiridil) $[\text{Ru}(\text{byp})_3]^{2+}$ kompleks i tripropilamin (TPA), dvije elektrokemijski aktivne supstance ključne u reakcijama koje vode do emisije svjetlosti. Objе supstance su stabilne sve dok se ne primijeni napon. Reakcija između rutenij-tris(bipiridil)²⁺ i tripropilamina odvijaju se na površini elektrode od platine (Slika 4.). Primjenom napona stvara se električno polje na koje sve supstance unutar njega reagiraju pa tako dolazi do oksidacije TPA pri čemu nastaje slobodni TPA radikal koji uzrokuje prijelaz rutenijevog kompleksa iz osnovnog u pobuđeno stanje.

Pobuđeni oblik je vrlo nestabilan zbog čega brzo dolazi do prelaska u osnovno stanje uz emisiju fotona na 620 nm. Tako završeni ciklus se može ponavljati. Budući da se rutenijev kompleks u osnovnom stanju kontinuirano obnavlja, može se koristiti u sljedećim ciklusima. Iz jednog kompleksa antigen-protutijelo može se stvoriti mnogo fotona. Upravo zbog toga dolazi do amplifikacijskog efekta koji pridonosi osjetljivosti metode. Emisija svjetlosti mjeri se pomoću luminometra, a količina proizvedenog zračenja direktno je proporcionalna količini prolaktina u uzorku. Koncentracija prolaktina evaluirana je i izračunata prema kalibracijskoj krivulji koja je uspostavljena na temelju standarda poznate koncentracije prolaktina.



Slika 4. Elektrokemiluminiscentna reakcija na površini elektrode (preuzeto i prilagođeno s http://www.unitedlabs.com.kw/sopdoc/training_files/cobas/cobas.pdf)



Slika 5. Sendvič princip ECLIA metode (preuzeto i prilagođeno s http://www.unitedlabs.com.kw/sopdoc/training_files/cobas/cobas.pdf)

3.5. STATISTIČKE METODE

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2016, Microsoft office (Microsoft USA) i MedCalc v.17.8.6. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Normalnost raspodjele podataka ispitana je D'Agostino-Pearsonovim testom. Statistički značajna razlika u pojavnosti makroprolaktina između spolova ispitana je Fisherovim egzaktnim testom. Wilcoxonov parni test je primijenjen za ispitivanje statistički značajne razlike u skupini pacijenata kod kojih je ponovljeno taloženje prolaktina prema priloženom protokolu prikazanom na Slici 3. Svi rezultati interpretirat će se na razini statističke značajnosti $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. DESKRIPTIVNA STATISTIKA REZULTATA MJERENJA

U istraživanju je sudjelovalo 1136 odraslih pacijenata, od kojih je 994 bilo ženskog, a 142 muškog spola. Od ukupnog broja pacijenata, njih 37 (1 muškarac i 36 žena) je imalo iskorištenje (engl. *Recovery*) prolaktina u supernatantu manje ili jednako 40% što upućuje na prisutnost povećanih količina makroprolaktina u uzorku. U ispitivanoj skupini incidencija makroprolaktina bila je 3,26%.

U Tablici 3. prikazana je raspodjela podataka s obzirom na dob i spol te medijan i interkvartilni raspon vrijednosti inicijalnih mjerenja prolaktina u serumu, koncentracije prolaktina u supernatantu nakon taloženja polietilen glikolom te iskorištenja. Fischerovim egzaktnim testom smo ispitali postoji li statistički značajna razlika u udjelu makroprolaktina prema spolu ($P = 0,0754$).

Tablica 3. Prikaz raspodjele makroprolaktina i koncentracije prolaktina po spolu u ispitivanoj populaciji.

	<i>M</i>	<i>Ž</i>	<i>Ukupno</i>
<i>N</i>	142	994	1136
<i>Dob medijan (min-max)</i>	47,5 (18,0 – 88,0)	31,0 (18,0 – 79,0)	32,0 (18,0 – 88,0)
<i>PRL mIU/L medijan (IQR)</i>	543,35 (447,80 – 825,60)	676,05 (563,30 – 978,20)	664,40 (550,80 – 964,55)
<i>PRL-PEG mIU/L medijan (IQR)</i>	438,00 (371,80 – 691,80)	540,30 (453,00 – 789,00)	532,80 (441,90 – 770,40)
<i>PRL% medijan (IQR)</i>	86,11 (82,46 – 90,28)	83,61 (78,64 – 87,48)	84,01 (78,91 – 87,91)

N - broj pacijenata s iskorištenjem > 40%

IQR – interkvartilni raspon

PRL – koncentracija prolaktina prije taloženja polietilen glikolom

PRL-PEG – koncentracija prolaktina nakon taloženja polietilen glikolom

PRL% - iskorištenje prolaktina u supernatantu

U tablici 4. prikazan je broj pacijenata s obzirom na način izvještavanja rezultata nakon taloženja makroprolaktina polietilen glikolom. Od ukupno 1136 pacijenata, 37 je imalo iskorištenja manje ili jednako od 40% što označava pseudohiperprolaktinemiju, tj. prisutnost velikih količina makroprolaktina koji lažno povisuju koncentraciju monomernog prolaktina.

Među njima je 31 pacijent prema post-PEG referentnim intervalima također klasificiran u grupu s makroprolaktinemijom jer su koncentracije prolaktina nakon taloženja unutar granica pripadnog referentnog intervala. Posebnu kategoriju čini 6 pacijenata kod kojih iskorištenje upućuje na makroprolaktinemiju, a post-PEG referentni intervali na pravu hiperprolaktinemiju.

Tablica 4. Raspodjela pacijenata s obzirom na iskorištenje i post-PEG referentne intervale

	<i>HPRL (+)</i>	<i>HPRL (-)</i>
<i>PRL% ≤ 40%</i>	6	31
<i>PRL% > 40%</i>	1070	29

HPRL (+) – prava hiperprolaktinemija (koncentracije prolaktina nakon taloženja iznad gornje granice post-PEG referentnog intervala)

HPRL (-) – pseudohiperprolaktinemija (koncentracije prolaktina nakon taloženja unutar granica post-PEG referentnog intervala)

U tablici 5. prikazan je broj pacijenata kod kojih bi se primijenio protokol taloženja s PEG-om prema predloženim graničnim koncentracijama prolaktina i ukupan broj otkrivenih pseudohiperprolaktinemija s obzirom na postavljene kriterije. Skupina A označava praćenje standardnog protokola koji obuhvaća sve pacijente s koncentracijama prolaktina iznad gornje granice referentnog intervala. Skupina B odnosi se na sve pacijente koji imaju koncentraciju prolaktina iznad 700 mIU/L, a skupina C na sve pacijente koji imaju koncentraciju prolaktina iznad 1000 mIU/L.

Tablica 5. Broj pacijenata prema skupinama i s obzirom na prisutnost makroprolaktinemije

<i>Skupina</i>	<i>N</i>	<i>N (MaPRL)</i>
<i>A</i>	1136	37
<i>B</i>	515	18
<i>C</i>	267	7

N - ukupan broj pacijenata

N (MaPRL) - broj pacijenata s $PRL\% \leq 40\%$

A - standardni protokol (iznad GGRI za PRL)

B - $PRL > 700$ mIU/L

C - $PRL > 1000$ mIU/L

4.2. STATISTIČKA ANALIZA PONAVLJANIH MJERENJA

Za pacijente kod kojih je prema već opisanom vremenskom periodu ponavljen postupak taloženja PEG-om ispitivali smo postoji li statistički značajna razlika između dva mjerenja pomoću Wilcoxonovog parnog testa (Tablica 6.)

Korišteni su podaci svih pacijenata s ponavljanim mjerenjima za omjer prolaktina nakon taloženja polietilen glikolom i prolaktina (PRL%, iskorištenje). Isti test proveden je i za pacijente koji ne obuhvaćaju sivu zonu mjerenja (iskorištenje > 60%), one koji obuhvaćaju sivu zonu (iskorištenje > 40%) te pacijente koji imaju makroprolaktinemiju (iskorištenje ≤ 40%).

Tablica 6. Rezultati Wilcoxonovog parnog testa za ponavljana mjerenja PRL%

<i>Skupina</i>	<i>N</i>	<i>P-vrijednost</i>
<i>A</i>	71	0,0001
<i>B</i>	52	0,0002
<i>C</i>	65	0,0001
<i>D</i>	6	NP

A - svi pacijenti kojima su ponavljana mjerenja

B - pacijenti s ponavljanim mjerenjima čije su vrijednosti iskorištenja > 60%

C - pacijenti s ponavljanim mjerenjima čije su vrijednosti iskorištenja > 40%

D - pacijenti s ponavljanim mjerenjima čije su vrijednosti iskorištenja ≤ 40%

NP - nije primjenjivo

5. RASPRAVA

U općoj populaciji prevalencija makroprolaktinemije iznosi oko 3-4% bez obzira na spol, a za pacijente s hiperprolaktinemijom ona varira između 15 i 35% (prosječni udio 25%) ovisno o korištenoj metodologiji i karakteristikama ispitivane populacije (Shimatsu i Hattori, 2012; Favresse i sur., 2017; Kasum i sur., 2017). Analizom prikupljenih podataka incidencija makroprolaktinemije u ispitivanoj populaciji iznosi 3,26% što je niže odnosu na prethodne studije. Nije utvrđena statistički značajna razlika između spolova kao što se pokazalo u većini ostalih istraživanja.

Postupak taloženja makroprolaktina polietilen glikolom je jednostavan način za uklanjanje polimernog oblika prolaktina iz krvi pri čemu se računa iskorištenje (engl. *Recovery*), tj. omjer izmjerene prolaktin monomera u supernatantu nakon taloženja polietilen glikolom i prethodno izmjerene prolaktina u serumu prije taloženja. Vrijednost iskorištenja omogućava razlikovanje prave hiperprolaktinemije i pseudohiperprolaktinemije uzrokovane interferencijom makroprolaktina. Najčešća predložena granična vrijednost iskorištenja za taloženje polietilen glikolom iznosi 40% pri čemu vrijednosti jednake ili manje od 40% upućuju na makroprolaktinemiju, dok vrijednosti veće od 40% upućuju na pravu hiperprolaktinemiju. Razlikovanje patološkog od benignog stanja ovisi o graničnoj vrijednosti koja nije zadovoljavajuće dijagnostičke specifičnosti i može dovesti do krive interpretacije u uzorcima koji imaju povećanu razinu monomernog prolaktina istovremeno s makroprolaktinom (Samson i sur., 2015). Zbog toga se preporučuje uz iskorištenje koristiti i referentne intervale nakon taloženja polietilen glikolom, tzv. post-PEG referentne intervale (Smith i Fahie-Wilson, 2010). U studiji iz 2014., Beda-Maluga i sur. usporedili su podudarnost u detekciji makroprolaktinemije korištenjem granične vrijednosti za iskorištenje od 40% i post-PEG referentnih intervala. Uočili su da je u 57% uzoraka iskorištenje manje ili jednako 40% pri čemu su koncentracije prolaktina nakon taloženja bile unutar granica post-PEG referentnog intervala koje predlaže proizvođač. S druge strane, kod 43% pacijenata s makroprolaktinemijom (iskorištenje manje ili jednako 40%) izmjerena koncentracija prolaktina bila je iznad gornje granice post-PEG referentnog intervala što označava pravu hiperprolaktinemiju (Beda-Maluga i sur., 2014). U našoj studiji je 83,78% uzoraka imalo iskorištenje manje ili jednako 40% uz koncentraciju prolaktina unutar post-PEG referentnih intervala, dok je 16,22% uzoraka prema iskorištenju imalo makroprolaktinemiju, iako su im

koncentracije prolaktina nakon taloženja ostale iznad gornje granice post-PEG referentnih intervala.

Pretraživanje na makroprolaktin prvenstveno se provodi kako bi se spriječilo nepotrebno liječenje zdravih pacijenata s lažnom hiperprolaktinemijom. Osim toga, omogućava i uštedu jer je smanjen broj slikovnih pretraga i korištenja lijekova (Gibney i sur., 2005). Unatoč tome, de Soárez i sur. su u studiji iz 2009. uočili da ušteda nije veoma značajna budući da liječnici i dalje naručuju dodatne pretrage bez obzira na laboratorijske rezultate (de Soárez i sur., 2009). S ciljem smanjenja broja nepotrebnih dodatnih testiranja na makroprolaktin, pokušali smo podići graničnu vrijednost za provođenje taloženja polietilen glikolom, ali su rezultati pokazali da bi se na taj način propustio značajan broj pacijenata s lažnom hiperprolaktinemijom. Podizanjem granične vrijednosti na 700 mIU/L propustilo bi se 19 pacijenata, a korištenjem granične vrijednosti od 1000 mIU/L čak njih 30, stoga dosadašnji protokol koji koristi gornju granicu referentnog intervala kao graničnu vrijednost ima opravdanu primjenu.

Patogeneza makroprolaktinemije nije još u potpunosti poznata. Postoje razne studije u kojima se istražuje povezanost stvaranja anti-prolaktinskih protutijela i različitih autoimunih bolesti poput sistemskog eritemskog lupusa, iako do sada nije utvrđena korelacija između ta dva fenomena. Smatra se da najveću ulogu imaju genetski i okolišni čimbenici koji utječu na imunološki odgovor organizma na sličan način kao i kod drugih autoimunih bolesti. Nastala protutijela ostaju stabilna kroz duži period života (duže od 10 godina) zbog čega se može reći da je makroprolaktinemija kronično stanje (Kasum i sur., 2017). Upravo zbog toga, potrebno je provoditi inicijalni probir na makroprolaktin kod svih novih pacijenata s hiperprolaktinemijom te ponavljati postupak za svako kontrolno određivanje kod pacijenata kojima je već utvrđena makroprolaktinemija. U studiji iz 2012., Hattori i sur. pratili su unutar 4 godina pacijente s utvrđenom makroprolaktinemijom te utvrdili da se udio makroprolaktina u serumu značajno ne mijenja u tom razdoblju (Hattori i sur., 2012). Ograničenje naše studije je nedovoljan broj pacijenata s makroprolaktinemijom kojima se opetovano izvodio probir da bi se moglo zaključiti postoji li statistički značajna razlika između mjerenja. S druge strane, htjeli smo također utvrditi postoji li potreba za ponavljanjem probira na makroprolaktin kod pacijenata koji dolaze kontrolirati hiperprolaktinemiju nakon godinu dana. Dosadašnja dugoročna praćenja pacijenata upućuju da se makroprolaktinemija razvija prije srednjih godina pa mogućnost pojave ove interferencije kod pacijenata koji ju prethodno nisu razvili i dalje postoji (Shimatsu i Hattori, 2012). Ispitali smo postoji li statistički značajna razlika između mjerenja kod svih pacijenata

kojima je probir ponavljen te s obzirom na skupinu u koju ih svrstavamo prema iskorištenju. Kod svih pacijenata kojima je utvrđena prava hiperprolaktinemija, bez obzira nalaze li se u sivoj zoni ili iznad nje, postoji statistički značajna razlika između ponavljanih mjerenja što upućuje na zaključak da postoji potreba za ponavljanjem probira nakon godinu dana.

6. ZAKLJUČCI

1. Incidencija makroprolaktinemije u ispitivanoj populaciji je 3,26% što je niže u odnosu na druge studije kod kojih je prosjek oko 25%.
2. Prevalencija makroprolaktinemije u populaciji nije statistički značajno različita između muškaraca i žena što se podudara s rezultatima ostalih istraživanja.
3. Rezultate nakon taloženja makroprolaktina polietilen glikolom trebalo bi izvještavati u obliku postotka iskorištenja te kao apsolutni broj uz pripadajuće post-PEG referentne intervale kako se ne bi propustili pacijenti kod kojih je prisutna makroprolaktinemija uz pravu hiperprolaktinemiju.
4. Racionalniji pristup uz podizanje graničnih vrijednosti nije se pokazao opravdanim jer bi se na taj način propustio znatan broj pacijenata s lažnom hiperprolaktinemijom.
5. Dosadašnji postupak ponovljenog taloženja koji se primjenjuje na bolesnike koji opetovano dolaze kontrolirati hiperprolaktinemiju, pokazao se opravdanim, budući da postoji statistički značajna razlika u izmjerenim koncentracijama prolaktina.

7. LITERATURA

Baban RS, Farid YY. Comparison between Serum Prolactin Levels Determined by VIDAS and RIA Techniques. *Iraqi J Med Sci*, 2009, 7(4), 20-26.

Beda-Maluga K, Pisarek H, Komorowski J, Swietoslowski J, Fuss-Chmielewska J, Winczyk K. Evaluation of hyperprolactinaemia with the use of the intervals for prolactin after macroforms separation. *J Physiol Pharmacol*, 2014, 65(3), 359-364.

Beltran L, Fahie-Wilson MN, McKenna TJ, Kavanagh L, Smith TP. Serum Total Prolactin and Monomeric Prolactin Reference Intervals Determined by Precipitation with Polyethylene Glycol: Evaluation and Validation on Common ImmunoAssay Platforms. *Clin Chem*, 2008, 54(10), 1673-1681.

Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Pituitary Function and Pathophysiology. U: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Wurm-Cutter E, urednica, St. Louis, Missouri, Elsevier, 2012, str. 1820-1824.

Burtis CA, Bruns DE. Disorders of the Pituitary Gland. U: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Sawyer BG, urednica, St. Louis, Missouri, Elsevier, 2015, str. 776-777.

Can M, Guven B, Atmaca H, Acikgoz S, Mungan G. Clinical characterization of patients with macroprolactinemia and monomeric hyperprolactinemia. *Kaohsiung J Med Sci*, 2011, 27, 173-176.

Capozzi A, Scambia G, Pontecorvi A, Lello S. Hyperprolactinemia: pathophysiology and therapeutic approach. *Gynecol Endocrinol*, 2015, 31(7), 506-510.

de Soárez PC, Souza SC, Vieira JG, Ferraz MB. The effect of identifying macroprolactinemia on health-care utilization and costs in patients with elevated serum prolactin levels. *Value Health*, 2009, 12(6), 930-934.

Fahie-Wilson MN, John R, Ellis AR. Macroprolactin; high molecular mass forms of circulating prolactin. *Ann Clin Biochem*, 2005, 42, 175-192.

Favresse J, Bastin P, Fillée C, Luyckx F, Maiter D, Gruson D. Tracking Macroprolactin : Use of an optimized polyethylene glycol precipitation method more compatible with the

requirements and processes of automated core laboratories. *J Appl Lab Med*, 2017, 01, 661-667.

Fliers E, Korbonits M, Romjin JA. Hyperprolactinemia and prolactinoma. U: Handbook of Clinical Neurology. Elsevier, 2014, str. 186-187.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiol Rev*, 2000, 80(4), 1529-1532.

Gardner DG, Shoback D. Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology. U: Hypothalamus & Pituitary Gland. Shanahan J, Linskey P, urednici, New York, Mc Graw-Hill, 2007, str. 120, 142-143.

Gibney J, Smith TP, McKenna TJ. The Impact on Clinical Practice of Routine Screening for Macroprolactin. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(7), 3927-3932.

Hattori N, Adachi T, Ishihara T, Shimatsu A. The natural history of macroprolactinaemia. *Eur J Endocrinol*, 2012, 166(4), 625-629.

Hattori N, Aisaka K, Shimatsu A. A possible cause of the variable detectability of macroprolactin by different immunoassay systems. *Clin Chem Lab Med*, 2016, 54(4), 603-608.

Hattori N, Ikekubo K, Nakaya Y, Kitagawa K, Inagaki C. Immunoglobulin G Subclasses and Prolactin (PRL) Isoforms in Macroprolactinemia Due to Anti-PRL Autoantibodies. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(5), 3036-3044.

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.

Jamaluddin FA, Sthaneshwar P, Hussein Z, Othman N, Chan SP. Importance of screening for macroprolactin in all hyperprolactinaemic sera. *Malays J Pathol*, 2013, 35(1), 59-63.

Karavitaki N, Thanabalasingham G, Shore HCA, Trifanescu R, Ansorge O, Meston N, Turner HE, Wass JAH. Do the limits of serum prolactin in disconnection hyperprolactinaemia need re-definition? A study of 226 patients with histologically verified non-functioning pituitary macroadenoma. *Clin Endocrinol*, 2006, 65, 524-529.

Kasum M, Pavičić-Baldani D, Stanić P, Orešković S, Šarić JM, Blajić J, Juras J. Importance of macroprolactinemia in hyperprolactinemia. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2014, 183, 28-32.

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.

Kavanagh L, McKenna TJ, Fahie-Wilson MN, Gibney J, Smith TP. Specificity and Clinical Utility of Methods for the Detection of Macroprolactin. *Clin Chem*, 2006, 52(7), 1366-1372.

Lippi G, Plebani M. Macroprolactin: searching for a needle in a haystack?. *Clin Chem Lab Med*, 2016, 54(4), 519-522.

McCudden CR, Sharpless JL, Grenache DG. Comparison of multiple methods for identification of hyperprolactinemia in the presence of macroprolactin. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(3-4), 155-160.

Melmed S, Casanueva FF, Hoffman AR, Kleinberg DL, Montori VM, Schlechte JA, Wass JAH. Diagnosis and Treatment of Hyperprolactinemia: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(2), 273-288.

Overgaard M, Møller Pedersen S. Serum prolactin revisited: parametric reference intervals and cross platform evaluation of polyethylene glycol precipitation-based methods for discrimination between hyperprolactinemia and macroprolactinemia. *Clin Chem Lab Med*, 2017, 55(11), 1744-1753.

Parlant-Pinet L, Harthé C, Roucher F, Morel Y, Borson-Chazot F, Raverot G, Raverot V. Macroprolactinaemia: a biological diagnostic strategy from the study of 222 patients. *Eur J Endocrinol*, 2015, 172(6), 687-695.

Reinhoffer V, Oláh M, Vecsernyés M, Tóth BE, Nagy GM. The Regulation of Pituitary Prolactin Secretion: Hypothalamic, Intrapituitary and Intracellular Factors and Signaling Mechanisms, Prolactin. U: Prolactin. Nagy GM, Toth BE, urednici, InTech, 2013, DOI: 10.5772/55571. Dostupno na: <https://www.intechopen.com/books/prolactin/the-regulation-of-pituitary-prolactin-secretion-hypothalamic-intrapituitary-and-intracellular-factor>

Quinn AM, Rubinas TC, Garbincius J, Holmes EW. Determination of ultrafilterable prolactin: elimination of macroprolactin interference with a monomeric prolactin-selective sample pretreatment.. *Arch Pathol Lab Med*, 2006, 130, 1807-1812.

Samson SL, Hamrahian AH, Ezzat S. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology Disease State Clinical Review: Clinical Relevance of Macroprolactin in the Absence or Presence of True Hyperprolactinemia. *Endocr Pract*, 2015, 21(12), 1427-1435.

Schneider W, Marcovitz S, Al-Shammari S, Chevalier S. Reactivity of macroprolactin in common automated immunoassays. *Clin Biochem*, 2001, 34(6), 469-473.

Serri O, Chik CL, Ur E, Ezzat S. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *Can Med Assoc J*, 2003, 169(6), 575-581.

Shimatsu A, Hattori N. Macroprolactinemia: Diagnostic, Clinical, and Pathogenic Significance. *Clin Dev Immunol*, 2012, 2012, ID 167132, 1-7.

Smith TP, Fahie-Wilson MN. Reporting of Post-PEG Prolactin Concentrations: Time to Change. *Clin Chem*, 2010, 56(3), 484-490.

Smith TP, Kavanagh L, Healy ML, McKenna TJ. Technology Insight: measuring prolactin in clinical samples. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007, 3(3), 279-289.

Spiegel K, Follenius M, Simon C, Saini J, Ehrhart J, Brandenberger G. Prolactin Secretion and Sleep. *Sleep*, 1994, 17(1), 20-27.

Vaishya R, Gupta R, Arora S. Macroprolactin; A Frequent Cause of Misdiagnosed Hyperprolactinemia in Clinical Practice. *J Reprod Infertil*, 2010, 11(3), 161-167.

Veljkovic K, Servedio D, Don-Wauchope AC. Reporting of post-polyethylene glycol prolactin: precipitation by polyethylene glycol 6000 or polyethylene glycol 8000 will change reference intervals for monomeric prolactin. *Ann Clin Biochem*, 2012, 49, 402-404.

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.

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 koncentracije prolaktina u serumu ima najveći klinički značaj u diferencijalnoj dijagnostici hiperprolaktinemije. Budući da je fiziologija djelovanja i regulacije lučenja prolaktina u krvi vrlo složena, postoje različiti čimbenici koji utječu na vrijednosti izmjerenih koncentracija. Jedan od glavnih analitičkih interferenata prilikom određivanja koncentracija prolaktina u serumu je povećana prisutnost polimernog oblika, makroprolaktina.

Ciljevi ovoga rada bili su ispitati učestalost makroprolaktinemije u ispitivanoj populaciji te utvrditi postoji li statistički značajna razlika u prevalenciji između spolova. Također je napravljena usporedba načina izvještavanja rezultata nakon taloženja makroprolaktina polietilen glikolom te ispitana mogućnost racionalizacije postupka taloženja podizanjem granične vrijednosti na 700 mIU/L, tj. 1000 mIU/L. Wilcoxonovim parnim utvrđeno je postoji li statistički značajna razlika u testu iskorištenja (engl. *Recovery*) kod ispitanika kojima je postupak taloženja polietilen glikolom ponovljen nakon godinu dana.

Ispitivanje je provedeno na 1136 uzoraka seruma odraslih pacijenata prikupljenih u razdoblju od siječnja 2016. do rujna 2017. kojima su koncentracije prolaktina bile iznad gornje granice referentnog intervala. Koncentracije prolaktina prije i nakon taloženja polietilen glikolom izmjerene su elektrokemiluminiscentnom metodom na analizatoru Cobas e601. Koncentracije prolaktina koje su unutar referentnog intervala nakon taloženja smatraju se lažnim hiperprolaktinemijama.

Prema rezultatima ispitivanja utvrđena je učestalost makroprolaktinemije u ispitanoj populaciji od 3,26% pri čemu nema statistički značajne razlike između muškaraca i žena u prevalenciji makroprolaktinemije. Usporedbom načina izvještavanja rezultata nakon taloženja makroprolaktina polietilen glikolom uočena je važnost paralelnog prikazivanja postotka iskorištenja uz apsolutne vrijednosti koncentracija prolaktina nakon taloženja i pripadnih post-PEG referentnih intervala. Podizanje graničnih vrijednosti nije opravdano jer bi se propustio veliki broj pacijenata s makroprolaktinemijom, a rezultati Wilcoxonovog parnog testa potvrđuju potrebu za ponavljanjem taloženja polietilen glikolom nakon godinu dana za sve pacijente s hiperprolaktinemijom.

8.2. SUMMARY

Determination of serum prolactin concentration has the highest clinical relevance in the differential diagnosis of hyperprolactinemia. Since the physiological activity and regulation of prolactin secretion is very complex, there are many different factors that affect prolactin serum concentration to consider. Macroprolactin, a polymeric form of prolactin, is the major cause of falsely increased prolactin.

Aims of this study were to establish the prevalence of macroprolactinaemia in our study population and to see whether there is a statistically significant difference between men and women. A comparison of the method of reporting the results after the precipitation of macroprolactin with polyethylene glycol was also made, as well as the possibility of rationalizing the precipitation process by increasing the limit value to 700 mIU/L, i.e. 1000 mIU/L. Wilcoxon's paired test was used to determine whether there was a statistically significant difference in recovery in subjects whose polyethylene glycol precipitation was repeated after one year.

The study was conducted on 1136 adult patients' sera samples which were collected from January 2016 to September 2017. All samples had prolactin above corresponding upper reference limit. Measurements before and after PEG-precipitation were performed with electrochemiluminescence method on Cobas e601 analyzer. Post-PEG prolactin concentrations that fall within corresponding reference interval are considered false hyperprolactinemia.

According to the results of the study, the incidence of macroprolactinemia in the examined population was 3.26%, with no statistically significant difference between men and women. By comparing the method of reporting the results after the precipitation of macroprolactin with polyethylene glycol, the importance of the parallel representation of the percentage of recovery and absolute values of prolactin concentrations after precipitation, along with corresponding post-PEG reference intervals, was observed. Raising the limit values is not justified because a large number of patients with macroprolactinemia would be missed, and Wilcoxon's paired test results confirmed the need to repeat the precipitation with polyethylene glycol after a period of one year for all patients with hyperprolactinaemia.

9. PRILOZI

9.1. POPIS KRATICA

PRL-R – prolaktinski receptor

PRL – prolaktin

ACTH – adrenokortikotropni hormon

PIF – faktori inhibicije prolaktina

PRF – faktori otpuštanja prolaktina

TRH – hormon koji otpušta tireotropin

VIP – vazoaktivni intestinalni peptid

MRI – magnetska rezonancija

CT – kompjuterska tomografija

IgG – imunoglobulin G

PEG – polietilen glikol

LIS – laboratorijski informacijski sustav

ECLIA – elektrokemiluminiscentna imunometoda

TPA – tripropilamin

MaPRL - makroprolaktin

PRL-PEG – koncentracija prolaktina nakon taloženja polietilen glikolom

PRL% - iskorištenje prolaktina u supernatantu

HPRL - hiperprolaktinemija

MAKROPROLAKTIN – RACIONALNA UPOTREBA PROBIRNOG TESTA U DIJAGNOSTICI HIPERPROLAKTINEMIJE

Milica Šostarić

SAŽETAK

Određivanje koncentracije prolaktina u serumu ima najveći klinički značaj u diferencijalnoj dijagnostici hiperprolaktinemije. Budući da je fiziologija djelovanja i regulacije lučenja prolaktina u krvi vrlo složena, postoje različiti čimbenici koji utječu na vrijednosti izmjerenih koncentracija. Jedan od glavnih analitičkih interferenata prilikom određivanja koncentracija prolaktina u serumu je povećana prisutnost polimernog oblika, makroprolaktina. Ciljevi ovoga rada bili su ispitati učestalost makroprolaktinemije u ispitivanoj populaciji te utvrditi postoji li statistički značajna razlika u prevalenciji između spolova. Također je napravljena usporedba načina izvještavanja rezultata nakon taloženja makroprolaktina polietilen glikolom te ispitana mogućnost racionalizacije postupka taloženja podizanjem granične vrijednosti na 700 mIU/L, tj. 1000 mIU/L. Wilcoxonovim parnim utvrđeno je postoji li statistički značajna razlika u testu iskorištenja (engl. Recovery) kod ispitanika kojima je postupak taloženja polietilen glikolom ponovljen nakon godinu dana. Ispitivanje je provedeno na 1136 uzoraka seruma odraslih pacijenata prikupljenih u razdoblju od siječnja 2016. do rujna 2017. kojima su koncentracije prolaktina bile iznad gornje granice referentnog intervala. Koncentracije prolaktina prije i nakon taloženja polietilen glikolom izmjerene su elektrokemiluminiscentnom metodom na analizatoru Cobas e601. Koncentracije prolaktina koje su unutar referentnog intervala nakon taloženja smatraju se lažnim hiperprolaktinemijama. Prema rezultatima ispitivanja utvrđena je učestalost makroprolaktinemije u ispitanoj populaciji od 3,26% pri čemu nema statistički značajne razlike između muškaraca i žena u prevalenciji makroprolaktinemije. Usporedbom načina izvještavanja rezultata nakon taloženja makroprolaktina polietilen glikolom uočena je važnost paralelnog prikazivanja postotka iskorištenja uz apsolutne vrijednosti koncentracija prolaktina nakon taloženja i pripadnih post-PEG referentnih intervala. Podizanje graničnih vrijednosti nije opravdano jer bi se propustio veliki broj pacijenata s makroprolaktinemijom, a rezultati Wilcoxonovog parnog testa potvrđuju potrebu za ponavljanjem taloženja polietilen glikolom nakon godinu dana za sve pacijente s hiperprolaktinemijom.

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

Rad sadrži: 33 stranica, 5 grafičkih prikaza, 6 tablica i 41 literaturni navod. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Hiperprolaktinemija, makroprolaktin, taloženje polietilen glikolom, probirni test

Mentor: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Sandra Šupraha Goreta, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Dr. sc. Olga Gornik, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: ožujak 2018.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

MACROPROLACTIN – RATIONAL USE OF SCREENING TEST IN DIAGNOSTICS OF HYPERPROLACTINAEMIA

Milica Šostarić

SUMMARY

Determination of serum prolactin concentration has the highest clinical relevance in the differential diagnosis of hyperprolactinemia. Since the physiological activity and regulation of prolactin secretion is very complex, there are many different factors that affect prolactin serum concentration to consider. Macroprolactin, a polymeric form of prolactin, is the major cause of falsely increased prolactin. Aims of this study were to establish the prevalence of macroprolactinaemia in our study population and to see whether there is a statistically significant difference between men and women. A comparison of the method of reporting the results after the precipitation of macroprolactin with polyethylene glycol was also made, as well as the possibility of rationalizing the precipitation process by increasing the limit value to 700 mIU/L, i.e. 1000 mIU/L. Wilcoxon's paired test was used to determine whether there was a statistically significant difference in recovery in subjects whose polyethylene glycol precipitation was repeated after one year. The study was conducted on 1136 adult patients' sera samples which were collected from January 2016 to September 2017. All samples had prolactin above corresponding upper reference limit. Measurements before and after PEG-precipitation were performed with electrochemiluminescence method on Cobas e601 analyzer. Post-PEG prolactin concentrations that fall within corresponding reference interval are considered false hyperprolactinemia. According to the results of the study, the incidence of macroprolactinemia in the examined population was 3.26%, with no statistically significant difference between men and women. By comparing the method of reporting the results after the precipitation of macroprolactin with polyethylene glycol, the importance of the parallel representation of the percentage of recovery and absolute values of prolactin concentrations after precipitation, along with corresponding post-PEG reference intervals, was observed. Raising the limit values is not justified because a large number of patients with macroprolactinemia would be missed, and Wilcoxon's paired test results confirmed the need to repeat the precipitation with polyethylene glycol after a period of one year for all patients with hyperprolactinaemia.

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

Thesis includes: 33 pages, 5 figures, 6 tables and 41 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Hyperprolactinaemia, macroprolactin, precipitation with polyethylene glycol, screening test

Mentor: **Nada Vrkić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Nada Vrkić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Sandra Šupraha Goreta, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Olga Gornik, Ph.D. Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2018.