

Ispitivanje razlike u koncentraciji hormona prolaktina između dvije metode-postoji li razlika

Gašpar, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split / Sveučilište u Splitu**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:176:714828>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**

Repository / Repozitorij:



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

[Repository of the University Department for Health Studies, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
PREDDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKE
DIJAGNOSTIKE

Ivana Gašpar

**Ispitivanje razlike u koncentraciji hormona prolaktina
između dvije metode - postoji li razlika**

Završni rad

Split, 2017.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
Podružnica
SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA
PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ
PREDDIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO LABORATORIJSKE
DIJAGNOSTIKE

Ivana Gašpar

**Ispitivanje razlike u koncentraciji hormona prolaktina
između dvije metode - postoji li razlika
Investigating the difference in the prolactin hormone
concentration between the two methods - is there a difference**

Završni rad/Bachelor's Thesis

Mentor:

Dr. sc. Daniela Šupe Domić, mag. med. biochem.

Split, 2017.

Zahvaljujem se mentorici dr.sc.Danieli Šupe Domić na svesrdnoj pomoći u izradi završnog rada. Posebna zahvala Sandri Šego, med. lab. ing. i Žanet Bradarić, ing. kem. te svim djelatnicima Kliničkog zavoda za nuklearnu medicinu.

Hvala svim prijateljima i obitelji na podršci za vrijeme studiranja.

Najveća hvala mojim roditeljima. Za sve.

Sadržaj

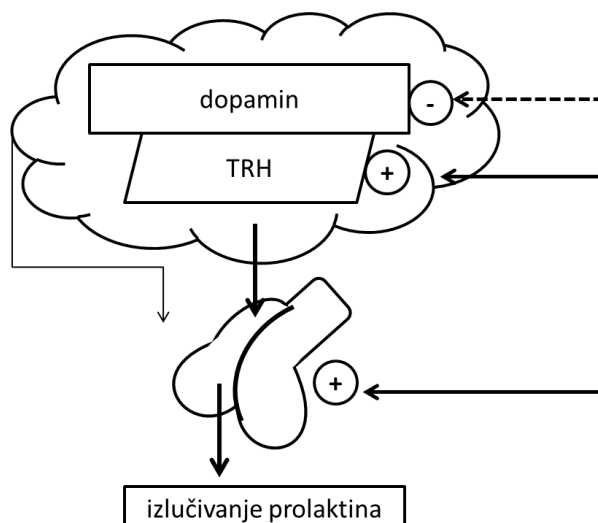
1.	Uvod.....	1
1.1.	Prolaktin.....	1
1.2.	Hiperprolaktinemije.....	4
2.	Cilj rada	6
3.	Materijali i metode	7
3.1.	Predanalitička faza.....	7
3.2.	Analitička faza	8
3.2.1.	Prolaktin-IRMA metoda	8
3.2.2.	Prolactin II metoda	10
3.3.	Post analitička faza.....	12
3.3.1.	Statistička analiza	12
4.	Rezultati	13
4.1.	PRL – IRMA	14
4.2.	PRL – ECLIA.....	16
4.3.	Passing-Bablok regresija	18
4.4.	Demingova regresijska analiza	20
5.	Rasprava	22
6.	Zaključak	23
7.	Literatura.....	24
8.	Sažetak.....	26
	Summary	27
9.	Životopis.....	28
10.	Prilozi.....	29
10.1.	Popis kratica	29
10.2.	Popis slika.....	30
10.3.	Popis tablica	30
10.4.	Etičko povjerenstvo	31

1. Uvod

1.1. Prolaktin

Prolaktin (engl. *prolactin*; PRL) je proteinski hormon. Izlučuje se iz laktotropnih stanica prednjeg režnja hipofize. Međutim, nađeno je da ga u manjoj mjeri luče stanice živčanog sustava, maternice i drugih tkiva uključenih u oplodnju i začeće (1). Naziva se još i luteotropni hormon. Izgrađen je od 198 aminokiselina kodiranih genima na 6 kromosomu, 22 pruzi. Transkripciju gena stimuliraju prvenstveno estrogene, međutim velike koncentracije estrogena djeluju inhibitorno (2). Sekrecija je prvenstveno pod kontrolom prolaktin inhibirajućeg faktora (engl. *prolactin inhibitory factor*; PIF) – dopamina koji se luči u hipotalamusu. Prolaktin je jedinstven među hormonima hipofize jer je primarno pod inhibicijskom kontrolom, odnosno izostanak kontrole uzrokuje povišenje serumske koncentracije prolaktina (1). Kada dopamin dođe iz hipotalamusa u prednji režanj hipofize, veže se za D2 receptore na površini laktotropnih stanica tako dajući signal stanicama da zaustave egzocitozu i proizvodnju prolaktina. Međutim, interesantno je da prolaktin sam promovira dopamin što pospješuje kontrolu povratnom spregom (3).

Na isti se način antipsihotici nepotpuno vežu na D2 receptore laktotropnih stanica uzrokujući povećanu sekreciju prolaktina. Estrogeni također kontroliraju prolaktin što je izuzetno važno za vrijeme trudnoće i poslije poroda. Manju ulogu imaju tireootpuštajući hormon (engl. *thyrotropin releasing hormone*; TRH), antidiuretski hormon (engl. *antidiuretic hormone*; ADH), β -endorfin i epidermalni faktor rasta (engl. *epidermal growth factor*; EGF) (4).



Slika 1. Shematski prikaz povratne sprege izlučivanja prolaktina

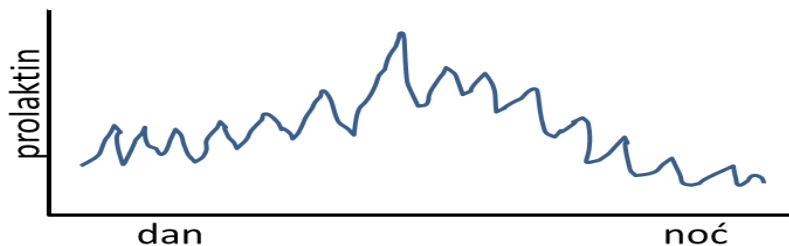
Prolaktin je po svojoj strukturi sličan hormonu rasta (engl. *human growth hormone*; hGH) i humanom placentarnom laktogenu (engl. *human placental lactogen*; hPL) a razlog je što su geni koji ih kodiraju potekli od zajedničkog pragera koji se duplicirao. Unatoč tome pokazuje manju sličnost s njima nego ta dva hormona međusobno (1). Pojavljuje se u mnogostrukim oblicima koji nastaju posttranslacijskim promjenama (alternativno prekrajanje, glikolizacija, polimerizacija). Prolaktin se u serumu zdravih osoba pojavljuje u tri forme različite molarne mase koje je moguće razlučiti gel-filtracijskom kromatografijom: monomer prolaktina (23 kDa) 86%, veliki prolaktin (50–60 kDa) 9% i veliki-veliki prolaktin (>150 kDa) 5%. Veliki-veliki ili makroprolaktin je u većini slučajeva kompleks prolaktina vezanog za imonoglobulin G (IgG), konkretno anti-prolaktinska autoantitijela te je biološki inaktivan (5).



- monomer prolaktina
- veliki prolaktin
- veliki-veliki prolaktin

Slika 2. Grafički prikaz udjela polimera prolaktina

Koncentracija prolaktina u serumu žena značajno je viša nego kod muškaraca u zbog utjecaja estrogena. Fiziološki izlučivanje se povećava nakon unosa hrane, kod teških napora, stresa, hipoglikemije, trudnoće i kod mehaničkog stimuliranja dojke tijekom dojenja. Prolaktin ima cirkadijalni ritam izlučivanja. Koncentracija prolaktina najveća je preko dana kada je organizam aktivan i pod utjecajem okoline dok se snižava za vrijeme mirovanja i spavanja.



Slika 3. Shematski prikaz cirkadijalnog ritma prolaktina

Istraženo je preko 300 različitih funkcija a najvažnija je uloga u diferencijaciji i proliferaciji epitela dojke i stimulaciji laktacije (nakon što su na dojku tijekom trudnoće djelovali estrogen i progesteron). Direktno utječe na aktivnost lipoprotein lipaze u adipoznom tkivu preko funkcionalnih prolaktinskih receptora (engl. *prolactin receptor*; PRLR). Ima ulogu i u normalnom funkcioniranju žutog tijela pa sudjeluje u nastanku predmenstrualnih simptoma vezanih za dojke jer je u lutealnoj fazi njegova koncentracija blago povećana. Novija istraživanja na miševima upućuju na to da je prisutnost prolaktina neophodna za pravilan razvoj i sazrijevanje oocite, mejoze, fertilizacije i ranog razvitka zametka (4). Zbog blizine gena koji kodiraju sistem leukocitnih antigena (engl. *human leukocyte antigen*; HLA) pokazalo se da prolaktin sudjeluje i u imunološkom odgovoru (6). Kako nema opisanih slučajeva gdje čovjeku nedostaje gen za prolaktin ili njegove receptore pretpostavlja se da je neophodan za život (7). Moguće je i da suprimira apoptozu tako sudjelujući u genezi tumora (8).

1.2. Hiperprolaktinemije

Hiperprolaktinemiju je moguće definirati kao rapidno povećanje koncentracije prolaktina dva sata nakon buđenja 425.53 mIU/L za muškarce i 531.91 mIU/L za žene a općenito označava stanje povišenog serumskog prolaktina (9).

Hiperprolaktinemiju najčešće izaziva prolaktinom, dobroćudni tumor hipofize iz kojeg se luče velike količine prolaktina. Hiperprolaktinemiju uzrokovanu adenomom hipofize uglavnom prate neurološki simptomi uzrokovani masom tumora. Simptomi uključuju glavobolje, gubitak vida, kranijalne neuropatije, hipopituitarizam i napadaje gubitka svijesti.

Poremećaji lučenja prolaktina uzrokovani su smanjenjem stvaranja dopamina ili stanja koja uvjetuju prekid prijenosa dopamina iz hipotalamusa do hipofize; povećanjem lučenja TRH zbog primarne hipotireoze. Hiperprolaktinemija često prati hipotireozu, cirozu jetre i zloćudne tumore (karcinom pluća, hipernefron), a javlja se i kao posljedica uzimanja nekih lijekova, osobito blokatora dopaminskih receptora (neuroleptici: fenotijazini i butirofenoni i antiemetici: metoklopramid, domperidon i sulpirid).

Najčešća posljedica hiperprolaktinemije je hipogonadotropni hipogonadizam. On se klinički očituje različito ovisno o dobi i spolu bolesnika te kliničkoj slici hiperprolaktinemije.

Kod žena klinički se očituje ranije i lakše se dijagnosticira. Granično povišeni prolaktin utječe na skraćivanje lutealne faze ciklusa i insuficijenciju žutog tijela. Bolesnica može imati ovulacije, ali ne ostvaruje trudnoću. Najčešći simptomi hiperprolaktinemije su oligomenoreja, amenoreja, galactoreja, smanjeni libido, neplodnost i sekundarna osteoporoza. Moguća posljedica je i kronični hiperandrogenizam s posljedičnom pojavom hiruzitizma i akni te povišenom razinom slobodnog testosterona u serumu. Muškarci s hiperprolaktinemijom klinički pokazuju znakove erektilne disfunkcije, smanjenog libida, neplodnosti, ginekomastije, sekundarne osteoporoze i rijetko galaktoreje. S vremenom se pojavljuje pad osjećaja energije, reducira se mišićna masa te povećava rizik za osteopeniju (2).

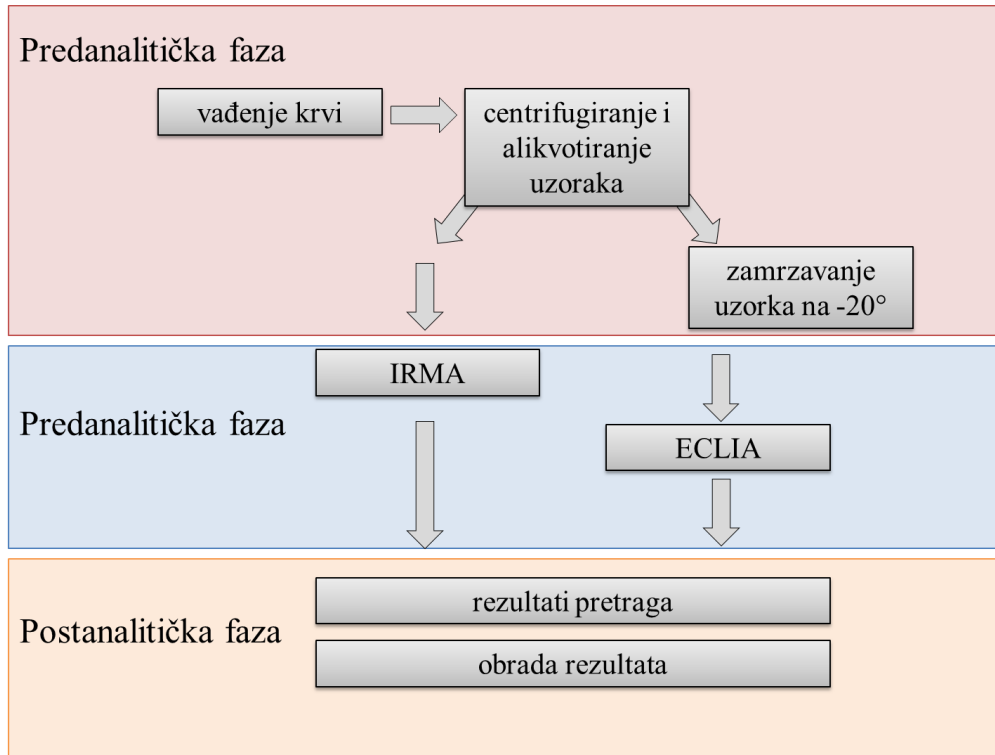
Pravovremena dijagnoza hiperprolaktinemije može spriječiti nastanak navedenih komplikacija od kojih se kao uputna dijagnoza za laboratorijske pretrage najčešće navodi neplodnost, kako kod žena tako i kod muškaraca. S obzirom da se dijagnoza postavlja interpretacijom nalaza serumske koncentracije prolaktina, također, zbog praćenja uspješnosti terapije te longitudinalnog praćenja koncentracije prolaktina neophodno je osvijestiti postojanje razlika samih metoda. Razlike nastaju zbog različite metodologije mjerenja. Osim toga, svaka metoda ima određena ograničenja u smislu interferencija.

2. Cilj rada

Cilj ovog rada je dokazati odsutnost ili prisutnost statistički značajne razlike u određivanju koncentracije prolaktina korištenjem dvije različite metode na slučajnom uzorku od 40 bolesnika.

Uspoređuju se dvije različite imunokemijske metode kojima se određuje koncentracija serumskog prolaktina. Obje metode se izvode u laboratorijima Kliničkog bolničkog centra Split. Imunoradiometrijska metoda (IRMA) provodi se u Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu, a elektrokemiluminiscencijska imunokemijska metoda (ECLIA) u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku.

U pretraženoj literaturi ni jedna metoda nije predložena kao zlatni standard tako da se obje izvode kao jednako specifične i osjetljive. Rezultati dobivenih pretraga neusporedivi su zbog različitosti metoda kao takvih.



Slika 4. Hodogram izrade završnog rada

3. Materijali i metode

Usporedba metoda provedena je na rutinskim uzorcima seruma bolesnika koji su pristupili postupku venepunkcije a upućeni su u laboratorij radi dijagnostičke obrade od odabranih liječnika obiteljske medicine po preporuci liječnika subspecijaliste endokrinologije i dijabetologije ili specijaliste ginekologije i opstetricije. Analizirano je 40 uzoraka u kojima je mjerena koncentracija prolaktina. U istraživanje su uključeni nasumično odabrani uzorci 4 muškarca i 36 žena.

3.1. Predanalitička faza

Za potrebe određivanja koncentracije prolaktina svim je ispitanicima venepunkcijom izvađeno 5 mililitara pune krvi u BD Vacutainer® (Becton Dickinson) vakuete koje u sebi sadrže silikon aktivator koagulacije i separacijski gel koji predstavlja barijeru između koaguluma i seruma nakon centrifugiranja, a karakterizira ih žuti čep. Venepunkcija je vršena do 8:00 sati ujutro odnosno najkasnije 1,5 sati od buđenja bolesnika (preporučeno radi dnevnog lučenja). Nakon centrifugiranja 5 minuta pri 3000 okretaja/minuti u centrifugi Lab cetrifuge 400 (Heraeus instruments, Njemačka) serum je iz vakuete alikvotiran u dvije sekundarne epruvete. Predanalitička faza odrađena je u Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu.

IRMA analiza vršena je na dan uzorkovanja dok je ECLIA analiza vršena nakon što su se uzorci sakupili tijekom 5 dana. Zbog odgode analize svi su uzorci za ECLIA analizu zamrznuti na -20°C. Stabilnost prolaktina prema deklariranim uputama samog proizvođača ECLIA metode je najviše 6 mjeseci na -20°C; bez višekratnog postupka zamrzavanja.

3.2. Analitička faza

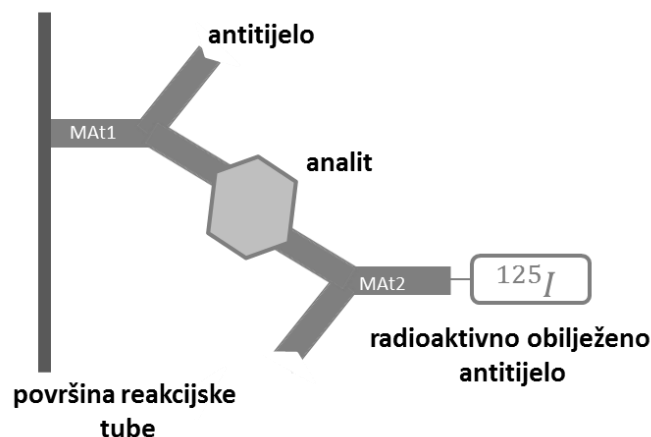
3.2.1. Prolaktin-IRMA metoda

IRMA metoda zasniva se na radioaktivno označenim antitijelima. Razlikuje se od konvencionalne radioimunoanalize (engl. *radio immuno assay*; RIA) po tome što se analit odmah veže za radioaktivno antitijelo, dodano u suvišku. Općenito, u ovoj se metodi radioaktivnim elementom obilježena antitijela vežu za antigen prisutan u uzorku. Radioaktivni izotopi joda (I) kojima se obilježavaju uzorci su ^{125}I i ^{131}I . Izmjerena radioaktivnost izravno je razmjerna koncentraciji analita u uzorku (10).

Ovako ispada da se radioizotopi vežu za antigen, a zapravo se vežu.

Prolaktin-IRMA metoda je imunoradiometrijska metoda ispitivanja koja se zasniva na separaciji u označenim epruvetama. Proizvođač DIASource PRL-IRMA Kit-a (96 testova) koji je korišten u ovom ispitivanju jest DIASource ImmunoAssays S.A. (Belgija).

Monoklonalna antitijela (MA_{t1}) vezana su direktno na stijenke i dno polistirenskih testnih tuba. U prvom koraku bolesnikov serum se inkubira s MA_{t1} u testnoj tubi. U ovoj fazi analit iz bolesnikovog seruma pokazuje slab afinitet za MA_{t1}. U drugom koraku dodaje se drugo monoklonalno antitijelo (MA_{t2}) označeno s radioaktivnim jodom (^{125}I). MA_{t2} potiče i završava imunološku reakciju vezujući se za analit iz pacijentovog seruma što rezultira sendvič kompleksom MA_{t1}-analit-MA_{t2}. Korištenjem različitih monoklonalnih antitijela izbjegava se učinak hiperspecifičnosti. Nevezana MA_{t2} uklanjaju se ispiranjem i dekantacijom na tvornički propisan način.



Slika 5. Shematski prikaz reakcijske smjese Prolaktin-IRMA metode

Intenzitet radioaktivnosti proporcionalan je koncentraciji analita u bolesnikovom serumu. Određivanje koncentracije analita vrši se pomoću kalibracijske krivulje. Kalibracijska se krivulja izrađuje svakog tjedna s reagensima i epruvetama istog lota. Određuje se pomoću 5 kalibratora poznate koncentracije. U svakoj seriji uz kalibratore i uzorke bolesnika analiziraju se i 2 kontrolna uzorka. Prva kontrola jest kontrola čija je poznata koncentracija unutar referentnog raspona a druga kontrola ima visoku koncentraciju analita. Radijacija ^{125}I dobivenom u paketu s reagensima ograničena je na 66 dana, pa s vremenom opada te se iz tog razloga kalibracija i kontrole rade pri svakom mjerenju. Za mjerenje se koristi mjerač gama zračenja (Capintec instruments inc. Pittsburgh, PA, USA, CAP RIA 16) koji mjeri prolaktin obilježen ^{125}I radioaktivnim iodom tijekom 2 minute. ^{125}I emitira pri 340 kBq.

Dobiveni se rezultati izražavaju u mjernoj jedinici ng/ml ali se s faktorom korekcije 29 rezultat izražava u mjernoj jedinici mIU/L. Na Kliničkom zavodu za nuklearnu medicinu ova metoda je manualna.

Referentni interval je za muškarce i žene 81 - 597 mIU/L.

IRMA metoda nije preporučena za bolesnike koji su primili terapiju koja sadržava ljudska anti-mišja antitijela jer može uzrokovati lažno povišenu ili lažno sniženu koncentraciju prolaktina. Moguća je interferencija hemoglobina iznad 124.88

mmol/L i bilirubina iznad 3.33 mmol/L. Hook efekt javlja se kod koncentracije veće od 382978.72 mIU/L.

3.2.2. Prolaktin-II metoda

Enzimimunokemijske metode zasnivaju se na specifičnoj imunokemijskoj reakciji koju slijedi enzimatska odnosno indikatorska faza.

ECLIA metoda zasniva se na luminiscenciji koja se oslobađa uslijed promjene naboja rutenija u reakcijskoj smjesi. Tijekom reakcije stvara se kompleks višeg energetskog stanja koji pri vraćanju u stanje relaksacije otpušta fotone koji se detektiraju na fotomultiplikatoru. Reakcija se odvija uz prisutnost vodikova peroksida i katalizatora (kobalt, bakar, peroksidaza) (10). Uobičajeno se koriste rutenski kompleksi posebno $[\text{Ru}(\text{Bpy})_3]^{2+}$ s tripropilaminom (engl. *tripropylamine*; TPA) u tekućem ili tekuće-krutom mediju a koji su vezani za antitijela visoko specifična prema prolaktinu.

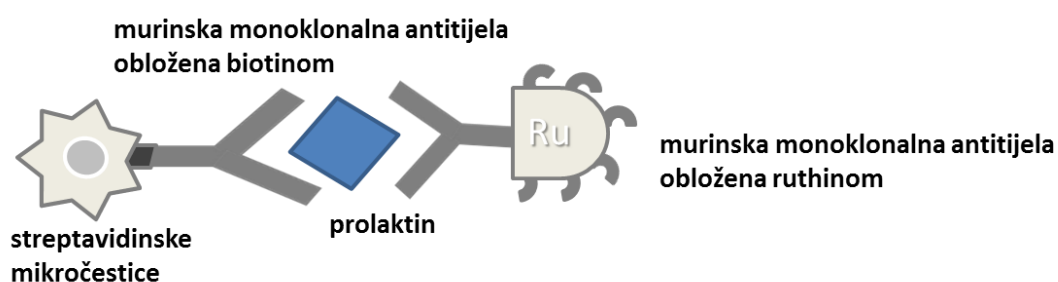
Prolactin II metoda proizvođača Roche je ECLIA za in vitro određivanje koncentracije prolaktina u serumu. Metoda je automatizirana na samostojećem imunokemijskom analizatoru (engl. stand alone) Cobas e 601 tvrtke Roche (Mannheim, Njemačka).

Uzorak seruma bolesnika inkubira se s dva monoklonalna antitijela označena jedan s biotinom (MA_tB), a drugi s ruteniumom (MA_tR). Oba antitijela visoko su specifična za prolaktin. Tijekom inkubacije stvara se prvi kompleks, koji se sastoji od molekule prolaktina na koji su vezana dva obilježena antitijela. U reakcijsku se smjesu, potom dodaju magnetske mikročestice presvučene streptavidinom. Stvara se sendvič kompleks, u kojem se obilježeni kompleks veže za magnetske mikročestice preko interakcije biotin-streptavidin, koji imaju jaki međusobni afinitet. Reakcijska se smjesa premješta u mjernu ćeliju gdje mikročestice na koje je vezan kompleks bivaju privučene magnetom na površinu elektrode, dok se nevezana antitijela ispiru. Pod utjecajem električne struje na elektrodi rutenij mijenja naboj, odnosno ionsko stanje, pri čemu se oslobađa kemiluminiscentno svjetlo koje se mjeri na fotomultiplikatoru. TPA u

reakcijskoj smjesi služi kao izvor elektrona za redukciju rutenija. Vrijeme testiranja je 18 minuta.

Koncentracija prolaktina u uzorku izračunava se pomoću kalibracijske krivulje dobivene analizom komercijalno dostupnih kalibratora točno poznatih koncentracija standardiziranim prema 3rd IRP WHO Reference Standard 84/500 u duplikatu. Metodom je moguće mjeriti koncentracije 1.00 – 10,000 mIU/L što predstavlja mjerni raspon metode. Kontrolni uzorci se analiziraju svaki drugi dan u dvije razine, normalni (koncentracija unutar referentnog raspona) i patološki (kontrolni uzorak visokih koncentracija). Kontrole su komercijalno dostupni uzorci tvrtke Roche i uzorci tvrtke Randox.

Referentni intervali su za muškarce 86 – 324 mIU/L, a za žene 102 – 496 mIU/L.



Slika 6. Shematski prikaz reakcijske smjese Prolactin II ECLIA metode

ECLIA metoda nije preporučena za bolesnika koji primaju terapiju biotinom u velikim dozama (>5 mg/dan) bar 8 sati nakon primljene terapije. Moguća je interferencija hemoglobina iznad 0.932 mmol/L, bilirubina iznad 0.513 mmol/L, lipemije iznad 249.75 mmol/L i biotina iznad 164000 mmol/L. Monoklonalna antitijela su deklarirano visoko specifična te ne interferiraju s hGH, humanim korionskim gonadotropinom (engl. *human chorionic gonadotropin*; hCG), humanim placentarnim laktogenom (engl. *human placental lactogen*, hPL), tireostimulirajućim hormonom (engl. *thyroid-stimulating hormone*; TSH), folikulostimulirajućim hormonom (engl. *follicle-stimulating hormone*; FSH) ni luteinizirajućim hormonom (engl. *luteinizing hormone*, LH).

3.3. Post analitička faza

3.3.1. Statistička analiza

Za sve uzorke upotrijebljen je faktor korekcije 29 za IRMA metodu. Podatci su grupirani po analizama i poredani po rednom broju. Za svaku metodu posebno, rezultati su statistički obrađeni te grafički opisani „kutija-brkovi“ statističkim alatom (engl. *box and whiskers*). Raspršenje podataka grafički je prikazano. Regresija po Passing-Babloku korištena je za usporedbu metoda, uključujući i Cusumov test linearnosti te Spearmanov korelacijski koeficijent. Demingova regresijska analiza korištena je kako bi se utvrdila prisutnost konstantne i proporcionalne pogreške. Statistička analiza provedena je pomoću statističkog softvera MedCalc 17.6 (MedCalc, Mariakerke, Belgija).

4. Rezultati

Tablica 1. Rezultati koncentracija prolaktina dobiveni dvjema imunokemijskim metodama

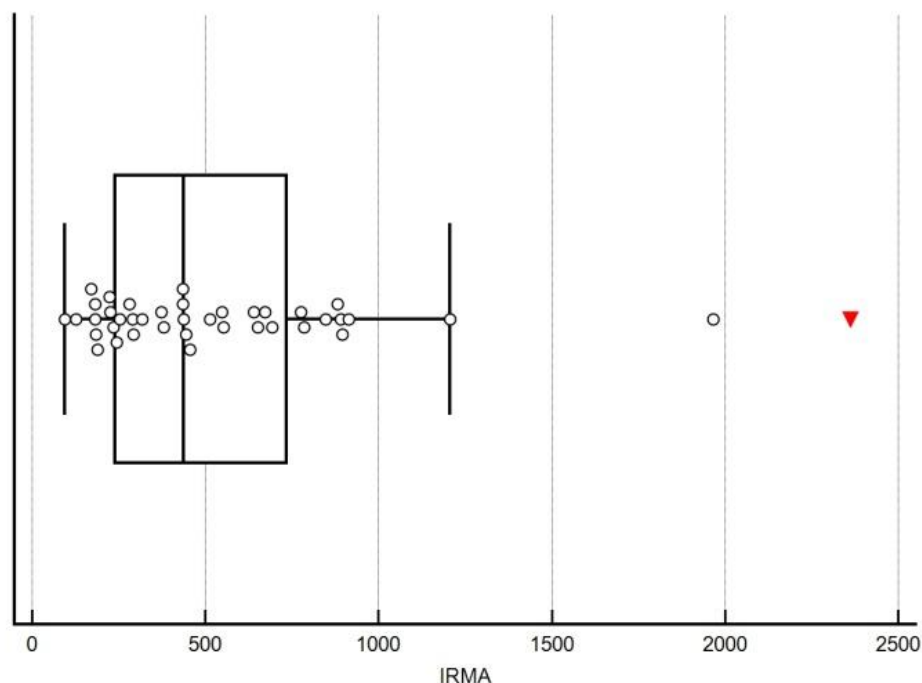
UZORAK	SPOL	PRL – IRMA (mIU/L)	PRL - ECLIA (mIU/L)
1	M	692,4	967,6
2	Ž	183,5	299,6
3	Ž	776,0	843,5
4	Ž	372,9	451,6
15	Ž	292,2	401,5
6	Ž	896,0	1027,0
7	Ž	380,6	515,8
8	Ž	182,2	242,7
9	Ž	672,0	456,4
10	Ž	445,4	408,0
11	Ž	847,5	1222,0
12	Ž	2363,0	2103,0
13	Ž	127,3	166,8
14	Ž	244,4	270,8
15	Ž	914,0	1016,0
16	Ž	438,4	621,3
17	Ž	434,2	834,3
18	Ž	640,0	908,6
19	Ž	254,3	368,2
20	Ž	548,6	288,5
21	Ž	1207,0	1714,0
22	Ž	290,1	340,5
23	Ž	317,1	423,5
24	Ž	890,0	805,3
25	Ž	784,1	477,9
26	Ž	93,6	95,1
27	Ž	553,6	736,6
28	Ž	281,1	352,9
29	M	1967,0	1990,0
30	Ž	188,2	218,7
31	Ž	513,1	559,2
32	Ž	882,0	1171,0
33	M	226,6	278,8
34	Ž	224,1	274,8
35	Ž	235,9	413,7
36	Ž	169,6	205,8
37	M	652,2	562,2
38	Ž	434,2	656,2
39	Ž	181,8	247,3
40	Ž	456,0	682,2

4.1. PRL – IRMA

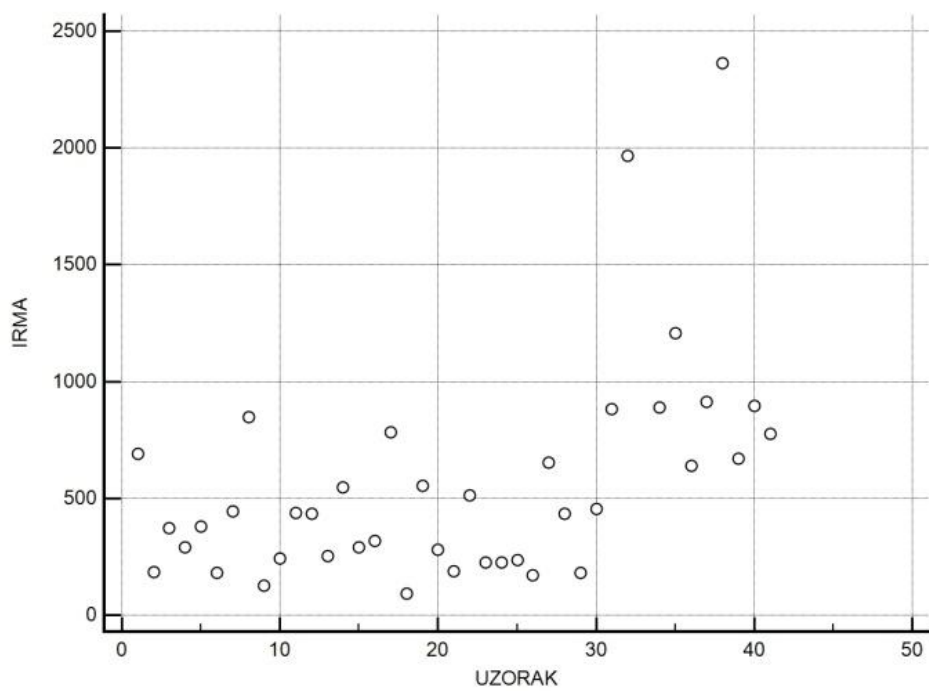
Tablica 2. Opisna statistika dobivenih koncentracija prolaktina metodom IRMA

Minimum	93,58
Prvi interkvartil (Q1)	238,06
Medijan	436,33
Treći interkvartil (Q3)	755,09
Maksimum	2363,00
Raspon	2269,42

Raspon izmjerenih koncentracija prolaktina IRMA metodom iznosi 2269,42 mlU/L. Podatci se u 50% slučajeva nalaze između 238,08 i 755,09 mlU/L. 25% podataka u donjem rasponu nalazi se između 93,58 i 238,06 mlU/L. 25% podataka u gornjem rasponu nalazi se između 755,09 i 2363,00 mlU/L.



Slika 7. Grafički prikaz „kutija brkovi“ za dobivene koncentracije PRL – IRMA metodom (središnja crta predstavlja medijan, „kutija“ interkvartilni raspon, a „brkovi“ totalni raspon)



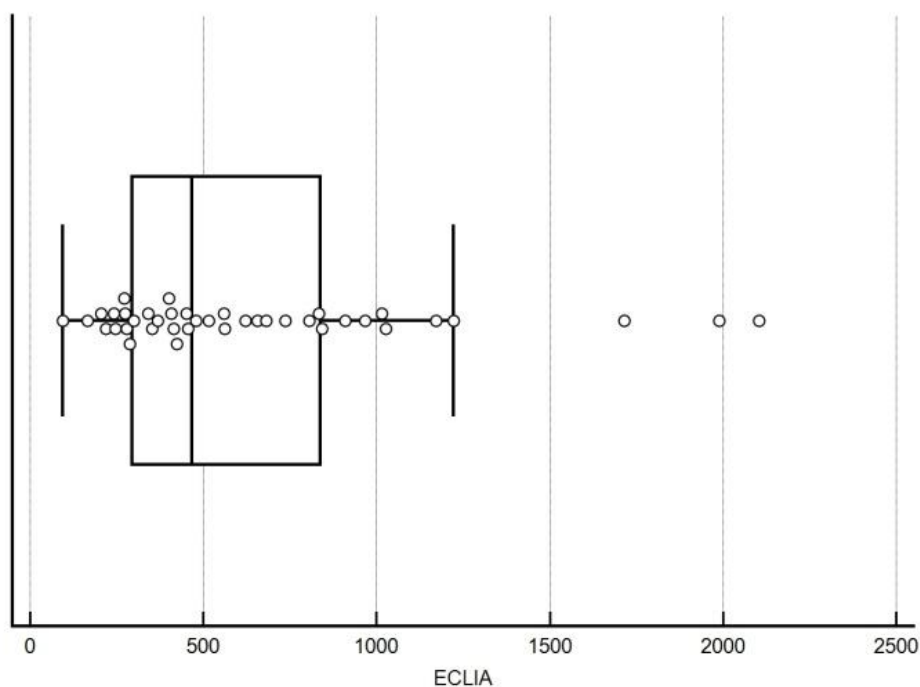
Slika 8. Grafički prikaz raspšenja za dobivene koncentracije PRL – IRMA metodom

4.2. PRL – ECLIA

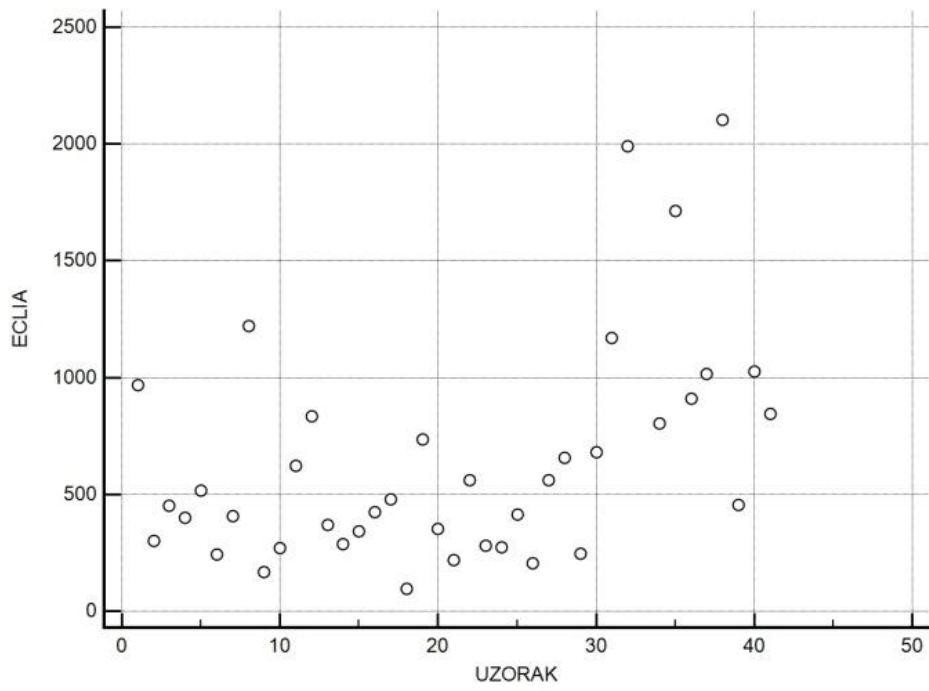
Tablica 3. Opisna statistika dobivenih koncentracija prolaktina metodom ECLIA

Minimum	95,07
Prvi interkvartil (Q1)	291,28
Medijan	467,15
Treći interkvartil (Q3)	841,20
Maksimum	2103,00
Raspon	2007,93

Raspon izmjerenih koncentracija prolaktina ECLIA metodom iznosi 2007,93 mIU/L. Podatci se u 50% slučajeva nalaze između 291,28 i 841,20 mIU/L. 25% podataka u donjem rasponu nalazi se između 95,07 i 291,28 mIU/L. 25% podataka u gornjem rasponu nalazi se između 841,20 i 2103,00 mIU/L.



Slika 9. Grafički prikaz „kutija brkovi“ za dobivene koncentracije PRL – ECLIA metodom (središnja crta predstavlja medijan, „kutija“ interkvartilni raspon, a „brkovi“ totalni raspon)

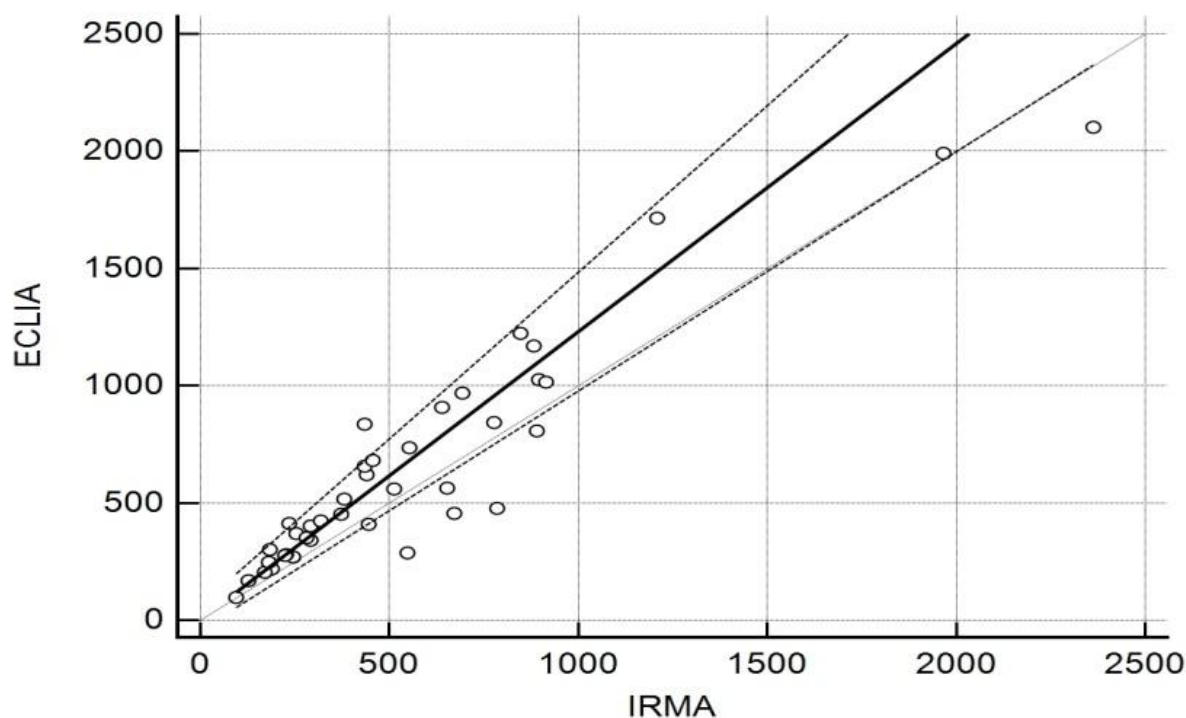


Slika 10. Grafički prikaz raspšenja za dobivene koncentracije PRL – ECLIA metodom

4.3. Passing-Bablok regresija

Tablica 4. Izračun za Passing-Bablokovu regresijsku analizu

Varijabla X	ECLIA	Varijabla Y	IRMA
Veličina uzorka		40	
		Varijabla X	Varijabla Y
Najniža vrijednost		93,5820	95,0700
Najveća vrijednost		2363,0000	2103,0000
Aritmetička sredina		556,3048	640,4717
Medijan		436,3305	467,1500
Standardna devijacija		463,8229	473,4664
Srednja standardna pogreška		73,3368	74,8616
Regresijska jednadžba		$y = 4,012028 + 1,228439 x$	
Sustavne razlike			
Odsječak A		4,0120	
95% CI		-43,4073 to 63,8255	
Proporcionalne razlike			
Nagib B		1,2284	
95% CI		1,0209 to 1,4208	
Nasumične razlike			
Rezidualna standardna devijacija (RSD)		138,7170	
± 1.96 RSD Interval		-271,8853 to 271,8853	
Valjanost linearnog modela			
Cusumov test za linearnost		P=1,00	
Spearmanov korelacijski koeficijent			
Koeficijent korelacije			0,916
Razina signifikantnosti			P < 0,0001
95% CI			0,845 to 0,955



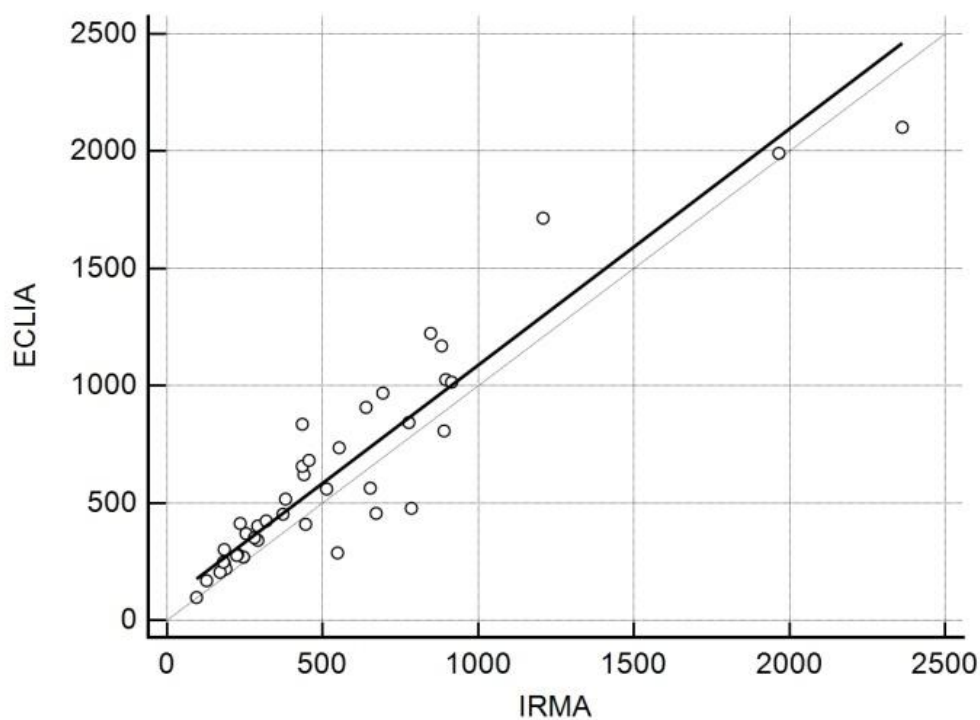
Slika 11. Grafički prikaz Passing-Bablokove regresije

Koncentracije prolaktina za svaku pojedinačnu metodu ne slijede Gaussovu raspodjelu. Važno je istaknuti da je koeficijent korelacije visok ($r = 0,916$) uz 95% interval pouzdanosti od 0,845 do 0,955 (razina signifikantnosti $P < 0,0001$). Podaci dobiveni korištenjem Passing-Bablokove regresijske analize pokazali su da ne postoji konstantno odstupanje između metoda (interval pouzdanosti odsječka uključuje 0), ali da postoji vrlo malo proporcionalno odstupanje (interval pouzdanosti nagiba ne uključuje 1, ali se 95% CI kreće od 1,0209 do 1,4208). Po izračunu Cusumovog testa nema značajnog odstupanja od linearnosti ($P = 1,00$). Passing-Bablokova regresijska analiza jest neparametrijska metoda (ne ovisi o vrsti raspodjele) te je preporučena u slučajevima kad postoji proporcionalno odstupanje jedne metode od druge te u slučajevima miješanog odstupanja.

4.4. Demingova regresijska analiza

Tablica 5. Izračun za Demingovu regresijsku analizu

Metoda X		IRMA	
Metoda Y		ECLIA	
Metoda	Aritmetička sredina	Koeficijent varijacije (%)	
X	556,3048	1,38	
Y	640,4717	1,46	
Veličina uzorka	40		
Omjer varijacije	0,6713		
Regresijska jednadžba		$y = 79,6233 + 1,0082 x$	
Parametar	Koeficijent	Standardna greška	95% CI
Odsječak	79,6233	60,5497	-42,8500 do 202,0967
Nagib	1,0082	0,1347	0,7357 do 1,2806



Slika 12. Grafički prikaz Demingove regresijske analize

Podaci dobiveni korištenjem Demingove regresijske analize pokazali su da ne postoji konstantno odstupanje između metoda (interval pouzdanosti odsječka obuhvaća 0) kao niti proporcionalno odstupanje (interval pouzdanosti nagiba obuhvaća 1). Demingova regresijska analiza pretpostavlja nezavisan odnos između dvije metode te uzima u obzir i nepreciznost obje mjerne metode.

5. Rasprava

Brojne metode se koriste kako bi se odredila koncentracija prolaktina u serumu. Uobičajene metode su uglavnom imunoanalize kao što su radioimunološka analiza (RIA), enzimumunokemijska analiza (ELISA), kemiluminiscencijska analiza (CLIA), elektrokemiluminiscencijska analiza (ECLIA) itd. Studije su pokazale kako je gel filtracijska kromatografija zlatni standard za kvantifikaciju molekularnih oblika prolaktina (11). Nedostaci su što je metoda zahtjevna vremenski i financijski. U posljednje vrijeme sve više laboratorija prelazi s RIA (IRMA) na ne-RIA metode, konkretno luminiscentne metode. Kemiluminiscentne metode su metode izbora zbog bolje osjetljivosti i niske pozadinske interferencije a zasnivaju se na okoliš neštetoj oksidaciji (12).

Iz rezultata našeg istraživanja proizlazi da usporedivost koncentracija prolaktina dobivenih dvjema metodama nije zadovoljavajuća. Bez obzira na visoku korelaciju i ne postojanje konstantne pogreške evidentno postoje proporcionalne razlike koje se ne mogu zanemariti. Razlike se mogu objasniti potpuno različitom metodologijom rada - različitim afinitetom i aviditetom antitijela ponuđenih od proizvođača. Na temelju svih opisanih rezultata može se zaključiti da postoje značajne razlike u koncentracijama prolaktina za svaki pojedini ispitivani uzorak. Kod tumačenja rezultata i donošenja bilo kakvih čvrstih zaključaka, a obzirom da je broj analiziranih uzoraka bio minimalan, trebalo bi navedeno ograničenje uzeti u obzir. Naredna istraživanja morala bi obuhvatiti veći broj ispitanika čije se koncentracije raspršuju kroz cijelo klinički značajno područje. Također bi trebalo testirati da li je statistički značajna razlika i klinički značajna i kod kojih koncentracija prolaktina. Osim broja ispitanika, ograničenje našeg istraživanja jest i nedostatak kliničkih podataka o bolesniku.

6. Zaključak

Tijekom longitudinalnog praćenja koncentracije prolaktina bolesnika važna je primjena iste metode na istom analizatoru kako bi osigurali usporedivost rezultata. Važno je da ordinarijus bude upućen, te da je na uputnici naznačeno kojom se metodom analizira i prati koncentracija hormona i ako je moguće prijašnji rezultat kako bi interpretacija nalaza bila što kvalitetnija. Svakako, tijekom interpretacije neophodno je koristiti zadane referentne intervale ovisno o korištenoj metodi. Ukoliko se bolesnik mora testirati drugom metodom potrebno je odrediti novu nultu koncentraciju prolaktina, od koje bi polazilo praćenje koncentracije, paralelnim određivanjem hormona s obje metode tijekom određenog vremenskog intervala.

Sve metode koje mjere koncentraciju prolaktina pokazuju križnu reaktivnost s makroprolaktinom koji je biološki inaktivan, odnosno detektiraju ukupni prolaktin u serumu. Detektabilnost prolaktina u serumu ovisi o izboru antitijela u reagensu (13).

U teoriji, rezultati dobiveni različitim metodama mogu biti usporedivi, ali kao što pokazuje ovo istraživanje to u rutini nije moguće jer nije provedena standardizacija.

7. Literatura

1. Freeman M., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*. 2000 Jan; 80(4):1523-1631. available from: <http://physrev.physiology.org/content/80/4/1523.long> (16.5.2017.)
2. Majumdar, Abha, and Nisha Sharma Mangal. Hyperprolactinemia. *Journal of Human Reproductive Sciences* 2013:168–175. available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3853872/> (10.6.2017.)
3. Fitzgerald P., Dinan T. Prolactin and dopamine: What is the connection? *Journal of Psychopharmacology*. 2008. March; 22(2):12–19. available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18477617> (24.6.2017.)
4. Kiapekou E, Loutradis D, Mastorakos G, Bletsas R, Beretsos P, Zapanti E, Drakakis P, Antsaklis A, Kiessling AA. Effect of PRL on in vitro follicle growth, in vitro oocyte maturation, fertilization and early embryonic development in mice. *Cloning Stem Cells* 2009 Nov: 293-300. available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/clo.2008.0046> (10.6.2017.)
5. Hattori, Naoki, Kohzo Aisaka and Akira Shimatsu. A possible cause of the variable detectability of macroprolactin by different immunoassay systems *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 2015; 54(4):603-608. available from: <https://www.degruyter.com/view/j/cclm.2016.54.issue-4/cclm-2015-0484/cclm-2015-0484.xml> (27.6.2017.)
6. Teilum K1, Hoch JC, Goffin V, Kinet S, Martial JA, Kragelund BB. Solution structure of human prolactin. *J Mol Biol*. 2005. Aug; 351(4):810-23. available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16045928> (15.5.2017.)

7. Nussey S, Whitehead S. Endocrinology: An Integrated Approach. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2001. Box 7.30, Actions of prolactin available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK27/box/A1430/> (10.6.2017.)
8. <http://www.proteinatlas.org/ENSG00000172179-PRL/cancer> (10.6.2017.)
9. Singh O. J., Singh T. I., Valte V., Cimetidine-induced Hyperprolactinemia, Journal of Medical Society, 2013: 27(3): 165-168. available from: <http://www.jmedsoc.org/article.asp?issn=0972-4958;year=2013;volume=27;issue=3;spage=165;epage=168;aulast=Singh#ref2> (10.6.2017.)
10. Slavica Dodig, Imunokemija, Medicinska naklada 2014. (147-148, 165)
11. Hattori N, Aisaka K, Shimatsu A, A possible cause of the variable detectability of macroprolactin by different immunoassay systems. Clin Chem Lab Med. 2016 Apr;54(4):603-608. available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26457779> (24.6.2017.)
12. Farzami, M. R., Aliasgharpour, M. Chemiluminescence systems; do all lead to same results in prolactin analysis? Journal of Diabetes and Metabolic Disorders 2017.; 16 (24). available from: <https://link.springer.com/article/10.1186/s40200-017-0305-7> (24.6.2017.)
13. Baban R., Farid Y. Comparison between Serum Prolactin Levels Determined by VIDAS and RIA Techniques. Iraqi Journal of Medical Sciences 2009; 7(4):20-26) availale from: http://www.academia.edu/1287778/Comparison_between_serum_prolactin_levels_determined_by VIDAS_and_RIA_techniques (24.6.2017.)

8. Sažetak

Uvod: Prolaktin (PRL) je proteinski hormon. Izlučuje ga adenohipofiza ali i druga tkiva u manjoj mjeri. Njegovu sintezu stimuliraju prvenstveno estrogene dok je sekrecija pod kontrolom prolaktin inhibirajućeg faktora (PIF) – dopamina. Po svojoj je strukturi sličan hormonu rasta (hGH) i humanom placentarnom laktogenu (hPL). Prolaktin se u serumu zdravih ljudi pojavljuje u tri forme različite molarne mase: monomer prolaktina (23kDa) 86%, veliki prolaktin (50–60 kDa) 9% i veliki-veliki prolaktin (>150 kDa) 5%. Koncentracija prolaktina u serumu žena značajno je viša nego kod muškaraca zbog utjecaja estrogena. Povećavaju je i neka fiziološka stanja kao što su spavanje, tjelesni napor, stres, hipoglikemija, trudnoća i dojenje. Najčešća patološka stanja vezana uz prolaktin su hiperprolaktinemije uzrokovane prolaktinomima i dobroćudnim tumorima hipofize.

Cilj: Cilj ovog rada je dokazati odsutnost ili prisutnost statistički značajne razlike u koncentraciji serumskog prolaktina korištenjem dvije različite metode.

Materijali i metode: Ispitivan je uzorak od 40 slučajnih uzoraka bolesnika upućenih u laboratorij u sklopu dijagnostičke obrade. Uspoređivane su dvije različite imunokemijske metode: imunoradiometrijska metoda (IRMA) i elektrokemiluminiscencijska imunokemijska metoda (ECLIA).

Rezultati: Dobiven je visok koeficijent korelacije ($r = 0,916$) uz interval pouzdanosti (95% CI) od 0,845 do 0,955 (razina signifikantnosti $P < 0,0001$). Podaci dobiveni korištenjem Passing-Bablockove regresijske analize pokazali su da ne postoji konstantno odstupanje između metoda ali da postoji malo proporcionalno odstupanje. Po izračunu Cusumovog testa nema značajnog odstupanja od linearnosti ($P = 1,00$). Podaci dobiveni korištenjem Demingove regresijske analize pokazali su da ne postoji niti konstantno niti proporcionalno odstupanje između metoda.

Zaključak: Tijekom praćenja koncentracija prolaktina kod svakog bolesnika važna je primjena iste metode na istom analizatoru kako bi rezultati bili sljedivi. Ukoliko se koncentracija prolaktina određuje drugom metodom potrebno je odrediti novu nultu koncentraciju prolaktina od koje bi proizlazilo praćenje koncentracije ovog hormona.

Ključne riječi: prolaktin, IRMA, ECLIA, usporedba

Summary

Introduction: Prolactin (PRL) is a protein hormone. It is excreted by adenohypophysis and other tissues to a lesser extent. Its production is primarily stimulated by estrogens while secretion is under the control of prolactin inhibiting factor (PIF) - dopamine. Its structure is similar to growth hormone (hGH) and human placental lactogen (hPL). In healthy patients serum prolactin appears in three forms of different relative molecular mass: prokaryotic monomer (23kDa) 86%, large prolactin (50-60 kDa) 9% and large-prolactin (> 150 kDa) 5%. Concentration of prolactin in serum of women is significantly higher than in men due to estrogen influence. Some physiological conditions such as sleep, physical exertion, stress, hypoglycemia, pregnancy and lactation are also elevated. The most common pathological conditions associated with prolactin are hyperprolactinemia caused by prolactinomas, a benign pituitary tumor.

Aim: The aim of this paper is to prove the absence or presence of statistically significant differences in the results of serum prolactin determined by two different methods.

Materials and Methods: A sample of 40 randomized patient samples from ambulatory patients was tested. Two different immunochemical methods were compared: the immunoradiometric method (IRMA) and the electrochemiluminiscence immunoassay method (ECLIA).

Results: High coefficient of correlation ($r = 0.916$) and significance level $P < 0.0001$ were obtained. The confidence interval (95% CI) for coefficient of correlation was 0.845 to 0.955. Data obtained by using the Passing and Bablock regression analysis showed that there are no constant deviations between methods but there is a slight proportional deviation. Cusum's test does not show significant linear deviations ($P = 1.00$). Data obtained using Deming regression analysis showed that there were no constant or proportional deviations between methods.

Conclusion: Monitoring of the value of prolactin in each patient is important with the application of the same methods on the same analyzer to make the results comparable. If prolactin is determined by other methods it is necessary to determine the new zero concentration of prolactin from which this hormone concentration can be monitored.

Key words: prolactin, IRMA, ECLIA, comparisson

9. Životopis

Osobni podaci

Ime i prezime Ivana Gašpar
Datum rođenja 27. lipnja 1995. u Splitu
Državljanstvo Hrvatsko
Adresa Put stare Duće 15, 21310 Omiš
Web adresa gaspar.ivana00@gmail.com

Školovanje

2002. - 2010. Osnovna škola „Josip Pupačić“ - Omiš
2010. - 2014. Srednja škola „Jure Kaštelan“ - Omiš; Opća gimnazija
2014. - 2017. Preddiplomski studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika;
Odjel zdravstvenih studija Sveučilište u Splitu

Osobne vještine i kompetencije

Strani jezik	Engleski	Tečno
Strani jezik	Talijanski	Osnovno
Korištenje računala	Napredno	
Vozačka dozvola	B kategorija	

Dodatni podaci

Sudjelovanje na kongresima **02.-05.06.2016.** - Kongres Hrvatske komore zdravstvenih radnika, Strukovnog razreda za medicinsko-laboratorijsku djelatnost s međunarodnim sudjelovanjem - A. Barać, I. Gašpar, A. Jurić, M. Lovrić
„Učinkovitost laboratorijskih testova u dijagnozi neonatalne sepse“
06.05.2017. – Simpozij personalizirana medicina

Nagrade i priznanja Nagrada i priznanje za izniman angažman u izvannastavnim aktivnostima 2017.

Volonterski rad Udruga izviđača Omiš – Omiš

10. Prilozi

10.1. Popis kratica

ADH - antidiuretski hormon (engl. antidiuretic hormone)

PRL - prolaktin (engl. prolactin)

CLIA - kemiluminiscencijska imunokemijska analiza (engl. chemiluminescence immunoassay)

ECL - kemiluminiscencijska analiza (engl. enhanced chemiluminescence)

ECLIA - elektrokemiluminiscencijska imunokemijska metoda
(engl. electrochemiluminescence immunoassay)

EGF - epidermalni faktor rasta (engl. epidermal growth factor)

ELISA - enzimimunokemijska analiza (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)

FSH - folikulstimulirajući hormon (engl. follicle-stimulating hormone)

hCG - humani korionski gonadotropin (engl. human chorionic gonadotropin)

hGH - humani hormon rasta (engl. human growth hormone)

HLA - humani leukocitni antigeni (engl. human leukocyte antigen)

hPL - humani placentarni laktogen (engl. human placental lactogen)

IRMA - imunoradiometrijska metoda (engl. immunoradiometric assay)

LH – luteinizirajući hormon (engl. luteinizing hormone)

PIF - dopamin; prolaktin inhibirajući faktor (engl. prolactin inhibitory factor)

RIA - radioimunoanaliza (engl. radio immuno-assay)

PRLR - prolaktinski receptor (engl. prolactin receptor)

TPA - tripropilamin (engl. tripropylamine)

TRH - tireootpuštajući hormon (engl. thyrotropin releasing hormone)

TSH - tireostimulirajući hormon (engl. thyroid-stimulating hormone)

10.2. Popis slika

Slika 1. Shematski prikaz povratne sprege izlučivanja prolaktina.....	2
Slika 2. Grafički prikaz udjela polimera prolaktina	2
Slika 3. Shematski prikaz cirkadijalnog ritma prolaktina	3
Slika 4. Hodogram izrade završnog rada	6
Slika 5. Shematski prikaz reakcijske smjese Prolaktin-IRMA metode.....	9
Slika 6. Shematski prikaz reakcijske smjese Prolactin II ECLIA metode	11
Slika 7. Grafički prikaz „kutija brkovi“ za dobivene koncentracije PRL – IRMA metodom.....	14
Slika 8. Grafički prikaz raspršenja za dobivene koncentracije PRL – IRMA metodom	15
Slika 9. Grafički prikaz „kutija brkovi“ za dobivene koncentracije PRL – ECLIA metodom.....	16
Slika 10. Grafički prikaz raspršenja za dobivene koncentracije PRL – ECLIA metodom	17
Slika 11. Grafički prikaz Passing-Bablokove regresije.....	19
Slika 12. Grafički prikaz Demingove regresijske analize.....	20
Slika 13. Dopuštenje etičkog povjerenstva za provođenje istraživanja u sklopu izrade završnog rada.....	31

10.3. Popis tablica

Tablica 1. Rezultati koncentracija prolaktina dobiveni dvjema imunokemijskim metodama	13
Tablica 2. Opisna statistika dobivenih koncentracija prolaktina metodom IRMA	14
Tablica 3. Opisna statistika dobivenih koncentracija prolaktina metodom ECLIA	16
Tablica 4. Izračun za Passing-Bablokovu regresijsku analizu	18

10.4. Etičko povjerenstvo

KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR SPLIT
ETIČKO POVJERENSTVO

Klasa: 500-03/17-01/11
Ur.br.: 2181-147-01/06/M. S.-17-2
Split, 07.03.2017.g.

IZ V O D
IZ ZAPISNIKA SA SJEDNICE ETIČKOG POVJERENSTVA KBC SPLIT

IVANA GAŠPAR, studentica Medicinsko laboratorijske dijagnostike Odjela zdravstvenih studija Sveučilišta u Splitu, uputila je Etičkom povjerenstvu zamolbu za odobrenje provedbe istraživanja:

„Postoji li razlika u koncentraciji prolaktina između dvije metode?“

Istraživanje se planira provesti za potrebe izrade završnog rada.

Zamolbi je priloženo kako slijedi :


- Plan istraživanja od dana 01.02.2017. g., s obrazloženjem ciljeva i metodologije istraživanja te kriterija uključivanja/isključivanja ispitanika;
- Obrazloženje o načinu zaštite osobnih podataka;
- Obrazloženje troškova istraživanja: Nema troškova za KBC Split;
- Suglasnost predstojnika Kliničkog zavoda za nuklearnu medicinu i Zavoda za medicinsku laboratorijsku dijagnostiku
- Trajanje istraživanja : mjesec dana

Nakon razmatranja zahtjeva, donijet je sljedeći

Z a k l j u č a k

Iz priložene dokumentacije razvidno je da se tijekom provođenja istraživanja štite prava i osobni podaci ispitanika u skladu sa Zakonom o zaštiti prava pacijenata (NN169/04, 37/08) i Zakonom o zaštiti osobnih podataka (NN 103/03-106/12), te da je istraživanje usklađeno s odredbama Kodeksa etike i deontologije Hrvatske komore zdravstvenih radnika iz 2010.g. Etičko povjerenstvo je suglasno s provedbom predloženog istraživanja uz uvjet da troškovi istraživanja ne terete KBC Split, te poštivanja navedenih etičkih načela

ZAMJENIK PREDSJEDNIKA
ETIČKOG POVJERENSTVA KBC SPLIT
PROF.DR.SC. MARIJAN SARAGA



KLINIČKI BOLNIČKI CENTAR SPLIT
Etičko povjerenstvo

Slika 13. Dopuštenje etičkog povjerenstva za provođenje istraživanja u sklopu izrade završnog rada