

Određivanje makroprolaktina u ispitivenju hiperprolaktinemije

Kalajžić, Nina

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:176:178535>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-11**

Repository / Repozitorij:



Sveučilišni odjel zdravstvenih studija
SVEUČILIŠTE U SPLITU

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



UNIVERSITY OF SPLIT



SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Nina Kalajžić

**ODREĐIVANJE MAKROPROLAKTINA U ISPITIVANJU
HIPERPROLAKTINEMIJE**

Završni rad

Split, 2017. godina

SVEUČILIŠTE U SPLITU

Podružnica

SVEUČILIŠNI ODJEL ZDRAVSTVENIH STUDIJA

PREDDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ

MEDICINSKO LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Nina Kalajžić

**ODREĐIVANJE MAKROPROLAKTINA U ISPITIVANJU
HIPERPROLAKTINEMIJE**

**ASSAYING OF MACROPROLACTIN IN ASSESMENT OF
HYPERPROLACTINEMIA**

Završni rad/ Bachelor's Thesis

Mentor:

**Dr. sc. Nada Bilopavlović, spec. med. biokemije i laboratorijske
medicine**

Split, 2017. godina

KRATICE

ECLIA	elektrokemiluminiscentna imunometoda engl. electrochemiluminescence immunoassay
EGF	epidermalni faktor rasta
GABA	gama amino maslačna kiselina
IgA	imunoglobulin A
IgM	imunoglobulin M
IgG	imunoglobulin G
IL - 2	Interleukin - 2
IL - 6	Interleukin - 6
MAO	monoaminooksidaza
Mr	molekularna masa
PEG	polietilen glikol
PTH	paratiroidni hormon
TRH	tireotropin
VIP	vazoaktivni crijevni peptid

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Prolaktin i njegova biološka uloga u organizmu	1
1.2. Regulacija izlučivanja prolaktina.....	3
1.3. Hiperprolaktinemija	4
1.3.1. Uzroci hiperprolaktinemije	5
1.4. Makroprolaktin	8
1.5. Metode određivanja makroprolaktina	9
1.5.1. Gel filtracija.....	10
1.5.2. Imunoadsorpcija	10
1.5.3. Ultrafiltracija	11
1.5.4. Taloženje polietilen glikolom.....	11
2. CILJEVI	13
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Ispitanici i metode.....	14
3.1.1. Elektrokemiluminiscentna imunometoda (ECLIA)	14
3.1.2. Metoda taloženja polietilen glikolom.....	16
4. REZULTATI	18
5. RASPRAVA.....	21
6. ZAKLJUČCI	23
7. LITERATURA	24
8. SAŽETAK	27
9. ABSTRACT	29
10. ŽIVOTOPIS	31

1. UVOD

1.1. Prolaktin i njegova biološka uloga u organizmu

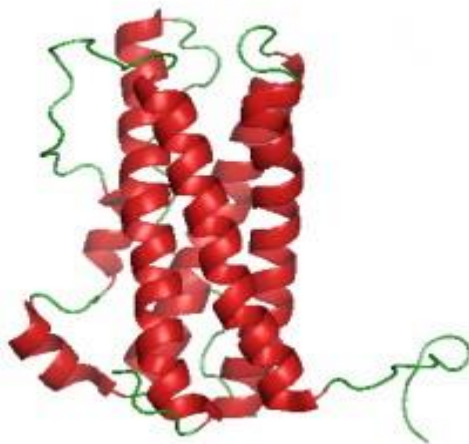
Prolaktin je polipeptidni hormon koji sadrži 199 aminokiselina. Sintetizira se i izlučuje najvećim dijelom iz specijaliziranih stanica prednjeg režnja hipofize, odnosno laktotropnih stanica. Sinteza i izlučivanje prolaktina nisu ograničeni samo na prednji režanj hipofize, nego i drugi organi mogu stvarati i izlučivati prolaktin (mozak, odnosno hipotalamus, posteljica, maternica, mliječna žlijezda, te imunološki sustav, prije svega limfociti) (1). Prolaktin se najprije sintetizira kao prohormon molekularne mase 26 kDa, te nakon proteolitičkog cijepanja i posttranslacijskih modifikacija nastaje monomerni (mali) prolaktin molekularne mase (M_r) 23 kDa. Ova monomerna izoforma je dominantan oblik u cirkulaciji, čini 80 – 95% ukupnog prolaktina, te je biološki i imunološki aktivan *in vivo* (2). Ostali oblici uglavnom uključuju dimerni (veliki) prolaktin, $M_r = 45 - 60$ kDa i polimerni (veliki-veliki) prolaktin ili makroprolaktin, $M_r > 150$ kDa. Poznato je da ova dva oblika u organizmu imaju nižu biološku aktivnost (3).

Koncentracija prolaktina u serumu ovisi o fiziološkim i dnevnim promjenama te su vrijednosti prolaktina veće u poslijepodnevnim satima nego ujutro. Također, izlučivanje prolaktina povećava se kod stresa, spavanja, vježbanja, probave hrane, trudnoće i traume (3). Iako se prije smatralo da prolaktin utječe samo na izlučivanje mlijeka tijekom trudnoće i nakon poroda, danas je poznato više od 300 njegovih bioloških učinaka. Prolaktin ima višestruku ulogu u reprodukciji osim laktacije, sudjeluje u održavanju homeostaze u organizmu, regulaciji osmotskog tlaka i imunoregulaciji (1). Ovi učinci prolaktina događaju se jer se veže za specifične receptore u spolnim stanicama, limfoidnim stanicama i jetri (4). Glavni biološki učinci prolaktina su: sinteza mlijeka (laktogeneza), rast i razvoj mliječnih žlijezda (mamogeneza) tijekom trudnoće te održavanje sekrecije mlijeka (galaktopoeza) nakon poroda. Inducira sintezu mliječnih proteina kazeina i γ -laktalbumina, mliječnog šećera laktoze i mliječnih masti te kontrolira sadržaj elektrolita u mlijeku. Osim prolaktina u navedenim fiziološkim procesima sudjeluju i drugi hormoni i faktori rasta. Istraživanja pokazuju da na rast i razvoj mliječnih žlijezda utječu estrogen, progesteron i glukokortikoidi,

dok na sekreciju mlijeka utječu hormon rasta, inzulin, hormoni štitnjače, paratiroidni hormon (PTH), kalcitonin i oksitocin (1)(5).

Prolaktin je zajednički posrednik imunoneuroendokrine regulacijske mreže unutar koje živčani, endokrini i imunološki sustav međusobno komuniciraju. Ima značajnu ulogu u regulaciji humornog i staničnog imunološkog odgovora kako u fiziološkim tako i u patološkim stanjima (npr. autoimune bolesti) (1). Olakšava sazrijevanje T-limfocita preko ekspresije interleukin-2 (IL-2) receptora, smanjuje toleranciju B-limfocita na autoantigene zbog antiapoptotičkog učinka, potiče razvoj antigen prezentirajućih stanica i povećava proizvodnju imunoglobulina (6).

Prolaktin sudjeluje u regulaciji transporta vode i otopljenih tvari kroz stanične membrane sisavaca, a time i u održavanju osmotskog tlaka. Tako npr. regulira transport otopljenih tvari kroz membrane epitelnih stanica dojke smanjujući transport natrija i povećavajući transport kalija. Također je odgovoran za transport vode, natrija, kalcija i klorida kroz membrane epitelnih stanica crijeva (1).



Slika 1. Struktura prolaktina (7)

1.2. Regulacija izlučivanja prolaktina

Normalna koncentracija serumskog prolaktina rezultat je kompleksne ravnoteže između pozitivnih i negativnih podražaja. Regulacija lučenja prolaktina regulirana je mnoštvom čimbenika hipofiznog i perifernog porijekla izravnim ili neizravnim učinkom na laktotropne stanice (3). Kao i za većinu hormona iz prednjeg režnja hipofize, izlučivanje prolaktina je pod regulacijom hormona hipotalamusa koji se izlučuju u hipotalamus-hipofiznu portalnu cirkulaciju (8).

Sintezu i izlučivanje prolaktina iz laktotropnih stanica hipofize, u najvećem dijelu, inhibira neurotransmiter dopamin koji se izlučuje u hipotalamusu i veže se na laktotropne D2 receptore. Osim dopamina, lučenje prolaktina inhibiraju i gama amino maslačna kiselina (GABA), somatostatin, acetilkolin i noradrenalin (1).

Faktori koji potiču sintezu i izlučivanje prolaktina uključuju antagoniste dopaminskih receptora, angiotenzin II, interleukin-6 (IL-6), estrogen, hormon koji oslobađa tireotropin (TRH), epidermalni faktor rasta (EGF) i vazoaktivni crijevni peptid (VIP). Tako npr. estrogen stimulira sintezu prolaktina u trudnoći, dok mehanizmi djelovanja ostalih faktora na sintezu i izlučivanje prolaktina nisu u potpunosti poznati (3).

Tablica 1. Regulacija izlučivanja prolaktina (1)

STIMULATORI LUČENJA PROLAKTINA	INHIBITORI LUČENJA PROLAKTINA
Antagonisti dopaminskih receptora	Dopamin
Angiotenzin II	GABA
IL-6	Somatostatin
Estrogen	Acetilkolin
EGF	Noradrenalin
VIP	

1.3. Hiperprolaktinemija

Hiperprolaktinemija je stanje u kojem je povećana koncentracija monomernog prolaktina u krvi, koja nastaje zbog fizioloških ili patoloških stanja koja uzrokuju hipersekreciju prolaktina iz laktotropnih stanica adenohipofize. Hiperprolaktinemija se može dijagnosticirati ako je u uzorku krvi uzetom natašte koncentracija prolaktina iznad 324 mIU/l kod muškaraca i iznad 496 mIU/l kod žena. Iako se hiperprolaktinemija može pojaviti kod oba spola, većina pacijenata su žene. Povećana koncentracija prolaktina u krvi kod oba spola snižava razinu spolnih hormona (estrogena i testosterona) što dovodi do poremećaja menstruacijskog ciklusa i spolne funkcije (4).

Hiperprolaktinemija može biti povezana s ozbiljnim kliničkim stanjima (npr. adenomi), ali može biti i asimptomatska. U liječenju hiperprolaktinemije uzrokovane adenomom hipofize uglavnom se koriste agonisti dopamina, kao npr. bromokriptin. Samo u rijetkim slučajevima, kada je primjena lijekova neučinkovita ili kada bolesnik ima nuspojave pri uzimanju lijekova, adenom se treba kirurški ukloniti. Ako se tumor ne može operirati, preporučuje se radioterapija (3).

Klinički simptomi hiperprolaktinemije značajno variraju ovisno o dobi i spolu pacijenta i veličini prolaktina koji se nalazi u prekomjernoj koncentraciji u krvi. Kod žena su simptomi očitiji i javljaju se ranije nego kod muškaraca. Žene mogu imati simptome poput oligomenoreje, amenoreje, galaktoreje, smanjenja libida i neplodnosti, kod muškaraca se javlja erektilna disfunkcija, smanjenje libida, neplodnost i ginekomastija, a galaktoreja se rijetko pojavljuje. Djeca s hiperprolaktinemijom imaju simptome kao što su odgođen pubertet, galaktoreja, ginekomastija i primarna amenoreja. Važno je napomenuti da su kod pacijenata s visokom koncentracijom makroprolaktina u krvi, u većini slučajeva, odsutni navedeni simptomi (3)(9).

1.3.1. Uzroci hiperprolaktinemije

Hiperprolaktinemija može biti fiziološka, patološka, idiopatska i uzrokovana lijekovima. Fiziološka hiperprolaktinemija je obično blaga ili umjerena. Tijekom trudnoće, prolaktin se u serumu progresivno povećava na oko 4240 – 10600 mIU/l. Stres, spavanje i probava također uzrokuju povećanje koncentracije prolaktina (3).

Patološka hiperprolaktinemija može biti uzrokovana bolestima hipotalamusa i hipofize (najčešće tumori) koje uzrokuju kompresiju infundibuluma hipofize, kao i ostalim bolestima koje nisu vezane za hipotalamus i hipofizu. Većina tumora hipofize su adenomi. Adenomi se dijele u dvije skupine: mikroadenomi koji su manji od 10 mm i češći su kod žena u premenopauzi i makroadenomi koji su veći od 10 mm, a češće se javljaju kod muškaraca i žena u postmenopauzi. Među adenomima prolaktinomi su najčešći tip (25 – 30%) i uzrok su kronične hiperprolaktinemije (3). Nefunkcionalni adenomi, gliomi i kraniofaringeomi mogu komprimirati ili razoriti tkivo hipofize ili hipotalamusa što može rezultirati povećanim lučenjem prolaktina (4). Takvi pacijenti imaju simptome poput glavobolje, mučnine, povraćanja, poremećaja vidnog polja, kranijalne neuropatije, hipopituitarizma i cerebrospinalne rinoreje. Oko 40% pacijenata s hipotireozom, 30% bolesnika s kroničnim zatajenjem bubrega i do 80% bolesnika na hemodijalizi imaju blagi porast koncentracije prolaktina (3).

Primarna hipotireoza može biti uzrok hiperprolaktinemije. Zbog smanjene funkcije štitne žlijezde, kompenzatorno se povećava izlučivanje TRH iz hipotalamusa, što rezultira povećanim lučenjem prolaktina. U ovom slučaju liječenje se provodi sintetskim hormonima štitnjače. Nakon normalizacije hormona štitnjače u krvi, normalizirat će se i koncentracija prolaktina (8).

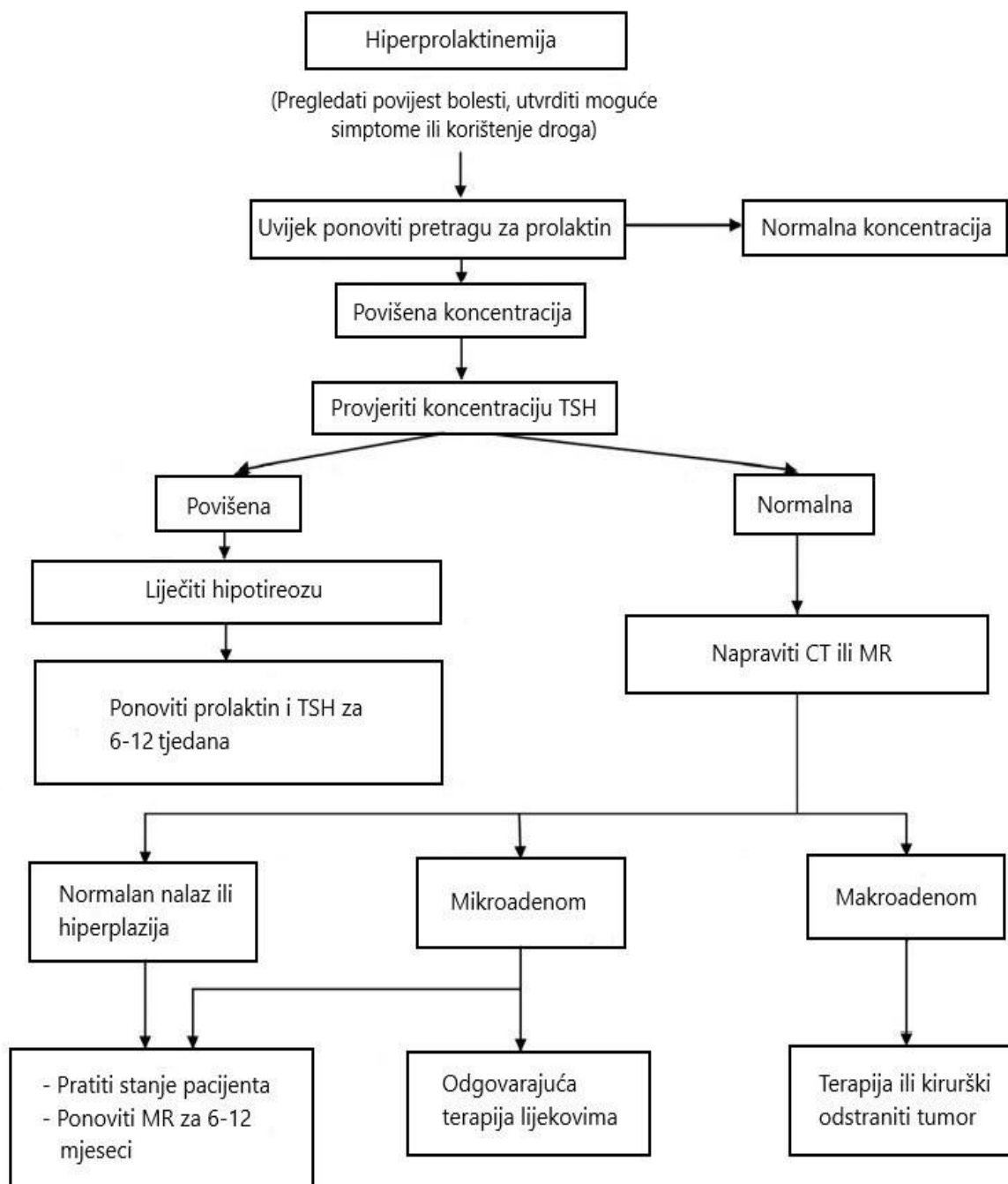
Hiperprolaktinemija bez utvrđenog uzroka zahtjeva dodatnu pretragu na makroprolaktin i snimanje područja hipotalamusa i hipofize. Makroprolaktin je jedan od glavnih uzroka idiopatske hiperprolaktinemije, stoga asimptomatskim pacijentima treba napraviti dodatnu pretragu taloženja makroprolaktina i ponovo izmjeriti koncentraciju monomernog prolaktina. Blago povišena razina serumskog prolaktina može biti posljedica nefunkcionalnog adenoma hipofize ili kraniofaringeoma koji komprimiraju infundibulum hipofize, ali visoka razina

prolaktina obično je povezana s funkcionalnim prolaktinomom hipofize (10). Za dijagnozu prolaktinoma može se koristiti kompjuterizirana tomografija (CT), ali najbolju vizualizaciju područja turskog sedla pruža magnetska rezonanca (MR) u kojoj se koristi kontrastno sredstvo s ionima gadolinija. U slučajevima kada su svi uzroci hiperprolaktinemije isključeni i adenom se ne može vizualizirati CT-om ili MR-om, takva hiperprolaktinemija se naziva idiopatska hiperprolaktinemija (3).

Hiperprolaktinemija može biti uzrokovana lijekovima kao što su fenotijazini, metoklopramid, sulpirid, risperidon, metildopa, opijati, antihistaminici (cimetidin), inhibitori monoaminooksidaze (MAO) i verapamil. Navedeni lijekovi mogu uzrokovati povećanje koncentracije prolaktina iznad 4240 mIU/l. Ako se ustanovi da određeni lijek uzrokuje hiperprolaktinemiju, nisu potrebne daljnje pretrage, već je dovoljno pacijentu promijeniti terapiju (3)(9).

Tablica 2. Uzroci hiperprolaktinemije (11)

HIPERPROLAKTINEMIJA	UZROCI
Fiziološka hiperprolaktinemija	Trudnoća, spavanje, probava hrane, stres
Patološka hiperprolaktinemija	Adenomi (najčešće prolaktinomi), gliomi i kraniofaringeomi
Hiperprolaktinemija uzrokovana primarnom hipotireozom	Povećano lučenje TRH
Idiopatska hiperprolaktinemija	Nije poznat uzrok hiperprolaktinemije
Hiperprolaktinemija uzrokovana lijekovima	Fenotijazini, metoklopramid, sulpirid, risperidon, metildopa, opijati, antihistaminici, inhibitori MAO, verapamil



Slika 2. Algoritam za dijagnosticiranje i liječenje hiperprolaktinemije (3)

1.4. Makroprolaktin

Iako je monomerni oblik dominantan u cirkulaciji, prolaktin je prisutan u različitim molekularnim oblicima o kojima ovisi bioaktivnost hormona. Prolaktin je prisutan u obliku velikog prolaktina molekularne mase od 50 kDa i velikog-velikog prolaktina (makroprolaktina) molekularne mase od 150 kDa, koji imaju visoka imunogena svojstva, ali nemaju biološki učinak. Veliki prolaktin i makroprolaktin predstavljaju dimere, trimere i polimere prolaktina ili imunokomplekse prolaktin-imunoglobulin (3).

Makroprolaktin je kompleks koji najčešće nastaje zbog vezanja imunoglobulina G (dominantna podklasa je IgG4) na monomerni prolaktin, ali imunoglobulin A (IgA) i imunoglobulin M (IgM) se također mogu vezati na molekulu prolaktina (12)(13). Mehanizam nastanka navedenih imunoglobulina nije u potpunosti poznat, ali pretpostavlja se da posttranslacijske modifikacije (glikozilacija i fosforilacija) nekih proteina i prolaktina mogu uzrokovati nastanak novih epitopa koji potiču proizvodnju imunoglobulina. Nastanak makroprolaktina nije povezan sa životnom dobi, može nastati u oba spola, ali većina pacijenata su žene (4).

Zbog svoje velike molekularne mase makroprolaktin je prisutan uglavnom u intravaskularnom prostoru, ne može proći kroz kapilarni endotel i vezati se za prolaktinske receptore na ciljanim stanicama te je to razlog niske biološke aktivnosti i nedostatka kliničkih simptoma (14).

Iako manji postotak pacijenata s povišenim vrijednostima makroprolaktina može imati simptome hiperprolaktinemije te ih se ne može pouzdano razlikovati na temelju kliničke slike, na prisustvo makroprolaktina treba sumnjati kada su odsutni tipični simptomi hiperprolaktinemije. Zbog toga se rutinski primjenjuje probirna metoda za ispitivanje prisutnosti makroprolaktina kako bi se izbjegla nepotrebna dijagnostička ispitivanja, kao i liječenje. Testiranje na makroprolaktin treba provesti u slučajevima asimptomatske hiperprolaktinemije. Mnogi komercijalni testovi ne otkrivaju makroprolaktin, ali postoje metode kojima se njegovo prisustvo može dokazati. Metoda taloženja polietilen glikolom je metoda izbora za otkrivanje prisutnosti makroprolaktina u serumu (3).

Prisutnost makroprolaktina u cirkulaciji je benigno stanje u kojem se rijetko pojavljuju klinički simptomi zbog čega su nepotrebne hormonske i radiološke pretrage, kirurški zahvati, a isto tako i primjena lijekova koji se koriste za liječenje hiperprolaktinemije (najčešće agonisti dopamina), a ne snižavaju koncentraciju makroprolaktina, kao i dugotrajno praćenje.

1.5. Metode određivanja makroprolaktina

Laboratorijske tehnike kojima se dokazuje hiperprolaktinemija neophodne su za točnu dijagnozu i liječenje bolesnika. Danas se laboratorijski stručnjaci susreću s različitim komercijalno dostupnim imunokemijskim testovima kako bi se razlikovali pacijenti s hiperprolaktinemijom koja nastaje zbog povećane koncentracije monomernog prolaktina, od onih pacijenata s povećanim vrijednostima makroprolaktina. Naime, makroprolaktin interferira u svim imunokemijskim testovima, ali u različitim stupnjevima. Općenito, metode određivanja prolaktina imaju visoku, srednju ili malu vjerojatnost interferencije makroprolaktina (4). U biokemijskim pretragama makroprolaktin se ne dokazuje izravno, već indirektnim metodama. Najčešće se koristi taloženje polietilen glikolom ili imunoadsorpcija (11).

Unatoč svom znanju i nastojanjima da se riješi ovaj analitički problem, proizvođači imunokemijskih testova nisu uspjeli proizvesti antitijelo koje bi bilo usmjereno protiv epitopa specifičnih samo za monomerni prolaktin. Bez sumnje, dobra laboratorijska praksa zahtjeva probir na makroprolaktin kod svih pacijenata koji imaju povećanu koncentraciju prolaktina u serumu, te određivanje koncentracije prolaktina nakon uklanjanja makroprolaktina iz uzorka. Za odvajanje makroprolaktina koristi se nekoliko različitih tehnika koje su opisane u nastavku (4).

Malo je vjerojatno da se bilo koja od navedenih tehnika za određivanje makroprolaktina može koristiti za ispitivanje svih uzoraka analiziranih u kliničkom biokemijskom laboratoriju. Dobro poznavanje svih prednosti i nedostataka metoda koje se koriste za određivanje makroprolaktina, komunikacija između laboratorija i kliničara te između laboratorija i

proizvođača imunokemijskih testova dovode do brže dijagnoze, točnijih rezultata, smanjenja troškova i uvođenja pravilne terapije (4).

1.5.1. Gel filtracija

Gel filtracija je referentna metoda za odvajanje makroprolaktina od različitih molekularnih oblika prolaktina: monomernog, dimernog i polimernog prolaktina. Na gelu se molekule razdvajaju na temelju različite molekularne mase (6).

Iako je ova tehnika pouzdana i reproducibilna, neki nedostaci sprječavaju široku primjenu ove metode u dijagnostičkim laboratorijima. Određena količina prolaktinskih autoantitijela se može odvojiti od kompleksa tijekom duljeg trajanja filtracije, što dovodi do smanjenja koncentracije makroprolaktina. Nije točno određena granična vrijednost kojom bi se mogla dijagnosticirati makroprolaktinemija, ali se pozitivnim rezultatom smatra kada je 30-60% prolaktina u obliku makroprolaktina. Zatim, procjena postotka makroprolaktina može biti neprecizna u slijedu od 30 do 40 frakcija. Također, adsorpcija ili denaturacija imunoreaktivnog materijala tijekom postupka gel filtracije mogu uzrokovati gubitak pojedinačnih izoformi prolaktina u testiranom uzorku. Posljednji i možda najvažniji nedostatak je dugotrajnost gel filtracije te je metoda skupa i zahtjeva određenu tehničku vještinu, pa je prikladnija za istraživačke laboratorije (4).

1.5.2. Imunoadsorpcija

Imunoadsorpcija s proteinom A i proteinom G temelji se na visokom afinitetu proteina A i G za ljudski IgG, koji je primarno antitijelo za prolaktin u serumu. Nakon inkubacije, imunološki kompleksi između proteina A ili proteina G i makroprolaktina istalože se centrifugiranjem, a koncentracija monomernog prolaktina mjeri se u supernatantu. Iako ova metoda pokazuje prihvatljivu preciznost i vrijeme trajanja metode je zadovoljavajuće, neki od autora tvrde da obrada seruma s proteinima A i G dovodi do značajnog odstupanja u koncentraciji monomernog prolaktina. Takvo odstupanje rezultata od ciljnih vrijednosti ograničava korištenje ove metode za odvajanje makroprolaktina iz seruma (4).

1.5.3. Ultrafiltracija

Ultrafiltracija je metoda koja se temelji na prolasku molekula prolaktina kroz membranu koja selektivno zadržava čestice na temelju njihove razlike u naboju, molekularnoj masi (veličini) i trodimenzionalnoj strukturi. Uzorak seruma se razrijedi s fiziološkom otopinom u kojoj se nalazi fosfatni pufer, zatim se uzorak podvrgne filtriranju te se nakon toga centrifugira na preporučenoj brzini određeno vrijeme. Koncentracija monomernog prolaktina se mjeri u ultrafiltriranom i početnom uzorku, a rezultat se izdaje u obliku postotka (4). Iako ultrafiltracija predstavlja praktičnu i preciznu alternativu gel filtraciji za procjenu makroprolaktina u serumu, koncentracije prolaktina zabilježene nakon ultrafiltracije, u usporedbi s koncentracijama nakon gel filtracije, mogu značajno varirati od uzorka do uzorka (2)(4).

1.5.4. Taloženje polietilen glikolom

Brojne studije pokazuju da polietilen glikol (PEG) uzrokuje taloženje makroprolaktina u serumu te predstavlja jednostavnu, jeftinu, dostupnu i reproducibilnu metodu za probir seruma u kojima je povećana koncentracija prolaktina. Metoda se temelji na različitom taloženju proteina s obzirom na njihovu molekularnu masu i topljivost u vodenoj otopini PEG-a (4). Taloženje s PEG-om je test koji se najčešće upotrebljava kao probirni test za makroprolaktin i lako se provodi u kliničkim laboratorijima (2). Koristi se 25%-tni PEG, a postotak precipitiranog prolaktina predstavlja postotak makroprolaktina (6). Kada je udio makroprolaktina u ukupno izmjerenoj koncentraciji prolaktina, nakon taloženja PEG-om, veći od 60%, uzorak se smatra pozitivnim na prisutnost makroprolaktina (13). Međutim, PEG može uzrokovati i taloženje monomernog prolaktina (do 25%), te ovaj nedostatak specifičnosti može dovesti do pogrešne interpretacije koncentracije prolaktina. Zatim, prisutnost PEG-a u uzorku može ometati određene imunokemijske analize prolaktina. Kako bi se izbjegli problemi u interpretaciji rezultata izmjerenih koncentracija prolaktina, preporučuje se da svaki laboratorij koji se bavi probirom na makroprolaktin, mora utvrditi specifične referentne intervale koji su dobiveni iz seruma zdravih pojedinaca koji su

prethodno tretirani PEG-om. U rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici ovako modificirani referentni intervali omogućuju precizno prepoznavanje bolesnika s hiperprolaktinemijom (4).

Tablica 3. Prednosti i nedostaci različitih metoda koje se koriste za ispitivanje makroprolaktinemije (6)

METODA	PRINCIP	PREDNOSTI	NEDOSTATCI
Gel filtracija	Odvajanje različitih oblika prolaktina na temelju različite molekularne mase	Precizna Referentna metoda	Dugotrajna Skupa
Imunoadsorpcija	Makroprolaktin se veže na protein A ili protein G	Identifikacija prolaktina vezanog za IgG	Odstupanja u koncentraciji monomernog prolaktina
Ultrafiltracija	Različiti oblici prolaktina se odvajaju zbog razlike u naboju, veličini i trodimenzionalnoj strukturi	Praktična Relativno precizna	Neusporedivost rezultata s referentnom metodom
Taloženje PEG-om	PEG uzrokuje taloženje makroprolaktina	Jednostavna Jeftina Metoda izbora za probir makroprolaktina	Nije visoko specifična

2. CILJEVI

- Izdvojiti rezultate s izmjerenim koncentracijama prolaktina u vremenskom intervalu od godinu dana iz laboratorijskog informacijskog sustava Zavoda za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split
- Odrediti udio rezultata s povišenim koncentracijama prolaktina u ukupnom broju izmjerenih koncentracija prolaktina
- Odrediti udio zahtjeva za ispitivanjem prisutnosti makroprolaktina u ukupnom broju povišenih koncentracija prolaktina
- Odrediti udio rezultata koji ukazuju na makroprolaktinemiju u ukupnom broju zahtjeva za ispitivanje prisutnosti makroprolaktina metodom taloženja PEG-om

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Ispitanici i metode

U ovom istraživanju iz laboratorijskog informacijskog sustava Zavoda za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split izdvojeno je 1300 pacijenta koji su imali rezultat za izmjereni prolaktin u vremenskom periodu od godinu dana (28. lipnja 2016 – 28. lipnja 2017). Vrijednosti prolaktina mjerene su elektrokemiluminiscentnom metodom na imunoanalizatoru Cobas Roche e 601. Dobiveni rezultati obrađeni su u programu Microsoft Excel 2010. Uzorci su potjecali od pacijenata s kliničkom sumnjom na hiperprolaktinemiju ili prisutnost makroprolaktina te od pacijenata s potvrđenom dijagnozom hiperprolaktinemije.

3.1.1. Elektrokemiluminiscentna imunometoda (ECLIA)

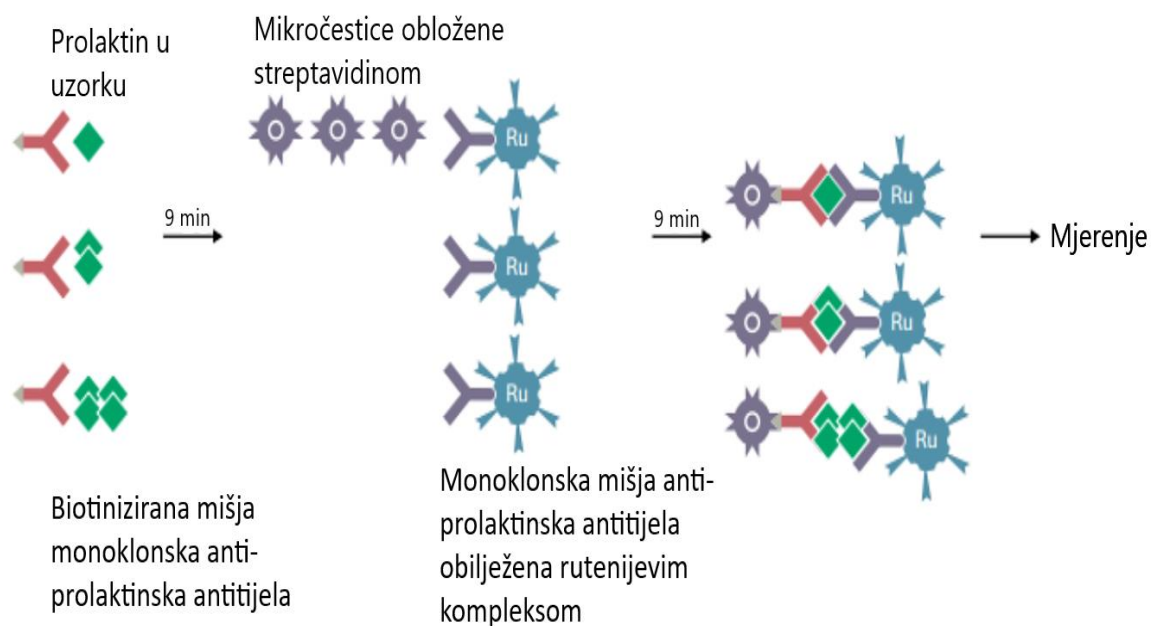
ECLIA test je sendvič metoda s dva monoklonska antitijela koja se koristi za kvantitativno *in vitro* određivanje koncentracije prolaktina u ljudskom serumu i plazmi. Ako su u uzorku prisutni makroprolaktin i veliki prolaktin mogu se ukloniti pomoću taloženja PEG-om.

Metoda se sastoji od dvije inkubacije koje sveukupno traju 18 minuta. 10 µl uzorka se inkubira 9 minuta sa specifičnim (mišjim) monoklonskim anti-prolaktinskim antitijelima koja su obilježena biotinom. Ako dođe do vezanja antitijela i prolaktina iz uzorka nastaje prvi kompleks. Nakon prve inkubacije reakcijskoj smjesi dodaju se mikročestice obložene streptavidinom i monoklonska (mišja) anti-prolaktinska antitijela obilježena rutenijevim kompleksom te se stvara i fiksira sendvič kompleks na čvrstoj fazi (mikročesticama) zahvaljujući reakciji biotina i streptavidina. Inkubacija također traje 9 minuta nakon čega se prolaktin iz uzorka nalazi u sendviču dvaju antitijela (15)(16).

Nakon dvije inkubacije reakcijska smjesa se aspirira u mjernu stanicu gdje se mikročestice vežu za površinu elektrode, a nevezane čestice ispiru se pomoću otopine ProCell/ ProCell M. Povećanje napona na elektrodi uzrokuje prijenos elektrona te kemiluminiscentnu emisiju

rutenijevog kompleksa čiji se signal mjeri luminometrijski. Rezultati se određuju pomoću aktualne kalibracijske krivulje u dvije točke koja je pohranjena u upravljačkom računalu analizatora te glavnom krivuljom također pohranjenonj u računalu, a povezanoj s aktualnom kalibracijskom krivuljom preko barcoda reagensa (17).

Princip testa: sendvič imunometoda



Slika 3. Princip ECLIA imunotesta. Uzorcima koji su prethodno obrađeni dodaju se antitijela koja su specifična za analit koji se testira (biotinizirana antitijela i antitijela obilježena rutenijevim kompleksom), te mikročestice obložene streptavidinom. Nastaje sendvič kompleks, a mjerenje kemiluminiscentne emisije vrši se luminometrom (18)

Tablica 4. Karakteristike ECLIA imunotesta (18)

Vrijeme trajanja testa	18 minuta
Princip testa	Sendvič imunometoda
Kalibracija	2 točke
Uzorak	Serum, Li-heparin plazma, K ₃ -EDTA plazma
Volumen uzorka	10 µl
Donja granica detekcije	1 µIU/ml
Mjerni raspon	1 – 10000 µIU/ml
Očekivane vrijednosti (svaki laboratorij trebao bi istražiti očekivane vrijednosti, te ako je potrebno, prilagoditi referentne intervale vlastitoj populaciji bolesnika.)	Muškarci (N= 102) 86 – 324 µIU/ml Žene (N= 198) 102 – 496 µIU/ml

3.1.2. Metoda taloženja polietilen glikolom

Metoda taloženja PEG-om je jedan od načina razlikovanja monomernog prolaktina i makroprolaktina. 25%-tna otopina PEG-a ima sposobnost taloženja imunokompleksa kao što je makroprolaktin.

Prije obrade seruma PEG-om potrebno je napraviti 25%-tnu otopinu PEG-a. 2,5 g PEG 6000 otopi se u 6 ml destilirane ili deionizirane vode na sobnoj temperaturi (18 – 25 °C) uz miješanje tijekom 15 minuta. Nakon toga, otopini treba dodati 4 ml destilirane ili deionizirane vode tako da sveukupan volumen bude 10 ml. Pripremljena 25%-tna otopina stabilna je 7 dana, a pohranjuje se na temperaturi od 20 do 25 °C (17).

Serum se pomiješa s istom količinom 25%-tne otopine PEG-a (minimalno 180 µl), dobro izmiješa te se inkubira na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon inkubacije uzorak se centrifugira na 10000 g tijekom 5 minuta, a potom se nastali supernatant tretira kao i nativni uzorak za određivanje prolaktina. Dilucijski efekt i koprecipitacija monomernog prolaktina

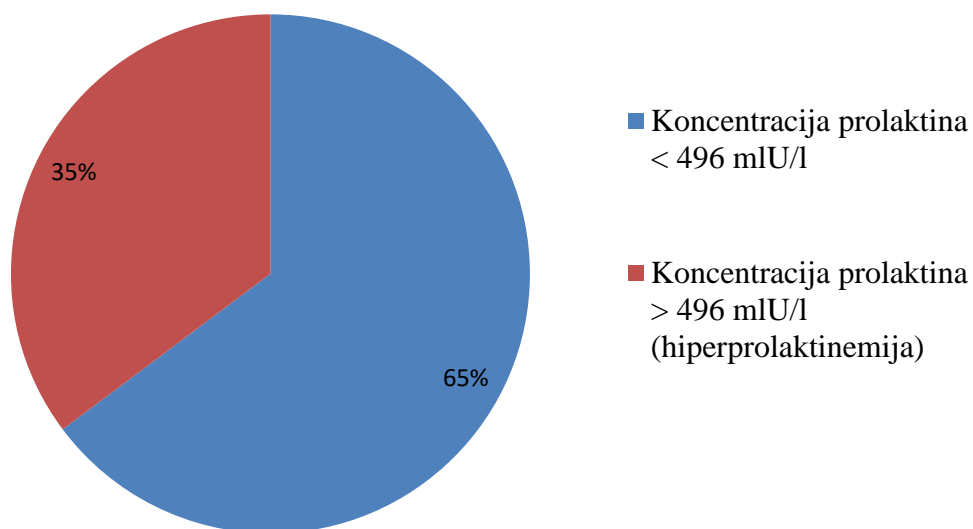
bi se trebali uzeti u obzir. Rezultat se izražava kao postotak koncentracije prolaktina u nativnom uzorku. Ukoliko je taj postotak veći od 60%, uzorak sadrži uglavnom monomerni prolaktin, a ako je postotak od 40% do 60% tada su u uzorku prisutni monomerni prolaktin, oligomerni prolaktin i/ili makroprolaktin. Ako je postotak manji od 40% tada se u uzorku nalazi uglavnom makroprolaktin i/ili oligomerni prolaktin (17)(19).

4. REZULTATI

Tablica 5. Udio hiperprolaktinemije (u ukupnom broju uzoraka)

Koncentracija prolaktina	N
< 496 mIU/l	842
> 496 mIU/l	458

**Udio hiperprolaktinemije
(u ukupnom broju uzoraka)**

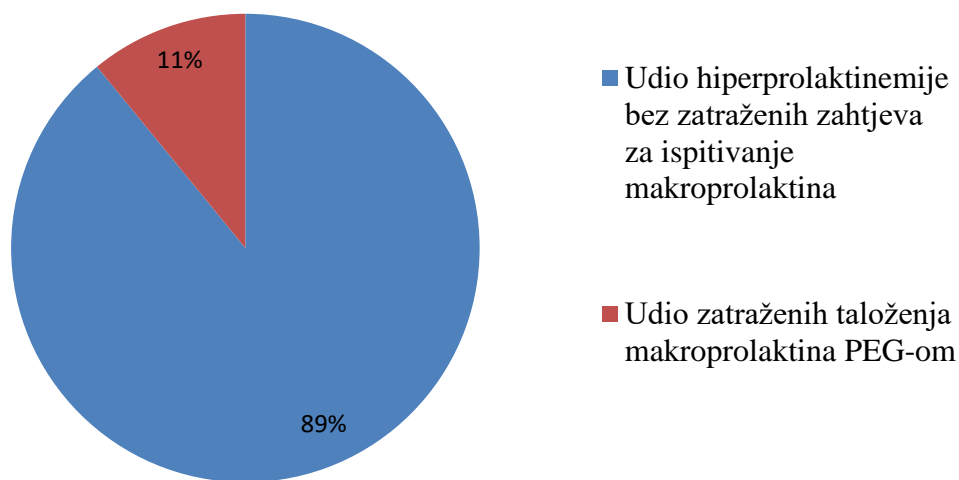


Grafikon 1. Udio hiperprolaktinemije (u ukupnom broju uzoraka)

Tablica 6. Udio zatraženih taloženja PEG-om u ukupnom broju izmjerenih povišenih koncentracija prolaktina

	N
Udio hiperprolaktinemije bez zatraženih zahtjeva za ispitivanje makroprolaktina	408
Udio zatraženih taloženja makroprolaktina PEG-om	50

Udio zatraženih taloženja PEG-om u ukupnom broju povišenih koncentracija prolaktina

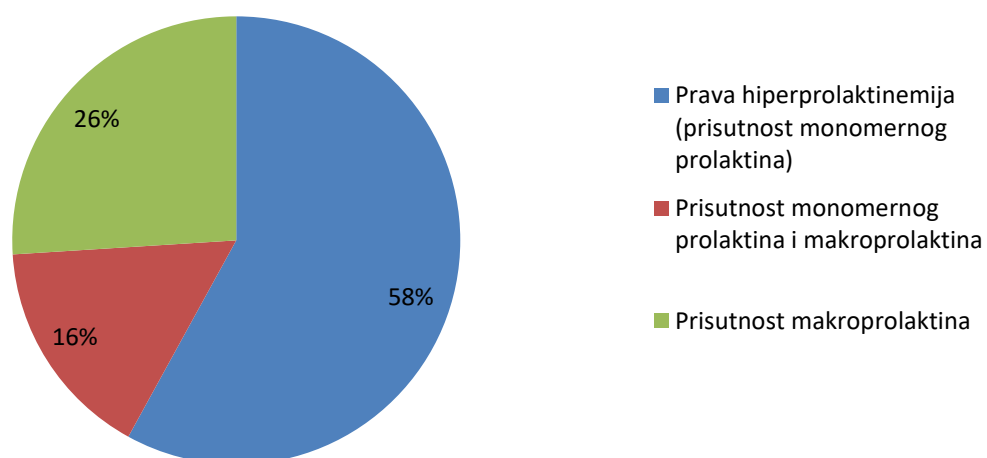


Grafikon 2. Udio zatraženih taloženja PEG-om na ukupan broj povišenih prolaktina

Tablica 7. Udio makroprolaktina u ukupnom broju zatraženih taloženja PEG-om

	N
Prava hiperprolaktinemija (prisutnost monomernog prolaktina)	29
Prisutnost monomernog prolaktina i makroprolaktina	8
Prisutnost makroprolaktina	13

Udio makroprolaktina u ukupnom broju zatraženih taloženja PEG-om



Grafikon 3. Udio makroprolaktina u ukupnom broju zatraženih taloženja PEG-om

5. RASPRAVA

Hiperprolaktinemija je stanje povećane koncentracije monomernog prolaktina u krvi uzrokovano fiziološkim ili patološkim procesima koji dovode do hipersekrecije prolaktina iz adenohipofize. Hiperprolaktinemija može biti fiziološka, patološka, idiopatska i uzrokovana lijekovima. Klinički simptomi hiperprolaktinemije se razlikuju ovisno o dobi i spolu pacijenta te veličini prolaktina koji se nalazi u prekomjernoj koncentraciji u krvi, ali stanje može biti i asimptomatsko (3).

Uzrok izmjerenih visokih koncentracija prolaktina kod asimptomatskih pacijenata je upravo prisutnost makroprolaktina. Makroprolaktin je kompleks velike molekularne mase koji nastaje kao posljedica vezanja imunoglobulina na monomerni prolaktin. Vezanjem prolaktina u makrokomplekse slabi njegova biološka aktivnost čime se objašnjava izostanak simptoma kod pacijenata s prisutnim makroprolaktinom u cirkulaciji. Iako makroprolaktin nema biološki učinak u organizmu, interferira u svim imunokemijskim testovima. Naime, imunokemijski testovi za prolaktin mjere bez razlike vrijednosti biološki inaktivnog makroprolaktina zajedno s biološki aktivnim prolaktinom. Stoga cirkulirajući makroprolaktin pridonosi izmjerenoj koncentraciji prolaktina imunokemijskim testovima (4). U krvi pacijenata s povišenom koncentracijom prolaktina prisutni su monomerni, oligomerni i makroprolaktin i to različitim udjelom. Asimptomatska stanja s izmjerenom povišenom koncentracijom prolaktina stoga se povezuju s prevladavajućim udjelom makroprolaktina koji je biološki inaktivan. Zbog svega prethodno navedenog, svim asimptomatskim pacijentima s povišenim koncentracijama prolaktina treba napraviti dodatnu pretragu taloženja makroprolaktina s PEG-om i ponovo izmjeriti koncentraciju monomernog prolaktina kako bi se u slučaju dokaza prisutnosti makroprolaktina u prevladavajućem udjelu izbjegla daljnja nepotrebna klinička obrada pacijenata. Uzorak seruma pacijenta koji se obrađuje taloženjem nakon podvrgavanja ponovnom mjerenju koncentracije prolaktina mora sadržavati manje od 40% koncentracije prolaktina izmjerene prije taloženja da bi se zaključilo da pacijent u cirkulaciji ima uglavnom makroprolaktin.

U ovom istraživanju iz laboratorijskog informacijskog sustava Zavoda za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split izdvojeno je 1300 pacijenta koji su imali rezultat za

izmjereni prolaktin u vremenskom periodu od godinu dana. Od ukupnih 1300 uzoraka, manji broj pacijenata, njih 458 je imalo povišenu koncentraciju prolaktina u odnosu na većinu od njih 842 koji su imali normalne vrijednosti izmjerenog prolaktina. Od navedenih 458 uzoraka, upućeno je samo 50 zahtjeva za ispitivanje makroprolaktina metodom taloženja s PEG-om. Laboratorijski stručnjak nema uvid u kliničko stanje pacijenta pa prema tome o dodatnom testiranju na prisustvo makroprolaktina odlučuje sam kliničar ukoliko za to postoji prava potreba, odnosno ukoliko se radi o asimptomatskom pacijentu. Prema tome jedno od mogućih objašnjenja zašto je u odabranom vremenskom periodu kod malog broja pacijenata, s obzirom na broj onih s povišenom koncentracijom prolaktina, zatraženo dodatno ispitivanje na prisustvo makroprolaktina je vjerojatno prisustvo kliničkih simptoma koji dokazuju patološku hiperprolaktinemiju i zahtjevaju daljnju obradu pacijenta. U tom slučaju je podatak o prisutnosti makroprolaktina nevažan.

6. ZAKLJUČCI

1. U ukupnom broju zahtjeva za mjerenje koncentracije prolaktina unutar godinu dana u Zavodu za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split, pronađen je veći udio rezultata s izmjerenom normalnom koncentracijom prolaktina u krvi od onih koji ukazuju na hiperprolaktinemiju
2. U odabranom vremenskom periodu udio zahtjeva za ispitivanjem makroprolaktina u krvi je malen u odnosu na broj pacijenata s izmjerenom povišenom koncentracijom prolaktina
3. U ukupnom broju zahtjeva za ispitivanjem prisutnosti makroprolaktina u krvi najveći je udio rezultata koji ukazuju na pravu hiperprolaktinemiju

7. LITERATURA

1. Freeman M. E., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G. Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*. 2000; 80: 1523–1631. (<http://physrev.physiology.org/content/80/4/1523.long>); pristupljeno 20.06.2017
2. Gibney J., Smith T. P., McKenna T.J. Clinical relevance of macroprolactin. *Clinical Endocrinology*. 2005; 62: 633–643. (http://www.saegre.org.ar/biblioteca/arboll_bibliografico/septiembre2005/clin_endocrinol_macro_prol.pdf); pristupljeno 12.08.2017
3. Majumdar A., Mangal N. S. Hyperprolactinemia. *J Hum Reprod Sci*. 2013; 6(3): 168–175. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4062336/>); pristupljeno 14.06.2017
4. Kasum M., Oreskovic S., Zec I., Jezek D., Tomic V., Gall V., et al. Macroprolactinemia: new insights in hyperprolactinemia. *Biochem Med (Zagreb)*. 2012; 22(2): 171–179. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4062336/>) pristupljeno 14.06.2017
5. Čvorišćec D., Čepelak I. (2009) 14. Hormoni. U: Štrausova medicinska biokemija. Zagreb: Medicinska naklada d.o.o., str. 350–351
6. Shimatsu A., Hattori N. Macroprolactinemia: Diagnostic, Clinical, and Pathogenic Significance. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 167132. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3529459/>); pristupljeno 20.06.2017
7. Preuzeto s: <http://emedicine.medscape.com/article/2089400-overview#showall>
8. Serri O., Chik C. L., Ur E. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *CMAJ*. 2003; 169(6): 575–581. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC191295/>); pristupljeno 13.06.2017
9. Ignacak A., Kasztelnik M., Sliwa T., Korbut R.A., Rajda K., Guzik T. J. Prolactin - not only lactotrophin a "new" view of the "old" hormone. *Journal of physiology and pharmacology*. 2012; 63(5): 435–443. (http://www.jpp.krakow.pl/journal/archive/10_12/pdf/435_10_12_article.pdf); pristupljeno 08.08.2017

10. Vilar L., Fleseriu M., Bronstein M. D. Challenges and pitfalls in the diagnosis of hyperprolactinemia. *Arq Bras Endocrinol Metab (São Paulo)*. 2014; 58(1): 9-22. (http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302014000100009&lng=en&nr m=iso&tlng=en); pristupljeno 15.06.2017
11. Zeitlin S. I., Rajfer J. Hyperprolactinemia and Erectile Dysfunction. *Rev Urol*. 2000; 2(1): 39–42. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1476085/>); pristupljeno 15.08.2017
12. Silvaa A. M., Martins da Costa P., Pacheco A., Oliveira J. C., Freitas C. Assessment of macroprolactinemia by polyethylene glycol precipitation method. *Rev Port Endocrinol Diabetes Metab*. 2014; 9(1): 25–28. (<https://core.ac.uk/download/pdf/82478899.pdf>); pristupljeno 13.08.2017
13. Krysiak R., Drosdzol-Cop A., Skrzypulec-Plinta V., Okopien B. Sexual function and depressive symptoms in young women with elevated macroprolactin content: a pilot study. *Endocrine*. 2016; 53: 291–298. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4901097/>); pristupljeno 20.08.2017
14. Vaishya R., Gupta R., Arora S. Macroprolactin; A Frequent Cause of Misdiagnosed Hyperprolactinemia in Clinical Practice. *J Reprod Infertil*. 2010; 11(3): 161–167. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3719302/>); pristupljeno 21.08.2017
15. Marcius M., Vrkić N., Getaldić-Švarc B. Analytical evaluation of commercial P1NP assay. *Biochemia Medica* 2006; 16(2): 178-90. (<http://www.biochemia-medica.com/content/analytical-evaluation-commercial-p1np-assay>); pristupljeno 24.08.2017
16. Hasanbegovic L., Alicelebic S., Sljivo N. Comparison of Specific Ovarian Tumor Markers by Elecsys Analyzer 2010. *Acta Inform Med*. 2015; 23(2): 86–89. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4430012/>); pristupljeno 25.08.2017
17. Cobas Prolactin II User Manual, 2014
18. Preuzeto s: <https://usdiagnostics.roche.com/en/resourcecenter/public/Prolactin-Fact-Sheet-PP-US-06893.pdf>
19. Beda-Maluga K., Pisarek H., Romanowska I., Komorowski J., Świętosławski J., Winczyk K. Ultrafiltration – an alternative method to polyethylene glycol

precipitation for macroprolactin detection. Arch Med Sci. 2015; 11(5): 1001–1007.
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4624744/>);pristupljeno 25.08.2017

8. SAŽETAK

UVOD:

Prolaktin je polipeptidni hormon kojeg izlučuje adenohipofiza. Različiti molekularni oblici prolaktina u cirkulaciji utječu na njegovu biološku aktivnost. Povećana koncentracija monomernog prolaktina u krvi uzrokuje pravu hiperprolaktinemiju, dok je makroprolaktin najčešći uzrok asimptomatske hiperprolaktinemije.

CILJ:

Cilj rada je odrediti udio zahtjeva za taloženje makroprolaktina s PEG-om u ukupnom broju povišenih koncentracija prolaktina te odrediti udio rezultata kod kojih je metoda taloženja s PEG-om uputila na makroprolaktinemiju.

METODE:

U ovom istraživanju korišteni su rezultati uzoraka dobivenih iz pretraživanja laboratorijskog informacijskog sustava Zavoda za medicinsko laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Split. Izdvojeno je 1300 pacijenta koji su imali rezultat za izmjereni prolaktin u vremenskom periodu od 28. lipnja 2016. do 28. lipnja 2017. (godina dana) kao i rezultati zatraženih ispitivanja makroprolaktina u krvi. U ispitivanju koncentracije prolaktina korištene su ECLIA metoda na imunoanalizatoru Cobas Roche e 601 i metoda taloženja s PEG-om.

REZULTATI:

Od ukupnih 1300 uzoraka koji su izdvojeni iz laboratorijskog informacijskog sustava, u 458 uzoraka uočena je povišena koncentracija prolaktina. Od navedenih 458 uzoraka s povišenom koncentracijom prolaktina, zahtjev za ispitivanje makroprolaktina imalo je njih 50. Obradom i interpretacijom rezultata utvrđeno je 58% uzoraka s povišenom koncentracijom prolaktina, 16% uzoraka s prisutnošću monomernog prolaktina i makroprolaktina te 26% uzoraka s makroprolaktinemijom.

ZAKLJUČAK:

U ukupnom broju rezultata s povišenom koncentracijom prolaktina malen je udio (11%) zahtjeva za ispitivanje makroprolaktina. Nakon taloženja makroprolaktina s PEG-om, utvrđen je najveći udio rezultata koji upućuju na pravu hiperprolaktinemiju.

9. ABSTRACT

INTRODUCTION:

Prolactin is a polypeptide hormone secreted by adenohypophysis. Different molecular forms of prolactin in the circulation affect its biological activity. Increased concentration of monomeric prolactin in the blood causes true hyperprolactinemia, whereas macroprolactin is the most common cause of asymptomatic hyperprolactinaemia.

OBJECTIVE:

The aim of this study was to determine the proportion of requests for PEG precipitation of macroprolactin in the total number of elevated prolactin concentrations and to determine the proportion of results in which the PEG precipitation method indicated the presence of macroprolactin.

METHODS:

In this study, the results obtained from the laboratory information system in the Clinical Laboratory of University Hospital Center Split were used. In one year period (28 June 2016 – 28 June 2017) 1300 patients who had results for the measured prolactin were singled out. Concentrations of prolactin were measured using ECLIA method on immunoanalyzer Cobas Roche e 601 and PEG precipitation method.

RESULTS:

From the total of 1300 samples singled out from the laboratory information system, 458 samples showed an elevated concentration of prolactin. Out of the 458 samples with elevated prolactin concentrations, for 50 of them the precipitation of macroprolactin was required. By processing and interpretation of results it was determined that 58% of the results had elevated prolactin concentrations, 16% results indicating monomeric prolactin and macroprolactin predominance, and 26% results indicating macroprolactin predominance in circulation.

CONCLUSION:

In the total number of results with elevated prolactin concentrations, a small proportion (11%) for precipitation of macroprolactin was required. After PEG precipitation of macroprolactin, the highest percentage of results indicated true hyperprolactinemia.

10. ŽIVOTOPIS

OPĆI PODACI:

Ime i prezime: Nina Kalajžić
Datum rođenja: 28. lipnja 1988.
Državljanstvo: Hrvatsko
Adresa stanovanja: Hercegovačka 46, 21 000 Split
Mobitel: 099 57 47 261
E-mail: ninica8688@gmail.com

OBRAZOVANJE:

Vrijeme (od-do) 1995. – 2003.
Institucija Osnovna škola „Trstenik“, Split

Vrijeme (od-do) 2003. – 2007.
Institucija Zdravstvena škola – farmaceutski tehničar, Split

Vrijeme (od-do) 2014. – 2017.
Institucija Sveučilišni odjel zdravstvenih studija u Splitu – Medicinsko laboratorijska dijagnostika

RADNO ISKUSTVO:

Vrijeme (od-do) 01. veljače 2009. – 31. siječnja 2010.
Poslodavac Ljekarna Splitsko-dalmatinske županije; Ljekarna „Lučac“
Radno mjesto Farmaceutski tehničar

Vrijeme (od-do) 14. ožujka 2011. – 04. srpnja 2012.
Poslodavac Klinički bolnički centar Split
Radno mjesto Farmaceutski tehničar

Vrijeme (od-do) 04. ožujka 2013. – 05. prosinca 2013.
Poslodavac Ljekarna Čipčić-Mirković, Dugopolje
Radno mjesto Farmaceutski tehničar

JEZICI:

Engleski jezik aktivno
Španjolski jezik aktivno
Njemački jezik A1

RAČUNALNE VJEŠTINE:

Poznavanje rada u Microsoft Office paketu (Word, Excel, Power Point), služenje internetom

OSTALO:

Vozačka dozvola B kategorija