

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİBİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**HİPERPROLAKTİNEMİLİ HASTALARDA
MAKROPROLAKTİN ÖLÇÜMÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Ayşegül TURAN

TRABZON - 2011

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİBİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**HİPERPROLAKTİNEMİLİ HASTALARDA
MAKROPROLAKTİN ÖLÇÜMÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Ayşegül TURAN

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

TRABZON -2011

ÖNSÖZ

Uzmanlık tezi olarak sunduğum bu çalışmada bilgi ve deneyimlerini aktaran, her konuda bana yardımcı olan tez danışmanım sayın Doç. Dr. Yüksel Aliyazıcıoğlu olmak üzere, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Orhan Değer 'e, Prof. Dr. E. Edip Keha 'ya, Prof. Dr. Asım Örem 'e, Prof. Dr. Caner Karahan 'a, Doç. Dr. Birgül Vanizör Kural 'a, Doç. Dr. Ahmet Alver'e, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları A.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Cihangir Erem 'e,

Yardımlarından dolayı çalışma arkadaşlarım Dr. Tuba Esen 'e, Dr. Sabiha Kamburoğlu 'na, Dr. Selçuk Yaman'a, Dr. Ayşegül Yılmaz 'a, Dr. Nazime Çebi 'ye, Dr. Suret Ağaç 'a, Dr. Hüseyin Yaman 'a,

Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Endokrinoloji kliniğinden Uz. Dr. İnan Anaforoğlu 'na,

Çalışma grubunda yer alan gönüllülere,

Anabilim dalındaki tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Rutin laboratuvardaki tüm çalışanlara,

Her zaman bana destek olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme, özellikle yeğenim Merve Şener 'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Ayşegül Turan

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLOLAR ve ŞEKİLLER	iv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Prolaktin	3
2.1.1.Prolaktin ve Otoimmünite	8
2.2. Hiperprolaktinemi	9
2.3. Makroprolaktin	13
2.3.1. Makroprolaktinemi	14
2.4.Prolaktin tayin yöntemleri	17
2.5. Makroprolaktin Tayin Yöntemleri	22
2.5.1. GFC	22
2.5.2. PEG Presipitasyon	23
2.5.3. İmmünopresipitasyon ve Adsorpsiyon	25
2.5.4. Ultrafiltrasyon	25
3.MATERYAL VE METOD	27
3.1.Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	27
3.1.1.Kullanılan cihazlar	27
3.1.2.Kullanılan kimyasallar	27
2.Metodlar	28
3.2.1.Hasta ve örneklerin toplanması	28
3.2.2.Prolaktin tayini	28
3.2.3.Makroprolaktin tayini	29
3.2.3.1.Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	30

3.2.3.2.PEG ile çöktürme	30
3.2.4.İstatistiksel Analiz	31
4.BULGULAR	32
4.1. Çalışma Grubunun Demografik Verileri	32
4.2. Çalışma Yönteminin Performans Verileri	32
4.3. Makroprolaktin Taramasına Ait Sonuçlar	33
5.TARTIŞMA	41
6.SONUÇLAR ve ÖNERİLER	46
6.1.Sonuçlar	46
6.2.Öneriler	46
7.ÖZET	47
8.SUMMARY	48
9.KAYNAKLAR	49
ÖZGEÇMİŞ	59

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. Prolaktinin serumdaki formları	4
Tablo 2. Prolaktin salınımını etkileyen kimyasal faktörler	6
Tablo 3. Hiperprolaktinemi nedenleri	10
Tablo 4. Prolaktin seviyelerine göre tanı olasılıkları	11
Tablo 5. Hiperprolaktineminin klinik bulguları	12
Tablo 6. Prolaktinin hassasiyet (precision) ve doğruluk (accuracy) kontrol sonuçları	33
Tablo 7. Hiper ve makroprolaktinemili numunelerde PRL için CV değerleri	33
Tablo 8. Total PRL, PEG1 ve PEG 2 ile çöktürme sonrası elde edilen PRL değerleri ve geri kazanım değerleri	34
Tablo 9. PEG 1 ile çöktürme sonrası makroprolaktin pozitif hasta sonuçları	37
Tablo 10. PEG 2 ile çöktürme sonrası makroprolaktin pozitif hastalar	38

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İmmünoassay sandviç prensibi	18
Şekil 2. İmmünoassayde bazı interferanslar	19
Şekil 3. Farklı immünoassaylerle makroprolaktin tespitindeki farklılıkları açıklayan teoriler	21
Şekil 4. PEG çöktürme	24
Şekil 5. PEG 1 çöktürme sonrası makroprolaktin sıklığı	36
Şekil 6. PEG 2 sonrası makroprolaktin sıklığı	37
Şekil 7. Makroprolaktin negatif ve pozitif bulunan total PRL değerlerinin dağılımı	38
Şekil 8. PEG 1 ve PEG 2 ile çöktürme sonrası elde edilen PRL değerlerinin korelasyon grafiği	39

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Hiperprolaktinemi, prolaktininin (PRL) aşırı sekresyonu sonucu ortaya çıkan hipotaloma-hipofizer aksın en yaygın endokrin bozukluğudur (1). Hiperprolaktinemi menstrüel hastalık nedenlerinin 1/5 kadarını oluşturmaktadır ve PRL düzeyinin ilgili laboratuvar tarafından kullanılan referans aralığın üzerinde olması olarak tanımlanır (2).

Prolaktin, ön hipofizden salgılanan ve serum PRL'inin %85-95'ini oluşturan monomerik bir proteindir. Serumda Jel Filtrasyon Kromatografisi(GFC) ile tanımlanan farklı molekül ağırlıklı formlarının olduğu bilinmektedir. Bunlardan biri total prolaktinin %1'inden azını oluşturan 'big-big' PRL diye de isimlendirilen ve çoğunlukla immünglobulin G (IgG)ile monomerik PRL birleşmesinden oluşan makroprolaktindir (2,3).

Makroprolaktin, büyük molekül ağırlığı veya net yükündeki değişiklikler nedeniyle kapiller damarlardan zor geçer veya geçemez. Bu durum in vivo biyoaktivitesinin azlığını veya yokluğunu açıklamaktadır. Aynı nedenle böbrek klirensi azalmakta ve hipotalamik feed-back mekanizması işlememektedir. Hedef hücrelere geçişin engellenmesi yüksek prolaktin düzeylerine rağmen klinik semptom olmamasına yol açmaktadır (3,4). Makroprolaktin klinik bulgu vermeyen hiperprolaktinemiye neden olmaktadır ve idiyopatik hiperprolaktinemiler arasında önemli bir yer kaplamaktadır (4,5).

Makroprolaktinemi, makroprolaktin düzeyinin total prolaktininin %50'sinden fazla olması olarak değerlendirilir. Her iki cinsteye çocuklarda görülür. Genel popülasyonun %1'inden azında görülmektedir. Hiperpolaktinemili hastalarda makroprolaktinemi sıklığı %18-42 arasında değişmektedir (4).

Otuz yıldır varlığı bilinmesine rağmen makroprolaktin tanı ve takip açısından endokrinologlar ve laboratuvar uzmanları için halen baş ağrıtıcı bir konudur. Makroprolaktin, hiperprolaktinemili hastaların sıklıkla yanlış tanı ve tedavi almalarına sebep olmaktadır. Bu nedenle hiperprolaktinemili hastaların klinik özelliklerine göre

sınıflandırılmadan her hastaya makroprolaktin tarama testi yapılması önerilmiştir. Böylece hormonal ve radyolojik tetkiklerin tekrarlanması ve gereksiz tedavi verilmesinin önüne geçilecektir. Bu nedenle bu biyolojik bozukluk için her araştırma merkezinde rutin bir tanı yönteminin bulundurulması önerilmektedir (5,6).

Makroprolaktin varlığı kompleks yapısı nedeniyle kullanılan farklı rutin immünometrik yöntemlerle farklı reaksiyonlar verir. Makroprolaktine duyarlılığı en fazla olan immun yöntemin elektrokemiluminesans yöntem olduğu ileri sürülmüştür. Makroprolaktinin temel yapısı otoantikör kompleksi olduğu için ölçümler arası farklılıklar çapraz reaksiyonlar ile açıklanabilir (6,7).

Araştırmacılar birçok tayin yöntemini karşılaştırmıştır. Altın standart yöntem GFC olmakla beraber pahalı ve zahmetli olduğu için rutin kullanımda tercih edilmemektedir (2,3). Alternatif yöntemler içinde polietilen glikol (PEG) ile çöktürme ucuz, kolay ve GFC ile korele olması nedeniyle birçok laboratuvar tarafından tarama yöntemi olarak tercih edilmektedir (4,6).

Bu çalışmanın amacı, laboratuvarımızda prolaktin ölçümünde kullandığımız immünoassay yönteminin makroprolaktin ile etkileşim derecesini ortaya koymak ve PEG ile çöktürmeye dayalı makroprolaktin tarama metodunu standardize ederek rutin klinik kullanıma sunmaktır. Böylece hiperprolaktinemili hastaların ne kadarının gerçek hiperprolaktinemili olduğu tespit edilecek ve gereksiz ileri tetkik istemi ve gereksiz tedaviye yönlendirme engellenecektir.

2.GENEL BİLGİLER

1.Prolaktin

Prolaktin, ilk olarak 1933 yılında, hayvan örneklerinde ön hipofizin bir ürünü olarak tanımlanmış ancak insanlarda 1971'de saflaştırılmıştır(8). Prolaktin, ön hipofizdeki asidofilik laktotrof hücrelerde sentezlenen, molekül içi 3 disülfid bağı içeren 199 aminoasitlik tek polipeptid zincirden oluşan globüler bir proteindir.PRL hormonunu sentezleyen gen 6. kromozomda yerleşmiştir. Laktotrop hücreler ön hipofiz hücrelerinin %15-25 kadarını oluşturur.Hücre miktarı değişmemekle beraber gebelik ve laktasyon esnasında laktotrof hiperplazi meydana gelir. Gebeliğin son 2 trimestri ile laktasyonun ilk birkaç ayında laktotrop hücre hiperplazisi önemli boyutlara ulaşır ve takip eden aylarda hücreler eski haline döner. Bu değişiklikleri östrojenin indüklediği düşünülmektedir (4,9). Ön hipofizden ayrıca gonadotropinler(FSH,LH), tirotropin(TRH), somatotropin(GH), kortikotropin(ACTH) gibi diğer hormonlar da salgılanmaktadır (10).

PRL 'nin sadece ön hipofiz bezinde sentezlenmediği; vücutta santral sinir sistemi,bağışıklık sistemi, meme bezi epitel hücresi, uterus ve plasenta gibi birçok doku ve organlarda da sentezlendiği ve salgılandığı saptanmıştır.Hipofiz dışında prolaktince en zengin kaynak plasentadır.Plasentada desidual hücreler tarafından salgınır ve human plasental laktojen (HpL) olarak isimlendirilir.Ayrıca uterin endometrium,myometrium ve fibroidler tarafından da üretilir (10,11). Desidual HpL ve GH pitüiter prolaktine biyolojik,kimyasal ve immünolojik özellikler bakımından benzemekle beraber insan GH ve plasental laktojeni, PRL ile sadece sırasıyla %16 ve %13 aminoasit sıra homolojisi gösterirler.Bu ise kromozom 6'da bulunan ortak bir GH-PRL-HpL geninin duplikasyonu esnasında farklı genlere dönüştüğünü gösterir (10,11).

Prolaktin, 26 kDa molekül ağırlıklı bir prehormon olarak sentezlenir ve proteolitik yıkımla 23 kDa'luk olgun polipeptid meydana gelir.Bu monomerik form (little;küçük PRL) total serum prolaktininin büyük kısmını oluşturur (9,10). Normal kişilerde ve

hiperprolaktinimli hastaların çoğunda dolaşan total prolaktinin yaklaşık %85'ini monomerik PRL oluşturmakla beraber serumda GFC ile tanımlanan diğer molekül ağırlıklı PRL varyantları da görülmektedir. Bunlardan biri prolaktinin dimeri olduğu düşünülen 50 kDa molekül ağırlıklı, dolaşımdaki prolaktinin % 10-15'ini oluşturan 'big; büyük' prolaktindir. Diğer dolaşımdaki prolaktinin %1'inden azını oluşturan 150 kDa veya daha büyük molekül ağırlıklı 'big big; büyük büyük' prolaktin veya 'makroprolaktin (MPRL)' diye de isimlendirilen formdur. Dolaşımda ayrıca posttranslasyonel modifikasyonla oluşan glikozile ve fosforile varyantlar ile birlikte 8,14,16 ve 22 kDa'luk proteolitik formlara da rastlanmıştır (4,9,10). Tablo 1'de PRL'in dolaşımdaki ana formları görülmektedir.

Tablo 1. Prolaktinin serumdaki formları

Prolaktin İzoformları	Moleküler ağırlık (kDa)	Biyolojik aktivite	Gözleendiği durumlar
Proteolitik fragmentler	16	?	PRL reseptörlerine bağlanabilir
<u>Monomerik PRL</u> "little PRL" (mPRL)	22-23	100%	Serumdaki total PRL'nin %85-90'
Glikozile (G-PRL)	25	Az veya farklı aktivite	Gebeliğin 3. trimesterinde baskın yapı olabilir
<u>Agregatlar</u> Dimers "big PRL" (b- PRL)	50-60	Az veya mPRL'e yakın	Total PRL'in %10'u, dimer yapıda
"big-big PRL" (b-b.PRL) (MPRL)	> 100	Az veya yok	İdiyopatik hiperprolaktinomalı hastaların %25'i, 3. trimester gebelerin %2.7'si

Küçük prolaktinin biyoaktivitesi ve immünreaktivitesi glikozilasyon ile değiştirilmiştir. Glikozile yapı en baskın şekil olmakla birlikte 23 kDa'lık nonglikozile prolaktinin en etkin şekil olduğu görülmüştür (10).

Bu PRL yapılarının her birinin oranı, fizyolojik, patolojik ve hormonal uyarılarla değişmektedir. Salgılanan formların heterojenliği araştırma konusu olmaya devam etmektedir.

Fetal prolaktin sentezi gebeliğin 12. haftasında başlar. Normal erişkinde serum PRL düzeyi kadında 10- 25 µg/L, erkekte 10-15 µg/L 'dir. PRL sekresyonu pulsatil olup günün içinde 90 dakika aralıklarla 13-14 kez salgılanır, en yüksek düzeylere uykudaki REM (hızlı göz hareketleri) fazında ulaşılır. Sabaha karşı 4.00 ile 6.00 arası 30 µg/L'ye varan zirve değerlerle karşılaştırılır (12). PRL'in dolaşımdaki yarı ömrü 50 dk kadardır. Serum PRL'i %75 oranında karaciğer, %25 oranında da böbreklerden temizlenir (2,9,10).

Fizyolojik düzeyler gebelik ve laktasyonda daha yüksek olmak üzere kadınlarda erkeklerden daha yüksektir. Gebelik sırasındaki yüksek PRL seviyeleri nedeniyle yenidoğanlar yüksek PRL seviyelerine sahiptirler ve bu durum 3 ay içinde normale döner. PRL kızlarda pubertedeki artışla erişkin düzeyine ulaşırken erkeklerde bu artış görülmez, bu erkeklerdeki düşük düzeyi açıklar. Yaşla her iki cinsten PRL düzeyi azalır. Yaşlı erkeklerde pulsatil patlamalarla salınımında azalma meydana gelir. Aynı şekilde postmenopozal kadınlar premenopozal kadın veya erkeklerden daha düşük serum PRL seviyeleri ve puls hızına sahiptir (2,9,10).

Salınımını, PRL salınımı yapan faktörler (PRF) ve PRL salınımını inhibe eden faktörler (PIF) kontrol ederler. PRL inhibitör santral kontrol mekanizması olması nedeniyle benzeri olmayan bir hipofiz hormonudur. Hipotalamik salıverici faktörler tarafından kontrol edilen diğer ön hipofiz hormonlarının aksine PRL sekresyonu, en önemlisi dopamin olan PRL inhibe edici faktörlerin tonik inhibisyonu altındadır (10,11,12). Dopamin etkisi, her biri membranı 7 kez geçen G proteinle kenetlenmiş reseptör (GPCR) üst ailesinin bir üyesi olan multipl reseptör alt tipleri aracılığı ile ortaya çıkar. Hipotalamusta üretilen dopamin, sinir lifleriyle medyan eminense, buradan da portal dolaşıma geçip adenohipofize ulaşır ve laktotrop hücre membranlarında bulunan adenilat siklaz bağımlı dopamin tip 2 reseptörleri (D2) üzerinden etki yapar. D2 reseptörlerine bağlanan dopamin adenilat siklazı inhibe ederek siklik adenosin monofosfatı (cAMP) azaltır (11,12,13). Azalan cAMP, PRL salınımını azaltır. Dopamin aynı zamanda PRL'nin biyosentezini RNA transkripsiyon

basamağında direkt olarak da inhibe eder. Dopaminin bu özelliğinden dolayı hiperprolaktinemi tedavisinde dopamin agonistleri kullanılmaktadır. Hipofiz sapının devamlılığının bozularak dopaminin laktotroplara iletiminin engellenmesi, ya da bazı ilaçlar nedeniyle endojen dopamin reseptörlerinin blokajı, prolaktin sekresyonunda orta derecede artışa neden olur. Dopamin, dopamin prokürsörleri veya agonistleri PRL sekresyonunu inhibe eder. Artan PRL hipotalamik dopamin yapımını artırırken, artan dopamin kısa feed-back yolla PRL yapımını baskılar (10,12).

Vazoaktif intestinal peptid(VIP), tiroid salgılatıcı hormon(TRH) ve gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte, prolaktin sekresyonunu uyarıcı etkiye sahiptir. Bunların ya direkt olarak hipofize etki ederek ya da dopaminerjik blokaj veya deplezyon yaparak etki gösterdikleri düşünülmektedir. Glukokortikoidler ve tiroid hormonu ise PRL salınımını baskılar(10,12,14). Tablo 2 'de PRL salınımını etkileyen kimyasal faktörler verilmiştir.

Serum PRL düzeyleri egzersiz, yemek(aminoasitler), cinsel temas, küçük cerrahi operasyonlar, akut myokard enfarktüsü ve diğer akut stres durumlarında artış gösterir. Gebelik sırasında 10 kata kadar(200-500ng/mL) çarpıcı artışlar gösteren PRL düzeyleri doğumdan 2 hafta sonra hızla düşer. Bebeklerini emziren annelerin PRL düzeyleri yüksek kalır ve emzirme esnasında PRL düzeyleri bazalin 8,5 katına çıkabilir (2,9,12).

Tablo 2. Prolaktin salınımını etkileyen kimyasal faktörler

Inhibitör faktörler	Stimülatör faktörler
Dopamin	TRH
Somatostatin	VİP
GABA	Östrojen
Glukokortikoidler	β -Endorfin
GnRH	
	Enkefalin
	Serotonin

İnsanlarda PRL reseptörleri meme ve gonadlarda bulunur.PRL reseptörü,GH ve IL-6 reseptörlerini içeren tip 1 sitokin reseptör ailesinin bir üyesidir.Ligandın bağlanması reseptör dimerizasyonuna, janus kinaz (JAK) yolunun intrasellüler haberleşmeyi başlatmasına,bu haberleşme de sinyal ileti ve transkripsiyon aktivatörleri(STAT) ailesinin değişik komponentlerinin fosforilasyonuna neden olur.STAT proteinleri nukleusa geçip hedef genlerde transkripsiyon aktivatörleri olarak etki gösterir.Memede PRL,plasental laktojenler,artmış progesteron ve lokal parakrin büyüme faktörlerine yanıt olarak lobülealveoler epitel proliferer olur ve kompleks multihormonal etkileşimlerin bir sonucu olarak laktogenez ortaya çıkar (9, 11, 12)

İnsan PRL'nin görevleri, aktivitesinin büyüme hormonunkinden ayırt edilmesiyle ve bunu takiben radyoimmünoassaylerin gelişmesiyle daha iyi tanımlanmıştır (2).

PRL'in temel fonksiyonu gebelikte ve lohusalıkta laktasyonun başlatılıp sürdürülmesi olmakla beraber PRL 'in sadece laktasyonda rolü olmadığı, büyüme-gelişme, elektrolit dengesi, üreme, endokrin ve bağışıklık sistemi ile ilgili çeşitli biyolojik fonksiyonlara da sahip olduğu bilinmektedir (12).

Büyüme ve gelişme;PRL' nin vücut ağırlığını artırdığı, intestinal mukozanın boyutunda artmaya yol açtığı, vasküler düz kas hücreleri, prostatın epitelial hücreleri,astrositlerin ve çeşitli immün sistem hücrelerinin proliferasyonunu, akciğer maturasyonu ve sürfaktan üretimini uyardığı bildirilmektedir (11).

Üreme sistemi;overlerden progesteron üretimi döllenmiş yumurtanın implantasyonu,gebeliğin devamı ve ovulasyonun inhibisyonu için gereklidir. PRL, progesteron biyosentezi ve luteal hücre hipertrofisi için gebelik süresince esansiyel olup fizyolojik düzeylerde luteal hücrelerden progesteron üretimini uyarır. Uterusta progesteron reseptörlerinin sayısını artırarak bu hormonun etkilerini güçlendirir. Hipotalamik GnRH ve hipofizer gonadotropin sekresyonunu baskılaması nedeniyle erkek ve kadında gonadal steroidogenez azalır,pulsatil LH salgılanması ortadan kalkar. Overlerde follikülogenezi engeller ve granuloza hücresinin aromataz aktivitesini inhibe eder, böylece hipoöstrojenemi ve anovulasyona neden olur.Bu sayede maternal laktasyon bir gebelik tarafından kesintiye uğratılmadan sürdürülür (11,15).

PRL, erkekte leydig hücrelerinin hücrel morfolojisinin idamesinde yer alır veluteinize edici hormon ile birlikte LH reseptör sayısını artırır. Sertoli hücrelerinde FSHreseptör sayısını, germ hücrelerinde total lipitleri ve spermatozid-spermid dönüşümünüarttırır.

Prostatta ise androjen reseptör düzeyinin ve prostata özgü proteinlerin artışında rol alır (12). Bu hormonal değişiklikler hiperprolaktinemili hastalarda libidoyu ve fertilitiyi azaltır.

Bağışıklık sistemi;PRL immün sistem üzerine uyarıcı etkiye sahiptir. Humoral ve hücreli immün yanıtların düzenlenmesinde önemli rol oynar.PRL'in lenfosit maturasyonunu uyararak immünojenik fonksiyona da sahip olduğu gösterilmiştir (15,16). Endokrinoloji ve metabolizma;memelilerde fetal akciğerde fosfolipit sentezini ve karaciğerde lipoprotein lipaz aktivitesini uyarır, safra salınımını artırır. İzolehepatositlerde glikojen fosforilaz A' nin aktivasyonunu artırır. İnsülin sekresyonunu uyarır, insülin salınımı için glukoz eşiğini düşürür, glukokinaz ve glukoz transporter(GLUT)-2' yi artırarak pankreatik fonksiyon üzerine direkt etki gösterir (17).

2.1.1.Prolaktin ve Otoimmünite

PRL, hem anterior hipofiz bezinde hem de nöronlar, prostat, desidua, meme epiteli, cilt ve immün sistem gibi hipofiz dışı dokularda alanlarda üretilir (18). PRL, yapısal olarak sitokin/homeoetik ailesi üyelerine benzemekte, insanlarda ve hayvanlarda immün cevabın düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (19). İmmün sistem üzerindeki etkisini endokrin ve parakrin/otokrin mekanizması ile göstermektedir. Bu etki tüm immün ve homeoetik hücrelerin membranlarında eksprese edilen spesifik prolaktin reseptörlerine bağlıdır. Prolaktin reseptörü, IL-2, 3, 4, 6, 7, 12, 15 ve IFN γ için reseptörler içeren sitokin/homeoetik reseptör ailesine aittir (9,11). Birçok immünojik cevabın aktivasyonunda görev aldığından PRL artışı otoimmün hastalıklardaki immün sürecin ilerlemesini geliştirmektedir. Sıklıkla otoimmün hastalıklarda görülen hiperprolaktinemi bulguları, PRL'nin kendi başına immünomodülatör rolü olduğunu göstermektedir. Prolaktin ve otoimmün hastalıklar arasındaki ilişki, insan prolaktin geninin HLA bölgesine yakın olan kromozom 6'nın kısa kolunda yer almasıyla açıklanabilir (20). HLA kompleksinin bazı antijenlerinin birçok otoimmün hastalıkla karşılıklı ilişkiye sahip oldukları çok iyi bilinmektedir. Son zamanlardaki çalışmalarda, PRL geni ile romatoid artrit (RA) ve sistemik lupus eritematöz(SLE) ile ilişkili olduğu bilinen major histokompatibilite kompleksi (MHC) geni arasında bir bağlantı dengesizliği bulunmuştur (21). Stevens ve arkadaşları SLE lenfositlerinde PRL promoter aktivitesi ve mRNA seviyesinde değişiklik yapan fonksiyonel olarak önemli polimorfizm göstermişlerdir (22).

2.2.Hiperprolaktinemi

Hiperprolaktinemi klinik endokrinolojide en sık karşılaşılan hipotalomik-hipofizer aks bozukluğudur.Hiperprolaktinemiden kaynaklanan klinik sendrom, çok eskiden beri bilinmekle beraber, biyokimyasal bozukluk 1971 yılında PRL ile büyüme hormonunun kesin olarak birbirinden ayrılması ile tanımlanabilmiştir. Hiperprolaktinemi en az 2 ayrı ölçümde serum PRL değerinin laboratuvarca kabul edilen normal aralığın(genelde 20-25 ng/ mL (ya da 400-500 mU /L) üzerinde olması olarak tanımlanır (2,23).

Daha çok kadınlarda görülmekle beraber genel popülasyondaki prevalansı %0.4'tür. Hiperprolaktinemi prevalansı seçilen hasta popülasyonuna göre değişir. Reprodüktif bozukluğu olan kadınlarda %9-17 oranlarında görülebilmektedir. Prevalansı, bir aile planlaması kliniğinde %5,sekonder amenoreli kadınlar grubunda %9,polikistik over sendromlu kadınlarda ise % 17 olarak bulunmuştur (14,24).

Hiperprolaktinemi fizyolojik,farmakolojik ve patolojik olabilir.Fizyolojik nedenleri başında gebelik,laktasyon,stres gelmektedir. Hiperprolaktinemi ayırıcı tanısına her iki cinsten ilaç kullanımı ve kadınlarda gebelik dışlanarak başlanmalıdır (23,25). Patolojik hiperprolaktinemi, prolaktin hipersekresyonunun fizyolojik nedenleri dışlandıktan sonra serum PRL değerlerinin sürekli olarak yüksek olmasıdır.Patolojik olarak ise başta prolaktin salgılayan hipofiz adenomları(prolaktinoma) olmak üzere hepatorenal hastalıklar,primer hipotiroidi,boş sella sendromu,hipotalamusa bası yapan tümörler gibi çok çeşitli patolojiler sayılabilir. İlaça bağlı hiperprolaktinemi dışlandığında mikroprolaktinoma (<10mm) veya makroprolaktinoma (>10mm) tanıları hiperprolaktineminin en sık sebeplerindendir (26). Kadın erkek oranı 10/1'dir. İlerleyen yaşlarda prolaktinoma sıklığı her iki cinsiyet için aynıdır (23).

Hipotalamik dopamin sistemini ya da hipofizer dopamin reseptörlerini etkileyen her ilaç prolaktin düzeyinde yükselmeye neden olabilir.Dopamin reseptörlerini bloke ederek dopamin nörotransmisyonunu azaltan ilaçlar(fenotiazinler,butirofenonlar,metoklopramid gibi), santral katekolamin depolarını boşaltan ilaçlar (rezerpin gibi),trisiklik antidepressanlar,opiadlar,verapamil ve yüksek doz parenteral simetidin bu ilaçlardan bazılarıdır (27).

Klinik, hormonal ve nöroradyolojik araştırmalara rağmen serum PRL konsantrasyonunu arttıran neden bulunamayan hastalardaki PRL yüksekliği “idiyopatik hiperprolaktinemi” şeklinde isimlendirilmektedir. Heterojen bir gruptur ve bütün hiperprolaktinemilerin % 8,5-40 kadarını oluşturmaktadır.Yakın zamana kadar mevcut görüntüleme yöntemleri ile saptanamayan mikroprolaktinomaların bu tablodan sorumlu olabileceği düşünölmekte idi (28).

Tablo 3.Hiperprolaktinemi nedenleri

Fizyolojik Nedenler	Farmakolojik Nedenler	Patolojik Nedenler
<ul style="list-style-type: none"> • Gebelik • Emzirme • Meme başı uyarısı • Cinsel ilişki • Stres(cerrahi, hipoglisemi, miyokard enfarktüsü, senkop, travma) • Uyku • Egzersiz • Yemek 	<ul style="list-style-type: none"> • Nöroleptik ilaçlar (fenotiazinler, butirofenonlar, klorpromazin) • Antidepresanlar (trisiklik antidepresanlar) • Anksiyolitikler (benzodiazepin) • Antiemetikler (metoklorpramid, sulpirid, domperidon) • Opiyatlar • Antihistaminikler • Antihipertansifler (reserpin, metil dopa) • Hormonlar (östrojen, siproteron asetat, TRH) 	<ul style="list-style-type: none"> • Saf prolaktinomalar • Hipofizin mikst adenomları • Hipotalamus ve hipofiz sapı hastalıkları • Polikistik over hastalığı • Primer hipotiroidi • Kronik böbrek yetmezliği • Siroz • Göğüs duvarı travması <p>İdiyopatik Nedenler</p> <ul style="list-style-type: none"> • Makroprolaktinemi • Diğerleri

Ancak artık makroprolaktin denen PRL formunun serumda artışının idiyopatik hiperprolaktinemi nedeni olduğu düşünölmektedir. Hattori ve arkadaşları 208 idiyopatik

hiperprolaktinimli hastada %16 oranında makroprolaktin pozitifliği tespit etmişler ve makroprolaktini hiperprolaktineminin bir sebebi olarak göstermişlerdir (29). Tablo 3 'te hiperprolaktinemi nedenleri görülmektedir.

İdiopatik hiperprolaktinimli hastalarda prolaktin düzeyi genelde 100 ng/mL'nin altındadır (30). Bu hastaların 6 yıl takip edildikleri bir çalışmada vakaların % 10'unda hipofizer adenom geliştiği görülmüştür. Hastaların üçte birinde 5-6 yıl takip edildiklerinde PRL düzeylerinin normale döndüğü, kalanların yarısında da PRL düzeylerinin değişmediği bulunmuştur(19,30).

PRL seviyelerine göre olası sebepler hakkında fikir yürütülebilir. Fizyolojik ve psikolojik streslerde PRL düzeyi artmakla beraber nadir olarak 40 ng/mL'yi aşar. Tümör boyu ve PRL seviyeleri iyi korelasyon gösterir ve bir makroadenomda PRL seviyesi genellikle 200ng/mL ve üzeridir. İlaçlara bağlı hiperprolaktinemilerde ise değer 25-100ng/mL gibi geniş aralıkta bulunabilir. İdiopatik hiperprolaktinemide nadiren 100 ng/mL'yi geçer (2, 25, 30). Tablo 4'te seviyelere göre olası sebepler görülmektedir.

Tablo 4. Prolaktin seviyelerine göre tanı olasılıkları

Prolaktin seviyesi (ng/ml)	Neden
>150 (genellikle)	Prolaktinoma
50-300	Mikroprolaktinoma
200-5000 (genellikle >250)	Makroprolaktinoma
25-100	Psikoaktif ilaçlar, östrojen veya idiyopatik, fiziksel ve psikolojik stres
25-150 (nadiren >150)	Sap basısı

Not: Bu tanısal değerlere rağmen yine de prolaktinomaların PRL seviyelerinde farklı yükselmelere yol açabileceği dikkatten kaçmamalı.

12

Klinik olarak genellikle, kadınlarda galaktore, amenore, oligomenore ve/veya infertilite ile erkeklerde ise libido azalması, impotans ve/veya oligospermi bulguları ile ortaya çıkar (31). Görülen semptomlar tablo 5 'te verildi.

Tablo 5. Hiperprolaktineminin klinik bulguları

Hiperprolaktinemi ve hipogonadizm	Kitle etkisi
<ul style="list-style-type: none">• Oligomenore, amenore• Galaktore• Libido kaybı• Kılınma artışı• Akne• Osteopeni-osteoporoz• Fertilitede azalma	<ul style="list-style-type: none">• Baş ağrısı• Görme kaybı• Kraniyal nöropatiler• Hipopituitarizm• Nöbetler• Rinore

Hiperprolaktinemi tanısı genellikle, iki ayrı ölçümde PRL değerinin yüksek bulunması ile konur. Hafif hiperprolaktinemi de, damara girişin yarattığı stres nedeniyle oluşan hiperprolaktinemiye engellemek için, damara yerleştirilen venöz kanülden 60-90 dk. sonra alınan kanda değerlendirme yapmak uygundur (23). Prolaktinoma dışında hiperprolaktineminin en önemli üç nedeni: gebelik, primer hipotiroidi ve ilaçlardır. Özellikle ilaç kullanımı yönünden dikkatli anamnez, fizik muayene, biyokimyasal testler hiperprolaktineminin nedenini belirleyemezse hastada büyük ihtimalle hipotalamo-hipofizer hastalık mevcuttur (25).

Hiperprolaktinemi nedeninin tümöral olup-olmadığını ayırabilen güvenilir bir stimülasyon veya supresyon testi yoktur ve hiçbir laboratuvar verisi hipofiz veya hipofiz dışı nedenleri ayırt etmede yeterli değildir.

Belirlenebilen bir nedeni olmadan hiperprolaktinemisi olan ve PRL düzeyi 200 ng/mL'nin üzerinde olan her hastaya hipotalamo-hipofizer inceleme yapılmalıdır. Manyetik rezonans görüntüleme (MRI) sellanın ve özellikle mikroadenom denen 10mm altındaki lezyonların en iyi görüntülenmesini sağlar (31,32). Klinik ve hormonal araştırmalarla hiperprolaktineminin tüm nedenleri ekarte edilip, MRI'da adenomun görüntülener 13 olgularda 'idiyopatik' hiperprolaktinemiden söz edilir.

Hipotiroidi bulgusu olan hastalar tedavi sonrası tekrar PRL açısından değerlendirilmelidir. İlaçlara bağlı PRL yüksekliği düşünülüyorsa, ilacı başlatan hekime danışarak, ilacı 72 saat kesip tekrar PRL seviyelerine bakmak yeterli olur (25).

Hiperprolaktineminin nedeni belirlendikten sonra tedavinin gerekli olup olmadığına bakılır.Tedavi endikasyonları tümörün basısına bağlı veya hiperprolaktineminin sebep olduğu infertilite,amenore/oligomenore,osteoporoz; rahatsız eden hirsutizm ve galaktore gibi semptomlardır.Mikroprolaktinomalarda tedavinin amacı prolaktin seviyelerinin normale indirilmesi,gonadal fonksiyonların düzeltilmesi ve kronik hiperprolaktineminin yan etkilerinin ortadan kaldırılmasıdır.Dopamin agonistleriyle tedavi prolaktinomalarda birinci seçenektir.Makroprolaktinomalı hastalarda buna ek olarak,tümörün kitle etkisinin ortadan kaldırılması için tümörün küçültülmesi gerekebilir.Mevcut tedavi yöntemleri,izlem,tıbbi tedavi, cerrahi ve radyoterapidir (14).

İdiopatik hiperprolaktinemili hastalar,gebe kalmayı planlamıyorlarsa,hipogonadizm ya da kemik yoğunluğunda azalma bulguları yoksa seri prolaktin ölçümleri ile izlenebilirler (25).

14

2.3.Makroprolaktin

1974'te Suh ve Frantz'ın insan PRL'inin molekül yapısının heterojenliğini ortaya koymasıyla ilk olarak big PRL tanımlandı. 1981'de Whittaker tarafından hiperprolaktinemili ancak fertil hastada 'big big prolaktin' rapor edildi. Sonraki çalışmalarda yapısı ortaya konuldukça makroprolaktin ismi kullanılmaya başlandı. Ancak yapısı ve fonksiyonu hala iyi anlaşılmış değildir (29,32).

Makroprolaktinin doğası karmaşıktır.Yapısı ve oluşumu ile ilgili yapılan çalışmalarda önceleri monomerik prolaktinin disülfid bağları ile bağlı polimeri,ya da nonkovalent olarak birleşmiş prolaktin agregatları olabileceği öne sürülmekteydi (33). Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda big big prolaktinin en yaygın olarak monomerik prolaktin ile bu monomerik PRL'e karşı oluşmuş IgG'nin oluşturduğu IgG-PRL(antijen-antikor) kompleksi şeklinde olduğu gösterilmiştir. Hattori idiopatik hiperprolaktinemili 75 hastadan alınan hiperprolaktinematik örneğin 12'sinde(%16) anti-PRL otoantikoru tespit etti.Daha sonra yapılan birçok çalışma gösterdi ki makroprolaktin monomerik PRL ve anti-PRL otoantikorlardan oluşan büyük bir antijen-antikor kompleksidir. Makroprolaktinin molekül ağırlığı 150-170 kDa 'dur.IgG içeren makroprolaktin PRL-otoantikor kompleks özellikleri gösterebilmektedir. Makroprolaktinin yapısında daima bulunan m-PRL'in bazı vakalarda glikozile olduğu ortaya konmuştur (34,35).Sonuç olarak makroprolaktin

değişken bir bileşime sahiptir ve bu nedenle moleküler kitlesi ve immünoaktivitesi değişmektedir (36).

Sıçan lenfoması Nb2 deneyleri kullanılarak makroprolaktinin in vitro biyoaktivitesi olduğu gösterilmiştir. Birçok çalışma ile makroprolaktinin invitro olarak biyoaktivitesinin olduğu halde,invivo biyoaktivitesinin olmadığı veya minimal olduğu gösterilmiştir. Makroprolaktinin invivo biyoaktivitesinin olmamasının, makroprolaktinimli hastaların çoğunun hiperprolaktinemi semptomları (amenore veya oligomenore, galaktore, infertilite) göstermemesinin nedeni olduğu ileri sürülmektedir (6,37,38). Makroprolaktinin, invivo biyoaktivitesinin düşüklüğünün sebebi, makroprolaktinin hedef hücrelere ulaşmak için büyük molekül kitlesinden ötürü kapiller damarlardan zorlukla geçmesi veya geçememesi ve intravasküler kompartmanda sınırlı kalmasıdır. Aynı nedenle makroprolaktinin, dolaşımdan uzaklaştırılması serbest prolaktine göre daha yavaştır (39). Muhtemelen moleküler büyüklüğü ve/veya net yükündeki değişiklikler nedeniyle makroprolaktin böbrek bariyerini geçememekte ve klirensi gecikmekte,aynı nedenle hipotalamusa geçemediğinden yüksek PRL düzeyleri ile tetiklenen hipotalamik feed-back mekanizması işlememektedir.Bu durum makroprolaktinin serum düzeylerinin neden yüksek kaldığını da açıklamaktadır (6,30).Makroprolaktinimli hastaların çoğunda hiperprolaktinemi belirtilerinin olmayışı veya hiperprolaktinemi belirtilerinden çok az bir kısmının olması sebebiyle, birçok çalışmada makroprolaktininin ileri tetkik ve tedavi gerektirmeyen selim bir durum olduğu ileri sürülmüştür (40, 41).

Büyük moleküler yapı hedef hücrelere geçişi engellemekte bu da yüksek prolaktin düzeylerine rağmen klinik semptom yokluğuna yol açmaktadır. Makroprolaktinin,hiperprolaktinemiye katkıda bulunan bir durum olduğu son yıllarda anlaşılmıştır (42).

2.3.1.Makroprolaktinemi

GFC kullanılarak yapılan ölçümlerde,hiperprolaktinematik hasta serumlarında makroprolaktin konsantrasyonunun total prolaktin konsantrasyonunun % 30'undan fazla olması anlamlı makroprolaktinemi olarak kabul edilir (43).

Hiperprolaktinematik hastalarda hormon artışının direkt semptomları yoksa (amenore,galaktore ve infertilite) ve/veya hipofiz tümörü düşündüren radyolojik bulgu yoksa makroprolaktinemi akla gelmelidir.

Normal bireylere intravenöz TRH veya dopamin antagonisti (domperidon)uygulanmasını takiben serum PRL seviyelerinde bir artış oluşurken gerçekhiperprolaktinemide bu cevap oluşmaz. Makroprolaktinematik hastaların çoğunda bu uyarıya cevap normal bireylerinki ile benzerdir (44).

Eş zamanlı hipofiz tümörü ve makroprolaktinemili bir hastada makroprolaktinin dağılımınının incelendiği bir çalışmada hipofizer ekstrakt,BOS ve serumda GFC ile monomerik PRL ortaya konulurken makroprolaktin sadece serumda gösterilebilmiştir.Bu durum makroprolaktinin,monomerik prolaktinin hipofizden salınımını takiben oluştuğunu ve yüksek molekül ağırlığından dolayı intravasküler alanda sınırlı kaldığını gösterir (29).

Makroprolaktinemi prevalansı genel popülasyonda %1'in altındadır. Makroprolaktin' in her iki cinste, gebelerde, fetal kord kanında ve çocuklarda da bulunabileceği belirlenmiştir (45).Makroprolaktinemi sağlıklı kadınlarda % 0.2, erkeklerde ise % 0.02 düzeyinde impotans ve infertilitesi olan erkeklerde %5 oranında bulunmaktadır (46).

Otoimmün hastalıklı kişilerde makroprolaktinemi insidansı daha yüksektir. Makroprolaktin nedeniyle hiperprolaktinemi SLE'de iyi tanımlanmıştır ancak benzer ilişki RA'da gösterilememiştir(47). Bu farklılık dolaşan otoantikör tipi ile ilişkilendirilebilir. RA'da dolaşımdaki baskın antikör IgM'dir ve PRL'e bağlanamayabilir (15).

Prevalansındaki bu çeşitlilik ölçümün yapıldığı topluma bağlı olduğu gibi PRL ölçüm metoduna ve kullanılan PRL immün yöntemine de bağlıdır (48).Prolaktini ölçmek için kullanılan immün yöntemin spesifitesi makroprolaktinemiye bağlı hiperprolaktineminin prevalansı üzerinde etkilidir (32).

Açıklığa kavuşmayan durum, makroprolaktinemili hastaların hiperprolaktinematik sendromun klinik ve radyolojik özelliklerini sergileyip sergilemedikleri ve bundan dolayı ileri tetkik ve tedaviyi gerektirip gerektirmedikleridir (49).

Makroprolaktinemili hastaların çoğunda hiperprolaktinemi belirtilerinin olmayışı veya hiperprolaktinemi belirtilerinden çok az bir kısmının olması sebebiyle, birçok çalışmada makroprolaktineminin ileri tetkik ve tedavi gerektirmeyen selim bir durum olduğu ileri sürülmüştür (29). Ancak makroprolaktinle ilgili ilk çalışmalar semptomu olmayanlarda yapılmıştır. Bu çalışmalarda esas olarak, prolaktin fazlalığı bulguları olmayıp

açıklanamayan hiperprolaktinemi olduğunda makroprolaktinemi akla gelmiştir; bu da makroprolaktineminin asemptomatik bir durum olduğunu güçlendirmeye yaramıştır. Buna karşın son zamanlarda yapılan çalışmalar, bazı hastaların, hiperprolaktinemi semptomları ve adenom kanıtları gösterdiğine dikkat çekmişlerdir (50, 51). Sonuç olarak bazı hastalar hiperprolaktinemi semptomları gösterirken bazıları göstermemektedir.

Bu klinik karışıklık oldukça uzun zamandan beri bilindiği halde makroprolaktine bağlı hiperprolaktinemi testleri klinik laboratuvarlarda çok fazla yaygınlaşmamıştır. Bu belki biraz da, makroprolaktinin in vivo biyoaktivitesi ve klinik önemi ile ilgili süregiden tartışmalar nedeniyle klinik biyokimyacıların izlenecek en doğru yolkonusunda ortak bir noktaya varamamış olmalarından kaynaklanmaktadır.

Olukago, makroprolaktinemili bazı hastaların, hiperprolaktinemi sendromunun semptomlarını göstermesinin nedeninin, makroprolaktinin biyoaktif prolaktinin dolaşımdaki deposu olarak görev yapması ve bağlı olduğu IgG'den aralıklı olarak ayrılarak ortama monomerik prolaktin salması olduğunu ileri sürmektedir. Makroprolaktinin neden olduğu hiperprolaktineminin tamamen zararsız olmadığını öne sürmektedir. Dolayısıyla makroprolaktinin, bazılarının yaptığı gibi, makroamilaz veya makro-CK tip I gibi makroanalitlerle analogisine bakarak analitik bir artefakt olarak kabul edilemeyeceğini tersine, makroprolaktinemi potansiyel morbidite nedeni olan makroanalit olgularından biri olarak görülmesi gerektiğini savunmaktadır. Bu nedenle de, bazı yazarların sadece monomerik prolaktin ile reaksiyona giren ve makroprolaktini tespit etmeyen prolaktin assayleri geliştirilmesini istemelerine karşılık Olukoga, makroprolaktine duyarsız assaylerin makroprolaktin varlığının neden olduğu tanı karmaşasını büyük ölçüde önlemekle beraber bazı kişilerde görülen ve açıklanamayan semptomların nedeninin makroprolaktine bağlı hiperprolaktinemi olduğunu belirlemeyi başaramayacağını dolayısıyla, makroprolaktineminin klinik semptomlara yol açabileceğinin kanıtlanmasının makroprolaktin ile reaksiyon veren prolaktin assaylerinin değerini artıracığını öne sürmüştür (52).

Bazı çalışmalarda, serumlarında predominant formun makroprolaktin olduğu saptanan hastaların çoğunda hiperprolaktineminin tipik semptomlarının olmadığı fakat bazılarında amenore, galaktore, libido azalması gibi semptomların olduğu ve makroprolaktinemi varlığının hipofiz adenomunu dışlayamayacağı bildirilmiştir (50, 52). 1999'da Olukoga ve

Kane çalışmalarındaki 17 makroprolaktinemili hastanın 13'ünde en az bir hiperprolaktinemi semptomunun bulunduğunu ve 3 hastada hipofiz görüntülemesiyle saptanan mikroadenom bulunduğunu bildirmiştir (51). 2002'de Hauache ve arkadaşları çalışmalarında 113 makroprolaktinemili hastanın % 32.8'inde hipofiz mikroadenomu, %6.22'sinde hipofiz makroadenomu bulmuşlar ve makroprolaktinemi varlığının hipofiz adenomunu dışlayamayacağı sonucuna varmışlardır (52). Strachan ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada hipofiz görüntülemesiyle 36 makroprolaktinemili hastanın 5 'inde mikroadenom, 1'inde makroadenom tespit etmişler ve monomerik PRL'nin yükselmediği makroprolaktinemili hastalarda hipofiz adenomuna rastlanma olasılığının sağlıklı topluma yakın olduğu ve makroprolaktinemi tespit edildiğinde hipofiz görüntülemesinin gerekip gerekmediğinin tartışmalı olduğu sonucuna varmışlardır (28). Leslie ve arkadaşları çalışmalarında, makroprolaktinemili hastaların %27'sinde klasik hiperprolaktinemi semptomları ve % 7.2'sinde hipofiz adenomu tespit etmişlerdir (40). Hattori ve arkadaşları 15 makroprolaktinematik kadın hastanın 11'inde normal mensler 2'inde oligomenore saptamışlardır. 2 hasta minimal galaktoreden yakınmaktaydı (53). Bir başka çalışma sonucunda, makroprolaktinemili hastalar hiperprolaktinemiye düşündüren semptomlar gösterebilir veya hipofiz görüntülemelerinde anormal bulguları olsa da bunun bir nedensel ilişki olduğunun kesin olmadığı, eğer monomerik prolaktin konsantrasyonu anlamlı derecede yüksek değilse görüntüleme tetkiklerinin klinisyene ve hastaya bir yarar sağlayıp sağlamadığının tartışmalı olduğu ve eğer dopamin agonist tedavi düşünülüyorsa çok sıkı takip edilip ve semptomlarda bir düzelme olmazsa kesilmesi gerektiği öne sürülmüştür (28).

2.4.Prolaktin Tayin Yöntemleri

Prolaktin ölçümü reproduktif sistem hastalıklarının değerlendirilmesinde en sık başvuru tetkiklerinden biridir (32).

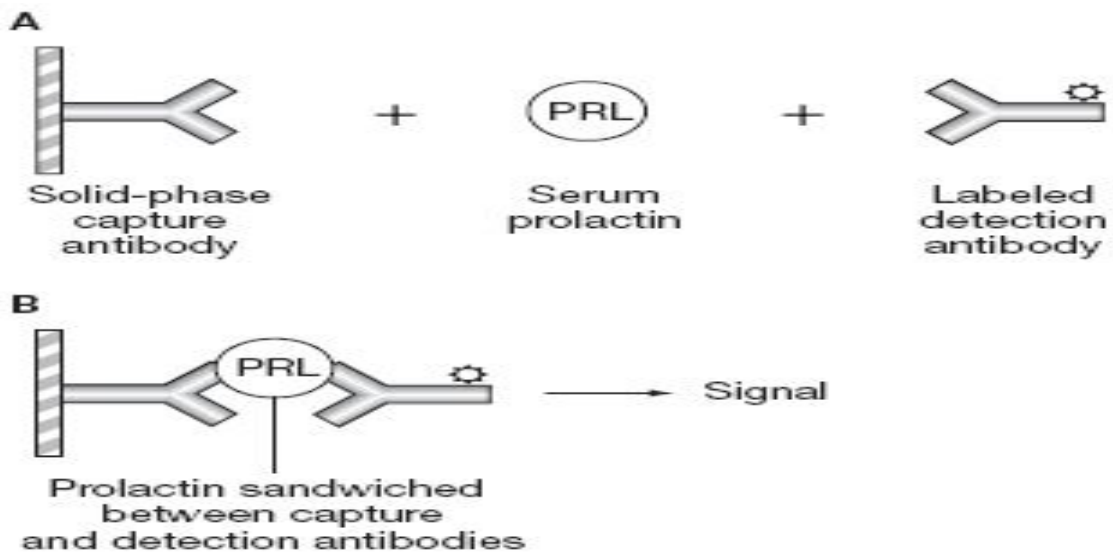
Bioasaylar: Prolaktin için en sensitif ve spesifik olan bioassay sıçan lenfomasından elde edilen Nb2 hücre dizisinin cevabına dayanan tekniktir (29,54).

Reseptör deneyleri: Bu deneylerde laktojenik aktivite, örneklerin radyoaktif hormonun membran reseptörlerine bağlanmasını inhibe etme yeteneğine göre ölçülür.

Bu iki test türü rutin kullanım için sensitivite ve spesifiteleri düşük, pratik olmayan tetkiklerdir. Daha çok, hormonun klinik etkileri ile uyumlu olmayan immünosay sonuçları sözkonusu olduğunda, PRL biyoaktivitesini ölçmekte yararlıdır.

Radyoimmünoassay: İmmünoimetrik immünosaylerin gelişmesi ile artık PRL tayininde rutin kullanılmamaktadır.

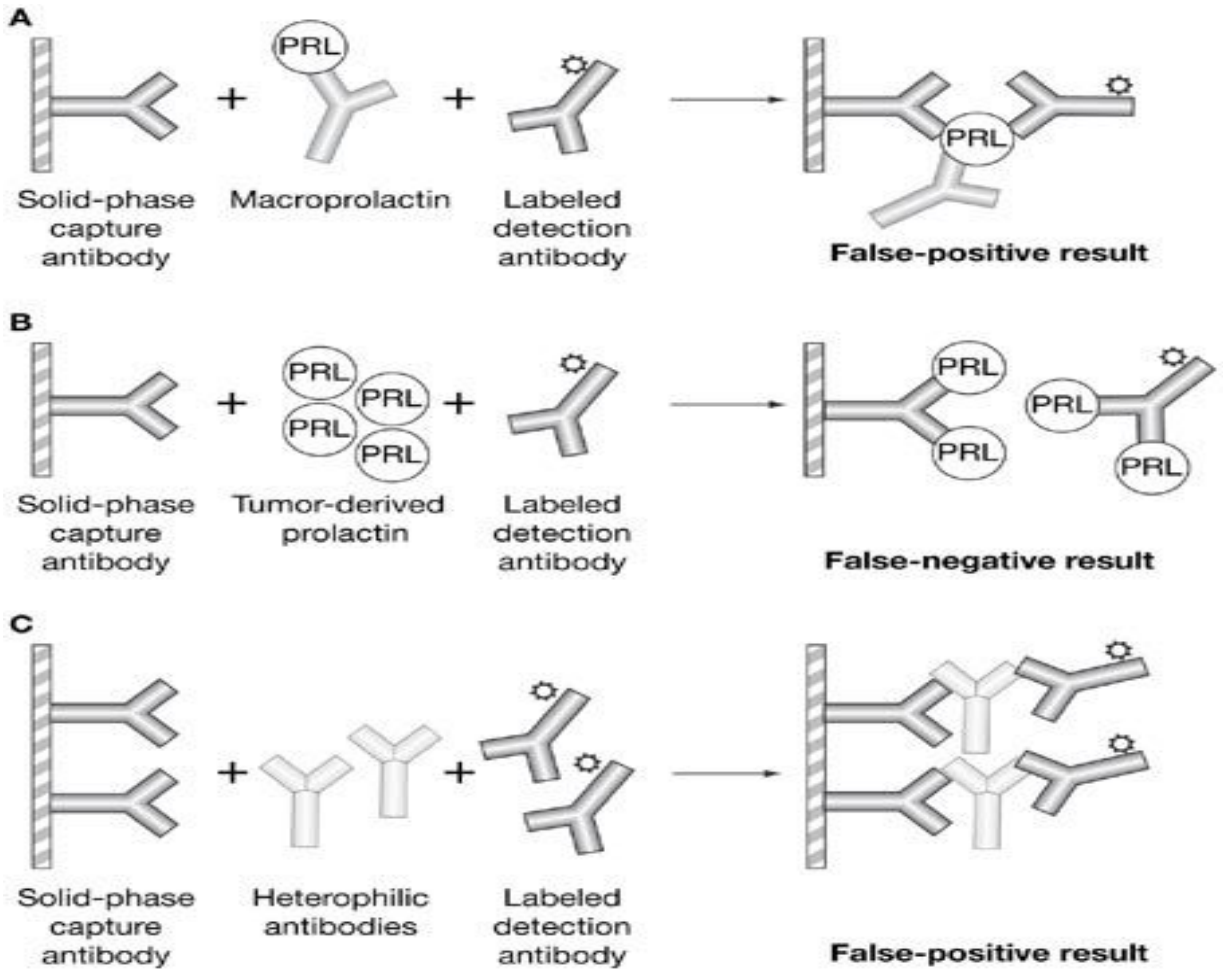
İmmünoassayler: Özellikle saflaştırılmış insan prolaktininin elde edilmesinin kolaylaşmasıyla birlikte prolaktinin tespitinde immünoassayler rutin kullanımda ön plana çıkmıştır (2,15). İki yönlü immünoimetrik veya 'sandviç' yöntemi en sık kullanılandır. Bu yöntemde, solid faz sistemine (tüp duvarı, plastik bilye, mikropartikül, vs.) bağlı antikolar örnekteki prolaktin molekülünün hedef bölgesine bağlanır. Daha sonra eklenen işaretlenmiş (radyoizotop, enzim, florofor veya kemilüminesan etiket) antikolar ortama eklendiğinde bu da prolaktin molekülünün başka bir bölgesine bağlanarak kompleks oluşturur. İşaretler ölçülerek miktar tayini yapılır (55). Şekil 1'de sandviç model gösterildi.



Şekil 1. İmmünoassay sandviç prensibi

Ancak immünosaylerde, plazma ve serum proteinleri (romatoid faktör, bağlayıcı proteinler), heterofil antikolar, ilaçlar ve ilaç metabolitleri, hemoliz ve çapraz reaksiyon yapan maddeler interferansa neden olabilirler (55). Ayrıca hiperprolaktineminin değerlendirilmesinde makroprolaktin ve hook etkisine de dikkat edilmelidir (56). Makroprolaktin polietilen glikol çöktürme, ultrafiltrasyon ve GFC yöntemleriyle saptanabilir (57). Hook etkisi bazı dev prolaktinomalarda gözlenmektedir. İki yönlü

yöntemle ölçüm yapan sistemlerde çok yüksek düzeydeki PRL mevcut antikorla tamamen birleşeceğinden, arda kalan PRL miktarı için antikor kalmayacağından, PRL doğru olarak ölçülemeyecektir. Bunun için serumun 1/100 oranında sulandırılarak çalışılması bu sorunu önleyecektir. Hook etkisi özellikle yeni tanı alan ve PRL değeri hafif yüksek saptanmış dev makroadenomlu hastalarda akla getirilmelidir (57). Şekil 2’de immunometrik immünoassayda interferans yapan potansiyel faktörler gösterilmiştir.



Şekil 2. İmmünoassayda bazı interferanslar A) IgG-PRL kompleksi olan makroprolaktin çoğu immünoassayda sandviç kompleksi oluşturduğundan dolayı tespit edilir. B) Serum PRL’indeki büyük artışlarda meydana gelen ‘hook etkisi’ C) Heterofil antikor varlığı 20 oluşan sandviç yapısı.

Prolaktin varyantlarının serumda bulunmaları diagnostik ve analitik olarak önemlidir. Prolaktinin immünoimetrik ölçüm sonuçları ile klinik tablo arasındaki farklılıkların

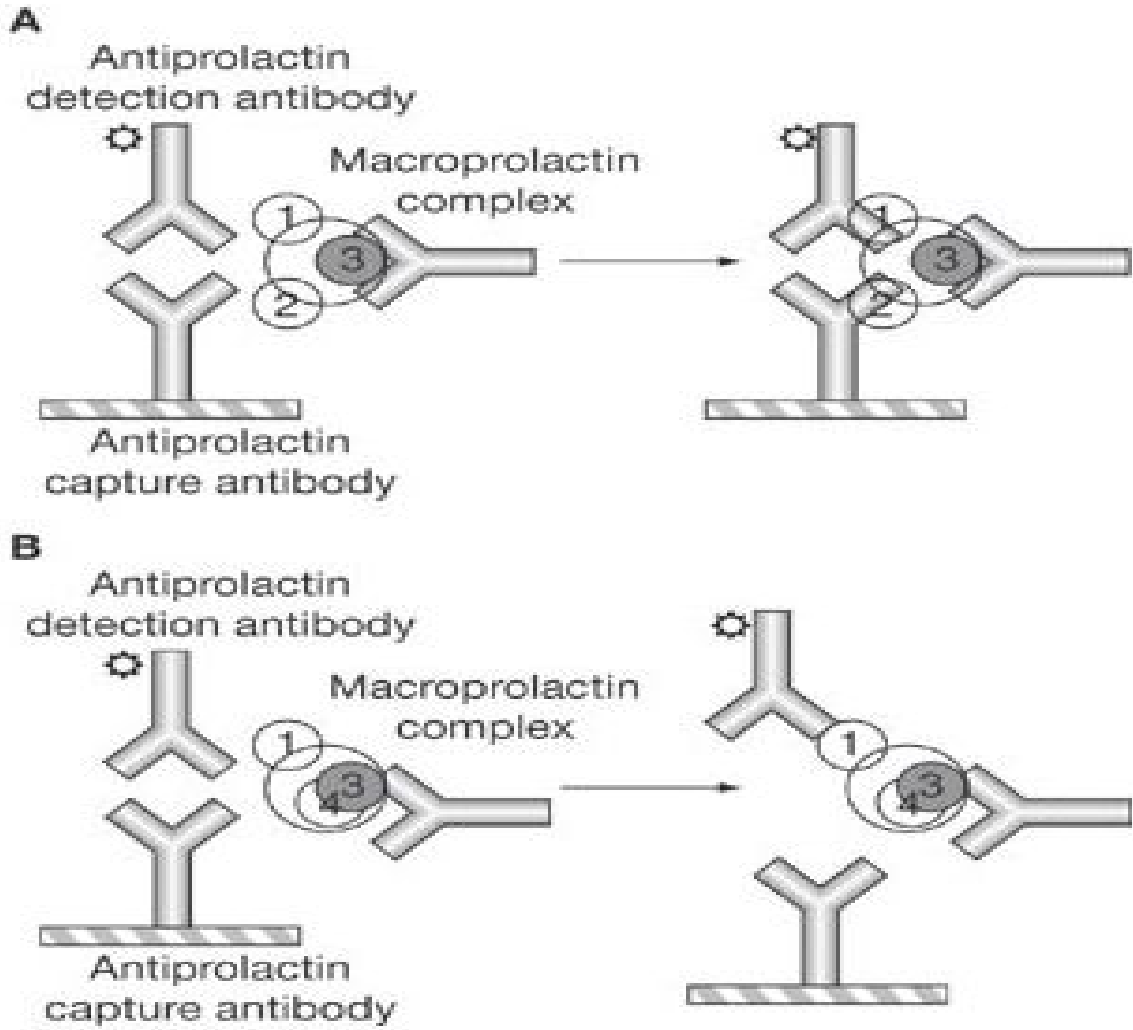
görüldüğü durumları anlamamıza yardımcı olabileceği belirtilmektedir(58). Örneğin overlerin normal fonksiyona sahip olduğu, fertilitate problemi olmayan ancak yüksek PRL düzeyine sahip hastaların serumlarında artmış miktarda yüksek moleküler ağırlıklı PRL olduğu gösterilmiştir. Hiperprolaktinemi olmasına rağmen klinik bulgunun görülmemesinden dolayı immünometrik yöntem ile bu kompleksin etkileşimi araştırılmıştır. Hiperprolaktinemisi olan ancak klinik bulgusu olmayan hasta serumları farklı immünometrik yöntemler ile çalışıldığında bütün immünometrik yöntemlerin prolaktinin daha büyük formlarını monomerik prolaktine olan hassasiyet ile aynı oranda tanımadığı ve makroprolaktin'in PRL ölçümü için kullanılan immünometrik yöntemlerle etkileşim gösterdiği çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir(59,60). Makroprolaktin, prolaktin tespitinde kullanılan immünoassay tipine göre farklı etkileşim gösteren heterojen bir prolaktin-IgG kompleksi ailesidir. Dolayısıyla prolaktin assaylerinin makroprolaktin ile reaksiyonu da değişkendir. Prolaktin ölçen tüm yöntemlerin makroprolaktin ile reaksiyonunun derecesi reaktifteki antikora bağlıdır.

Çoğu vakada makroprolaktinin bir otoantikor kompleksi olduğu düşünülürse farklı yöntemler ile alınan sonuçların bu kadar saçılımının nedeni olarak;

- a) PRL molekülünün heterojen oluşu,
- b) Makroprolaktin molekülünün yapısal farklılığı ve yöntemdeki antikorlarca tanınan epitoplara maskelenmesi,
- c) Otoantikorun bağlanması, antikor-prolaktin-antikor sandviçinin solid faza bağlanmasını engellemesi
- d) İmmünometrik yöntemde kullanılan antikorların hormonun modifiye olmamış monomerik formuna karşı ortaya çıkarılmış olması sonucunda modifiye ama biyoaktif formları saptayamaması gibilerden ileri sürülmektedir (55, 58,61). Şekil 3'te makroprolaktinin immünoassaylerle etkileşimi verilmektedir.

Bu nedenlerden dolayı PRL'i saptamak için kullanılan immün yöntemler makroprolaktini tespit etme duyarlılığı bakımından farklılık gösterirler (29).

Çalışmalarda makroprolaktine duyarlılığı en fazla olan yöntemin elektrokemiluminesans immün yöntem(ECLIA) olduğu ileri sürülmektedir (35,62).



Şekil 3. Farklı immünoassaylerle makroprolaktin tespitindeki farklılıkları açıklayanteorilerA)Makroprolaktin varlığında yüksek okuyan yöntemler; tespit ve yakalama antikorlarına karşı oluşturulan epitoplar(sırasıyla 1 ve 2) antiprolaktin otoantikoru tarafından engellenmez, B)Makroprolaktin varlığında düşük okuyan yöntemler;yakalama antikoru (epitop 4) antiprolaktin antikoru tarafından (epitop 3) kapatılır (55).

UK NEQAS(United Kingdom National Quality Assesment Scheme) tarafından prolaktin ölçen immünyöntemler makroprolaktin ile etkileşimlerine bağlı olarak 3 alt gruba ayrılmıştır:

- 1) Düşük
- 2) Orta
- 3) Yüksek etkileşimli yöntemler (63).

2.5.Makroprolaktin Ölçüm Yöntemleri

Makroprolaktinemi rutin olarak tespit edebildiğimiz bir yöntem yoktur. Makroprolaktin tespiti için kullanılan yöntemler yöntemler jel filtrasyon kromatografisi, PEG çöktürme, protein A ve G sefaroza ile çöktürme ultrafiltrasyon, Nb2 lenfoma hücre kültürü ve Western Blotting'tir (35).

2.5.1.Jel Filtrasyon Kromatografisi (GFC)

Makroprolaktin varlığını doğrulamak ve miktarını tespit etmek için kullanılan 'altın standart' yöntem olarak kabul edilmektedir. Prolaktinin üç moleküler formunun aynı anda miktar belirlenmesinde tek yöntemdir. Makroprolaktin sonucu yüzde olarak ifade edilir (29,64). Bu yöntemde kimyasal olarak inert olması gereken katı faz, bir jel ya da gözenekli bir organik bileşiktir. Hareketli faz katı gözeneklerini doldurmuştur. Ayırma, örnek bileşenlerinin molekül büyüklüklerine göre olur. En içteki gözeneklere ulaşabilen küçük moleküllü bileşenler, kolonda uzun süre kalırken, büyük moleküller daha kısa süre kalırlar (65).

GFC metodu Olukago ve Kane tarafından tam olarak belgelenmiştir. Molekül büyüklüğü temelinde dayanarak ayırma yapar. Sabit faz gözenek boyutları iyi tanımlanmış boncuklardan oluşur ve bir kolon içindedir. Makroprolaktinli bir örnek kolona uygulandığı zaman MPRL ilk olarak elue olur, takiben big PRL ve monomerik PRL elue olur (15).

Geleneksel olarak, hiperprolaktinematik hastalarda GFC ile ölçülen PRL'in %30-60'ından fazlası makroprolaktin formunda ise makroprolaktinemi denir (66).

GFC sağlam ve tekrarlanabilir tekniğinden dolayı referans yöntem olarak kabul edilmekle beraber dört temel dezavantajı vardır:

1) Düşük afiniteli antikor kompleksi olduğu için uzun jel filtrasyon çalışması esnasında otoantikordan PRL'in ayrılması için olanak sağlar ve bu yüzden makroprolaktinin serumdaki miktarından daha az ölçülmesine yol açar.

2) Makroprolaktini % olarak elde edebilmek için 30-40 farklı fraksiyonda PRL ve makroprolaktin seviyesi ölçümü ile ilişkili olarak önemli derecede doğal bir tutarsızlık meydana gelir.

3)Selektif jel filtrasyon çalışması esnasında denatürasyon veya adsorpsiyon yoluyla PRL immünreaktif materyal kaybı,izoformların olduğundan düşük ya da yüksek bulunmasına yol açar.

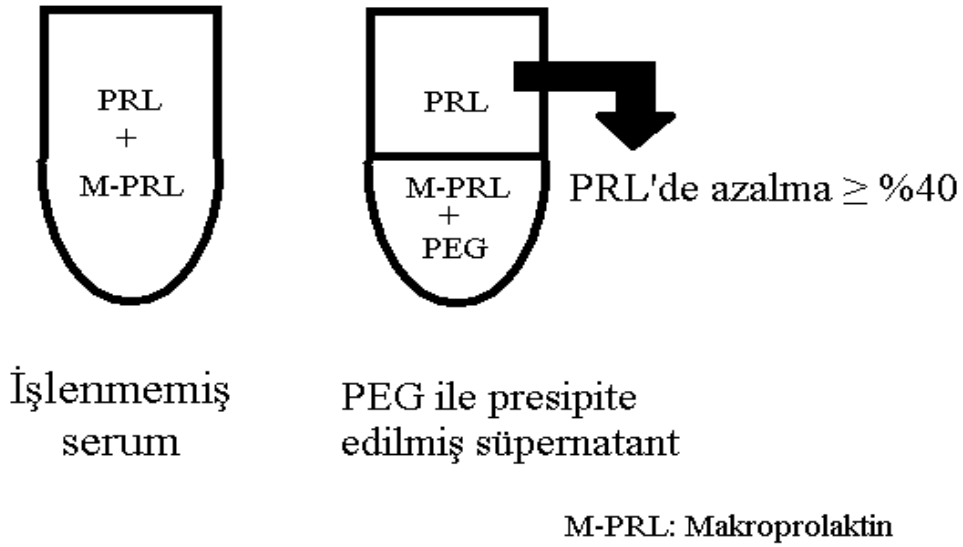
4) Zaman alıcı,yorucu ve pahalı bir yöntem olması rutin kullanımını engeller (29,43).

2.5.2.Polietilen Glikol (PEG) Çöktürme

PEG iyonik olmayan ve suda çözünebilen bir polimerdir. Karışıma polimer eklenmesi immün kompleks büyüme hızında artışa neden olur ve immün kompleksin çökmesini artırır. En çok istenen özellik yüksek moleküler ağırlık, yüksek derecede doğrusallık (az dallanma) ve suda yüksek çözünürlüktür. Polimerin molekül ağırlığı 4000'den daha büyük olmalıdır (67). Protein çöktürmede en fazla kullanılan PEG tipi, PEG-6000 ve PEG-20000 türevleridir. % 20-30 PEG konsantrasyonunda maksimum protein çökmesi gerçekleşir (68). PEG 6000 bu özelliklerden dolayı 2,5 mg/dL konsantrasyonunda immün kompleksleri çöktürme amaçlı tercih edilmektedir (69). 1992'de Hattori tarafından tanımlandığından beri hiperprolaktinematik serumlarda makroprolaktin varlığının taranması için yaygın olarak kullanılmaktadır (29).Literatürde diğer molekül ağırlıklı PEG (4000,8000) tipleri de kullanılmaktadır (42,64). PEG çözeltisi oda sıcaklığında 3 ay stabildir (70).

Yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin PEG ile çöktürülmesi GFC ile karşılaştırıldığında gayet iyi bir ayırma gücü ile makroprolaktin taramasında kullanılmaktadır.Fahie-Wilson ve Soule tarafından önerilen bu yöntemde polietilen glikol 6000'in makroprolaktinleri çöktürme yeteneğinden yararlanır ve süpernatanda PRL düzeyi ölçülerek % geri kazanım (recovery) hesaplanır (71). PEG çöktürme sonrası süpernatandaki prolaktin konsantrasyonunun (monomerik prolaktin) kontrol örneklerindeki prolaktin konsantrasyonuna(total prolaktin)oranı recovery(düzeltilme) oranı olarak ifade edilir (72).Şekil 4'te PEG çöktürme işlemi görülmektedir. Geri kazanılan %PRL oranı % 40'ın altındaysa makroprolaktin pozitif,%60'ın üzerindeki değerler negatif olarak değerlendirilir.%40-60 arası değerler gri bölge olarak tanımlanır ve makroprolaktin ile birlikte oligomerik ve monomerik prolaktin içeriyor olabilir.Bu durumda makroprolaktin varlığını teyit etmek için GFC yapılması önerilmektedir. Yaygın kullanılan birçok

otomatik immünoassayde,PEG makroprolaktin varlığını gösteren onaylanmış bir tarama testi olarak kullanılmaktadır (73, 74).



Şekil 4. PEG çöktürme

Yöntem çoğu grup araştırmacı tarafından GFC'ye karşı onaylanmış ve %40'ın altındaki PRL recovery oranları makroprolaktin tespiti için önerilmiştir.GFC ve PEG çöktürme arasında iyi korelasyon var iken kantitatif makroprolaktin seviyeleri farklıdır.PEG ile serumu çöktürmeyi takiben elde edilen makroprolaktin düzeyleri GFC ile elde edilenlerden daha yüksektir. Yani monomerik prolaktini daha düşük gösterme eğilimindedir. Bu farklılığın olası nedeni normal serumda bulunan küçük miktardaki makroprolaktinle birlikte monomerik prolaktinin önemli miktarının PEG ile birlikte çökmesidir.Monomerik prolaktinin yaklaşık %14'ü PEG ile birlikte çökler (75, 76).

PEG çöktürme yöntemi tekrarlanabilir,kolay ve ucuz olması nedeniyle birçok laboratuvar tarafından tercih edilir (15, 29, 32). Bununla birlikte kesin prolaktin eşik değerlerinden ziyade % kullanarak sonuç verildiğinden yanlış yorumlamalara yol açmaktadır.Örneğin,makroprolaktinin artmış miktarının ve monomerik prolaktinin suprafizyolojik seviyelerinin eşzamanlı birlikteliği durumlarında;%40'ın altındaki recovery değerlerinde gerçek hiperprolaktinemi olabilir.Bazı hastalarda kesin olarak makroprolaktin ve monomerik prolaktin birlikte artmıştır.Klinik açıdan önemli olan artmış monomerik prolaktin varlığıdır ve bu durumda klinikçiyi bilgilendirmek gerekir (29).

Makroprolaktin tespitinde yaygın olarak kullanımını sınırlayan bir başka neden piyasadaki bazı immünosaylarla interferans yapmasıdır. Kullanılan immün yöntemlere göre değişmek üzere pozitif, negatif veya değişken interferansa neden olmaktadır (77).

2.5.3. İmmünpresipitasyon ve Adsorpsiyon

1992'de bağımsız 2 grup, anti insan IgG ve protein A antikollarının her ikisinin makroprolaktini çöktürme yeteneğinde olduğunu gösterdi ve bu makroprolaktinin PRL-IgG kompleksi olduğunun güçlü bir kanıtı kabul edildi (29, 78). Protein A, staf. aureus'un hücre duvar yapısında bulunur ve antijen bağlayan bölge ile interferans vermeden IgG molekülünün Fc bölgesine bağlanma yeteneğindedir. Yakın çalışmada makroprolaktin tarama amaçlı immünoassay ölçümü öncesi hiperprolaktinik serumdan PRL-IgG komplekslerinin uzaklaştırılması için protein A Sefaroz kullanıldı (79). İnsan IgG için daha spesifik protein G Sefaroz kullanımı ile elde edilen bulgular protein A ile elde edilen bulgularla benzerdi. Her ikisi de immünoassay öncesi makroprolaktin baskın serumda makroprolaktini çöktürme yeteneğindedir. Sonuçlar gösterdiği serumdan makroprolaktini uzaklaştırmada etkili olmakla beraber bu reaktiflerin muamelesi sonucu elde edilen monomerik PRL sonuçları GFC ile elde edilen değerlerden yaklaşık %30 daha yüksektir. Bunun nedeni bu teknikte bütün IgG komplekslerinin çökmemesi ve nadir de olsa makroprolaktinin IgG içermemesidir. Bir diğer dezavantajı çok fazla dilüsyon (1:20) yapılmasıdır (38). Bununla beraber protein A ve protein G, GFC ile karşılaştırıldığında tatmin edici korelasyon katsayıları elde edilmiştir (sırasıyla 0.91, 0.93) (29).

2.5.4. Ultrafiltrasyon

Ultrafiltrasyon plazma proteinleri için spesifik membranların moleküler kütle seçiciliğine dayanmaktadır. Fahie-Wilson, Heys, Craddock ve Quinn bu tekniği makroprolaktin içeren serumlara uyguladılar ve PEG çöktürmeye alternatif olarak kullanılabileceğini öne sürdüler (29, 38). Bununla birlikte Prazeres GFC ve UF ile elde edilen makroprolaktin seviye 26 karşılaştırdığında vakaların çoğunda yaygın tutarsızlık olduğunu gözlemlediler (37).

Prolaktin izoformlarını moleküler büyüklüklerine göre ayıran ve dolayısıyla tüm makroprolaktin formlarının tespiti için sensitif bir tekniktir (80). Her ne kadar 4 saatlik

450g 'de sıcaklık kontrollü santrifüjün temini ve kullanımı bazı laboratuvarlar için zor olsada, çok daha basit, hızlı ve ucuz olması ve makroprolaktinin hakim form olmasıdurumunda miktar tayinindeki doğruluğu bakımından değerli olabilir. Ultrafiltrasyonyöntemi basitlik ve performans açısından PEG yöntemine önemli derecede benzemektedir (60). Bu yöntemin yakın gelecekte PEG çöktürme yönteminin yerini alması beklenmektedir (15).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

Otoanalizör	(ROCHE Modüler Sistem, E170)
Santrifüj	(EPPENDORF 5810)
Vorteks	(NUVE, NM 110)
Manyetik Karıştırıcı	(IKAMAG RH)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Prolaktin Kiti(Roche Modüler E170 kendi uyumlu kiti)
Dilüent Universal (Roche Modüler dilüent)
Kontrol Örnekleri (Elecsys Precicontrol Universal 1 ve 2)
PEG 6000(MERCK)
PBS Tablet(MEDİCAGO)

3.2. Metod

3.2.1. Deneyin Planlanması ve Numunelerin Toplanması

Bu çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi araştırma etik kurulundan onay alınarak başlandı. Çalışma, yapılan rutin tetkikler sonucu PRL düzeyleri laboratuvarlarımızda kullanılan referans aralığın üst değerinin (kadın için 4.79-23.3ng/mL, erkek için 4.04-15.2 ng/mL arası) üzerinde ve 200ng/mL altında bulunan bireyler üzerinde yapılması planlanmışken, uzun sürede son derece az numune gelmesi nedeniyle çalışmaya KTÜ Tıp Fakültesi ve Trabzon Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Polikliniğine başvuran ve idiyopatik hiperprolaktinemi tanısı alan 43 hasta alındı. Tüm bireylerin onam formları alındı. 43 kişinin 38'i kadın, 5'i erkekti. Çalışmaya gebelik ve travma hikayesi olan şahıslar alınmamıştır.

Araştırma için kan alımı rutin tetkik ve tedavi işlemleri için kan alımı sırasında gerçekleştirilmiştir.

Bir gecelik açlık dönemini takiben bireylerden vakumlu jellidüz tüplere venöz kan örneği alınmıştır. Tüpler 3000rpm'de 10dk santrifüj edilerek serum elde edilmiş ve gerekli tayinler bekletilmeden yapılmıştır.

Örneklerden önce PRL tayini gerçekleştirildi. Makroprolaktin varlığını değerlendirmek için, örnekler PEG 6000 ile ön işleminden geçtikten sonra tekrar PRL tayini yapıldı.

3.2.2. Prolaktin Tayini

Kullanılan materyaller:

- a) PRL M reaktifi: 6,5ml; streptavidin kaplı mikropartiküller ve koruyucu madde içerir.
- b) R1 reaktifi: 10ml; biyotinli monoklonal anti-PRL antikor ve koruyucu madde içerir.
- c) R2 reaktifi: 10ml; rutenyum kompleksi ile işaretli monoklonal anti-PRL antikor, tamponu ve koruyucu madde içerir.

PRL tayini serumda Roche firmasına ait PRL tayin kiti ile Roche Modüler E170 otoanalizöründe yapıldı. Serumdaki PRL miktarı, elektrokemilüminesans immünosayyöntemle sandviç prensibiyle tayin edilmiştir. Yöntemde PRL'e karşı biotin ve rutenyumla işaretlenmiş 2 ayrı monoklonal antikor kullanılır. Toplam test süresi 18dk'dır ve iki ayrı inkübasyon siklusundan oluşur. Birinci inkübasyonda 10µL serum ve PRL'e spesifik biyotinli monoklonal antikor ilk kompleksi oluşturur. İkinci inkübasyonda rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş prolaktine spesifik monoklonal antikor ve streptavidin kaplı mikropartiküller eklendikten sonra bir sandviç kompleksi oluşur ve biyotin ile streptavidinin etkileşimi aracılığı ile katı faza bağlı hale gelir. Reaksiyon karışımı, mikropartiküllerin elektrodun yüzeyine manyetik olarak yakalandıkları ölçüm hücre sine aspire edilir. Tutunamayan maddeler yıkama işlemi ile uzaklaştırılır. Elektroda voltaj uygulanması kemilüminesans emisyonuna neden olur ve bu bir foton sayıcı (photomultiplier) ile ölçülür. Sonuçlar, 2-noktalı kalibrasyon ile cihaza özel olarak oluşturulmuş bir kalibrasyon eğrisi ve reaktif barkodu aracılığıyla elde edilen bir ana eğri ile tayin edilir (57).

Otoanalizörde yapılan tayin işlemleri günlük kalite kontrol çalışmalarının ardından gerçekleştirildi.

3.2.3. PEG çöktürme ile Makroprolaktin Tayini

3.2.3.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Literatürde PEG, distile su ve fosfat tamponu olmak üzere iki farklı şekilde hazırlanmaktadır.

Fosfat tamponu hazırlanması (PBS, pH: 7.4, 1L); Temiz bir beher alındı ve içerisine 900 mL kadar saf su konuldu. 10 tane PBS tablet behere konuldu ve magnetik bar yardımıyla tabletler çözünür hale getirildi. pHmetrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra çözeltinin pH'sı 7.4'e ayarlandı. Çözelti balon jöjeye aktarılarak, saf su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı ve 2-8°C'de saklandı.

Distile su ile %25'lik PEG 6000 in hazırlanması (PEG1); 25g PEG 6000 tartılarak behere konuldu ve yaklaşık 60 mL distile veya deiyonize su içinde 18-25°C'de manyetik

karıştırıcı ile 15dk karıştırıldı.Çözelti balon jojeye aktarılarak distile su ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı ve 20-25°C'de 10 güne kadar saklandı.

Fosfat tamponu ile %25'lik PEG 6000 in hazırlanması (PEG2);25g PEG 6000 tartılarak behere konuldu ve yukarıdaki şekilde hazırlanmış olan yaklaşık 60 mL PBS içinde 18-25°C'de manyetik karıştırıcı ile 15dk karıştırıldı.Çözelti balon jojeye aktarılarak PBS ile son hacim 100 mL'ye tamamlandı ve 20-25°C'de 10 güne kadar saklandı.

3.2.3.2. PEG ile çöktürme

Çalışmaya başlarken kit prospektüsünde yer aldığı şekilde PEG1 hazırlanarak örnekler çalışıldı. Ancak daha sonra literatürde PEG2 ile yapılmış çok sayıda yayın olması üzerine PRL sonuçları ve çözelti stabilitesi açısından iki çözelti arasında fark olup olmadığını görmeye karar verdik. Bu nedenle PEG1 ile 43 hastanın tamamının serum örneği muamele edilirken PEG2 ile 30 hasta örneği muamele edilmiştir.

1-200 µL serum 200 µLPEG1çözeltisi ile karıştırıldı ve 10 sn. vortekslendi. 10 dk oda ısısında inkübe edildi.Karışım sonra 2200g'de 30 dk santrifüj edildi. Süpernatandan prolaktin tayini yapıldı.Aynı anda PEG ile işlem yapılmamış serum,kontrol olarak çalışıldı.Kontrol örnekleri 200 µL dilüente konulan 200µL serumla hazırlandı.

2-200 µL serum 200 µLPEG2 çözeltisi ile karıştırıldı ve 10sn vortekslendi. 10 dk oda ısısında inkübe edildi.Karışım 2200g'de 30 dk santrifüj edildi.Süpernatandan tekrar prolaktin tayini yapıldı.Kontrol örnekleri 200 µL dilüente konulan 200 µL serumla hazırlandı (75).

PEG ile ön işlem yapılmadan ölçülen prolaktin ile PEG çöktürme sonrası ölçülen prolaktin arasındaki fark makroprolaktini verir (81).Sonuçlar hesaplanırken, PEG işlemi esnasında meydana gelen dilüsyon etkisi dikkate alınmalıdır.PEG ileçöktürmeden sonra,her laboratuar beklenen değerlerin kendi hasta popülasyonuna uygulanabilirliğini incelemeli ve gerekiyorsa kendine ait referans aralıkları belirlemelidir.

PEG ile makroprolaktinin çöktürülerek örnekten uzaklaştırıldığı yöntemde,makroprolaktinin yanı sıra monomerik prolaktinin ortalama %14'ünün (%0-40) PEG ile çöktüğü bildirilmektedir.Recovery hesaplanması aşağıda gösterilmiştir (7,82).

(PEG ile çöktürme sonrası ölçülen PRL düzeyi+0,14)×2

$$\text{Düzeltilme (Recovery) \%} = 100 \times \frac{\text{PEG ile çöktürme sonrası ölçülen PRL düzeyi}}{\text{PEG ile çöktürme öncesi ölçülen PRL düzeyi}}$$

Düzeltilme ; > % 60 Monomerik prolaktin
 % 40-60 Monomerik ve makroprolaktin
 < %40 Makroprolaktin

3.2.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda ölçümle elde edilen veriler aritmetik ortalama (X), standart sapma (SD) ve ortanca(minimum-maksimum) şeklinde ifade edildi. Frekans veriler sayı (%) olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğuna Kolmogorov-Smirnov testi ile bakıldı. Normal dağılıma uydıkları için eşleştirilmiş örneklerde t- testi ile anlamlılıklarına bakıldı. Farklı iki çözelti arasındaki karşılaştırmada Pearson korelasyon analizi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi p<0.005 olarak alındı.

Metodun analitik hassasiyeti (precision) ve doğruluğu (accuracy) varyasyon katsayısı (% CV) hesaplanarak ifade edildi.

$$\% \text{ CV} = (\text{SD}/\text{X}) \times 100$$

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubunun Demografik Verileri

Çalışmamıza katılan 43 hiperprolaktinematik kişinin tamamı 18 yaş ve üzerindedir. Grubun yaş ortalaması $38,5 \pm 8,9$ (21-63) yıl idi. Prolaktin değerlerinin ortalaması $71,1 \pm 38,4$ (16,23-181,3) ng/ml bulundu.

PEG1 ile çöktürme sonrası 43 hastanın PRL ortalama değeri $50,53 \pm 30,3$ (3,94-140,2), PEG 2 ile çöktürme sonrası 30 hastanın PRL ortalama değeri $54,5 \pm 33,6$ (3,8-144,8) olarak bulundu. Bu değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,005$).

4.2. Çalışma Yönteminin Performans Verileri

PRL ölçümü yaptığımız immünoassay yönteminin analitik hassasiyet ve doğruluk değerlendirmesini kontrol numuneleri ile yaptık. (Kontrol 1=Normal, Kontrol 2=yüksek seviye PRL kontrolleri). Kontrol numunelerinde çalışma içi (intraassay) % CV kontrol 1’de %1, kontrol 2’de %1.3; hergün yapılan ölçümde günler arası (day to day) kontrol 1’de %3.4, kontrol 2’de %2.5 bulundu ($n=5$). Sonuçlar ‘ng/mL’ cinsinden ifade edildi. Yine makroprolaktin içeren ve içermeyen örneklerle ($n=10$) tekrarlanabilirliği test ettik. Makroprolaktin içermeyen hiperprolaktinematik serumda ölçümler arası (interassay) total prolaktin ortalaması 112.9 ng/mL ve % CV değeri 2.8, günler arası total prolaktin ortalaması 119, % CV değeri 6.9 bulundu. Makroprolaktin pozitif serumda ölçümler arası total PRL değeri 61.1; % CV değeri % 3.2 ve günler arası total PRL ortalaması 65.3 ng/mL CV değeri % 8.5 elde edildi. Bulgular tablo 6 ve 7’de verildi.

Tablo 6. Prolaktinin hassasiyet (precision) ve doğruluk (accuracy) kontrol sonuçları

Örnek	Okunması gereken değer (ng/mL)	N	Ortalama	SD	% CV	Bias
Çalışma içi						
Kontrol 1	10.8±0.75	5	10,66	0,11	1	-0,14
Kontrol 2	40.2±2.81	5	39,7	0,55	1,3	-0,5
Günler arası						
Kontrol 1	10.8±0.75	5	10,82	0,37	%3,4	+0,02
Kontrol 2	40.2±2.81	5	39,9	1,03	%2,5	-0,3

SD = standart deviation, CV = coefficient of variation, n = ölçüm sayısı

Tablo 7.Hiper ve makroprolaktinemili numunelerde PRL için CV değerleri

Örnek (n=10)		Ortalama	% CV
Hiperprolaktinmik	Ölçümler arası	112,9	2,8
	Günler arası	119	6,9
Makroprolaktinmik	Ölçümler arası	61,1	3,2
	Günler arası	64,8	8,5

4.3.Makroprolaktin taramasına ait sonuçlar

Çalışma grubunda PRL % geri kazanımdeğerleri hesaplanarak serum prolaktin değerlerindeki yüksekliğe makroprolaktinin katkısı araştırıldı. Geri kazanım hesaplaması her iki çözelti için ayrı ayrı yapıldı. Çalışma grubu demografik verileri, total PRL, PEG1

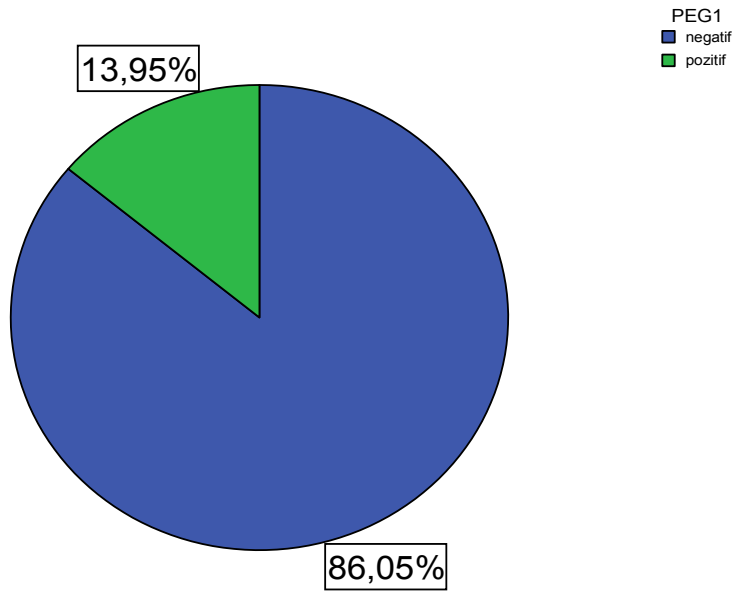
vePEG 2 ile çöktürme sonrası elde edilen değerler ve geri kazanım değerleri tabl 34 verilmiştir.

Tablo 8.Total PRL, PEG1 vePEG 2 ile çöktürme sonrası elde edilen değerler ve geri kazanım değerleri.

Hasta No	Cinsiyet	Yaş	PRL	PEG1	PEG2	Recovery 1 (%)	Recovery 2 (%)
1	Kadın	44	24	9	-	%37,5	-
2	Kadın	30	126,3	98,6	-	%78	-
3	Kadın	41	79,63	71,1	-	%89,2	-
4	Kadın	42	58,96	52,06	-	%88	-
5	Kadın	35	53,01	4,52	-	%8,5	-
6	Kadın	37	74,38	64,72	-	%87	-
7	Kadın	40	42,37	29,1	-	%68	-
8	Kadın	40	52,61	50,06	-	%96	-
9	Kadın	34	69,36	56,04	-	%81	-
10	Kadın	49	41,6	14,96	-	%35	-
11	Kadın	40	31,95	21,62	-	%67	-
12	Kadın	42	87,59	59,46	-	%67	-
13	Kadın	49	62,22	44,08	-	%71	-
14	Kadın	38	113	70,44	70,4	%62	62,4
15	Kadın	46	68,12	46,14	52,6	%67	72.2
16	Kadın	48	181,3	106,5	124.4	%58	68
17	Kadın	22	41,24	15	16	%36	39
18	Kadın	40	54,12	39,3	41,4	%72	76,4
19	Kadın	32	102,3	72,18	74,7	%70	73
20	Kadın	21	46,7	29,68	31,7	%63	67
21	Erkek	28	147,2	104,52	105	%71	71
22	Erkek	32	76,4	59,1	58,2	%77	76
23	Kadın	34	103,9	72,96	77,8	%70	74,9
24	Kadın	40	60,3	55,84	48,4	%84	80,3
25	Kadın	34	60,36	44,54	47,1	%73	78

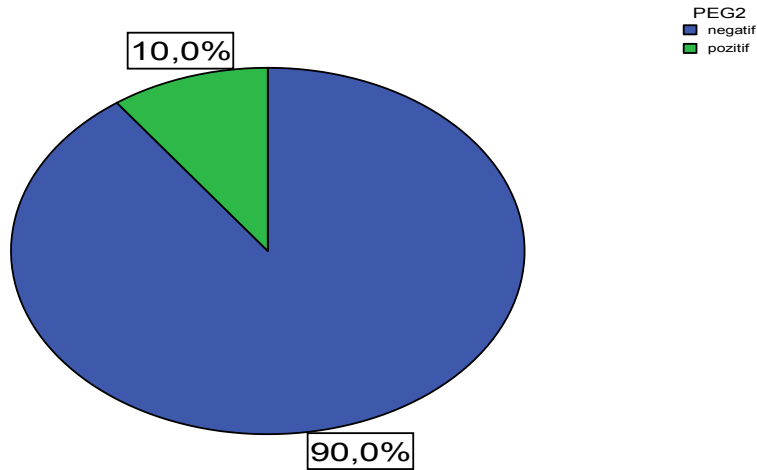
26	Kadın	48	41,8	35,3	35,6	%84	85
27	Kadın	39	61	45,5	44,1	%74	72
28	Kadın	26	89,6	67	66,5	%74	74,2
29	Kadın	48	83,2	64,8	70,4	%77	84
30	Kadın	31	32,74	21,04	23,16	%64	70
31	Kadın	33	93,71	64,9	63	%69	67
32	Kadın	36	50,25	37,1	39,1	%73	77
33	Kadın	49	128,6	110,8	111,5	%86	86,7
34	Kadın	26	95,44	73,2	71,8	%76	75,2
35	Kadın	36	38,14	30,8	30,4	%80	79,8
36	Kadın	50	56,59	47,1	46,9	%83	83
37	Erkek	34	69,81	51,7	51,7	%74	73
38	Kadın	63	29,9	11,5	10,96	%38,9	36,7
39	Erkek	29	31,84	24,3	26,7	%76	83
40	Kadın	33	180,2	140,2	144,8	%77	80
41	Kadın	39	36,11	24,2	29,2	%78	80
42	Erkek	59	16,3	3,9	3,8	%27	26,7
43	Kadın	39	65,1	29,7	30,1	%45	46

Geri kazanım oranı <%40 olan hastalar makroprolaktin olarak değerlendirildiği zaman 43 hastanın 6'sında makroprolaktin saptandı. Çalışma grubumuzda makroprolaktin sıklığı % 13.5 olarak belirlendi. Bunların 5'i kadın 1'i erkekti. Pekil 5 ve 6'da makroprolaktin sıklığı görülmektedir.



Şekil 5. PEG 1 çöktürme sonrası makroprolaktin sıklığı

Recovery oranı %40-60 arasında olan 2 hasta vardı.PEG1 ve PEG2 ile çöktürme sonrası makroprolaktin pozitifliği taranan 30 hastadan hem PEG1 hem de PEG2 ile çöktürme sonrası aynı 3 hastada makroprolaktin pozitifliği saptandı. Yani iki çözelti arasında makroprolaktini yakalama açısından fark bulunamadı.Tablo 9 ve 10'da makroprolaktin pozitif hastalar verildi.



Şekil 6. PEG 2 sonrası makroprolaktin sıklığı

Makroprolaktin açısından pozitif bulunan serumların total PRL düzeyleri 100ng/mL'nin altındaydı. Makroprolaktin negatif ve pozitif bulunan total PRL değerlerinin dağılımı Şekil 7'de görülmektedir.

Tablo 9. PEG 1 ile çöktürme sonrası makroprolaktin pozitif hasta sonuçları

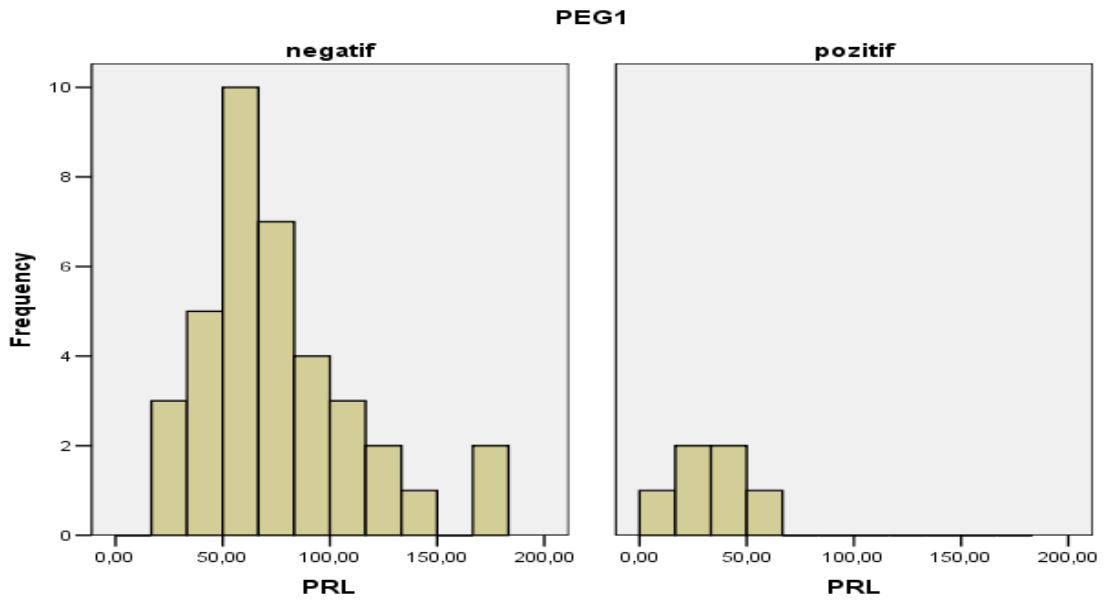
	1.Hasta	2.Hasta	3.Hasta	4.Hasta	5.Hasta	6.Hasta
Yaş	44	35	49	22	63	59
Total PRL(ng/mL)	24	53,01	41,6	41,24	29,9	16,3
Monomerik PRL(ng/mL)	9	4,52	14,96	15	11,5	3,9
Recovery (%)	37,5	8,5	35	36	38,9	27

38

Tablo 10. PEG 2 ile çöktürme sonrası makroprolaktin pozitif hastalar

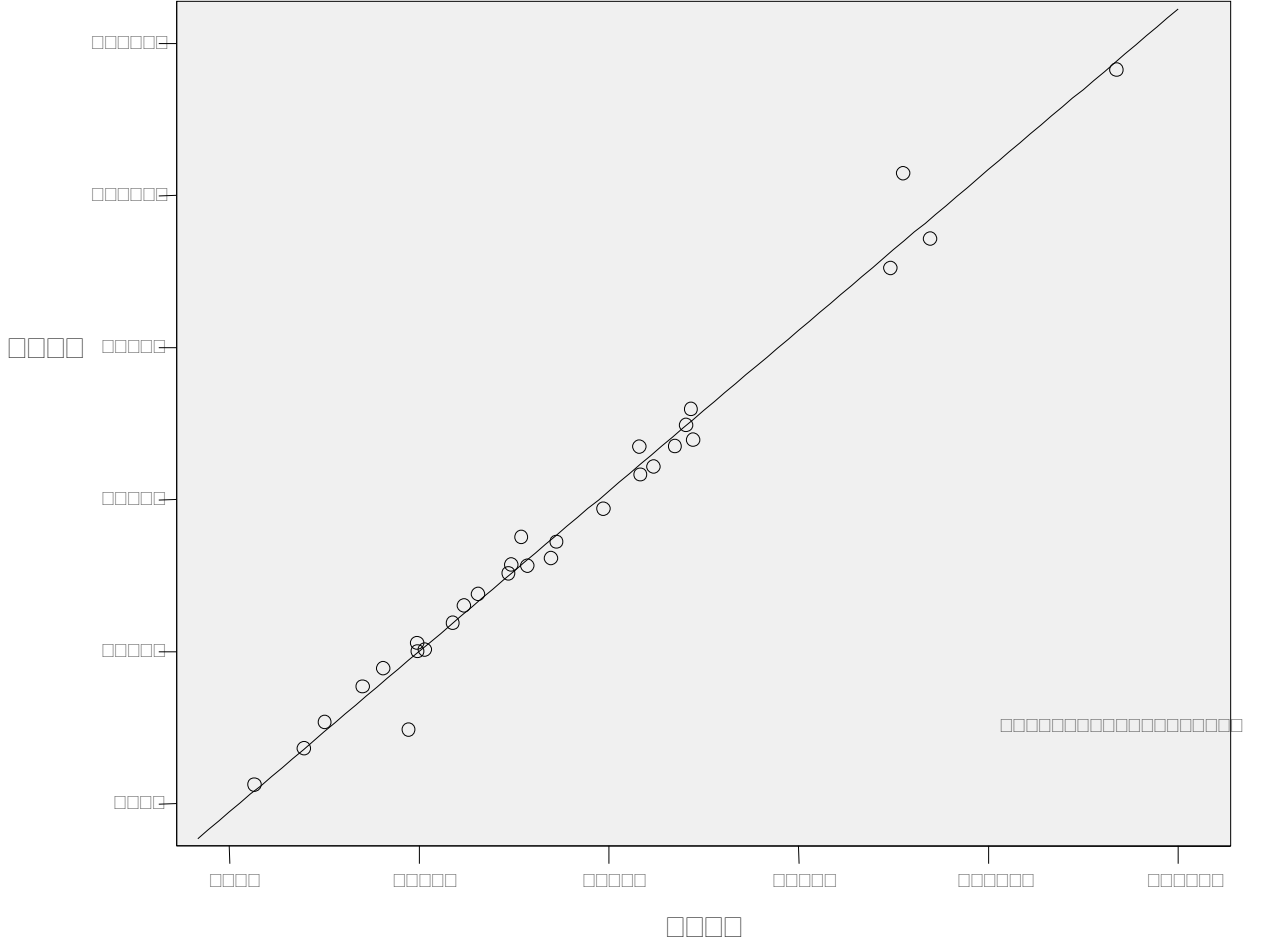
	1.Hasta	2.Hasta	3.Hasta

Yaş	22	63	59
Total PRL(ng/mL)	41,24	29,9	16,3
Monomerik PRL(ng/mL)	15	11,5	3,9
Recovery (%)	36	38,9	27



Bekil 7. Makroprolaktin negatif ve pozitif bulunan total PRL değerlerinin dağılymı

PEG 1 ve PEG 2 ile çöktürme sonrası bulunan monomerik PRL düzeyleri arasında güçlü pozitif korelasyon bulundu ($r=0,99,p=0.00$).



Şekil 8. PEG 1 ve PEG 2 ile çöktürme sonrası elde edilen PRL sonuçlarının korelasyon grafiği (PEG 1=PEG 1 sonrası PRL değeri, PEG 2=PEG 2 sonrası PRL değeri)

5.TARTIŞMA

Günümüzde makroprolaktinemiye bağlı hiperprolaktinemi ile gerçek hiperprolaktineminin ayrılmaması hastanın yanlış yönlendirilmesine sebep olacağından güncelliğini hala koruyan bir konudur.Hiperprolaktineminin makroprolaktinemiye bağlı olduğunun anlaşılamaması, semptomların gerçek nedeninin bulunmamasına yol açabilir. Bu durum, uygunsuz veya gereksiz laboratuvar ve görüntüleme tetkikleri, medikal ya da cerrahi tedavi ile sonuçlanabilir. PRL varyantları arasında monomerik hiperprolaktineminin önemi tedaviyle düzeltilebilen morbiditesinden ileri gelir. Monomerik prolaktinemi ile makroprolaktinemi ayrımını klinik değerlendirmeyeyle yapmak uygun değildir. Hiperprolaktinemisi olan bütün hastalarda makroprolaktineminin araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır (83).

Suliman ve arkadaşları (81)yaptıkları çalışmada monomerik hiperprolaktinemili hastalardaoligomenore veya amenoreye daha sık rastlanmakla birlikte, makroprolaktinemili hastalarda da sıkça rastlandığını bildirmişler, istatistiksel olarak anlamlı olmakla birlikte bu farklılıkların iki grubun birbirinden ayrılması için yeterli olmadığı sonucuna varmışlardır. Bu ve diğer çalışmalarda görülen galaktore ve oligomenore gibi klinik semptomlar ile makroprolaktinemi laboratuvar bulgusu arasındaki ilişkinin rastlantısal olma ihtimalinin yüksek olduğunu ileri sürmüşler ve her hiperprolaktinemili hastaya makroprolaktinemi için tarama testi yapmayı önermişlerdir.

Ancak yapılan çalışmalarda 200 ng/mL ve üzerinde total PRL değerlerinin genellikle adenoma eşlik ettiği gösterilmiştir (84). Total PRL değeri 25-100 ng/mL olan hastalarda makroprolaktinemiye daha sık rastlanmaktadır (2). 120 hiperprolaktinematik serumda yapılan bir çalışmada makroprolaktinemi prevalansı % 20 (20/120) bulundu ve bu 20 hastanın da PRL konsantrasyonu 89 ng/mL'nin altındaydı (43).

Biz bu bulguları göz önüne alarak ve maliyet olarak uygunluğunu da düşünerek çalışma grubumuzu makroprolaktinemi görölme sıklığı yüksek olan 200 ng/mL'nin altındaki değerlerden seçtik.

Vallette-Kasic (85) geniş serili araştırmaları sonucunda; makroprolaktineminin, hiperprolaktineminin major ama sıklıkla gözden kaçırılan bir nedeni olduğunu, hiperprolaktinematik hastalarda klinik tablo ve biyolojik takip açısından uyumsuz bulgular gözlemlendiği zaman araştırılması gerektiğini, sorunsuz gebelikle birlikte giden fertilitenin devamına rağmen olağan hiperprolaktinemi semptomlarının mevcut olabildiğini, prolaktin düzeylerinin çoğunlukla zaman içinde sabit kaldığını, dopaminerjik tedavinin bazen yararlı olabildiğini ancak prolaktin konsantrasyonlarının düşmesini her zaman sağlamadığını, prolaktinoma gibi hipofiz lezyonlarının bazen birlikte görülebildiğini ve radyolojik görüntüleme ile bertaraf edilmesi gerektiğini ortaya koymuşlardır. Yine de makroprolaktinemi tanısının, hormonal ve radyolojik tetkiklerin tekrarlanmasını ve gereksiz tedaviyi önlediğinden hareketle bu biyolojik bozukluk için rutin bir tanı yönteminin tüm özelaştırma merkezlerinde bulunmasını tavsiye etmişlerdir.

Makroprolaktinemi tanısında kullanılan referans yöntemi olan GFC, prolaktinin üç molekülerformunun (m-prolaktin, b-prolaktin ve bb-prolaktin) aynı anda miktar belirlemede yegane yöntemdir. Ancak bu yöntem klinik labolatuvarlarda rutin olarak kullanılmak için çok pahalı ve zaman alıcıdır. Bu yüzden bb-prolaktinin miktar belirlemede veya en azından makroprolaktin taramasında dahabasit bir yöntem arayışı doğmuştur. Günümüzde PEG ile çöktürme tarama amaçlı en sık kullanılan yöntemdir. Yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin PEG ile çöktürülmesi GFC ile karşılaştırıldığında gayet iyi bir ayırma gücü ile makroprolaktin taramasında kullanılmaktadır (29).

Yapılan farklı çalışmalarda hızlı, ucuz ve her hastaya uygulanabilen bir teknik olan PEG çöktürme yönteminin hiperprolaktinematik hastalarda tarama testi olarak kullanılması önerilmiştir (15-18). Maliyet açısından da GFC'den 27 kat daha ucuzdur (15). Fakat MPRL varlığını belirlemek için PRL'in tekrar istemi gerekmektedir. Maliyet olarak kullanılan PEG'in fiyatı da PRL tayinine ilave edilmelidir. Test başına kilogramı 90 TL olan % 25'lik hazırlanan PEG 6000'den 200µl kullanılmaktadır. Bu açıdan bakıldığında PRL tayini üzerine kayda değer bir ek yük getirmeyeceği aşıkardır. Fakat suda hazırlanan çözeltilinin 15 günlük stabilitesi göz önünde bulundurulmalıdır (38).

Bu alışmalar ışığında bizde laboratuvarımızda makroprolaktin için rutin bir tarama yöntemi kurmayı amaçladık ve kullandığımız immünoassay yönteminin makroprolaktinle etkileşimini ortaya koymaya çalıştık. Avantajlarından dolayı ve kullandığımız immünoassay ile uyumlu olduğundan tarama yöntemi olarak 42 çöktürme yöntemini seçtik. Bu yöntemde çöktürme fosfat tamponu ve su ile yapılabilmektedir. Literatürde yaygın olarak fosfat tamponu ile hazırlanmış PEG kullanılmaktadır (44,45,46). Su ile yapılan az sayıda çalışma vardır (85). PEG fizyolojik şartlarda kristalize halde olan fosfat veya su ile hazırlandığında basit aköz stabil olmayan bir maddedir. Fosfat tamponu ile hazırlandığında PEG'in stabilizasyonu artmakta (2 ay) fakat yalnız daha düşük geri kazanıma neden olmaktadır (38, 86). Laboratuvarımızda kullanılan immünoassay sisteminin reaktif prospektüsünde ise PEG'in distile veya deiyonize su ile hazırlanması önerilmektedir. Bu şekilde hazırlandığında ise stabilitesi 15 gündür (87).

Biz her iki şekilde de PEG çözeltisi hazırlayarak makroprolaktini değerlendirdik. Ve ayrıca hem geri kazanımlarını ve hemde iki çözelti arasında fark olup olmadığını inceledik. Geri kazanımlar açısından durum iki çözelti arasında anlamlı bir fark bulamadık. Her iki çözelti ile muamale sonrası elde edilen PRL (monomerik) değerleri arasında güçlü bir korelasyon bulduk.

Serum PRL düzeyinin değerlendirilmesi de hala önemli bir sorundur. Çünkü PRL birçok fizyolojik durumda akut olarak artabilen bir hormondur. Üstelik monomerik PRL, big PRL, big big PRL ve glikozile PRL olmak üzere birden çok izotipi vardır. Bu hormonların her birinin farklı biyolojik aktiviteleri vardır ve farklı antiserumlarla ölçülebilirler. Ancak günümüzde mevcut PRL ölçüm yöntemleri, çeşitli klinik durumlarda hiperprolaktinemi varlığını yeterince yansıtamamaktadır. Mevcut laboratuvar yöntemleri arasında PRL ölçümünde önemli derecede farklılıklar olabilmektedir. Prolaktini belirlemede kullanılan immünoassaylerin makroprolaktini saptaması sürpriz değildir. Asıl sürpriz olan ve hem klinisyenlerin hem de laboratuvar bilimcilerinin ilgi alanındaki konu rutinde kullanılan farklı PRL immünoassayleri ile hiperprolaktinemik serumda makroprolaktinin saptanmasındaki anlamlı değişkenliktir. Kapsamlı bir çalışmada Smith ve arkadaşları (61), ağırlıklı olarak makroprolaktin içeren 10 serumda, PRL'yi ölçmede en yaygın kullanılan immünoassay platformlarından dokuzunun ölçme becerisini incelemişlerdir. Bulgular, bu 10 serum örneğinde PRL'nin saptanmasında kullanılan dokuz immünoassay sistemi

arasında 2.3-7.8 kat arasında değişen büyük farklılıklar olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu 10 serumda GFC ile ölçülen monomerik PRL düzeyleri ile immünoassay ile ölçülen PRL düzeylerinin karşılaştırılması, tüm otomatik immünoassay sistemlerinin makropr 43 i bir dereceye kadar ölçtüğünü ortaya çıkarmıştır. Her ne kadar bu 10 serumda ölçülen mutlak PRL düzeyleri değişkenlik gösterse de, tutarlı bir tabakalaşma söz konusuydu ve böylece elde edilen bulgulardaki hiyerarşi her bir ölçümde tekrarlanmıştır.Yine UK NEQAS tarafından yapılan bir çalışmada makroprolaktinemili bir hastadan elde edilen prolaktin sonuçları kullanılan immün ölçüme bağlı olarak 476-3212 mU/L arasında değişim göstermiştir (88).Bir başka çalışmada denenen 5 analizörde, makroprolaktin içeren ve içermeyen numunelerde sonuçlar çarpıcı şekilde farklı bulunmuştur (42).

İmmünoassayler arasındaki farklılıklar yanında çalışılan örneğin alınış zamanı ve kişinin mental durumunda göz önünde bulundurulması gerektiği unutulmamalıdır. 70 hiperprolaktinemili kadından dinlenme esnasında rastgele alınan kan örneklerinden PRL ölçümü yapıldığında yaklaşık % 30'unun stres ilişkili hiperprolaktinemi olduğu ortaya konmuştur. Özellikle sınırda olgularda,serum PRL düzeyi minimal travma ile ve aralıklı olarak alınan en az üç kan örneğinin ortalaması şeklinde ölçülmelidir (2). Ancak bu durum klinik pratikte uygulaması zor olduğu ve fazla iş gücü gerektirdiği için pek kullanılmamaktadır.

Biz ise hiperprolaktinemi tanımızı koyarken bu uygulamayı yapamasak da yine sık kullanılan en az iki ayrı ölçümde prolaktinin normal değerinin üzerinde olması gerekliliği protokolünü uyguladık (23).

Hem klinik hem de biyokimyasal perspektife göre, birinci aşamada gerçek hiperprolaktinemisi olan hastaların doğru şekilde saptanması ve böylece gereksiz tetkik ve tedaviden kaçınılması için aşırı dikkat edilmesi gerekir. Bugünlerde, hiperprolaktinematik serum incelemesi, yalnızca, makroprolaktinin ayrıştırılmasından sonra serumun PRL açısından yeniden analiz edilmesi anlamına gelmektedir. Makroprolaktinin ölçülmesi ya da incelenmesi ilk aşamada hiperprolaktinemi bulunduğu zaman gereklidir (89). Makroprolaktinle güçlü tepkime veren immunoasayleri kullanarak, makroprolaktin araştırılan her 100 hiperprolaktinematik örnekten yaklaşık 25'i (% 25) pozitif olacaktır. Düşük tepkime veren sistemler kullanıldığında, yüksek tepkime veren assay sistemleriyle saptanan 100 orijinal hiperprolaktinematik örneğin 80'i hiperprolaktinematik olarak

bulunacaktır. Bu 80 örnekten de genellikle 5'den daha azı (% 6.25) makroprolaktin açısından pozitif bulunacaktır (29).

Bizim laboratuvarımızda kullandığımız sistem, makroprolaktin ile yüksek etkileşim gösteren sistemdir. Çalışmamızda hiperprolaktinmikler arasında makroprol 44 yakalama oranı % 13,5 olarak bulundu. Yüksek etkileşim gösteren sistemlerle yapılan çalışmalara göre bizim yüzdemizin düşük görülmesinin nedeni endokrinoloji polikliniğinden makroprolaktinemi taraması istenen hastaların idiyopatik hiperprolaktinemili olmaması şeklinde yorumlanabilir.

Birçok farklı metotla yapılan çalışmada PEG ile çöktürme öncesi ve sonrası PRL ölçümünün analitik performansı değerlendirilmiş ve %CV olarak ifade edilmiştir.

Smith ve arkadaşları kullandıkları floreoimmünoassay sisteminin interassay % CV değerini total PRL ortalama değeri 297 mU/L serumda % 5.3, PEG çöktürme sonrası PRL konsantrasyonu 1229mU/L'den 139 mU/L'ye inen serumda % 4.9 bulmuşlardır(61). Başka bir çalışmada kemiluminesans ölçüm yapan yöntemin intraassay CV değerlerini kontrol serumlarında(iki seviye) sırasıyla % 1.3 ve 3.6 olarak bulunmuştur (82).

Biz çalışmamızda makroprolaktin içermeyen total prolaktin ortalaması 112.9 ng/mL olan serumda, ölçümler arası varyasyon katsayısını % 2.9,günlerarası % 6.4 bulduk.Makroprolaktin pozitif total PRL ortalaması 61ng/mL olan örnekte, günler arası CV değeri % 8.5 olarak elde edildi. Makroprolaktinmik serumdaki bu artışı makroprolaktinin immünoreaktivitesine bağladık. Yine kontrol numunelerinde çalışma içi CV kontrol 1'de %1,kontrol 2'de % 1.3;günler arası serum 1'de % 3.4, serum 2'de % 2.5 bulduk. Bu sonuçlar literatürlede oldukça uyumlu idi.

Çeşitli toplumlarda hiperprolaktinemi ve makroprolaktinemi prevalansını saptamaya yönelik araştırmalar yapılmıştır. Sağlıklı 10550 (8450 erkek, 2100 kadın) erişkinin 40'ında (% 0.04) hiperprolaktinemi bulunmuş ve bu 40 hiperprolaktinemili kişinin 10'unda makroprolaktinemi saptanmıştır (90). Sağlıklı 660 (280 erkek, 380 kadın) erişkini içeren Norveç'te yapılan bir çalışmada sadece 1 kadında makroprolaktinemi tespit edilmiş, makroprolaktineminin sağlıklı kadın popülasyonundaki prevalansı % 0.02 olarak bildirilmiştir (46). Çalışmalarda makroprolaktinemi prevalansı, gebelerde % 2.7 olarak bulunurken, prolaktinin yükselmesine sebep olan ilaç kullananlarda % 4.8 ve prolaktinomali hastalarda % 2.7 olarak bulunmuştur (83). Hiperprolaktinemili hastalar arasındaki

makroprolaktinemi prevalansı prolaktini ölçmede kullanılan yöntem ve çalışılan hasta grubuna bağlı olarak değişmektedir. Fahie-Wilson ve arkadaşları tarafından 955 hastadan oluşan bir popülasyonda 71 hastada serum prolaktini yüksek bulunmuş. 69 hastada hiperprolaktinemi' ye makroprolaktin' in katkısı olup olmadığı araştırıldığında 14 hastada (%20) makroprolaktin saptanmıştır (71). Bu hasta popülasyonu 45 makroprolaktine bağlı olarak gelişen hiperprolaktinemi prevalansı %1,5'tur. Yapılan çeşitli çalışmalarda hiperprolaktinemi olgularında makroprolaktinemi insidansı kesin olmamakla beraber %18-42 arasında değiştiği gözlenmiştir (40,71). Bjoro ve arkadaşları 605 hiperprolaktinematik hastanın 157'sinde (%26) artmış makroprolaktin seviyesi saptamışlar (46). Leslie ve arkadaşları 1225 hiperprolaktinematik serum örneğini incelediklerinde hastaların 332 'sinde (%26) makroprolaktin düzeylerini yüksek olarak bulmuşlardır (40). Valette-Kasic ve arkadaşları 1106 hiperprolaktinematik hastanın %10 oranında makroprolaktinemi tespit etmişlerdir. Bu 106 hastanın %61'inde normal menstrüasyon ve %54'ünde galaktore gözlemlenildi (85). Donadio ve arkadaşları da 135 hiperprolaktinematik hastanın %42'sinde makroprolaktin pozitifliği saptamışlardır (91,92).

Bugüne kadar hiperprolaktinemideki en düşük makroprolaktinemi prevalansı Sanches-Eixeres ve arkadaşları tarafından % 9 olarak bildirilmiş olup, en yüksek makroprolaktinemi prevalansı ise Hauache ve arkadaşları tarafından % 46 ve İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi tarafından % 48 olarak bildirilmiştir (35). Referans laboratuvarlarına gelen hiperprolaktinemili hastalarda makroprolaktinemi insidansı %18-42 arasında bulunmaktadır. Bunun nedeni referans laboratuvarına gelen numunelerin beklenmedik biçimde yüksek prolaktin içeren numuneler olmasıdır. Buna karşın endokrinoloji kliniğine gelen hastalarda makroprolaktinemi insidansı %10'a yakın bulunmuştur (15).

Biz çalışmamızda PEG çöktürme yöntemini kullanarak taradığımız 43 hiperprolaktinematik hastanın 6'sında (%13,5) makroprolaktin tespit ettik. Bu değer literatür ile uyumlu idi.

Sonuç olarak makroprolaktin, hiperprolaktineminin ayırıcı tanısı için kullanılan klinik algoritmalarındaki yerini almıştır. Klinisyen ve laboratuvar uzmanının iletişim içinde olup, kullanılan immünoassay ile makroprolaktin etkileşimi hakkında bilgi paylaşımında bulunmaları gerekmektedir. PRL kiti ve cihazı üreten firmaların da bu durumdan haberdar olup kit ve cihaz prospektüslerinde etkileşim derecelerini bildirme ve uygun tarama yöntemi konusunda kullanıcıları bilgilendirme zorunlulukları olmalıdır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçlar

- 1.Total PRL düzeyleri 16.23-181.3 ng/mL arasında olan 43 hiperprolaktinematik kişide makroprolaktinemi prevalansı % 13.5 bulundu.
- 2.Distile su ve fosfat tamponu kullanılarak hazırlanan farklı PEG çözeltileri arasında makroprolaktini tespit etme açısından bir fark bulunamadı.
- 3.Makroprolaktin pozitifliği bulduğumuz hastaların total PRL değerleri 100 ng/mL 'nin altındaydı.

Öneriler

- 1.Her laboratuvarın makroprolaktinemi tespit etmek için bir stratejisi olmalıdır.
- 2.Laboratuvarlar prolaktin ölçüm yöntemlerinin makroprolaktinlerle etkileşme derecelerini bilmeli ve klinisyenleri bundan haberdar etmelidirler.
- 3.Prolaktin kiti üreten firmalar ürün prospektüslerinde makroprolaktin ile ölçüm yöntemlerinin ne derece etkileştiğini belirtmeli ve makroprolaktin varlığını tespit edecek onaylanmış bir yöntemle sahip olmalıdırlar.
- 4.PEG çöktürme sonrası monomerik prolaktin miktarı gerçek prolaktin konsantrasyonundan düşük bulunabilir.Bu nedenle klinisyen laboratuvarında kullanılan yöntemin özellikleri açısından bilgilendirilmelidir.
5. MPRL'nin Sosyal Güvenlik Kurumunun yayınladığı SUT (Sağlık Uygulama Tebliği) kitapçığında yer alması sağlanmalıdır.

6. Yaptığımız çalışmada 200 ng/mL 'nin altındaki hiperprolaktinemili hastalarda makroprolaktinemi prevalansını % 13,5 bulmamızdan dolayı, klinisyenlerin bu açıdan uyarılmalarının doğru olacağı kanaatindeyiz.

7.ÖZET

Bu çalışma ile endokrinoloji polikliniğine başvuran idiopatik hiperprolaktinemili hastaların serumunda, makroprolaktin ölçümünün PEG çöktürme yöntemini kullanarak değerlendirilmesi amaçlandı.

Çalışmaya 38 kadın 5 erkek toplam 43 hasta dahil edildi. PRL miktarı ECLIA yöntemi ile ölçüldü. % 25'lik PEG 6000, distile su ve fosfat tamponu olmak üzere iki farklı şekilde hazırlandı. PEG ile çöktürme sonrası süpernatanda PRL ölçümü yapıldı. Geri kazanım oranı % 40'ın altında olanlar makroprolaktinemi olarak değerlendirildi. 43 hastanın 6'sında makroprolaktin pozitif bulundu. Makroprolaktini pozitif bulunan hastaların total PRL değerleri 100 ng/ml nin altındaydı. İki farklı PEG çözelti ile çöktürme işlemi sonrası ölçülen monomerik PRL seviyeleri arasında güçlü pozitif korelasyon görüldü. PRL ölçümünün doğruluğunu ortaya koymak için kontrol numunelerinde yaptığımız çalışma içi CV kontrol 1'de % 1, kontrol 2'de % 1.3; günler arası serum 1'de % 3.4, serum 2'de % 2.5 bulundu.

Hiperprolaktinemili hastalarda makroprolaktinemi varlığı akla getirilmesi gereken önemli bir sebeptir. Fosfat veya su ile hazırlanabilen PEG çöktürme yönteminin her ikisinde kullanılabilmesi ve her laboratuvarın makroprolaktinemi tespit etmek için bir stratejisinin olması gerektiği kanaatine varıldı.

8. SUMMARY

The aim of this study is to evaluate the idiopathic hyperprolactinaemic patients serum, who applied to endocrinology polyclinic and to measure the macroprolactin with PEG precipitation method in this patients.

The study include 38 women and 5 men at total 43 patients. PRL level measured with ECLIA method. The PEG 6000 at % 25 was used with two different materials as distile water and phosphate buffer. After precipitation with PEG the PRL is measured in the supernatant. The recovery below the % 40 reffered as macroprolactinaemic. In 43 patient, the macroprolactin of the six patients were positive. The total PRL levels were below the 100 ng/ml in the macroprolactin positive patients. The strong positive corelation was found between the monomeric PRL levels which measured with two different PEG precipitation methods. To confirm the accuracy of the prl measurement in control samples intraassay CV's % were control 1; % 1 and control 2; % 1.3. Another hand at day to day control CV's were, control 1; % 3.4 and control 2; % 2.5.

In hyperprolactinaemic patients the macroprolactinaemia should be come to mind as an important reasen. In PEG precipitation method both the phosphate and distile water can be used and each labrotary should own strategy to determine the macroprolactin.

9.KAYNAKLAR

1. Demers, D.M., Vance, M.L.: Pituitary fonction. In:Burtis C.A., Ashwood E.R., Bruns D.E., ed. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th ed.Missouri,elsevier saunders, 1967-96, 2006.
2. Chahal, J., Schlechte, J.: Hyperprolactinemia. Pituitary,11:141-146,2008
3. Fahie-Wilson M.: The macroprolactinemia problem and its solution.Southern Medical Association,38:1206,2006.
4. Koukoulis, G.N.:Macroprolactinemia:an unnoticiable factor. Hormones, 2(2):91-92,2003.
- 5.Gezer, A., Atasü, T., Hekim, C., Stenman, U.H.,Hekim, N.: Hyperprolactinaemia does not always mean 'hyperprolactinaemia'!.European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology, 118:206-208, 2005.
- 6.McCenna, T.J.: Should macroprolactin be measured in all hyperprolactinaemic sera?.Clinical Endocrinology, 71: 466-469,2009.
- 7.Espinoza, J.R., Landa, A.T.,Garcia, V.B.,Gonzalez,I.R.,Alonso,A.B.,Sanchez, G.R.:Assesment of macroprolactin after polyethylene glycol precipitation in two commercial immünossays.Bioquimia,31:140-145,2006.
- 8.Peak Mann Mah, B.M., Jonathan Webster, M.A.: Hyperprolactinemia: Etyology,Diagnosis and Management. Seminars in Reproductive Medicine, 20(4): 365-374, 2002.
- 9.Melmed, S., Polonsky, K.S.: Phsiology and disorders of pituitary hormone axes.In: Larsen P.R, Kronenberg H.M.,ed.Williams Texbook of Endocrinology,Elsevier Saunders, Philadelphia, 180-192,2008.

10. Balçık, O.: Hiperprolaktinemide kabergolinin düşük doz ve kısa dönem idame tedavisinin etkinliğinin araştırılması, Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2007.
11. Bole-Feysot, C., Goffin, V., Ederly, M., Binart, N., Kelly, P.A.: Prolactin and Its Receptor: Actions, Signal Transduction Pathways and Phenotypes Observed in PRL Receptor Knockout Mice. *Endocr Rev*, 19(3): 225-268, 1998.
12. Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A., Nagy, G.: Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *American Physiological Society*, 80 (4):1523-1631, 2000.
13. Katznelson L, Klibanski A. Principles and practice of endocrinology and metabolism. In: Becker K.L., ed. Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia, p:145-153, 2001.
14. Serri, O., Chik, C.L., Ur E., Ezzat, S.: Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *Canadian Medical Association Journal*, 169(6):575-581, 2003.
15. Sadideen, H., Swaminathan, R.: Macroprolactin: what is it and what is its importance?. *Journal of Clinical Practice*, 60(4):457-461, 2006.
16. Gala RR. Prolactin and growth hormone in the regulation of the immun system. *Proc Soc Exp Biol Med*, 198:513-527, 1991.
17. Weinhaus AJ, Stout LE, Sorenson RL. Glucokinase, hexokinase, glucosetransporter 2, and glucose metabolism in islets during pregnancy and prolactin treated islets in vitro: Mechanisms for long term up-regulation of islets. *Endocrinology*, 137: 1640-1649(64), 1996.
18. Galoius, S., Kertesz G., Somma, C., Coculescu M., Brue T.: Clinical expression of big big prolactin of macroprolactinemia upon immunodiagnostic tests. *Acta Endocrinologica*, 1(1):30-40, 2005.
19. Chikanza, I.C.: Prolactin and neuroimmunomodulation: in vitro and in vivo observations. *Ann N, Y Acad Sci*, 876:119-130, 1999.
20. Vera-Lastra, O., Jara, L.J., Espinoza, L.R.: Prolactin and autoimmunity. *Autoimmun*, 1:360-364, 2002.

21. Brennan, P., Hajeer, A., Ong K.R., Worthington, J., John, S., Thomson, W., Silman, A., Ollier, B.: Allelic markers close to prolactin are associated with HLA-DRB1 susceptibility alleles among women with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 40:1383-1386,1997.
22. Stevans, A, Ray, D., Alansari, A., Hajeer, A. Thomson, W., Donn, R., Ollier, W.E., Worthington, J., Davis, J.R.: Characterization of a prolactin gene polymorphism and its associations with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 44:2358-2366,2001.
23. Somurkıran, A., İş, M., Yücel, O.: Hiperprolaktinemi; Tanı ve Tedavideki Güncel Yaklaşımlar. *Türkiye Klinikleri Journal of Gynecologyc Obstetry* ,16:137-146, 2006.
24. Gündüz, T., Şimşek, M., Akar, M., Taşkın, Ö.: Hiperprolaktinematik infertil hastalarda makroprolaktinemi prevalansı. *Türkiye Klinikleri Journal of Gynecologyc Obstetry* ,17:159-162,2007.
25. TEMD Hipofiz Çalışma Grubu: Hipofiz hastalıkları tanı, tedavi ve izlem kılavuzu, Ankara, 2009.
26. Ciccarelli, A., Daly A.F., Beckers, A.: The epidemiology of prolactinomas. *Pituitary*. 8(1):3-6,2005.
27. Luciano AA.: Clinical presentation of hyperprolactinemia. *Journal of Reproductive Medicine*, 44:1085–1090,1999.
28. Strachan MWJ, Teoh WL, Don-Wauchope AC, et al. Clinical and radiological features of patients with hyperprolactinemia. *Clinical Endocrinology*, 59:339-346,2003.
29. Gibney, J., Smith, T.P., McKenna, J.: Clinical relevance of macroprolactin. *Clinical Endocrinology*, 62:633-643,2005.
30. Göksu, U.A.: Cabergolin kullanan hiperprolaktinematik hastalarımızın tedaviye cevaplarının retrospektif olarak incelenmesi. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı*, Samsun, 2009.

- 31.Yönem, A., Kutlu, M.: Hiperprolaktinemi: Tanı ve Tedavisi.Türkiye Klinik Tıp Bilimleri, 19:63-72, 1999.
- 32.Yücel, N., Eren, N., Serin, E.: Klinik bulgularla uyumsuz prolaktin düzeyleri ve makroprolaktin.Türk Nöroşirürji Dergisi,17(1):33-39,2007.
- 33.Jackson, R.D., Wortsman, J. Malarkey, W.: Characterization of a large molecularweight prolactin in women with idiopathic hyperprolactinemia and normalmenses. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 61:258-264, 1985.
- 34.Schiettecatte, J.,Opdenbosch, A.V.:Anckaert E.,Schepper PK.,Velkeniers B.:Immunoprecipitation for rapid detection of macroprolactin in the form of prolactin-immunglobulin coplexes.Clinical Chemistry;51:1746-1749,2005.
- 35.Tamer, G., Alagöl, F.: Makroprolaktinemi.Endokrinolojide Diyalog, 2:96-101,2007.
- 36.Fahie-Wilson, M.N.:The macroprolactin problem:past,present and future.Ligand Assay,11(2):96-97,2006.
37. Prazeres, S., Santos, A.M., Ferreira, H.G., Sobrinho, L.G.: A practical method for thedetection of macroprolactinaemia using ultrafiltration. Clinical Endocrinology, 58:686-690,2003.
- 38.Fahie-Wilson, M.N., John R., Ellis A.R.: Macroprolactin; high molecular mass forms of circulating prolactin. Annals of Clinical Biochemistry, 42:175-192,2005.
- 39.Hattori, N.,Inagaki, C.:Anti-prolactin(PRL) autoantibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia :bioassay and clearence studies of PRL-Immunglobulin G complex.Clinical Endocrinology and Metablism. 82(9):3107-3110, 1997.
- 40.Leslie, H., Courtney, C.: Bell P.M. Hadden, D.R., Mccanne, D.R, Ellis, P.K., SheridanB, Atkinson, A.B.: Labaratory and clinical experience in 55 patients withmacroprolactinemia identified by a simple polyethylene glycol precipitationmethod. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 86:2743-2746,2001.

- 41.Theunissen, C. Scheepper, J., Schiettecatte, J. Verdood, P., Hooghe-Peters E.L.,Velkeniers, B.: Macroprolactinemia: clinical significance and characterization (53 condition. *Acta Clinica Belgica*, 60:190-197,2005.
- 42.Ellis M.J., Livesey, J.H., Soule, S.G.:Macroprolactin, big-prolactin and potential effects on the misdiagnosis of hyperprolactinemia using the Beckman Coulter Access prolactin assay.*Clinical Chemistry*,39:1028-34,2006.
- 43.McCudden, C.R., Sharpless, J.L., Grenache, D.G.: Comparison of multiple methods for identification of hyperprolactinemia in the presence of macroprolactin. *Clinica Chimica Acta*, 411:155-160,2010.
- 44.Leite, V., Cosby, H., Sobrinho, L.G., Fresnoza, M.A., Santos, M.A., Friesen, H.G.:Characterization of big big prolactin in patients with hyperprolactinaemia. *ClinicalEndocrinology*, 37: 365-372,2003.
- 45.Fideleff, H.L., Ruibal, G., Boquete, H., Pujol, A., Sequera, A., Sobrado, P.:Macroprolactinemia in childhood and adolescence: A cause of asymptomatic hyperprolactinemia. *Hormon Research*, 53:16-19, 2000.
- 46.Bjoro, T., Morkrid, L., Wergeland, R., Turtur, A., Kvistborg, A., Sand, T., Torjesen, P.: Frequency of hyperprolactinaemia due to large molecular weight prolactin (150–170 kD PRL). *ScandinavianJournal of Clinical Laboratory Investigation*, 55:139–147,1995.
- 47.Favela, F.B., Chavez-Rueda, K.,Miranda, A.L.:Analysis of anti-prolactin autoantibodies in systemic lupuserythematosus.*Lupus*,10:757-761,2001.
- 48.Vaishya, R,Gupta, R,2; Arora, S.:Macroprolactin; A Frequent Cause of Misdiagnosed Hyperprolactinemia in Clinical Practice.*Journal of Reproducty and Infertility*,11(3):161-67,2010.
- 49.Hauche, O. M.,Maia, A.C.M.,Maciel, R.M.,Veiera, J.G.H.:Screening for macroprolactinemiae and pituitary imaging studies.*Clinical Endocrinology*,57:327-31,2002.
50. Mounier, C., Trouillas, J., Claustrat, B. Duthel, R., Estour, B.: Macroprolactinaemiaassociated with prolactin adenoma. *Human Reproduction*, 18:853-857,2003.

51. Olukago, A.O., Kane J.W.: Macroprolactinemia: Validation and application of the polyethylene glycol precipitation test and clinical characterisation of 54 condition. *Clinical Endocrinology*, 51:119-126-126, 1999.
52. Olukaga, A.O.: Macroprolactinemia is clinically important. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 87(10): 4833-4834, 2002.
53. Hattori N.; The frequency of macroprolactinemia in pregnant women and the heterogeneity of its etiologies. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81:586–590, 1996.
54. Hattori, N., Nakayama, Y., Kitagawa, K., Ishihara, T., Saiki Y., Inagaki C.: Anti-prolactin (PRL) autoantibodies suppress PRL bioactivity in patients with macroprolactinaemia. *Clinical Endocrinology*, 68:72-76, 2008.
55. Sztéfko, K.: Diagnosis of hormonal disorders based on immunochemical methods—current problems. *Journal of Chinese Clinical Medicine*, 3(9):497-506, 2008.
56. Smith, T.P. Kavanagh, L., Healy, M.L.: Technology insight: measuring PRL in clinical samples. *Nature Clinical Practice Endocrinology and Metabolism*, 3(3):279–89, 2007.
57. Fleseriu, M., Lee, M., Pineyro, M.M., Shugor, M., Reddy, S.K., Siraj, E., Hamrahian AH.: Giant invasive pituitary prolactinoma with falsely low serum prolactin: the significance of ‘hook effect’. *Journal of Neuro-Oncology* 79:41-43, 2006.
58. Smith, C.R., Norman M.R.: Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. *Annals of Clinical Biochemistry*, 27:542-550, 1990.
59. Schneider, W., Marcovitz, S., Al-Shammari, S., Yago, S., Chevalier.: Reactivity of macroprolactin in common automated immunoassays. *Clinical Biochemistry*, 34:469-473, 2001.
60. Ellis, M.J., Reed, M.R., Livesey, J.H.: Cross-reactivities of macroprolactin and big-prolactin in three commercial immunoassays for prolactin: A chromatographic analysis. *Clinical Biochemistry*, 10:1285-90, 2007.

61. Smith, T.P., Suliman, A.M., Fahie-Wilson MN.:Gross variability in the detection of prolactin in sera containing big big prolactin (macroprolactin) by commercial immünassays.Clinical Endocrinology, 87(12):5410-5415, 2002.

55

62. Schepper, J.D.,Schiettecatte, J.,Velkeniers, B.,Blumenfeld, Z.,Shteinberg, M.,Devroey, P.,Anckaert, E.,Smitz E.:Clinical and biological charecterization of macroprolactinemia with and without prolactin-IgG complexes.European Journal of Endocrinology, 149:201-207, 2003.

63.Gilson G., Schmidt P., Thix J., Hoffman J.P., Humbel R.L.: Prolactin results for samples containing macroprolactin are method and sample dependent. Clinical Chemistry, 47(2): 331-3, 2001.

64. Kavanagh, L., Mckenna, T.J., Fahie-Wilson M.N., Gibney, J.,Smith TP.:Specificity and clinical utility of methods forth detection of macroprolactin.Clinical Chemistry, 52(7):1366-72,2006.

65. Burtis, C.A., Ashwood, E.R.: Klinik Kimyada Temel İlkeler(çev.D Aslan).Palme Yayıncılık,No.306,s.137,2005.

66. Catteneo, F., Kappeler D.,Müller, B.:Macroprolactinaemia, the major unknown in the differential diagnosis of hyperprolactinaemia.Swiss Medicine Weekly,131:122-126,2001.

67. <http://biyokure.org/protein-cokturme-yontemleri/152>,13.01.2011.

68. Aygan, A.:haloalkalofil bacillus sp. izolasyonu, amilaz, selülazve ksilanaz enzimlerinin üretimi, karakterizasyonu ve biyoteknolojik uygulamalarda kullanılabilirliği. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,doktora tezi,Adana,2008.

69.Burtis, C.A.,Ashwood, E.R.:Klinik Kimyada Temel İlkeler(çev.D Aslan).Palme Yayıncılık, No.306, s.181,2005.

70. Ellis, G.:Degradation of crystalline polyethylene glycol 6000 and its effect on assays for macroprolactin and other analytes.Clinical Biochemistry, 39:1035-1040, 2006.

71. Fahie-Wilson M., Soule, S., Macroprolactinaemia: Contribution to hyperprolactinaemia in a district general hospital and evaluation of a screening test based on precipitation with polyethylene glycol. *Annals of Clinical Biochemistry*, 34:252-258, 1997.

72. Fahie-Wilson, M.: In hyperprolactinemia, testing for macroprolactin is essential. *Clinical Chemistry*; 49:1434-1436, 2003. 56

73. John, R., McDowell, I.F.W, Scanlon, M.F., Ellis, A.R.: Macroprolactin Reactivities in Prolactin Assays: An Issue for Clinical Laboratories and Equipment Manufacturers. *Clinical Chemistry*, 46(6), 2000.

74. Germano, L., Mormile A., Filtri, L., Cocciardi, E., Di Grazia, M., Marranca, D., Limone, P., Migliardi, M.: Evaluation of polyethylene glycol precipitation as screening test for macroprolactinemia using Architect immunoanalyser. *Ligand Assay*, 11(2), 2006.

75. Fahie-Wilson, M., Brunsden, P., Surrey J., Everit A.: Macroprolactin and the Roche Elecsys Prolactin Assay: Characteristics of the reaction and detection by precipitation with Polyethylene Glycol. *Clinical Chemistry*, 46(12):1993-95, 2000.

76. Sapin, R., Gasser, F., Grucker, D.: Free prolactin determinations in hyperprolactinemic men with suspicion of macroprolactinemia. *Clinica Chimica Acta*, 316:33-41, 2002.

77. Fahie-Wilson M.N., Detection of macroprolactin causing hyperprolactinemia in commercial assays for prolactin. *Clinical Chemistry*, 46(12):2022-23, 2000.

78. Leite, V., Cosby, H., Sobrinho, L.G., Fresnoza, M.A., Santos M.A, Friesen, H.G.: Characterization of big big prolactin in patients with hyperprolactinaemia. *Clinical Endocrinology*; 37: 365-372, 2003.

79. Sapin, R., Kertesz G.: Macroprolactin Detection by Precipitation with Protein A-Sepharose: A Rapid Screening Method Compared with Polyethylene Glycol Precipitation. *Clinical Chemistry*, 49(3), 2003.

80. Landberg, E., Wahlberg, J., Rydén, I., Arvidsson, B.M., Ekman, B.: Detection of molecular variants of prolactin in human serum, evaluation of a method based on ultrafiltration. *Clinica Chimica Acta*, 376:220-225, 2007.

81. Suliman, A.M,Smith T.P.,Gibney, J,Mckenna T.J.:Frequent misdiagnosis and mismanagement of hyperprolactinemic patients before th introduction of macroprolactin screening:application of a new strict laboratory definition of macroprolactinemia.Clinical Chemistry,49(9):1504-509,2003.

82.Fahie-Wilson, M.,Bieglmayer, C.,Kratzsch, J.,Nusbaumer, C.,Roth, H.J.,et al.Roche Elecsys Prolactin II assay:reactivity with macroprolactin compared with eight commercial assays for prolactin and determination of monomeric prolactin by precipitation with polyethylene glycol.Clinical Laboratory,53:301-307,2007. 57

83.Hattori, N.: Macroprolactinemia: a new cause of hyperprolactinemia.Journal of Pharmacological Science, 92:171 – 177, 2003.

84. Martin, N.:Prolactin disorders.Medicine,37(8):411-413,2009.

85.Vallette-Kasic S., Morange-Ramos I., Selim A, et al. Macroprolactinemia revisited:a study on 106 patients. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 87:581–588,2002.

86.Gilberto, J., Vieira, H., Tachibana T.T.,Obara, L.H., Maciel, R.M.B.:Extensive experience and validation of polyethylene glycol precipitation as a screening method formacroprolactinemia.Clinical Chemistry,44(8):1758-59,1998.

87.Roche Diagnostics GmbH,Prolactin II insructions,03203093 190,Germany.

88.Seth, J., Sturgeon, C.M., Ellis, A.R., Al-Sadie, R., Logan, M.: UK NEQAS for peptid,hormones and related substances. Annuals Review, A1-A4, 1998.

89.Bağdatoğlu C.,Bağdatoğlu Ö.T.,Muslu, N.,Köseoğlu, A.,Dağtekin, A.,Polat G.,Dolgun, H.,Karataş, M.A.:The Importance ofMacroprolactinemia in theDifferential Diagnosis ofHyperprolactinemic Patients. Turkish Neurosurgery,18(3):203-27, 2008.

90.Ichihara, K., Miyai, K. : Detection of asymptomatic prolactinoma by a mass screening program.Japanese Journal of Clinical Pathology, 38, 667–674, 1990.

91.Donadio, F., Barbieri, A., Angioni, R., Mantovani, G., Beck-Peccoz, P., Spada, A., Lania,A.G.: Patients with macroprolactinaemia: clinical and radiological features.European Journal of Clinical Investigation. 37(7):552-557, 2007.

92.Bekfailaviođlu, G.:Ötiroid hashimoto tiroiditli hastalarda makroprolaktin sıklığının değerlendirilmesi.Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakóltesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı,Uzmanlık Tezi,Samsun,2003.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşegül TURAN, 1980 yılında Trabzon-Beşikdüzü'nde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon'da tamamladıktan sonra 1998 yılında Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde öğrenime başladı ve 2004 yılında mezun oldu.2006 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda başladığı uzmanlık eğitimini bu bitirme tezi ile sonuçlandırdı.