Rassegna

Impatto clinico e laboratoristico delle isoforme macromolecolari della prolattina

A.Marcolla[a], C.Dilberis[b], F. Dal Bosco[c], P. Amadori[d]

[a] *Unità di Patologia Clinica, Ospedale di Cles, A.P.S.S., Trento;* [b]*Laboratorio di Analisi Cliniche, Ospedale S.Camillo, Trento*
[c] *Laboratorio di Immunometria, A.P.S.S., Pergine, Trento;* [d]*Servizio ambulatoriale di Endocrinologia, A.P.S.S., Trento*

Riassunto

Le isoforme macromolecolari della prolattina (PRL) vengono classificate come BigPRL e BigBigPRL (macroprolattina) sulla base del peso molecolare. Possono essere presenti nel siero umano, sia normo che iperprolattinemico e vengono dosate dai comuni metodi immunometrici per la PRL, determinando problemi nell'interpretazione dei risultati.

Gli obbiettivi della presente rassegna sono: a) una valutazione esaustiva e aggiornata della letteratura sulle isoforme macromolecolari della PRL e della loro interferenza sui metodi immunometrici di dosaggio della PRL; b) delineare delle indicazioni ottimali per gestire i sieri con iperprolattinemia potenzialmente imputabile a macroprolattinemia.

L'iperprolattinemia dovuta a eccesso di isoforme macromolecolari della PRL presenta una frequenza di circa 20% fra tutti i dosaggi di prolattinemia eseguiti dai laboratori di chimica clinica, anche se tale percentuale può variare in relazione al metodo impiegato.

La cromatografia su gel è il metodo più sensibile e specifico per individuare la macroprolattina, è in grado di dosare anche la BigPRL, ma è costoso e lento e quindi raramente impiegato. La precipitazione con PEG, il metodo più diffuso per individuare la BigBigPRL, non consente il riconoscimento della BigPRL. I laboratori dovrebbero cercare sistematicamente la macroprolattina nei sieri iperprolattinemici. In alternativa dovrebbero segnalare, attraverso il referto, la possibile presenza di macroprolattina, e garantire la possibilità di controllarla.

La distinzione fra BigBigPRL con e senza autoanticorpi anti PRL è possibile attraverso vari metodi non standardizzati, che riconoscono la componente immunologica della molecola. Al momento non è dimostrata una sicura utilità clinica in tale distinzione, anche sé è possibile che in futuro emergano delle indicazioni in questo senso.

Summary

Clinical and laboratory importance of prolactin macromolecular isoforms.

Macromolecular isoforms of prolactin (PRL) are classified as BigPRL and BigBigPRL (macroprolactin) on the basis of their molecular weight. They can be present in both normoprolactinemic and hyperprolactinemic human serum, and are detected by current immunometric PRL assays, causing problems in result interpretation.

The aims of this review were: a) to perform a thorough, up-to-dated evaluation of the literature on the PRL macromolecular isoforms and on the ability of immunometric PRL assays to recognise BigPRL and BigBigPRL isoforms; b) to define the optimal management of macroprolactinemic samples.

The results of this survey, show that hyperprolactinemia due to excess of PRL macromolecular isoforms is as common as about 20% among blood samples assayed for PRL in general clinical laboratories, although the rate may vary according to the method. Gel chromatography is the most sensitive and specific technique for detecting macroprolactin, also able of assaying BigPRL, but it is expensive and time consuming and therefore seldom used. PEG precipitation, the most employed method to discover BigBigPRL, does not enable the recognition of BigPRL. Labs should routinely perform macroprolactin detection in hyperprolactinemic samples. Otherwise, information about the possible presence of macroprolactin should be added to the report, and the opportunity to check for macroprolactinemia should be offered. Distinction between BigBigPRL with and without anti-PRL antibodies is possible by means of several, non standardised methods, recognising the immunologic component of the molecule. However, at present, there is no certain clinical usefulness in distinguishing between BigBigPRL with or without anti-PRL antibodies, although future perspectives are reasonably imaginable.

Key words: macroprolactin, immunoassay, BigBigprolactin, PEG, immunocomplex.

Corrispondenza: Dott. Pierluigi Amadori Ambulatorio di Endocrinologia
Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari - Piazza Venezia 41- 38100 Trento (Italia)
E-mail: amadoripierluigi@libero.it

Introduzione

La prolattina (PRL) è un ormone polipeptidico secreto dalle cellule lattotrope dell'ipofisi anteriore e da altri stipiti cellulari extraipofisari, quali linfociti circolanti, decidua, epitelio mammario, e appartiene alla famiglia ormonale PRL, ormone dell'accrescimento (GH) e ormone lattogeno placentare (HPL)[1]. Nell'uomo la principale forma di PRL circolante (PRL monomerica – mPRL) è costituita da una catena singola di 199 aminoacidi di PM 23 kDa[1]. Sia nell'uomo che in altri mammiferi sono state individuate delle varianti della PRL, la maggioranza delle quali è rappresentata isoforme a alto PM, dovute a processi postranslazionali quali dimerizzazione, polimerizzazione e aggregazione ad altre proteine, con vari gradi di glicosilazione[1]. Esse sono state classificate, mediante filtrazione su gel, in BigPRL (PM = ~50 kDa) e BigBigPRL (PM $\geq$150 kDa)[2]. Il termine di "macroprolattinemia" viene generalmente impiegato come sinonimo di prevalente presenza di BigBigPRL in circolo[3,4] e così verrà utilizzato nel presente articolo.

La BigPRL sembra possa derivare da dimerizzazione della mPRL[1,5] o da legame della mPRL con altre componenti sieriche quali una PRL binding protein, a sua volta coincidente con la componente extracellulare del recettore della PRL, analogamente a quanto riportato per la proteina plasmatica legante il GH[5,6].

La natura della BigBigPRL appare eterogenea, ma fondamentalmente distinguibile in due principali sottogruppi: BigBigPRL costituita da un complesso mPRL-IgG anti PRL e BigBigPRL non contenente immunoglobuline.

La presenza di autoanticorpi anti PRL in soggetti con macroprolattinemia è stata descritta originariamente nel 1986[7] e confermata successivamente[8,9] e la natura di immunocomplesso di una parte della BigBigPRL è stata dimostrata ripetutamente[10-12].

La natura della BigBigPRL senza immunocomplessi è meno chiara. E' stato ipotizzato possa trattarsi di complessi eterogenei di mPRL, legate in modo covalente o non covalente, con possibili vari gradi di glicosilazione, la cui frammentazione può portare a singole molecole di mPRL e BigPRL[8,11].

Frequenza

L'iperprolattinemia dovuta a prevalente presenza di BigBigPRL sembra essere un fenomeno frequente, variando dal 10% al 26% di tutti i sieri iperprolattinemici[13-14]. La frequenza della BigPRL non è nota in quanto il suo riconoscimento richiede la cromatografia su gel, che viene applicata raramente (vedi dopo). La frequenza di BigBigPRL con autoanticorpi anti PRL nei soggetti macroprolattinemici non è nota e pochi studi hanno tentato di valutarla. Complessivamente vi è generale accordo sulla netta prevalenza della forma da immunocomplessi mPRL-IgG anti PRL, con frequenze comprese fra 96% e 72%[13,15] e un incidenza del 100% riportata in pazienti macroprolattinemici con lupus erythematosus sistemico (LES)[16].

Azioni biologiche delle isoforme macromolecolari della PRL

Un'azione biologica *in vivo* di BigPRL e di BigBigPRL non è stata dimostrata con certezza. La maggior parte dei pazienti con rilevante presenza di BigPRL e di BigBigPRL e normali valori di mPRL non presentano sintomi clinici di iperprolattinemia quali amenorrea, infertilità, galattorrea e, nel maschio, impotenza e non richiedono trattamento specifico[10,17-20], anche se alcuni studi non hanno escluso un certo impatto clinico della macroprolattinemia[21,22]. Non esistono studi caso-controllo né prospettici. Un solo studio, su 51 pazienti con macroprolattinemia, ha valutato la correlazione fra PRL totale, mPRL (che, però, era normale nella grande maggioranza dei pazienti) e BigBigPRL e manifestazioni cliniche (alterazioni mestruali, galattorrea, resistenza alla terapia con dopaminergici, alterazioni all'imaging ipofisario), senza trovare alcuna significatività[17]. Una normale azione biologica *in vitro* è stata invece dimostrata per la BigBigPRL mediante studi di induzione mitotica su cellule di linfoma Nb2, che esprimono recettori per la PRL[23-26]. Questa discrepanza sembra imputabile alle grandi dimensioni di Big e BigBigPRL che non consente un rapido passaggio attraverso le pareti dei capillari, riducendo la possibilità di interagire con i recettori tessutali per la PRL, aumentando l'emivita, e quindi la concentrazione plasmatica, della PRL[23,26] anche se non sono stati escluse anormalità sia dell'interazione fra le isoforme macromolecolari della PRL e il recettore per questo ormone, sia del segnale postrecettoriale[26].

Impatto analitico e metodiche di individuazioni delle isoforme macromolecolari della PRL

BigPRL e BigBigPRL si accumulano nel plasma e vengono riconosciute dalle comuni metodiche immunometriche di dosaggio, determinando elevati valori di PRL. Pertanto queste molecole non causano un aumento spurio della prolattinemia, in quanto il contenuto sierico di PRL è realmente aumentato[27]. La presenza di BigPRL e BigBigPRL rappresenta la principale causa di variabilità fra i dosaggi della PRL, data la marcata differenza di sensibilità di ogni singolo sistema immunometrico verso queste molecole[3,23,28,29] (Tabella I).

Tabella I. Ordinamento di 13 dosaggi immumetrici della PRL per sensibilità decrescente alla BigBigPRL.

Elecsys (Roche – Indianapolis IN, USA)
Auto Delfia (Wallach – Finlandia)
Immuno 1 (Bayer – Pittsburg PA, USA)
Imx (Abbott - Abbott Park IL, USA)
AxSYM (Abbott – Abbott Park IL, USA)
Abbott Architect (Abbott Park IL – USA)
J&J (Amerlite – UK)
Roche Enzymun (Roche – Indianapolis IN, USA)
Immulite (DPC - Los Angeles CA, USA)
Liaison (DiaSorin – Saluggia, Italia)
ACS:180 (Bayer – Pittsburg PA, USA)
Centaur (Bayer – Pittsburg PA, USA)
Access (Beckman - Brea CA, USA)

DPC Immulite e Beckman Access presentano una sensibilità rispettivamente pari a circa il 50% e il 25% di Roche Elecsys. L'ordine di sensibilità è stato ottenuto impiegando i dati dei riferimenti [3, 15,45].

Tutte le principali metodiche che lavorano con doppio anticorpo presentano una certa sensibilità alla BigBigPRL, restituendo valori di PRL comunque maggiori di quelli ottenuti con la cromatografia su gel, ma con grande differenza fra loro, mantenendo tuttavia la gerarchia di sensibilità con il variare della concentrazione della BigBigPRL[3]. Solo per Bayer Centaur e ACS 180 (che impiegano gli stessi anticorpi) è stata segnalata una maggiore variabilità, con possibile maggiore sensibilità per alcuni campioni macroprolattinemici rispetto ad altri[28,29].
Nel caso della BigBigPRL con Ab anti PRL tali differenze di sensibilità sembrano imputabili al fatto che l'autoanticorpo legato alla PRL possa mascherare i siti di legame degli anticorpi impiegati nel metodo di dosaggio e che tale interferenza sia tanto più marcata quanto maggiore è la corrispondenza fra questi epitopi[14,28,29]. Tuttavia un altro fattore importante è rappresentato dai tempi di incubazione previsti dai singoli dosaggi, con un rapporto proporzionale diretto fra questo parametro e la sensibilità alla BigBigPRL[30].
Questo fattore potrebbe almeno parzialmente spiegare perché i primi lavori pubblicati in proposito da Hattori[27] avevano evidenziato, per un dosaggio IRMA, la stessa sensibilità verso mPRL e BigBigPRL, dato poi smentito da molti lavori più recenti. Infatti il metodo utilizzato (Dynabot IRMA - Tokyo - Giappone) prevedeva 3 ore di incubazione, mentre gli attuali sistemi immunometrici automatizzati prevedono tempi di incubazione dell'ordine della decina di minuti.
La presenza di BigBigPRL nel plasma può essere svelata con varie tecniche, riportate di seguito. Solo una di esse, invece, è in grado di individuare la BigPRL.

Cromatografia su gel

L'identificazione della presenza di isoforme macromolecolari della PRL è stata realizzata originariamente con la cromatografia su gel[31]. Questa metodica è in grado di distinguere le varie isoforme della PRL e determinarne la quantità relativa e rappresenta il "gold standard"[16], ma è costosa e lenta[14]. A tutt'oggi appare l'unico metodo in grado di identificare con certezza la BigPRL.
La macroprolattinemia può essere individuata anche con metodiche più semplici, economiche e veloci della cromatografia su gel, ancorché qualitative o semi-quantitative.

Precipitazione con PEG

E' la più diffusa e sperimentata. Il PEG è stato impiegato in passato nei dosaggi RIA per separare l'analita legato all'anticorpo da quello libero. Per la ricerca della BigBigPRL viene utilizzato PEG 6000 diluito al 25%, che viene mescolato 1:1 con il siero del campione; la miscela viene quindi centrifugata. Il PEG diluito al 12,5% (come nella miscela finale) precipita le proteine seriche con PM>100 kDa[18]. La mPRL viene quindi dosata sul supernatante, libero da BigBigPRL, ma non da BigPRL, e la concentrazione moltiplicata per 2 per compensare l'iniziale diluizione 1:1 del siero con il PEG. Tempo di centrifugazione, velocità di rotazione e temperatura impiegati variano in letteratura (Tabella II). Il rinnovo del PEG ogni 3 mesi è raccomandato per evitare una progressiva riduzione del recupero di mPRL[32].
Il valore di mPRL così ottenuto è inferiore alla concentrazione reale della mPRL presente nel siero non trattato con PEG, in quanto esiste una precipitazione aspecifica della mPRL con le proteine del siero, la cui entità risulta intorno al 20%[18,29,32,33], con un massimo del 45% riportato in donne in gravidanza[34]. Per tale ragione, confermata da confronti fra Cromatografia su Gel e precipitazione con PEG (in metodiche esenti da interferenza da PEG) un recupero di mPRL dopo precipitazione con PEG <40% (mPRL nel supernatante/mPRL nel siero non trattato x 100) è indicativo di prevalente presenza di BigBigPRL; recuperi fra 40 e 50% di variabile presenza di BigBigPRL e >60% di prevalente presenza di mPRL. Pur non essendo una metodica quantitativa, la precipitazione con PEG ha mostrato generalmente una buona correlazione con la Gel cromatografia[3,13,21,29,30].
Una presenza preponderante di BigBigPRL non esclude a priori un eccesso di mPRL. Per questo, la determinazione della sola percentuale di recupero di mPRL viene considerata un parametro insufficiente dal punto di vista clinico[3,35,36]. Una soluzione per ovviare a questo problema è stata proposta da Suliman e al.[35], e prevede la determinazione di un intervallo di riferimento della PRL dopo precipitazione con PEG, realizzato trattando con PEG un adeguato numero di sieri con PRL nella norma, che consenta di individuare i sieri con eccesso di mPRL. Tuttavia, nel caso che questo approccio non sia realizzabile, il valore della mPRL dopo precipitazione con PEG rappresenta

Tabella II. Variabilità in letteratura dei parametri impiegati nella metodica di precipitazione della BigBigPRL con PEG.

Tempo di rotazione (min.)	*RPM*	*Temperatura (C°)*	*Riferimento*
30	1800	Ambiente	3
30	1400	N.S.	17
30	1500	4	18
30	2800	4	21
40	2000	Ambiente	29*
30	3000	4	32
5	9500	N.S	41

N.S.: non specificato
RPM: frequenza (giri x min $^{-1}$) della centrifugazione
* metodica modificata in più fasi per Bayer Immuno1

comunque un dato utile che andrebbe comunicato al clinico. Infatti, qualora questo valore ecceda i limiti di normalità del test (in metodiche analitiche libere da interferenza da PEG) la presenza di un eccesso di mPRL è certa, dato che la precipitazione con PEG tutt'al più ne riduce il valore.
Va tenuto presente che questa metodica interferisce con alcuni sistemi immunometrici, in senso positivo, come con Abbott AxSYM[36], Bayer Immuno 1[32], DPC Immulite[28] e ciò ne limita la applicabilità.
Recentemente, tuttavia, sono state proposte modificazioni della metodica con PEG, quali il pretrattamento con PEG degli standard di curva per Abbott AxSYM[36] e l'eliminazione completa del PEG con buffer proteico per Bayer Immuno 1[29] che la rendono utilizzabile anche su queste macchine.

Ultrafiltrazione

Una metodica di individuazione dei sieri macroprolattinemici, alternativa alla precipitazione con PEG, è stata proposta recentemente[37,38]. La separazione della BigBigPRL avviene mediante un filtro molecolare che blocca il passaggio di molecole di PM >100 kDa. La mPRL viene misurata sull'ultrafiltrato. Questa metodica ha il vantaggio di essere applicabile a tutti gli analizzatori, ma richiede lunghi tempi di centrifugazione (5 ore). I risultati hanno evidenziato un'elevata correlazione con la precipitazione con PEG.

Variazione dei tempi di incubazione in immunometria

E' stato dimostrato che la riduzione del tempo di incubazione di un dosaggio immunometrico per la PRL (con Delfia Wallac) riduce maggiormente la sensibilità nei confronti della BigBigPRL rispetto alla mPRL. Questo fatto è stato sfruttato per identificare i sieri macroprolattinemici, eseguendo il dosaggio due volte, con 5 e 90 minuti di incubazione. Il rapporto PRL 5'/PRL 90' è risultato correlato alla percentuale della sola mPRL sierica identificata con filtrazione su gel e ai valori di recupero dopo precipitazione con PEG[30]. Il limite di questa metodica sta nel fatto che la maggior parte degli analizzatori immunometrici attuali hanno un software "chiuso" e spesso non è possibile modificare i parametri di reazione.

Metodiche di tipizzazione della BigBigPRL

Le due forme di BigBigPRL, con e senza componente anticorpale, possono essere distinte fra loro mediante alcune metodiche:
- Dimostrazione di Ab anti PRL con PRL radiomarcata con 125I. Questa metodica evidenzia la presenza di Ab anti PRL liberi nel siero ed ha permesso di sospettare la natura immunologica di una parte della BigBigPRL[9,10]
- Cromatografia per affinità su colonna con agarosio anti IgG umane[10,11]
- Immunoprecipitazione con agarosio anti IgG[13]
- Precipitazione con proteina A-sepharose[39]. Questa metodica ha tuttavia limiti sia di sensibilità che di specificità, in quanto la proteina A è un polipeptide che lega la frazione Fc delle IgG umane, ma è più sensibile ai sottogruppi IgG1 e IgG2, e ha qualche affinità anche per IgA e IgM.
- Dosaggio immunometrico "sandwich" della BigBigPRL contenente IgG.

Metodica recentemente proposta, che impiega un anticorpo anti PRL di cattura e un secondo anticorpo anti IgG umane, Frazione C, come tracciante[17].

Indicazioni alla ricerca delle isoforme macromolecolari della PRL

Sulla base della letteratura scientifica disponibile è possibile tentare di definire delle indicazioni di comportamento per il laboratorio di patologia clinica nei confronti delle problematiche implicate dalla possibile presenza di isoforme macromolecolari della PRL.
1. Data l'elevata frequenza della macroprolattinemia fra i sieri iperprolattinemici, vi è generale accordo che sarebbe ottimale eseguire lo screening per BigBigPRL su tutti i sieri iperprolattinemici, soprattutto se viene impiegato una metodica altamente sensibile a questa molecola[18,33,40-42] dato il rischio di possibili ulteriori indagini e soprattutto di trattamenti medici, e potenzialmente chirurgici[43] comportati dal mancato riconoscimento di questa situazione.
2. Qualora, per ragioni tecniche (vedi sopra), organizzative e/o economiche, il laboratorio non sia in grado di cercare routinariamente la macroprolattina, potrebbe essere utile che il referto dell'analisi riporti, assieme ai valori normali, un avvertimento specificante che l'iperprolattinemia può essere imputabile alla presenza di macromolecole della PRL.
3. Il laboratorio dovrebbe comunque impegnarsi ad assicurare la ricerca di macroprolattinemia, qualora venga espressamente chiesto dal clinico, anche ricorrendo all'invio del campione altra sede attrezzata.
4. Per quanto riguarda le modalità di descrizione nel referto analitico della presenza e dell'entità della macroprolattina dopo precipitazione con PEG, sembra più utile indicare, accanto alla percentuale di recupero, il valore di PRL basale e quello dopo precipitazione con PEG piuttosto che la semplice dizione "probabile presenza/assenza di macroprolattina", come suggerito in alcuni Kit di immunometria per la PRL. Come già menzionato, infatti, il clinico può avere un'indicazione più precisa, ancorché non assoluta, della presenza o meno di iperprolattinemia vera.
5. Dato che il valore del recupero percentuale esprime il rapporto fra il valore della PRL dosato sul siero dopo precipitazione con PEG e quello sul siero non trattato, è ovvio che esso presenta una correlazione inversamente proporzionale alla sensibilità di ogni sistema di dosaggio verso la BigBigPRL. Pertanto, dosaggi caratterizzati da bassa sensibilità verso la BigBigPRL (Tab. 1) non solo non esimono dalla ricerca della macroprolattina, ma, al contrario, richiedono di controllare anche sieri solo modicamente iperprolattinemici.
6. La variabilità del valore del recupero in relazione al kit di dosaggio impiegato rappresenta un'ulteriore motivo per fornire al clinico il valore della PRL dopo precipitazione, che appare molto meno vincolato al singolo kit (in assenza di interferenze da PEG[19]).
7. Dal punto di vita clinico, la ricerca della macroprolatti-

nemia va eseguita al minimo in quelle situazioni nelle quali un'iperprolattinemia non si associa a sintomi o segni tipici, o comunque quando non è presente chiara correlazione fra l'iperprolattinemia e il quadro clinico.

E' stato riportato come la macroprolattinemia rappresenti la principale causa di elevati valori di PRL in assenza di sintomi con una frequenza del 90% [36].

Qualora, in situazioni di questo tipo, essa venga esclusa, vanno prese in considerazione altre possibilità, quali una prevalenza di sola BigPRL, che richiede la cromatografia su gel, o, molto raramente, la presenza di anticorpi eterofili[44].

Quale il dosaggio ideale della PRL?

E' possibile considerare le isoforme macromolecolari della PRL esclusivamente come un problema analitico, un "incidente di percorso" da riconoscere e eliminare per evitare di dare valori falsamente elevati di mPRL? Questo orientamento emerge da una parte della letteratura scientifica[23,32,45] e porterebbe al fine ultimo di sviluppare metodiche analitiche il più possibile specifiche per la mPRL, analogamente agli attuali dosaggi delle frazioni libere degli ormoni tiroidei. Questo indirizzo appare però prematuro, almeno fino a quando non saranno chiariti alcuni problemi inerenti le isoforme macromolecolari della PRL:

a) una possibile attività biologica *in vivo* di BigPRL e BigBigPRL (vedi sezioni precedenti), ancora non esclusa.
b) una possibile produzione primitiva di BigPRL e BigBigPRL da parte di lesioni ipofisarie.

Questa ipotesi avrebbe ovvie conseguenze sulla necessità o meno di sottoporre tutti i casi di BigBigPRL e/o BigPRL a imaging ipofisario, messa talora in dubbio per i pazienti asintomatici, nonostante la macroprolattinemia di per se non escluda un possibile coesistente adenoma ipofisario[17,46,47].

A questo proposito, la produzione di BigBigPRL è stata dimostrata in adenomi ipofisari[48] e ritenuta molto probabile per la BigPRL[49]. Recentemente è stata segnalata la possibile produzione di BigBigPRL senza IgG anti PRL da parte di adenomi ipofisari[50].

Una eventuale origine esclusivamente periferica della BigBigPRL costituita da complesso mPRL-IgG anti PRL, qualora dimostrata, potrebbe rappresentare un indicazione allo sviluppo di metodiche routinarie di riconoscimento di queste molecole.

c) un possibile significato della BigBigPRL costituita da complesso mPRL-IgG anti PRL quale "marker" di disturbo immunitario. A tale proposito sono interessanti le segnalazioni di aumentata frequenza di queste molecole in soggetti affetti da LES o con infezione da HIV[16,20].

Conclusioni

La frequenza di iperprolattinemia causata dalla presenza prevalente di isoforme macromolecolari della PRL appare elevata, ancorché metodo dipendente. E' quindi necessario che i laboratori di analisi dispongano di metodiche in grado di individuare queste situazioni e comunicarle al clinico. La precipitazione della BigBigPRL con PEG appare un metodo efficace, economico e, entro certi limiti, quantitativo. Per le metodiche sulle quali esso produce interferenza è disponibile l'ultrafiltrazione, tuttavia è possibile che alcuni accorgimenti, come il trattamento con PEG degli standard di curva, premetta di allargare l'applicabilità di questa tecnica, come già è accaduto con Abbott AxSYM. Può invece apparire prematura la realizzazione di metodiche analitiche della PRL con esclusiva specificità per la mPRL.

Al momento non vi sono metodi alternativi alla cromatografia su gel per individuare con certezza la BigPRL. L'origine, il significato biologico e l'eventuale impatto clinico delle isoforme macromolecolari della PRL non sono completamente chiariti e ciò è in gran parte dovuto alla eterogeneità chimica di queste molecole.

La componente immunologica in una rilevante frazione della BigBigPRL solleva interessanti interrogativi su un possibile collegamento fra queste molecole e il sistema immunitario, anche considerati i ruoli di mediatore e indicatore di attività immunologica attribuiti alla PRL[51].

Bibliografia

1. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. Physiol Rev 2000; 80:1523-631.
2. Smith CR, Norman MR. Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. Ann Clin Biochem 1990; 27:542-50.
3. Smith TP, Suliman AM, Fahie-Wilson MN, McKenna TJ. Gross variability in the detection of prolactin in sera containing big big prolactin (macroprolactin) by commercial immunoassays. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:5410-5.
4. Schlechte JA. Editorial: the macroprolactin problem. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:5408-9.
5. Sinha YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. Endocr Rev 1995; 16:354-69.
6 Kline JB, Clevenger CV. Identification and characterization of the prolactin-binding protein in human serum and milk. J Biol Chem 2001; 276:24760-6.
7. Sweefoong NG, Richards RJ, Ward GJ, Kunze HF, Irving MJ, Cameron DP. Big big prolactin-what is it? 29th annual meeting of the Endocrine Society of Australia 1986; Abstract n 136.
8. Carlson HE, Markoff E, Lee DW. On the nature of serum prolactin in two patients with macroprolactinemia. Fertil Steril 1992; 58:78-87.
9. Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. A normal ovulatory woman with hyperprolactinemia: presence of anti-prolactin autoantibody and the regulation of prolactin secretion. Acta Endocrinol (Copenh) 1992; 126:497-500.
10. Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Correlation of the antibody titers with serum prolactin levels and their clinical course in patients with anti-prolactin autoantibody. Eur J Endocrinol 1994; 130:438-45.
11. Hattori N. The frequency of macroprolactinemia in pregnant women and the heterogeneity of its etiologies. J Clin Endocrinol Metab 1996; 81:586-90.
12. Cavaco B, Leite V, Santos MA, Arranhado E, Sobrinho LG. Some forms of big big prolactin behave as a

complex of monomeric prolactin with an immunoglobulin G in patients with macroprolactinemia or prolactinoma. J Clin Endocrinol Metab 1995; 80:2342-6.
13. Schiettecatte J, De Schepper J, Velkeniers B, Smitz J, Van Steirteghem A. Rapid detection of macroprolactin in the form of prolactin-immunoglobulin G complexes by immunoprecipitation with anti-human IgG-agarose. Clin Chem Lab Med 2001; 39:1244-8.
14. Hattori N. Macroprolactinemia: a new cause of hyperprolactinemia. J Pharmacol Sci 2003; 92:171-7.
15. Amadori P, Dilberis C, Marcolla A, Pinamonti M, Menapace P, Valentini A. Identification of IgG-immunocomplex macroprolactin with an immunometric "sandwich" system: techincal and clinical considerations. J Endocrinol Invest 2004; 27:1022-8.
16. Leanos-Miranda A, Pascoe-Lira D, Chavez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Detection of macroprolactinemia with the polyethylene glycol precipitation test in systemic lupus erythematosus patients with hyperprolactinemia. Lupus 2001; 10:340-5.
17. Strachan MW, Teoh WL, Don-Wauchope AC, Seth J, Stoddart M, Beckett GJ. Clinical and radiological features of patients with macroprolactinaemia. Clin Endocrinol (Oxf) 2003; 59:339-46.
18. Leslie H, Courtney CH, Bell PM, Hadden DR, McCance DR, Ellis PK, et al. Laboratory and clinical experience in 55 patients with macroprolactinemia identified by a simple polyethylene glycol precipitation method. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:2743-6.
19. Fideleff HL, Ruibal G, Boquete H, Pujol A, Sequera A, Sobrado P.Macroprolactinemia in childhood and adolescence: a cause of asymptomatic hyperprolactinemia. Horm Res 2000; 53:16-9.
20. Leanos-Miranda A, Contreras-Hernandez I. Related Articles, Antiprolactin autoantibodies are associated with hyperprolactinemic status in men infected with human immunodeficiency virus. Endocrine 2002; 19:139-46.
21. Olukoga AO, Kane JW. Macroprolactinaemia: validation and application of the polyethylene glycol precipitation test and clinical characterization of the condition. Clin Endocrinol (Oxf) 1999; 5:119-26.
22. Vallette-Kasic S, Morange-Ramos I, Selim A, Gunz G, Morange S, Enjalabert M, et al. Macroprolactinemia revisited: a study on 106 patients. J Clin Endocrinol Metab 2002; 87:581-8.
23. Cavaco B, Prazeres S, Santos MA, Sobrinho LG, Leite V. Hyperprolactinemia due to big big prolactin is differently detected by commercially available immunoassays. J Endocrinol Invest 1999; 22:203-8.
24. Leite V, Cosby H, Sobrinho LG, Fresnoza MA, Santos MA, Friesen HG. Characterization of big, big prolactin in patients with hyperprolactinaemia. Clin Endocrinol (Oxf) 1992 ; 37:365-72
25. Leanos-Miranda A, Pascoe-Lira D, Chavez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Persistence of macroprolactinemia due to antiprolactin autoantibody before, during, and after pregnancy in a woman with systemic lupus erythematosus. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:2619-24.
26. Leanos-Miranda A, Chavez-Rueda KA, Blanco-Favela F. Biologic activity and plasma clearance of prolactin-IgG complex in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2001; 44:866-75
27. Hattori N, Ikekubo K, Ishihara T, Moridera K, Hino M, Kurahachi H. Effects of anti-prolactin autoantibodies on serum prolactin measurements. Eur J Endocrinol 1994; 130:434-7.
28. Gibson G, Schmit P, Thix J, Hoffman JP, Humbel RL. Prolactin results for samples containing macroprolactin are method and sample dependent. Clin Chem 2001; 47:331-3.
29. Schneider W, Marcovitz S, Al-Shammari S, Yago S, Chevalier S. Reactivity of macroprolactin in common automated immunoassays. Clin Biochem. 2001; 34:469-73.
30. Hekim C, Alfthan H, Leinonen JT, Stenman UH. Effect of incubation time on recognition of various forms of prolactin in serum by the DELFIA assay. Clin Chem 2002; 48:2253-6.
31. Suh HK, Frantz AG. Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. J Clin Endocrinol Metab 1974; 39:928-35.
32. Fahie-Wilson MN, Soule SG. Macroprolactinaemia: contribution to hyperprolactinaemia in a district general hospital and evaluation of a screening test based on precipitation with polyethylene glycol. Ann Clin Biochem 1997; 34: 252-8.
33. Fahie-Wilson M, Brunsden P, Surrey J, Everitt A. Macroprolactin and the Roche Elecsys prolactin assay: characteristics of the reaction and detection by precipitation with polyethylene glycol. Clin Chem 2000; 46:1993-5.
34. Pascoe-Lira D, Duran-Reyes G, Contreras-Hernandez I, Manuel-Apolinar L, Blanco-Favela F, Leanos-Miranda A. Frequency of macroprolactinemia due to autoantibodies against prolactin in pregnant women. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:924-9.
35. Suliman AM, Smith TP, Gibney J, McKenna TJ. Frequent misdiagnosis and mismanagement of hyperprolactinemic patients before the introduction of macroprolactin screening: application of a new strict laboratory definition of macroprolactinemia. Clin Chem 2003; 49:1504-9.
36. Amadori P, Dilberis C, Marcolla A, Pinamonti M, Menapace P, Dal Bosco F. Macroprolactinemia: predictability on clinical basis and detection by PEG precipitation with two different immunometric methods. J Endocrinol Invest 2003; 26:148-5.
37. Craddock HS, Fahie-Wilson M. Heys AD. Macroprolactin detection by ultrafiltration screening with the Abbott AxSYM assay. Proceedings of Pathology 2000. Association of Clinical Biochemists National Meeting. London: The Association of Clinical Biochemists. p.148.
38. Prazeres S, Santos MA, Ferreira HG, Sobrinho LG. A practical method for the detection of macroprolactinaemia using ultrafiltration. Clin Endocrinol (Oxf) 2003; 58:686-90.
39. Sapin R, Kertesz G. Macroprolactin detection by precipitation with protein A-sepharose: a rapid screening method compared with polyethylene glycol precipitation. Clin Chem 2003; 49:502-5.

40. Sanchez-Eixeres MR, Mauri M, Alfayate R, Graells ML, Miralles C, Lopez A, et al. Prevalence of macroprolactin detected by Elecsys 2010. Horm Res 2001; 56:87-92.
41. Vieira JG, Tachibana TT, Obara LH, Maciel RM. Extensive experience and validation of polyethylene glycol precipitation as a screening method for macroprolactinemia. Clin Chem 1998; 44:1758-9.
42. De Schepper J, Schiettecatte J, Velkeniers B, Blumenfeld Z, Shteinberg M, Devroey G, et al. Clinical and biological characterization of macroprolactinemia with and without prolactin-IgG complexes. Eur J Endocrinol 2003; 149:201-7.
43. Cattaneo FA, Fahie-Wilson MN. Concomitant occurrence of macroprolactin, exercise-induced amenorrhea, and a pituitary lesion: a diagnostic pitfall. Case report. J Neurosurg 2001; 95:334-7.
44. Sapin R, Simon C. False hyperprolactinemia corrected by the use of heterophilic antibody-blocking agent. Clin Chem 2001; 47:2184-5.
45. John R, McDowell IF, Scanlon MF, Ellis AR. Macroprolactin reactivities in prolactin assays: an issue for clinical laboratories and equipment manufacturers. Clin Chem 2000; 46:884-5.
46. Serri O, Chik CL, Ur E, Ezzat S. Diagnosis and management of hyperprolactinemia. CMAJ 2003; 169:575-81.
47. Hauache OM, Rocha AJ, Maia AC, Maciel RM, Vieira J. Clin Endocrinol (Oxf) 2002; 57:327-31.
48. Ohnami S, Eto S, Ohnami S, Soejima T, Nakata H. Characterization of “big big prolactin” in serum and tumor extract in patients with PRL-secreting tumor. Endocrinol Jpn 1987; 34:325-34.
49. Tritos NA, Guay AT, Malarkey WB. Asymptomatic ‘big’ hyperprolactinemia in two men with pituitary adenoma. Eur J Endocrinol 1998; 138: 82-5.
50. Mounier C, Trouillas J, Claustrat B, Duthel R, Estour B. Macroprolactinaemia associated with prolactin adenoma. Hum Reprod 2003; 18:853-7.
51. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor, actions, signal transduction pathways and phenotipes observed in PRL receptor knockout mice. Endocr Rev 1998; 19:225-68.