

KOMPARATIVNA ANALIZA HOMEOSTAZE KALCIJUMA U USLOVIMA FIZIOLOŠKE I MEDIKAMENTNE HIPERPROLAKTINEMIJE – EKSPERIMENTALNA STUDIJA

1. UVOD

Prolaktin je jednolančani polipeptidni hormon, koga sintetišu i sekretuju laktotropne ćelije prednjeg režnja hipofize. Za razliku od ostalih pituitarnih hormona, sklon je spontanoj hipersekreciji, te je pod stalnom toničkom inhibicijom od strane hipotalamusa. Nema ciljnu endokrinu žlezdu. Svoje dejstvo ostvaruje vezivanjem za specifične prolaktinske receptore (PRLR). Široka rasprostranjenost PRLR objašnjava brojne funkcije koje se prolaktinu pripisuju. Ima ključnu ulogu u razvoju mlečnih žlezdi, sintezi mleka i održavanju mlečne sekrecije, zbog čega se često naziva laktogenim hormonom. Od 1930.god., kada je otkriven, do danas, utvrđeno je preko 300 različitih bioloških funkcija prolaktina u domenu reprodukcije, metabolizma, osmoregulacije, imunoregulacije i ponašanja.

Par decenija unazad, brojni autori svojim rezultatima dokazuju da su fiziološka, patološka i medikamentna hiperprolaktinemija povezane sa promenama u koštanom sistemu.

U trudnoći i laktaciji, značajan transfer kalcijuma iz tela majke u fetus i odojče, predstavlja svojevrsan stres za homeostazu kalcijuma majčinog organizma. S obzirom da je u ovim stanjima povišena koncentracija prolaktina u serumu, sve je više zastupljeno mišljenje, da je prolaktin jedan od glavnih kalcitropnih hormona u fiziološkoj hiperprolaktinemiji. Povećana potražnja za kalcijumom u trudnoći, može se obezbediti: 1. povećanom apsorpcijom kalcijuma na nivou intestinuma; 2. smanjenom ekskrecijom kalcijuma preko bubrega i/ili 3. povećanom resorpcijom kalcijuma iz kostiju. Pa, ipak, promene na koštanom sistemu, u stanjima fiziološke hiperprolaktinemije, po pravilu su male i reverzibilne, tako da sam broj trudnoća i dužina laktacije ne predstavljaju faktore rizika za osteopeniju i osteoporozu.

Dugotrajna upotreba medikamenata koji dovode do hiperprolaktinemije, poput antipsihotika, antidepresiva, SSRI i prokinetika, sve se češće dovode u vezu sa povećanim rizikom za frakturu. Većina autora, uzročno-posledičnu vezu između medikamentne hiperprolaktinemije i gubitka koštane gustine, objašnjava sekundarnim hipogonadizmom i hipoestrogenemijom kod žena. Međutim, identifikacija PRLR u kostima, napravila je prostor za teoriju direktnog uticaja prolaktina na skeletni sistem.

Imajući u vidu prisustvo PRLR u intestinumu, bubregu i koštanom sistemu, moguće je pretpostaviti da različiti mehanizmi homeostaze kalcijuma, dovode do tranzitornih promena koštane gustine u fiziološkoj hiperprolaktinemiji, a do značajne osteopenije i osteoporoze u medikamentnoj.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Prolaktin

2.1.1. Strukturne karakteristike prolaktina

Prolaktin (PRL) je polipeptidni hormon, koga sintetišu i sekretuju laktotrofne ćelije adenohipofize. Po svojoj građi i funkciji pripada familiji somatomamotropnih hormona, zajedno sa hormonom rasta i humanim placentarnim laktogenom (poreklom iz placente).

Gen odgovoran za sintezu prolaktina nalazi se na 6. hromozomu (1). On kodira sintezu prohormona prolaktina sačinjenog od 227 aminokiselina, čijom maturacijom nastaje humani prolaktin od 199 aminokiselina (2). Molekul prolaktina je strukturisan u vidu jednolančanog polipeptida sa tri disulfidne veze između 6 cisteinskih ostataka (Cys⁴-Cys¹¹, Cys⁵⁸-Cys¹⁷⁴, Cys¹⁹¹-Cys¹⁹⁹) unutar lanca (3).

Njegov poluživot u plazmi je vrlo kratak i kreće se između 20 i 30 min. Brzo se metabolize u jetri. Normalne koncentracije prolaktina u plazmi su nešto veće kod žena nego kod muškaraca, što se pripisuje delovanju estrogena. Prolaktin se sekretuje u pulsevima i to na 90 minuta. Nešto u većim koncentracijama se sekretuje tokom sna. Postoje podaci o takozvanoj bimodalnoj sekreciji prolaktina, sa prvima pikom oko 03h (nazvan noćni pik-N) i drugim, u popodnevnom satima istog dana, oko 17h (nazvan dnevni pik-D) (4).

Najčešći oblik prolaktina, koji se može naći u cirkulaciji i pituitarnoj žlezdi, je "mali prolaktin" (molekularne mase 23kDa) u manjoj meri "veliki prolaktin" (molekularne mase 50-60kDa) i "makroprolaktin" (150-170kDa) (5). Prilikom radioimunološkog određivanja prolaktina oni čine deo ukupne koncentracije prolaktina u serumu. Visokomolekularne forme prolaktina su zastupljenije kod bolesnika sa hiperprolaktinemijom (5). Ranije studije su prvenstveno predstavljale makroprolaktin kao polimera sastavljenog od malih prolaktina vezanih disulfidnim mostovima (6), agregate prolaktina vezane nekovalentnim vezama (7), ili kompleks prolaktin-IgG vezan disulfidnim mostom (8). Noviji radovi opisuju makroprolaktin kao kompleks monomernog prolaktina sa antitelom klase IgG, ostavljajući mogućnost da se radi o autoantitelima (9,10). Pored visokomolekularnih formi prolaktina, izolovane su i brojne niskomolekularne forme (14, 16 i 22kDa). Najčešće ispitivana 16kDa, fragment prolaktina (1-148) nastaje proteolizom 23kDa prolaktina (11). Pravi značaj različitih formi prolaktina još uvek nije precizno definisan, ali je opšteprihvaćeno mišljenje da većina njih ima manju biološku potentnost.

2.1.2. Prolaktinski receptori

Prolaktin je hormon koji nema ciljnu endokrinu žlezdu preko koje bi izrazio svoje efekte. Svoje dejstvo ostvaruje vezivanjem za specifične membranske prolaktinske receptore

(PRLR) koji pripadaju klasi 1 citokinske familije receptora (12,13,14). Svaki prolaktinski receptor sastoji se iz tri dela: ekstracelularnog, transmembranskog i intracelularnog (citoplazmatskog) dela (15). Opisane su brojne izoforme PRLR u različitim tkivima (16,17). Izoforme PRLR razlikuju se po dužini i sastavu intracelularnog (citoplazmatskog) dela, dok je ekstracelularni deo identičan za sve izoforme (14,18,19). Tri glavne izoforme PRLR identifikovane kod pacova su: kratka (291 amino kiselina) srednja (393 amino kiselina) i dugačka (591 aminokiselina) forma (18). Aktivacija PRLR počinje vezivanjem molekule prolaktina za ekstracelularni deo prolaktinskog receptora, čime započinje dimerizacija receptora (18). Svaka molekula prolaktina vezuje se za dva prolaktinska receptora obrazujući trimerični kompleks (dva receptora i jedan hormon) (18,20). Uloga transmembranskog dela PRLR još uvek nije potpuno razjašnjena. Intracelularni (citoplazmatski) deo PRLR ima ključnu ulogu u inicijaciji mehanizama transdukcije signala, koji se složenim kaskadnim mehanizmima prenose do nukleusa gde se aktivira promotor target gena (18, 21). Prolongirano dejstvo prolaktina (kao u stanju hiperprolaktinemije) dovodi do tranzitne sinteze proteina koji će „ugasiti“ aktivnost intracelularnog dela prolaktinskih receptora (nishodna regulacija RPRL) (22). Rasprostranjenost PRLR je takoreći ubikvitarna. Najveći broj PRLR pronađen je u uterusu, dojka i ovarijumu (23). Identifikovano je njihovo prisustvo u gotovo svim delovima CNS-a: u kori mozga, u srednjem mozgu, talamusu, hipotalamusu, olfaktornom sistemu, u amigdalnim jedrima, horoidnom pleksusu (24,25). Receptori prolaktina i njihova mRNK prisutni su u hipofizi, nadbubrežnim žlezdama, bubrezima, timusu, slezini, prostati, trahei, plućima i srcu (18, 23, 26). Vizuelizovani su u skoro svim delovima digestivnog trakta: u jetri, pankreasu, jednjaku, želucu, duodenumu, jejunumu, ileumu i kolonu (nisu prisutni samo u rektumu) (27). Identifikacija PRLR i njene mRNK u ćelijama osteosarkoma (28) i kultivisanim osteoblastima kalvarije (29) naveli su brojne autore na razmišljanje da su i kosti target za direktno delovanje prolaktina. Charoenphandhu i sar. 2006 godine, dokazali su ekspresiju kratke i dugačke forme PRLR mRNK u tibiji, femuru, pogravini i pršljenovima, potvrđujući ranije pretpostavke da prolaktin vezujući se za svoje receptore u kostima direktno utiče na koštani metabolizam kalcijuma (30).

2.1.3. Biološka aktivnost prolaktina

Najpoznatija uloga prolaktina je svakako u procesu laktogeneze. Hormon je i dobio ime na osnovu činjenice da ekstrakt govede pituitarne žlezde stimuliše laktaciju drugih eksperimentalnih životinja (31). Od perioda njegovog otkrivanja do danas, utvrđeno je više od 300 različitih bioloških funkcija prolaktina (18). Najvažnije se grubo mogu podeliti na ulogu prolaktina u: A. reprodukciji i B. homeostazi.

A. Reprodukcija

U domenu reproduktivnog sistema, prolaktin ispoljava mnogobrojne efekte na nivou mamarne žlezde, ima značajnu lutealnu funkciju i utiče na takozvano „reproduktivno ponašanje“.

1. Laktacija

Normalan razvoj i funkcionisanje mlečnih žlezdi, omogućeno je sinhronizovanim delovanjem sistema veoma složenih neuroendokrinih veza. Dojka je uključena u lanac koji ide putem hipotalamus-hipofiza-nadbubreg-ovarijum-dojka. Kora velikog mozga, indirektno preko hipotalamusa, utiče i na hipofizu. Na taj način, uticaji spoljne sredine, obrađeni u korteksu velikog mozga i prevedeni u impulse, koji će se različitim neurotransmiterima dalje prenositi, mogu uticati i na stanje dojki.

U svim razvojnim fazama mamarne žlezde prolaktin ima značajno mesto. Neophodan je za mamogenezu (rast i razvoj dojke), laktogenezu (sinteza mleka) i galaktopoezu (održavanje mlečne sekrecije) (32).

Pod prvim uplivom estrogena iz probuđenog jajnika, počinje rast dojki, koji ne mora biti sinhron, ni simetričan. Rast strome je najdominantniji i odgovoran je za najveći deo povećanja volumena dojke. Istovremeno, primarni kanalići počinju da se izdužuju i stvaraju završne grančice. Na taj način stvaraju se čvrsti režnjevi, lobusi mlečne žlezde. Ciljano izazavani poremećaji na nivou prolaktinskog gena (prolaktin knockout eksperimentalni model) (33) ili na nivou prolaktinskih receptora (34), rezultovace abnormalnom mamogenezom i potpunim odsustvom lobuloalveolarnih jedinica u odraslih homozigotnih ženki, što su samo neki od mnogobrojnih dokaza uloge prolaktina u mamogenezi.

Tokom laktogeneze prolaktin stimuliše preuzimanje amino kiselina i sintezu mlečnih proteina kazeina i α -laktalbumina, preuzimanje glukoze i sintezu mlečnog šećera laktoze kao i sintezu mlečnih masti (35,36).

Iako je uloga prolaktina od presudnog značaja za održavanje mlečne sekrecije (galaktopoeza) neophodno je sinhrono delovanje insulina, hormona rasta, tireoidnih hormona, paratireoidnog hormona, kalcitonina, faktora rasta i oksitocina (37).

2. Lutealna funkcija

Svoje dejstvo na nivou reproduktivnog sistema, prolaktin ostvaruje direktnim putem, vezujući se za specifične PRLR u gonadama i indirektno, preko hipotalamusa gde utiče na pulsativnu sekreciju folikostimulirajućeg (FSH) i luteinizirajućeg (LH) hormona.

Kod većine sisara, prolaktin se ponaša kao luteotropni hormon, koji održava strukturalni i funkcionalni integritet corpus luteum-a 6 dana nakon ovulacije (37), čime pojačava sekreciju progesterona (38). U eksperimentalnom modelu PRLR knockout, izostaje normalna lutealna funkcija, dolazi do steriliteta, aberantne

ovogeneze i neuspele implantacije oplodene jajne ćelije (18), što je sve potvrda direktne lutealne uloge, mimo „luteotropnog“ kompleksa LH-FSH-PRL.

Tokom trudnoće, pojačana proizvodnja estrogena stimuliše rast i deobu hipofiznih laktotrofa. Prolaktin počinje da se povećava kod trudnica počev od trećeg meseca graviditeta da bi pred sam porođaj dostigao vrednosti koje su i 17 puta veće od normalnih. U tom periodu njegova najvažnija uloga jeste da pripremi dojke za laktaciju. Prisustvo prolaktina je takođe od ključnog značaja za biosintezu progesterone u trudnoći i hipertrofiju lutealnih ćelija (18).

3. *Reproduktivno ponašanje*

Brojni su podaci u literaturi koji ukazuju na ulogu prolaktina u obrascu ponašanja „roditeljstva“. Pravljenje gnezda, sastavljanje, grupisanje, čišćenje, dojenje, briga i učenje mladih, pripisuje se u manjoj ili većoj meri dejstvu prolaktina (39,40). U različitim eksperimentalnim modelima je potvrđeno da kontakt sa mladunčtom indukuje transkripciju dugačke forme PRLR mRNK u mozgu ženki i da se ovaj efekat gubi kod ovarijskih i hipofizektomiranih životinja (41).

B. Homeostaza

Prolaktin, regulacijom imunološkog sistema, osmotskog balansa, prometa kalcijuma i angiogeneze, igra značajnu ulogu u održavanju konstantnosti unutrašnje sredine.

1. *Imunološki odgovor*

U imuno-neuro-endokrinoj mreži, gde nervni, endokrini i imuni sistem neprestano komuniciraju, prolaktin se vrlo često nalazi u ulozi medijatora (42). Ovaj hormon utiče na humoralni i celularni imuni odgovor kako u fiziološkim tako i u patološkim stanjima, kao što su autoimune bolesti (43, 44). Prolaktin stimuliše mitogenezu normalnih T limfocita (45), ali i ćelija Nb2 limfoma (46). Aktivacija T limfocita interleukinom 2 (IL-2) zhteva prisustvo prolaktina (47). Stavovi o ulozi prolaktina u hematopoezi ipak nisu uniformni. Ciljano izazvani poremećaji na nivou prolaktinskog gena ne dovode do značajne izmene u ekspresiji antigena B i T ćelija (33). Takvi rezultati idu u prilog pretpostavci da uloga prolaktina u primarnoj diferencijaciji limfocita nije nezamenljiva i da može biti kompenzovana aktivnošću drugih faktora.

2. *Osmoregulacija*

Jedna od najmanje poznatih bioloških funkcija prolaktina jeste uticaj ovog hormona na transport soli i vode kroz ćelijske membrane (48). Imajući u vidu laktogene osobenosti prolaktina, prva zapažanja su bila na nivou mamarnih epitelnih ćelija, gde je dokazano da ovaj hormon smanjuje transport natrijuma i povećava transport kalijuma kod zečeva tretiranih bromokriptinom (49,50). Prolaktin takođe utiče na transport vode kroz amnio-membranu, stimuliše ga kod eksperimentalnih životinja

(51) i inhibiše kod humanog amniona (52). Na nivou membrane intestinalnih epitelnih ćelija prolaktin je odgovoran za transport tečnosti, natrijuma i hlorida (53). Na nivou proksimalnih tubula PRL inhibira aktivnost Na-K-ATP-aze čime dovodi do povećane natriumureze (54). Inhibicijom intrarenalne produkcije dopamina, natriumuretički efekat PRL nestaje (55). Neophodnost intaktne renalne produkcije dopamina, za natrijumuretički efekat PRL dokaz je permisivno-sinergističke uloge dopamina na PRL (54, 55).

3. *Homeostaza kalcijuma*

U poslednjoj deceniji, sve je više podataka kojima se prolaktinu pripisuje uloga regulatora homeostaze kalcijuma. U uslovima in vivo i vitro prolaktin stimuliše intestinalnu apsorpciju kalcijuma, povećava koštani „turnover“ i redukuje renalnu ekskreciju kalcijuma.

Intraperitonealno dat, prolaktin, značajno povećava pasivnu apsorpciju Ca u duodenumu (56). Tokom trudnoće i laktacije (stanja fiziološke hiperprolaktinemije) endogeni prolaktin utiče na povećan unos hrane, povećava frakcionisanu apsorpciju kalcijuma u utiče na koštani „turnover“ (57). Tokom rasta i razvoja, fiziološka je uloga prolaktina da stimulacijom apsorpcije kalcijuma omogućava potrebnu koncentraciju kalcijuma za formiranje koštanog sistema (58). Imajući u vidu da se ukupni aktivni transport kalcijuma može podeliti na: voltažno zavistan, hemijski i transcelularni aktivni transport, mnogi eksperimenti su sprovedeni u cilju ispitivanja uloge prolaktina u svakom vidu kalcijumskog transporta zasebno. Ova ispitivanja su potvrdila da je duodenum „target“ organ prolaktina koji podstiče hemijski transport i transcelularni aktivni transport kalcijuma, ali nema uticaja na voltažno zavistan transport kalcijuma (59,60). Mehanizam, kojim prolaktin dovodi do pojačanog aktivnog transporta kalcijuma u duodenumu, je direktno dejstvo ovog hormona na povećanu aktivnost Na(+)-K(+)-ATP-aze i Ca(2+)-ATP-aze u epitelijalnim ćelijama duodenuma (61). Sve brojniji dokazi o direktnom uticaju prolaktina na apsorpciju kalcijuma i intenzivna ekspresija mRNA PRLR u digestivnom traktu otvorila su nova polja istraživanja, obzirom da postreptorni mehanizmi delovanja prolaktina na PRLR u digestivnom traktu još uvek nisu razjašnjena (27,62,63).

Otkrivanje PRLR u ćelijama osteosarkoma, navelo je brojne autore na ispitivanje direktnog dejstva prolaktina na koštani sistem (28). Dalja istraživanja otkrila su ekspresiju PRLR mRNA u osteoblastima i odsustvo u osteoklastima, in vitro i in vivo (29,64). U eksperimentalnom modelu PRLR „knockout“ utvrđeno je da nepostojanje PRLR dovodi do usporenog formiranja kosti i manje osteopenije (29). Davanje prolaktina (akutno i u trajanju od 2 nedelje) utiče na promet kalcijuma kako u kompaktnim tako i trabekularnim kostima (65). Inhibicija endogenog PRL bromokriptinom, tokom laktacije, dovodi do smanjenog odlaganja kalcijuma, ali i smanjene resorpcije u femuru, tibii, pršljenovima i sternumu, što potvrđuje da

prolaktin ima ulogu u koštanom „turnoveru“ tokom laktacije (66). Efekat prolaktina na povećano odlaganje kalcijuma u trabekularne kosti, van perioda laktacije, se gubi nakon ovariektomije (67). Dijeta sa povećanim unosom kalcijuma, uz eksperimentalno izazavanu umerenu hiperprolaktinemiju (poput fiziološke hiperprolaktinemije) kod mladih pacova, značajno povećava sadržaj kalcijuma u tibii, za razliku od odraslih, gde ga smanjuje (30). Tokom trudnoće, povećava se koštana gustina femura i pršljenova, dok dugotrajna laktacija vodi gubitku gustine trabekularnih kostiju (68). Po svoj prilici, uticaj prolaktina na koštani sistem, zavisi od životne dobi, od fizioloških stanja (trudnoća, laktacija), unosa kalcijuma i različit je na nivou kortikalnih i trabekularnih kostiju.

4. *Angiogeneza*

Intaktnom prolaktinu, placentalom laktogenu i hormonu rasta pripisuje se uloga aktivatora angiogeneze (69). S druge strane, proteolitički fragment nativnog prolaktina, (16kDa prolaktinski fragment) inhibira razvoj novih krvnih sudova (70, 71). Iako fiziološki značaj ovih suprotnih efekata još uvek nije razjašnjen, nazire se mogućnost terapijske primene niskomolekularnih fragmenata prolaktina kao lokalnih inhibitora angiogeneze.

2.1.4. Neurohumoralna regulacija sekrecije prolaktina

Opšte je prihvaćeno mišljenje da laktotropne ćelije hipofize imaju spontano visoku sekretornu aktivnost. Iz tog razloga je sekrecija prolaktina pod stalnom toničkom inhibicijom hipotalamusa. Ovakav stav proizilazi iz sledećih činjenica: 1) hirurška sekcija pituitarnog stalka rezultuje postepenim porastom koncentracije prolaktina, koji postiže plato u okviru nedelju dana od hirurške intervencije (72), 2) nakon transplatacije prednjeg režnja hipofize ispod bubrežne kapsule, javlja porast koncentracije PRL u serumu (73), 3) u uslovima in vitro, kultura pituitarnih ćelija pokazuje sposobnost spontane sekrecije prolaktina (74).

Međutim, postoje brojne situacije u kojima uklanjanje inhibitornog dejstva hipotalamusa nije dovoljno za postizanje potrebne koncentracije prolaktina, te je neophodno delovanje stimulatornih faktora.

A. Prolaktin inhibirajući faktori

Najznačajniju ulogu u inhibiranju sinteze i sekrecije prolaktina, ima dopamin, ali se izvesna inhibitorna svojstva pripisuju i somatostatinu, kalcitoninu i samom prolaktinu (mehanizam kratke negativne-povratne sprege).

1. *Dopamin*

Glavni inhibitorni hormon prolaktina je dopamin (75,76,77). On se stvara u paraventrikularnim i arkuatnim jezgrama hipotalamusa (78,79). Aksonima putuje do eminencije medijane (tuberoinfundibularnim dopaminergičkim putem) gde se oslobađa u portalnu cirkulaciju kojom stiže do adenohipofize. Nakon što je dopamin dopremljen prednjem režnju hipofize, vezuje se za dopaminske receptore smeštene na površini laktotropa (80,81). Veoma važna postreptorna karika je blokiranje cAMP i sinteze fosfoinozitola koji su neophodni za influks kalcijumskih jona u laktotrope (82,83). Dopamin, vezujući se za dopaminske receptore u hipofizi, blokira sintezu cAMP-a i ulaz kalcijuma u laktotrope, inhibirajući na taj način sintezu i sekreciju PRL (84).

2. *Somatostatin*

Od otkrivanja somatostatina, pokazalo se da ovaj hipotalamički hormon ne inhibiše samo sekreciju hormona rasta već i prolaktina, TSH i ACTH (85,86,87). Identifikacija somatostatinskih receptora u laktotrofima, somatotrofima i tireotrofima, pokazala je da se radi jedinstvenoj klasi receptora (88). Njihovo prisustvo je veoma često i u tumorskim ćelijama koje produkuju prolaktin (89). Činjenica da normalne laktotrofne ćelije, kao i tumorske ćelije mamosomatotrofnog porekla, pokazuju ekspresiju somatostatinskih receptora navodi na zaključak da somatostatin ima izvesno mesto u regulaciji laktotrofa kako u fiziološkim tako i u patološkim stanjima.

3. *Kalcitonin*

Kalcitonin, sintetisan u parafolikularnim ćelijama tireoidne žlezde, je primarno opisan kao hormon koji snižava koncentraciju kalcijuma u plazmi. Međutim, pokazalo se da ovaj polipeptidni hormon može da inhibira sekreciju PRL (90). Imunoreaktivnost kalcitonina je detektovana u CNS-u i laktotropima prednjeg režnja hipofize (91). U uslovima in vitro, kalcitonin inhibira bazalnu i TRH-stimulisanu sekreciju PRL, ne pokazujući pri tom uticaj na GH, LH, FSH i TSH (92,93). Kalcitoninu slični peptidi snižavaju sekreciju prolaktina izazvanu stersom, u uslovima in vivo (94). Vezujući se za svoje receptore na laktotropnim ćelijama, kalcitonin dovodi do smanjene produkcije inozitol fosfata i redukcije slobodnih Ca^{2+} u citozolu, što posledično smanjuje sintezu i sekreciju prolaktina (95).

4. *Prolaktin-mehanizam kratke negativne povratne sprege*

Sam prolaktin utiče na sopstvenu sintezu i sekreciju mehanizmom kratke negativne povratne sprege (96). Povišena koncentracija prolaktina povećava sintezu hipotalamičkog dopamina i koncentraciju dopamina u hipotalamo-hipofiznoj portalnoj cirkulaciji (97). Nakon hipofizektomije ili nakon duže terapije bromokriptinom, sinteza hipotalamičkog dopamina se značajno smanjuje (98).

Otkrivanje PRLR u svim subpopulacijama dopaminergičkih neurona, dalo je i funkcionalnu i anatomsku potvrdu postojanja kratke negativne povratne sprege prolaktina (99).

B. Prolaktin stimulišući faktori

Mada još nije identifikovan specifičan hormon koji oslobađa prolaktin, utvrđeno je da njegovu sekreciju stimulišu brojni hormoni i supstance.

1. Tireoslobađajući hormon (TRH)

Nakon što je izvršena identifikacija TRH iz hipotalamusa, pripisana mu je osnovna uloga u stimulaciji tireostimulišućeg hormona (TSH) adenohipofize. Vrlo brzo se pokazalo da je TRH sposoban da stimuliše i oslobađanje PRL iz laktotropnih ćelija, u uslovima *in vitro* i *in vivo* (100,101). Receptori TRH su pronađeni na većini pituitarnih ćelija, a posebno na laktotropima (102). Vezujući se za svoje receptore, TRH aktivira membransku fosfolipazu C, povećava stvaranje inozitol-3-fosfata i mobilizaciju kalcijuma, neophodnog za sintezu i sekreciju PRL (103).

Međutim oslobađanje prolaktina i TSH su pod nezavisnom kontrolom pri različitim fiziološkim stanjima. Laktacija neće dovesti do podizanja nivoa TSH (104), a primarna hipotireoza nije uvek udružena sa hiperprolaktinemijom. Činjenica da tranzitorno povlačenje dopamina pojačava stimulatívni efekt TRH (105) nije dovoljna da se TRH smatra jedinim autentičnim stimulatorom PRL, već potvrđuje dominaciju dopamina u regulaciji prolaktinske sekrecije.

2. Oksitocin

Oksitocin se sintetiše u paraventrikularnim i supraoptičkim nukleusima i aksonima se transportuje do neurohipofize, gde se kratkotrajno skladišta. Sekretuje se u portalnu cirkulaciju hipofize, gde dostiže 10-15 puta veću koncentraciju u odnosu na perifernu cirkulaciju (106) i pokazuje veliki afinitet za oksitocinske receptore u prednjem režnju hipofize. U uslovima *in vitro*, potentnost oksitocina, kao PRL oslobađajućeg faktora, je vrlo mala (107). Visoke doze oksitocina, podižu nivo prolaktina kod muških ili ovariektomisanih pacova (108). Antagonizovanje oksitocina, u uslovima *in vivo*, redukuje prolaktin u laktaciji (107), blokira endogeni ritam prolaktina kod ženki pacova i skok prolaktina izazvan parenjem (109). Uporedivši koncentraciju oksitocina u adenohipofizi i neurohipofizi, otkrivena je bimodalna sekrecija oksitocina u adenohipofizi koja se podudara sa pikovima sekrecije prolaktina (110). U izvesnim fiziološkim stanjima (ali ne svim) u uslovima *in vivo*, oksitocin, može da deluje kao PRL oslobađajući faktor.

3. *Vazopresin*

Slično oksitocinu, vazopresin se sintetise u paraventricularnim i supraoptičkim jedrima. Doprema se aksonima do neurohipofize, gde se skladišti. Do adenohipofize može doći preko dugačkog ili kratkog portalnog sistema (111). Prisutan je u portalnoj cirkulaciji u visokoj koncentraciji (112), a vazopresinski receptori su detektovani u adenohipofizi (113). Iako u uslovima *in vitro* ne utiče na sekreciju PRL (114), vazopresin indukuje oslobađanje prolaktina *in vivo* (115).

4. *Vazoaktivni intestinalni peptid (VIP)*

VIP je primarno izolovan iz tankog creva (116). Tek kasnijim ispitivanjima, dokazano je njegovo prisustvo u paraventricularnim jedrima hipotalamusa i eminenciji mediana (117,118). Stimulacija oslobađanja prolaktina, pod dejstvom VIP-a dokazana je u uslovima *in vivo* i *in vitro* (119,120). Inhibicijom VIP-a (pasivna imunizacija, kojom se neutralise VIP u plazmi) u potpunosti se blokira pojačano oslobađanje PRL izazvano stersom (121), a parcijalno laktacijom (122). Ovakvi rezultati idu u prilog hipotezi da endogeni VIP ima ulogu hipotalamičnog neurohormona koji stimuliše laktotrofe na pojačanu sekreciju PRL. Obzirom da je pokazano da sami laktotrofi imaju sposobnost oslobađanja VIP-a, to ovom polipeptidu daje i ulogu autokrinog regulatora PRL sekrecije (123).

5. *Angiotenzin II (ANG II)*

Još početkom devedesetih godina utvrđeno je da su sve komponente renin-angiotenzin sistema prisutne u hipofizi (124). Specifični ANG II receptori, subklase AT1, identifikovani su prvenstveno u laktotrofima, a u manjoj meri u kortikotrofima (125). Aplikovan direktno na pituitarne ćelije, u uslovima *in vitro*, ANG II, dovodi do oslobađanja prolaktina, delujući jače i specifičnije od TRH, obzirom da ne pokazuje svoj uticaj na druge pituitarne hormone (126).

Nakon vezivanja ANG II za svoje specifične receptore u adenohipofizi, raste aktivnost fosfolipaze C i povećava se sinteza inozitol-3-fosfata (127) što se smatra najznačajnijom postreceptornom reakcijom. Pod dejstvom inozitol-3-fosfata dolazi do oslobađanja Ca^{2+} jona koji su skladišteni u endoplazmatičnom retikulumu (inicijalna mobilizacija Ca^{2+}), a zatim je za postizanje i održavanje platoa koncentracije Ca^{2+} neophodan influks Ca^{2+} kroz voltažno osetljive kalcijumove kanale (128). Povećana sinteza i sekrecija prolaktina, pod dejstvom ANG II je upravo omogućena zahvaljujući povećanoj koncentraciji Ca^{2+} u laktotropnim ćelijama (129).

6. *Serotonin*

Mada su serotonin receptori identifikovani u adenohipofizi (130) u uslovima *in vitro*, serotonin ne povećava sekreciju prolaktina (131) što navodi na zaključak da serotonin stimuliše sintezu i sekreciju PRL prevashodno kao neurotransmiter, a ne

kao neurohormon. Intravenska infuzija serotonina ili njegovog prekursora, 5-hidroksitriptofana rezultuje porastom nivoa PRL u plazmi, kako kod eksperimentalnih životinja (132) tako i u humanoj populaciji (133). Inhibicija sinteze serotonina u potpunosti obustavlja oslobađanje PRL u laktaciji (134). Isti efekat se postiže davanjem malih doza metisergida (blokator serotoninskih receptora) (135). Takođe je pokazano da stimulativno dejstvo serotonina ne zavisi od koncentracije dopamina u portalnoj cirkulaciji (136). Dopaminska infuzija ne može da spreči stimulativno dejstvo serotonina na PRL (137).

7. *Opioidi*

Nivo prolaktina raste u raznim stresnim situacijama (138). Obzirom da se taj porast blokira antagonistima opijata, poput naloksona, može se zaključiti da u stresnom tipu izlučivanja prolaktina učestvuju endogeni opioidi (139,140,141).

Endogeni opioidi mogu u izvesnoj meri da antagonizuju efekat dopamina na nivou pituitarne žlezde i da samim tim učestvuju u regulaciji sekrecije PRL (142).

2.1.5. Klasifikacija hiperprolaktinemije

Hiperprolaktinemija je veoma čest endokrinološki poremećaj hipotalamo-hipofizne regije. Sama po sebi nije ništa drugo do abnormalan "laboratorijski rezultat" koji ukazuje na prisustvo nekog patofiziološkog procesa (143). Može biti uzrokovana bilo kojim procesom koji utiče na sintezu dopamina, njegov transport do pituitarne žlezde ili na dopaminske receptore u laktotropima (144).

Imajući u vidu kompleksnost različitih etiopatogenetskih mehanizama, hiperprolaktinemija se može klasifikovati u četiri kategorije: A. Fiziološka, B. Patološka, C. Medikamentna i D. Funkcionalna hiperprolaktinemija.

A. Fiziološka hiperprolaktinemija

Brojna su fiziološka stanja koja dovode do očekivanog porasta koncentracije prolaktina u serumu. Najčešća i najpoznatija su svakako trudnoća i laktacija. Pored njih, kratkotrajni porast prolaktina se javlja tokom sna, koitusa, stresa, uzimanja hrane, a manje amplitude su zabeležene i prilikom izlaganja svetlosnim, zvučnim i olfaktornim stimulusima. Stanja fiziološke hiperprolaktinemije ne zahtevaju dalju dijagnostiku, ni terapiju, jer se ostavlja prostor za ispoljavanje normalne biološke aktivnosti prolaktina.

1. Trudnoća

Od pete nedelje trudnoće koncentracija prolaktina u krvi se neprekidno povećava sve do porođaja, zahvaljujući visokim koncentracijama estrogena koje stimulišu rast i deobu hipofiznih laktotropa (145).

Glavna uloga prolaktina u ovom periodu je pripremanje dojki za predstojeći period laktacije (32,33). Ono što posebno karakteriše hiperprolaktinemiju tokom trudnoće

jeste odsustvo galaktoreje. Do porođaja se obično luči svega nekoliko mililitara tečnosti dnevno. Po svom sastavu to je kolostrum, koji u osnovi sadrži istu količinu belančevina i laktoze kao i mleko, ali praktično nema masti. Najčešće se odsustvo galaktoreje pripisuje visokim koncentracijama estrogena i progesterona. Naime estrogen i progesteron, u domenu rasta i diferencijacije dojki pokazuju sinergizam sa prolaktinom, ali i veoma izraženo antagonističko dejstvo prolaktinu u pokretanju laktacije.

Povećane potrebe za kalcijumom tokom trudnoće, zarad rapidne mineralizacije neonatalnog skeleta, predstavljaju značajan stres za homeostazu kalcijuma majčinog organizma. Sve je više podataka koji otkrivaju da tokom trudnoće, hiperprolaktinemija povećava resorpciju kalcijuma iz duodenuma i direktno utiče na koštani sistem majke, sprečavajući negativan bilans kalcijuma (57, 66, 67,68).

2. *Laktacija*

Neposredno nakon rođenja deteta i ekspulzije placente dolazi do naglog pada koncentracije estrogena, što će omogućiti da prolaktin iz majčine hipofize preuzme svoju laktogenu ulogu. U postpartalnom periodu dolazi postepeno do pada koncentracije prolaktina, i normalizacije u periodu između 3. i 7. nedelje puerperijuma. Međutim period laktacije može trajati znatno duže. Za vreme dojenja, mehanički stimulansi koji nastaju u dojkama, prenose se poput nervnih impulsa iz bradavica do hipotalamusa izazivajući talas višestruko pojačane sekrecije prolaktina, koja traje oko jednog sata. Ovaj prolaktin deluje na dojke i obezbeđuje stvaranje mleka za naredni podoj. Koncentracija prolaktina počinje da raste 1-3min od početka dojenja, dostiže pik za 10min, ostaje konstantno povišena sve vreme dojenja i pada čim se podoj završi (146). Period laktacije može trajati i nekoliko godina, ako dete neprekidno sisa, ali se po pravilu lučenje mleka znatno smanji nakon 7 do 9 meseci. Mehanizam kontrole pulsativne sekrecije prolaktina, tokom laktacije, nije u potpunosti razjašnjen. Delimično se može objasniti padom toničke inhibicije uzrokovane mehaničkom stimulacijom bradavica tokom dojenja (147). Međutim, količina oslobođenog prolaktina je daleko veća od one koja se može postići padom dopamina, pa se opravdano daje značaj prolaktin oslobađajućim faktorima poput TRH, vazopresina i oksitocina. Obzirom da se ova sekrecija može blokirati serotoninским antagonistima, poput metisergida, može se zaključiti da je u periodu laktacije sekrecija prolaktina pod serotoninergičkom kontrolom (134,135).

3. *Stres*

Uticaj stresa na sekreciju prolaktina ispitivan je u različitim stresnim situacijama: stres izazvan etrom, zatvaranjem eksperimentalnih životinja (148), promenom temperature (149), hemoragijom (150), socijalnim konfliktom (151). U svakom od ovih eksperimentalnih modela, potvrđen je značajan porast sekrecije prolaktina, ali jedinstven obrazac nastanka ovog porasta, nije utvrđen.

Obzirom da brojne „stresne“ situacije utiču na povećanu sekreciju prolaktina, on se može smatrati i „stres hormonom“.

4. *San*

Koncentracije prolaktina rastu tokom spavanja, naročito u ranoj fazi sna. Ovaj fenomen se može objasniti jedino porukama, koje tokom sna, viši centri šalju hipotalamusu.

5. *Ostali uzroci fiziološke hiperprolaktinemije*

Konstantna izloženost svetlu, rezultuje gubitkom cikličnosti estrogena i prolaktina dovodeći do hiperprolaktinemije, kod pacova (152). Zvuk gladnih novorođenčadi (153), kao i miris (154) dovodi do porasta koncentracije prolaktina kod ženskih pacova.

B. Patološka hiperprolaktinemija

Patološka hiperprolaktinemija podrazumeva postojanje patološkog supstrata koji različitim mehanizmima može da uzrokuje povišenu koncentraciju prolaktina u serumu. Najčešće se radi o primarnim i sekundarnim tumorima, zapaljenskim procesima, nespecifičnim granulomatozama, zračenju, traumi ili vaskularnim abnormalnostima. U zavisnosti od lokalizacije patološkog supstrata do hiperprolaktinemije mogu dovesti: 1. *Lezije u predelu hipotalamusa*, 2. *Lezije u predelu stalka hipofize*, 3. *Lezije na nivou same hipofize* i 4. *Ostali uzroci patološke hiperprolaktinemije* (poput primarne hipotireoze, hronične bubrežne slabosti, ciroze jetre, epileptičnih napada ili povreda grudnog koša).

1. *Lezije u predelu hipotalamusa*

Najčešći uzroci koji dovode do oštećenja hipotalamusa jesu tumori, granulomatozne promene, upalni procesi, kao i metaboličke i degenerativne bolesti CNS-a. Bez obzira na etiologiju, organske lezije u hipotalamusu, uzrokuju gubitak inhibitorne kontrole hipotalamusa. Smanjena sinteza i sekrecija dopamina, dovešće do porasta koncentracije prolaktina. Ovako uzrokovana hiperprolaktinemija retko se javlja kao izolovani poremećaj, a znatno češće je udružena sa drugim poremećajima endokrine funkcije hipotalamusa i oštećenjem različitih neurometaboličkih procesa. Ispadi u endokrinoj funkciji hipotalamusa prezentovaće se pozajmljenom kliničkom slikom izolovanog, parcijalnog ili panhipopituitarizma, ne retko sa prisutnim insipidnim dijabetesom. Poremećaji neurometaboličkih procesa, prezentovaće se različitim psihičkim poremećajima, promenom ličnosti, fluktuacijama u telesnoj temperaturi, poremećajem spavanja i ishrane.

2. *Lezije u predelu stalka hipofize*

Organske lezije u samom stalku hipofize ili u njegovoj neposrednoj blizini, oštećujući tuberoinfundibularni dopaminergički put, smanjuju toničku inhibiciju dopamina

prema prolaktinu, što rezultuje hiperprolaktinemijom. Normalni dijametar stalka hipofize je 2-3mm. Svako proširenje se smatra patološkim stanjem.

Tumorski procesi u kranijumu mogu dovesti do pomaranja položaja peteljke. U veoma niskom procentu kod ljudi ekscentrično postavljena hipofiza ima izvijenu peteljku. U svim ostalim slučajevima, devijacija hipofiznog stalka predstavlja veoma važan znak u neuroradiološkoj dijagnostici koji ukazuje na ekspanzivni proces.

Tumori hipofiznog stalka su izuzetno retki. Primarni tumori češći su od sekundarnih. Od primarnih se mogu sresti germinomi, horistiomi, pituitomi. Ukoliko su dimenzija manjih od 3mm mogu proći asimptomatski. U vrlo niskom procentu su slučajan nalaz na autopsijama. Metastaze u peteljci hipofize mogu se javiti kod karcinoma plućnog parenhima, karcinoma bronha i karcinoma dojke (155). Postoje prikazi vrlo retkih slučajeva gde prva manifestacija primarnog karcinoma pluća bude posledica paraselarnih metastaza i invazije hipotalamusa (156).

Zračenje primenjeno u terapijske svrhe zbog prisustva intrakranijalnih tumora takođe može biti uzrok oštećenja tuberoinfundibularnog dopaminergičkog puta.

Presecanje peteljke hipofize nastaje najčešće kao posledica traume. Pored nepovoljnog endokrinološkog statusa, koji se prezentuje različitim stepenom hipopituitarizma uz hiperprolaktinemiju, anamnestički podatak o povredi glave je često presudan za dalje dijagnostičke procedure i viizuelizaciju prekida peteljke hipofize.

Zapaljenski procesi, metaboličke i degenerativne bolesti CNS-a, kao i granulomatozne bolesti vrlo retko se mogu naći izolovano u peteljci hipofize. Takođe je raritet zahvaćenost stalka i zadnjeg reznja hipofize inflamatornim procesom, koji se manifestuje insipidnim dijabetesom i hiperprolaktinemijom, naziva se infundibularni neurohipofizitis (157).

Vaskularne abnormalnosti, naročito aneurizme karotidne arterije, retki su uzroci hiperprolaktinemije i uglavnom su prezentovani kao sporadični slučajevi. Karotidna aneurizma može biti uzrok reverzibilne pituitarne disfunkcije, a da prateća hiperprolaktinemija navede najpre na pomisao o prisustvu prolaktinoma. Normalan CT nalaz, kao i vraćanje prolaktina u normalu nakon hirurškog rešavanja aneurizme isključuju mogućnost koegzistiranja prolaktinoma (158). Intrakavernozusne aneurizme, mada vrlo retke, mogu se dijagnostičkim procedurama zameniti za hipofizni tumor, pa to zahteva posebnu operznost u preoperativnoj dijagnostici. U tom slučaju ono što se CT-om može predstaviti kao selarna masa sa supraselarnom propagacijom, NMR i arteriografija prikazuju kao kavernoznu aneurizmu i samim tim omogućuju izbor odgovarajućeg hirurškog pristupa koji je dijametralno različit za hipofiznu tumorsku masu i aneurizmu (159). Ispitivanje svakog slučaja pituitarne apopleksije treba ići i u pravcu eventualnog postojanja vaskularne abnormalnosti, jer upravo iznenadna ruptura aneurizme karotidne arterije može biti uzrok pituitarne apopleksije (160).

3. *Lezije u predelu same hipofize*

Ptološke promene na nivou hipofize takođe mogu biti veoma raznolike, ali su najčešći pituitarni adenomi (161).

Tumori hipofize su obično sporo-rastuće, benigne, monoklonalne neoplazme, ali ipak povezane sa signifikantnim morbiditetom i preranim mortalitetom. Pituitarni adenomi dolaze do kliničkog izražaja zahvaljujući efektu "mase" što rezultuje oštećenjem okolnih struktura, ili zahvaljujući manifestacijama koje su posledica ekscesa ili insuficijencije pituitarnih hormona (162). Godišnja incidenca tumora hipofize iznosi iznosi od 0,5 do 7,4 na 100 000 u zavisnosti od pola i starosti, sa najvišom incidencom u žena životne dobi između 15 i 44 god. (163). U poređenju sa drugim neoplazmama, pituitarni adenomi se javljaju češće u populaciji mlađih pacijenata. Relativno niska godišnja incidenca dijagnostikovanih tumora hipofize i veoma duga istorija bolesti ovih neoplazmi otežavaju praćenje kliničkih rezultata u signifikantnom broju pacijenata. Štaviše, različiti tipovi tumora moraju se evaluirati odvojeno, obzirom da svaki ima jedinstvenu frekvencu, patologiju, terapijske pristupe i prognozu (164).

1. Prolaktinomi su sekretorni tumori laktotropnih ćelija hipofize. Više od 70% adenoma hipofize za koje se ranije smatralo da su nefunkcionalni, zapravo su prolaktinomi. Prema veličini tumorske mase dele se na mikroprolaktinome (ispod 1cm) i makroprolaktinome (iznad 1cm). Mikroadenomi mogu proći kao nemi "pituitarni adenomi" što potvrđuje i podatak da se na autopsijama nađe oko 11% mikroadenoma, nedijagnostikovanih tokom života (165). Nivo prolaktina u serumu je u korelaciji sa dimenzijom tumora i što je adenom veći to je i koncentracija prolaktina viša. Prema morfološkim karakteristikama mogu se razlikovati gusto granulisani i retko granulisani prolaktinomi. Gusto granulisani adenomi sastoje se od okruglih ili poligonalnih ćelija, bogatih citoplazmom u kojoj se nalaze gusto raspoređene sekretorne granule. Retko granulisani prolaktinomi sastoje se od okruglih ili poligonalnih ćelija sa retkim malim granulama, koje se osim u citoplazmi nalaze i na spoljašnjoj strani ćelijske membrane. Luče mnogo veće količine prolaktina, češći su u odnosu na gusto granulisane prolaktinome i vrlo dobro reaguju na terapiju agonistima prolaktina. Makroadenomi se češće dijagnostikuju u populaciji pacijenata muškog pola i sa znatno višim koncentracijama prolaktina. Ovo se može objasniti nešto oskudnijom simptomatologijom, koja ostavlja više vremena za napredovanje tumorske mase i kasnije otkrivanje bolesti.
2. Pseudoprolaktinomi su pituitarni tumori kod kojih nije moguće identifikovati povišenu sintezu i sekreciju nekog hormona, pa se još nazivaju i klinički nefunkcionalni tumori (KNFT). Najčešće nastaju od ćelija gonadotropne regije. Imunohistohemijski je dokazano kod većine ovih bolesnika pozitivno bojenje na LH, FSH ili najmanje jednu glikoproteinsku subjedinicu (166). Češći su u ženskoj populaciji, slično prolaktinomima (164). Za razliku od prolaktinoma, KNFT se dijagnostikuju u pacijenata posle 40-e godine, kao makroadenomi, upravo zbog

siromašne simptomatologije. Kompletna fenomenologija ovih adenoma izazvana je pritiskom tumorske mase, sa znacima endokrinološkog deficita ili bez njih. Do hiperprolaktinemije dovode ili:

- ometajući dopaminergičku inhibiciju prolaktina, pritiskom na stalak hipofize, zbog supraselarne propagacije, ili
- povećanjem intraselarnog pritiska, koji deluje stimulatивно na laktotropne ćelije (167).

3. Mešoviti sekretorni adenomi sastavljeni su od laktotrofnih i somatotrofnih ćelija u kom slučaju luče HR i prolaktin ili, mada znatno ređe od kotikotropnih i laktotropnih ćelija stvarajući u većem obimu ACTH i prolaktin. Hiperprolaktinemija koja prati akromegaliju nije iznenađujući nalaz i verifikuje se u trećine pacijenata sa akromegalijom. Objašnjava se činjenicom da somatotrofne i laktotrofne ćelije potiču od zajedničke progenitorne ćelije "mamosomatotrofa" (168).

4. Sekundarni tumori hipofize su veoma retki. Po pravilu se radi o metastazama karcinoma pluća i nešto ređe karcinoma dojki. Morita A i sar. (1998) u svojoj studiji pokazuju da se u 56% pacijenata najpre javljaju simptomi pituitarnih metastaza, a da je prosečno preživljavanje nakon postavljene dijagnoze prisutnih meta u hipofizi, 180 dana (155). Ima prikaza slučajeva, mada su veoma retki, da inicijalna klinička manifestacija mikrocelularnog karcinoma pluća, bude metastatski zahvaćena parotidna žlezda, sa kasnijim zahvatanjem pituitarne žlezde (169). Indirektni znaci koji mogu poslužiti za diferencijalnu dijagnozu primarnih od sekundarnih tumora hipofize jesu sledeći: kod metastatskih tumora su znatno češće okulomotorne pulsacije (42%) u odnosu na adenome hipofize (5%); kod metastatskih tumora je često javljanje insipidnog dijabetesa (33%) prema 1% sa dijagnostikovanim adenomom hipofize (170).

Sindrom prazne sele (empty sella syndrome) je netumorsko uvećanje sele koje se može biti primarno i sekundarno.

1. Primarni „empty sella“ sindrom nastaje kao posledica urođene slabosti dijafragme sele sa prodorom moždanih ovojnica i likvora kroz otvor dijafragme u unutrašnjost turskog sedla. U opštoj populaciji se smatra veoma čestim neuroradiološkim nalazom, koji može uzrokovati hipopituitarizam (171). Iako se sela vizuelizuje kao uvećana, volumen hipofize je obično normalan što je od posebne važnosti za diferencijalno dijagnostikovanje u odnosu na sekundarni sindrom prazne sele. Većina bolesnika sa primarnim sindromom prazne sele su gojazne višerotkinje, sa glavoboljama. Oko 30% njih ima hipertenziju. Endokrini poremećaji su relativno retki. Hiperprolaktinemija je retka prezentacija ovog sindroma (172) a najverovatnije je uzrokovana istezanjem peteljke.

2. Sekundarni „empty sella“ sindrom posledica je lezije same hipofize. Najčešće se radi o spontanoj nekrozi tumora hipofize, apopleksiji pituitarne regije, operativnom ili radijacionom lečenju pituitarnog tumora. Do sekundarne, parcijalne empty selle može dovesti dugotrajna upotreba doping sredstava (hormona rasta, testosterona i tireoidnog hormona) za koje se pretpostavlja da dovode do porasta intrakranijalnog pritiska i manifestacije „empty sella“ sindroma (173). Osim što je povećan

volumen sele, u sekundarnom sindromu empty selle, izrazito je povećan i volumen same hipofize.

Hipofizitis. Inflammatorne lezije pituitarne žlezde, hipofizitisi, mogu se podeliti na primarne i sekundarne.

1. Primarni ili idiopatski hipofizitis odnosi se na zapaljenski proces hipofize nepoznate etiologije. Danas se smatra najčešćom formom pituitarne inflamacije. Do sada su poznata tri histopatološka oblika primarnog hipofizitisa: limfocitni hipofizitis, granulomatozni hipofizitis i ksantomatozni hipofizitis (174).
2. Sekundarni hipofizitis podrazumeva zapaljenski proces uzrokovan poznatim etiološkim uzročnikom ili sistemskom bolešću (175). Bio je znatno češći u prošlosti nego danas. Opisani su bakterijski, virusni i gljivični uzročnici. Sistemske inflamatorne bolesti koje mogu zahvatiti hipofizu jesu sarkoidoza (176), Wegenerova granulomatoza (177), Takajašijeva bolest (178), Kronova bolest (179) i histiocitoza (180). Lakše se dijagnostikuje od primarnog hipofizitisa, jer pacijenti po pravilu imaju i druge sistemske manifestacije osnovne bolesti. U odsustvu sistemskih manifestacija, vrlo često predstavljaju „zaboravljen“ uzrok hiperprolaktinemije.

4. *Ostali uzroci patološke hiperprolaktinemije*

Hronična bubrežna insuficijencija. Uremični pacijenti imaju različite endokrine poremećaje poput sekundarnog hiperparatiroidizma, tireoidne disfunkcije, azospermije, amenoreje, infertiliteta, pa i hiperprolaktinemije. Patogeneza ovih poremećaja je kompleksna. U njenoj osnovi je izmenjen metabolizam i ekskrecija hormona, ali takođe i promenjeno stvaranje i metabolizam hormona.

Primarni hipotireoidizam. Kod pojedinih pacijenata sa primarnom hipotireozom može se javiti hiperprolaktinemija. Mehanizam nastanka povišene koncentracije prolaktina objašnjava se stimulativnim efektom TRH ne samo na tireotrofne, već in a laktotrofne ćelije hipofize (100,101). Primarni hipotireoidizam i prateći sindrom hiperprolaktinemije, mogu dovesti i do tranzitornog pituitarnog uvećanja (181,182). Ovakvo uvećanje hipofize, koje se vizuelizuje i NMR-om, može se objasniti hiperplazijom pituitarnih tirotrofa i/ili laktotrofa (183). Supstituciona terapija tireoidnih hormona dovodi do potpune normalizacije svih kliničkih, biohemijskih, radioloških i endokrinih abnormalnosti.

Ciroza jetre. Kako se najveći deo prolaktina metaboliše u jetri, razumljivo je da će svaka insuficijencija jetre, bez obzira na etiopatogenezu, dovesti do sporije razgradnje prolaktina, dužeg zadržavanja u cirkulaciji i sledstvene hiperprolaktinemije.

Trauma zida grudnog koša. Hirurške intervencije, povrede, herpes zoster grudne lokalizacije, pa čak i opekotine grudnog koša (184) mogu biti praćene galaktorejom i/ili amenorejom usled povišenih koncentracija prolaktina. Ova "neurogena hiperprolaktinemija" nastaje stimulacijom odgovarajućih dermatoma. Hronična stimulacija nervnih završetaka u grudnom košu, koji čine aferentni luk do

hipotalamo-hipofizne regije uslovaljava hiperprolaktinemiju (185) koja se normalizuje interkostalnom nervnom blokadom i bromokriptinskom terapijom.

Epileptični napadi. Koncentracija prolaktina u serumu raste nakon generalizovanog tonično-kloničnog epi napada, nakon složenih parcijalnih napada i nakon nekih jednostavnih parcijalnih epi napada. Apsensi i mioklonični epi napadi ne utiču na nivo prolaktina u serumu (186). Prevalenca hiperprolaktinemije je povećana kod žena sa epilepsijom (187) naročito u slučaju zahvaćenosti temporalnog lobusa (188). Ponavljani epileptični napadi i primenjena elektrokonvulzivna terapija, postepeno dovode do sve manjeg porasta prolaktina (186).

C. Medikamentna hiperprolaktinemija

Farmakološka ili medikamentna hiperprolaktinemija predstavlja neželjeno dejstvo primenjenog leka u terapijskoj dozi.

Brojni su lekovi koji mogu dovesti do hiperprolaktinemije. Mnogi od njih su indikovani u lečnju hroničnih bolesti i zahtevaju dugotrajnu primenu. Sve se više pažnje posvećuje činjenici da prolongirana medikamentna hiperprolaktinemija nosi sa sobom brojne posledice. Neke od njih su: smanjena funkcija gonada, infertilnost, pad libida, atrofija uterusa i vaginalne mukoze, recidivantni nepuerperalni mastitisi, gubitak koštane mase.

Na osnovu mehanizma kojim uzrokuju hiperprolaktinemiju, farmakološki agensi se mogu podeliti na : 1. *Antagoniste dopaminskih receptora*, 2. *Agense koji izazivaju depleciju dopamina* i 3. *Ostale medikamente koji mogu dovesti do hiperprolaktinemije*.

1. Antagonisti dopaminskih receptora

Antidopaminergici svoje dejstvo ispoljavaju vezivanjem i blokadom dopaminskih (D₂) neuroreceptora. Oni obuhvataju 1. antipsihotike i 2. prokinetike.

1. Antipsihotici

Prva generacija antipsihotika (konvencionalni antipsihotici)

Na osnovu hipoteze da mezolimbčki dopaminergički sistem zauzima glavno mesto u nastanku psihotičnih simptoma, generisani su brojni antipsihotici sa ciljem da svoje efekte ispolje upravo u ovom sistemu. Njihove zajedničke karakteristike su blokiranje dopaminskih D₂ neuroreceptora i uzrokovanje neuroleptičnog sindroma (psihomotorno kočenje i afektivna indiferentnost). Oni predstavljaju *prvu generaciju antipsihotika (konvencionalni antipsihotici)* i obuhvataju fenotiazine, butirofenone i tioksantene.

Fenotiazini. Najpoznatiji fenotiazini su: hlorpromazin, flufenazin, levopromazin, trifluperazin i tioridazin.

Butirofenoni. Najčešće primenjivani predstavnici ove grupe lekova jesu: haloperidol, droperidol i penfluridol.

Tioksanteni. Najvažniji predstavnici ove grupe lekova su hlorprotiksen, kloptentiksol i flupentiksol.

Svi konvencionalni antipsihotici blokiraju D₂ receptore na laktotropnim ćelijama i sprečavaju inhibitorno dejstvo dopamina na sekreciju prolaktina. Hiperprolaktinemija se javlja nekoliko sati nakon početka terapije (189). U narednih 3-9 nedelja, terapijske doze antipsihotika mogu dovesti i do desetostrukog uvećanja prolaktina (190). Koncentracija prolaktina u serumu raste sa povećanjem doze primenjenog neuroleptika (191). Obustavljanje antipsihotične terapije rezultovaće normalizacijom prolaktina u periodu od 3 nedelje do 6 meseci, što zavisi od polživota leka i njegovih metabolita, kao i od deponovanja u masnom tkivu (192, 193).

Druga generacija antipsihotika (atipični antipsihotici)

U daljem razvoju antipsihotika, sem težnje da se postigne jača dopaminska blokada (194) dosta se pažnje posvećivalo i redukciji sporednih efekata izazvanih blokadom D₂ receptora van mezolimbičke regije. Najznačajnije je svakako bilo suprimirati ekstrapiramidalni sindrom nastao dopaminergičkom blokadom u striatumu (195). Otkriće, da je klozapin efikasniji od hlompromazina, sa znatno manjim ekstrapiramidalnim simptomima, smatra se početkom druge generacije antipsihotika (196). *Druga generacija antipsihotika*, naziva se *atipičnim antipsihoticima*, jer svoje dejstvo ispoljavaju ne samo preko dopaminskih, već i preko drugih neuroreceptora. Ovoj grupi pripadaju: klozapin, olanzapin, risperidon, ziprasidon, amisulprid.

Atipični antipsihotici u manjoj meri dovode do hiperprolaktinemije. Razlog tome može biti veći afinitet za druge neuroreceptore u odnosu na dopaminske, ili brža i različita dinamika u vezivanju D₂ receptora (brže vezivanje i brža disocijacija) (197).

Klozapin i olanzapin mogu uzrokovati porast koncentracije prolaktina u serumu, ali umereno i tranzitorno (198, 199). Risperidon i amisulprid po pravilu dovode do značajne hiperprolaktinemije, koja se održava sve dok terapija ovim antipsihoticima traje (200, 201).

2. Prokinetici

Antidopaminergički gastrointestinalni prokinetici predstavljaju grupu lekova koji imaju široku kliničku primenu kod poremećaja motiliteta gornjeg digestivnog trakta, uključujući funkcionalnu dispepsiju, stazu želuca različitog porekla i povraćanje (202). Vezivanjem za periferne D₂ receptore (u gastrointestinalnom traktu) ispoljavaju prokinetičko dejstvo (203), dok blokadom centralnih D₂ receptora (u postremalnoj regiji) deluju kao antiemetici (204). Antiemetički efekat prokinetika zavisiće od permeabilnosti krvno-moždane barijere za određeni preparat. Obzirom da se pituitarna žlezda nalazi van ove barijere, hiperprolaktinemija će se javiti kod svih antidopaminergičkih prokinetika. U najvećem broju slučajeva, do porasta prolaktina u serumu dolazi nakon 3 dana do 2 nedelje od početka terapije (205). Stepent hiperprolaktinemije opada sa prolongiranom primenom antidopaminergičkih prokinetika, a nedelju dana nakon obustave terapije, galaktorea se povlači (202). Najčešće primenjivani prokinetici su: domperidon, levosulpirid, bromoprid i metoklopramid.

2. *Agensi koji izazivaju depleciju dopamina*
 1. Metildopa. Metidopa je inhibitor DOPA-dekarboksilaze, enzima koji pomaže nastajanje dopamina iz 1-DOPA (dihidroksi-fenil-alanin). Usled ovakvog delovanja nastaje depresija biosinteze kateholamina, smanjuje se inhibitorski dopaminergički učinak na sintezu i sekreciju prolaktina i dolazi do hiperprolaktinemije.
 2. Rezerpin. Mehanizam dejstva reserpina jeste da prazni depoe kateholamina u adrenergičkim nervnim strukturama centralnog i perifernog nervnog sistema. Na isti način deluje i na nivou tuberoinfundibularnog dopaminergičkog puta gde snižavajući koncentraciju dopamina, dovodi do hiperprolaktinemije.
3. *Ostali medikamenti koji mogu dovesti do hiperprolaktinemije*

Antidepresivi sa serotoninergičkim dejstvom, kao što su inhibitori monoamino oksidaze (MAO inhibitori), ticiklični antidepresivi, pa čak i selektivni inhibitori serotoninog preuzimanja (SSRI) mogu da uzrokuju umerenu hiperprolaktinemiju (206). Starije generacije antidepresiva, ispoljavaju svoje dejstvo preko serotoninergičkog, dopaminergičkog i noradrenergičkog sistema. Upravo ova neselektivnost može objasniti hiperprolaktinemiju (smanjenje toničke dopaminergičke inhibicije).

Većina antidepresiva (kako ticiklični antidepresivi tako i mianserin, antidepresiv II generacije) inhibiše enzim triptofan-pirolazu u jetri, uzrokuje porast koncentracije triptofana, čime povećavaju sintezu serotoninina u mozgu. Posledična hiperprolaktinemija se može objasniti direktnim stimulativnim dejstvom serotoninina na sekreciju prolaktina (132,133) ili može biti rezultat povećane sekrecije vazoaktivnog intestinalnog peptida (VIP) i oksitocina pod dejstvom serotoninina (207).

Novije generacije antidepresiva se karakterišu većim stepenom selektivnog dejstva na serotoninergički sistem, pa se opravdano očekivala i manja učestalost hiperprolaktinemije, kao neželjenog dejstva. SSRI (selective serotonin reuptake inhibitors) svoje terapijske efekte postižu blokiranjem presinaptičkih receptora serotoninina, nedozvoljavanjem ponovnog preuzimanja serotoninina („reuptake) na nivou presinapsi i povećanjem koncentracije serotoninina u samim sinapsama (208). Mada pojedini SSRI agensi interaguju sa drugim neurotransmiterskim sistemima (uključujući i dopaminergički) stimulacija prolaktina je najverovatnije uzrokovana serotoninergičkim mehanizmom (209, 210) koji još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Najčešće korišćeni SSRI su: sertralin, fluoksetin, paroksetin, fluvoksamin i citalopram. Svi mogu dovesti do hiperprolaktinemije (211) izuzev citaloprama koji je jedini SSRI preparat bez statistički značajne hiperprolaktinemije.

Estrogen je dobro poznat modulator sinteze i sekrecije prolaktina. Svakodnevno uzimanje estrogenskih preparata, dovodi do stimulacije sekrecije prolaktina već nakon 2-3 dana od početka terapije (212). Svoje dejstvo ispoljava direktno, vezujući se za estrogenske receptore na laktotrofnim ćelijama (dovodi do povećane transkripcije PRL gena) (213), i indirektno, preko hipotalamusa, gde utiče na hipotalamički VIP (214) i gensku ekspresiju oksitocina (215).

Opijati. Karakteristika svih opijata jeste da smanjuju oslobađanje velikog broja neurotransmitera poput acetilholina, noradrenalina, serotonina, supstance P i dopamina. Hiperprolaktinemija nastaje upravo zbog smanjene toničke inhibicije dopamina.

Verapamil pripada grupi blokatora kalcijumovih kanala. Mehanizam njegovog delovanja ogleda se u selektivnom vezivanju za voltažne kalcijumske kanale. Blokiranjem kalcijumovih kanala, verapamil, dovodi do porasta prolaktina tako što na nivou hipotalamusa smanjuje stvaranje dopamina, te slabi inhibitorni dopaminergički efekt hipotalamusa (216). Blokada kalcijumovih kanala pod dejstvom ovih lekova je delimično reverzibilan proces, jer se povećanjem koncentracije kalcijuma može delimično ili potpuno otkolniti. Antagonizovanje ovog bloka moguće je i pomoću adrenergičkih antagonista koji povećavaju transmembranski prolaz kalcijuma.

Inhibitori proteaze, koriste se u aktivnoj antiretrovirusnoj terapiji i u profilaktične svrhe, nakon ekspozicije. U izvesnog broja pacijenata, zabeležena je galaktoreja, kao posledica hiperprolaktinemije. Etiopatogenetski mehanizam povrasta prolaktina nije u potpunosti razjašnjen. Jedna je mogućnost da je ova reakcija na primenjenu terapiju posledica direktnog efekta inhibitora proteaze. A druga, da inhibitori proteaze oocupirajući kompleks enzima citohrom P450, potenciraju efekte dopaminskih antagonista (217).

D. Funkcionalna hiperprolaktinemija

Hiperprolaktinemija, čiji uzrok ostane nepoznat i pored opsežnih dijagnostičkih pretraga, klasifikuje se kao “idiopatska” ili funkcionalna hiperprolaktinemija (218). U zavisnosti od tehničke opremljenosti dijagnostičkih centara, a vrlo često i od upornosti kojom se traži uzrok hiperprolaktinemije, procenat idiopatske hiperprolaktinemije iznosi 8,5-40%. Kod izvesnog broja pacijenata sa funkcionalnom hiperprolaktinemijom, moguće je prisustvo mikroadenoma hipofize, koji se zbog izuzetno malih dimenzija ne može vizuelizovati NMR-om.

Brojni su podaci koji idiopatsku hiperprolaktinemiju pokušavaju da objasne kao autoimuni proces. Antiprolaktinska autoantitela (IgG) vezuju se za prolaktin i stvaraju kompleks PRL-PRLAt, koji se znatno sporije uklanja iz cirkulacije, tu se akumulira i dovodi do hiperprolaktinemije. Iako je koncentracija prolaktina u serumu povećana, kompleks PRL-PRLAt ne može da dospe do hipotalamusa (zbog nemogućnosti da prođe barijeru kapilarnog zida) tako da negativna povratna sprega na nivou hipotalamusa izostaje (10, 219, 220).

Kao mogući etiopatogenetski mehanizam funkcionalne hiperprolaktinemije, razmatra se i povećana sinteza i sekrecija prolaktina van laktotropnih ćelija. Produkcija prolaktina je zapažena u CNS-u i to: hipotalamusu, telencefalonu, kori velikog mozga i hipokampusu (221). Negravidan uterus se takođe pokazao kao moguće mesto sinteze prolaktina. U miometriumu neskotnih pacova, identifikovan je prolaktin, koga nije bilo moguće razlikovati od pituitarnog (222).

2.2. Metabolizam kalcijuma

Kalcijum je jedan od najzastupljenijih elemenata u organizmu čoveka. Prisutan je u količini od oko 1000g kod odraslih. Igra ključnu ulogu u skeletnoj mineralizaciji, kao i u širokom spektru bioloških funkcija. Ovaj esencijalni element je organizmu dostupan isključivo putem unosa hranom. Aktuelne preporuke za dnevni unos kalcijuma, u zavisnosti od starosne dobi, iznose 1000-1500 mg/d (223).

2.2.1. Distribucija kalcijuma

Većina ukupnog kalcijuma u organizmu (>99%) nalazi se u skeletu kao kompleks kalcijum-fosfata, primarno hidroksiapatita, koji je odgovoran za mnoge karakteristike koštanog sistema (224). Dve su osnovne uloge kalcijuma u kostima: 1. obezbeđuje čvrstinu skeleta i 2. omogućuje dinamiku skeletnog kalcijumskog pula, neophodnu za održavanje intra- i ekstracelularnog kalcijuma.

Manje od 1% ukupnog kalcijuma u organizmu pripada „nekoštanom“ kalcijumu ($\approx 10g$ kod odraslih). On je odgovoran za brojne esencijalne funkcije, uključujući transmisiju nervnih impulsa, ekstra- i intracelularnu signalizaciju i mišićne kontrakcije (225, 226). U stalnoj je i brznoj razmeni sa različitim „pulovima“ kalcijuma. Opseg referentnih vrednosti ukupnog kalcijuma u serumu je vrlo uzan i iznosi 2,20-2,65 mmol/l. Njega čine: slobodni jonizovani kalcijum ($\approx 51\%$), kompleks kalcijum-protein ($\approx 40\%$) i kompleksi jonizovanog kalcijuma ($\approx 9\%$) (227). Da bi se izbegla toksičnost kalcijuma, koncentracije jonizovanog kalcijuma se moraju održavati u fiziološkom okviru od 1-1,35mmol/l. Nejonizovani kalcijuma se vezuje za različite proteine i anjone, kako u ekstracelularnoj, tako i u intracelularnoj sredini. Najvažniji kalcijum-vezujući proteini u serumu, su albumini i globulini, a intracelularno kalmodulin. Najzastupljeniji kompleksi jonizovanog kalcijuma u serumu su kalcijum-fosfat, kalcijum-karbonat i kalcijum-oksalat.

2.2.2. Bilans kalcijuma

Bilans kalcijuma predstavlja stanje kalcijumskih depoa u organizmu, posmatrano u dužem vremenskom periodu (dani, nedelje ili meseci). Rezultat je odnosa intestinalne resorpcije kalcijuma i ekskrecije kalcijuma putem bubrega, intestinuma i znojnih žlezdi. Obzirom da je skeletni sistem najveće skladište kalcijuma, promene u bilansu kalcijuma će se najpre odraziti na koštani kalcijum. Koštani kalcijumski bilans može biti pozitivan, neutralan ili negativan. On zavisi od brojnih faktora, kao što su rast, starenje, stečene i nasledne bolesti. Tokom različitih životnih doba, koštani bilans kalcijuma je podložan promenama, ali uvek zavisi od odnosa koštane formacije i resorpcije. Pozitivan koštani bilans je prisutan u dečijem dobu (formacija > resorpcije) što omogućava normalan rast skeleta. Zdrava, mlađa odrasla populacija se karakteriše neutralnim koštanim bilansoma (formacija = resorpcija) koji pokazuje da je postignut pik koštane mase. Kod starijih individua tipičan je negativan koštani bilans (formacija < resorpcije) koji vodi gubitku koštane mase. Faktori koji mogu dovesti do pozitivnog koštanog bilansa kod odraslih

jesu fizička aktivnost, anabolici i antiresorptivna terapija. Patološka stanja, poput sindroma „gladnih kostiju“ i osteoblastičnog kancera prostate, mogu takođe uticati na povećanu koštanu formaciju u odnosu na resorpciju, pa samim tim mogu dovesti do pozitivnog koštanog bilansa. S druge strane, imobilizacija, gubitak na telesnoj težini kao i deficit polnih steroida, mogu uzrokovati negativan koštani bilans kod odraslih.

2.2.3. Metode merenja bilansa kalcijuma

Obzirom da je kalcijum u najvećoj meri skladišten u koštanom sistemu, razvijene su mnogobrojne vizuelizacione tehnike merenja koštanog mineralnog sastava, na osnovu kojih se može proceniti stanje ukupnog kalcijuma u organizmu. Kako koštani sistem ne predstavlja inertan organ, već ga odlikuje stalna formacija i resorpcija koštanog tkiva, koriste se i mnoge biohemijske analize za procenu koštanog metabolizma.

A. Vizuelizacione tehnike

Vizuelizacione tehnike, kao što su dual x-ray apsorptimetrija (DXA), kompjuterizovana tomografija (CT) i nuklearna magnetna rezonanca (NMR) mereći mineralni sastav koštanog sistema, obezbeđuju dobru procenu ukupnog kalcijuma u organizmu. Ponavljana merenja koštanog mineralnog sastava (najčešće jednom godišnje) pokazuju bilans kalcijuma u dužem vremenskom periodu. Koštana gustina raste tokom detinjstva (228), dostiže pik u doba adolescencije (229), ostaje relativno konstantna u mlađem, odraslom životnom dobu (230) i opada sa starenjem.

Longitudinalna merenja koštane gustine verifikuju nastale promene u skeletnom sistemu, ali ne daju objašnjenje kako su one nastale.

B. Biohemijski markeri koštanog metabolizma

Određivanje biohemijskih markera koštanog metabolizma je veoma važan dodatak vizuelizacionim tehnikama, zarad boljeg razumevanja promena u skeletnom sistemu (231).

Smenjivanje koštane formacije i resorpcije, tokom čitavog životnog veka, rezultuje remodelovanjem kosti. Ovaj dinamični metabolički proces ima dva osnovna cilja: 1. prilagođavanje koštane arhitekture mehaničkim potrebama i 2. održavanje nivoa kalcijuma. Remodelovanje se odigrava u svim kostima, bilo da su one kortikalne ili trabekularne, ali je znatno brže i izraženije u trabekularnim kostima. Metabolički aktivne ćelije koštanog sistema, u kojima se odvijaju procesi formacije i resorpcije, jesu osteoblasti i osteoklasti. Osteoblasti su poreklom iz mezenhimalne stem ćelije koštane srži. Mesto su formiranja (sinteze) nove kosti i zaslužne su za oblikovanje skeleta kako bi pružio optimalnu performansu. Osteoklasti su poreklom iz hematopoetične stem ćelije, resorbuju kost i doprinose održavanju mineralne homeostaze. Produkti ovih metaboličkih procesa naći će se u cirkulaciji. Određivanjem njihove koncentracije u serumu, dobijaju se značajni podaci o koštanom metabolizmu.

Mada su koštana resorpcija i formacija nove kosti, usko povezani procesi, biohemijski parametri koštanog metabolizma su podeljeni u dve grupe: 1. *Markere koštane formacije* i 2. *Markere koštane resorpcije*.

1. *Markeri koštane formacije*. Produkti osteogeneze (koštane formacije) ili faktori sekretovani od strane osteoblasta daju značajne podatke o stepenu koštane formacije. Najčešće korišćeni markeri koštane formacije (sinteze) su: alkalna fosfataza, osteokalcin, amino- i karboksi-terminalni propeptid prokolagena tip I. Indirektni su pokazatelji osteoblastne aktivnosti.

1. Alkalna fosfataza. Najstariji marker koštane formacije, koji se i danas koristi, je merenje enzimske aktivnosti alkalne fosfataze (AP). Alkalna fosfataza je ektoenzim, vezan za membranu, koji dovodi do hidrolize monofosfatnih estara u baznoj sredini (pH 8-10) (232). U kostima učestvuje u inicijaciji koštane mineralizacije. Dovodi do hidrolize pirofosfata i obezbeđuje fosfat neophodan za mineralizaciju. Povišene vrednosti AP u serumu pokazatelj su povećane osteoblastne aktivnosti. Ono što joj se najviše zamera jeste niska senzitivnost i specifičnosti. Naime, alkalna fosfataza u serumu može biti poreklom iz kostiju, ali i drugih tkiva kao što su jetra, gastrointestinalni trakt, bubrezi, placenta, pa čak i pojedinih tumorska tkiva. Obzirom da je struktura proteina alkalne fosfataze iz različitih tkiva veoma slična (ako ne i identična) nije moguće kvantifikovati enzimsku aktivnost alkalne fosfataze iz kostiju u odnosu na druga tkiva.

Određivanje aktivnosti AP i danas se koristi kao značajan klinički test za praćenje bolesti u kojima je veoma izražena osteoblastna aktivnost. Pacijenti sa Paget'ovom bolešću, osteomalacijom, renalnom osteodistrofijom, uznapredovalim hiperparatireoidizmom, imaju značajno povišene vrednosti AP.

Kod pacijenata sa manje dramatičnim biohemijskim promenama skeleta, kao što je osteoporoza, merenje aktivnosti AP je od malog značaja (233).

2. Osteokalcin. Osteokalcin (OC) je koštani, specifičan, nekolagenski protein. Sastoji se od 49 aminokiselina i sintetise se isključivo u osteoblastima i odontoblastima (234). Za njegovu aktivnost su od najvećeg značaja tri ostatka glutamične kiseline, koja modifikuje γ -glutamil karboksilaza (235). Ova γ -karboksilacija osteokalcina, daje mu visok afinitet za mineralne jone, omogućava privlačenje jona kalcijuma i njihovu ugradnju u kristale hidroksiapatita, koji čini približno 70% koštanog tkiva (236). Osteokalcin se smatra vitamin K-zavisnim proteinom, iz razloga što je vitamin K kofaktor γ -glutamil karboksilaze, enzima neophodnog za karboksilaciju OC (235,236). Poznat je još pod nazivom koštani GLA protein (GLA: γ -karboksi-glutaminska kiselina). Najveći deo OC se odlaže u ekstracelularni matriks kostiju, a mala količina dospeva u cirkulaciju.

Osteokalcin je senzitivn i specifičan marker osteoblastične aktivnosti i njegov nivo u serumu odraz je koštane formacije. Eliminise se putem bubrega, što znači da nivo osteokalcina delom zavisi od bubrežne funkcije.

Koncentracija OC biće povećana kod različitih bolesti skeleta u čijoj je osnovi povećana osteoblastična aktivnost. Može se koristiti za praćenje osteomalacije, osteitis fibrosa-e, koštanih metastaza, ali i za bolesti sa umerenijim biohemijskim promenama poput osteoporoze.

Kod pacijenata sa renalnom osteodistrofijom, pouzdanost koncentracije OC je smanjena zbog bubrežne slabosti i dužeg zadržavanja OC u cirkulaciji (237). U Paget'ovoj bolesti osteokalcin pokazuje veoma malu senzitivnost (238).

Povišene koncentracije OC se javljaju u hipertireoz i akromegaliji i hipervitaminozi D (239, 240).

Pad koncentracije OC zabeležen je prilikom davanja kalcitonina, glukokortikoida i estrogena (241). Obzirom da je genska ekspresija OC direktno regulisana kortikosteroidima i 1,25 OH D₃, koncentraciju OC, kod pacijenata tretiranih ovim hormonima treba oprezno interpretirati (242).

Menopauza, različite faze menstrualnog ciklusa i trudnoća takode utiču na koncentraciju OC u serumu, što treba imati u vidu prilikom analize rezultata (243, 244). Mada je interpretacija osteokalcina limitirana u ovim stanjima, on ipak ispunjava sve karakteristike pouzdanog koštanog markera: 1. specifičan je za kost, 2. raste sa porastom koštane formacije i 3. brzo odgovara (u okviru nekoliko sati) na promene skeletne homeostaze (245).

3. Peptidi prokolagena tip I. Kolagen tip I je glavni produkt osteoblasta, koji čini 90% svih koštanih proteina (233). Nastaje iz prokolagena tip I. Delovanjem specifičnih proteaza, u ekstracelularnom prostoru, od prokolagena tip I nastaje kolagen tip I. Tokom ove konverzije, od prokolagena se odvajaju propeptidi koji se završavaju amino- ili karboksi grupom. Odatle su i dobili naziv *prokolagen tip I amino terminalni propeptid* (P1NP) i *prokolagen tip I karboksi terminalni propeptid* (P1CP). Kada je konverzija prokolagena u kolagen povećana, ovi propeptidi se otpuštaju u cirkulaciju, tako da se mogu koristiti kao markeri koštane formacije.

Koncentracije P1NP-a i P1CP-a će biti povećane u poremećajima koji se karakterišu ubrzanim koštanim metabolizmom, kao što su: hiperparatireoidizam, hipertireoza, osteomalacija, Paget'ova bolest i metastaze u kostima.

Određivanje P1CP-a je od manjeg značaja u osteoporozi (246) za razliku od P1NP-a koji se pokazao kao vrlo senzitivn marker koštane formacije, u različitim situacijama, uključujući i monitoring terapijskog efekta PTH u osteoporozi (247).

2. *Markeri koštane resorpcije.* Produkti osteolize, ili faktori sekretovani od strane osteoklasta, pružaju uvid u stepen koštane resorpcije. Mnogi od njih zavise od dijetarnog unosa kalcijuma i hrane bogate kolagenom. Njihovo određivanje u urinu je vrlo često nepouzđano zbog različitog stepena reapsorpcije na nivou bubrežnih tubula. Međutim, kako koštana resorpcija prethodi koštanoj formaciji, određivanjem markera koštane resorpcije mogu se detektovati najranije promene u koštanom metabolizmu. Kao markeri koštane resorpcije mogu se koristiti: određivanje kalcijumureze, merenje koncentracije hidroksiprolina i hidroksilizina u urinu, merenje aktivnosti kisele fosfataze i određivanje koncentracije piridinolina, dezokspiridinolina, karboksi- i amino-telopeptida kolagena tip I.

1. Kalcijum u urinu. Merenje kalcijumureze je jedna od najstarijih i najjeftinijih metoda, koja se može koristiti za procenu stepena koštane resorpcije. U velikoj meri, ekskrecija kalcijuma zavisi od bubrežne funkcije i unosa kalcijuma hranom, pa je senzitivnost ove metode vrlo mala.

2. Hidroksiprolin u urinu. Hidroksiprolin je jedna od amino kiselina kolagena. Njena koncentracija u urinu biće povišena u svim stanjima povećane razgradnje kolagena tokom ubrzane koštane resorpcije. Međutim, najveći deo hidroksiprolina, nastalog razgradnjom kolagena, reapsorbuje se na nivou bubrežnih tubula i razgrađuje se u jetri. Samo 10% hidroksiprolina se ekskretuje putem bubrega. Povećan unos hrane bogate kolagenoma, poput mesa, takođe dovodi do porasta koncentracije hidroksiprolina u urinu. Zbog svega toga, hidroksiprolin nije idealan marker koštane resorpcije, ali može pružiti korisne informacije, ako se korektno određuje.

3. Hidroksilizin u urinu. Hidroksilizin je druga amino kiselina kolagena. U urinu se mogu detektovati dve glikozidne forme hidroksilizina. Jedna od njih je *galaktozil-hidroksilizin* koja je prilično specifičan marker degradacije koštanog kolagena. Obzirom da se ne reapsorbuje na nivou bubrežnih tubula i da ne zavisi od dijetarnog režima, senzitivnija je od hidroksiprolina u urinu.

4. Kisela fosfataza. Kisela fosfataza je lizosomalni enzim, prisutan u kostima, hrskavici, prostati, trombocitima, eritrocitima i slezini. Iako ima brojne izoenzime, određivanje aktivnosti izoenzima specifičnog za kosti, može se koristiti kao indirektni pokazatelj koštane resorpcije. Osteoklasti sekretuju aktivni enzim (kiselu fosfatazu) nakon vezivanja za površinu kosti. Enzim dospeva u cirkulaciju, gde se inaktiviše i razgrađuje. Merenje katalitičke aktivnosti kisele fosfataze u cirkulaciji, reflektovaće stoga, skoro otpušten enzim kao rezultat koštane resorpcije. U poređenju sa hidroksiprolinom u urinu, senzitivnost kisele

fosfataze, kao markera koštane resorpcije se ipak dovodi u pitanje (248), a pojedini autori smatraju da kisela fosfataza reflektuje broj osteoklasta, pre nego njihovu aktivnost (249).

5. Piridinolin i dezoksipiridinolin. Piridinolin (PYD) i dezoksipiridinolin (DPD) nastaju posttranslacionom modifikacijom lizina i hidrosilizina. Njihova osnovna uloga jeste stabilizacija kolagena tip 1. Peptidni lanac kolagena na svojim krajevima ima karboksi- i amino grupu. Za ove završetke se vezuju teleopeptidni lanci. Unakrsna veza između kolagena i teleopeptida se ostvaruje uz pomoć PYD-a i DPD-a. Za vreme koštane resorpcije, PYD i DPD se oslobađaju iz kosti u odnosu 3:1, kao slobodni molekuli (20%) ili vezani za fragmente kolagena (250). Izlučuju se nepromenjeni putem bubrega (251). Njihova koncentracija u urinu je blisko vezana za stepen koštane resorpcije. Unos kolagena hranom ne utiče na koncentraciju PYD-a i DPD-a. Mada mogu bit poreklom i iz vezivnog tkiva, najvećim delom su skladišteni u koštanom, što posebno važi za DPD, koji je skoro isključivo koštanog porekla (252).
6. Teleopeptidi kolagena tip I. Zreo peptidni lanac kolagena tip I završava se karboksilnom (C-terminal) i amino (N-terminal) grupom. Za ove krajeve su unakrsnim vezama (cross-linked) vezani teleopeptidni lanci, koji su tako i nazvani: C-terminalni teleopeptid kolagena tip I (CTX) i N-terminalni teleopeptid kolagena tip I (NTX). Tokom koštane resorpcije CTX i NTX se oslobađaju i prelaze u cirkulaciju, gde predstavljaju značajne pokazatelje koštane razgradnje (249). Produkti razgradnje kolagena su različite veličine i mogu se dodatno razgrađivati na nivou jetre ili bubrega. Mada se kolagen može stvarati i u drugim tkivima, osteoklastni fragmenti njegove razgradnje se razlikuju od fragmenata razgradnje kolagena u neskeletnom tkivu (253). Može se određivati koncentracija CTX i NTX u serumu i urinu, ali su eseji za određivanje u serumu pouzdaniji i sa manjim stepenom varijabilnosti (253). Poredeći ova dva teleopeptida kolagena tip I, NTX pokazuje veću koštanu specifičnost (253).

2.2.4. Homeostaza kalcijuma

Homeostaza kalcijuma podrazumeva hormonalnu regulaciju transporta kalcijuma u organizmu (254). Metabolizam kalcijuma čitavog organizma kontrolišu tri target mesta, intestinum, bubreg i kosti, sa zajedničkim ciljem da održe nivo serumskog kalcijuma u vrlo uzanom fiziološkom opsegu (255). U hormonalnom sistemu, koji reguliše homeostazu kalcijuma, najznačajnije mesto zauzimaju paratireoidni hormon (PTH), $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ i sam serumski jonizovani kalcijum (256, 257, 258). Međutim, na metabolizam kalcijuma utiču i tireoidni hormon, hormon rasta, insulinu sličan faktor rasta I (IGF-I), estrogen, testosteron, prolaktin (259). Pojedini efekti ovih hormona su rezultat

direktnog delovanja na target mesta kalcijumskog transporta, a drugi su indirektni (preko metabolizma vitamina D) (259).

A. Paratireoidni hormon u homeostazi kalcijuma

Paratireoidni hormon (PTH) se smatra najvažnijim regulatorom homeostaze kalcijuma. Glavni stimulator njegove povećane sekrecije je pad serumskog kalcijuma. Otpušten u cirkulaciju, PTH, se uključuje u nekoliko važnih etapa metabolizma kalcijuma: 1. povećava reapsorpciju kalcijuma na nivou bubrežnih tubula, 2. stimuliše osteoklastnu aktivnost i samim tim koštanu resorpciju i 3. povećava efikasnost apsorpcije kalcijuma u intestinumu. Dejstvo PTH na nivou bubrega i skeleta je direktno i ostvaruje se vezivanjem PTH za PTH-receptore (PTHr). Njegova uloga na nivou intestinuma je dugo smatrana isključivo indirektnom i posredovanom povećanim nivoom $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Naime, na nivou bubrega PTH stimuliše transkripciju gena renalnog enzima CYP27B1 i inhibiše renalnu 24-hidroksilazu (CYP24) stvarajući uslove za povećanu sintezu $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (260, 261). Povećan nivo serumskog $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ će aktivirati receptore vitamina D (VDR) na nivou digestivnog trakta i povećati apsorpciju kalcijuma. Međutim, detektovanje PTH receptora u bazolateralnoj membrani intestinalnih epitelnih ćelija (262) navelo je na razmišljanje o mogućem direktnom uticaju PTH na intestinalnu apsorpciju kalcijuma. U uslovima in vitro, tretiranje izolovanih enterocita paratireoidnim hormonom, rezultuje povećanim nivoom cAMP, što omogućava prolaz kalcijuma kroz kalcijumske kanale (263, 264). Ispitivanja direktnog uticaja PTH na apsorpciju kalcijuma, u uslovima in vivo, zahtevala bi generisanje eksperimentalnog modela sa ciljanom delecijom intestinalnih PTHR (259).

B. Vitamin D u homeostazi kalcijuma

Uloga vitamina D u homeostazi kalcijuma je najvažnija u domenu intestinalne apsorpcije. Smanjeni unos kalcijuma, predstavlja najjači stimulan za povećanu apsorpciju kalcijuma, tako što dovodi do povećane renalne produkcije aktivne, hormonske forme vitamina D, $1,25$ dihidroksi-vitamina D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) (265). Svoje dejstvo, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, ispoljava vezujući se za svoje receptore (vitamin D-receptori, VDR) u digestivnom traktu (266). U duodenumu, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, povećava transcelularnu apsorpciju kalcijuma, koja podrazumeva kretanje kalcijuma od mukozne do serozne strane intestinalne barijere, suprotno koncentracijskom gradijentu (267). U nižim partijama digestivnog trakta, uloga vitamina D u apsorpciji kalcijuma je znatno manja. Ipak, postoje podaci o stimulatívnoj ulozi $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ na pasivnu apsorpciju kalcijuma u ileumu (268).

Za razliku od brojnih dokaza, da $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ povećava intestinalnu apsorpciju kalcijuma (267, 268, 269, 270), podaci o uticaju 25-hidroksivitamina D ($25(\text{OH})\text{D}$), su vrlo kontradiktorni. Rezultati pojedinih studija pokazali su da viši nivo $25(\text{OH})\text{D}$ nije u korelaciji sa povećanom intestinalnom apsorpcijom kalcijuma kod dece i odraslih (271, 272). S druge strane, grupa autora je dokazala da četvoro-nedeljni tretman sa $50\mu\text{g}$

25(OH)D/dnevno, povećava apsorpciju kalcijuma za 25%, a kod post-menopauzalnih žena i do 65% (273, 274). Ovakvi rezultati idu u prilog hipotezi da je enzim neophodan za konverziju 25(OH)D u 1,25(OH)₂D, prisutan u intestinumu (275, 276).

C. Tireoidni hormoni u homeostazi kalcijuma

Tireoidni hormoni, tiroksin (T₄) i trijodtironin (T₃) primarno se smatraju regulatorima metabolizma. Hipertireoidizam se međutim, povezuje sa hiperkalcemijom i ubrzanim prometom kalcijuma u kostima, što može dovesti do osteopenije (277). Eksperimentalna istraživanja su pokazala da je apsorpcija kalcijuma u duodenumu hipertireoidnih pacova veća u odnosu na hipotireoidne (278). Ovakvi rezultati navode na razmišljanje da tireoidni hormoni moduliraju intestinalnu apsorpciju kalcijuma.

Obzirom da terapija tireoidnim hormonima povećava nivo PTH i 1,25(OH)₂D, smatra se da tireoidni hormoni svoje efekte na metabolizam kalcijuma, ispoljavaju indirektno, preko PTH-vitamin D osovine.

D. Hormon rasta i IGF-1 u homeostazi kalcijuma

Tokom perioda rasta i razvoja, u detinjstvu i adolescentnom dobu, hormon rasta (GH) i njegov fiziološki medijator, insulinu sličan faktor rasta I (IGF-1) imaju glavnu ulogu u linearnom koštanom rastu i sticanju koštane mase (279). Na nivou bubrega, GH aktivira enzim CYP27B1 i dovodi do porasta 1,25(OH)₂D (280). Ovaj mehanizam objašnjava indirektno dejstvo GH na povećanje intestinalne apsorpcije kalcijuma. Međutim, postoje rezultati koji pokazuju stimulativan efekat GH na intestinalnu apsorpciju, bez značajnog povećanja koncentracije 1,25(OH)₂D (281). Obzirom da tretman GH sprečava gubitak VDR kod ovariektomisanih pacova (282), alternativni mehanizam kojim bi GH mogao da poveća apsorpciju kalcijuma, jeste regulacija receptora vitamina D (VDR) i porast ćelijske senzitivnosti na nepromenjene vrednosti 1,25(OH)₂D.

Uloga koju GH ima u apsorpciji kalcijuma se odvija preko medijatora IGF-1 i postoje dokazi da se radi o vitamin D nezavisnom mehanizmu. Intestinalna apsorpcija kalcijuma pozitivno korelira sa IGF-1. Starenje dovodi do pada IGF-1 i značajnog negativnog uticaja na apsorpciju kalcijuma, što se ne može objasniti samom redukcijom 1,25(OH)₂D u serumu (283). Ipak, vitamin D-nezavisan mehanizam kojim GH/IGF-1 imaju u regulaciji metabolizma kalcijuma, još uvek nije u potpunosti razjašnjen.

E. Steroidi u homeostazi kalcijuma

1. *Estrogen*. Hormoni reproduktivnog sistema žene igraju veoma važnu ulogu u homeostazi kalcijuma, ispoljavajući svoje efekte na sva tri target mesta: skelet, bubreg i intestinum. Na nivou koštanog tkiva, estrogen održava balansiran odnos koštane formacije i resorpcije (284). On smanjuje formiranje i aktivnost osteoklasta, ubrzava osteoklastnu apoptozu i samim tim skraćuje njihov životni vek (285). Mada je dejstvo estrogena na osteoblastnu aktivnost diskutabilna, postoje podaci da

- estrogen povećava formiranje osteoblasta, njihovu diferencijaciju, proliferaciju i funkciju (286). Postmenopauzalni deficit estrogena dovodi do značajnog porasta kalcijumureze, uzrokujući negativan bilans kalcijuma (287). Gubitak estrogena redukuje nivo $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ i utiče na smanjenu intestinalnu apsorpciju kalcijuma (288). Mogući mehanizmi ovakvog dejstva estrogena, jesu smanjena sinteza $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (289), ili redukcija VDR u intestinumu (282). Detektovanje estrogenskih receptora (ER) u intestinumu (289) navelo je brojne autore na ispitivanje direktnog dejstva estrogena na apsorpciju kalcijuma (289, 290, 291).
2. *Testosteron*. Glavna uloga testosterona na nivou koštanog tkiva je redukcija koštane resorpcije (292). Smatra se, da je najveći deo ovakve aktivnosti testosterona indirektan, i da je posledica aromatizacije testosterona u estrogen (293). Obzirom da su androgeni receptori prisutni na koštanim ćelijama, ne može mu se osporiti izvesna direktna uloga u fiziologiji skeleta (294, 295). Hipogonadizam kod muškaraca uzrokuje smanjenu koštanu gustinu (296) što se pripisuje nedovoljnoj stimulaciji osteoblasta od strane testosterona, preko androgenskih receptora na osteoblastima (297). Testosteronu se pripisuje i izvestan uticaj na apsorpciju kalcijuma. Kod dečaka, porast koncentracije testosterona, povećava intestinalnu apsorpciju kalcijuma za 61% (298). Međutim, kako se tom prilikom značajno povećava koncentracija IGF-1, ne može se doneti pouzdan zaključak o direktnom dejstvu testosterona. Smanjena intestinalna apsorpcija kalcijuma, vezana za proces starenja, u korelaciji je sa padom dihidroepiandrosterona (DHEAS): sulfatne forme testosteronskog prohormona (DHEA) (299). Ove promene su nezavisne od nivoa $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, što ide u prilog direktnom uticaju androgena na homeostazu kalcijuma, nezavisno od metabolizma vitamina D.
 3. *Glikokortikoidi*. Svoju najvažniju ulogu u metabolizmu kalcijuma, glikokortikoidi ispoljavaju na nivou koštanog tkiva. Oni suprimiraju koštnu formaciju, u uslovima in vivo i in vitro, indukujući apoptozu osteoblasta (300, 301, 302). Uticaj glikokortikoida na osteoklaste, ogleda se na produžavanje životnog veka zrelih osteoklasta, ali nije dokazano da utiču na osteoklastnu diferencijaciju (303). Sem direktne inhibicije osteoblasta, novija istraživanja su pokazala da glikokortikoidi smanjuju koštanu formaciju i indirektno, preko osteoklasta, Naime, oni remete citoskeletnu organizaciju osteoklasta i inhibiraju osteoklastnu resorptivnu aktivnost. Ovako smanjena resorpcija kosti, dodatno će usporiti koštanu formaciju (304).

F. Prolaktin u homeostazi kalcijuma

Par decenija unazad, brojni autori svojim rezultatima dokazuju da su fiziološka i patološka hiperprolaktinemija povezane sa promenama u koštanom sistemu. Hiperprolaktinemija uzrokovana tumorom kod ljudi (305, 306, 307, 308, 309, 310) i kod pacova (311) udružena je sa osteopenijom. Povišena koncentracija PRL u serumu uzrokovana neurolepticima (medikamentozna hiperprolaktinemija) takođe dovodi do

osteopenije (312, 313, 314, 315). U stanjima fiziološke hiperprolaktinemije kao što su trudnoća i laktacija, značajan transfer kalcijuma iz tela majke u fetus i odojče, koji je neophodan za rapidnu mineralizaciju neonatalnog skeleta, predstavlja svojevrsan stres homeostaze kalcijuma majčinog organizma, koji može rezultovati smanjenjem koštane gustine (57, 66, 316).

Obzirom da je hiperprolaktinemija vrlo često udružena sa hipogonadizmom, većina autora je zaključila da je uloga prolaktina u metabolizmu kalcijuma i njegov uticaj na koštani sistem, indirektni (317, 318). Eksperimentalna istraživanja su pokazala da dodavanje estrogena u periodu laktacije samo delimično inhibiše gubitak koštane mase, što bi značilo da deficit estrogena u hiperprolaktinemiji, nije jedini faktor koji dovodi do osteopenije (319). Klinička ispitivanja su pokazala da je koštana gustina smanjena i kod pacijenata sa hiperprolaktinemijom bez sekundarnog hipogonadizma (310). Identifikacija PRLR u ćelijama osteosarkoma, osteoblastima, kortikalnim i trabekularnim kostima (27,28,29,30, 64) dala je osnovu za ispitivanje direktnog delovanja prolaktina na koštani sistem.

Obzirom da je dokazano da prolaktin stimuliše $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, dugo je uticaj prolaktina na povećanu apsorpciji kalcijuma, smatran indirektnim (320). Međutim, pokazano je da infuzija prolaktina, dovodi do porasta intestinalne apsorpcije kalcijuma za 30%, čak i kod deficita vitamina D (321). Rezultati brojnih eksperimentalnih studija su zatim dokazali direktno dejstvo prolaktina u stimulaciji apsorpcije kalcijuma u intestinumu (59, 60, 322, 323) povećanjem aktivnosti Ca^{2+} ATP-aze (61) i stimulisanjem transepitelijalnog transporta kalcijuma u duodenumu (62).

Ekskrecija kalcijuma preko bubrega značajno se menja u periodu trudnoće i laktacije (stanja fiziološke hiperprolaktinemije). Urinarna ekskrecija kalcijuma raste tokom trudnoće i opada u periodu laktacije (324, 325). Iako su PRLR dokazani u tkivu bubrega (26), nema podataka u literaturi da li izmenjena genska ekspresija PRLR, u stanju fiziološke hiperprolaktinemije, korelira sa evidentno izmenjenom kalcijumurezom.

3. NAUČNA HIPOTEZA

Imajući u vidu značaj prolaktina za metabolizam kalcijuma, činjenicu da fiziološka hiperprolaktinemija dovodi do tranzitornih, reverzibilnih promena u koštanom sistemu i da se prolongirana patološka i medikamentozna hiperprolaktinemija sve više dovode u vezu sa smanjenjem koštane gustine, postavljene su sledeće naučne hipoteze:

- I. *U stanjima hiperprolaktinemije (kako fiziološke tako i medikamentne) dolazi do izmene u genskoj ekspresiji PRLR u duodenumu, koštanom tkivu i bubrezima, što uticajem na apsorpciju kalcijuma, njegov promet u kostima i nivo urinarne ekskrecije, objašnjava direktne efekte prolaktina na homeostazu kalcijuma.*
- II. *U fiziološkoj hiperprolaktinemiji dolazi do porasta genske ekspresije PRLR (ushodna regulacija) u duodenumu, što omogućava povećanu resorpciju kalcijuma i sprečava negativni kalcijumski bilans.*
U medikamentnoj hiperprolaktinemiji, posebno prolongiranoj, izostaje ushodna regulacija genske ekspresije PRLR, što rezultira pojavom osteopenije.

4. CILJ ISTRAŽIVANJA

Iz navedenih hipoteza postavljene su sledeći ciljevi rada:

- 1) Utvrditi da li postoji razlika u genskoj ekspresiji PRLR u zavisnosti od životne dobi eksperimentalnih životinja.
- 2) Korelirati gensku ekspresiju PRLR u duodenumu, bubregu i kostima u stanju fiziološke i medikamentozne hiperprolaktinemije.
- 3) Ispitati da li postoji pozitivna korelacija između genske ekspresije PRLR u bubrezima i urinarne ekskrecije Ca u fiziološkoj i medikamentoznoj hiperprolaktinemiji.
- 4) Utvrditi da li postoji pozitivna korelacija između genske ekspresije PRLR u kostima i biohemijskih markera osteosinteze: alkalne fosfataze, osteokalcina i proterminalnog N peptida, u fiziološkoj i medikamentoznoj hiperprolaktinemiji.
- 5) Ispitati da li se genska ekspresija PRLR menja u zavisnosti od dužine trajanja medikamentozne hiperprolaktinemije.
- 6) Ispitati značaj suplementne terapije Ca i vitamina D u medikamentoznoj hiperprolaktinemiji.

5. MATERIJAL I METODE

Eksperimentalno istraživanje pod nazivom: „Komparativna analiza homeostaze kalcijuma u uslovima fiziološke i medikamentne hiperprolaktinemije“ izvedeno je u Centru za biomedicinska istraživanja Medicinskog Fakulteta, Univerziteta u Nišu od 2010 i 2012 godine.

5.1. Eksperimentalne životinje

Ispitivanje je izvedeno na pacovima Wistar soja uzgojenih na Farmi laboratorijskih životinja, na Torlaku, u okviru instituta za medicinska istraživanja VMA, Beograd. U eksperimentu su korišćeni pacovi ženskog pola, starosne dobi 5 i 18 i 21 nedelja. Težina mladih pacova kretala se od 130-150g, a odraslih od 290-340g. Životinje su čuvane u čeličnim kavezima, hranjene laboratorijskom hranom normalnog sadržaja kalcijuma (1,0% w/w Ca) pojene komunalnom vodom, uz smenjivanje svetla i mraka na 12h. Sobna temperatura je održavana od 23-25°C, a relativna vlažnost vazduha se kretala između 50-60%. Sve eksperimentalne životinje su čuvane u skladu sa principima i preporukama Etičkog Komiteta, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Nišu.

5.2. Eksperimentalne grupe

Životinje su podeljene u sledeće grupe:

Grupa A – 10 eksperimentalnih životinja, pacova ženskog pola, starosne dobi 5 nedelja.

Grupa C – 10 skotnih eksperimentalnih životinja, starosne dobi 18 nedelja (u trećoj nedelji graviditeta). Prilikom žrtvovanja ove eksperimentalne grupe, utvrđeno je da C4 nije skotna. Uzorci krvi, urina i tkiva ove eksperimentalne životinje nisu odvajani za dalje analize. Svi rezultati grupe C, bazirani su na preostalih 9 životinja.

Grupa D – 10 eksperimentalnih životinja, zrelih pacova ženskog pola, starosne dobi 18 nedelja, kod kojih je medikamentna hiperprolaktinemija izazvana sulpiridom u trajanju od 3 nedelje. Sulpirid je davan dva puta dnevno, intramuskularno, u dozi od 10mg/kg telesne težine.

Grupa E - 10 eksperimentalnih životinja, zrelih pacova ženskog pola, starosne dobi 18 nedelja, kod kojih je medikamentna hiperprolaktinemija izazvana sulpiridom u trajanju od 6 nedelja. Sulpirid je davan dva puta dnevno, intramuskularno, u dozi od 10mg/kg telesne težine. U vreme žrtvovanja, eksperimentalne životinje bile su starosne dobi 21 nedelja.

Grupa F - 10 eksperimentalnih životinja, zrelih pacova ženskog pola, starosne dobi 18 nedelja, kod kojih je medikamentna hiperprolaktinemija izazvana sulpiridom u trajanju od 6 nedelja, s tim što je nakon prve tri nedelje uvedena suplementna terapija Ca i vitamina D. Sulpirid je davan dva puta dnevno, intramuskularno, u dozi od 10mg/kg telesne težine.

Tableta šumećeg kalcijuma od 500mg (Ca Sandoz) rastvarana je u 200ml vode. Svakoj eksperimentalnoj životinji grupe F, davano je po 20ml rastvora dnevno. Takođe je svim životinjama grupe F davana 1-2 kapi uljanog rastvora holekalciferola dnevno („Vigantol“) što je činilo 500-1000 iU vitamina D dnevno. U vreme žrtvovanja, eksperimentalne životinje bile su starosne dobi 21 nedelja.

Obzirom da sazrevanje skeleta i homeostaza kalcijuma zavise od starosne dobi, korišćene su dve kontrolne grupe:

Grupa B – 10 eksperimentalnih životinja, pacova ženskog pola, nulipara, starosne dobi 18 nedelja, koje su predstavljale kontrolu eksperimentalnim grupama C i D.

Grupa B2 – 7 eksperimentalnih životinja, pacova ženskog pola, nulipara, starosne dobi 21 nedelja, koje su predstavljale kontrolu eksperimentalnim grupama E i F.

5.3. Tehnika žrtvovanja eksperimentalnih životinja

Sve životinje jedne grupe žrtvovane su istog dana. Da bi se odredila 24h kalcijum i fosfoureza, eksperimentalne životinje su čuvane u metaboličkom kavezu (slike 1. i 2.) 24h pre žrtvovanja.



Slika 1. Eksperimentalne životinje u metaboličkom kavezu, 24h pre žrtvovanja.



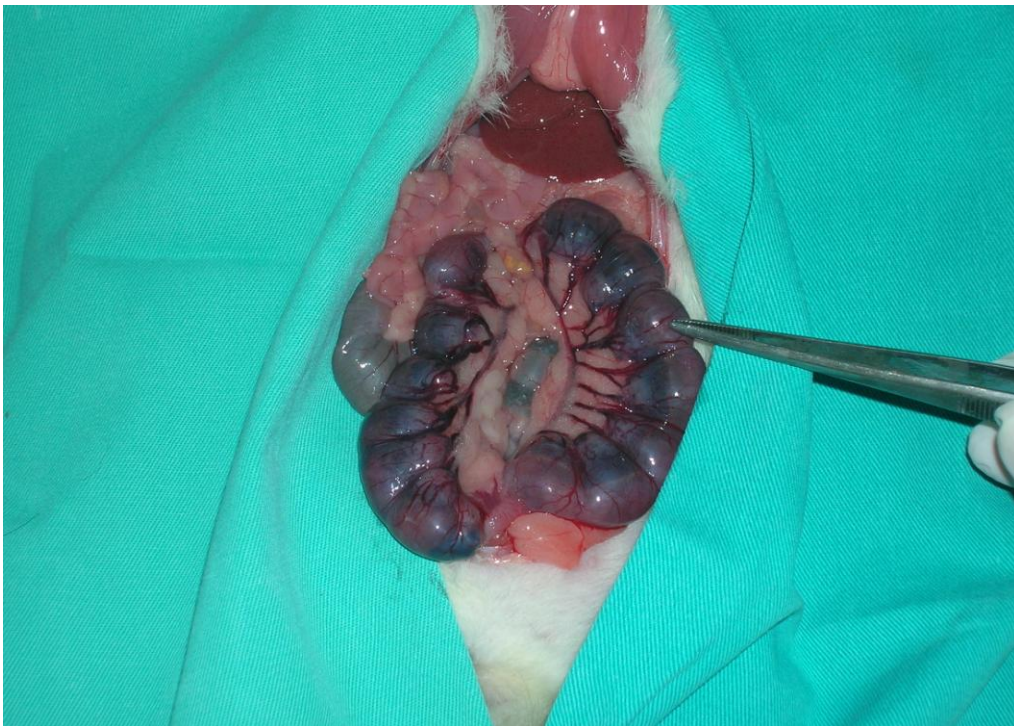
Slika 2. Skupljanje urina za određivanje 24h kalcijum- i fosforeze.

Žrtvovanje i uzorkovanje krvi izvedeno je na sledeći način:

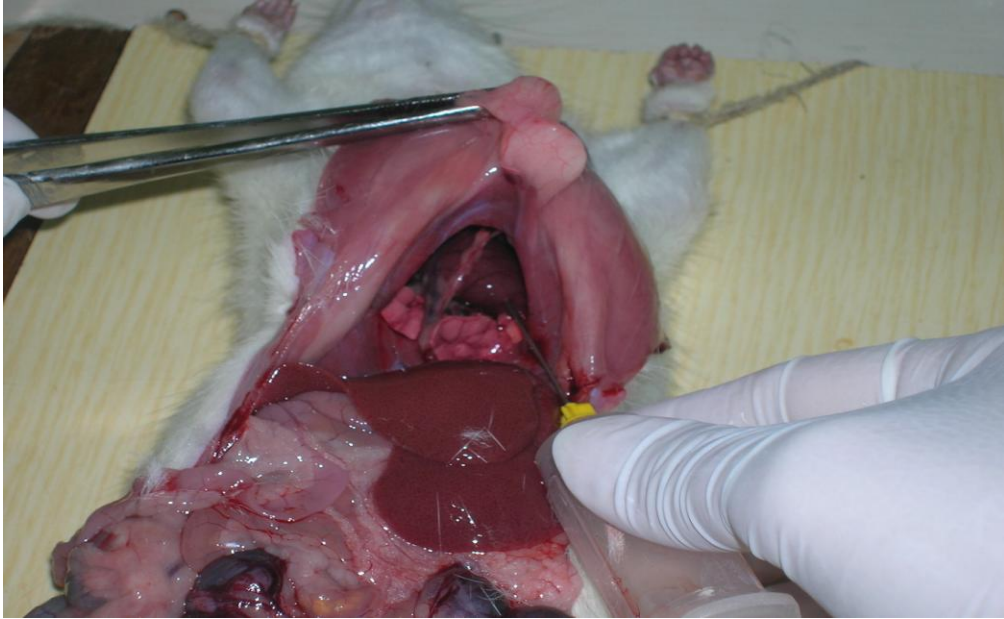
- Životinje su uvođene u anesteziju intramuskularnim ubrizgavanjem (u prednji trbušni zid) po 0,3ml 10%-og rastvora ketamin-hidrohlorida (hemijski naziv: cikloheksilamin), derivata fenciklidina (zaštićeno ime: Ketamidol®, proizvođač "Richter Pharma", Austrija).
- Nakon medijalne torakofrenolaparotomije (slike 3. i 4.) i ekspozicije srca (slika 5.) leva komora miokarda punktirana je iglom spojenom sa brizgalicom (špricom) čiji su zidovi prethodno obloženi uvlačenjem 0,3-0,5ml rastvora antikoagulansa heparin-natrijuma za intravensku primenu (1ml rastvora sadrži 5000i.j. heparina u obliku heparin-Na, proizvođač: Galenika a.d., SCG)("heparinizirani" špric) i njime je iz leve komore preko igle in situ izvlačena krv do prestanka rada srčanog mišića, čime su eksperimentalne životinje žrtvovane (slika 6.).



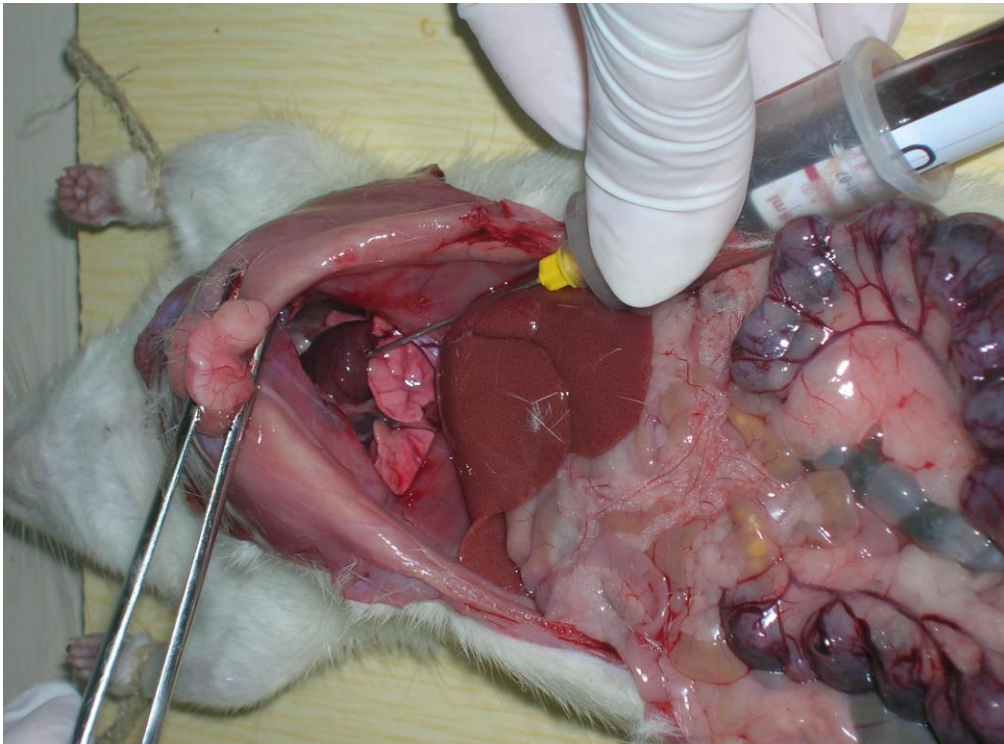
Slika 3. Priprema eksperimentalne životinje za medijalnu torakofrenolaparatomiju.



Slika 4. Medijalna torakofrenolaparatomija gravidne eksperimentalne životinje.



Slika 5. Ekspozicija srca nakon medijalne torakofrenolaparatomije.



Slika 6. Punktiranje leve komore miokarda.

Prosečno je dobijano 5,5ml krvi (u opsegu od 3-6,5ml), koja je stavljana u klasičnu laboratorijsku epruvetu kapaciteta 10ml uz dodatak oko 0,1-0,3ml istog rastvora heparina. Ovako uzeti uzorci krvi odmah su nošeni u Centar za medicinsku biohemiju KC Niš, gde su obavljane zaplanirane biohemijske analize. Izolovana tkiva duodenuma, bubrega, femura i pršljena čuvana su na -80°C u RNALatter (20mg tkiva u 200 μL RNALatter)

5.4. Biohemijske analize

Kod svih eksperimentalnih životinja određivani su sledeći biohemijski parametri u serumu: urea, kreatinin, ukupni proteini (TP), fosfor (P), ukupni i jonizovani kalcijum (Ca, Ca^{++}). Takođe su u svim eksperimentalnim i kontrolnim grupama merene koncentracije biohemijskih markera osteosinteze: alkalne fosfataze (ALP), osteokalcina (OC). Određivan je ukupni 25-hidroksivitamin D. U urinu je određivana 24-časovna kalcijumureza i fosfoureza.

Urea. Za određivanje uree u serumu korišćen je komercijalni kit za kinetički UV test na analizatoru Beckman Coulter AU-680, Beckman Coulter Inc; Brea, California, USA.

Kreatinin. Za kvantitativno određivanje kreatinina u serumu korišćen je komercijalni kit za kinetički kolor test (Jaffe metoda) na analizatoru Beckman Coulter AU-680, Beckman Coulter Inc; Brea, California, USA.

Ukupni proteini. Kvantitativno određivanje ukupnih proteina u serumu vršeno je fotometrijskim kolor testom, na analizatoru Beckman Coulter AU-680, Beckman Coulter Inc; Brea, California, USA.

Fosfor. Za određivanje neorganskog fosfata u serumu korišćen je fotometrijski UV test (analizator Beckman Coulter AU-680, Beckman Coulter Inc; Brea, California, USA).

Ukupni kalcijum meren je korišćenjem fotometrijskog kolor testa (analizator Beckman Coulter AU-680, Beckman Coulter Inc; Brea, California, USA).

Jonizovani kalcijum. Za određivanje jonizovanog kalcijuma korišćena je potenciometrijska metoda (merenje razlike u elektrohemijском potencijalu između kalcijum jon-selektivne elektrode i referentne elektrode, obe uronjene u uzorak).

Alkalna fosfataza. Aktivnost alkalne fosfataze određivana je kinetičkim kolor testom (analizator Beckman Coulter AU-680, Beckman Coulter Inc; Brea, California, USA).

Osteokalcin. Kvantitativno određivanje osteokalcina u serumu vršeno je korišćenjem elektrohemiluminiscentnog imunoeseja „ECLIA“ na Cobas e 411 imunoesejskom analizatoru (Cobas e 411, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Vitamin D. Ukupni 25-hidroksivitamin D, meren je korišćenjem elektrohemiluminiscentnog imunoeseja „ECLIA“ na Cobas e imunoesejskom analizatoru (Cobas e 411, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

Kalcijumureza određivana je fotometrijskim kolor testom, a *fosfoureza* fotometrijskim UV testom (analizator Beckman Coulter AU-680, Beckman Coulter Inc; Brea, California, USA).

5.5. Elisa testovi

Svim eksperimentalnim i kontrolnim životinjama elisa metodom određivane su koncentracija prolaktina (PRL) i proterminalnog N peptida (P1NP).

Prolaktin. Koncentracija prolaktina u serumu merena je korišćenjem enzim-vezanog imunosorbentskog kita za prolaktin. Kit je „sendvič“ enzim imunoesej za in vitro kvantitativno merenje prolaktina (Uscnk, Life Science Inc.).

Proterminalni N peptid određivan je korišćenjem enzim vezanog imunosorbentskog kita za P1NP. Kit je „sendvič“ enzim imunoesej za in vitro kvantitativno merenje P1NP (Uscnk, Life Science Inc.).

5.6. Metodologija određivanja ekspresije gena za prolaktinski receptor

Izolacija RNK

Totalna RNK iz 20 mg uzorka koji je čuvan na -80 u 200 µL RNALater (bubreg, pršljen i duodenum) izolovana je RNeasy Mini Kit-om (Qiagen, Nemačka) prema uputstvu proizviđača u RNaza-free uslovima. Izolacijom je dobijeno po 60 µL uzorka RNK koji je alikvotiran u dva dela po 30 µL.

Uzorci izolovane RNK tretirani su DNazom I (Applichem-Biochemica GmbH, USA) pre reverzne transkripcije. Ovaj tretman se sastojao u dodavanju 10% zapremine izolata (6 µL) DNaza i pufera i 1 µL Dnaze I izolovanoj RNK, posle čega je uzorak inkubiran u trajanju od 15 minuta na 37°C. Delovanje Dnaze I prekinuto je dodavanjem DNaza I inhibitora u količini od 6,15 µl (10% od zapremine smeše). Zatim je uzorak centrifugiran, 1 minut na 10 000 rpm čime je odvajan DNaza inhibitor, a RNK je prebacivana u RNaza-free tubice.

Koncentracija RNK određivana je fluorometrijski QubitTM Fluorometer-om (Invitrogen, SAD) pomoću Qubit® RNA Assay Kit-a, dok je njen kvalitet proveravan elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Izolovana RNK čuvana je u zamrzivaču na -80°C do upotrebe.

Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija 50 ng svake RNK izolovane iz bubrega i duodenuma je izvođena u zapremini od 20 µl. cDNK je dobijena pomoću kita za reverziju High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, SAD), koji je sadržao reverznu transkriptazu, 10x RT pufer, dNTP miks, random primers i RNaza inhibitor (Applied Biosystems, SAD) i RNaza-free vodu.

Reverzna transkripcija 20 ng svake RNK izolovane iz kosti je izvođena u zapremini od 20 µl. cDNK je dobijena pomoću kita za reverziju Sensiscript Kit-a (Qiagen, Nemačka) po uputstvu proizviđača. Pored navedenog kita u toku reakcije reverzne transkripcije korišćeni su RNase inhibitor (Applied Biosystems, SAD) i Random hexamers (Applied Biosystems, SAD). Reverzna transkripcija izvođena je u zapremini od 20 µl.

Odnos i koncentracija reagenasa, tokom reakcije reverzne transkripcije, prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1. Odnos i koncentracija reagenasa tokom reakcije reverzne transkripcije u bubregu, duodenumu i kostima.

	Reverzna transkripcija- bubreg i duodenum (volumen/reakcija)	Reverzna transkripcija- kosti (volumen/reakcija)
10X RT Buffer	2 μ l	2 μ l
dNTP miks	0.8 μ l	2 μ l
Random hexamers	2 μ l	1 μ l
RNase inhibitor	0.5 μ l	0.5 μ l
MultiScribe™ Reverzna transcriptaza	1 μ l	/
Sensiscript Reverzna transcriptaza	/	1 μ l
Rnase-free voda	Promenljiv	Promenljiv
RNK	Promenljiv	Promenljiv
Ukupni volumen	20 μ l	20 μ l

Uzorci i reagensi su tokom pripreme reakcione smeše držani na ledu, a sama reakcija reverzne transkripcije izvođena je u aparatu Mastercycleru ep Gradient S (Eppendorf, Nemačka). Za reakciju reverzne transkripcije u bubregu i duodenumu korišćen je sledeći termalni profil: 10min na 25°C, 120min na 37°C i 5 min na 85°C. Termalni profil reakcije reverzne transkripcije za kosti bio je sledeći: 60min na 37°C i 5min na 95°C.

Po obavljenoj reverznoj transkripciji, cDNK je smeštena na -80oC do dalje upotrebe.

Relativna kvantifikacija ekspresije gena za prolaktinski receptor na RealTime PCR-u

Kvantifikacija genske ekspresije dobijena je metodom kvantitativne analize lančane reakcije polimeraze (engl. Quantitative real time polimerase chain reaction, qRT-PCR), pomoću KAPA Universal SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) (Kapa Biosystems, SAD) kompleta. KAPA Universal SYBR® FAST qPCR Master Mix se isporučuje kao 2X Master Mix sa integrisanim antitelo-posredovanim hot start-om, SYBR® Green I fluorescentnom bojom, MgCl₂, dNTP-ovima i stabilizatorima. Rox referentna boja nije uključena u Master Mix, ali se dostavlja uz njega.

Nivo relativne ekspresije ciljnog gena određivana jee poređenjem ekspresije tog istog gena u kontrolnom uzorku- kalibratoru.

Pored kalibratora neophodno je bilo definisati endogenu kontrolu, koju predstavljaju geni sa konzistentnim nivoom ekspresije u svim eksperimentalnim uzorcima. Na ovaj način izvršena je normalizacija relativne kvantifikacije, tj eliminiše se varijabilnost u inicijalnoj koncentraciji i kvalitetu RNK. U ovom eksperimentu korišćen je β 2 mikroglobulin kao *housekeeping* gen. Za amplifikaciju endogene kontrole i ciljnog gena korišćeni su komercijalni RNK specifični prajmeri prikazani u Tabeli 2.

Tabela 2. Komercijalni RNK specifični prajmeri korišćeni u eksperimentu.

Naziv gena	QuantiTect Primer Assay (Qiagen, Nemačka)	Detektovani transkript
β2 mikroglobulin	Rn_B2m_1_SG, QT00176295	NM_012512
Prolaktinski receptor	Rn_Prlr_vb.1_SG, QT01169518	NM_001034111

Amplifikacija je praćena na Stratagene Mx3005P System (Agilent Technologies, SAD) RealTime PCR-u. qRT-PCR je izveden korišćenjem 1 cDNK, specifičnih prajmera i qPCR Master Mixa (Kapa Biosystems, SAD) u ukupnoj zapremini reakcije od 10 µl. Odnosi reagenasa korišćenih u reakciji amplifikacije prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Odnosi reagenasa korišćenih u reakciji amplifikacije.

Reagensi	Volumen/reakcija
KAPA SYBR® FAST Universal 2X qPCR Master Mix	5 µl
ROX- referentna boja	0.2 µl
QuantiTect Primer Assay	1.1 µl
Rnase-free voda	2.7 µl
cDNK	1 µl
Ukupni volumen	10 µl

Reakcija amplifikacije izvođena je po sledećem termalnom profilu: *aktivacija enzima* 3min na 95⁰C; *amplifikacija* 3sek na 95⁰C, 20sek na 55⁰C, 1sek 72⁰C (x40 ciklusa); *disocijacija* 1min na 95⁰C, 30sek na 55⁰C, 30sek na 95⁰C.

Analiza rezultata RealTime PCR-a

Specifičnost produkta određivana je na 2% agaroznom gelu i analizom krive topljenja (engl. melting curve analysis). Dobijeni podaci su analizirani MxPro TM QPCR softwer-om (Agilent Technologies, SAD).

Ekspresiji ciljnog gena u kalibratoru, gde kalibrator predstavlja netretiranu grupu, dodeljena je vrednost 0. Relativna ekspresija gena predstavlja odnos između ekspresije ciljne RNK u tretiranom uzorku i ekspresije ciljne RNK u kalibratoru i njene vrednosti izražene su kao Log₂.

5.7. Statistička obrada podataka

Unos, tabelarno i grafičko prikazivanje podataka obavljeno je korišćenjem MS Office Excel programa, a statistički proračuni su vršeni programom SPSS, verzija 15.0. Rezultati statističke analize prikazani su tabelarno i grafički.

Kontinualni (merljivi) parametri su predstavljeni srednjim vrednostima (X) i standardnim devijacijama (SD), medijanom (Md), maksimalnim (Max) i minimalnim (Min) vrednostima. Normalnost raspodele parametara utvrđivana je utvrđivana je Shapiro-Wilk testom.

Studentovim t-testom nezavisnih uzoraka (pri normalnim raspodelama) i Mann-Whitney U testom (pri raspodelama parametara koje odstupaju od normalne) vršeno je testiranje statističke značajnosti razlike vrednosti kontinualnih parametara između dveju grupa.

Studentovim t-testom zavisnih (uparenih) uzoraka (pri normalnim raspodelama) i Wilcoxon testom (pri raspodelama koje odstupaju od normalne) vršeno je testiranje statističke značajnosti razlike vrednosti kontinualnih parametara na početku i kraju istraživanja.

Za statističku obradu podataka dobijenih RealTime PCR-om korišćen je programski paket SPSS v. 15.0. ANOVA analizom utvrđivano je postojanje statistički značajne zavisnosti dobijenih vrednosti parametara u okviru eksperimentalne grupe kada je bilo više od dve podgrupe.

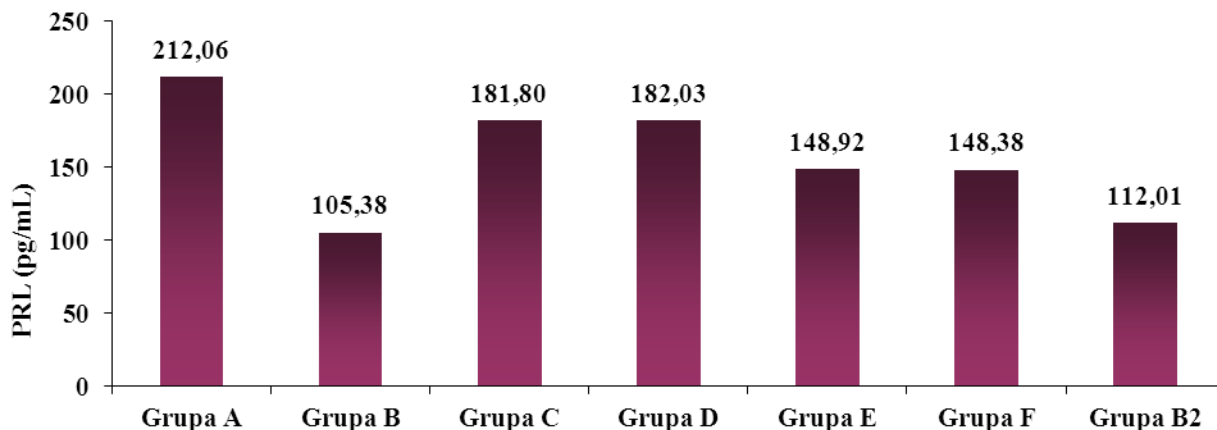
Na osnovu rezultata testiranja homogenosti varijansi Levene-ovim metodom, za naknadnu Post-hoc analizu multiplih poređenja korišćeni su Tukey-ov ili Dunnett-ov test radi utvrđivanja statistički značajnih razlika između srednjih vrednosti. Za statistički značajan nivo smatrano je $p \leq 0,05$.

Studentov t-test, uz testiranje homogenosti varijansi Levene-ovim metodom korišćen je kada je eksperimentalna grupa imala samo dve podgrupe.

6. REZULTATI

6.1. Rezultati koncentracije prolaktina

Rezultati srednje vrednosti PRL u ispitivanim grupama, prikazani su na Grafikonu 1.



Grafikon 1. Srednja vrednost PRL u ispitivanim grupama.

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola grupama C i D (starosna dob 18 nedelja); Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; Grupa B2: kontrola grupama E i F (starosna dob 21 nedelja).

6.1.1. Koncentracija PRL kod gravidnih eksperimentalnih životinja

U trećoj nedelji trudnoće, koncentracija PRL, u grupi C, bila je signifikantno veća u odnosu na kontrolnu grupu B ($181,80 \pm 29,65$ pg/mL vs. $105,38 \pm 28,34$ pg/mL; $p < 0,001$) čime je potvrđena fiziološka hiperprolaktinemija kod gravidnih eksperimentalnih životinja (Tabela 4).

Tabela 4. Koncentracija PRL u eksperimentalnim grupama C i B.

	PRL(pg/mL) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa C	$181,80 \pm 29,65^a$	9	175,46	131,22– 216,72
Grupa B	$105,38 \pm 28,34$	10	99,97	62,36– 146,16

Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa B: kontrolna grupa; ^a C vs B, $p < 0,001$

6.1.2. Koncentracija PRL kod eksperimentalnih životinja tretiranih Sulpiridom

Eksperimentalne životinje grupe D, tretirane Sulpiridom tri nedelje, pokazale su statistički značajan porast koncentracije PRL u odnosu na starosno odgovarajuću kontrolnu grupu B ($182,03 \pm 57,80$ pg/mL vs. $105,38 \pm 28,34$ pg/mL; $p < 0,001$). Životinje eksperimentalnih grupa E i F, tretirane 6 nedelja Sulpiridom, takođe su pokazale signifikantan porast koncentracije PRL u odnosu na starosno odgovarajuću kontrolnu grupu B2 (E vs. B2: $148,92 \pm 20,46$ pg/mL vs. $112,01 \pm 11,92$ pg/mL; $p < 0,001$ i F vs. B2: $148,38 \pm 27,25$ pg/mL vs. $112,01 \pm 11,92$ pg/mL; $p < 0,01$). S obzirom da je u svim grupama tretiranim Sulpiridom, verifikovan statistički značajan porast koncentracije PRL, potvrđeno je stanje medikamentne hiperprolaktinemije (Tabela 5).

Tabela 5. Koncentracija PRL u eksperimentalnim grupama D, E, F, B i B2.

	PRL(pg/mL) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa D	$182,03 \pm 57,80^a$	10	164,21	133,56– 330,84
Grupa B	$105,38 \pm 28,34$	10	99,97	62,36– 146,16
Grupa E	$148,92 \pm 20,46^b$	10	151,11	112,50– 182,16
Grupa F	$148,38 \pm 27,25^c$	10	148,05	106,56– 190,98
Grupa B2	$112,01 \pm 11,92$	7	109,66	100,84– 134,28

Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa B: kontrola grupi D; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; B2 grupa: kontrola grupama E i F; ^a D vs B, $p < 0,001$; ^b E vs B2, $p < 0,001$; ^c F vs B2, $p < 0,01$

6.1.3. Koncentracija PRL u kontrolnim grupama različite starosne dobi

Merenjem koncentracije PRL u grupi A (starosna dob 5 nedelja), grupi B (starosna dob 18 nedelja) i grupi B2 (starosna dob 21 nedelja) nađena je signifikantno viša koncentracija PRL u mladim pacova u odnosu na starije (A vs. B: $212,06 \pm 27,00$ pg/mL vs. $105,38 \pm 28,34$ pg/mL; $p < 0,001$ i A vs. B2: $212,06 \pm 27,00$ pg/mL vs. $112,01 \pm 11,92$ pg/mL; $p < 0,001$). Rezultati srednje vrednosti koncentracije PRL, sa SD, Me i Min-Max vrednosti, kod eksperimentalnih životinja različite starosne dobi, prikazani su u Tabeli 6.

Tabela 6. Koncentracija PRL u eksperimentalnim grupama A, B i B2.

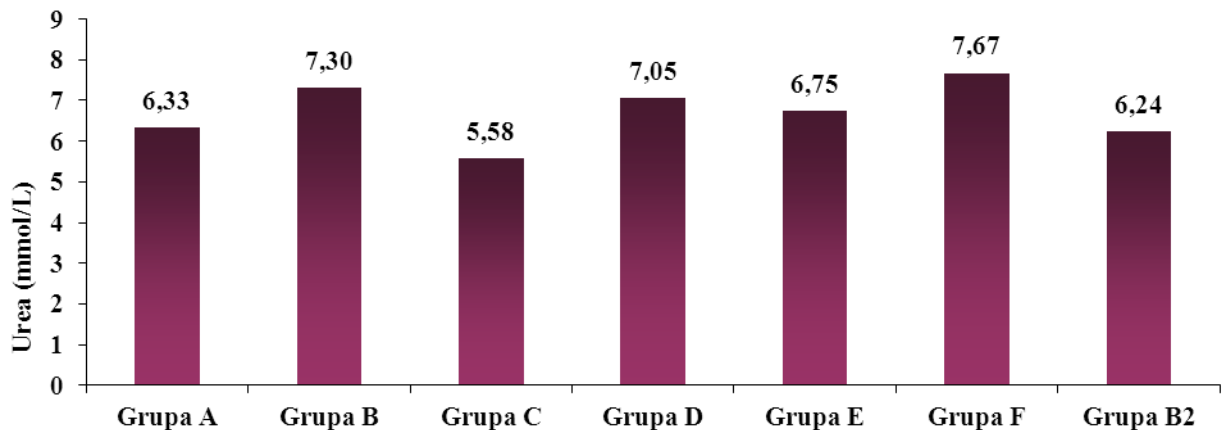
	PRL (pg/mL) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa A	212,06±27,00 ^{a,b}	10	218,52	147,96– 238,16
Grupa B	105,38±28,34	10	99,97	62,36– 146,16
Grupa B2	112,01±11,92	7	109,66	100,84– 134,28

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola starosne dobi 18 nedelja; Grupa B2: kontrola starosne dobi 21 nedelja; ^a A vs B, p<0,001; ^b A vs B2, p<0,001

6.2. Rezultati opštih biohemijskih analiza u serumu (urea, kreatinin i ukupni proteini)

6.2.1. Urea

Srednja vrednost koncentracije uree u svim ispitivanim grupama prikazana je na Grafikonu 2.



Grafikon 2. Srednja vrednost uree u ispitivanim grupama.

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola grupama C i D (starosna dob 18 nedelja); Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; Grupa B2: kontrola grupama E i F (starosna dob 21 nedelja).

6.2.1.1. Koncentracija uree u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Vrednosti uree u serumu kod svih eksperimentalnih životinja grupe C i B bile su u granicama referentnog opsega. Srednja vrednost koncentracije uree u fiziološkoj hiperprolaktinemiji pokazala se značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultati su prikazani u Tabeli 7.

Tabela 7. Koncentracija uree u fiziološkoj hiperprolaktinemiji.

	Urea (mmol/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa C	5,58±1,39 ^a	9	4,90	4,50– 8,50
Grupa B	7,30±1,23	10	7,35	5,00– 9,60

Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa B: kontrolna grupa; ^aC vs B, p<0,05

6.2.1.2. Koncentracija uree u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

Kod svih eksperimentalnih grupa sa medikamentnom hiperprolaktinemijom, koncentracija uree u serumu bila je u granicama normale. Statistički značajno viša koncentracija, verifikovana je u grupi F u odnosu na grupu E i kontrolnu grupu B2 (F vs. E: $7,67 \pm 1,1$ mmol/L vs. $6,75 \pm 0,76$ mmol/L; $p < 0,05$ i F vs. B2: $7,67 \pm 1,1$ mmol/L vs. $6,24 \pm 0,54$ mmol/L; $p < 0,01$). Rezultati su prikazani u Tabeli 8.

Tabela 8. Koncentracija uree u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

	Urea (mmol/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa B	$7,30 \pm 1,23$	10	7,35	5,00– 9,60
Grupa D	$7,05 \pm 1,21$	10	7,15	5,60– 9,60
Grupa E	$6,75 \pm 0,76$	10	7,05	5,30– 7,60
Grupa F	$7,67 \pm 1,10^{a,b}$	10	7,80	6,10– 9,90
Grupa B2	$6,24 \pm 0,54$	7	6,20	5,50– 7,30

Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa B: kontrola grupi D; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; B2 grupa: kontrola grupama E i F; ^a F vs B2, $p < 0,01$; ^b F vs E, $p < 0,05$

6.2.1.3. Koncentracija uree u različitoj starosnoj dobi

Poredeći srednju vrednost koncentracije uree u starosno različitim kontrolnim grupama, statistički značajno viša koncentracija verifikovana je samo u grupi B (18 nedelja stari pacovi) u odnosu na grupu A (stari 5 nedelja). Sve vrednosti koncentracije uree bile su u referentnom opsegu. Rezultati su prikazani u Tabeli 9.

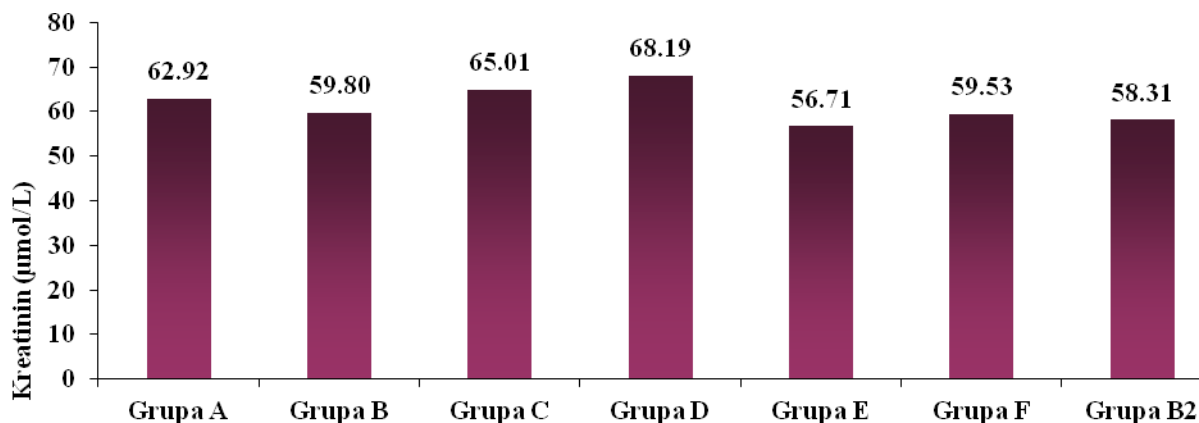
Tabela 9. Koncentracija uree u starosno različitim kontrolnim grupama.

	Urea (mmol/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa A	$6,33 \pm 0,76$	10	6,35	5,40– 7,50
Grupa B	$7,30 \pm 1,23^a$	10	7,35	5,00– 9,60
Grupa B2	$6,24 \pm 0,54$	7	6,20	5,50– 7,30

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola starosne dobi 18 nedelja; Grupa B2: kontrola starosne dobi 21 nedelja; ^a B vs A, $p < 0,05$

6.2.2. Kreatinin

Srednja vrednost koncentracije kreatinina u svim ispitivanim grupama prikazana je na Grafikonu 3.



Grafikon 3. Srednja vrednost kreatinina u ispitivanim grupama.

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola grupama C i D (starosna dob 18 nedelja); Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; Grupa B2: kontrola grupama E i F (starosna dob 21 nedelja).

6.2.2.1. Koncentracija kreatinina u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

U fiziološkoj hiperprolaktinemiji vrednosti koncentracije kreatinina bile su u granicama normale i bez značajne razlike u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu. Rezultati su prikazani u Tabeli 10.

Tabela 10. Koncentracija kreatinina u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

	Kreatinin (µmol/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa C	65,01±16,66	9	59,60	54,50– 108,40
Grupa B	59,80±4,43	10	59,95	54,20– 66,80

Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa B: kontrolna grupa.

6.2.2.2. Koncentracija kreatinina u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

Kod svih eksperimentalnih životinja sa medikamentnom hiperprolaktinemijom koncentracija kreatinina bila je u referentnom opsegu. Poređenje srednje vrednosti u grupi D sa grupom B pokazalo signifikantno višu koncentraciju kreatinina. Značajna razlika je uočena i između srednje vrednosti koncentracije kreatinina u grupi D u odnosu na grupe E i F. Poredeći koncentraciju kreatinina među samim grupama sa prolongiranom medikamentnom hiperprolaktinemijom (E i F) i u odnosu na odgovarajuću kontrolu (B2) nije zabeležena značajna razlika (Tabela 11).

Tabela 11. Koncentracija kreatinina u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

	Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$) X \pm SD	N	Me	Min– Max
Grupa D	68,19 \pm 9,01 ^{a, b, c}	10	64,70	60,60– 91,00
Grupa B	59,80 \pm 4,43	10	59,95	54,20– 66,80
Grupa E	56,71 \pm 4,48	10	55,10	51,80– 66,10
Grupa F	59,53 \pm 4,70	10	59,30	52,40– 65,50
Grupa B2	58,31 \pm 6,76	7	59,00	49,20– 67,60

Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa B: kontrola grupi D; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; B2 grupa: kontrola grupama E i F; ^a D vs E, $p < 0,01$; ^b D vs B, $p < 0,01$; ^c D vs F, $p < 0,05$

6.2.2.3. Koncentracija kreatinina u različitoj starosnoj dobi

U kontrolnim grupama različite starosne dobi (5, 18 i 21 nedelja) koncentracija kreatinina bila je u granicama normale, bez statistički značajne razlike (Tabela 12).

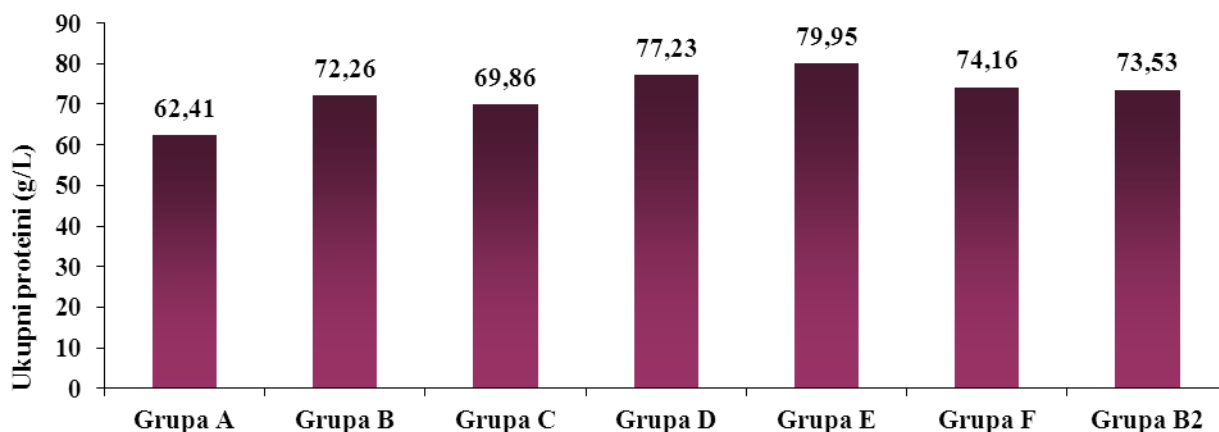
Tabela 12. Koncentracija kreatinina u starosno različitim kontrolnim grupama.

	Kreatinin ($\mu\text{mol/L}$) X \pm SD	N	Me	Min– Max
Grupa A	62,92 \pm 7,00	10	60,07	56,90– 78,40
Grupa B	59,80 \pm 4,43	10	59,95	54,20– 66,80
Grupa B2	58,31 \pm 6,76	7	59,00	49,20– 67,60

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola starosne dobi 18 nedelja; Grupa B2: kontrola starosne dobi 21 nedelja.

6.2.3. Ukupni proteini

Srednja vrednost koncentracije ukupnih proteina u svim ispitivanim grupama prikazana je na Grafikonu 4.



Grafikon 4. Srednja vrednost ukupnih proteina u ispitivanim grupama.

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola grupama C i D (starosna dob 18 nedelja); Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; Grupa B2: kontrola grupama E i F (starosna dob 21 nedelja).

6.2.3.1. Koncentracija ukupnih proteina u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Vrednosti koncentracije ukupnih proteina u fiziološkoj hiperprolaktinemiji bile su u granicama normale, bez značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 13).

Tabela 13. Ukupni proteini u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

	Ukupni proteini (g/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa B	72,26±2,23	10	72,55	67,70– 75,00
Grupa C	69,86±7,71	9	72,80	50,90– 75,60

Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa B: kontrolna grupa.

6.2.3.2. Koncentracija proteina u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

U grupama D i E nađena je značajno viša koncentracija ukupnih proteina u odnosu na kontrolu (D vs B: $77,23 \pm 3,93$ g/L vs. $72,26 \pm 2,23$ g/L; $p < 0,01$ i E vs B2: $79,95 \pm 3,01$ g/L vs. $73,53 \pm 3,36$ g/L; $p < 0,01$). Signifikantna razlika je verifikovana i među samim grupama sa medikamentnom hiperprolaktinemijom (E vs. F: $79,95 \pm 3,01$ g/L vs. $74,16 \pm 3,76$ g/L; $p < 0,01$). Kod svih eksperimentalnih životinja koncentracija ukupnih proteina bila je u granicama normale. Rezultati su prikazani u Tabeli 14.

Tabela 14. Ukupni proteini u medikamentnoj hiperprolaktinemiji.

	Ukupni proteini (g/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa D	$77,23 \pm 3,93^a$	10	77,95	70,70– 82,30
Grupa B	$72,26 \pm 2,23$	10	72,55	67,70– 75,00
Grupa E	$79,95 \pm 3,01^{b,c}$	10	79,20	76,10– 85,20
Grupa F	$74,16 \pm 3,76$	10	74,40	68,40– 82,40
Grupa B2	$73,53 \pm 3,36$	7	72,30	70,10– 79,70

Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa B: kontrola grupi D; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; B2 grupa: kontrola grupama E i F; ^a D vs B, $p < 0,01$; ^b E vs B2, $p < 0,01$; ^c E vs F, $p < 0,01$

6.2.3.3. Koncentracija ukupnih proteina u različitoj starosnoj dobi

Kod pacova mlađe životne dobi utvrđeno je postojanje značajno nižih vrednosti ukupnih proteina u odnosu na kontrolne grupe starijih pacova (Tabela 15).

Tabela 15. Ukupni proteini u starosno različitim kontrolnim grupama.

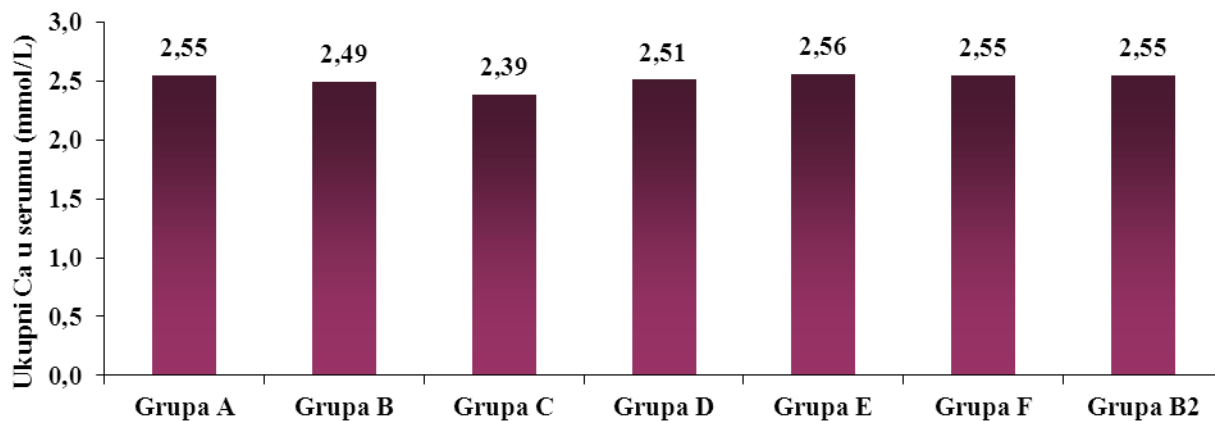
	Ukupni proteini (g/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa A	$62,41 \pm 3,84$	10	61,95	55,80– 67,70
Grupa B	$72,26 \pm 2,23^a$	10	72,55	67,70– 75,00
Grupa B2	$73,53 \pm 3,36^b$	7	72,30	70,10– 79,70

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola starosne dobi 18 nedelja; Grupa B2: kontrola starosne dobi 21 nedelja; ^a B vs A, $p < 0,001$; ^b B2 vs A, $p < 0,001$

6.3. Rezultati koncentracije kalcijuma i fosfora u serumu

6.3.1. Ukupni kalcijum u serumu

Srednja vrednost koncentracije ukupnog kalcijuma u svim ispitivanim grupama prikazana je na Grafikonu 5.



Grafikon 5. Srednja vrednost ukupnog kalcijuma u ispitivanim grupama.

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola grupama C i D (starosna dob 18 nedelja); Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; Grupa B2: kontrola grupama E i F (starosna dob 21 nedelja).

6.3.1.1. Ukupni kalcijum u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Srednja vrednost koncentracije ukupnog kalcijuma u fiziološkoj hiperprolaktinemiji nije se značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 16).

Tabela 16. Ukupni kalcijum u fiziološkoj hiperprolaktinemiji.

	Ukupni Ca (mmol/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa B	2,49±0,04	10	2,49	2,45– 2,58
Grupa C	2,39±0,14	9	2,41	2,10– 2,58

Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa B: kontrolna grupa.

6.3.1.2. Ukupni kalcijum u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

Nivo ukupnog kalcijuma u fiziološkoj hiperprolaktinemiji kretao se u opsegu referentnih vrednosti, bez statistički značajne razlike između grupa (Tabela 17).

Tabela 17. Ukupni kalcijum u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

	Ukupni Ca (mmol/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa D	2,51±0,06	10	2,51	2,41– 2,58
Grupa B	2,49±0,04	10	2,49	2,45– 2,58
Grupa E	2,56±0,06	10	2,56	2,48– 2,67
Grupa F	2,55±0,08	10	2,57	2,37– 2,68
Grupa B2	2,55±0,07	7	2,52	2,45– 2,65

Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa B: kontrola grupi D; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; B2 grupa: kontrola grupama E i F.

6.3.1.3. Ukupni kalcijum u različitoj starosnoj dobi

Kod mladih pacova zabeležena je značajno viša koncentracija ukupnog kalcijuma u odnosu na grupu B (2,55±0,07 mmol/L vs 2,49±0,04 mmol/L; p<0,05) i pored toga što su sve vrednosti bile u referentnom opsegu (Tabela 18).

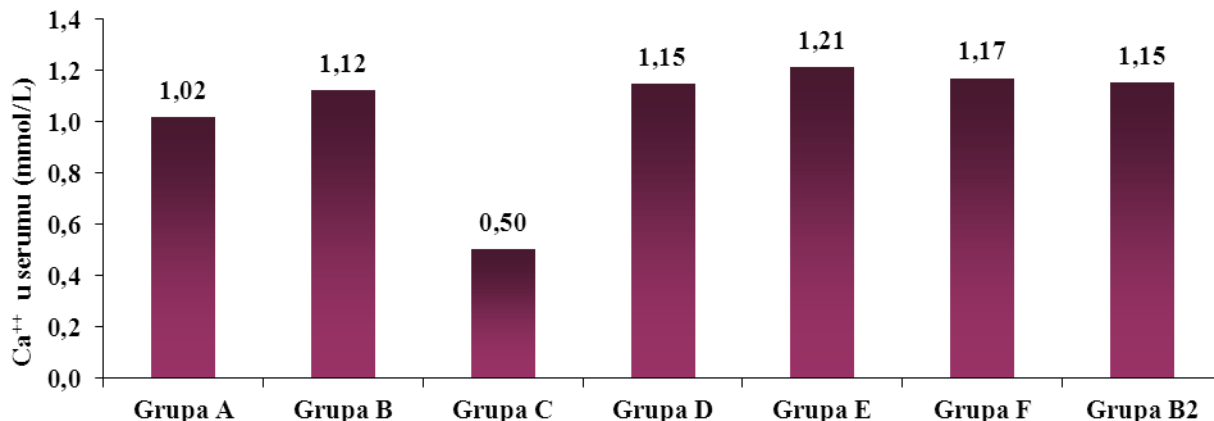
Tabela 18. Ukupni kalcijum u različitim starosnim dobima.

	Ukupni Ca (mmol/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa A	2,55±0,07 ^a	10	2,55	2,44– 2,66
Grupa B	2,49±0,04	10	2,49	2,45– 2,58
Grupa B2	2,55±0,07	7	2,52	2,45– 2,65

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola starosne dobi 18 nedelja; Grupa B2: kontrola starosne dobi 21 nedelja;^a A vs B, p<0,05

6.3.2. Jonizovani kalcijum

Srednja vrednost koncentracije jonizovanog kalcijuma u svim ispitivanim grupama prikazana je na Grafikonu 6.



Grafikon 6. Srednja vrednost jonizovanog kalcijuma u ispitivanim grupama.

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola grupama C i D (starosna dob 18 nedelja); Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; Grupa B2: kontrola grupama E i F (starosna dob 21 nedelja).

6.3.2.1. Jonizovani kalcijum u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Srednje vrednost jonizovanog kalcijuma kod pacova sa fiziološkom hiperprolaktinemijom bila je signifikantno niža u odnosu na kontrolnu grupu ($0,50 \pm 0,2$ mmol/L vs. $1,12 \pm 0,04$ mmol/L; $p < 0,001$). Rezultati su prikazani u Tabeli 19.

Tabela 19. Jonizovani kalcijum u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

	Ca ⁺⁺ (mmol/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa C	$0,50 \pm 0,20^a$	9	0,41	0,29– 0,82
Grupa B	$1,12 \pm 0,04$	10	1,14	1,04– 1,17

Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa B: kontrolna grupa; ^a C vs B, $p < 0,001$

6.3.2.2. Jonizovani kalcijum u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

U svim eksperimentalnim grupama sa medikamentnom hiperprolaktinemijom zabeležen je porast koncentracije jonizovanog kalcijuma u serumu. Statistički značajno više koncentracije verifikovane su u grupi D u odnosu na grupu B ($1,15 \pm 0,04$ mmol/L vs. $1,12 \pm 0,04$ mmol/L; $p < 0,05$) i u grupi E u odnosu na grupu F i B2 (E vs F: $1,21 \pm 0,03$ mmol/L vs. $1,17 \pm 0,03$ mmol/L; $p < 0,01$ i E vs B2: $1,21 \pm 0,03$ mmol/L vs. $1,15 \pm 0,02$ mmol/L; $p < 0,001$). Sa prolongiranjem medikamentne hiperprolaktinemije verifikovan je i signifikantni porast koncentracije jonizovanog kalcijuma (E vs. D: $1,21 \pm 0,03$ mmol/L vs. $1,15 \pm 0,04$ mmol/L; $p < 0,001$). Rezultati su prikazani u Tabeli 20.

Tabela 20. Jonizovani kalcijum u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

	Ca ⁺⁺ (mmol/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa D	$1,15 \pm 0,04$ ^a	10	1,14	1,09– 1,22
Grupa B	$1,12 \pm 0,04$	10	1,14	1,04– 1,17
Grupa E	$1,21 \pm 0,03$ ^{b,c,d}	10	1,21	1,18– 1,25
Grupa F	$1,17 \pm 0,03$	10	1,17	1,12– 1,23
Grupa B2	$1,15 \pm 0,02$	7	1,15	1,12– 1,19

Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa B: kontrola grupi D; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; B2 grupa: kontrola grupama E i F; ^a D vs B, $p < 0,05$; ^b E vs F, $p < 0,01$; ^c E vs B2, $p < 0,001$; ^d E vs D, $p < 0,001$

6.3.2.3. Jonizovani kalcijum u različitoj starosnoj dobi

Srednja vrednost jonizovanog kalcijuma kod mladih pacova bila je značajno niža u odnosu na kontrolne grupe starije životne dobi (A vs. B: $1,02 \pm 0,1$ mmol/L vs. $1,12 \pm 0,04$ mmol/L; $p < 0,05$ i A vs. B2: $1,02 \pm 0,1$ mmol/L vs. $1,15 \pm 0,02$ mmol/L; $p < 0,01$; Tabela 21).

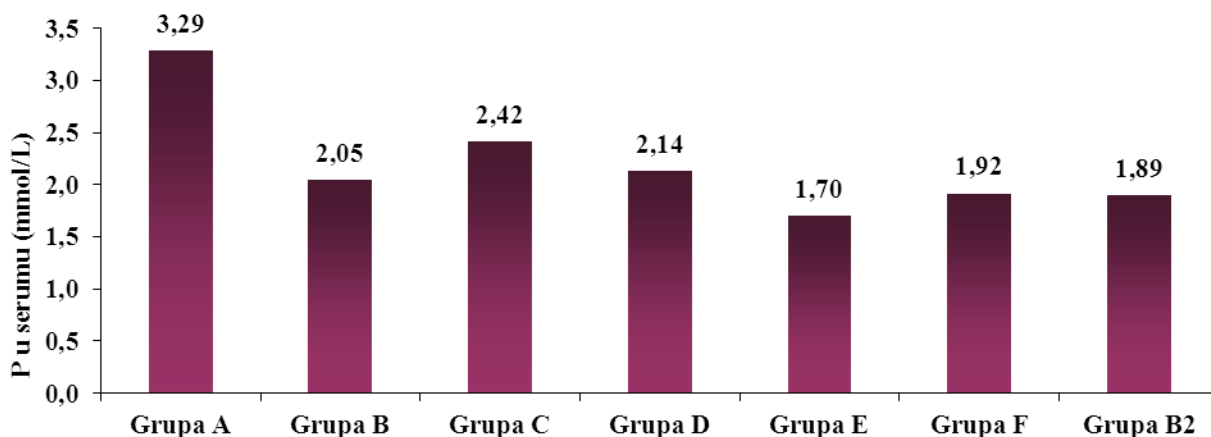
Tabela 21. Jonizovani kalcijum u starosno različitim kontrolnim grupama.

	Ca ⁺⁺ (mmol/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa A	1,02±0,10 ^{a,b}	10	1,06	0,83– 1,11
Grupa B	1,12±0,04	10	1,14	1,04– 1,17
Grupa B2	1,15±0,02	7	1,15	1,12– 1,19

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola starosne dobi 18 nedelja; Grupa B2: kontrola starosne dobi 21 nedelja; ^a A vs B, p<0,05; ^b A vs B2, p<0,01

6.3.3. Fosfor u serumu

Srednja vrednost koncentracije fosfora u svim ispitivanim grupama prikazana je na Grafikonu 7.



Grafikon 7. Srednja vrednost fosfora u ispitivanim grupama.

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola grupama C i D (starosna dob 18 nedelja); Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; Grupa B2: kontrola grupama E i F (starosna dob 21 nedelja).

6.3.3.1. Fosfor u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Uporedo sa padom jonizovanog kalcijuma u fiziološkoj hiperprolaktinemiji, zabeležen je i statistički značajan porast koncentracije fosfata u serumu ($2,42 \pm 0,46$ mmol/L vs. $2,05 \pm 0,19$ mmol/L; $p < 0,05$). Rezultati ovih analiza prikazani su u Tabeli 22.

Tabela 22. Fosfor u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

	P u serumu (mmol/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa C	$2,42 \pm 0,46^a$	9	2,23	2,00– 3,29
Grupa B	$2,05 \pm 0,19$	10	2,05	1,73– 2,46

Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa B: kontrolna grupa; ^aC vs B, $p < 0,05$

6.3.3.2. Fosfor u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

Koncentracija fosfora u serumu, kod svih eksperimentalnih životinja sa medikamentnom hiperprolaktinemijom, bila je u granicama normale. Poredeći srednje vrednosti koncentracije fosfora u grupama D, E i F sa odgovarajućim kontrolama (B i B2) nije viđena statistički značajna razlika. Zabeležen je samo značajan pad koncentracije fosfora sa prolongiranjem medikamentne hiperprolaktinemije (D vs. E: $2,14 \pm 0,48$ mmol/L vs. $1,70 \pm 0,13$ mmol/L; $p < 0,05$; Tabela 23).

Tabela 23. Fosfor u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

	P u serumu (mmol/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa D	$2,14 \pm 0,48^a$	10	2,05	1,67– 3,39
Grupa B	$2,05 \pm 0,19$	10	2,05	1,73– 2,46
Grupa E	$1,70 \pm 0,13$	10	1,70	1,43– 1,91
Grupa F	$1,92 \pm 0,16$	10	1,87	1,68– 2,22
Grupa B2	$1,89 \pm 1,89$	7	1,87	1,37– 2,32

Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa B: kontrola grupi D; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; B2 grupa: kontrola grupama E i F; ^aD vs E, $p < 0,05$

6.3.3.3. Fosfor u različitoj starosnoj dobi

Srednja vrednost koncentracije fosfora u serumu, bila je značajno viša u odnosu na kontrolne grupe starije životne dobi (A vs B: $3,29 \pm 0,81$ mmol/L vs. $2,05 \pm 0,19$ mmol/L; $p < 0,001$ i A vs. B2: $3,29 \pm 0,81$ mmol/L vs. $1,89 \pm 0,32$ mmol/L; $p < 0,001$; Tabela 24).

Tabela 24. Fosfor u starosno različitim kontrolnim grupama.

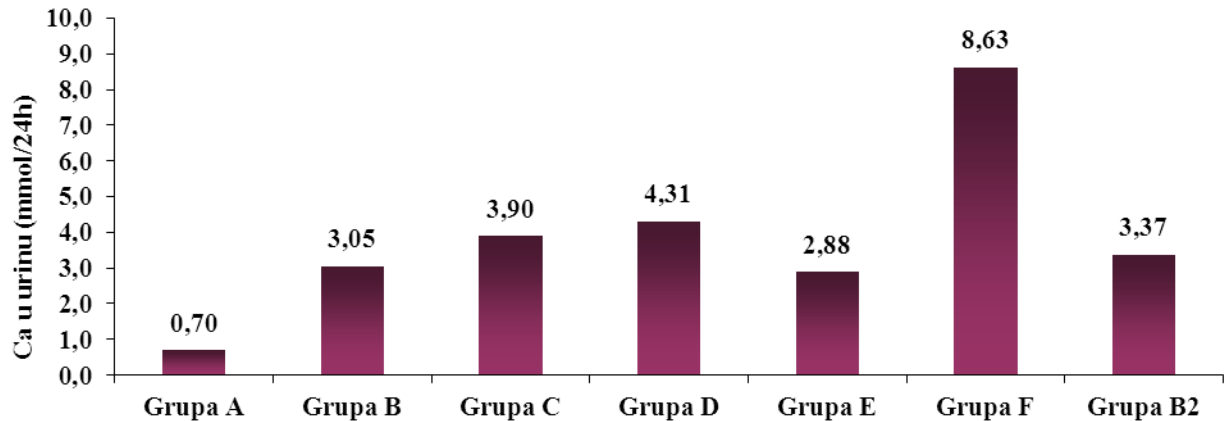
	P u serumu (mmol/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa A	$3,29 \pm 0,81^{a,b}$	10	2,93	2,84– 5,49
Grupa B	$2,05 \pm 0,19$	10	2,05	1,73– 2,46
Grupa B2	$1,89 \pm 0,32$	7	1,87	1,37– 2,32

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola starosne dobi 18 nedelja; Grupa B2: kontrola starosne dobi 21 nedelja; ^aA vs B, $p < 0,001$; ^bA vs B2, $p < 0,001$

6.4. Rezultati kalcijum- i fosforeze

6.4.1. Kalcijumureza

Rezultati 24-časovne kalcijumureze u ispitivanim grupama prikazani su na Grafikonu 8.



Grafikon 8. Kalcijumureza u ispitivanim grupama.

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola grupama C i D (starosna dob 18 nedelja); Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; Grupa B2: kontrola grupama E i F (starosna dob 21 nedelja).

6.4.1.1. Kalcijumureza u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Poredeci 24-h kalcijumurezu kod gravidnih eksperimentalnih životinja sa kontrolnom grupom verifikovano je signifikantno veće izlučivanje kalcijuma u fiziološkoj hiperprolaktinemiji ($3,90 \pm 0,46$ mmol/24h vs. $3,05 \pm 0,58$ mmol/24h; $p < 0,01$; Tabela 25).

Tabela 25. Kalcijumureza u fiziološkoj hiperprolaktinemiji.

	Ca u urinu (mmol/24h) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa C	$3,90 \pm 0,46^a$	9	4,06	3,26– 4,54
Grupa B	$3,05 \pm 0,58$	10	3,17	2,28– 3,99

Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa B: kontrolna grupa; ^aC vs B, $p < 0,01$

6.4.1.2. Kalcijumureza u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

U tronedeljnoj medikamentnoj hiperprolaktinemiji, zapažen je signifikantni porast kalcijumureze u odnosu na kontrolnu grupu ($4,31 \pm 1,11$ mmol/24h vs. $3,05 \pm 0,58$ mmol/24h; $p < 0,01$). Sa prolongiranjem hiperprolaktinemije, kalcijumureza značajno opada poredeći rezultate grupe D i E ($4,31 \pm 1,11$ mmol/24h vs. $2,88 \pm 0,60$ mmol/24h; $p < 0,01$) dok poredeći grupu E sa starosno odgovarajućom kontrolnom grupom statistički značajna razlika izostaje ($2,88 \pm 0,60$ mmol/24h vs. $3,37 \pm 0,87$ mmol/24h). Dodavanjem suplementne terapije kalcijuma i vitamina D, životinjama sa medikamentnom hiperprolaktinemijom, dolazi do značajnog porasta kalcijumureze (F vs B2: $8,63 \pm 2,08$ mmol/24h vs. $3,37 \pm 0,87$ mmol/24h; $p < 0,001$; F vs. E: $8,63 \pm 2,08$ mmol/24h vs. $2,88 \pm 0,60$ mmol/24h; $p < 0,001$; F vs.D: $8,63 \pm 2,08$ mmol/24h vs. $4,31 \pm 1,11$ mmol/24h; $p < 0,001$; Tabela 26).

Tabela 26. Kalcijumureza u medikamentnoj hiperprolaktinemiji.

	Ca u urinu (mmol/24h) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa D	$4,31 \pm 1,11^{a,b}$	10	4,27	2,81– 6,53
Grupa B	$3,05 \pm 0,58$	10	3,17	2,28– 3,99
Grupa E	$2,88 \pm 0,60$	10	2,83	2,06– 3,83
Grupa F	$8,63 \pm 2,08^{c,d,e}$	10	8,88	5,22– 11,40
Grupa B2	$3,37 \pm 0,87$	7	3,70	1,75– 4,17

Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa B: kontrola grupi D; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; B2 grupa: kontrola grupama E i F; ^a D vs B, $p < 0,01$; ^b D vs E, $p < 0,01$; ^c F vs B2, $p < 0,001$; ^d F vs D, $p < 0,001$; ^e F vs E, $p < 0,001$

6.4.1.3. Kalcijumureza u različitoj životnoj dobi

Kod mladih pacova verifikovana je značajno niža kalcijumureza u odnosu na eksperimentalne životinje starije životne dobi (A vs. B: $0,70 \pm 0,25$ mmol/24h vs. $3,05 \pm 0,58$ mmol/24h; $p < 0,001$ i A vs. B2: $0,70 \pm 0,25$ mmol/24h vs. $3,37 \pm 0,87$ mmol/24h; $p < 0,001$, Tabela 27).

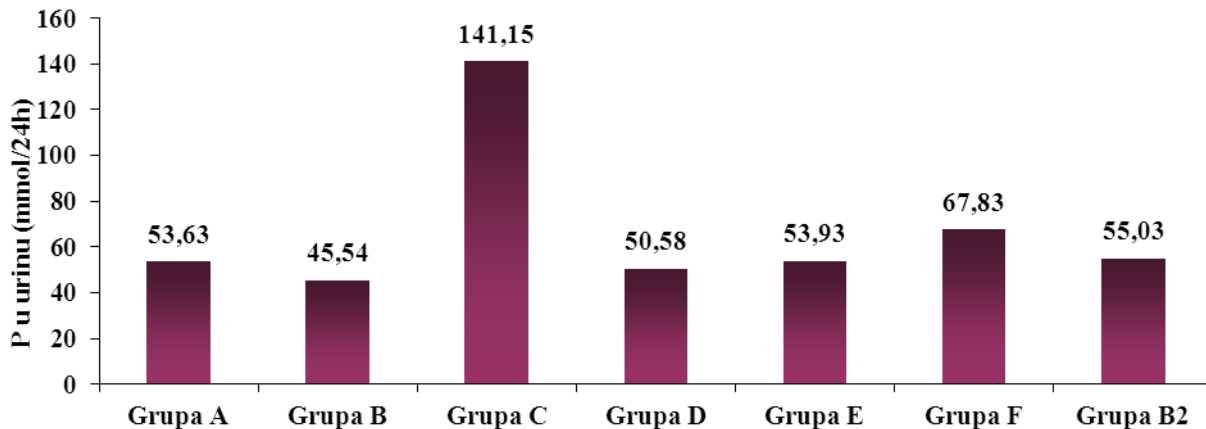
Tabela 27. Kalcijumureza u starosno različitim kontrolnim grupama.

	Ca u urinu (mmol/24h) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa A	0,70±0,25 ^{a,b}	10	0,66	0,46– 1,28
Grupa B	3,05±0,58	10	3,17	2,28– 3,99
Grupa B2	3,37±0,87	7	3,70	1,75– 4,17

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola starosne dobi 18 nedelja; Grupa B2: kontrola starosne dobi 21 nedelja; ^a A vs B, p<0,001; ^b A vs B2, p<0,001

6.4.2. Fosfoureza

Rezultati 24-časovne fosfoureze u ispitivanim grupama prikazani su na Grafikonu 9.



Grafikon 9. Fosfoureza u ispitivanim grupama.

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola grupama C i D (starosna dob 18 nedelja); Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; Grupa B2: kontrola grupama E i F (starosna dob 21 nedelja).

6.4.2.1. Fosfoureza u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Srednja vrednost 24-h fosfoureze, u fiziološkoj hiperprolaktinemiji, bila je signifikantno viša u odnosu na kontrolnu grupu ($141,15 \pm 20,65$ mmol/24h vs. $45,54 \pm 7,99$ mmol/24h; $p < 0,001$, Tabela 28).

Tabela 28. Fosfoureza u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

	P u urinu (mmol/24h) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa C	$141,15 \pm 20,65^a$	9	140,92	119,86– 191,30
Grupa B	$45,54 \pm 7,99$	10	45,88	33,18– 56,08

Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa B: kontrolna grupa; ^a C vs B, $p < 0,001$

6.4.2.2. Fosfoureza u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

Signifikantno viša fosfoureza zabeležena je u grupi F u odnosu na grupu D ($67,83 \pm 16,78$ mmol/24h vs. $50,58 \pm 9,77$ mmol/24h; $p < 0,05$, Tabela 29).

Tabela 29. Fosfoureza u medikamentnoj hiperprolaktinemiji.

	P u urinu (mmol/24h) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa D	$50,58 \pm 9,77$	10	51,72	35,73– 64,26
Grupa B	$45,54 \pm 7,99$	10	45,88	33,18– 56,08
Grupa E	$53,93 \pm 14,05$	10	52,96	33,57– 80,48
Grupa F	$67,83 \pm 16,78^a$	10	66,54	46,58– 87,51
Grupa B2	$55,03 \pm 20,37$	7	45,59	39,37– 95,44

Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa B: kontrola grupi D; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; B2 grupa: kontrola grupama E i F; ^aF vs D, $p < 0,05$

6.4.2.3. Fosfoureza u različitoj životnoj dobi

Značajno viša fosfoureza zabeležena je samo u grupi mladih pacova u odnosu na grupu B ($53,63 \pm 8,12$ mmol/24h vs $45,54 \pm 7,99$ mmol/24h; $p < 0,05$, Tabela 30).

Tabela 30. Fosfoureza u u starosno različitim kontrolnim grupama.

	P u urinu (mmol/24h) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa A	$53,63 \pm 8,12^a$	10	53,51	40,37– 68,63
Grupa B	$45,54 \pm 7,99$	10	45,88	33,18– 56,08
Grupa B2	$55,03 \pm 20,37$	7	45,59	39,37– 95,44

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola starosne dobi 18 nedelja; Grupa B2: kontrola starosne dobi 21 nedelja; ^aA vs B, $p < 0,05$

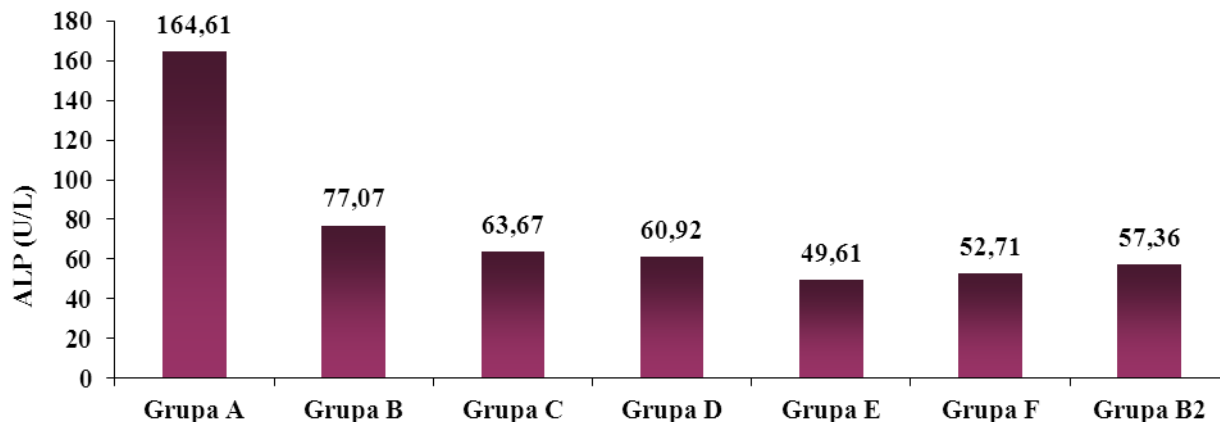
6.5. Rezultati koncentracije vitamina D

Nivo vitamina D je u svim ispitivanim grupama, izuzev grupe F, bio nemerljivo nizak, pa samim tim nije bila moguća statistička obrada podataka.

6.6. Rezultati nivoa biohemijskih markera koštane formacije

6.6.1. Alkalna fosfataza

Aktivnost alkalne fosfataze u ispitivanim grupama prikazana je na Grafikonu 10.



Grafikon 10. Aktivnost ALP u ispitivanim grupama.

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola grupama C i D (starosna dob 18 nedelja); Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; Grupa B2: kontrola grupama E i F (starosna dob 21 nedelja).

6.6.1.1. ALP u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Aktivnost ALP u fiziološkoj hiperprolaktinemiji, nije se značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu (Tabela 31).

Tabela 31. Aktivnost ALP u fiziološkoj hiperprolaktinemiji.

	ALP (U/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa C	63,67±21,19	9	59,30	42,20– 115,70
Grupa B	77,07±22,60	10	81,10	46,80– 119,50

Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa B: kontrolna grupa.

6.6.1.2. ALP u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

Kod svih eksperimentalnih grupa sa medikamentnom hiperprolaktinemijom, aktivnost ALP bila je nešto niža u odnosu na starosno odgovarajuće kontrolne grupe, ali bez signifikantne razlike (Tabela 32).

Tabela 32. Aktivnost ALP u medikamentnoj hiperprolaktinemiji.

	ALP (U/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa D	60,92±19,40	10	56,90	32,20– 96,20
Grupa B	77,07±22,60	10	81,10	46,80– 119,50
Grupa E	49,61±14,39	10	44,20	32,10– 79,80
Grupa F	52,71±19,14	10	49,55	27,50– 101,50
Grupa B2	57,36±22,92	7	48,00	36,60– 97,00

Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa B: kontrola grupi D; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; B2 grupa: kontrola grupama E i F.

6.6.1.3. ALP u različitoj starosnoj dobi

Kod mladih pacova nađena je značajno viša aktivnost ALP u odnosu na grupe starije životne dobi (A vs B: 164,61±42,42 U/L vs. 77,07±22,60 U/L; $p<0,001$ i A vs. B2: 164,61±42,42 U/L vs. 57,36±22,92 U/L; $p<0,001$). Iako je aktivnost ALP pokazala tendenciju pada u grupi B2 (21 nedelja starosti) u odnosu na grupu B (18 nedelja starosti) signifikantna razlika nije potvrđena (Tabela 33).

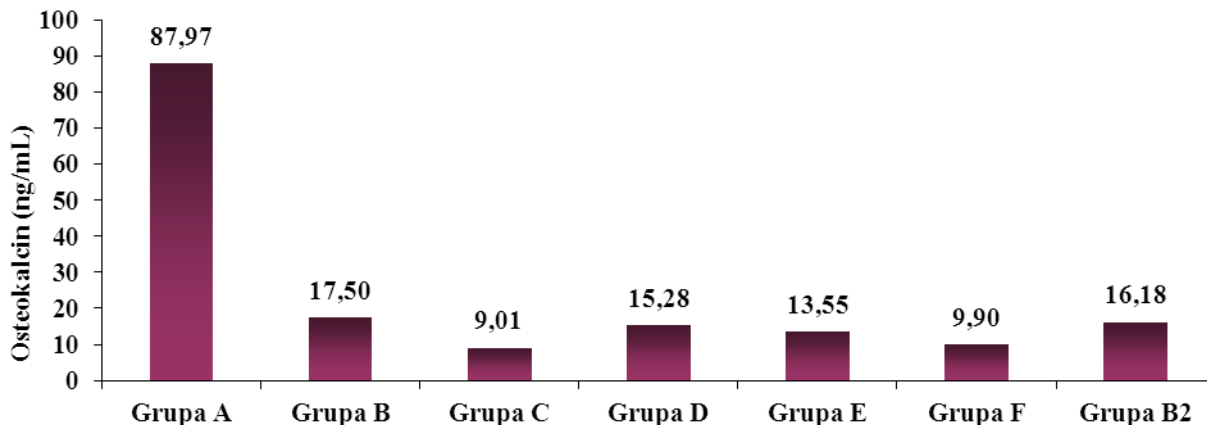
Tabela 33. Aktivnost ALP u starosno različitim kontrolnim grupama.

	ALP (U/L) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa A	164,61±42,42 ^{a,b}	10	146,45	124,70– 242,50
Grupa B	77,07±22,60	10	81,10	46,80– 119,50
Grupa B2	57,36±22,92	7	48,00	36,60– 97,00

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola starosne dobi 18 nedelja; Grupa B2: kontrola starosne dobi 21 nedelja; ^a A vs B, $p<0,001$; ^b A vs B2, $p<0,001$

6.6.2. Osteokalcin

Koncentracija osteokalcina u ispitivanim grupama prikazana je na Grafikonu 11.



Grafikon 11. Koncentracija osteokalcina u ispitivanim grupama.

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola grupama C i D (starosna dob 18 nedelja); Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; Grupa B2: kontrola grupama E i F (starosna dob 21 nedelja).

6.6.2.1. OC u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

U fiziološkoj hiperprolaktinemiji utvrđena je značajno niža koncentracija OC u odnosu na kontrolnu grupu ($9,01 \pm 1,09$ ng/mL vs $17,50 \pm 2,76$ ng/mL; $p < 0,001$, Tabela 34.)

Tabela 34. Koncentracija OC u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

	OC (ng/mL) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa C	$9,01 \pm 1,09^a$	9	9,00	7,18– 10,61
Grupa B	$17,50 \pm 2,76$	10	17,81	13,43– 23,16

Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa B: kontrolna grupa; ^a C vs B, $p < 0,001$

6.6.2.2. OC u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

U eksperimentalnim grupama D i E, nije zabeležena značajna razlika u koncentraciji OC u poređenju sa starosno odgovarajućim kontrolnim grupama. Dodavanjem

suplementne terapije (kalcijum i vitamin D) pacovima sa medikamentnom hiperprolaktinijom, značajno se snižava koncentracija OC (F vs B2: $9,90 \pm 1,98$ ng/mL vs. $16,18 \pm 2,0$ ng/mL; $p < 0,001$; F vs E: $9,90 \pm 1,98$ ng/mL vs. $13,55 \pm 3,42$ ng/mL; $p < 0,01$ i F vs. D: $9,90 \pm 1,98$ ng/mL vs. $15,28 \pm 2,51$ ng/mL; $p < 0,001$, Tabela 35).

Tabela 35. Koncentracija OC u medikamentnoj hiperprolaktiniji

	OC (ng/mL) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa D	$15,28 \pm 2,51$	10	15,62	11,23– 18,94
Grupa B	$17,50 \pm 2,76$	10	17,81	13,43– 23,16
Grupa E	$13,55 \pm 3,42$	10	12,29	8,73– 19,14
Grupa F	$9,90 \pm 1,98^{a,b,c}$	10	9,43	7,20– 13,07
Grupa B2	$16,18 \pm 2,00$	7	16,41	12,84– 18,99

Grupa D: medikamentna hiperprolaktinija u trajanju od 3 nedelje; Grupa B: kontrola grupi D; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; B2 grupa: kontrola grupama E i F; ^a F vs B2, $p < 0,001$; ^b F vs D, $p < 0,001$; ^c F vs E, $p < 0,01$

6.6.2.3. OC u različitoj starosnoj dobi

Signifikantno viša koncentracija OC, zabeležena je kod mladih pacova u odnosu na starije eksperimentalne životinje (A vs B: $87,97 \pm 10,0$ ng/mL vs. $17,50 \pm 2,76$ ng/mL; $p < 0,001$ i A vs B2: $87,97 \pm 10,0$ ng/mL vs. $16,18 \pm 2,0$ ng/mL; $p < 0,001$). Najniža koncentracija OC zabeležena je u najstarijoj eksperimentalnoj grupi (B2) ali bez značajne razlike u odnosu na B. Rezultati su prikazani u Tabeli 36.

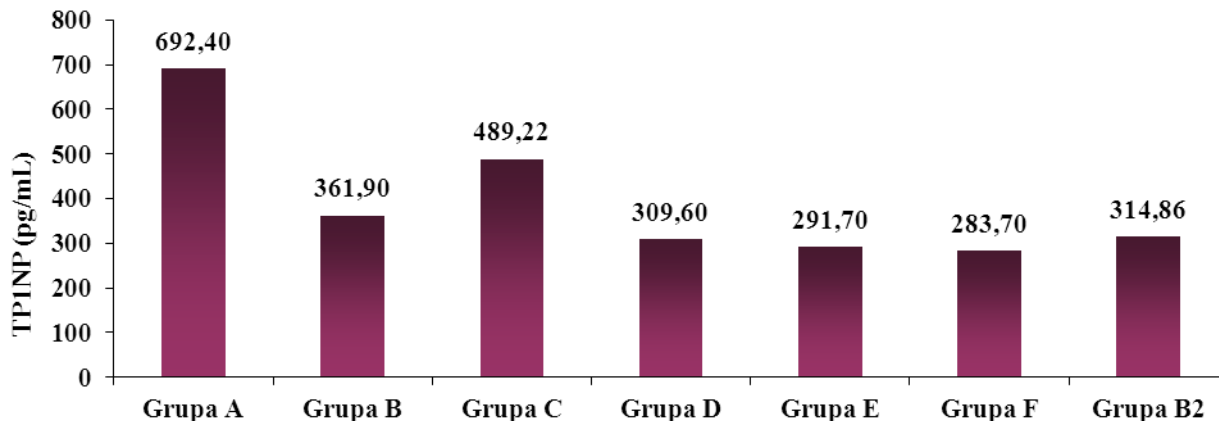
Tabela 36. Koncentracija OC u starosno različitim kontrolnim grupama.

	OC (ng/mL) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa A	$87,97 \pm 10,00^{a,b}$	10	86,90	69,44– 105,30
Grupa B	$17,50 \pm 2,76$	10	17,81	13,43– 23,16
Grupa B2	$16,18 \pm 2,00$	7	16,41	12,84– 18,99

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola starosne dobi 18 nedelja; Grupa B2: kontrola starosne dobi 21 nedelja; ^a A vs B, $p < 0,001$; ^b A vs B2, $p < 0,001$

6.6.3. Prokolagen tip I amino terminalni propeptid

Koncentracija TP1NP u ispitivanim grupama prikazana je na Grafikonu 12.



Grafikon 12. Koncentracija TP1NP u ispitivanim grupama.

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola grupama C i D (starosna dob 18 nedelja); Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; Grupa B2: kontrola grupama E i F (starosna dob 21 nedelja).

6.6.3.1. TP1NP u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

U eksperimentalnoj grupi sa fiziološkom hiperprolaktinemijom verifikovana je statistički značajno viša koncentracija TP1NP u poređenju sa kontrolom ($489,22 \pm 46,77$ pg/mL vs $361,90 \pm 53,01$ pg/mL; $p < 0,001$, Tabela 37).

Tabela 37. Koncentracija TP1NP u fiziološkoj hiperprolaktinemiji.

	TP1NP (pg/mL) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa C	$489,22 \pm 46,77^a$	9	474,00	443,00– 596,00
Grupa B	$361,90 \pm 53,01$	10	368,00	278,00– 449,00

Grupa C: fiziološka hiperprolaktinemija; Grupa B: kontrolna grupa; ^aC vs B, $p < 0,001$

6.6.3.2. TP1NP u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

Srednja vrednost koncentracije TP1NP u grupi D bila je značajno niža u odnosu na kontrolnu grupu ($309,60 \pm 36,74$ pg/mL vs. $361,90 \pm 53,01$ pg/mL; $p < 0,05$). Sa

prolongiranjem medikamentne hiperprolaktinemije, koncentracij TP1NP bila je u padu, ali bez statističke značajnosti. Rezultati su prikazani u Tabeli 38.

Tabela 38. Koncentracija TP1NP u medikamentnoj hiperprolaktinemiji.

	TP1NP (pg/mL) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa D	309,60±36,74 ^a	10	318,00	226,00– 365,00
Grupa B	361,90±53,01	10	368,00	278,00– 449,00
Grupa E	291,70±71,03	10	320,50	168,00– 363,00
Grupa F	283,70±86,52	10	307,50	85,00– 402,00
Grupa B2	314,86±50,99	7	345,00	248,00– 362,00

Grupa D: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 3 nedelje; Grupa B: kontrola grupi D; Grupa E: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja; Grupa F: medikamentna hiperprolaktinemija u trajanju od 6 nedelja, uz tronedeljnu suplementnu terapiju kalcijumom i vitaminom D; B2 grupa: kontrola grupama E i F; ^a D vs B, p<0,05

6.6.3.3. TP1NP u različitoj starosnoj dobi

Koncentracija TP1NP kod mladih pacova bila je značajno viša u odnosu na starije eksperimentalne kontrolne grupe (A vs. B: 692,40±92,68 pg/mL vs. 361,90±53,01pg/mL; p<0,001 i A vs. B2: 692,40±92,68 pg/mL vs. 314,86±50,99pg/mL; p<0,001). Najniža koncentracija TP1NP zabeležena je u najstarijoj kontrolnoj grupi (B2) ali bez statistički značajne razlike u odnosu na B. Rezultati su prikazani u Tabeli 39.

Tabela 39. Koncentracija TP1NP u starosno različitim kontrolnim grupama.

	TP1NP (pg/mL) X±SD	N	Me	Min– Max
Grupa A	692,40±92,68 ^{a,b}	10	707,00	516,00– 791,00
Grupa B	361,90±53,01	10	368,00	278,00– 449,00
Grupa B2	314,86±50,99	7	345,00	248,00– 362,00

Grupa A: starosna dob 5 nedelja; Grupa B: kontrola starosne dobi 18 nedelja; Grupa B2: kontrola starosne dobi 21 nedelja; ^a A vs B, p<0,001; ^b A vs B2, p<0,001

6.7. Rezultati PCR analize u duodenumu.

6.7.1. Genska ekspresija PRLR u duodenumu eksperimentalnih grupa C, D i B

ANOVA analiza, utvrdila je statistički značajno višu ekspresiju PRLR u grupi C i značajno nižu ekspresiju PRLR u grupi D, u odnosu na kontrolnu grupu B ($p < 0,001$). Logaritam za osnovu 2 bio je najviši u eksperimentalnoj grupi C.

Sledstvena Post-hock analiza pokazala je da je odnos relativne genske ekspresije PRLR u fiziološkoj hiperprolaktinemiji i kontrolnoj grupi, statistički značajno viši u poređenju sa odnosom ekspresije gena za PRLR u medikamentnoj hiperprolaktinemiji i iste kontrolne grupe ($p < 0,001$). Rezultati su prikazani u Tabeli 40.

Tabela 40. Odnos relativne ekspresije gena PRLR u duodenumu grupa C i D.

	N	Mean \pm SD	95% CI	Min	Max
$\log_2(C/B)$	6	10,02 \pm 1,41 ^a	8,54 –11,50	8,07	11,47
$\log_2(D/B)$	4	4,26 \pm 0,60	3,30 –5,22	3,72	4,90

F=39,13, p = 0,0000 < 0,001

^a $\log_2(C/B)$ vs $\log_2(D/B)$, $p < 0,001$

6.7.2. Genska ekspresija PRLR u duodenumu eksperimentalnih grupa E, F i B2

Ekspresija PRLR u grupi E, bila je niža, a ekspresija PRLR u grupi F viša, u odnosu na kontrolnu grupu B2, sa statistički značajnom razlikom od $p < 0,01$.

Odnos relativne genske ekspresije PRLR u prolongiranoj hiperprolaktinemiji i starosno odgovarajuće kontrolne grupe, signifikantno je manji u poređenju sa odnosom ekspresije gena za PRLR u medikamentnoj hiperprolaktinemiji uz suplementnu terapiju (Ca i vitamin D) i iste kontrolne grupe ($p < 0,01$). Rezultati su prikazani u Tabeli 41.

Tabela 41. Odnos relativne genske ekspresije PRLR u duodenumu grupa E i F.

	N	Mean \pm SD	95% CI	Min	Max
$\log_2(E/B2)$	6	3,34 \pm 1,49 ^a	1,78 –4,90	1,67	5,42
$\log_2(F/B2)$	5	6,41 \pm 0,74	5,50 –7,33	5,34	7,01

^a $\log_2(E/B2)$ vs $\log_2(F/B2)$, $p < 0,01$; t-test = 4,19, p = 0,0024 < 0,01

6.7.3. Genska ekspresija PRLR u duodenumu eksperimentalnih grupa A, B i B2

Ekspresija PRLR u duodenumu grupa A i B bila je niža u odnosu na grupu B2, ali bez statistički značajne razlike.

Relativna ekspresija gena PRLR u duodenumu mladih pacova veća je u odnosu na gensku ekspresiju PRLR u duodenumu eksperimentalnih životinja starije životne dobi, ali bez statističke značajnosti (Tabela 42).

Tabela 42. Odnos relativne genske ekspresije PRLR u duodenumu grupa A i B.

	N	Mean ± SD	95% CI	Min	Max
$\log_2(A/B2)$	5	-0,85 ± 1,92	-3,23 – 1,54	-3,78	1,22
$\log_2(B/B2)$	5	-1,61 ± 0,41	-2,11 – -1,10	-2,07	-1,28

t-test = 0,87, p = 0,41199

6.8. Rezultati PCR analize u bubregu

6.8.1. Genska ekspresija PRLR u bubregu eksperimentalnih grupa C, D i B

ANOVA analiza je utvrdila statistički značajnu nižu ekspresiju PRLR u grupi C i značajno višu ekspresiju PRLR u grupi D u poređenju sa kontrolnom grupom B ($p < 0,01$). Sledstvena Post-hoc analiza pokazala je da je odnos relativne genske ekspresije PRLR u bubregu, u fiziološkoj hiperprolaktinemiji i kontrolne grupe, signifikantno niži u poređenju sa odnosom relativne genske ekspresije PRLR u medikamentnoj hiperprolaktinemiji i iste kontrolne grupe ($p < 0,001$). Rezultati su prikazani u Tabeli 43.

Tabela 43. Odnos relativne ekspresije gena PRLR u bubregu grupa C i D.

	N	Mean ± SD	95% CI	Min	Max
$\log_2(C/B)$	7	-1,23 ± 0,36	-1,68 – 0,78	-1,66	-0,6
$\log_2(D/B)$	8	0,74 ± 0,84 ^a	0,04 – 1,44	0,15	2,22

F=7,83, p = 0,0011 < 0,01

^a $\log_2(D/B)$ vs $\log_2(C/B)$, $p < 0,001$

6.8.2. Genska ekspresija PRLR u bubregu eksperimentalnih grupa E, F i B2

Ekspresija PRLR u grupama E i F bila je povišena u odnosu na grupu B2, ali bez statističke značajnosti.

Relativna genska ekspresija PRLR u bubregu pacova sa prolongiranom medikamentnom hiperprolaktinemijom, nije značajno izmenjena u odnosu na relativnu ekspresiju PRLR u bubregu pacova eksperimentalne grupe F. Rezultati su prikazani u Tabeli 44.

Tabela 44. Odnos relativne ekspresije gena PRLR u bubregu grupa E i F.

	N	Mean ± SD	95% CI	Min	Max
log ₂ (E/B2)	5	13,22 ± 0,88	12,12 – 14,31	12,10	14,25
log ₂ (F/B2)	6	13,05 ± 0,71	12,30 – 13,79	12,07	13,72

t-test = 0,35, p = 0,7317

6.8.3. Genska ekspresija PRLR u bubregu eksperimentalnih grupa A, B i B2

ANOVA analiza utvrdila je statistički značajno višu ekspresiju PRLR u grupi A i značajno nižu ekspresiju u grupi B2 u odnosu na referentnu vrednost B (p<0,01). Sledstvena Post-hoc analiza pokazala je da je odnos relativne genske ekspresije PRLR u bubregu najmlađih pacova i grupe B, signifikantno viši u poređenju sa odnosom genske ekspresije PRLR najstarije grupe i iste kontrole (p<0,05). Rezultati su prikazani u Tabeli 45.

Tabela 45. Odnos relativne genske ekspresije PRLR u bubregu najmlađe i najstarije kontrolne grupe.

	N	Mean ± SD	95% CI	Min	Max
log ₂ (A/B)	8	1,23 ± 2,22 ^a	-0,62 – 3,09	-1,93	3,57
log ₂ (B2/B)	4	-2,33 ± 0,58	-3,26 – -1,40	-2,74	-1,46

F=7,83, p = 0,0011 < 0,01

^a log₂(A/B) vs log₂(B2/B), p<0,05

6.9. Rezultati PCR analize u pršljenju

6.9.1. Genska ekspresija PRLR u pršljenju eksperimentalnih grupa C, D i B

ANOVA analiza je utvrdila statistički značajno nižu ekspresiju PRLR u pršljenju grupe C i značajno višu ekspresiju PRLR u grupi D, u odnosu na kontrolnu grupu B ($p < 0,001$). Logaritam za osnovu 2 bio je najveći u grupi D.

Sledstvena Post-hoc analiza pokazala je da je odnos relativne genske ekspresije PRLR u medikamentnoj hiperprolaktinemiji i kontrolne grupe B, signifikantno viši u poređenju sa odnosom relativne genske ekspresije PRLR u fiziološkoj hiperprolaktinemiji i iste kontrolne grupe ($p < 0,01$). Rezultati su prikazani u Tabeli 46.

Tabela 46. Odnos relativne ekspresije gena PRLR u pršljenju grupa C i D.

	N	Mean \pm SD	95% CI	Min	Max
$\log_2(C/B)$	5	-2,42 \pm 1,83	-4,69 – -0,15	-5,48	-0,70
$\log_2(D/B)$	6	1,29 \pm 1,15 ^a	0,09 – 2,50	-0,74	2,69

F=12,58, $p = 0,0002 < 0,001$

^a $\log_2(D/B)$ vs $\log_2(C/B)$, $p < 0,01$

6.9.2. Genska ekspresija PRLR u pršljenju eksperimentalnih grupa E, F i B2

Genska ekspresija PRLR u pršljenovima grupe E i F nije se značajno razlikovala u odnosu na kontrolnu grupu B2.

Odnos relativne genske ekspresije PRLR u grupi F i B2, bio je viši u poređenju sa odnosom genske ekspresije PRLR u grupi E i B2, ali bez statističke signifikantnosti (Tabela 47).

Tabela 47. Odnos relativne ekspresije gena PRLR u pršljenju grupa E i F.

	N	Mean \pm SD	95% CI	Min	Max
$\log_2(E/B2)$	5	9,73 \pm 2,03	7,21 – 12,25	7,18	12,02
$\log_2(F/B2)$	5	11,82 \pm 1,75	9,65 – 14,00	9,63	14,40

t-test = 1,75, $p = 0,1184$

6.9.3. Genska ekspresija PRLR u pršljenu eksperimentalnih grupa A, B i B2

ANOVA analiza je utvrdila statistički značajno nižu ekspresiju PRLR u pršljenovima grupe A i značajno višu ekspresiju PRLR u grupi B2, u odnosu na kontrolnu grupu B ($p < 0,001$).

Logaritam za osnovu 2 bio je najmanji u grupi A.

Sledstvena Post-hoc analiza pokazala je da je odnos relativne genske ekspresije PRLR u pršljenu najmlađih pacova i grupe B, signifikantno niži u poređenju sa odnosom relativne ekspresije PRLR kod najstarije ispitivane grupe i iste kontrole ($p < 0,01$). Rezultati su prikazani u Tabeli 48.

Tabela 48. Odnos relativne genske ekspresije PRLR u pršljenu najmlađe i najstarije kontrolne grupe.

	N	Mean \pm SD	95% CI	Min	Max
$\log_2(A/B)$	4	-3,11 \pm 1,80 ^a	-5,99 – -0,24	-5,07	-1,13
$\log_2(B2/B)$	4	1,19 \pm 0,40	0,56 – 1,82	0,74	1,63

F=12,58, $p = 0,0002 < 0,001$
^a $\log_2(A/B)$ vs $\log_2(B2/B)$, $p < 0,01$

7. DISKUSIJA

7.1. Analiza koncentracije prolaktina u eksperimentalnim grupama

7.1.1. Analiza koncentracije PRL kod gravidnih eksperimentalnih životinja

U humanoj populaciji, od pete nedelje trudnoće, koncentracija prolaktina u krvi se neprekidno povećava sve do porođaja. Ova fiziološka hiperprolaktinemija nastaje zahvaljujući visokim koncentracijama estrogena koje stimulišu rast i deobu hipofiznih laktotropa (145).

Kod Wistar pacova prosečna dužina trajanja trudnoće iznosi 19-22 dana. Koncentracija PRL počinje da raste već u prvoj nedelji, svoj maksimum dostiže u drugoj i ostaje povišena do porođaja. Signifikantno viša koncentracija PRL kod gravidnih eksperimentalnih životinja, u odnosu na kontrolnu grupu, očekivan je rezultat i shvaćena je kao fiziološka hiperprolaktinemija.

7.1.2. Analiza koncentracije PRL kod životinja tretiranih Sulpiridom

Sulpirid pripada drugoj generaciji antipsihotika. Ova grupa je generisana sa ciljem da se postigne jača dopaminska blokada (194) kojom se uzrokuje neuroleptični sindrom (psihomotorno kočenje i afektivna indiferentnost) i suprimiranje ekstrapiramidalnog sindroma, nastalog dopaminergičkom blokadom u striatumu (195). U domenu antipsihotika, Sulpirid po pravilu dovodi do značajne hiperprolaktinemije, koja se održava sve dok terapija traje (200, 201).

Široku kliničku primenu Sulpirid je našao i kao antidopaminergički gastrointestinalni prokinetik. Indikacije za njegovu primenu su poremećaji motiliteta gornjeg digestivnog trakta, uključujući funkcionalnu dispepsiju, stazu želuca različitog porekla i povraćanje (202). Vezivanjem za periferne D₂ receptore (u gastrointestinalnom traktu) Sulpirid ispoljava prokinetičko dejstvo (203), dok blokadom centralnih D₂ receptora (u postremalnoj regiji) deluje kao antiemetik (204). Antiemetički efekat prokinetika zavisi od permeabilnosti krvno-moždane barijere za određeni preparat. Obzirom da se pituitarna žlezda nalazi van ove barijere, hiperprolaktinemija će se javiti kod svih antidopaminergičkih prokinetika. U najvećem broju slučajeva, do porasta prolaktina u serumu dolazi nakon 3 dana do 2 nedelje od početka terapije (205).

Statistički značajano veća koncentracija PRL kod svih životinja tretiranih Sulpiridom (grupe D, E i F) u odnosu na starosno odgovarajuće kontrolne grupe (B i B-II) očekivan je rezultat i shvaćena je kao medikamentna hiperprolaktinemija.

Sa prolongiranjem terapije Sulpiridom (grupe E i F) verifikovan je diskretan pad koncentracije PRL (u odnosu na grupu D) što je u skladu sa podacima iz literature da stepen hiperprolaktinemije opada sa prolongiranom primenom antidopaminergičkih prokinetika (201). Pad koncentracije PRL mogao bi biti posledica ushodne-regulacije D₂

receptora u laktotropima nakon produženog inhibirajućeg efekta Sulpirida ili posledica postreceptornog pada cAMP neophodnog za oslobađanje prolaktina (326).

Uvođenje suplementne terapije Ca i vitamin D nije dovelo do značajne izmene u koncentraciji PRL.

7.1.3. Analiza koncentracije PRL u kontrolnim grupama različite starosne dobi

Veoma je oskudan broj podataka u literaturi, koji govori o promeni koncentracije PRL tokom različitih životnih doba. Verifikovana značajno viša koncentracija PRL kod mladih pacova, korelira sa ranijim zapažanjima da sa godinama dolazi do pada koncentracije PRL u ženskoj populaciji (327, 328). Rezultati novijeg datuma pokazuju da sa starenjem dolazi do aplatiranja pulsativne sekrecije PRL i pada koncentracije maksimalnih izmerenih vrednosti u noćnom piku (329). Starenje je praćeno povećanim stepenom tačkaste fibroze, fokalne nekroze i taloženjem gvožđa u adenohipofizi (330) što sve može dovesti do umerenog smanjenja volumena pituitarne žlezde (331) pa ipak, ukupni broj laktotropnih ćelija ostaje nepromenjen. Mogući razlozi za pad koncentracije PRL sa starenjem su povećan dopaminergički tonus tokom spavanja kod starijih (332) porast D-1 receptora sa starenjem (333) ili gubitak stimulativnog dejstva leptina (334).

Signifikantno viša koncentracija PRL kod mladih pacova ne može se objasniti kao posledica majčinog prolaktina u mleku, jer su ispitivani mladi pacovi u 5-oj nedelji života, koji su već u drugoj nedelji odvojeni od majke. Obzirom da se radi o zdravim, netretiranim 5-o nedeljnim pacovima, nađena hiperprolaktinemija se može shvatiti kao normalna, razvojna i samim tim fiziološka hiperprolaktinemija.

7.2. Analiza rezultata uree, kreatinina i ukupnih proteina

Određivanje koncentracije azotnih produkata u serumu, prvenstveno je rađeno sa ciljem da se isključi postojanje akutne ili hronične bubrežne insuficijencije, koja bi mogla uticati na porast koncentracije PRL kod eksperimentalnih životinja. Kod svih ispitivanih grupa vrednosti uree i kreatinina bile su u referentnom opsegu, čime je potvrđena normalna bubrežna funkcija.

7.2.1. Analiza rezultata uree u eksperimentalnim grupama

Tokom trudnoće smanjuje se osmolalnost plazme, raste plazma volumen i stepen glomerularne filtracije (335). U svetlu ovih događanja, pad koncentracije uree kod gravidnih eksperimentalnih životinja, može se objasniti kako ekspanzijom ekstracelularne tečnosti, tako i padom osmolalnosti plazme.

Značajano viša koncentracija uree u F grupi eksperimentalnih životinja, može se delimično pripisati dejstvu sulpirida, koji preko D-2 receptora može sprečiti porast glomerularne filtracije i bubrežni plazma protok (336, 337). Obzirom da su ove

eksperimentalne životinje tretirane i vitaminom D i suplementnom terapijom kalcijuma, ne može se sa sigurnošću tvrditi da je porast koncentracije uree isključivo posledica dejstva sulpirida, pogotovu što u E eksperimentalnoj grupi takva promena nije detektovana.

Značajno niža koncentracija uree kod mladih pacova, takođe se može smatrati posledicom povećane glomerularne filtracije u mlađem životnom dobu.

7.2.2. Analiza rezultata kreatinina u eksperimentalnim grupama

Ovim ispitivanjem, utvrđena je značajno viša koncentracija kreatinina (ali i dalje u granicama normale) kod pacova tretiranih Sulpiridom 3 nedelje. Ukoliko je ona posledica medikamentne hiperprolaktinemije, kartkotrajna je, tranzitorna i reverzibilna, obzirom da u grupama sa prolongiranom primenom sulpirida (E i F) promene u koncentraciji kreatinina nisu verifikovane.

7.2.3. Analiza koncentracije ukupnih proteina u eksperimentalnim grupama

Određivanje ukupnih proteina u serumu vršeno je sa ciljem da bi se izbegla eventualna pogrešna interpretacija ukupnog kalcijuma u serumu, u slučajevima hipo ili hiperproteinemije. U svim eksperimentalnim grupama koncentracija ukupnih proteina bila je u okviru referentnih vrednosti.

Značajno viša koncentracija ukupnih proteina u medikamentnoj hiperprolaktinemiji, može se objasniti povećanim unosom hrane i diskretnim povećanjem telesne težine. U grupi F, koja je uz Sulpirid dobijala suplementnu terapiju Ca i vitamina D, nije zabeležena izmena u koncentraciji ukupnih proteina.

Signifikantno niže vrednosti totalnih proteina kod mladih pacova, mogu se smatrati posledicom manjeg unosa hrane i manje telesne težine u odnosu na pacove starije životne dobi.

7.3. Analiza rezultata koncentracije kalcijuma i fosfora u serumu

7.3.1. Ukupni kalcijum u serumu

7.3.1.1. Analiza ukupnog kalcijuma u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Homeostaza kalcijuma u majčinom organizmu je tokom trudnoće znatno izmenjena zbog rapidne mineralizacije skeleta ploda i samim tim, većih potreba fetusa za kalcijumom.

Da bi organizam majke mogao da odgovori ovim povećanim zahtevima, pribegava različitim adaptacionim mehanizmima. Ovi adaptacioni mehanizmi se mogu odigravati na nivou intestinuma, gde rezultuju povećanom intestinalnom resorpcijom kalcijuma; na nivou bubrega, gde bi se mogla smanjiti urinarna ekskrecija kalcijuma

ili na nivou koštanog sistema, gde se povećava mobilizacija majčinih koštanih minerala.

U ranijim istraživanjima zapažen je pad koncentracije ukupnog kalcijuma tokom trudnoće (324, 325) i po pravilu je smatran posledicom hemodilucije i sniženih albumina u serumu (324, 338, 339). Rezultati ovog ispitivanja nisu otkrili značajnu razliku u koncentraciji ukupnih proteina između gravidnih pacova i kontrolne grupe.

7.3.1.2. Analiza ukupnog kalcijuma u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

Istraživanja sprovedena sa ciljem da se utvrdi uticaj medikamentne hiperprolaktinemije na skeletni system, najčešće su bazirana na parametrima denzitometrije ili biohemijskim markerima koštanog metabolizma. Vrlo je malo studija u kojima je određivana koncentracija kalcijuma i fosfora u medikamentnoj hiperprolaktinemiji.

Normalne vrednosti ukupnog kalcijuma dobijene su kod svih eksperimentalnih grupa tretiranih Sulpiridom (D, E i F) bez statistički značajne razlike u odnosu na starosno odgovarajuće kontrole.

7.3.1.3. Analiza ukupnog kalcijuma u grupama različite životne dobi

Bez obzira na brojne podatke o uticaju starenja na izmenu mineralnog sastava koštanog sistema, koncentracija ukupnog kalcijuma se održava u referentnom opsegu zahvaljujući stalnoj i brznoj razmeni serumskog (nekoštanog) kalcijuma sa različitim „pulovima“ kalcijuma. Rezultati ovog ispitivanja, potvrdili su normokalcemiju kod svih kontrolnih grupa, bez obzira na životnu dob. Značajno viša koncentracija ukupnog kalcijuma kod mladih pacova u odnosu na starije, očekivan je rezultat, obzirom da je pozitivan koštani bilans, karakteristika dečijeg životnog doba (formacija > resorpcije) koja omogućava normalan rast skeleta.

7.3.2. Jonizovani kalcijum u serumu

7.3.2.1. Analiza jonizovanog kalcijuma u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Sa ciljem da se izbegne „lažno“ niska koncentracija kalcijuma u serumu, koja bi se mogla javiti zbog dilucionog efekta, određivan je i nivo jonizovanog kalcijuma.

Rezultati ovog ispitivanja verifikovali su signifikantno niži jonizovani kalcijum u grupi gravidnih pacova, što je u suprotnosti sa ranijim istraživanjima gde je utvrđena nepromenjena koncentracija jonizovanog kalcijuma tokom gestacije (340, 341) i u saglasnosti sa rezultatima nekoliko eksperimentalnih animalnih modela, gde je takođe utvrđen pad jonizovanog kalcijuma pri kraju trudnoće (342, 343). Rapidni rast fetusa u kasnoj trudnoći može prevazići kapacitet majčinog organizma da održi nivo serumskog kalcijuma u granicama normale što će rezultovati padom koncentracije jonizovanog kalcijuma u serumu majke.

7.3.2.2. Analiza jonizovanog kalcijuma u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

Rezultati ovog ispitivanja pokazala su da nema značajne izmene u koncentraciji jonizovanog kalcijuma tokom medikamentne hiperprolaktinemije kraćeg trajanja i kao takvi, u saglasnosti su sa malobrojnim podacima iz literature (344, 345, 346).

U prolongiranoj hiperprolaktinemiji verifikovan je signifikantni porast koncentracije jonizovanog kalcijuma što može biti rezultat 1. Povećane apsorpcije kalcijuma u gornjem intestinumu (“apsorptivna hiperkalcemija”) 2. Povećane resorpcije kalcijuma iz kostiju (“remodelirajuća hiperkalcemija”) ili 3. Povećane reapsorpcije kalcijuma na nivou bubrega (“tubularna reapsorptivna hiperkalcemija”).

U poslednjoj deceniji, sprovedene su mnogobrojne studije kojima je utvrđena veoma važna i direktna uloga PRL u regulaciji intestinalne apsorpcije kalcijuma (59, 60, 61, 62, 63). Sva dosadašnja istraživanja bazirana su na fiziološkoj hiperprolaktinemiji. Do sada nije bilo podataka o tome da li medikamentna hiperprolaktinemija takođe dovodi do povećane intestinalne apsorpcije kalcijuma.

Otkrivanje ekspresije mRNA prolaktinskih receptora (PRLR) u ćelijama osteosarkoma (28) u osteoblastima kalvarije (29) u tibiji, femuru i pršljenovima kod normalnih odraslih pacova (30) dovelo je brojne autore na razmišljanje da kosti takođe predstavljaju target za direktno dejstvo PRL. Da li je hiperkalcemija u prolongiranoj medikamentnoj hiperprolaktinemiji, posledica povećane resorpcije kalcijuma iz kostiju još uvek je nerazjašnjeno.

Za sada ne postoje podaci u literaturi o genskoj ekspresiji PRLR u bubrezima i eventualnom uticaju medikamentne hiperprolaktinemije na povećanu tubularnu reapsorpciju kalcijuma.

Dodavanje vitamin D i Ca, pacovima sa prolongiranom hiperprolaktinemijom, rezultovalo je padom serumskog jonizovanog kalcijuma u odnosu na grupu E. Obzirom da je u istoj eksperimentalnoj grupi verifikovan signifikantan porast serumskog fosfora, diskretan pad Ca^{++} se može smatrati posledicom hiperfosfatemije (347).

7.3.2.3. Analiza jonizovanog kalcijuma u kontrolama različite starosne dobi

Za razliku od ukupnog kalcijuma, koji je kod mladih pacova bio značajno viši u odnosu na eksperimentalne grupe starije životne dobi, koncentracija jonizovanog kalcijuma pokazala se signifikantno niža.

Ukupni kalcijum u serumu čine: slobodni jonizovani kalcijum ($\approx 51\%$), kompleks kalcijum-protein ($\approx 40\%$) i kompleksi jonizovanog kalcijuma ($\approx 9\%$) (227). Nejonizovani kalcijum se vezuje za različite proteine i anjone, kako u ekstracelularnoj, tako i u intracelularnoj sredini. Najvažniji kalcijum-vezujući proteini u serumu, su albumini i globulini, a intracelularno kalmodulin. Najzastupljeniji kompleksi jonizovanog kalcijuma u serumu su kalcijum-fosfat, kalcijum-karbonat i kalcijum-oksalat.

Signifikantno niži jonizovani kalcijum s jedne strane i značajno viši ukupni kalcijum, u mlađem životnom dobu, može biti posledica većeg afiniteta jonizovanog kalcijuma za formiranje kompleksa (kalcijum-fosfata, kalcijum-karbonata ili kalcijum oksalata) i jačih veza u okviru već formiranog kompleksa, čime bi procenat slobodnog jonizovanog kalcijuma bio smanjen.

7.3.3. Fosfor u serumu

7.3.3.1. Analiza fosfora u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Neorganski fosfor se veoma često smatra pasivnim „družbenikom“ kalcijuma. Studije koje evaluiraju promet fosfata u fiziološkoj hiperprolaktinemiji (kao što su trudnoća ili laktacija) još su ređe od studija koje prate promet kalcijuma.

Koncentracija fosfata u serumu, tokom trudnoće, kako u humanoj populaciji, tako i u animalnim eksperimentalnim modelima, po pravilu ne trpi velike promene (324, 338). Rezultati ovog ispitivanja su pak pokazali značajan porast koncentracije serumskog fosfora u odmakloj trudnoći. Porast fosfata je u saglasnosti sa padom jonizovanog kalcijuma, verifikovanog u ovoj eksperimentalnoj studiji. Iako koncentracija PTH nije određivana, u ranijim eksperimentalnim modelima na pacovima, utvrđen je porast PTH tokom trudnoće, čime se može objasniti i hipokalcemija i hiperfosfatemija (338). Povećavajući resorpciju kalcijuma na nivou intestinuma (59, 60, 61, 62, 63) fiziološka hiperprolaktinemija možda istovremeno otvara vrata za povećanu resorpciju fosfora, koji se inače apsorbuje skoro dva puta efikasnije od kalcijuma (254).

7.3.3.2. Analiza fosfora u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

Dokazi da prolongirana hiperprolaktinemija može dovesti do smanjene koštane gustine su u stalnom porastu (315, 345, 348, 349) pa ipak, podaci o promenama koncentracije kalcijuma i fosfora, u ovim stanjima su i dalje malobrojni.

Kod životinja tretiranih sulpiridom 3 nedelje, koliko u proseku traje trudnoća kod pacova, nije verifikovana značajna izmena koncentracije kalcijuma i fosfora u serumu. Sa prolongiranjem medikamentne hiperprolaktinemije (na 6 nedelja) došlo je do značajnog porasta jonizovanog kalcijuma i pada fosfora, što je u potpunoj suprotnosti sa rezultatima dobijenim u stanju fiziološke hiperprolaktinemije (pad jonizovanog kalcijuma i porast fosfata). Stepem hiperprolaktinemije ne može biti odgovoran za ovakvu diskrepancu, iz razloga što povišene koncentracije PRL nisu bile značajno izmenjene u fiziološkoj i medikamentnoj hiperprolaktinemiji. Različita dužina izloženosti medikamentnoj hiperprolaktinemiji ostavlja prostor za razmišljanje da je tokom tog perioda moglo doći do izmene adaptacionih mehanizama na nivou intestinuma, skeleta i bubrega, što je rezultovalo promenom koncentracije kalcijuma i fosfora u serumu.

U grupi F, koja je pored prolongirane primene Sulpirida tretirana suplementnom terapijom Ca i vitaminom D, zabeležen je značajan porast serumskog fosfora. Imajući u vidu da u grupi E porast fosfata nije zabeležen, malo je verovatno da je hiperfosfatemija u grupi F posledica prolongirane terapije Sulpiridom. Ovaj porast se pre može objasniti uticajem vitamin D na povećanu intestinalnu apsorpciju fosfata (347, 350).

7.3.3.3. Analiza fosfora u kontrolama različite starosne dobi

Obzirom na usku povezanost prometa kalcijuma i fosfora u organizmu, verifikovana značajno viša koncentracija fosfata kod mladih pacova, može se objasniti kao kompenzatorna hiperfosfatemija, uslovljena značajno nižom koncentracijom jonizovanog kalcijuma u istoj eksperimentalnoj grupi.

7.4. Analiza rezultata kalcijum- i fosforeze

7.4.1. Analiza kalcijum- i fosforeze u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Značajno povećana kalcijumureza u kasnoj trudnoći u saglasnosti je sa rezultatima ranijih istraživanja (325, 326). Smatra se posledicom povećane apsorpcije kalcijuma na nivou intestinuma i povećanim stepenom glomerularne filtracije, što zajedno može dovesti do prevazilaženja reapsorptivnih kapaciteta bubrega (324, 325, 338).

Povećana ekskrecija fosfora urinom, tokom trudnoće može se objasniti značajnim porastom serumskog fosfata verifikovanog ovim ispitivanjem, povećanim unosom hrane, boljom apsorpcijom na nivou intestinuma i povećanom glomerularnom filtracijom.

7.4.2. Analiza kalcijum- i fosforeze u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

Značajno viša kalcijumureza, verifikovana u grupi životinja tretiranih Sulpiridom 3 nedelje, može biti posledica značajno povišene koncentracije serumskog kalcijuma kod istih eksperimentalnih životinja. Iako se osmoregulatorna uloga PRL ređe pominje, postoje podaci u literaturi koji ukazuju na značajnu ulogu PRL na nivou proksimalnih tubula bubrega i vrlo jakom natrijumuretičkom efektu (54, 55). Moguće je da porast koncentracije PRL (pod dejstvom Sulpirida) i povišena natrijumureza, indirektno utiču na povećano izlučivanje i kalcijuma putem urina. Renalna tubularna disfunkcija, koja bi rezultovala gubitkom kalcijuma, kao neželjeno dejstvo Sulpirida, do sada nije opisana.

Sa prolongiranjem medikamentne hiperprolaktinemije dolazi do signifikantnog pada kalcijumureze, istovremeno sa perzistiranjem povišenog serumskog kalcijuma, što navodi na razmišljanje da uzrok ovoj promeni treba tražiti na nivou bubrega. S jedne strane stepen hiperprolaktinemije opada sa prolongiranom terapijom Sulpirida (201) što je potvrđeno i ovom eksperimentalnom studijom. Niža hiperprolaktinemija može biti praćena smanjenom natrijumurezom i indirektno kalcijumurezom. S druge strane ne može

se zanemariti činjenica da Sulpirid svoje dejstvo ostvaruje upravo preko dopaminskih receptora, te njegova duža primena možda uzrokuje izmenu u koncentraciji intrarenalnog dopamina, sprečavajući već dokazano sinergističko /permisivno dejstvo na PRL.

Značajan pad kalcijumureze u prolongiranoj hiperprolaktinemiji do sada nije razmatran, a može biti rezultat još uvek nepoznatog adaptivnog mehanizma, uključenog da se spreči dalji gubitak kalcijuma.

U eksperimentalnim grupama D i E, i zmene u fosfourezi, nisu verifikovane.

Dodavanje suplementne terapije Ca i vitamin D, rezultovalo je signifikantnim porastom kalcijum- i fosfoureze. Hiperkalcurija u monoterapiji vitaminom D ili uz suplementnu terapiju kalcijumom, verifikovana je u brojnim istraživanjima (351, 352, 353)

7.4.3. Analiza kalcijum- i fosfoureze kontrolama različite starosne dobi

Uz značajno nižu koncentraciju jonizovanog kalcijuma u serumu i signifikantno više vrednosti fosfora, kod mladih pacova, očekivan je rezultat značajno niže kalcijumureze i više fosfoureze. Naime, povećanjem reapsorpcije kalcijuma na nivou tubula bubrega (što će rezultovati padom kalcijumureze) istovremeno dolazi do povećanog gubitka fosfata urinom (povećana fosfoureza) čime se pomaže održavanju pozitivnog kalcijumskog bilansa, neophodnog za normalan rast i razvoj koštano sistema u detinjstvu.

7.5. Analiza nivoa biohemijskih markera koštane formacije

7.5.1. Analiza aktivnosti alkalne fosfataze

7.5.1.1. ALP u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Jedan od najstarijih markera koštane formacije, koji se i danas široko primenjuje, je ALP. U literaturi postoje kontradiktorni rezultati o aktivnosti ALP tokom trudnoće. Pojedini autori su verifikovali povećanu aktivnost ALP na početku trudnoće (354) drugi u kasnoj trudnoći (324) a postoje i rezultati koji pokazuju sniženu aktivnost ALP u trudnoći (355). Rezultati ovog eksperimentalnog ispitivanja nisu otkrili značajnu promenu u aktivnosti ALP kod gravidnih eksperimentalnih životinja.

I pored primamljivih osobina kao što su jednostavna metodologija i niska cena ove analize, ALP kao marker osteosinteze ima prilično nisku senzitivnost i specifičnost. Alkalna fosfataza u serumu, može poticati, pored kostiju i iz jetre gastrointestinalnog trakta, bubrega i placente. Obzirom da je struktura proteina alkalne fosfataze iz različitih tkiva veoma slična (ako ne i identična) nije moguće kvantifikovati enzimsku aktivnost alkalne fosfataze iz kostiju u odnosu na druga tkiva. Na aktivnost ALP u trudnoći mogu uticati frakcija ALP iz placente, hemodilucija i povećana glomerularna filtracija (338, 339) te stoga ne može biti pouzdan marker koštane formacije u trudnoći.

7.5.1.2. ALP u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

Rezultati ovog ispitivanja pokazali su sniženu aktivnost ALP u medikamentnoj hiperprolaktinemiji, ali bez statističke značajnosti. U saglasnosti su sa prethodnim istraživanjima, koja su pratila aktivnost ALP u različitim terapijskim pristupima psihijatrijskih poremećaja (345, 356, 357).

Iako je tendencija daljeg pada aktivnosti ALP zabeležena u prolongiranoj hiperprolaktinemiji, statistička signifikantnost nije evidentirana, te se ovaj rezultat ne može smatrati sigurnim dokazom smanjene osteoblastne aktivnosti.

Dodavanjem suplementne terapije Ca i vit.D, zapažen je blagi porast ALP u odnosu na grupu E. Obzirom da je statistička signifikantnost izostala, ne može se sa sigurnošću tvrditi da suplementna terapija u prolongiranoj medikamentnoj hiperprolaktinemiji poboljšava osteoblastnu aktivnost.

7.5.1.3. ALP u kontrolnim grupama različite starosne dobi

Značajno viša aktivnost ALP u mlađih pacova, očekivan je rezultat, obzirom na veoma izraženu osteosintezu koje ovo životno doba karakteriše.

7.5.2. Analiza koncentracije osteokalcina

7.5.2.1. OC u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Značajno niže vrednosti OC kod gravidnih pacova, dobijene ovi eksperimentalnim istraživanjem, u saglasnosti su sa ranijim rezultatima o padu OC u trudnoći (324, 325, 355, 358). Pad OC u trudnoći može biti posledica hemodilucije, doprinosa samog ploda (325), povećane degradacije na nivou bubrega (358) ili nedostatka optimalnih referentnih vrednosti u trudnoći (355).

7.5.2.2. OC u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

Različita istraživanja, sprovedena kod žena sa depresivnim poremećajima, sa ili bez graničnog poremećaja ličnosti, pre psihotropne terapije, ili tretirane antidepresivima verifikovala su porast OC (344, 357, 359). Rezultati ove eksperimentalne studije pokazali su niže vrednosti OC u medikamentnoj hiperprolaktinemiji, ali bez statističke značajnosti i u granicama referentnog opsega. Kao takvi, u saglasnosti su sa podacima iz literature, dobijenim ispitivanjem šizofrenih pacijenata na antipsihotičnoj terapiji (356, 357).

U grupi F, koja je pored prolongiranog teretiranja Sulpiridom, dobijala suplement Ca i vitamina D, verifikovan je signifikantan pad koncentracije OC. Protektivno dejstvo vitamina D se prevashodno pripisuje povećanoj intestinalnoj apsorpciji kalcijuma (360) i direktnom delovanju na koštani sistem (361, 362). Podaci iz literature o uticaju terapije vitaminom D na osteokalcin su kontradiktorni. Rezultati pojedinih studija pokazuju značajan porast OC u monoterapiji kalcitriolom što je od strane

autora tumačeno kao poboljšanje osteosinteze (363, 364). S druge strane postoje i podaci o padu OC tokom terapije vitaminom D (365, 366).

Za razliku od markera koštane resorpcije, čiji se pad koncentracije, uvek tumači kao poboljšanje koštanog metabolizma, interpretacija izmenjenih markera koštane sinteze nije uvek usaglašena. Naime, osteosinteza je veoma često odgovor na prethodeću osteorazgradnju. Pad koncentracije markera koštane sinteze, bi samim tim mogao da ukazuje na zaustavljenu ili smanjenu koštanu resorpciju (367). Obzirom da markeri koštane razgradnje nisu rađeni u ovom eksperimentu, pad koncentracije OC se ne može sa sigurnošću pripisati protektivnoj ulozi suplementne terapije Ca i vitamina D u medikamentnoj hiperprolaktinemiji.

7.5.2.3. OC u kontrolnim grupama različite starosne dobi

Značajno povišene vrednosti OC u najmlađoj grupi eksperimentalnih životinja odraz su veoma izražene osteoblastne aktivnosti neophodne za normalan rast i razvoj skeleta u najmlađem životnom dobu.

7.5.3. Analiza koncentracije TP1NP

7.5.3.1. TP1NP u fiziološkoj hiperprolaktinemiji

Do sada je sproveden vrlo mali broj istraživanja u kojima je praćena koncentracija P1NP-a u trudnoći. Studije dizajnirane da prate koncentraciju P1CP-a i P1NP-a na početku trudnoće, verifikovale su nisku koncentraciju ovih markera koštane sinteze (350, 360). Obzirom da je nivo P1NP-a u ovom eksperimentu određivan u kasnoj trudnoći, dobijena signifikantno viša koncentracija, u saglasnosti je sa rezultatima iz literature koji pokazuju tendenciju rasta P1NP-a iznad gornje granice normale, sa odmicanjem trudnoće (324, 368). Rapidni rast ploda pri kraju trudnoće, svakako je praćen povećanom potrebom fetusa za kalcijumom, neophodnim za ubrzanu mineralizaciju skeleta. Jedino mesto, gde plod može „potražiti“ kalcijum, jeste organizam majke. Pored povećane resorpcije kalcijuma na nivou intestinuma majčinog organizma, povećana potražnja kalcijuma u odmakloj trudnoći, omogućena je „crpljenjem“ kalcijuma iz majčinog skeletnog sistema. Proces osteorazgradnje, da bi se kalcijum oslobodio iz majčinog skeleta, po pravilu bude praćen procesom osteosinteze, te se povišene koncentracije P1NP-a pri kraju trudnoće time mogu i objasniti.

U ovom eksperimentalnom ispitivanju, nađena je izvesna diskrepanca između koncentracije OC (snižen kod gravidnih eksperimentalnih životinja) i P1NP-a (povišen u istoj eksperimentalnoj grupi). Iako su OC i P1NP markeri koštane sinteze, prilikom tumačenja dobijenih rezultata, mora se imati na umu činjenica, da su njihove serumske koncentracije odraz različitih aspekata osteoblastične aktivnosti. Naime OC se najvećim delom produkuje tokom faze mineralizacije, a prokolageni peptidi

tokom proliferacije osteoblasta (357). Objašnjenje za snižen OC u trudnoći, moglo bi biti da je zbog povećanih potreba ploda za kalcijumom, proces mineralizacije skeleta majke privremeno usporen ili sasvim obustavljen i da se nesmetano nastavlja nakon trudnoće, već u periodu laktacije (324, 357, 369). Porast koncentracije P1NP-a pri kraju trudnoće, ohrabrujuć je podatak, koji ide u prilog ne samo povećane osteosinteze već ukazuje i na povećanu proliferaciju osteoblasta čime se može objasniti brzi oporavak gubitka koštane mase, nakon trudnoće i laktacije.

7.5.3.2. TP1NP u medikamentnoj hiperprolaktinemiji

Do sada nije bilo objavljenih rezultata o promenama koncentracije P1NP-a u medikamentnoj hiperprolaktinemiji. Rezultati ovog ispitivanja, po prvi put verifikuju statistički značajan pad P1NP-a u hiperprolaktinemiji izazvanoj Sulpiridom. Sa prolongiranjem terapije, zapažena je dalja tendencija pada koncentracije ovog markera koštane sinteze.

Tokom ovog eksperimentalnog istraživanja, verifikovane su niže koncentracije svih rađenih biohemijskih markera osteosinteze (ALP, OC, P1NP). Odsustvo statističke značajnosti u aktivnosti ALP i OC može biti posledica manje senzitivnosti i specifičnosti ovih markera osteosinteze, ali zajedno sa signifikantnim padom P1NP-a svakako idu u prilog smanjene osteoblastne aktivnosti u medikamentnoj hiperprolaktinemiji.

Dodavanje suplementne terapije Ca i vitamina D, dovelo je do pada koncentracije P1NP-a u odnosu na grupu E, ali bez statističke značajnosti. U literaturi ne postoje podaci o efektima terapijske primene vitamina D i Ca u medikamentnoj hiperprolaktinemiji. Razlog za to je što sama medikamentna hiperprolaktinemija još uvek nije prihvaćena kao faktor rizika za osteopeniju i osteoporozu. Tumačenje rezultata markera osteosinteze i u populaciji ovih pacijenata, ne može se odvojiti od markera osteorazgradnje. Ukoliko bi se uz pad koncentracije P1NP-a potvrdila i niska koncentracija markera koštane resorpcije, moglo bi se reći da suplementna terapija Ca i vitaminom D ima značajno mesto u prevenciji daljeg siromašenja koštanog sistema u medikamentnoj hiperprolaktinemiji.

7.5.3.3. TP1NP u kontrolnim grupama različite starosne dobi

Kao i ostali markeri osteosinteze, određivani ovim istraživanjem i P1NP je pokazao značajno višu koncentraciju kod mladih pacova u odnosu na kontrolne grupe starije životne dobi, što je još jedna potvrda ubrzane osteosinteze u detinjstvu i ranoj mladosti. Iako je tendencija pada P1NP-a zabeležena i između druge dve starosne kontrole (pacovi 18 i 21 nedelja stari) odsustvo signifikantnosti može biti posledica nedovoljne starosne razlike između njih.

7.6. Analiza genske ekspresije PRLR u duodenumu

7.6.1. Analiza odnosa relativne ekspresije PRLR u duodenumu kod pacova sa fiziološkom i medikamentnom hiperprolaktinemijom

Prisutvo PRLR je verifikovano takoreći u celom digestivnom sistemu. Imunohistohemijskim metodama PRLR su identifikovani u epitelnim ćelijama jednjaka, želuca, duodenuma, jejunuma i pankreatičnim Langerhansovim ćelijama (370, 371). Kratka forma PRLR je značajno zastupljenija u jetri, duga u pankreasu i ezofagusu, dok su u ostalim delovima digestivnog trakta (želudac, duodenum, jejunum, ileum i kolon) jednako zastupljene obe forme PRLR. Jedini deo digestivnog trakta, gde PRLR nisu izolovani i vizuelizovani jeste rektum (27). Relativna genska ekspresija PRLR određivana RT-PCR analizama, potvrdila je prisustvo PRLR u jetri, pankreasu (372) epitelnim ćelijama duodenuma, jejunuma (62, 63, 373) i cekuma (374). Rezultati ovog eksperimentalnog istraživanja potvrdili su prisustvo genske ekspresije PRLR u duodenumu gravidnih eksperimentalnih životinja i životinja tretiranih Sulpiridom u trajanju od tri nedelje. Međutim, upoređivanjem odnosa ekspresije PRLR na nivou duodenuma, u fiziološkoj i medikamentnoj hiperprolaktinemiji, verifikovana je značajna razlika. Relativna ekspresija gena za PRLR u duodenumu, bila je signifikantno viša u fiziološkoj hiperprolaktinemiji u odnosu na medikamentnu. Poredeći odnos genske ekspresije PRLR kod gravidnih pacova sa kontrolnom grupom i odnos genske ekspresije PRLR kod pacova tretiranih Sulpiridom, može se izvesti zaključak da u uslovima fiziološke hiperprolaktinemije dolazi do ushodne regulacije PRLR u duodenumu, dok je uslovima medikamentne hiperprolaktinemije regulacija PRLR nishodna.

U proteklih par decenija, brojna istraživanja pokazala su značajnu ulogu PRL u apsorpciji kalcijuma na nivou intestinuma. Kalcijum se iz lumena intestinuma može apsorbovati: pasivno (paracelularni način apsorpcije, koji zavisi prvenstveno od gradijenta kalcijuma, pa se često naziva i voltažno-zavisnim) i aktivno (transcelularni način apsorpcije). U fiziološkim uslovima, kalcijum se prvenstveno apsorbuje paracelularnim putem, dok transcelularna apsorpcija postaje značajnija u uslovima povećane potrebe organizma za kalcijumom, kao što su trudnoća i laktacija (63, 375). Mehanizam, kojim prolaktin dovodi do pojačanog aktivnog transporta kalcijuma u duodenumu, je direktno dejstvo ovog hormona na povećanu aktivnost Na(+)-K(+)-ATP-aze i Ca(2+)-ATP-aze u epitelijalnim ćelijama duodenuma (61). Pasivni transport kalcijuma, stimulisan od strane PRL, odvija se preko povećane aktivnosti protein-kinaze C (PKC) i ROC-kinaze (RhoA-associated coiled-coil forming kinasa-ROCK) (376).

Signifikantan porast genske ekspresije PRLR u duodenumu gravidnih pacova, svakako je preduslov za direktan uticaja PRL na povećanje duodenalne apsorpcije kalcijuma u stanju fiziološke hiperprolaktinemije. Verifikovan pad ekspresije PRLR u duodenumu pacova tretiranih Sulpiridom, za posledicu može imati smanjenu intestinalnu apsorpciju kalcijuma. Ovakav rezultat ostavlja prostor za razmišljanje da je u uslovima

medikamentne hiperprolaktinemije, apsorpcija kalcijuma smanjena zahvaljujući nishodnoj regulaciji PRLR u duodenumu.

7.6.2. Analiza odnosa relativne ekspresije PRLR u duodenumu kod pacova sa prolongiranom medikamentnom hiperprolaktinemijom

Brojne eksperimentalne studije o ulozi PRL u intestinalnoj apsorpciji kalcijuma, rađene su u fiziološkim uslovima sa endogenim PRL (377) u stanjima hiperprolaktinemije izazvane egzogenim davanjem PRL (58, 60, 61) ili pituitarnim graftom (323, 373) i u u uslovima fiziološke hiperprolaktinemije kao što su trudnoća i laktacija (57, 63). Za sada, u literaturi nema podataka o duodenalnoj genskoj ekspresiji PRLR u medikamentnoj hiperprolaktinemiji, kao ni o uticaju medikamentne hiperprolaktinemije na intestinalnu apsorpciju kalcijuma.

Rezultati ovog ispitivanja po prvi put pokazuju sniženu gensku ekspresiju PRLR u duodenumu, kod pacova tretiranih Sulpiridom 6 nedelja, u odnosu na starosno odgovarajuću kontrolnu grupu. Kao posledica nishodne regulacije PRLR na nivou duodenuma, može se očekivati smanjena intestinalna apsorpcija kalcijuma u uslovima prolongirane medikamentne hiperprolaktinemije.

Dodavanjem vitamina D i Ca, pacovima sa prolongiranom hiperprolaktinemijom, verifikovana je signifikantno viša ekspresija PRLR u duodenumu.

Vitamin D₃ je svakako najvažniji hormon u regulisanju intestinalne apsorpcije kalcijuma (378). Svoje dejstvo ostvaruje vezivanjem za vitamin D receptore (VDR) i utiče na sve tri etape aktivnog intestinalnog transporta kalcijuma: 1. Ulaz Ca iz intestinalnog lumena u apikalni deo epitelnih ćelija intestinuma, kroz apikalne kalcijumske kanale, 2. Citoplazmatsku translokaciju u enterocitima i 3. Bazolateralnu ekstruziju Ca u plazmu preko kalcijumske pumpe i Ca²⁺-ATP-aze (378, 379, 380). Ranija istraživanja pokazala su, da u trudnoći i laktaciji raste koncentracija 1,25(OH)₂D₃ (381, 382) što je postavilo osnovu hipoteze o direktnom stimulativnom efektu PRL na produkciju 1,25(OH)₂D₃. Ova pretpostavka je i potvrđena eksperimentalnom studijom Ajibadea DV i sar (2010) koji su dokazali kooperativno dejstvo PRL i vitamina D u intestinalnoj apsorpciji kalcijuma (383). Naime, eksperimentalne životinje tretirane vitaminom D i PRL pokazale su da PRL utiče na povećanje mRNA tranzitornog receptora vaniloid tip 6 (TRPV6) neophodnog za apikalni ulaz kalcijuma pod dejstvom vitamina D. Isti autori pokazali su i direktno dejstvo PRL na povećanu transkripciju gena 1 α -hidroksilaze, neophodnog za sintezu vitamina D.

Rezultati ovog eksperimenta po prvi put ukazuju da je kooperativno dleovanje PRL i vitamina D dvosmerno. Ne samo da PRL direktno stimuliše aktivnost i sintezu vitamina D, već i vitamin D dovodi do povećane ekspresije PRLR u duodenumu. Ova ushodna regulacija PRLR pod dejstvom vitamina D može uticati na porast intestinalne apsorpcije kalcijuma u prolongiranoj medikamentnoj hiperprolaktinemiji. Iako su dokazi sve brojniji da medikamentna hiperprolaktinemija predstavlja svojevrsan faktor rizika za osteopeniju

i osteoporozu, studije o evaluaciji suplementne terapije vitaminom D i Ca takoreći ne postoje. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da bi blagovremeno uvođenje takve suplementne terapije bilo od velikog značaja.

7.6.3. Analiza odnosa relativne ekspresije PRLR u duodenumu pacova različite starosne dobi

U eksperimentalnom modelu na zečevima, imunohistohemijskom metodom, dokazan je veoma nizak nivo PRLR u intestinalnom epitelu kod tek rođenih zečeva i umeren kod zečeva starih mesec dana. Sa dva meseca, u epitelnim ćelijama intestinuma, dostignut je nivo PRLR odraslih zečeva (371). Ovi rezultati idu u prilog pretpostavci da ekspresija PRLR raste u razvojnom dobu da bi omogućila dovoljnu apsorpciju kalcijuma neophodnu za ovaj životni period ubrzanog rasta i razvoja skeletnog sistema. Sa starenjem, apsorpcija kalcijuma postepeno opada. Jedna od pretpostavki jeste da je ona uzrokovana padom koncentracije PRL i gubitkom njegovog dejstva na nivou intestinuma (63, 327, 329). Iako rezultati ovog istraživanja pokazuju nešto višu relativnu ekspresiju PRLR u duodenumu mladih pacova u odnosu na stariju eksperimentalnu grupu, statistička značajnost je izostala. Obzirom da se radi o vrlo postepenom smanjivanju intestinalne apsorpcije, mogući razlog za odsustvo statistički značajne razlike, je nedovoljna starosna ralika između eksperimentalnih grupa (5, 18 i 21 nedelja starosti).

7.7. Analiza genske ekspresije PRLR u bubregu

7.7.1. Analiza odnosa relativne ekspresije PRLR u bubregu kod pacova sa fiziološkom i medikamentnom hiperprolaktinemijom

Prisustvo PRL i PRLR verifikovano je u tkivu bubrega različitih životinja (384, 385, 386) ali i u humanoj populaciji (26). Imunohistohemijskim metodama vizuelizovani su PRLR u delovima membrana izolovanih iz bubrega (385). Radioimunološkim esejima potvrđeno je da se PRL vezuje za svoje receptore kako u renalnom korteksu tako i u meduli (387). U hibridizovanim renalnim tubulima in situ, identifikovana je mRNA PRLR (388). Relativna ekspresija PRLR, određivana RT-PCR analizom, potvrdila je prisustvo PRLR u tkivu bubrega, kako u animalnim eksperimentalnim modelima, tako i u humanoj populaciji (389, 54, 26).

Rezultati ovog eksperimenta potvrđuju prisustvo genske ekspresije duge forme PRLR u tkivu bubrega, kod svih eksperimentalnih grupa.

U domenu osmoregulacije, prolaktinu se najčešće pripisuje natrijumuretička uloga. Na nivou proksimalnih tubula, vezujući se za svoje receptore, prolaktin inhibira aktivnost $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP-aze}$ i dovodi do natrijumureze (54, 55). Da bi PRL ostvario svoje natrijumuretičko dejstvo, neophodna je dovoljna koncentracija intrarenalnog dopamina, čime je potvrđena permisivna uloga dopamina na PRL (55). Eksperimentalna studija,

novijeg datuma, otkrila je povećanu aktivnost Ca(2+)-ATP-aze, pod uticajem PRL (390). Ovaj rezultat bi se mogao tumačiti, da PRL, povećavajući aktivnost Ca(2+)-ATP-aze u bubregu, stimuliše tubularnu reapsorpciju kalcijuma. Obzirom da se radi o eksperimentalnom modelu na ribama, rezultat o povećanoj aktivnosti Ca(2+)-ATP-aze pod dejstvom PRL, bi trebalo uzeti sa rezervom prilikom interpretacije tubularne reapsorpcije Ca kod sisara.

Rezultati ovog eksperimenta, pokazali su značajan pad relativne genske ekspresije PRLR u bubregu u fiziološkoj hiperprolaktinemiji u odnosu na tronedeljnu medikamentnu hiperprolaktinemiju i starosno odgovarajuću kontrolu. U literaturi se vrlo često pominje uticaj PRL na povećanu tubularnu reapsorpciju kalcijuma u trudnoći i laktaciji (324, 325, 338, 339, 341). Povećana potreba majčinog organizma za kalcijumom se zaista može obezbediti sledećim mehanizmima: 1. Povećanom intestinalnom apsorpcijom kalcijuma; 2. Povećanim crpljenjem kalcijuma iz skeleta majke; ili/i 3. Povećanom tubularnom reapsorpcijom kalcijuma. Mada postoje jasni dokazi o direktnom dejstvu PRL na povećanu aktivnost Na(+)-K(+)-ATP-aze i Ca(2+)-ATP-aze u duodenum (61) vrlo su oskudna istraživanja o uticaju PRL na Ca(2+)-ATP-azu u tubularnom sistemu bubrega (390). Obzirom da u dostupnoj literaturi, nema podataka na koji način PRL dovodi do tubularne reapsorpcije kalcijuma, na osnovu rezultata ovog eksperimenta može se dati sledeće objašnjenje. Ukoliko se pođe od pretpostavke da se uz povišenu natrijumurezu, indirektno povećava ekskrecija kalcijuma, nishodna regulacija PRLR u bubregu gravidnih pacova, mogla bi se shvatiti kao kompenzatorni mehanizam. Naime, nishodna regulacija PRLR, ostaviće manje prostora za delovanje PRL na nivou tubula i rezultovaće padom natrijum i kalcijumureze. Zabeležena povišena kalcijumureza, u istoj eksperimentalnoj grupi sa fiziološkom hiperprolaktinomijom, može biti posledica povećane intestinalne apsorpcije kalcijuma i povećane glomerularne filtracije, što zajedno prevazilazi reapsorptivne kapacitete bubrega (324, 325, 338) a ne posledica nishodne regulacije PRLR.

U grupi eksperimentalnih životinja tretiranih Sulpiridom 3 nedelje, verifikovan je signifikantan porast genske ekspresije PRLR u bubregu. U dostupnoj literaturi, nema podataka o uticaju medikamentne hiperprolaktinemije na ekspresiju gena za PRLR, pa je tumačenje mogućih posledica ove ushodne regulacije PRLR, u bubregu pacova sa medikamentnom hiperprolaktinomijom, bazirano isključivo na pretpostavkama. Kod istih eksperimentalnih životinja, verifikovana je povišena kalcijumureza. Ona se ne može opravdati povećanom intestinalnom apsorpcijom kalcijuma, kao u slučaju fiziološke hiperprolaktinemije, jer je ekspresija PRLR u duodenumu, tokom medikamentne hiperprolaktinemije signifikantno snižena. Ova hiperkalcurija se takođe ne može objasniti povećanom glomerularnom filtracijom, jer ne postoje podaci o takvom efektu Sulpirida. Ukoliko je povišena kalcijumureza, posledica medikamentne hiperprolaktinemije, ona će biti rezultat povišene ekspresije PRLR u bubregu, koje nema u fiziološkoj hiperprolaktinemiji. Zašto približno iste koncentracije PRL dovode do različite ekspresije

PRLR u bubregu, u zavisnosti da li su posledica trudnoće ili medikamenta, za sada ostaje nepoznato.

7.7.2. Analiza odnosa relativne ekspresije PRLR u bubregu kod pacova sa prolongiranim medikamentnom hiperprolaktinijom

Istraživanja sprovedena do sada, nisu razmatrala problematiku medikamentne hiperprolaktinije i ekspresije PRLR u bubregu.

Rezultati ovog eksperimenta, po prvi put pokazuju ushodnu regulaciju PRLR u bubregu, u prolongiranoj hiperprolaktiniji. U istoj eksperimentalnoj grupi verifikovan je značajan pad kalcijumureze. Moglo bi se pretpostaviti da je povišena ekspresija PRLR razlog smanjene kalcijumureze. Međutim, rezultati sledeće eksperimentalne grupe, F, ukazuju da bi takav zaključak bio ishitren. Naime dodavanje vitamina D i suplementa Ca, pacovima sa prolongiranim hiperprolaktinijom, rezultovalo je značajnim porastom kalcijumureze, bez značajne izmene u genskoj ekspresiji PRLR.

Za ispoljavanje natrijumuretičkog dejstva, prolaktinu je neophodno prisustvo intrarenalnog dopamina (54, 55). Dodavanjem antagonista D1 receptora, sasvim se gubi natrijumuretički efekat PRL (55). Sulpirid pripada dopaminergičkim antagonistima, ali svoje dejstvo ispoljava prevashodno preko D2 receptora. Do sada nije opisano vezivanje Sulpirida za D1 receptore u proksimalnom tubulu bubrega, čime bi eventualno mogao dovesti do inhibicije sinteze intrarenalnog dopamina i kompromitovanja natrijumuretičke uloge PRL. Čak iako bi ova pretpostavka bila tačna, ostaje nerazjašnjeno da li je izmenjena kalcijumureza posledica direktnog delovanja Sulpirida ili Sulpiridom uzrokovane hiperprolaktinije.

7.7.3. Analiza odnosa relativne ekspresije PRLR u bubregu pacova različite starosne dobi

Rezultati ovog eksperimenta, po prvi put otkrivaju značajno višu ekspresiju PRLR u tkivu bubrega mladih pacova (5nedelja starosti) u odnosu na stariju eksperimentalnu grupu (21 nedelja starosti). Poredeći koncentracije PRL u različitim životnim dobima, rezultati ovog eksperimenta potvrdili su ranije nalaze, da sa starenjem dolazi do pada koncentracije PRL (327, 328). Da li je pad koncentracije PRL uzrok nishodne regulacije PRLR u bubregu, ne može se sa sigurnošću tvrditi. U dostupnoj literaturi ne postoje podaci koji bi jasno ukazivali da pad koncentracije PRL u procesu starenja, dovodi do izmene homeostaze kalcijuma. Mada je u najstarijoj eksperimentalnoj grupi verifikovana značajno niža koncentracija PRL, značajno niža ekspresija PRLR u bubregu i značajno viša kalcijumureza, uzročno-posledične veze još uvek nisu poznate.

7.8. Analiza genske ekspresije PRLR u pršljenju

7.8.1. Analiza odnosa relativne ekspresije PRLR u pršljenju kod pacova sa fiziološkom i medikamentnom hiperprolaktinemijom

Hipoteza o direktnom dejstvu prolaktina na koštani sistem, nastala je verifikovanjem ekspresije mRNK prolaktinskih receptora, RT-PCR analizom, u ćelijama osteosarkoma (28). Ubrzo nakon toga, u uslovima in vitro, na kulturi ćelija kalvarije, utvrđeno je prisustvo ekspresije mRNK PRLR u osteoblastima i odsustvo u osteoklastima (29). Imunohistohemijskom metodom, ovaj rezultat je potvrđen i u uslovima in vivo (64). Usledilo je otkrivanje ekspresije PRLR, RT-PCR analizama, u različitim kostima poput tibije, femura i pršljenova (30). Imunohistohemijskim analizama vizuelizovani su PRLR u osteoblastima tibije (68).

Rezultati ovog eksperimenta, potvrdili su RT-PCR analizom, ekspresiju duge forme PRLR u lumbalnim pršljenovima (L₅-L₆) pacova svih ispitivanih grupa.

Hormonska regulacija koštanih promena u trudnoći i laktaciji, nije potpuno razjašnjena. Sve je više dokaza da kalcitropni hormoni poput PTH i vitamina D₃, u uslovima fiziološke hiperprolaktinemije, nisu jedini odgovorni za promene koje se dešavaju u majčinom koštanom sistemu (321, 338, 391, 392).

Ovim eksperimentalnim ispitivanjem po prvi put je verifikovana signifikantno niža ekspresija PRLR u lumbalnim pršljenovima u trudnoći.

U dostupnoj literaturi, podaci o koštanoj mineralnoj gustini u trudnoći, bazirani na rezultatima DXA, su kontradiktorni. Pojedini animalni eksperimentalni modeli pokazuju značajan pad (393, 394, 395, 396) dok drugi pokazuju porast lumbalne BMD (68). Broj studija u humanoj populaciji, koje su pratile promenu BMD u trudnoći, je pak vrlo oskudan zbog opravdane brige o zračenju ploda primenom DXA. Korišćenjem tehnika SPA (single photon apsorptimetrija) DPA (dual-photon apsorptimetrija) i ultrasonografije, dobijeni su takođe različiti rezultati: od značajno smanjene, do neizmenjene BMD u trudnoći (397, 398, 399).

Studije bazirane na histomorfometriji pokazuju da se u kasnoj trudnoći značajno istanjuje kortikalni, povećava trabekularni deo pršljena i smanjuje površina osteoblasta (68, 396).

U uslovima in vitro dokazano je da PRL direktno utiče na osteoblaste, tako što značajno usporava njihovu diferencijaciju i ukupan broj (400). U osteoblastima, izloženim direktnom dejstvu PRL, u uslovima in vitro, verifikovana je niža ekspresija ALP i mRNK osteokalcina što je rezultovalo smanjenom mineralizacijom (64, 396, 400). Dovodeći do ushodne regulacije ekspresije RANKL (aktivator receptora jedarnog liganda faktora-kapaB) i nishodne regulacije ekspresije osteoprotegerina (OPG) prolaktin povećava odnos RANKL/OPG, dovodeći do povećane osteoklastne koštane resorpcije (396).

U periodu rapidne neonatalne mineralizacije, koštani sistem majke svakako predstavlja značajan izvor kalcijuma. Dosadašnji rezultati objašnjavaju na koji način PRL u trudnoći pomaže da se obezbede dovoljne količine kalcijuma za plod: povećanom apsorpcijom

kalcijuma u intestinumu majke i povećanom resorpcijom kalcijuma iz majčinog skeleta. Međutim, rezultati ovog eksperimenta, koji su pokazali značajno nižu ekspresiju PRLR u lumbalnim pršljenovima u trudnoći, navode na zaključak da se ovom nishodnom regulacijom PRLR ostavlja manje prostora za resorpcivno dejstvo PRL i time štiti majčin skeletni sistem od daljeg gubitka kalcijuma. Ovaj rezultat može pružiti objašnjenje zašto je u uslovima fiziološke hiperprolaktinemije, kao što je trudnoća, gubitak koštane mase umerenog stepena i po pravilu reverzibilan (392, 401).

Kod pacova sa medikamentnom hiperprolaktinemijom, izazvanom Sulpiridom, verifikovana je signifikantno viša ekspresija PRLR u pršljenovima u odnosu na kontrolnu grupu i u odnosu na gravidne pacove.

U dostupnoj literaturi nema podataka o ekspresiji PRLR u koštanom sistemu tokom medikamentno izazvane hiperprolaktinemije.

Hiperprolaktinemija uzrokovana antipsihoticima kod šizofrenih pacijenata, povezana je sa smanjenom koštanom mineralnom gustom i povećava rizik za frakturu (402, 403). Terapija Valproatom i atipičnim antipsihoticima, kod pacijenata sa bipolarnim poremećajima, takođe dovodi do pada BMD (345). Kod žena sa depresivnim sindromom sa/ili bez graničnog poremećaja ličnosti na terapiji SSRI, verifikovana je niža lumbalna BMD (359). Većina autora, uzročno-posledičnu vezu između medikamentne hiperprolaktinemije i gubitka koštane gustine, objašnjava sekundarnim hipogonadizmom i hipoestrogenemijom kod žena (315, 404, 405). U eksperimentalnom modelu, gde je kod jedne grupe pacova uzrokovana hiperprolaktinemija pituitarnim graftom (transplantacija anteriorne pituitarne žlezde) i urađena ovariektomija, a kod druge grupe samo ovariektomija, suplementacija estrogenom nije dovela do poboljšanja osteosinteze kod pacova sa hiperprolaktinemijom (396). Klinička studija o uticaju hiperprolaktinemije različitog porekla na BMD, pokazala je sniženu BMD i kod pacijenata bez sekundarnog hipogonadizma (310).

Rezultati ovog eksperimentalnog istraživanja, signifikantno povišena ekspresija PRLR u pršljenju, u medikamentnoj hiperprolaktinemiji, potvrđuju hipotezu direktnog uticaja PRL na koštani metabolizam. Ushodna regulacija PRLR u pršljenovima otvara prostor za intenzivnije delovanje PRL, što rezultuje slabijom diferencijacijom i smanjenim brojem osteoblasta (400). Snižena koncentracija PINP-a, u istoj eksperimentalnoj grupi, u saglasnosti je sa tom hipotezom, obzirom da se prokolageni peptidi u najvećoj meri proizvode tokom proliferacije osteoblasta (357). U uslovima medikamentne hiperprolaktinemije, sa povišenom ekspresijom PRLR u kostima, doći će do nishodne regulacije osteoprotegerina, niže ekspresije ALP i osteokalcina (64, 396, 400) i posledičnom smanjenom mineralizacijom kostiju. Obzirom da je OC, marker koštane osteosinteze, koji se prevashodno stvara u procesu mineralizacije (357) snižena koncentracija OC u medikamentnoj hiperprolaktinemiji, može se smatrati posledicom direktnog delovanja PRL.

Razlog za ushodnu regulaciju PRLR u kostima, može se objasniti na sledeći način. U grupi pacova sa medikamentnom hiperprolaktinemijom, verifikovana je niža ekspresija PRLR u duodenumu, koja za posledicu ima smanjenu intestinalnu apsorpciju kalcijuma. Da bi se kompenzovala smanjena intestinalna apsorpcija kalcijuma i održala normokalcemija, PRL svoje dejstvo usmerava na koštani sistem, gde je ushodnom regulacijom PRLR, omogućena resorpcija kalcijuma iz skeleta. Da poremećaj apsorpcije kalcijuma na nivou digestivnog trakta, rezultuje gubitkom koštane mase potvrđeno je i eksperimentalnim modelima novijeg datuma (406, 407).

Snižena ekspresija PRLR u pršljenu u fiziološkoj hiperprolaktinemiji i povišena u medikamentnoj, može biti jedan od razloga što trudnoća sama po sebi ne predstavlja faktor rizika za osteopeniju i osteoporozu, dok medikamentna hiperprolaktinemija to jeste.

7.8.2. Analiza odnosa relativne ekspresije PRLR u pršljenu kod pacova sa prolongiranom medikamentnom hiperprolaktinemijom

U prolongiranoj medikamentnoj hiperprolaktinemiji, ekspresija PRLR u pršljenu bila je povišena u odnosu na starosno odgovarajuću kontrolnu grupu. Imajući u vidu direktan uticaj PRL na koštani sistem, produženo trajanje medikamentne hiperprolaktinemije uzrokovalaće dalju koštanu resorpciju i gubitak koštane mase. Snižene koncentracije svih biohemijskih parametara osteosinteze (ALP, OC i P1NP) u ovoj eksperimentalnoj grupi, potvrđuju hipotezu da je odnos koštane sinteze i razgradnje narušen u hiperprolaktinemiji u korist povećane koštane resorpcije (396).

Dodavanjem suplementa Ca i vitamina D, pacovima sa prolongiranom medikamentnom hiperprolaktinemijom, nije došlo do značajne izmene u ekspresiji PRLR u pršljenu, uz istovremeno niske koncentracije markera osteosinteze (OC i P1NP). Obzirom da je u istoj grupi eksperimentalnih životinja, verifikovan porast ekspresije PRLR u duodenumu, što bi moglo rezultovati povećanom intestinalnom apsorpcijom kalcijuma, efekte suplementne terapije ne treba zanemariti. Da bi se utvrdio pravi značaj blagovremenog uveđenja suplementne terapije Ca i vitaminom D, u stanju medikamentne hiperprolaktinemije nedostaju kako eksperimentalna, tako i klinička i epidemiološka ispitivanja.

7.8.3. Analiza odnosa relativne ekspresije PRLR u pršljenu pacova različite starosne dobi

Rezultati ovog eksperimenta, pokazali su signifikantno nižu ekspresiju PRLR u pršljenovima najmlađih pacova (starih 5 nedelja) u odnosu na najstariju ispitivanu kontrolnu grupu (21 nedelja starosti).

Studije o ekspresiji PRLR u tkivu fetusa humane populacije i pacova, pokazale su prisustvo PRLR u dugim kostima, pršljenovima i rebrima, ukazujući na moguću ulogu PRLR već u embrionalnom razvoju skeletnog sistema (408, 409). Intrauterino dodavanje PRL, rezultovalo je padom aktivnosti ALP i koncentracije OC, redukovanom endohondrijalnom osifikacijom i tanjim kostima lobanje novorođenih pacova (64). U eksperimentalnom modelu PRLR „knockout“ miševa, utvrđeno je da odsustvo PRLR rezultuje značajnim smanjenjem koštane gustine u tibiji kod miševa starih 4 meseca (29). Dvonedeljna intraperitonealna administracija PRL, kod odraslih pacova, rezultovala je povećanom resorpcijom kalcijuma iz femura, tibije, sternuma i pršljenova, dok je kod mladih pacova zapaženo odlaganje kalcijuma u femur, tibiju i sternum (65). Dijetarni unos kalcijuma, takođe je pokazao različite efekte na koštani sistem, kod životinja različite životne dobi, sa eksperimentalno izazvanom hiperprolaktinemijom. Povećan unos kalcijuma je kod mladih pacova sa hiperprolaktinemijom, uzrokovao je povećano odlaganje kalcijuma na nivou tibije, a kod odraslih smanjeno (30).

Nishodna regulacija PRLR u pršljenovima mladih pacova u saglasnosti je sa povećanom osteoblastnom aktivnošću u ovom životnom periodu i sa povišenim markerima osteosinteze u ovoj eksperimentalnoj grupi (ALP, OC, P1NP). Značajno povišena ekspresija PRLR kod najstarijih eksperimentalnih životinja, otvara prostor za intenzivnije delovanje PRL, koje će rezultovati nadvladavanjem koštane resorpcije nad sintezom (396, 400) i gubitkom koštane mase u procesu starenja.

8. ZAKLJUČAK

Na osnovu rezultata ovog eksperimenta, može se zaključiti da je genska ekspresija prolaktinskih receptora, u ciljnim organima homeostaze kalcijuma, značajno različita u fiziološkoj i medikamentnoj hiperprolaktinemiji. U fiziološkoj hiperprolaktinemiji potvrđena je signifikantno viša ekspresija PRLR u duodenumu, što je u saglasnosti sa rezultatima dosadašnjih istraživanja. Istovremeno je, po prvi put, u uslovima fiziološke hiperprolaktinemije, verifikovana signifikantno niža ekspresija PRLR u bubregu i pršljenovima. U medikamentnoj hiperprolaktinemiji, istraživanja u domenu genske ekspresije PRLR do sada nisu sprovedena. Rezultati ovog eksperimenta, po prvi put, otkrivaju značajno sniženu ekspresiju PRLR u duodenumu, a povišenu u bubregu i pršljenovima. Ovako različita genska ekspresija PRLR, u target organima metabolizma kalcijuma, u uslovima fiziološke i medikamentne hiperprolaktinemije, objašnjava različite mehanizme homeostaze kalcijuma. U stanju fiziološke hiperprolaktinemije, viša ekspresija PRLR u duodenumu dovodi do povećane intestinalne apsorpcije kalcijuma, a snižena ekspresija PRLR u pršljenovima sprečava resorpciju kalcijuma iz skeletnog sistema. U medikamentnoj hiperprolaktinemiji, niska ekspresija PRLR u duodenumu praćena je smanjenom apsorpcijom kalcijuma, povišena ekspresija PRLR u bubregu rezultuje povišenom kalcijumurezom, a viša ekspresija PRLR u pršljenovima dovešće do povećane koštane resorpcije kalcijuma. Kao posledica različite homeostaze kalcijuma, promene koje trpi koštani sistem u fiziološkoj hiperprolaktinemiji, su blage i reverzibilne, dok se medikamentna hiperprolaktinemija može smatrati značajnim faktorom rizika za gubitak koštane mineralne gustine.

Na osnovu postavljenih hipoteza i rezultata ovog eksperimentalnog rada mogu se izvesti sledeći zaključci:

- I. U stanju fiziološke hiperprolaktinemije verifikovana je značajno viša ekspresija PRLR u duodenumu, što omogućuje povećanu intestinalnu apsorpciju kalcijuma. Značajno niža ekspresija PRLR u pršljenovima ostavlja manje prostora za resorpcivno dejstvo PRL i time štiti skeletni sistem od gubitka kalcijuma.
- II. U medikamentnoj hiperprolaktinemiji dolazi do nishodne regulacije ekspresije PRLR u duodenumu, čime se gubi značajna uloga prolaktina u apsorpciji kalcijuma iz intestinuma. Tražeći drugi izvor kalcijuma, koji bi nadomestio smanjenu intestinalnu apsorpciju, prolaktin se okreće koštanom sistemu, odakle ubrzano crpi kalcijum zahvaljujući ushodnoj regulaciji PRLR u pršljenovima.
- III. Blagovremeno uključivanje suplementne terapije kalcijumom i vitaminom D, dovodi do značajno više ekspresije PRLR u duodenumu pacova sa prolongiranom hiperprolaktinemijom, čime se može oporaviti intestinalna apsorpcija kalcijuma.

9. LITERATURA

1. **Owerbach D, Rutter WJ, Cooke NE, Martial JA, Shows TB.** The prolactin gene is located on chromosom 6 in humans. *Science*, 1981;212: 815-816.
2. **Sinha YN.** Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev*, 1995;16: 354-369.
3. **Cooke NE, Coit D, Shine J, Baxter JD, Martial JA.** Human prolactin cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J Biol Chem*, 1981;256: 4007-4016.
4. **Arey BJ, Freeman ME.** Oxytocin, vasoactive-intestinal peptide and serotonin regulate the matin surges of prolactin secretion in the rat. *Endocrinology*, 1990; 126 (1): 279-84.
5. **Leslie H, Courtney CH, Bell PM, Hadden DR, McCance DR, Ellis PK, Sheridan B, Atkinson AB.** Laboratory and clinical experience in 55 patients with macroprolactinemia indentified by a simple polyethylene glycol precipitation method. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86(6): 2743-6.
6. **Jackson RD, Wortsman J, Malarkey WB.** Characterization of a large moolecular weight prolactin in women with idiopathic hyperprolactineemia and normal menses. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985; 61: 258-264.
7. **Carlson HE, Markoff E, Lee DW.** On the nature of serum prolactin in two patients with macroprolactinemia. *Ffertil Steril*, 1992; 58: 78-87.
8. **Heffner LJ, Gramates LS, Yuan RW.** A glycosylated prolactin species is covalently bound to immunoglobulin in amniotic fluid. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; 165: 299-305.
9. **Cavaco B, Leite V, Santos MA, Arranhado E, Sobrinho LG.** Some forms of big big prolactin behave as complex of monomeric prolactinwith an immunoglobulin G in patients with macroprolactinemia or prolactinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995; 80: 2342-2346.
10. **Hattori N, Ishihara T, Ikekubo K, Moridera K, Hino M and Kurahachi H.** Autoantibody to human prolactin in patients with idiopathic hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992; 75: 1226-1229.
11. **Sinha YN, Gilligan TA, Lee DW, Hollingsworth D, Markoff E.** Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J Clin Endocrinol Metab*, 1985; 60: 239-243.
12. **Bazan JF.** Haemopoetic receptors and helical cytokines. *Immunol Today*, 1990; 11: 350-354.
13. **Bazan JF.** Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor super family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 6934-6938.
14. **Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay M-C, Edery M.** The prolactin/growth hormon receptor family. *Endocr Rev*, 1991; 12: 235-251.

15. **Yamashita S, Takayanagi A, Shimizu N.** Temporal and cell-type specific expression of c-fos and c-jun protooncogenes in the mouse uterus after estrogen stimulation. *Endocrinology*, 1996; 137: 5468-5475.
16. **Ali S, Pellegrini I, Kelly PA.** A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor. *J Biol Chem*, 1991; 266: 20110-20117.
17. **Davis JA, Linzer DIH.** Expression of multiple forms of the prolactin receptors in mouse liver. *Mol Endocrinol*, 1989; 3: 674-680.
18. **Bole-Feysot C, Goffin H, Edery M, Binart N, Kelly PA.** Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*, 1998; 19: 225-268.
19. **Lesueur L, Edery M, Ali S, Paly J, Kelly PA, Djiane J.** Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 824-828.
20. **Goffin V, Kinet S, Ferrag F, Binart N, Martial JA, Kelly PA.** Antagonistic properties of human prolactin analogues that show paradoxical agonistic activity in the Nb2 bioassay. *J Biol Chem*, 1996; 271: 16573-16579
21. **Carter-Su C, Smit LS.** Signaling via JAK tyrosine kinases: growth hormone receptor as a model system. *Recent Prog Horm Res*, 1998; 53: 61-82.
22. **Pezet A, Favre H, Kelly PA, Edery M.** Inhibition and restoration of prolactin signal transduction by suppressors of cytokine signaling. *J Biol Chem*, 1999; 274: 24497-24502.
23. **Nagano M, Kelly PA.** Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem*, 1994; 269: 13337-13345.
24. **Freemark M, Driscoll P, Andrews J, Kelly PA, Royster M.** Ontogenesis of prolactin receptor gene expression in the rat olfactory system: potential roles for lactogenic hormones in olfactory development. *Endocrinology*, 1996; 137: 934- 942.
25. **Freemark M, Nagano M, Edery M, Kelly PA.** Prolactin receptor gene expression in the fetal rat. *J Endocrinol*, 1995; 144: 285-292.
26. **Peirce SK, Chen WY.** Quantification of prolactin receptor mRNA in multiple human tissues and cancer cell lines by real time RT-PCR. *J Endocrinol*, 2001; 171: R1-R4.
27. **Ouhtit A, Kelly PA, Morel G.** Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in rat digestive tissues. *Am J Physiol*, 1994; 266: 807-815.
28. **Bataille-Simoneau N, Gerland K, Chappard D, Basle MF, Mercier L.** Expression of prolactin receptors in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996; 229: 323-328.
29. **Clement-Lacroix P, Ormandy C, Lepescheux L, Ammann P, Damotte D, Goffin V, Bouchard B, Amling M, Gaillard-Kelly M, Binart N, Baron R, Kelly PA.** Osteoblasts are a new target for prolactin: analysis of bone formation in prolactin receptor knockout mice. *Endocrinology*, 1999; 140: 96-105.
30. **Charoenphandhu N, Tudpor K, Thongchote K, Saengamart W, Puntheeranurak S, Krishnamra N.** High-calcium diet modulates effects of long term prolactin exposure on the cortical content in ovariectomized rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007; 292: 443-452.

31. **Riddle O, Bates RW, Dykshorn SW.** The preparation, identification and assay of prolactin- a hormon of anterior pituitary. *Am J Physiol*, 1933; 105: 191-216.
32. **Liu X, Robinson GW, Wagner KU, Garrett L, Boris AW, Hennighausen L.** Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes Dev* 1997; 11: 179-186.
33. **Horseman N, Zhao W, Montecino-Rodriguez E, Tanaka M, Nakashima K, Engle SJ, Smith F, Markoff E, Dorshkind K.** Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with targeted disruption of the prolactin gene. *EMBO J*, 1997; 16: 6926-6935.
34. **Ormandy CJ, Camus A, Barra J, Damotte JD, Lucas B, Buteau H, Edery M, Brousse N, Babinet C, Binart N, Kelly PA.** Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse. *Genes Dev*, 1997; 11: 167-178.
35. **Barber MC, Clegg RA, Finley E, Vernon RG, Flint DJ.** The role of growth hormone, prolactin and insulin-like growth factors in the regulation of rat mammary gland and adipose tissue metabolism during lactation. *J Endocrinol*, 1992; 135: 195-202.
36. **Tucker HA.** Lactation and its hormonal control. *The Physiology of Reproduction*, 1994; p.1065-1098.
37. **Morishige WK, Rothchild I.** Temporal aspects of the regulation of corpus luteum function by luteinizing hormone, prolactin and placental luteotrophin during the first half of pregnancy in the rat. *Endocrinology*, 1974; 95: 260-274.
38. **Freeman ME.** The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. *The Physiology of the reproduction*, 1994; p.613-658.
39. **Bridges RS, Robertson MC, Shiu RPC, Friesen HG, Stuer AM, Mann PE.** Endocrine communication between conceptus and mother: placental lactogen stimulation of maternal behavior. *Neuroendocrinology*, 1996; 64: 57-64.
40. **Lucas BK, Ormandy CJ, Binart N, Bridges RS, Kelly PA.** Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology*, 1998; 139: 4102-4107.
41. **Sugiyama T, Minoura H, Toyoda N, Sakaguchi K, Tanaka M, Sudo S, Nakashima K.** Pup contact induces the expression of long form prolactin receptor mRNA in the brain of female rats: effect of ovariectomy and hypophysectomy on receptor gene expression. *J Endocrinol*, 1996; 149: 335-340.
42. **Goffin V, Bouchard B, Ormandy CJ, Weimann E, Ferrag F, Touraine P, Bole-Feysot C, Maaskant RA, Clement-Lacroix P, Edery M, Binart N, Kelly PA.** Prolactin: a hormon at the crossroads of neuroimmunoendocrinology. *Ann NY Acad Sci*, 1998; 840: 498-509.
43. **Buskila D, Shoenfeld Y.** Prolactin, bromocriptin and autoimmune diseases. *Isr J Med Sci*, 1996; 32:23-27.
44. **Neidhart M.** Prolactin in autoimmune diseases. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1998; 217: 408-419.
45. **Viselli SM, Stanek EM, Mukherjee P, Hymer WC, Mastro AM.** Prolactin-induced mitogenesis of lymphocytes from ovariectomized rats. *Endocrinology*, 1991; 129: 983-990.

46. **Shiu RPC, Elsholtz HP, Tanaka T, Friesen HG, Gout PW, Geer CT, Noble RL.** Receptor-mediated mitogenic action of prolactin in a rat lymphoma cell line. *Endocrinology*, 1983; 113: 159-165.
47. **Gushichin GV, Cheney C, Glaser R, Malarkey WB.** Temporal relationships and IL-2 dependency of prolactin-induced lymphocyte proliferation. *J Neuroimmunol*, 1995; 60: 93-98.
48. **Shennan DB.** Regulation of the water and solute transport across mammalian plasma cell membranes by prolactin. *J Dairy Res*, 1994; 155-166.
49. **Falconer IR, Rowe JM.** Possible mechanism for action of prolactin on mammary cell sodium transport. *Nature*, 1975; 256: 327-328.
50. **Falconer IR, Langley JV, Vacek AT.** Effect of prolactin on $^{86}\text{Rb}^+$ uptake, potassium content and (G- ^3H)ouabain binding of lactating rabbit mammary tissue. *J Physiol (Lond)*, 1983; 334: 1-17.
51. **Manku MS, Mtabal JP, Horrobin DF.** Effect of cortisol, prolactin and ADH on the amniotic membrane. *Nature*, 1975; 258: 78-80.
52. **Leontic EA, Tyson JE.** Prolactin and fetal osmoregulation: water transport across isolated human amnion. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 1977; 232: 124-127.
53. **Mainoya JR.** Analysis of the role of endogenous prolactin on fluid and sodium chloride absorption by the rat jejunum. *J Endocrinol*, 1975; 67: 343-349.
54. **Crambert S, Sjoberg A, Eklof AC, Ibarra F, Holtback U.** Prolactin and dopamin 1-like receptor interaction in renal proximal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010; 299: 49-54.
55. **Ibarra F, Crambert S, Eklof AC, Hansell P, Holtback U.** Prolactin, a natriuretic hormone, interacting with renal dopamine system. *Kidney Int*, 2005; 68: 1700-1707.
56. **Krishnamara N, Wirunrattanakij Y, Limlomwongse L.** Acute effects of prolactin on passive calcium absorption in the small intestine by in vivo perfusion technique. *Can J Physiol Pharmacol*, 1998; 76(2): 161-168.
57. **Lotinun S, Limlomwongse L, Krishnamara N.** The study of physiological significance of prolactin in the regulation of calcium metabolism during pregnancy and lactation in rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 1998; 76(2): 218-228.
58. **Piyabhan P, Krishnamara N, Limlomwongse L.** Changes in the regulation of calcium metabolism and bone calcium content during growth in the absence of endogenous prolactin and during hyperprolactinemia: longitudinal study in male and female Wistar rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 2000; 78(10): 757-765.
59. **Charoenphandhu N, Limlomwongse L, Krishnamara N.** Prolactin directly stimulates transcellular active calcium transport in the duodenum of female rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 2001; 79(5): 430-438.
60. **Tanrattana C, Charoenphandhu N, Limlomwongse L, Krishnamara N.** Prolactin directly stimulated the solvent drag-induced calcium transport in the duodenum of female rats. *Biochim Biophys Acta*, 2004; 1665(1-2): 81-91.
61. **Charoenphandhu N, Limlomwongse L, Krishnamara N.** Prolactin directly enhanced Na^+/K^+ and Ca^{2+} -ATPase activities in the duodenum of female rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 2006; 84(5): 555-563.

62. **Jantarajit W, Thongon N, Pndaranandaka J, Teerapornpuntakit J, Krishnamara N, Charoenphandhu N.** Prolactin-stimulated transepithelial calcium transport in duodenum and Caco-2 monolayer are mediated by the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007; 293: 372-384.
63. **Charoenphandhu N, Krishnamara N.** Prolactin is an important regulator of intestinal calcium transport. *Can J Physiol Pharmacol*, 2007, 85(6): 569-581.
64. **Coss D, Yang L, Kuo CB, Xu X, Luben RA, Walker AM.** Effects of prolactin on osteoblast alkaline phosphatase and bone formation in the developing rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000;279: 1216-1225.
65. **Krishnamara N, Seemoung J.** Effects of acute and long-term administration of prolactin on bone ⁴⁵Ca uptake, calcium deposit, and calcium resorption in weaned, young, and mature rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 1996; 74(10): 1157-1165.
66. **Lotinun S, Limlomwongse L, Sirkulchayanonta V, Krishnamra N.** Bone calcium turnover, formation and resorption in bromocriptine- and prolactin-treated lactating rats. *Endocrine*, 2003; 20: 163-170.
67. **Puntheeranurak S, Charoenphandhu N, Krishnamara N.** Enhanced trabecular-bone calcium deposition in female rats with high physiological dose of prolactin diminishes after ovariectomy. *Can J Physiol Pharmacol*, 2006; 84(10): 993-1002.
68. **Suntornsaratooon P, Wongdee K, Goswami S, Krishnamara N, Charoenphandhu N.** Bone modeling in bromocriptine-treated pregnant and lactating rats: possible osteoregulatory role of prolactin in lactation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010; 299: 426-436.
69. **Struman I, Bentzien F, Lee HY, Mainfroid V, D Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA.** Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin, growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999; 96: 1246-1251.
70. **Clapp C, De la Escalera GM.** Prolactins: novel regulators of angiogenesis. *News Physiol Sci*, 1997; 12: 231-237.
71. **Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delrue F, Weiner RI.** The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*, 1993; 133: 1292-1299.
72. **Kanematsu S, Sawyer CH.** Elevation of plasma prolactin after hypophysial stalk section in the rat. *Endocrinology*, 1973; 93: 238-241.
73. **Everett JW.** Functional corpora lutea maintained for months by autografts of rat hypophysis. *Endocrinology*, 1956; 58: 786-796.
74. **Shaar CJ, Clemens JA.** The role of catecholamines in the release of anterior pituitary prolactin in vitro. *Endocrinology*, 1974; 95: 1202.
75. **Fuxe K.** Evidence for the existence of monoamine neurones in the central nervous system. *Acta Physiol Scand Suppl*, 1965; 239-247.
76. **Ben-Jonathan N, Oliver C, Winer HJ, Mical RS, Porter JC.** Dopamine in hypophysial portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology*, 1977; 100: 452-480.
77. **Gibbs DM, Neill JD.** Dopamine levels in hypophysal stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion in vivo. *Endocrinology*, 1978; 102: 1895-1900.

78. **Goudreau JL, Falls WM, Lookingland KJ, Moore KE.** Periventricular-hypophysal dopaminergic neurons innervate the intermediate but not the neural lobe of the rat pituitary gland. *Endocrinology*, 1995; 62: 147-154.
79. **Holzbauer M, Racke K.** The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Med Biol*, 1985; 63: 97-116.
80. **Goldsmith PC, Cronin MJ, Weiner RI.** Dopamine receptor sites in the anterior pituitary. *J Histochem Cytochem*, 1979; 27: 1205.
81. **Brown GM, Seeman P, Lee T.** Dopamine/neuroleptic receptors in basal hypothalamus and pituitary. *Endocrinology*, 1976;99: 1407-1410.
82. **Moriarty CM.** Role of the calcium in the regulation of adeno-hypophysal hormone release. *Life Sci*, 1978; 23: 185-194.
83. **Wakabayashi K, Arimura A, Schally A.** Different effect of potassium and calcium ion on the release of growth hormone and prolactin from isolated rat pituitary in vitro. *Endocrinology*, 1972; 59: 69-73.
84. **Knoepfmacher M, Villares SM, Nicolau W, Germek OO, Lerario AC, Wajchenberg BL, Liberman B.** Calcium and prolactin secretion in humans: effects of the channel blocker, verapamil, in the spontaneous and drug-induced hyperprolactinemia. *Horm Metab Res*, 1994; 26 (10): 481-485.
85. **Patel YC, Srikant CB.** Somatostatin mediation of adeno-hypophysal secretion. *Annu Rev Physiol*, 1986; 48: 551-567.
86. **Reichlin S.** Somatostatin. *N Engl J Med*, 1984;309: 910.
87. **Vale W, River C, Brazeau P, Gullemin R.** Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin. *Endocrinology*, 1974; 95: 968-977.
88. **Epelbaum J, Enjalbert A, Krantic S, Musset F, Bertrand P, Rasolonjanahary R, Shu C, Kordon C.** Somatostatin receptors on pituitary somatotrophs, thyrotrophs and lactotrophs: pharmacological evidence for loose coupling to adenylate cyclase. *Endocrinology*, 1987;121: 2177-2185.
89. **Enjalbert A, Bertrand P, Le Dafiniet M, Epelbaum J, Hugues JN, Kordon C, Moysse E, Pellion F, Shu C.** Somatostatin and regulation of prolactin secretion. *Physioneuroendocrinology*, 1986; 11: 155-165.
90. **Sibilia V, Netti C, Guidobono F, Cazzamalli E, Pecile A.** Effect of calcitonin gene-related peptide on prolactin secretion. *Pharmacol Res*, 1989; 21: 97-98.
91. **Morel G, Chabot JG, Enjalbert A, Priam M, Dubois PM.** Evidence for direct action of calcitonin in the rat pituitary gland. *Acta Endocrinol*, 1989; 120: 682-688.
92. **Xue-Zhang Q, Stanley SM, Shah GV.** Calcitonin inhibits prolactin gene transcription in rat pituitary cells. *Endocrine*, 1995, 3:445-451.
93. **Shah GV, Wang W, Grosvenor C, Crowley WR.** Calcitonin inhibits basal and thyrotropin-releasing hormone induced release of prolactin from anterior pituitary cells: evidence for selective action exerted proximal to secretagogue-induced increases in cytosolic Ca^{2+} . *Endocrinology*, 1990;127: 621-628.
94. **Elie C, Moukhtar MS, Milhaud G, Cressent M.** Hypoprolactinemic effect of calcitonin gene-related peptide in the rat. *Neuropeptides*, 1990; 16: 109-113.
95. **Judd AM, Kubota T, Kuan SI, Jarvis WD, Spangelo BL, MacLeod RM.** Calcitonin decreases thyrotropin-releasing hormone-stimulated prolactin release

- through a mechanism that involves inhibition of inositol phosphate production. *Endocrinology*, 1990, 127: 191-199.
96. **Milenkovic L, Parlow AF, McCann SM.** Physiological significance of the negative short-loop feedback of prolactin. *Neuroendocrinology*, 1990; 52: 389-392.
 97. **Gudelsky GA, Porter JC.** Release of dopamine from tuberoinfundibular neurons into pituitary stalk blood after prolactin or haloperidol administration. *Endocrinology*, 1980; 106: 526-529.
 98. **Demarest KT, Riegler GD, Moore KE.** Hypoprolactinemia induced by hypophysectomy and long-term bromocriptine treatment decreases tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and the responsiveness of these neurons to prolactin. *Neuroendocrinology*, 1985; 40: 369-376.
 99. **Arbogast LA, Voogt JL.** Prolactin (PRL) receptors are colocalized in dopaminergic neurons in fetal hypothalamic cell cultures: effect of PRL on tyrosine hydroxylase activity. *Endocrinology*, 1997; 138: 3016-3023.
 100. **Tashjian AHJ, Barowsky NJ, Jensen DK.** Thyrotropin releasing hormone: direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 1971; 43: 516-523.
 101. **Bowers CY, Friesen HG, Hwang P, Guyda HJ, Folkers K.** Prolactin and thyrotropin release in man by synthetic pyroglutamyl-histidyl-prolinamide. *Biochem Biophys Res Commun*, 1971; 45: 1033-1041.
 102. **Hinkle PM, Tashjian AHJ.** Receptors for thyrotropin-releasing hormone in prolactin producing rat pituitary cells in culture. *J Biol Chem*, 1973; 248: 6180-6186.
 103. **Fomina AF, Levitan ES.** Control of Ca²⁺ channel current and exocytosis in rat lactotrophs by basally active protein kinase C and calcineurin. *Neuroscience*, 1997;78: 523-531.
 104. **Riskind PN, Millard WJ, Martin JB.** Evidence that thyrotropin-releasing hormone is not a major prolactin-releasing factor during suckling in the rat. *Endocrinology*, 1984; 115: 312-316.
 105. **Martinez De La Escalera G, Weiner RI.** Transient dopamine withdrawal differentially potentiates thyrotropin-releasing hormone-induced release of prolactin of various ages. *Neuroendocrinology*, 1990;51: 694-699.
 106. **Gibbs DM.** High concentrations of oxytocin in hypophysial portal plasma. *Endocrinology*, 1984; 114: 1216-1218.
 107. **Samson WK, Lumpkin MD, McCann SM.** Evidence for physiological role for oxytocin in the control of prolactin. *Endocrinology*, 1986; 119: 554-561.
 108. **Lumpkin MD, Samson WK, McCann SM.** Hypothalamic and pituitary sites of action of oxytocin to alter prolactin secretion in the rat. *Endocrinology*, 1983; 112: 1711-1718.
 109. **Arey BJ, Freeman ME.** Oxytocin, vasoactive intestinal peptide and serotonin regulate the mating-induced surges of prolactin secretion in the rat. *Endocrinology*, 1990; 126: 279-284.
 110. **Greer ER, Caldwell JD, Johnson MF, Prange AJ, Pedersen CA.** Variations in concentration of oxytocin and vasopressin in the paraventricular nucleus of the hypothalamus during the estrous cycle in rats. *Life Sci*, 1986;38: 3211-2318.

111. **Zimmerman EA, Carmel PW, Husain MK, Ferin M, Tannenbaum M, Frantz AG, Robinsons AG.** Vasopressin and neurophysin: high concentrations in monkey hypophyseal portal blood. *Science*, 1973; 182: 925-927.
112. **Antoni FA.** Novel ligand specificity of pituitary vasopressin receptors in the rat. *Neuroendocrinology*, 1984; 39: 186-188.
113. **Valverde RC, Chieffo V, Reichlin S.** Prolactin releasing factor in porcine and rat hypothalamic tissue. *Endocrinology*, 1972;91: 982-993.
114. **Shin SH.** Vasopressin has a direct effect on prolactin release in male rats. *Neuroendocrinology*, 1982;34: 55-58.
115. **Said SI, Mutt V.** Polypeptide with broad biological activity in the porcine small intestine. *Science*, 1970;169: 1217-1218.
116. **Dalcik H, Phelps CJ.** Median eminence-afferent vasoactive intestinal peptide (VIP) neurons in the hypothalamus: localization by simultaneous tract tracing immunocytochemistry. *Peptides*, 1993; 14: 1059-1066.
117. **Mezey E, Kiss JZ.** Vasoactive intestinal peptide-containing neurons in the paraventricular nucleus may participate in regulating prolactin secretion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985; 82: 245-247.
118. **Kato Y, Iwasaki Y, Iwasaki J, Abe H, Yanaihara N, Imura H.** Prolactin release by vasoactive intestinal peptide in rats. *Endocrinology*, 1978;103: 554-558.
119. **Shaar CJ, Clemens JA, Dininger NB.** Effect of vasoactive intestinal polypeptide on prolactin release in vitro. *Life Sci*, 1979;25: 2071-2074.
120. **Shimatsu A, Kato Y, Ohta H, Toyo K, Kabayama Y, Inoue T, Yanaihara N, Imura H.** Involvement of hypothalamic vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in prolactin secretion induced by serotonin in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1984; 175: 414-416.
121. **Abe H, Engler D, Molitch ME, Bollinger-Gruber J, Reichlin S.** Vasoactive intestinal peptide is a physiological mediator of prolactin release in the rat. *Endocrinology*, 1985; 116: 1383-1390.
122. **Nagy G, Mulchahey JJ, Neill JD.** Autocrine control of prolactin secretion by vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology*, 1988; 122: 364-366.
123. **Deschepper CF.** The renin angiotensin system in the pituitary gland. *Trends Endocrinol Metab*, 1991; 2: 104-107.
124. **Kakar SS, Sellers JC, Devor DC, Musgrove LC, Neill JD.** Angiotensin II type-1 receptor subtype DNAs: differential tissue expression and hormonal regulation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992; 183: 1090-1096.
125. **Aguilera G, Hyde CL, Catt KJ.** Angiotensin II receptors and prolactin release in pituitary lactotrophs. *Endocrinology*, 1982, 111: 1045-1050.
126. **Canonico PL and MacLeod RM** Angiotensin peptides stimulate phosphoinositide breakdown and prolactin release in anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology*, 1986; 118: 223-228.
127. **Diaz-Torga D, Gonzalez-Iglesias A, Achaval-Zaia R, Libertun C, Becu-Villalobos D.** Angiotensin II-induced Ca²⁺ mobilization and prolactin release in normal and hyperplastic pituitary cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1998; 274: 534-540.

128. **Diaz-Torga G, Becu-Villalobos D and Libertun C.** Ontogeny of angiotensin-induced prolactin release in vivo and in vitro in female and male rats. *Neuroendocrinology*, 1994; 59: 57-62.
129. **Calogero AE, Bagdy G, Burrello N, Polosa P, D Agata R.** Role of serotonin₃ receptors in the control of adrenocorticotrophic hormone release from rat pituitary cell cultures. *Eur J Endocrinol*, 1995; 133:251-254.
130. **Lamberts SW, McLeod RM.** The interaction of the serotonergic and dopaminergic systems on prolactin secretion in the rat. The mechanism of action of the „specific“ serotonin receptor antagonist, methysergide. *Endocrinology*, 1978; 103: 287-295.
131. **Lu KH, Meittes J.** Effects of serotonin precursors and melatonin on serum prolactin release in rats. *Endocrinology*, 1973; 93:152-155.
132. **Kato Y, Nakai Y, Imura H, Chihara K, Ogo S.** Effect of 5-hydroxytryptophan (5-HTP) on plasma prolactin levels in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 1974; 38: 695-697.
133. **Kordon C, Blake CA, Terkel J, Sawyer CH.** Participation of serotonin-containing neurons in the suckling-induced rise in plasma prolactin levels in lactating rats. *Neuroendocrinology*, 1973; 13:213-223.
134. **Gallo RV, Rabii J, Moberg GP.** Effect of methysergide, a blocker of serotonin receptors, on plasma prolactin levels in lactating and ovariectomized rats. *Endocrinology*, 1975; 97: 1096-1105.
135. **Pilotte NS, Porter JC.** Dopamine in hypophysial portal plasma and prolactin in systemic plasma of rats treated with 5-hydroxytryptamine. *Endocrinology*, 1981; 108: 2137-2141.
136. **Matsushita N, Kato Y, Katakami H, Shimatsu A, Imura H.** Inhibition of naloxone of prolactin release induced by 5-hydroxytryptophan in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1981; 168: 282-285.
137. **Arey BJ, Freeman ME.** Activity of oxytocinergic neurons in the paraventricular nucleus mirrors the periodicity of the endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion. *Endocrinology*, 1992; 130(1): 126-32.
138. **Lookingland KJ, Gunnert JW, Moor KE.** Stress-induced secretion of alpha-melanocyte-stimulating hormone is accompanied by a decrease in the activity of tuberohypophysial dopaminergic neurons. *Neuroendocrinology*, 1991; 53:91-96.
139. **Xu RK, McCann SM.** Differential effects of naloxone on basal and stress-induced release of ACTH and prolactin in the male rat. *Life Sci*, 1989; 45: 1591-1599.
140. **Samson WK, McDonald JK, Lumpkin MD.** Naloxone-induced dissociation of oxytocin and prolactin releases. *Neuroendocrinology*, 1985; 40:68-71.
141. **Ieiri T, Chen HT, Campbell GA, Meites J.** Effects of naloxone and morphine on the proestrous surge of prolactin and gonadotropins in the rat. *Endocrinology*, 1980; 106: 1568-1570.
142. **Ruberg M, Enjalbert A, Arancibia S, Kordon C.** Regulation of prolactin secretion at the pituitary level. *Exp Brain Res Suppl*, 1981; 3: 182-199.
143. **Olive D.** Indications for hyperprolactinemia therapy. *J Reprod Med*, 1999; 44(12): 1091-4.

144. **Mancini T, Casanueva FF, Giuistina A.** Hyperprolactinemia and prolactinomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2008; 37(1): 67-99.
145. **Scarborough K, Weiland NG, Larson GH, Sortino MA, Chiu SF, Hirshfield AN, Wise PM.** Measurement of peptide secretion and gene expression in the same cell. *Mol Endocrinol*, 1991; 5: 134-142.
146. **Grosvenor CE, Whitworth N.** Evidence for a steady rate of secretion of prolactin following suckling in the rat. *J Dairy Sci*, 1974; 57: 900-904.
147. **Nagy GM, Demaria JE, Freeman ME.** Changes in the local metabolism of dopamine in the anterior and neural lobes but not in the intermediate lobe of the pituitary gland during nursing. *Brain Res*, 1998; 790: 315-317.
148. **Lookingland KJ, Gunnet JW, Toney TW, Moore KE.** Comparison of the effects of ether and restraint stress on the activity of tuberoinfundibular dopaminergic neurons in female and male rats. *Neuroendocrinology*, 1990; 52: 99-105.
149. **Vaha-Eskeli K, Erkkola R, Irjala K, Vinamaki O.** Effect of thermal stress on serum prolactin, cortisol and plasma arginine vasopressin concentration in the pregnant and non-pregnant state. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1991; 42:1-8.
150. **Carlson DE, Klemcke HG, Gann DS.** Response of prolactin to hemorrhage is similar to that of adrenocorticotropin in swine. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 1990; 258: 645-649.
151. **Huhman KL, Mougey EH, Moore TO, Meyerhoff JL.** Stressors, including social conflict, decrease plasma prolactin in male golden hamsters. *Horm Behav*, 1995; 29:581-592.
152. **Pieper DR, Gala RR.** The effect of light on the prolactin surges of pseudopregnant and ovariectomized, estrogenized rats. *Biol Reprod*, 1979; 20:727-732.
153. **Terkel J, Damassa DA, Sawyer CH.** Ultrasonic cries from infant rats stimulate prolactin release in lactating mothers. *Horm Behav*, 1979; 12:95-102.
154. **Mena F, Grosvenor CE.** Release of prolactin in rats by exteroceptive stimulation: sensory stimuli involved. *Horm Behav*, 1971; 2: 107-116.
155. **Morita A, Meyer FB, Laws ER Jr.** Symptomatic pituitary metastases. *J Neurosurg*, 1998; 89 (1): 69-73.
156. **Ko JC, Yang PC, Huang TS, Yeh KH, Kou SH, Luh KT.** Panhypopituitarism caused by solitary parasellar metastasis from lung cancer. *Chest*, 1994; 105 (3): 951-953.
157. **Imura H, Nakao K, Shimatsu A.** Lymphocytic infundibuloneurohypophysitis as a cause of central diabetes insipidus. *N Engl J Med*, 1993; 329: 683-689.
158. **Kahn SR, Leblanc R, Sadikot AF, Fantus IG.** Marked hyperprolactinemia caused by carotid aneurysm. *Can J Neurol Sci*, 1997; 24(1): 64-6.
159. **Slaba S, Medlej R, Smayra T, Zafatayeff S, Nohra G, Okais N, Halaby G.** Endocrinologic recovery after treatment of an intrasellar aneurysm. *J. Med Liban*, 2000; 48 (5): 333-7.
160. **Suzuki H, Muramatsu M, Murao K, Kawaguchi K, Shimizu T.** Pituitary apoplexy caused by ruptured internal carotid artery aneurysm. *Stroke*, 2001; 32 (2): 567-570.

161. **Luciano AA.** Clinical presentation of hyperprolactinemia. *J Reprod Med*, 1999; 44(12): 1085-90.
162. **Vance ML.** Hypopituitarism. *N Engl J Med*, 1994; 322: 966-967.
163. **Annegers JFF, Coulam CB, Laws ER.** Pituitary tumors:epidemiology. In:Givens JR, ed. *Hormone-secreting pituitary tumors*. Chicago: Year Book Medical Publishers, 1982; 393-403.
164. **Drange MR, Fram NR, Herman-Bonert V, Melmed S.** Pituitary tumor registry: a novel clinical resource. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000; 85 (1): 168-174.
165. **Molitch ME.** Pituitary incidentalomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1997; 26: 725-740.
166. **Snyder PJ.** Gonadotroph and other clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Cancer Treat Res*, 1997; 89: 57-72.
167. **Lees PD, Fahlbusch R, Zrinzo A, Pickard JD.** Intracellular pituitary tissue pressure, tumour size and endocrine status-an international comparison in 107 patients. *Br J Neurosurg*, 1994; 8: 313-318.
168. **Frawley LS, Boockfor FR.** Mammotrophs: presence and functions in normal and neoplastic pituitary tissue. *Endocr Rev*, 1991; 12: 337-355.
169. **Takatsugi K, Komuta K, Hosen N, Kitada S, Iida S, Nishihara K, Kimura R, Maeda K, Igarashi T.** Metastasis of small cell lung cancer to the parotid gland as the initial clinical manifestation, followed by metastases too the pituitary gland and lumber spinal cord. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*, 1998; 36 (3): 246-250.
170. **Aaberg TM Jr, Kay M, Sternau L.** Metastatic tumors to the pituitary. *Am J Ophthalmol*, 1995; 119 (6): 779-785.
171. **Cannavo S, Curto L, Venturino M, Squadrito S, Almoto B, Narbone MC, Rao R, Trimarchi F.** Abnormalities of hypothalamic-pituitary-thyroid axis in patients with primary empty sella. *J Endocrinol Invest*, 2002; 25 (3): 236-239.
172. **Paulose KP, Usha R.** Empty sella syndrome presenting as galactorrhoea. *J Assoc Physicians India*, 2000; 48 (12): 1205-1207.
173. **Dickerman RD, Jaikumar S.** Secondary partial empty sella syndrome in an elite bodybuilder. *Neurol Res*, 2001; 23 (4): 336-8.
174. **Cheung CC, Ezzat S, Smyth HS, Asa SL.** The spectrum and significance of primary hypophysitis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86 (3): 1048-1053.
175. **Sautner D, Saeger W, Lüdecke DK, Jansen V, Puchner MJA.** Hypophysitis in surgical and autoptical specimens. *Acta Neuropathol (Berl)*, 1995; 90: 637-644.
176. **Sato N, Szem G, Kim JH.** Cystic pituitary mass in neurosarcoidosis. *Am J Neuroradiol*, 1997; 18: 1182-1185.
177. **Lohr KM, Ryan LM, Toohill RJ, Anderson T.** Anterior pituitary involvement in Wegener's granulomatosis. *J Rheumatol*, 1988; 15: 855-861.
178. **Toth M, Szabo P, Racz K.** Granulomatous hypophysitis associated with Takayasu's disease. *Clin Endocrinol*, 1996; 45: 499-503.
179. **De Bruin WI, van't Verlaat JW, Graamans K, De Bruin TWA.** Sellar granulomatous mass in a pregnant woman with active Crohn's disease. *Neth J Med*, 1991; 39: 136-141.

180. **Schmitt S, Wichmann W, Martin E, Zachmann M, Schoenle EJ.** Primary stalk thickening with diabetes insipidus preceding typical manifestations of Langerhans cell histiocytosis in children. *Eur J Pediatr*, 1993; 152: 399-401.
181. **Chaieb L, Chadli-Chaieb M, Chaieb A, Zebidi A, Allegue M.** Primary amenorrhea-galactorrhea with hyperprolactinemia and huge pituitary enlargement in juvenile primary hypothyroidism. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 1992; 46 (2-3): 159-162.
182. **Abram M, Brue T, Morange I, Girard N, Guibout M, Jaquet P.** Pituitary tumor syndrome and hyperprolactinemia in peripheral hypothyroidism. *Ann Endocrinol*, 1992; 53 (5-6): 215-223.
183. **Kroese JM, Grootendorst AF, Schelfhout LJ.** Postpartum amenorrhea-galactorrhea associated with hyperprolactinemia and pituitary enlargement in primary hypothyroidism. *Neth J Med*, 2004; 62 (1): 28-30.
184. **Morley JE, Dawson M, Hodgkinson H, Kalk WJ.** Galactorrhea and hyperprolactinemia associated with chest wall injury. *J Clin Endocrinol Metab*, 1977; 45: 931-935.
185. **Boyd AE 3d, Spare S, Bower B, Reichlin S.** Neurogenic galactorrhea-amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab*, 1978; 47: 1374-1377.
186. **Pritchard PB 3rd.** The effect of seizures on hormones. *Epilepsia*, 1991; 32 (6): 46-50.
187. **Bauer J, Stefan H, Schrell U.** Serum prolactin concentrations and epilepsy: a study comparing patients in presurgical evaluation with healthy persons and circadian with seizure related variations. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*, 1992; 241: 365-71.
188. **Bauer J.** Epilepsy and prolactin in adults: a clinical review. *Epilepsy Res*, 1996; 24: 1-7.
189. **Meltzer HY, Fang VS.** The effect of neuroleptics on serum prolactin in schizophrenic patients. *Arch Gen Psych*, 1976; 33: 279-286.
190. **Crawford AM, Beasley CM, Tollefson GD.** The acute and long-term effect of olanzapine compared with placebo and haloperidol on serum prolactin concentrations. *Schizophrenia Res*, 1997; 26: 41-54.
191. **Green AL, Brown WA.** Prolactin and neuroleptic drugs. *Endocrinol Metab Clin of North America*, 1988; 17:213-223.
192. **Turkington RW.** Prolactin secretion in patients treated with various drugs. *Arch Int Med*, 1972; 130: 349-354.
193. **Wistedt B, Wiles D, Kolakowska T.** Slow decline of plasma drug and prolactin levels after discontinuation of chronic treatments with depot neuroleptics. *Lancet*, 1981, i, 1163.
194. **Freedman R.** Schizophrenia. *N Engl J Med*, 2003; 349 (18): 1738-1749.
195. **Wieck A, Haddad PM.** Antipsychotic-induced hyperprolactinemia in women: pathophysiology, severity and consequences. *B J Psych*, 2003; 182: 199-204.
196. **Kane J, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H.** Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. *Arch Gen Psychiatry*, 1988; 45(9): 789-796.

197. **Kapur S, Seeman P.** Does fast dissociation from the dopamine D2 receptor explain the action of atypical antipsychotics? A new hypothesis. *Am J Psych*, 2001; 158: 360-369.
198. **Meltzer HY, Goode DJ, Schyve PM.** Effect of clozapine on human serum prolactin levels. *American J Psych*, 1979; 136: 1550-1555.
199. **Tollefson GD, Kuntz AJ.** Review of recent clinical studies with olanzapine. *B J Psych*, 1999; 174(37): 30-35.
200. **Kleinberg DL, Davis JM, De Coster R.** Prolactin levels and adverse effects in patients treated with risperidon. *J Clin Psychopharmacol*, 1999; 19: 57-61.
201. **Gruender G, Wetzel H, Schloesser R.** Neuroendocrine response to antipsychotich: effect of drug type and gender. *Biol Psych*, 1999; 45: 89-97.
202. **Tonini M, Cipollina L, Poluzzi E, Cremas F, Corazzas GR, De Ponti F.** Review article: clinical implications of enteric and central D2 receptor blocade by antidopaminergic gastrointestinal prokinetics. *Aliment Pharmacol Ther*, 2004; 19: 379-390.
203. **Willems JL, Baylaert WA, Lefebvre RA, Bogaert MG.** Neuronal dopamine receptors on autonomic ganglia and sympathetic nerves and dopamine receptors in the gastrointestinal system. *Pharmacol Rev*, 1985; 37: 165-216.
204. **Mitchelson F.** Pharmacological agents affecting emesis. A review (Part I). *Drugs*, 1992; 43:295-315.
205. **Maddern GJ.** Galactorrhoea due to domperidone. *Med J Aust*, 1983; 2: 539-540.
206. **Haddad P, Wieck A.** Antidepressant-induced hyperprolactinemia. *J Psychopharmacol*, 2000; 14(3): A28.
207. **Emiliano AB, Fudge JL.** From galactorrhea to osteopenia: rethinking serotonin-prolactin interactions. *Neuropsychopharmacology*, 2004; 29 (5): 833-46.
208. **Dubovsky SL.** Beyond the serotonin reuptake inhibitors: rationales for the development of new serotonergic agents. *J Clin Psychiatry*, 1994; 55: 34-44.
209. **Peterson MC.** Reversible galactorrhea and prolactin elevation related to fluoxetine use. *Mayo Clin Proc*, 2001; 76: 215-216.
210. **Morrison J, Remick RA, Leung M, Wrixon KJ, Bebb RA.** Galactorrhea induced by paroxetine. *Can J Psychiatry-Rev Can Psychiatrie*, 2001; 46: 88-89.
211. **Petit A, Piednoir D, Germain ML, Trenque T.** Hyperprolactinemies d origine medicamenteuse: etude cas/non-cas dans la banque nationale de pharmacovigilance. *Therapie*, 2003; 58: 159-163.
212. **Greenspan DG.** Hypothalamus and pituitary. *Basic and Clinical Endocrinology*, eighth edition, a Lange medical book/ McGraw-Hill: 131-156.
213. **Schaufele F.** Regulation of estrogen receptor activation of the prolactin enhancer/promoter by antagonistic activation function-2-interacting proteins. *Mol Endocrinol*, 1999; 13:935-945.
214. **Lam KS, Srivastava G, Lechan RM, Lee T, Reichlin S.** Estrogen regulates the gene expression of vasoactive intestinal peptide in the anterior pituitary. *Neuroendocrinology*, 1990; 52: 417-421.
215. **Shughrue PJ, Dellovade TL, Merchenthaler I.** Estrogen modulates oxytocin gene expression in regions of the rat supraoptic and paraventricular nuclei that contain estrogen receptor-beta. *Progr Brain Res*, 2002; 139: 15-29.

216. **Kelley SR, Kamal TJ, Molitch ME.** Mechanism of verapamil calcium channel blockade-induced hyperprolactinemia. *Am J Physiol*, 1996; 270 (1Pt 1): 96-100.
217. **Hutchinson J, Murphy M, Harries R, Skinner CJ.** Galactorrhoea and hyperprolactinemia associated with protease-inhibitors. *Lancet*, 2000; 33356 (9234): 1003-4.
218. **Sluijmer AV, Lappöhn RE.** Clinical history and outcome of 59 patients with idiopathic hyperprolactinemia. *Fertil Steril*, 1992; 58: 72-77.
219. **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: 438-445.
220. **Vallettee-Kasic S, Morange -Ramos I, Selim A, Gunz G, Morange S, Enjalbert A, Martin PM, Jaquet P, Brue T.** Macroprolactinemia revisited: a study on 106 patients. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002; 87: 581-588.
221. **Devito WJ.** Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: effects of hypophysectomy and intraventricular administration of colchicine. *Neuroendocrinology*, 1988; 47: 284- 289.
222. **Walters CA, Daly DC, Chapitis J, Kuslis ST, Prior JC, Kusmik WF, Riddick DH.** Human myometrium: a new potential source of prolactin. *Am J Obstet Gynecol*, 1983; 147: 639-644.
223. **Institute of Medicine Standing Committee on the Scientific Evaluation of Dietary Reference Intakes Food and Nutrition Board.** Dietary Reference Intakes for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride. Washington, DC, National Academy Press, 1997.
224. **Wang L, Nancollas GH, Henneman ZJ.** Nanosized particles in bone and dissolution insensitivity of bone mineral. *Biointerphases*, 2006; 1: 106-111.
225. **Campbell AK.** Calcium as an intracellular regulator. *Proc Nutr Soc*, 1990; 49: 51-56.
226. **Bootman BD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, Mac-Kenzie L, De Smet P, Travers M, Tovey SC, Seo JT, Berridge MJ, Ciccolini F, Lipp P.** Calcium signaling- An overview. *Semin Cell Dev*, 2001; 12:3-10.
227. **Robertson WG, Marshall RW.** Calcium measurements in serum and plasma – Total and ionized. *CRC Crit Rev Clin Lab Sci*, 1979; 11: 271-304.
228. **Lu PW, Briody JN, Ogle GD, Morley K, Humphries IR, Allen J, Howman-Giles R, Sillence D, Cowell CT.** Bone mineral density of total body, spine, and femoral neck in children and young adults: A cross-sectional and longitudinal study. *J Bone Miner Res*, 1994; 9: 1451-1458.
229. **Bailey DA, Martin AD, McKay HA, Whiting S, Mirwald R.** Calcium accretion in girls and boys during puberty: A longitudinal analysis. *J Bone Miner Res*, 2000; 15: 2245-2250.
230. **Teegarden D, Proulx WR, Martin BR, Zhao J, McCabe GP, Lyle RM, Peacock M, Slemenda C, Johnston CC, Weaver CM.** Peak bone mass in young women. *J Bone Miner Res*, 1995; 10: 711-715.
231. **Deftos LJ.** Bone protein and peptide assays in the diagnosis and management of skeletal disease. *Clin Chem*, 1991; 37(7): 1143-1148.

232. **Harris H.** The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. *Clin Chem Acta*, 1989; 186: 133-150.
233. **Deftos LJ, Glowacki J.** Mechanisms of bone metabolism (Review). *Pathophysiology*, 3rd ed. Philadelphia: JB Lippincott Co, 1984; 445-468.
234. **Price PA.** New bone markers. (Review). *Triangle*, 1988; 27: 21-26.
235. **Maillard C, Berruyer M, Serre CM, Dechavanne M, Delmas PD.** Protein-S, vitamin K-dependent protein, is a bone matrix component synthesized and secreted by osteoblasts. *Endocrinology*, 1992; 130: 1599-1604.
236. **Bugel S.** Vitamin K and bone health in adult humans. *Vitam Horm*, 2008; 78: 393-416.
237. **Gundberg CM, Weinstein RS.** Multiple immunoreactive forms of osteocalcin in uremic serum. *J Clin Invest*, 1986; 77: 1762-1767.
238. **Delmas PD, Demiaux B, Malaval L, Chapuy MC, Meunier PJ.** Serum bone GLA-protein is not a sensitive marker of bone turnover in Paget's disease of bone. *Calcif Tissue Int*, 1986; 38: 60-61.
239. **Garrel DR, Delmas PD, Malavel L, Tourniaire J.** Serum bone Gla protein: a marker of bone turnover in hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 1986; 62: 1052-1055.
240. **Mizunashi K, Furukawa Y, Miura R, Yumita S, Sohn HE, Yoshinaga K.** Effect of active vitamin D3 and parathyroid hormone on the serum osteocalcin in idiopathic hypoparathyroidism and pseudohypoparathyroidism. *J Clin Invest*, 1988; 82: 861-865.
241. **Als OS, Riis BJ, Gotfredsen A, Christiansen C, Deftos LJ.** Biochemical markers of bone turnover in reumatoid arthritis: relation to anti-inflammatory treatment, sex, and menopause. *Arch Intern Med*, 1986; 219: 209-213.
242. **Bonnick SL, Shulman L.** Monitoring osteoporosis therapy: bone mineral density, bone turnover markers, or both? *Am J Med*, 2006; 119: 25-31.
243. **Rodin A, Duncan A, Quartero WP.** Serum concentrations of alkaline phosphatase isoenzymes and osteocalcin in normal pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 1989; 68: 1123-1127.
244. **Nielsen HK, Brixen K, Bouillon R, Mosekilde L.** Changes in biochemical markers of osteoblastic activity during the menstrual cycle. *J Clin Metab*, 1990; 70: 1431-1437.
245. **Price PA, Parthemore JG, Deftos LJ.** New biochemical marker for bone metabolism. Measurement by radioimmunoassay of bone Gla protein in the plasma of normal subjects and patients with bone disease. *J Clin Inves*, 1980; 66: 878-883.
246. **Ebeling PR, Peterson JM, Riggs BL.** Utility of type I procollagen propeptide assays for assessing abnormalities in metabolic bone diseases. *J Bone Miner Res*, 1992; 7: 1243-1250.
247. **Black DM, Greenspan SL, Ensrud KE, Palermo L, McGowan JA, Lang TF.** The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*, 2003; 349: 1207-1215.
248. **Uebelhart D, Schlemmer A, Johansen JS.** Effect of menopause and hormone replacement therapy on the urinary excretion of pyridinium cross-links. *J Clin Endocrinol Metab*, 1991; 72: 367-373.

- 249. Alatalo SB, Ivaska KK, Waguespack SG, Econs MJ, Vaananen HK, Halleen MJ.** Osteoclast-derived serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in Albers-Schonberg disease (type 2 autosomal dominant osteopetrosis). *Clin Chem*, 2004; 50: 883-890.
- 250. Watts NB.** Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clin Chem*, 1999; 45: 1359-1368.
- 251. Terpos E, Politou M, Rahemtulla A.** The role of markers of bone remodeling in multiple myeloma. *Blood Rev*, 2005; 19: 125-142.
- 252. Ju HS, Leung S, Brown B.** Comparison of analytical performance and biological variability of three bone resorption assays. *Clin Chem*, 1997; 43:1570-1576
- 253. Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM.** Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev*, 1996; 17: 333-368.
- 254. Peacock M.** Calcium metabolism in health and disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2010; 5: 23-30.
- 255. Fleet JC.** Molecular regulation of calcium metabolism. In:Weaver CM, Heaney RP, editors. *Calcium in Human Health*. Humana Press, Totowa NJ, 2006; 163-190.
- 256. Potts JT, Gardella TJ.** Progress, paradox and potential: Parathyroid hormone research over five decades. *Ann NY Acad Sci*, 2007; 1117: 196-208.
- 257. Jurutka PW, Whitfield GK, Hsieh JC, Thompson PD, Haussler CA, Haussler MR.** Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression. *Rev Endocr Metab Disord*, 2001; 2: 203-216.
- 258. Brown EM.** The calcium-sensing receptor: physiology, pathophysiology and CaR-based therapeutics. *Subcell Biochem*, 2007 45: 139-167.
- 259. Fleet JC, Schoch RD.** Molecular mechanisms for regulation of intestinal calcium absorption by vitamin D and other Factors. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2010; 47(4): 181-195.
- 260. Zierold C, Mings JA, DeLuca HF.** Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-24-hydroxylase mRNA by 1,25-dihydroxyvitamin D3 and parathyroid hormone. *J Cell Biochem*, 2003; 88: 234-237.
- 261. Armbrecht HJ, Boltz MA, Hodam TL.** PTH increases renal 25(OH)D3-1alpha-hydroxylase (CYP1alpha) mRNA but not renal 1,25(OH)2D3 production in adult rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003; 284: 1032-1036.
- 262. Gentili C, Morelli S, de Boland AR.** Characterization of PTH/PTHrP receptor in rat duodenum: Effects of ageing. *J Cell Biochem*, 2003; 88: 1157-1167.
- 263. Nemere I, Szego CM.** Early action of parathyroid hormone and 1,25-dihydroxycholecalciferol on isolated epithelial cells from rat intestine. *Endocrinology*, 1981; 109: 2180-2187.
- 264. Picotto G, Massheimer V, Boland R.** Parathyroid hormone stimulates calcium influx and the cAMP messenger system in rat enterocytes. *Am J Physiol-Cell Physiol*, 1997; 42: 1349-1353.
- 265. Favus MJ, Walling MW, Kimberg DV.** Effects of dietary calcium restriction and chronic thyroparathyroidectomy on metabolism of (3H)25-hydroxyvitamin D3 and active transport of calcium by rat intestine. *J Clin Invest*, 1974; 53: 1139-1148.
- 266. Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW.** The nuclear vitamin D receptor:

- biological and molecular regulatory properties revealed. *J Bone Miner Res*, 1998; 13: 325-349.
267. **Chandra S, Fullmer CS, Smith CA, Wasserman RH, Morrison GH.** Ion microscopic imaging of calcium transport in the intestinal tissue of vitamin D-deficient and vitamin D-replete chickens: a ⁴⁴Ca stable isotope study. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 5715-5719.
 268. **Sheikh MS, Schiller LR, Fordtran JS.** In vivo intestinal absorption of calcium in humans. *Miner Electrolyte Metab*, 1990; 16: 130-146.
 269. **Pansu D, Bellaton C, Roche C, Bronner F.** Duodenal and ileal calcium absorption in the rat and effects of vitamin D. *Am J Physiol*, 1983; 244: 695-700.
 270. **Song Y, Peng X, Porta A, Takanaga H, Peng JB, Hediger MA, Fleet JC, Christakos C.** Calcium transporter 1 and epithelial calcium channel messenger ribonucleic acid are differentially regulated by 1,25dihydroxyvitamin D₃ in the intestine and kidney of mice. *Endocrinology*, 2003; 144: 3885-3894.
 271. **Abrams SA, Hicks PD, Hawthorne KM.** Higher serum 25-hydroxyvitamin D levels in school-age children are inconsistently with increased calcium absorption. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009; 94: 2421-2427.
 272. **Need AG, Nordin BE.** Misconceptions-vitamin D insufficiency causes malabsorption of calcium. *Bone*, 2008; 42: 1021-1024.
 273. **Heaney RP, Barger-Lux MJ, Dowell MS, Chen TC, Holick MF.** Calcium absorptive effects of vitamin D and its major metabolites. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997; 82: 4111-4116.
 274. **Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A.** Calcium absorption varies within reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr*, 2003; 22: 142-146.
 275. **Anderson PH, Hendrx I, Sawyer RK, Zarrinkalam R, Manavis J, Sarvestani GT, May BK, Morris HA.** Co-expression of CYP27B1 enzyme with the 1.5kb CYP27B1 promoter-luciferase transgene in the mouse. *Mol Cell Endocrinol*, 2008; 285: 1-9.
 276. **Balesaria S, Sangha S, Walters JR.** Human duodenum responses to vitamin D metabolites of TRPV6 and other genes involved in calcium absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009; 297: 1193-1197.
 277. **Pantazi H, Papapetrou PD.** Changes in parameters of bone and mineral metabolism during therapy for hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000; 85: 1099-1106.
 278. **Kumar V, Prasad R.** Thyroid hormones stimulate calcium transport systems in rat intestine. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2003; 1639: 185-194.
 279. **Mora S, Pitukcheewanont P, Nelson JC, Gilsanz V.** Serum levels of insulin-like growth factor I and the density, volume and cross-sectional area of cortical bone in children. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999; 84: 2780-2783.
 280. **Zoidis E, Gosteli-Peter M, Ghirlanda-Keller C, Meinel L, Zapf J, Schmid C.** IGF-1 and GH stimulate Phex mRNA expression in lungs and bones and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ production in hypophysectomized rats. *Eur J Endocrinol*, 2002; 146: 97-105.

281. **Fleet JC, Bruns ME, Hock JM, Wood RJ.** Growth hormone and parathyroid hormone stimulate intestinal calcium absorption in aged female rats. *Endocrinology*, 1994; 134: 1755-1760.
282. **Chen C Noland KA, Kalu DN.** Modulation of intestinal vitamin D receptor by ovariectomy, estrogen and growth hormone. *Mech Ageing Dev*, 1997; 99: 109-122.
283. **Fatayerji D, Mawer EB, Eastell R.** The role of insulin-like growth factor I in age-related changes in calcium homeostasis in man. *J Clin Endocrinol Metab*, 2000; 85: 4657-4662.
284. **Manolagas SC.** Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 2000; 21: 115-137.
285. **Hughes DE, Dai A, Tiffie JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF.** Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts by TGF-beta. *Nat Med*, 1996; 2:1132-1136.
286. **Qu Q, Perala-Heape M, Kapanen A, Dahllund J, Salo J, Vaananen HK, Harkonen P.** Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone*, 1998, 22: 201-209.
287. **Heaney RP, Recker RR, Saville PD.** Menopausal changes in bone remodeling. *J Lab Clin Med*, 1978; 92: 964-970.
288. **Gallagher JC, Riggs BL, DeLuca HF.** Effect of estrogen on calcium absorption and serum vitamin D metabolites in postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab*, 1980; 51: 1359-1364.
289. **Thomas ML, Xu X, Norfleet AM, Watson CS.** The presence of functional estrogen receptors in intestinal epithelial cells. *Endocrinology*, 1993; 132: 426-430.
290. **Ten Bolscher M, Netelenbos JC, Barto R, Van Buuren LM, Van der Vijgh WJ.** Estrogen regulation of intestinal calcium absorption in the intact and ovariectomized adult rat. *J Bone Miner Res*, 1999; 14: 1197-1202.
291. **Van Abel M, Hoenderop JG, van der Kemp AW, van Leeuwen JP, Bindels JR.** Regulation of the epithelial Ca²⁺ channels in small intestine as studied by quantitative mRNA detection. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003;285(1):G78-85.
292. **Bellido T, Jilka R, Boyce B, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple S, Murray R, Manolagas S.** Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis and bone mass by androgens, *J Clin Invest*, 1995; 95: 2886-2895.
293. **Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkison EJ, O'fallon WM, Eastell R, Khosla S.** Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest*, 2000; 106: 1553-1560.
294. **Vanderscheueren D, Bouillon R.** Androgens and bone. *Calcif Tiss Int*, 1995; 56: 341-346.
295. **Compston JE.** Sex steroids and bone. *Physiol Rev*, 2001; 81: 419-47.
296. **Orwoll ES, Klein RF.** Osteoporosis in men. *Endocr Rev*, 1995; 16: 87-116.
297. **Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, Riggs BL, Spelsberg TC.** Identification of androgen receptors in normal human osteoblasts-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 854-857.

298. **Mauras N, Haymond MW, Darmaun D, Vieira NE, Abrams SA, Yergey AL.** Calcium and protein kinetics in prepubertal boys. Positive effects of testosterone. *J Clin Invest*, 1994; 93: 1014-1019.
299. **Chen RY, Nordin BE, Need AG, Scopacasa F, Wishart J, Morris HA, Horowitz M.** Relationship between calcium absorption and plasma dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) in healthy males. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2008; 69(6):864-9.
300. **Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC.** Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest*, 1998; 102: 274-282.
301. **Weinstein RS.** Glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord*, 2001; 2:65-73.
302. **Espina B, Liang M, Rusell RG, Hulley PA.** Regulation of bcl-2 in glucocorticoid mediated osteoblast apoptosis. *J Cell Physiol*, 2008; 215: 488-496.
303. **Jia D, O'Brien CA, Stewart SA, Manolagas SC, Weinstein RS.** Glucocorticoids act directly on osteoclasts to increase their life span and reduce bone density. *Endocrinology*, 2006; 147: 5592-5599.
304. **Kim HJ, Zhao H, Kitaura H, Bhattacharyya S, Brewer JA, Muglia LJ, Ross FP, Teitelbaum SL.** Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast. *J Clin Invest*, 2006; 116: 2152-2160.
305. **Greenspan SL, Neer RM, Ridgway EC, Klibanski A.** Osteoporosis in men with hyperprolactinemic hypogonadism. *Ann Intern Med*, 1986; 104: 777-782.
306. **Klibanski A, Greenspan SL.** Increase in bone mass after treatment of hyperprolactinemic amenorrhea. *N Engl J Med*, 1986; 315: 542-546.
307. **Schlechte J, El-Khoury G, Kathol M, Walkner L.** Forearm and vertebral bone mineral in treated and untreated hyperprolactinemic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab*, 1987; 64: 1021-1026.
308. **Schlechte JA, Sherman B, Martin R.** Bone density in amenorrheic women with and without hyperprolactinemia. *J Clin Endocrinol Metab*, 1983; 56: 1120-1123.
309. **Biller BMK, Baum HBA, Rosenthal DI, Saxe VC, Charpie PM, Klibanski A.** Progressive trabecular osteopenia in women with hyperprolactinemic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab*, 1992; 75: 692-697.
310. **Zadrozna-Sliwka B, Bolanowski M, Kaluzny M, Syrycka J.** Bone mineral density and bone turnover in hyperprolactinemia of various origins. *Polish Journal of Endocrinology*, 2007; 58: 116-122.
311. **Adler RA, Farrell ME, Deiss WP, Krieg RJ, MacLeod RM.** Hypercalciuria in a new rat model of hyperprolactinemia. *Metabolism*, 1991; 40: 292-296.
312. **Baastrop PC, Christiansen C, Transbol I.** Calcium metabolism in schizophrenic patients on long-term neuroleptic therapy. *Neuropsychobiology*, 1980; 6:56-59.
313. **Dicson RA, Glazer WM.** Neuroleptic-induced hyperprolactinemia. *Schizophr Res*, 1999; 35: 75-86.

- 314. Halbreich U, Rojansky N, Palter S, Hreshchyshyn M, Kreeger J, Bakhai Y, Rosan R.** Decreased bone mineral density in medicated psychiatric patients. *Psychosomatic medicine*, 1995; 57: 485-491.
- 315. Haddad PM, Wieck A.** Antipsychotic-induced hyperprolactinemia: mechanisms, clinical features and management. *Drugs*, 2004; 64: 2291-2314.
- 316. Drinkwater BL, Chesnut CH 3rd.** Bone density changes during pregnancy and lactation in active women: a longitudinal study. *Bone Miner*, 1991; 14: 153-160.
- 317. Adler RA, Evani R, Mansouri A, Krieg RJ jr.** Relative effects of prolactin excess and estrogen deficiency on bone in rats. *Metabolism*, 1998; 47: 425-428.
- 318. Greenspan SL, Oppenheim DS, Klibanski A.** Importans of gonadal steroids to bone mass in men with hyperprolactinemic hypogonadism. *Ann Intern Med*, 1989; 110: 526-531.
- 319. VanHouten JN.** Maternal calcium and bone metabolism during lactation. *Reproductive Endocrinol*, 2005; 12: 477-482.
- 320. Robinson CJ, Spanos E, James MF, Pike JW, Haussler MR, Makeen AM, Hillyard CJ, Mac Intyre I.** Role of prolactin in vitamin-D metabolism and calcium-absorption during lactation in the rat. *J Endocrinol*, 1982; 94: 443-453.
- 321. Pahuja DN, DeLuca HF.** Stimulation of intestinal-calcium transport and bone-calcium mobilization by prolactin in vitamin -D-deficient rats. *Science*, 1981; 214: 1038-1039.
- 322. Krishnamra N, Taweerathitam P.** Acute effect of prolactin on active calcium absorption in rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 1995; 73: 1185-1189.
- 323. Tudpor K, Charoenphandhu N, Saengamart W, Krishnamra N.** Long-term prolactin exposure differentially stimulated the transcellular and solvent drag-induced calcium transport in the duodenum of ovariectomized rats. *Exp Biol Med*, 2005; 230: 836-844.
- 324. Cross NA, Hillman LS, Allen SH, Krause GF, Vieira NE.** Calcium homeostasis and bone metabolism during pregnancy, lactation and postweaning: a longitudinal study. *Am J Clin Nutr*, 1995; 61: 514-523.
- 325. Ritchie LD, Fung EB, Halloran BP, Turnlund JR, Van Loan MD, Cann CE, King JC.** A longitudinal study of calcium homeostasis during human pregnancy and lactation and after resumption of menses. *Am J Clin Nutr*, 1998; 67: 693-701.
- 326. Stojilkovic SS, Murano T, Gonzalez-Iglesias AE, Andric SA, Popovic MA, Van Goor F, Tomic M.** Multiple roles of Gi/o protein-coupled receptors in control of action potential secretion coupling in pituitary lactotrophs. *Ann NY Acad Sci*, 2009; 1152:174-86.
- 327. Vekemans M, Robyn C.** Influence on age on serum prolactin levels in women and men. *Br Med J*, 1975; 4: 738-739.
- 328. Koloszar S, Gellen J, Kovacs L.** The value of plasma prolactin level determination in the diagnosis of postmenopausal osteoporosis. *Orv Hetil*, 1997; 138: 71-73.
- 329. Roelfsema F, Pijl H, Keenan DM, Veldhuis JD.** Prolactin secretion in healthy Adults is Determined by Gender, Age and Body Mass Index. *PLoS One*, 2012; 7(8): e 31305.

- 330. Rehman HU, Masson EA.** Neuroendocrinology of ageing. Age and ageing, 2001; 30: 279-287.
- 331. Gregerman RI, Bierman EL.** Aging and hormones. In Williams RH ed. Textbook of Endocrinology, 5th edition, 1981; 1192.
- 332. Copinschi G, Van Cauter E.** Effects of ageing on modulation of hormonal secretions by sleep and circadian rhythmicity. Horm Res, 1995; 43: 20-24.
- 333. Morgan DG, May PC, Finch CE.** Dopamine and serotonin systems in human and rodent brain: effects of age and neurodegenerative disease. J Am Geriatr Soc, 1987; 35: 334-45.
- 334. Isidori AM, Strollo F, More M, Caprio M, Aversa A.** Leptin and ageing: correlation with endocrine changes in male and female healthy adult populations of different Body weights. J Clin Endocrinol Metab, 2000; 85: 1954-1962.
- 335. Bedard S, Sicotte B, St-Louis J, Brochu M.** Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction. J Physiol, 2005; 562 (3): 937-950.
- 336. Luippold G, Muhlbauer B.** Dopamine D2 receptors mediate glomerular hyperfiltration due to amino acids. J Pharmacol Exp Ther, 1998; 286: 1248-1252.
- 337. Luippold G, Schneider S, Stefanescu A, Benohr P, Muhlbauer B.** Dopamine D2-like receptors and amino acid induced glomerular hyperfiltration in humans. Br J Clin Pharmacol, 2001; 51: 415-421.
- 338. Kovacs CS, Kronenberg HM.** Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium and lactation. Endocrine Reviews, 1997; 18(6): 832-872.
- 339. Mahadevan S, Kumaravel V, Bharath R.** Calcium and bone disorders in pregnancy. Indian J Endocrinol Metab, 2012; 16(3): 358-363.
- 340. Rasmussen N, Frolich A, Hornnes PJ, Hegedus L.** Serum ionized calcium and intact parathyroid hormone levels during pregnancy and postpartum. Br J Obstet Gynecol, 1990; 97: 857-859.
- 341. Dahlman T, Sjoberg HE, Bucht E.** Calcium homeostasis in normal pregnancy and puerperium. A longitudinal study. Acta Obstet Gynecol Scand, 1994; 73: 393-398.
- 342. Garner SC, Peng TC, Toverud SU.** Modulation of serum parathyroid hormone and ionized calcium concentrations during reproduction in rats fed a low calcium diet. J Bone Mineral Res, 1988; 3: 319-323.
- 343. Boass A, Garner SC, Schultz VL, Toverud SU.** Regulation of serum calcitriol by serum ionized calcium in rats during pregnancy and lactation. J Bone Mineral Res, 1997; 12: 909-914.
- 344. Aydin H, Mutlu N, Akbas NB.** Treatment of major depression episode suppresses markers of bone turnover in premenopausal women. J Psychiatr Res, 2011; 45(10): 1316-20.
- 345. Yang J, Joe SH, Lee MS, Ko YH, Jung IK, Kim SH.** Effects of long-term combination treatment with valproate and atypical antipsychotics on bone mineral density and bone metabolism in premenopausal patients with bipolar disorder: a preliminary study. Psychiatry Investig, 2011; 8: 256-261.

- 346. Wyszogrodzka-Kucharska A, Rabe-Jablonska J.** Calcium balance regulation in schizophrenic patients treated with second generation antipsychotics. *Psychiatr Pol*, 2005; 39(6): 1157-71.
- 347. Razzaque MS.** Osteo-Renal Regulation of Systemic Phosphate Metabolism. *IUBMB Life*, 2011; 63(4): 240–247.
- 348. Howard L, Kirkwood G, Leese M.** Risk of hip fracture in patients with a history of schizophrenia. *Br J Psychiatry*, 2007; 190: 129-134.
- 349. Muench J, Hamer A.** Adverse effects of antipsychotic medications. *Am Family Physician*, 2010; 81:617-622.
- 350. Sabbagh Y, O' Brien SP, Song W, Boulanger JH, Stockmann A, Arbeeny C, Schiavi SC.** Intestinal Ntp2b plays a major role in phosphate absorption and homeostasis. *J Am Soc Nephrol*, 2009; 20: 2348-2358.
- 351. Arthur RS, Piraino B, Candib D, Cooperstein L, Chen T, West C, Puschett J.** Effect of low-dose calcitriol and calcium therapy on bone histomorphometry and urinary calcium excretion in osteopenic women. *Miner Electrolyte Metab.* 1990; 16:385–390.
- 352. Need AG, Nordin C, Horowitz M, Morris HA.** Calcium and calcitriol therapy in osteoporotic postmenopausal women with impaired calcium absorption. *Metabolism.* 1990; 39:53–54.
- 353. Jang HR, Lee JW, Kim S, Heo NJ, Lee JH, Kim HS, Jung JY, Oh YK, Na KY, Han JS, Joo KW.** High dose vitamin D3 attenuates the hypocalciuric effect of thiazide in hypercalciuric rats. *J Korean Med Sci*, 2010; 25: 1305-1312.
- 354. Valenzuela GI, Mienson LA, Tarboux NM, Farley JR.** Time-dependent changes in bone, placental, intestinal and hepatic alkaline phosphatase activities on serum during human pregnancy. *Clin Chem*, 1987; 33:1801-1806.
- 355. Gallacher SJ, Fraser WD, Owens OJ, Dryburgh FJ, Logue FC, Jenkins A, Kennedy J, Boyle IT.** Changes in calciotropic hormones and biochemical markers of bone turnover in normal human pregnancy. *Eur J Endocrinol*, 1994; 131: 369-374.
- 356. Lee TY, Chung MY, Chung HK, Choi JH, Kim TY, So HS.** Bone density in chronic schizophrenia with long-term antipsychotic treatment: preliminary study. *Psychiatry Investig*, 2010; 7: 278-284.
- 357. Herrán A, Amado JA, García-Unzueta MT, Vázquez-Barquero JL, Perera L, González-Macías J.** Increased bone remodeling in first-episode major depressive disorder. *PsychosomMed*, 2000; 62: 779-782.
- 358. Cole DE, gundenberg CM, Stirk LJ.** Changing osteocalcin concentrations during pregnancy and lactation: implications for maternal mineral metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*, 1987; 65: 290-294.
- 359. Kahl KG, Greggersen W, Rudolf S, Stoeckelhuber BM, Bergmann-Koester CU, Dibbelt L, Schweiger U.** Bone mineral density, bone turnover, and osteoprotegerin in depressed women with and without borderline personality disorder. *PsychosomMed*, 2006; 68: 669-674.
- 360. Frolik CA, Deluca HF.** 1, 25-dihydroxycholecalciferol: the metabolite of vitamin D responsible for increased intestinal calcium transport. *Arch Biochem Biophys.* 1971; 147:143–147.

- 361. Shiraishi A, Higashi S, Ohkawa H, Kubodera N, Hirasawa T, Ezawa I, Ikeda K, Ogata E.** The advantage of alfacalcidol over vitamin D in the treatment of osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 1999; 65:311–316.
- 362. Richy F, Ethgen O, Bruyere O, Reginster JY.** Efficacy of alfacalcidol and calcitriol in primary and corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis of their effects on bone mineral density and fracture rate. *Osteoporos Int.* 2004; 15:301–310.
- 363. Gram J, Junker P, Nielsen HK, Bollerslev J.** Dose-response effect of short-term calcitriol treatment on bone and mineral metabolism in normal males. *Bone.* 1996; 18:539–544.
- 364. Sirtori P, Sosio C, Resmini G, Rubinacci A.** Effect of short course of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on biochemical markers of bone remodelling in postmenopausal women. *Pharmacol Res.* 1996; 33:353–359.
- 365. Gannage-Yared MH, Azoury M, Mansour I, Baddoura R, Halaby G, Naaman R.** Effects of a short-term calcium and vitamin D treatment on serum cytokines, bone markers, insulin and lipid concentrations in healthy post-menopausal women. *J Endocrinol Invest.* 2003; 26(8): 748-53.
- 366. Hitz MF, Jensen JE, Eskildsen PC.** Bone mineral density and bone markers in patients with recent low-energy fracture: effect of 1 y of treatment with calcium and vitamin D. *Am J Clin Nut.* 2007; 86: 251-259.
- 367. Peppone LJ, Hebl S, Purnell JQ, Reid ME, Rosier RN, Mustian KM, Palesh OG, Huston AJ, Ling MN, Morrow GR.** The efficacy of calcitriol therapy in the management of bone loss and fractures: a qualitative review. *Osteoporos Int.* 2010; 21(7): 1133–1149.
- 368. Hellmeyer L, Ziller V, Anderer G, Ossendorf A, Schmidt S, Hadji P.** Biochemical markers of bone turnover during pregnancy: a longitudinal study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2006; 114(9):506-510.
- 369. Kent GN, Price RI, Gutteridge DH.** Human lactation forearm trabecular bone loss, increased bone turnover and renal conservation of calcium and inorganic phosphate with recovery of bone mass following weaning. *J Bone Miner Res.* 1990; 5: 361-369.
- 370. Lobie PE, Garcia-Aragon J, Waters MJ.** Prolactin receptor expression in the gastrointestinal tract: characterization of the prolactin receptor of gastric mucosa. *J Endocrinol.* 1993; 139(3): 371-82.
- 371. Dusanter-Fourt I, Belair L, Gespach C, Dijane J.** Expression of prolactin (PRL) receptor gene and PRL-binding sites in rabbit intestinal epithelial cells. *Endocrinology.* 1992; 130(5):2877-82.
- 372. Feng Zhou J, Zadworny D, Guemene D, Kuhnlein U.** Molecular cloning, tissue distribution and expression of the prolactin receptor during various reproductive states in meleagris gallopavo. *Biol Reproduct.* 1996; 55:1081-1090.

- 373. Charoenphandhu N, Wongdee K, Teerapornpuntakit J, Thongchote K, Krishnamara N.** Transcriptome responses of duodenal epithelial cells to prolactin in pituitary grafted rats. *Mol Cell Endocrinol*, 2008; 296(1-2):41-52.
- 374. Kraidith K, Jantarajit W, Teerapornpuntakit J, Nakkrasae LI, Krishnamara N, Charoenphandhu N.** Direct stimulation of the transcellular and paracellular calcium transport in the rat cecum by prolactin. *Pflugers Arch*, 2009; 458(5):993-1005.
- 375. Khanal RC, Nemere I.** Endocrine regulation of calcium transport in epithelia. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35:1277-1287.
- 376. Thongon N, Nakkrasae L, Thongbunchoo J, Krishnamara N, Charoenphandhu N.** Enhancement of calcium transport in Caco-2 monolayer through PKC-dependent $Ca_v1.3$ mediated transcellular and rectifying paracellular pathways by prolactin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009; 296: C1373-C1382.
- 377. Amnattanakul S, Charoenphandhu N, Limlomwongse L, Krishnamara N.** Endogenous prolactin modulated calcium absorption in the jejunum of suckling rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 2005; 83(7):595-604.
- 378. DeLuca HF.** Evolution of our understanding of vitamin D. *Nutr Rev*, 2008; 66(10 Suppl 2): S73-S87.
- 379. Christakos S.** Vitamin D gene regulation. *Principles of bone biology*. 3rd ed. San Diego, CA: Elsevier, 2008; 779-794.
- 380. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ.** Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev*, 2005; 85: 373-422.
- 381. Halloran BP, DeLuca HF.** Calcium transport in small intestine during pregnancy and lactation. *Am J Physiol*, 1980; 239:E64-E68.
- 382. Halloran BP, Barthell EN, DeLuca HF.** Vitamin D metabolism during pregnancy and lactation in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76:5549-5553.
- 383. Ajibade DV, Dhawan P, Fechner AJ, Meyer MB, Pike JW, Christakos S.** Evidence for role of prolactin in calcium homeostasis: regulation of intestinal transient receptor potential vanilloid type 6, intestinal calcium absorption and 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α hydroxylase gene by prolactin. *Endocrinology*, 2010; 15(7):2974-2984.
- 384. Nicoll CS.** Role of prolactin in water and electrolyte balance in vertebrates. *Prolactin*, ed.by JaffeRB, New York, Elsevier, 1981; pp127-166.
- 385. Krishnan KA, Proudman JA, Bahr JM.** Radioligand receptor assay for prolactin using chicken and turkey kidney membranes. *Comp Biochem Physiol*, 1991; 100B:769-774.
- 386. Sakai Y, Hiraoka Y, Ogawa M, Takeuchi Y, Aiso S.** The prolactin gene is expressed in the mouse kidney. *Kidney International*, 1999; 55:pp 833-840.
- 387. Mountjoy K, Cowden EA, Dobbie JW, Ratcliffe JG.** Prolactin receptors in the kidney. *J Endocrinol*, 1980;87:47-54.
- 388. Ouhtit A, Kelly PA, Morel G.** Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in rat. *Endocrinology*, 1993; 133: 135-144.
- 389. Sakaguchi K, Ohkubo T, Sugiyama T, Tanaka M, Ushiro H, Nakashima K.** Differential regulation of prolactin receptor mRNA expression in rat liver and kidney by testosterone and oestradiol. *J Endocrinol*, 1994; 143(2): 383-92.

390. **Wongdee K, Charoenphandhu N.** Regulation of epithelial calcium transport by prolactin: from fish to mammals. *Gen Comp Endocrinol*, 2013; 181C: 235-240.
391. **Charoenphandhu N, Wongdee K, Krishnamara N.** Is prolactin the cardinal calciotropic maternal hormone? *Trnds Endocrinol Metab*, 2010; 21(7):395-401.
392. **Prentice A.** Calcium in pregnancy and lactation. *Annu Rev Nutr*, 2000; 20:249-272.
393. **Naylor KE, Igbal P, Fledelius C, Fraser RB, Eastell R.** The effect of pregnancy on bone density and bone turnover. *J Bone Miner Res*, 2000; 15(1):129-137.
394. **Black AJ, Topping J, Durham B, Fraquharson RG, Fraser WD.** A detailed assessment of alterations in bone turnover, calcium homeostasis and bone density in normal pregnancy. *J Bone Miner Res*, 2000; 15(3): 557-563.
395. **Omi N, Ezawa I.** Change in calcium balance and bone mineral density during pregnancy in female rats. *J Nutr Vitaminol*, 2001; 47(3): 195-200.
396. **Seriwatanachai D, Thongchote K, Charoenphandhu N, Pandaranandaka J, Tudpor K, Teerapornpuntakit J, Suthiphongchai T, Krishnamara N.** Prolactin directly enhances turnover by raising osteoblast-expressed receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoprotegerin ratio. *Bone*, 2008; 42(3): 535-546.
397. **Sowers M, Crutchfield M, Jannausch M, Updike S, Corton G.** A prospectiv evaluation of bone mineral change in pregnancy. *Obstet Gynecol*, 1991; 77:841-845
398. **Drinkwater BL, Chesnut III CH.** Bone density changes during pregnancy and lactation in active women: a longitudinal study. *Bone Miner*, 1991; 14:153-160.
399. **Paparella P, Giorgino R, Maglione A, Lorusso D, Scripa P, Del Bosco A, Mancuso S.** Maternal ultrasound bone density in normal pregnancy. *Clin Exp Obstet Gynecol*, 1995; 22:268-278.
400. **Seriwatanachai D, Krishnamara N, van Leeuwen JP.** Evidence for direct effects of prolactin on human osteoblasts: inhibition of cell growth and mineralization. *J Cell Biochem*, 2009; 107(4):677-85.
401. **Kovacs CS.** Calcium and bone metabolism disorders during pregnancy and lactation. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2011; 40(4): 795-826.
402. **Howe OD, Wheeler MJ, Meaney AM.** Bone mineral density and its relationship to prolactin levels in patients taking antipsychotic treatment. *J Clin Psychopharmac*, 2005; 25(3):259-261.
403. **Meaney AM, O'Keane V.** Bone mineral density changes over a year in young females with schizophrenia: relationship to medication and endocrine variables. *Schizoph Res*, 2007; 93:136-143.
404. **Misra M, Papakostas GI, Klibanski A.** Effects of psychiatric disorders and psychotropic medications on prolactin and bone metabolism. *J Clin Psychiatry*; 2004; 65(12):1607-1618.
405. **Kunimatsu T, Kimura J, Funabashi H, Inoue T, Seki T.** The antipsychotics haloperidol and chlorpromazine increase bone metabolism and induce osteopenia in female rats. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2010; 58(3):360-368.
406. **Jongwattanapisan P, Suntornsaratoon P, Wongdee K, Krishnamara N, Charoenphandhu N.** Impaired body calcium metabolism with low density and compenzatory colonic calcium absorption in cecectomized rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012; 302(7):E852-863.

- 407. Charoenphandhu N, Suntornsaratooon P, Jongwattanapisan P, Wongdee K, Krishnamara N.** Enhanced trabecular bone resorption and microstructural bone changes in rats after removal of the cecum. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012; 303(8):E1069-1075.
- 408. Royster M, Driscoll P, Kelly PA, Freemark M.** The prolactin receptor in the fetal rat: cellular localization of messenger RNA, immunoreactive protein, and ligand binding activity and induction of expression in late gestation. *Endocrinology*, 1995; 136:3892-3900.
- 409. Freemark M, Driscoll P, Maaskant R, Petryk A, Kelly PA.** Ontogenesis of prolactin receptors in the human fetus in early gestation. Implications for tissue differentiation and development. *J Clin Invest*, 1997; 99:1107-1117.