



UNIVERSITETI I MJEKËSISË, TIRANË

REPUBLIKA E SHQIPËRISË
UNIVERSITETI I MJEKËSISË TIRANË
FAKULTETI I SHKENCAVE MJEKSORE TEKNIKE
PROGRAMI DOKTORATURË

DISERTACION
PËR MARRJEN E GRADËS SHKENCORE
“DOKTOR”

TEMA

PËRCAKTIMI I MARKUESVE TUMORALË ME METODEN E
IMUNOFLUORESHENCËS NË PLLAKË NITROCELULOZË. VLERA E
MARKUESVE TUMORALË CEA, CA 19-9 DHE AFP NË PATOLOGJITË
MALINJE TË MËLÇISË

Kandidati
Petrit Gecaj

Udhëheqës shkencor
Prof. Dr. Robert Andoni

TIRANË

**REPUBLIKA E SHQIPËRISË
UNIVERSITETI I MJEKSISË TIRANË
FAKULTETI I SHKENCAVE MJEKSORE TEKNIKE
PROGRAMI DOKTORATURË**

**DISERTACION
PËR MARRJEN E GRADËS SHKENCORE
“DOKTOR”**

TEMA

**PËRCAKTIMI I MARKUESVE TUMORALË ME METODEN E
IMUNOFLUORESHENCËS NË PLLAKË NITROCELULOZË. VLERA E
MARKUESVE TUMORALË CEA, CA 19-9 DHE AFP NË PATOLOGJITË
MALINJE TË MËLÇISË**

MBROHET ME DATËN ___/___/___ PARA JURISË

- | | |
|----------|-------------------------|
| 1. _____ | KRYETAR |
| 2. _____ | ANËTAR (OPONENT) |
| 3. _____ | ANËTAR (OPONENT) |
| 4. _____ | ANËTAR |
| 5. _____ | ANËTAR |

Përmbajtja

Parathënje.....	3
Falenderime.....	6
Lista e akronimeve.....	7
Abstrakti.....	8
I. Hyrje.....	10
II. Qëllimi.....	11
1. Markuesit tumoralë në biokimin klinike dhe onkologji.....	12
1.1 Përkufizimi i markuesve tumoralë.....	12
1.2 Përcaktimi i një markuesi tumoral ideal.....	12
1.3 Vlera klinike e markuesve tumoralë në praktikën mjeksore.....	13
1.4 Klasifikimi i markuesve tumoralë.....	13
1.5 Markuesit tumoralë të patologjive malinje të mëlçisë.....	15
1.6 Përqëndrimet e alfafetoproteinës në patologjitë malinje të mëlçisë.....	16
1.7 Enzimat si markues tumoralë klasik.....	16
1.8 Shkaqet e rritjes jo specifike të markuesve tumoralë.....	20
2. Metodologjia e dozimit të markuesve tumoralë.....	22
3. Përcaktimi i CEA me metodën e imunofluoreshenës në pllakë nitrocelulozë dhe krahasimi i saj me metodën klasike ELISA.....	39
3.1 Metodatat analitike për përcaktimin e CEA në serum dhe gjakut.....	39
3.2 Përcaktimi i CEA me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë në tridhjetë subjekte të shëndoshë.....	40
3.3 Përfitimi i materialit biologjik për analizë dhe metoda analitike e përdorur.....	41
3.4 Përcaktimi i vlerave normale të CEA me metodën ELISA në kushtet e laboratoreve tanë.....	44
3.5 Krahasimi i metodës së imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë me metodën ELISA.....	48

4. Përcaktimi i alfafetoproteinës me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë.....	52
4.1. Biokimia e alfafetoproteinës.....	52
4.2. Metodatat e përcaktimit të alfafetoproteinës në serum të gjakut.....	53
4.3. Përbërja e kitit analitik për përcaktimin e AFP me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë.....	54
4.4. Studimi i precizionit të kitit i-CHROMA për matjen e përqendrimit të AFP në serum të gjakut.....	55
4.5. Përcaktimi i vlerave normale të AFP, matur në serum të gjakut me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë.....	56
4.6. Krahasim i metodës së imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë me metodën kalsike ELISA.....	58
4.7. Përcaktimi i CA 19-9 në serum të gjakut.....	60
4.8. Përcaktimi i CA 19-9 në serum të gjakut të 30 subjekteve të shëndoshë.....	60
4.9. Krahasimi i metodës së kemioluminiscencës për matjen e CA 19-9 në serum të gjakut me metodën kalsike ELISA.....	62
5. Studimi i përqendrimit të CEA, CA 19-9, AFP dhe enzimave hepatike në patologjitë malinje të mëlçisë dhe traktit digjektiv.....	65
5.1 Metodatat analitike të përdorura për përcaktimin e CEA, CA 19-9, AFP dhe enzimave hepatike.....	65
5.2 Metoda analitike për përcaktimin e ALT ose SGPT.....	66
5.3 Metoda analitike për përcaktimin e AST ose SGOT.....	68
5.4 Përcaktimi i gama-glutamil transferazë me metodën kinetike.....	69
5.5 Markuesit tumoralë CEA, CA 19-9, AFP në pacientë me patologji malinje të mëlçisë që ka cënuar funksionin hepatic.....	70
5.6 Përqëndrimet në serum të mikroelementëve bakër (Cu) dhe zink (Zn) në serum të pacientëve me kancer mëlçie.	
6. PERFUNDIME.....	79
7. REKOMANDIME.....	81
8. REFERENCA.....	82

Parathënie

Studimi i paraqitur ofron përdorimin e metodës të imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë, për përcaktimin e markuesve tumoralë, CEA dhe AFP në praktikën laboratorike të laboratorëve të vegjel dhe të mesëm. Në të njëjtën kohë, kjo metodë risi mund të përdoret për matje të shpejta dhe depistuese të disa markuesve të tjerë tumoralë, disa hormoneve dhe njaft metabolitëve. Krahas kësaj, në punim është studiuar përcaktimi i markuesve tumoralë CEA, AFP dhe CA 19-9, në patologjitë malinje të mëlçisë. Përcaktimi i markuesve të lartë përmendur është shoqëruar me përcaktimin e enzimave bazë, që tregojnë dëmtimin hepatic. Enzimat e përzgjedhura janë ALT, AST, GGT dhe ALP. Këto përcaktime, siç rezultuan edhe në punim, kanë vlera të mëdha për diagnostikimin, monitorimin dhe prognozën e patologjive malinje të mëlçisë. Përdorimi i metodës së imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë, është metodë e saktë, e shpejtë dhe ekonomike. Kjo metodë, në punim, është krahasuar me metodën klasike ELISA, tashmë e provuar nga përvoja dhe ka rezultuar e një vlefshme me të. Për metodën e re, të studiuar në përputhje me rekomandimet e IFCC, janë përcaktuar intervalet e vlerave normale, në kushtet e laboratoreve tona. Së fundi, gjatë përcaktimit të markuesve tumoralë në patologjitë malinje të mëlçisë, janë përcaktuar edhe mikroelementë si zinku (Zn) dhe bakri (Cu), të cilët ndryshojnë vlerat e tyre në këto patologji. Përcaktimet e këtyre elementëve janë bërë me metodën End- Point, e cila është e thjeshtë, ekonomike dhe nuk kërkon përdorimin e absorbentit atomik, si dhe mund të përcaktohet në çdo laborator. Rezultatet e këtij studimi ju shërbejnë të gjithë specialistëve të laboratoreve mjeksore, mjekëve të familjes, si dhe specialistëve onkologë, të cilët merren me trajtimin e këtyre patologjive malinje.

Falenderime

Me nderim më të lartë shpreh mirënjohje dhe falenderim të gjithë kolegëve, bashkëpunëtorëve, të njohurve dhe miqve që më dhanë shtysë, këshilla dhe mbështetje në kryerjen e këtij punimi.

Para së gjithash ndjehem falenderues ndaj profesorëve të mi pranë Fakultetit të Shkencave Mjeksore Teknike që më kanë mbështetur, inkurajuar dhe keshilluar gjatë punës për kërkim shkencor.

Falenderoj kolegët për klimën bashkëpunuese, në aspekte të praktikave mbi temën në studim.

Një mirënjohje e veçantë është për familjen time!

Lista e akronimeve

CEA	Antigeni karcinoembrionar
CA 19-9	Carbohydrate Antigen 19-9
AFP	Alfafetoproteina
SGPT (ALT)	Serum glutamic-pyruvic transaminase
SGOT (AST)	Serum glutamic oxaloacetic transaminase
GGT	Gama-glutamyl transeraza
ALP	Fosfotaza alkaline
HCG	Gonadotropina kronike
SCC	(Scuamous cell carcinoma) antigen
PAP	Fosfataza acide prostatike
LDH	Laktat dehidrogjenaza
LHD	Hidroksibutiret dehidrogjenaza
TR-FIA	Time Resolved Fluoro Immuno Assay
TR	Time Resolved
Metoda ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method
Metoda RIA	Radio Immuno Assay
Metoda SLFIA	Substrate Labeled Fluorescent Immuno Assay Method

Abstrakt

Përcaktimi i markuesve tumoralë me metoden e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë. Vlera e markuesve tumoralë CEA, CA 19-9 dhe AFP në patologjitë malinje të mëlçisë.

Fillimisht në këtë punim, është studiuar përcaktimi i CEA dhe AFP, me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë. Kjo metodë është një risi në praktikën e laboratoreve mjeksore. Metoda e studiuar ka një korelacion shumë të mirë me metodën klasike ELISA dhe me metodat e tjera analitike, që përdoren për matjen e këtyre markuesve, ($r > 0.9$). Intervalet e vlerave normale për CEA dhe AFP të matura me këtë metodë, në kushtet e laboratoreve tona, janë shumë të përafërt me ato të metodave të tjera apo të cituara në literaturë. Midis këtyre intervaleve normale, nuk ka asnjë ndryshim statistikisht sinjifikativ ($p > 0.05$). Metoda e imunofluoreshencës, në pllakë acetat celulozë, është e shpejtë, e saktë dhe ekonomike. Kjo metodë nuk ka nevojë, për ndërtimin e lakores së kalibrimit, pasi kjo ndodhet e gatshme me çipin parametrik (chip), që shoqëron kitin analitik. Në 100 pacientë me patologji malinje të mëlçisë, vlerat e CEA, CA 19-9 dhe AFP ishin të larta duke paraqitur ndryshime statistikisht sinjifikative, në raport me intervalet e vlerave normale, ($p < 0.05$). Tek këta pacientë funksioni hepatic ishte i dëmtuar. Kjo vërtetohej nga rritja e aktivitetit të enzimave hepaticke, ALT, AST, GGT dhe ALP. Kjo rritje është statistikisht sinjifikative në krahasim me intervalet e tyre të vlerave normale ($p < 0.05$). Përqëndrimi i mikroelementit bakër Cu, në këta pacientë është i lartë ndërsa përqëndrimi i mikroelementit zink Zn është i ulët, ($p < 0.05$). Përcaktimi i përqëndrimit në serum të markuesve tumoralë CEA, CA 19-9 dhe AFP në patologjitë malinje të mëlçisë ka vlerë mjeksore. Këto përcaktime ndihmojnë për diagnostikimin, monitorimin dhe prognozën e këtyre patologjive.

Fjalë kyçe: Imunofluoreshencë në pllakë nitrocelulozë, CEA, CA 19-9, AFP, ALT, AST, GGT, ALP. Bakër (kupremi) Cu, Zink (zinkemi) Zn.

Abstract

Determination of tumor marker through imunofluorescence method in nitrocellulose plaque. The value of the CEA tumor marker CA 19-9 and AFP in malignant liver pathologies.

In this paper, initially it is studied the determination of CEA and AFP through imunofluorescence method in nitrocellulose plaque. This method is an innovation in medical laboratories practice. The studied method has a very good correlation with classical method ELISA and other analytical methods which are used to determine these markers ($r=0.09$). The intervals of normal values of CEA and AFP, measured through this method, in our laboratories conditions, are very approximate compared to the values of other methods or those described in literature. There is no significant change between these normal intervals, ($p>0.05$). Imunofluorescence method, in acetate cellulose plaque, is fast, accurate and economical. There is no need to design the caliber curve for this method because it is ready in parametric chip which accompanies analytical kit. The values of CEA, CA 19-9 and AFP were high in 100 patients with malignant liver pathology, presenting statistically significant changes compared with normal values intervals, ($p<0.05$). The hepatic function in these patients was damaged. This was corroborated by increased activity of liver enzymes, ALT, AST, GGT and ALP. This increase is statistically significant compared with their intervals of normal values ($p<0.05$). Copper (Cu) microelement concentration in these patients is high and the concentration of zinc (Zn) microelement is low ($p <0.05$ level). Determination of concentration in blood serum of CEA tumor marker, CA 19-9 and AFP in malignant liver pathologies has medicinal value. These provisions help for diagnosis, monitoring and prognosis of these pathologies.

Key words: Immunofluorescence in nitrocellulose plaque, CEA, CA 19-9, AFP, ALT, AST, GGT, ALP. Copper Cu, Zinc Zn.

I. HYRJE

Sëmundjet kanceroze ose si emërohen ndryshe tumore malinje apo neoplazma, përbëjnë një nga problemet madhore të mjeksisë së sotme. Tumoret malinjë janë invazive, shkatërrues për indet dhe organet dhe shoqërohen me një prognozë të keqe dhe shkallë të lartë mortaliteti. Diferenca madhore midis qelizave normale dhe qelizave tumorale ka të bëjnë me faktin që qelizat tumorale rriten në mënyrë të pakontrolluar dhe abnormale. Këto transformime malinje (neoplastike) shoqërohen me alterime të gjeneve. Këto alterime të gjeneve ndikojnë në prodhimin e enzimave, hormoneve, receptorëve, proteinave dhe metabolikëve që ndodhen në sintezën qarkulluese të gjakut. Në qoftë se këto substanca të alteruara mund të maten, ato do të shërbejnë si një ndihmë për diagnozën dhe karakteristikat e sëmundjes malinje. Në të njëjtën kohë këto përcaktime mund të përdoren për të gjykuar në ecurin (monitorimin) e patologjive malinje dhe efikasitetin e mjekimit. Përmbajtja e DNA në qelizat tumorale mund të egzaminohet për mutacione. Vlerë ka përcaktimi i supresorëve të geneve, të cilët parandalojnë formimin e tumoreve. Prania e substancave onkogjene, të cilat ndikojnë në rritjen e qelizave tumorale është një ndihmesë e madhe për dignostikimin, monitorimin dhe gjykimin mbi efikasitetin e mjekimit. Këto substanca onkogjene emërtohen me termin markues tumoral. Një markues tumoral është ideal nëq ai plotëson karakteristikat e mëposhtme;

- Është specifik për patologjinë tumorale,
- Është i ndjeshëm për patologjinë tumorale,
- Sasitë e prodhuara të markuesit tumoral korelojnë me madhësinë e tumorit,
- Metoda analitike, për përcaktimin e këtij markuesi tumoral, është e thjeshtë për tu realizuar, ka ndjeshmëri të lartë dhe për përqëndrime të ulta të markuesit tumoral është ekonomike,
- Teknologjia matëse është e thjeshtë dhe e realizueshme në laboratorët mjekësor,
- Gjysëm jeta e markuesit tumoral është e shkurtër.

II. QËLLIMI I PUNIMIT

Duke marrë shkas nga rëndësia që kanë markuesit tumoral në diagnozë, monitorim dhe prognozë, për sëmundjet tumorale menduam të ndërmarrim këtë punim. Synimet e këtij punimi janë:

1. Të studiohet, në kushtet e laboratoreve tona, përcaktimi i markuesve tumoral CEA dhe AFP me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë.
Kjo metodë u përzgjedh si metodë e re. Metoda është e shpejtë, e saktë dhe ekonomike. Ajo mund të përdoret dhe në laboratorët e vegjël.
2. Të krahasohet metoda e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë me metodën klasike ELISA, për të gjykuar mbi korelacionet midis tyre.
3. Të verifikohen intervalet e vlerave normale të markuesve tumoral CEA, AFP dhe CA 19-9 në kushtet e laboratoreve tona.
4. Të studiohet ecuria e markuesve tumoralë CEA, CA 19-9 dhe AFP, në patologjitë malinje të mëlçisë.
5. Të studiohet niveli i enzimave hepatike ALT, AST, GGT dhe ALP, në patologjitë malinje të mëlçisë.

KAPITULLI I PARE

1. MARKUESIT TUMORALË NË BIOKIMIN KLINIKE DHE ONKOLOGJI

1.1 Përkufizimi i markuesve tumoralë

Markuesit tumoralë janë gjene të cilët prodhohen në përqëndrime të ulta nga indet normale të organizmit. Struktura e tyre është biokimike. Në qoftë se këto bashkëdyzime kimike, rrisin përqëndrimin e tyre në lëngjet (biokimike) biologjike nqs një organ apo ind ka një patologji tumorale, atëhere këta bashkëdyzime do të luajnë rolin e markuesve tumoralë. Markuesi tumoralë do të jetë i besueshëm për diagnozë klinike kur ka një korrelacion midis rritjes së përqëndrimit të tij dhe zhvillimit të patologjisë malinje. Markuesi tumoral prodhohet nga një tumor dhe arrin përqëndrime të larta në lëngjet biologjike, sidomos në gjak. Një ind normal nuk mund ta prodhojë markuesin tumoral në këto përqëndrime. Pikërisht këtu qëndron thelbi i diferencimit të tumorit nga indi normal me anë të matjes së përqëndrimit të markuesit tumoralë në gjakun e pacientit. Disa markues tumoralë janë specific për një tip të veçantë kanceri. Të tjerë markues tumoralë rrisin përqëndrimet e tyre në tipe të ndryshme patologjishë kanceroze.

1.2 Përcaktimi i një markuesi tumoral ideal

Një markues tumoral përdoret në onkologji për të diagnostikuar praninë e një patologjie malinje, si dhe për të monitoruar ecurinë e saj. Markuesi tumoral, që të jetë i vlefshëm në praktikën mjeksore onkologjike duhet të plotësojë këto kritere:

- Të jetë lehtësisht i matshëm në lëngjet biologjike me metoda analitike lehtësisht të realizueshme.
- Të jetë specifik për tumorin që duhet të diagnostikohet.
- Të ketë një lidhje korelative midis përqëndrimit të markuesit tumoral në lëngun biologjik dhe aktivitet të indit tumoral.
- Përqëndrimi plazmatik i markuesit tumoral duhet të ketë lidhje korelative me masën anatomike të tumorit. Në rast se markuesi tumoral është i pranishëm në plazmën e njerëzve të shëndoshë, përqëndrimi i tij duhet të jetë shumë më i ulët sesa përqëndrimet e tij në plazmën e gjakut të pacientëve me patologji malinje.

1.3 Vlera klinike e markuesve tumoralë në praktikën mjeksore

Në praktikën mjeksore markuesit tumoralë, përdoren për qëllime të mëposhtme:

- Depistimi i popullsisë.
- Diagnoza diferenciale tek pacientët që paraqesin anamnezë të dyshimtë për sëmundjet tumorale.
- Klasifikimi klinik i tumoreve malinjë.
- Vlerësimi i prognozës gjatë monitorimit të ecurisë së sëmundjes.
- Vlerësimi i efikasitetit të mjekimit kirurgjikal, radioterapisë, kemioterapisë apo kombinimit të tyre.
- Përcaktimi i recidivës të tumorit malinjë.

1.4 Klasifikimi i markuesve tumoralë

Klasifikimi i markuesve tumoral bazohet në këto parime:

- Struktura biokimike.
- Funkzioni i markuesit tumoral.
- Kombinimi i strukturës biokimike dhe funksionit të markuesit tumoral.
- Zbulimi i markuesve onkofetale.

Në raport me strukturën biokimike markuesit tumoral klasifikohen në:

- a) Proteina onkofetale
- b) Antigene të asociuar tumoral.
- c) Hormone.
- d) Receptorë hormonalë.
- e) Enzima.
- f) Citokina.
- g) Onkogjene.
- h) Antigjenë me origjinë nga karbohidratet.

i) Derivate të aminosaharideve.

Një klasifikim tjetër i markuesve tumoral lidhet me kriteret anatomike-topografike të organizmit. Sipas këtij klasifikimi markuesit tumoralë ndahen në:

- Markues nuklearë, të lidhur me bërthamat qelizore.
- Markues citoplazmatikë (enzima, poliomona, antigenë onkofetalë).
- Markues të membranës qelizore gliko-proteina, fibronektarina).
- Markues qarkullues në lëngjet biologjike.

Në praktikën mjeksore të përditshme, vlerat më të mëdha i kanë markuesit tumoralë, që maten në plazmën e gjakut. Në lidhje me këto markues tumoralë shumë autorë janë të mendimit për një klasifikim të veçantë. Sipas këtij klasifikimi markuesit tumoralë të pranishëm në gjak mund të specifikohen:

- a) Markues tumoralë me specificitet të lartë për organin (tireoglobulina, antigeni prostatik specifik, gonadotropina karionike).
- b) Markues tumoralë me specificitet të lartë për qelizën (kalcitonina, serotoninina dhe metabolitet e saj).
- c) Markues tumoralë të lidhur me tipa biologjikë të veçantë (antigeni karcioembrional, mucinat).

Klasifikimi më i përdorshëm i markuesve tumoralë është ai i lidhur me strukturën biokimike të tyre. Sipas këtij klasifikimi markuesit tumoralë ndahen në:

a) Proteina onkofetale.

Në proteinat onkofetale bëjnë pjesë këta markues tumoralë:

- Antigeni karcinoembrionar (CEA).
 - Alfafetoproteina (AFP).
 - Gonadotropina korionike (HCG).
 - SCC (Scuamous cell carcinoma) antigen.
- b) Mucinoglikoproteinat (antigjene me derivacion nga karbohidratat).
- CA-125.
 - CA-19.9.
- c) Enzima.
- Fosfotaza acide prostatike (PAP)
 - Antigeni specific prostatic (PSA).

- Fosfotaza alkaline (ALP).
 - Laktat dehidrogenaza (LDH).
 - 5'-Nukliotidoza.
- d) Hormone.
- ACTH.
 - Estrogenë të gjënrrave të qumështit dhe receptorë të progesteronit.
- e) Proteina të membranës qelizore.
- B-2- mikroglobulina.
- f) Markues qelizorë.

1.5 Markuesit tumoralë të patologjive malinje të mëlçisë.

Alfafetoproteina (AFP) është një glikoproteinë me peshë molekulare rreth 70 Kilodalton (KD). Në molekulën e alfaproteinës pjesa proteinike përbën rreth 95 % të peshës molekulare. Zinxhiri polipeptidik është i përbërë nga 590 aminoacide. Karbohidratet më të rëndësishme, që marrin pjesë në këtë molekulë janë N-acetilglukozamina, manoza, galaktoza dhe acidi sialik. Alfafetoproteina paraqet ngjashmëri të madhe strukturore, veti fiziko-kimike të përafërta dhe veprime imunologjike të njëjta me ato të albuminës. Në teknikën e elektroforozës alfafetoproteina migron bashkë me alfa-globulinën. Gjysëm jeta e alfaglobulinës është 4 deri në 6 ditë. Nga këndvështrimi biologjik AFP sintetizohet gjatë zhvillimit embrional. Gjatë jetës intrauterine alfafetoproteina prodhohet nga lëngu amniotik, nga mëlçia dhe në sasi më të vogla nga trakti gastrointestinal. Fillimisht sinteza e alfafetoproteinës fillon nga placenta dhe më vonë shtrihet në nivelin hepatic. Duke filluar nga muaji i katërt e deri në fund të gravidancës mëlçia bëhet organi i preferuar i prodhimit të alfaproteinës. Pas muajit të tetë të gravidancës, përqëndrimi i alfafetoproteinës ulet në mënyrë të shpejtë dhe paralelisht me këtë dukuri rritet përqëndrimi i albuminës. Alfafetoproteina shërben dhe si protein transporti. Molekulat e alfafetoproteinës janë të afta të lidhin një numër të madh substratesh. Ndër këto substrate më të rëndësishmit janë acidet yndyrore, bilirubina dhe disa metale, ku më i spikaturi është bakeri. Nivelet e AFP në serumin e gjakut varen nga mosha. Në momentin e lindjes përqëndrimi i alfafetoproteinës në serumin e gjakut është shumë i lartë. Me kalimin e kohës ky përqëndrim fillon të ulet dhe në fund të vitit të parë, përqëndrimi i alfafetoproteinës në serumin e gjakut është nga 15 ng/ml në 20 ng/ml. Në moshë madhore prodhimi i alfafetoproteinës është i lidhur ngushtë me proliferimin e hepatociteve

normale ose të transformuar (hepatokarcinoma). Vlerat normale të alfafetoproteinës në serum e gjakut të njerëzve të shëndoshë janë gjithmonë më të vogla sesa 10 ng/ml. Vlerat e alfafetoproteinës më të larta sesa 10 ng/ml, konsiderohen vlera patologjike, duke përjashtuar gravidancën. Rritje patologjike të alfafetoproteinës takohen në këto patologji:

- Sëmundje të mëlçisë.
- Kancerin testikular.
- Kancerin e ovareve.

1.6 Përqëndrimet e alfafetoproteinës në patologjitë malinje të mëlçisë.

a) Karcinoma hepatocelulare

Karcinoma hepatocelulare është një patologji shumë e rëndë e mëlçisë. Alfafetoproteina është një markues tumoral shumë i dobishëm për diagnostikimin e hepatokarcinomës dhe monitorimin e terapisë të kësaj patologjie. Në karcinomën hepatocelulare përqëndrimi i alfafetoproteinës në serum e gjakut mund të kalojë përqëndrimin 4000 ng/ml dhe kjo dukuri është specifike për këtë patologji. Vlerat e alfafetoproteinës rriten gjithashtu dhe në kancerin primitiv të mëlçisë por rritja është e moderuar në krahasim me karcinomën hepatocelulare. Si rregull, kanceri i mëlçisë trajtohet në mënyrë kirurgjikale. Në qoftë se masa kancerogjene hiqet totalisht me ndërhyrje kirurgjikale, niveli i alfafetoproteinës në gjak do të ulet duke arritur intervalin e vlerave normale. Në rast se me kalimin e kohës niveli i alfafetoproteinës do të rritet përsëri atëherë kemi të bëjmë me një recidivë të kancerit të mëlçisë.

b) Hepatiti akut dhe kronik

Në këto patologji të mëlçisë dhe sidomos në hepatitin akut, përqëndrimi i alfafetoproteinës rritet mbi 100 ng/ml.

1.7 Enzimët si markues tumoralë klasik

Qelizat neoplazike paraqesin shpesh një aktivitet enzimatik jashtë kufijve të intervalit të vlerave normale. Kjo gjë reflektohet si në aspektin cilësor ashtu dhe në atë sasior. Përdorimi i enzimave si markues tumoralë është më i hershmi në historinë e onkologjisë klinike.

Struktura proteinike e enzimave dhe potenciali i tyre imunogjen bëjnë mjaft të vlefshme matjen e tyre në lëngjet biologjike. Teknologjia e sotshme e dozimit të enzimave dhe

zhvillimi i sistemeve imunometrike më të ndjeshëm dhe më specifik janë një ndihmesë e madhe për onkologjinë klinike. Në tabelën e mëposhtme paraqiten disa nga përdorimet e rëndësishme të enzimave apo izoenzimave të tyre në patologji të ndryshme neoplazike. Metoda kinetike të analizës enzimmatike si dhe elektroforeza në xhel polikrilamidi e kanë bërë matjen e enzimave një praktikë rutinë në mjekësi.

Tabela Nr.1. Përdorimi i disa enzimave dhe izoenzimave në patologjitë neoplaztike.

ENZIMA	PATOLOGJIA NEOPLAZTIKE
Ribonukleaza	Pankreas, tumor i gjirit, tumor i kolonit, tumor në hepar
Fosfataza acide prostatike (PAP)	Prostata
Hidroksibutiret dehidrogjenaza (LHD)	Leuçemi akute, limfoma, tumor i testeve, tumor i gjirit, koloni.
Hidroksibutiret dehidrogjenaza (HBDH ose LDH1)	Tumor i testeve
Timidin Kinaza (TK)	Limfoma Hodgkin, leukemia, mikrocitoma
Fosfataza alkaline (ALP)	Metastazat hepatike, seminoma, osteoma, kanceri i ovareve, tumoret renale.
Fosfataza alkaline (ALP) (izoenzima kockore)	Oseosarkoma, metastazat kockore.

A. Fosfataza Alkaline (ALP)

Fosfataza alkaline është një enzimë që prodhohet kryesisht nga osteoblastet, nga qelizat e mukozës së traktit hepatobiliar dhe intestinal dhe nga placenta.

Nivelet e larta të fosfatazës alkaline në serum takohen më shpesh në neoplazite primitive ose sekondare të indit kockor, sidomos të atyre me natyrë osteoblastike. Nivele të larta të fosfatazës alkaline ndodhen në serum in e gjakut të pacientëve me tumore të heparit apo gjendrave paratiroide. Si rrjedhojë e rritjes së sistemit kockor tek subjektet e shëndoshë deri në 1000 u/l. Pas moshës së pubertetit dhe jashtë gravidancës, në mungesë të lezioneve kockore dhe pranisë së hepatomegalisë, rritja e niveleve të fosfatazës alkaline është një tregues për praninë e mundshme të patologjive neoplazike. Diagnoza diferenciale midis neoplazisë kockore dhe asaj hepatike, bëhet duke dozuar 5'nukleotidazës dhe leucinaminopeptidazën. Në rast se neoplazia është hepatike, krahas

rritjes së fosfatazës alkaline në serum in e gjakut, kemi dhe rritjen e njëkohëshme të 5'nukleotidazës dhe të leucinaminopeptidazës.

Këto enzima gjenden në përqëndrime të rritura në 30-35% të neoplazisë hepatike dhe asnjëherë nuk rrisin përqëndrimin e tyre në lezionet neoplazike kockore. Përkundrazi, në lezionet neoplazike kockore kemi rritje të përqëndrimit të hidroksipolinës dhe kalçiumit sidomos në urinë.

Në hepatokarcinomë ose hepatoblastome nivelet e fosfatazës alkaline janë normale ndërkohë që kemi rritje të AFP. Nivete më të larta të fosfatazës alkaline takohen në tumoret e rrugëve biliare apo në metastazat e tyre.

Në pacientet e prekur nga osteosarkoma fosfataza alkaline rritet në përqëndrime shumë të larta.

Izoenzima placentare e fosfatazës alkaline (PLAP) konsiderohet si një markues tumoral germinale, për tumoret e testeve dhe të ovareve.

B. Fosfataza acide Prostatike (PAP)

Fosfataza acide prostatike (PAP) është një glikoproteinë me peshë molekulare 100 kD. 93 % e saj përbëhet nga pjesa proteinike dhe vetëm 7 % i takojnë pjesës glucidike. Përdorimi i matjeve imunometrike ka vënë në dukje nivele të fosfatazës acide prostatike më të larta sesa 5-10 ng/ml tek pacientët e prekur nga karcinoma e prostatës në raport me gravitetin e patologjisë. Përcaktimi i fosfatazës acide është veçanërisht i dobishëm për tu përdorur si parametër i monitorimit të efikasitetit të terapisë. Rezultate false pozitive të fosfatazës acide që nuk kanë lidhje me praninë e neoplazisë së prostatës, takohen në prostatie (inflamacion i prostatës), si dhe në hipertrofinë beninje të prostatës.

C. Laktat dehidrogjenaza (LHD)

Laktat dehidrogjenaza është një enzimë që ka 5 izoenzima. Këto 5 izoenzima vihen në dukje me anë të teknikës elektroforetike dhe janë të korrespondueshme me α 1 e α 2, β 1 e β 2, dhe γ globulinat. Ato emërtohen me gerrat LDH dhe numrat arabe me rritje progresive. LDH2 > LDH 1 > LDH 3 > LDH 4 > LDH 5.

Vlerat normale të tyre janë si më poshtë:

LDH 1 = 15-32 %

LDH 2 = 25-44 %

LDH 3 = 12-19 %

LDH 4 = 3-16 %

LDH 5 = 3-16 %.

Studimet kanë treguar se funksionet izoenzimmatike të LDH e kanë origjinën e tyre nga indet. Fraksionet e shpejta gjatë migrimit elektroforetik LDH 1 dhe LDH 2 e kanë origjinën nga indi kardiak, kryesisht nga miokardi. Këto fraksione takohen gjithashtu, në përqëndrime më të ulta në eritrocite dhe qelizat e trurit. Fraksionet e lehta LDH 4 dhe LDH 5 janë të lokalizuara në muskujt e skeletit, në mëlçi dhe në veshka. Fraksioni intermediary LDH 3 është i pranishëm pothuajse në çdo ind. Kërkimet mbi strukturën e izoenzimave të LDH kanë vënë në dukje që izoenzimmat më të thjeshta janë polimere. Në tabelen e mëposhtme paraqiten karakteristikat strukturale, elektroforetike dhe shpërndarja anatomike e izoenzimave të LDH. Polimeri i izoenzimave të LDH përbëhet nga dy vargje apo dy njësi që emërtohen A dhe B. Kombinimi i tyre përcakton dhe natyrën e izoenzimës.

Tabela Nr. 2 Përcaktimi i izoenzimave të LDH.

Izoenzima	Lëvizja elektroforetike	Struktura	Zemër %	Muskul %	Hepar %
LDH 1	α - 1 globuline	A4 (H)	73	0	4
LDH 1	α -2 globuline	A3B1(H3M1)	24	0	8
LDH 1	B-1 globuline	A2B2(H2M2)	3	5	27
LDH 1	B-2 globuline	A1B3(H1M3)	0	17	24
LDH 1	γ - globuline	B4	0	78	37
H- simboli i monomerit A (Heart) M- simboli i monomerit B (Muscle)					

Për të matur përqëndrimin e LDH në serum janë përpunuar metoda të sakta analitike bashkëkohore. Ndër to më të përdorshme në praktikën e mjeksisë laboratorike janë metoda kinetike e analizës enzimmatike dhe elektroforeza në xhel poliakrilamidi. Këto metoda lejojnë përcaktimin e shpejtë dhe të saktë si të LDH- totale ashtu dhe të izoenzimave të saj.

1.8 Shkaqet e rritjes jo specifike të markuesve tumoralë

Përveç pranisë së tumoreve malinjë apo progresimit të tyre, përqëndrimi i markuesve tumoralë mund të gjendet i rritur dhe për shkaqe të tjerë patologjike. Në mënyre skematike këto mund të ndahen në katër kategori:

- a) Probleme fiziologjike dhe zakone si p.sh. pirja e duhanit.
- b) Shkaqe jatrogjenike por të pa lidhura me trajtime onkologjike.
- c) Patologji beninje ku markuesit tumoralë rriten në mënyrë të moderuar.
- d) Shkaqe jatrogjenike.

Dukurite fiziologjike, zakonet e vullnetshme apo shkaqet jatrogjenike që nuk korelojnë direkt me trajtimin e tumorit, paraqiten në tabelën e mëposhtme.

Dukuria më fiziologjike ku markuesit tumoralë rrisin vlerat e tyre pa praninë e patologjive malinje është gravidanca.

Në tabelën e mëposhtme paraqitet kjo dukuri:

Tabela Nr.3. Kushtet principale jo patologjike, ku vihen re nivele të rritura të markuesve tumoralë pa prani të patologjisë malinje

Kushtet fiziologjike apo jatrogjene	Markuesi tumoral
Gravidanca	AFP, hCG, MCA, CA - 125
Cikli menstrual	CA – 125
Duhan pirja	CEA
Terapia me hekur	Ferritina
Transfuzionet e gjakut	Ferritina
Kateterizimi vezikal	PAP, PSA

Në mjaft patologji beninje vërehet gjithashtu një rritje e moderuar e përqëndrimit të markuesve tumorale pa praninë e patologjive malinje. Është e rëndësishme të vihet në dukje një rritje e markuesve tumorale sidomos në patologjitë inflamatore të indeve dhe të organeve.

Në tabelën e mëposhtme jepen patologjitë kryesore ku vihet re kjo dukuri:

Tabela Nr.4. Kushtet principale patologjike ku rriten disa markues tumorale.

Patologjia beninje	Markuesi tumoral
Hepatopati kronike	CEA, CA – 19.9, CA – 15.3, CA – 125, CA – 50
Ikteri	CEA, TPA, Ferritina, CA – 19.9, CA – 50
Bronko – pneumopatia kronike	CEA, TPA
Asciti peritoneal	CA – 125
Versamenti pleurik	CA – 125, TATI
Endometriti	CA – 125
Pankreatiti (akut apo kronik)	CA – 19.9, CA – 125
Nefropatia kronike	CEA, TPA
Tireopatiti	TG
Hipertrofia e prostatës	PAP, PSA
Retensioni urinar	PAP, PSA
Psoriazis	SCC
Sëmundje reumatike	CA – 19.9
Diabeti	CA – 19.9, CA 50

KAPITULLI I DYTË

2. Metodologjia e dozimit të markuesve tumoralë

Teknologjia e hibridizimit qelizor ka siguruar prodhimin e antikorpeve mononukleare, të cilët janë specifike për antigene të ndryshëm të determinues, të pranishëm në molekule. Disponibiliteti i antikorpeve monoklonale si reagente specifike ka çuar në përpunimin dhe standartizimin e sistemeve të reja të dozimit. Kjo ka çuar në një dozim të saktë të markuesve tumorale dhe përdorimin e gjërë të tyre në praktiken klinike. Sistemet e dozimit aktualisht të përdorur për dozimin e pothuajse gjithë markuesve tumorale janë të tipit imunologjik dhe si rrjedhojë bazohen në lidhjen molekulare specifike midis antigenit dhe antikorpit. Në këtë mënyrë mbas veprimit katalitik antigen-antikorp kalohet në fazën e matjes e cila realizohet në dy mënyra.

- Sisteme që përdorin për matje izotopet radioaktive.
- Sisteme që përdorin për matje substanca joradioaktive të tilla si:
kromogjene ngjyruar, lëndë fluoreshente, lëndë lumineshente.

Skema principale e reaksionit analitik jepet me poshtë:

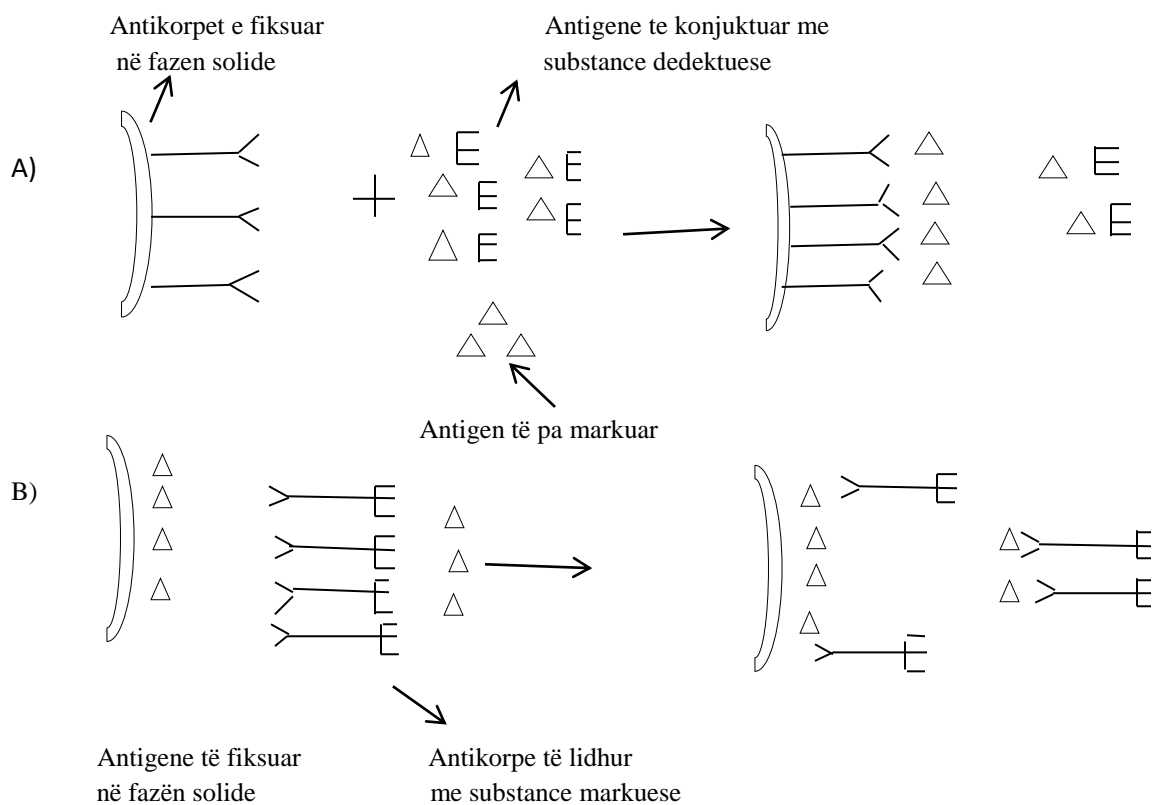


Figura 1, Sistemi kompetitiv (konkurrenues)

Në këtë metode antigeni mund të jetë i lidhur me izotop radioaktiv, i cili rrezaton rreze gamma. Në këtë rast, kemi të bëjmë me metode radioimunologjike që njihet me simbolin RIA. N.q.s me izotop radioaktiv markohet antikorpi, atëhere kemi të bëjmë me metodën radioimunologjike që quhet IRMA. Në sisteme që përdorin (rivelatore) jo radioaktive, antikorpet specifike mund të jenë të markuar me enzima dhe kemi të bëjmë me metodën imunoenzimatike që njihet me simbolin EIA. Një tip tjetër i dozimit imunometrik, që përdoret për matjen e markuesve tumoralë, është ajo e sistemeve jokompetitive (jo konkurues).

Skema e një sistemi të tilla paraqitet në skemën e mëposhtme:

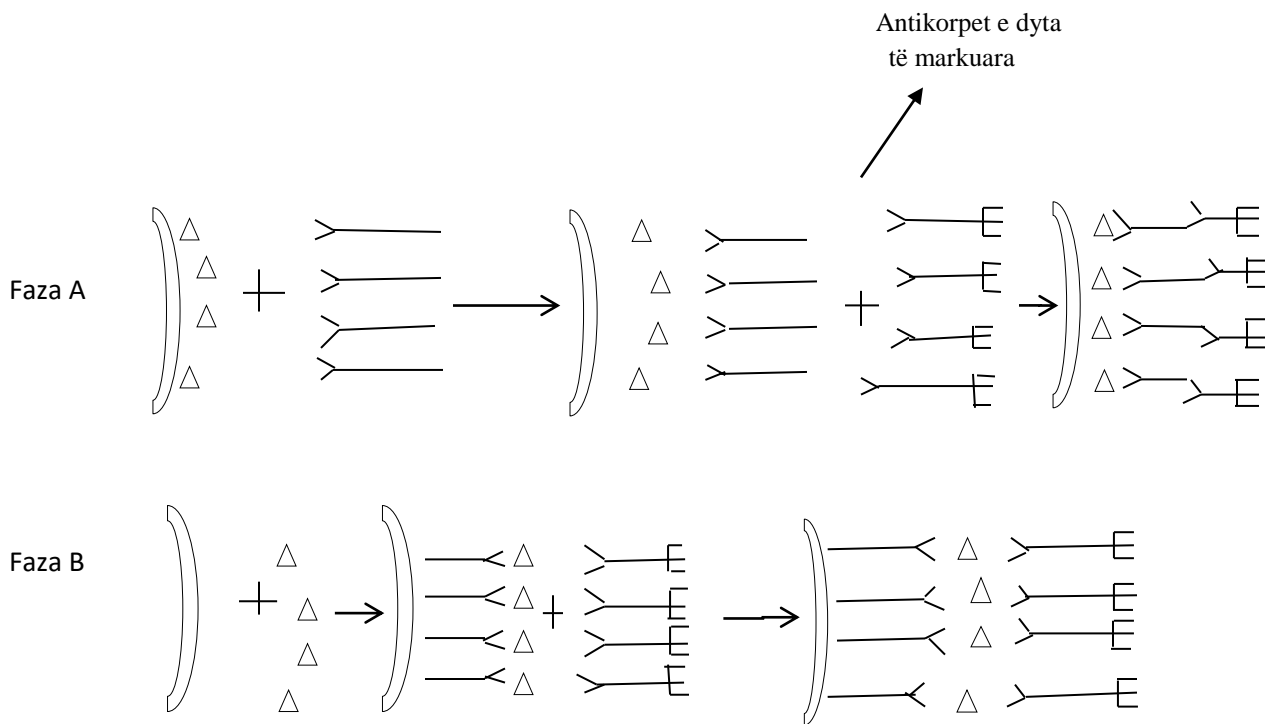


Figura 2, Skema e dozimit imunometrik jo kompetitiv të markuesve tumoralë.

Përcaktimet imunokimike të tipit optik

Përcaktimet imunokimike homogjene të tipit optik paraqesin në përgjithësi disa përparësi në krahasim me metodën RIA. Në metodën RIA, si e kemi theksuar antikorpi është i

markuar me enzima (të cilat zbërthejnë një substrat, që jep produkt me ngjyrë), me substanca fluoreshente, apo me substanca kemiolumineshente.

Në tabelën e mëposhtme, bëhet krahasimi i këtyre metodave, nga del në pah, përparësia e metodave optike.

Tabela Nr.5. Krahasimi midis metodës RIA dhe metodës imunokimike homogjene të tipit optik.

Karakteristikat e metodës	RIA	Imunokimike optike
Norma speciale sigurie	Po	Jo
Procedure e thjeshtë e markimit	Po	Po
Konservimi kufizuar i markuesit	Po	Jo
Domosdoshmëri e ndarjes “B/F”	Po	Jo
Koha e matjes së sinjalit analitik	E moderuar	E shpejtë
Preçizioni	I moderuar	I larte
Ndjeshmëria	1 pg/ml	1 ng/ml
Mundësi interference të sinjalit analitik	Jo	Po
Automatizimi i metodës	I pjesshem	Total

Përcaktimet imunoenzimike

Prej shumë kohësh, në laboratorët e kimise klinike të anatomise dhe histologjise patologjike, përdoren teknikat imunokimike të bazuara në përdorimin e antikorpeve të lidhur në mënyre kovalente me enzima, të cilat janë të afta të zbërthejnë një substrat specifik në një produkt të ngjyrosur. Dozimi i parë imunoenzimatik është bërë për herë të parë në vitin 1970 nga Engvall dhe Perlmann, për dozimin e IgG të lepurit. Për të realizuar qëllimin e tyre, autoret përdoren si gjurmues (traciant) IgG e lepurit të markuar me fosfataze alkaline.

Sot është bërë e mundur të përcaktohet me anë të kësaj teknike pjesa më e madhe e hormoneve, markuesve tumoralë dhe analiteve të tjera. Përbërsit kryesore të një përcaktimi imunoenzimatik “EIA” për një analit të dhënë janë:

- Analiti markohet me një enzimë specifike (funksioni i gjurmuesit apo traciantit).
- Antiserumi (ose antikorpi monoklonal)specifik kundrejt analitit.

- Një substrat kimik specifik, i aftë të prodhojë një produkt, i cili siguron një sinjal optikisht të matshëm. Ky produkt është rrjedhojë e bashkëveprimit katalitik substrat-enzimë.
- Ndërtimi i lakores së kalibrimit.
- Matja e kampionit biologjik.

Në figurën e mëposhtme tregohet qarte ecuria e këtij procesi analitik.

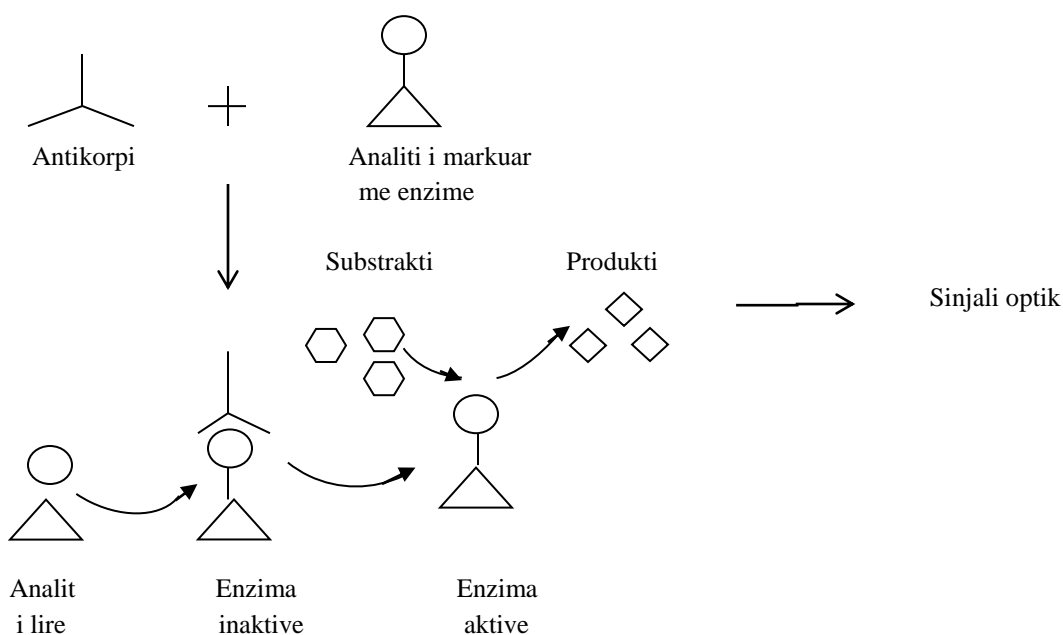


Figura 3. Skema e një dozimi imunoenzimatik “EIA” e tipit homogjen.

Substanca që analizohet (analiti) e markuar me enzime lidhet me antikorpit specifik. Në këtë fazë aktiviteti i enzimës është i bllokuar (inhibuar) ose i ngadalsuar. Substanca që analizohet, e pranishme në materialin biologjik apo në tretësirat standarte zhvendos një pjesë të gjurmuesit (traciantit) të antikorpit specifik, duke aktivizuar në këtë mënyrë enzimën. Enzima e aktivizuar në këtë mënyrë vepron mbi substratin. Nga bashkëveprimi enzime-substrat lind një produkt i cili paraqet veti optike që mund të jenë ngjyra të matshme në spektrin e dukshëm, veti optike në spektrin ultraviolet i aftë (p.sh. absorbim në 340 nm i NADH), veti turbidimetrike etj. Variacioni që manifestohet në aktivitetin enzimatik shkakton një variacion konseguent të sinjalit optik. Madhësia e sinjalit optik apo intensiteti i tij është në përpjestim të drejtë me analitin e lire në mjedisin e reaksionit.

Sinjali optik i prodhuar si rrjedhoje e zhvillimit të reaksionit analitik amplifikohet, përderisa enzima që çlirohet në gjëndje aktive katalizon transformime të shumta të substratit. Përcaktimet imunoenzimatiqe përdoren gjithashtu edhe për analiza të tipit kinetik në të cilën shpejtësia e transformimit të substratit është në përpjestim me aktivitetin e enzimes.

Dozimet imunoenzimatiqe heterogjene

Në këtë metode aktiviteti i enzimes mbetet i pandryshuar gjatë zhvillimit të reaksionit antigen-antikorp. Në këtë metode përdoren në përgjithësi antikorpe të markuar me enzime. Metoda më e njohur, që i takon këtij tipi është metoda “ELISA” (nga anglishtja: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Kjo metode ka përparsine e përdorimit të teknologjise në faze solide dhe të imunoreagenteve te markuar me enzime.

Metodat e para “ELISA” ishin të ngjashme me atë RIA (sita antikorpalet në mjedisin e reagentit). Sot përpunohen metoda “ELISA” të bazuara në tepicën e antikorpeve të markuara. Këto metoda janë në përgjithësi të tipit “Sandwich” ose “imunometrike”. Në figurën e mëposhtme jepet metoda “ELISA” në trajtë skematike, në formën më të thjeshtë të saj.

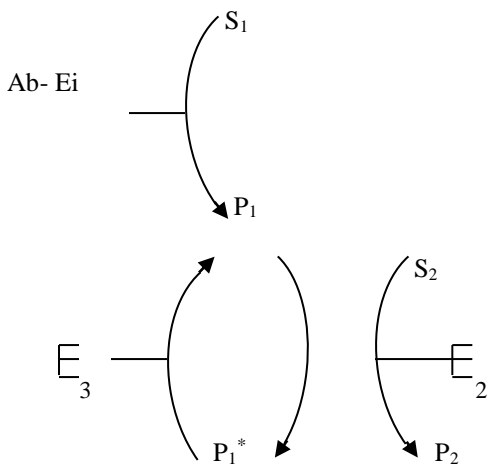


Figura 4, Parimi i dozimit “ELISA”, i amplifikuar.

Antikorpi A_b është i konjuguar me enzimen E_1 , e cila katalizon shënderrimin e substartit S_1 në produktin P_1 , në inkubimin e pare analitik. Më tej, në mjedisin analitik shtohet një tretësire amplifikuese, që përmban enzimën e dytë. Kjo enzimë shënderron substratin S_2 në produktin P_2 duke përdorur produktin P_1 si kofaktor. Enzima E_3 lejon rikuperimin e P_1 duke bërë të mundur lejimin e procesit që nga çdo molekulë e P_1 e prodhuar në reaksionin

e pare, të marre pjesë në formimin e shumë molekulave të P_2 . Produkti i ngjyrosur P_2 mund të amplifikohet rreth 100 here sipas veprimit direkt të E_1 si substrat kromogjenik (që jep një produkt me ngjyrë të forte). Metoda “ELISA” e lartpërmendur e njohur me emërtimin “Sandwich” është veçanërisht e përdorshme për dozimin e analiteve të pranishëm në një përzirje komplekse, siç është p.sh serumi i gjakut.

Duke përdorur si markues enzimen “fosfatazen alkaline” janë përpunuar shumë metoda për përcaktime shumë të ndjeshme të HCG, LH, FSH etj.

Për sistemet e metodës “ELISA” mund të përdoren të gjitha enzimat që mund të lidhen me imunoreagente.

Kërkesat që vihen para këtyre enzimave kanë të bëjnë me qëndrueshmërinë e tyre, koston e ulët ekonomike, si dhe zotërimin e një shpejtësie të lartë të lëvizjes, të qarkullimit të tyre. Enzimat më të përdorura, që gëzojnë vetitë e mësipërme janë fosfataza alkaline, betagalaktozidaza, peroksidazat, glukozoksidaza, ureaza, penicilinaza etj.

Substratet më të përdorshme janë o-tuloidina, 2, 2 azino-di/3-etilbenzotiozolina sulfonati me iniciale ABTS, o-fenilendiamina, acidi aminesalicilik.

Një lakore kalibrimi tipike për metoden “ELISA” jepet në figurën e mëposhtme.

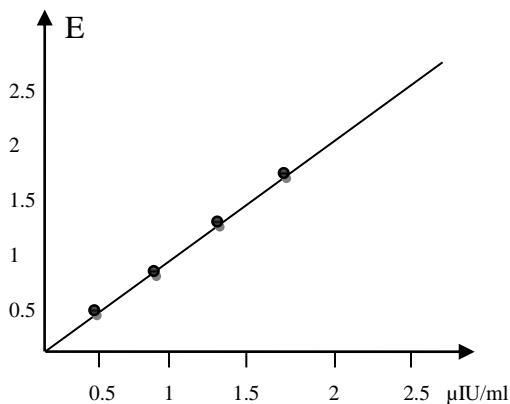


Figura 5, Lakorja e kalibrimit për përcaktimin e CEA me metoden “ELISA”.

Metodat imunoenzimatiqe në kohën e sotme përdoren gjerësisht në laboratorët mjeksorë. Ato përfshijnë fusha të tilla të gjëra si hormonologjia, onkologjia, sierologjia, farmakologjia, toksikologjia etj. Kjo për arsye se metodat imunoenzimatiqe janë të thjeshta, të shpejta dhe të sakta. Ato mund të përdoren për të bërë matje të sakta në një numër të vogël mostrash analitike apo në një numër të madh mostrash analitike.

Metodat imunoenzimatiqe mund të gjysëm automatizohen ose të automatizohen krejtësisht.

Sasite e materialit biologjik që kërkojnë këto metoda janë shumë të vogla, 10 deri në 50 mikrolitra (μl) gjak, serum apo urine. Kjo bën të mundur që me anë të metodave imunoenzimike të bëhen matje në gjak kapilar ose me mostra gjaku neonatal.

Sot teknikat imunoenzimike janë të disponueshme në trajten e kiteve, që përmbajnë reagentë të gatshëm të një cilësie të larte dhe tretësira standarte të gatshme në përdorim.

Mangësite e metodave imunoenzimike janë dy:

Kosto e larte e reagentëve.

Pandjeshmeri relative analitike për disa përcaktime, në krahasim me metodën “RIA”.

Një përmirësim i ndjeshëm analitike mund të arrihet me metodat që përdorin përthithjen në pjesën ultraviolet të spektrit, për të matur pikën finale të reaksionit duke konvertuar sinjalin optik në një matje të fluoreshencës.

Përcaktimet fluoroimunometrike

Përcaktimet fluoroimunometrike “FIA” (nga gjuha angleze: Fluoro Immuno Assay) janë huazuar në përdorimin e substancave organike fluoreshente. Këto substanca zgjidhen të tilla, që të japin një fluoreshence me zgjatje të shkurtër kohe.

Substanca të tilla janë izotiocianati i fluoreshines (FITC), rodamina dhe umbiliferoni. Është e rëndësishme të vihet në dukje që metoda e fluorometrise konvencionale paraqet probleme të shumta analitike. Një nga këto probleme është ndarja e fluoreshencës të emisionit nga ajo e eksitimit. Kjo ka të bëjë me dukurite fizike të njohura si efekti “scattering” i Rayleigh, efekti “scattering” i Raman. Gjithashtu duhet marre në konsiderate fluoreshenca e fonit (që ndodh në kyvetën matëse të fluorometrit dhe fluoreshenca që jep përmbajtja e serumit që po analizohet).

Diferenca midis gjatësisë së vales (λ) të eksitimit dhe asaj të emisionit e njohur me emërtimin “stokes shift” shërben për të realizuar një matje të fluoreshencës në mënyre optimale, për këtë arsye kjo diference duhet të jetë sa më e madhe që të jetë e mundur. Zakonisht në këtë metode fluoreshenca eksitohet me gjatësinë e vales 490 nm emetohet në gjatësinë e vales 520 nm.

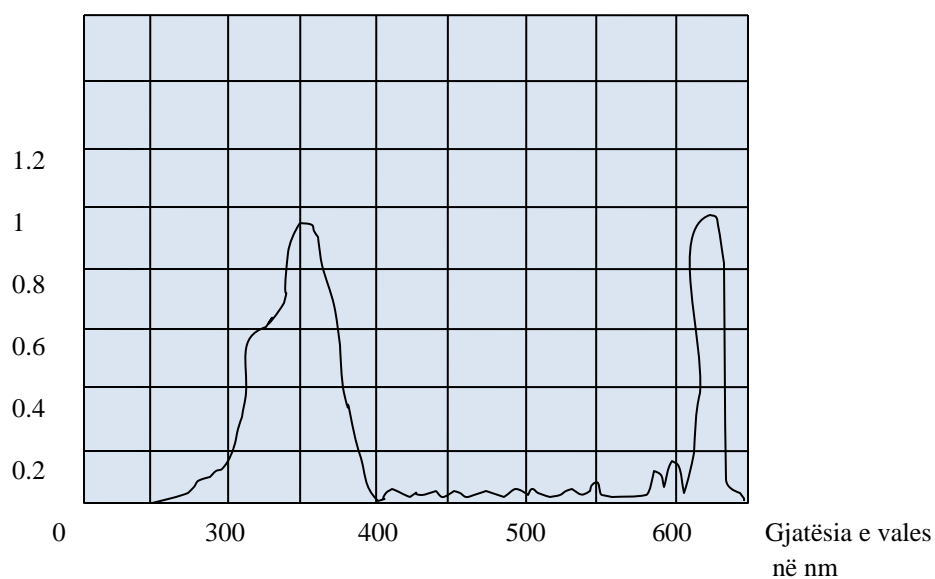
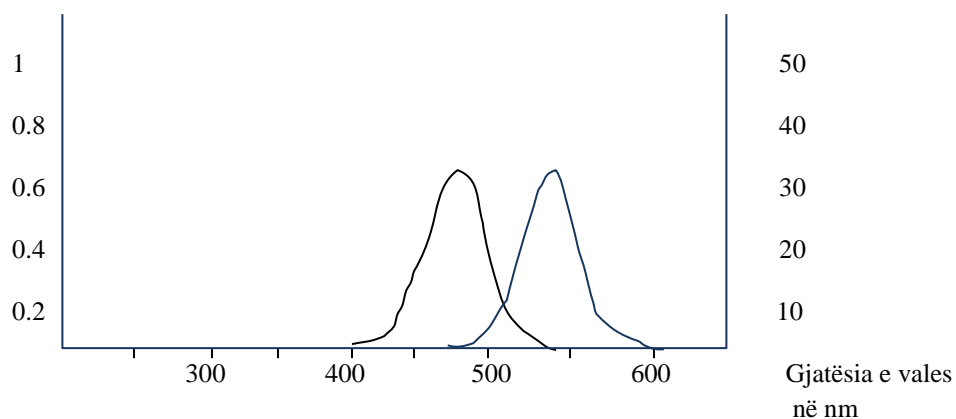


Figura 6 dhe 7, Spektrat e eksitimit dhe të emisionit të izotiocianatit të fluoreshinës dhe të elementit europium.

Në figurat e mësipërme janë treguar spektrat e eksitimit të emisionit të izotiocianatit të fluoreshinës dhe të europiumit.

Duhet të vënë në dukje se kur serumi i gjakut human ngacmohet me rrezatim ultraviolet me gjatësi vale 340 nm, ai jep një rrezatim emisioni fluoreshent me gjatësi vale 500 nm.

Duke u mbështetur në të dhënat e mësipërme kuptohet lehtë që vetëm me metodën e fluoreshencës klasike, është e vështirë të kryhen matje të sigurt të analitit (substancës që analizohet) në serum të gjakut të njeriut.

Në qoftë se substanca që analizohet është me gjak me përqendrime të larta (siç ndodh kur maten proteinat apo medikamentet në gjak) saktësia e metodës është shumë e mirë. Në rastet e tjera të përcaktimit, në matje me fluoreshencë, gjithmonë është i pranishëm një sinjal i fonit që ka madhësi të lartë e të ndryshueshme.

Amplifikimi enzimatik i sinjalit fluoreshent ose fluoreshenca e dritës së polarizuar kanë përmirësuar në mënyrë të dukshme përdorimin e “FIA” në imunokimie analitike.

Në thelb përcaktimet fluorimunokimike kanë përmirësuar ndjeshmërinë analitike në krahasim me metodën imunoenzimatike.

Përcaktimet “FIA” homogjene

Metoda e parë e këtij lloji është ajo që njihet me emërtimin “FPIA” (nga anglishtja: Fluorescence Polarization Immuno Assay). Metoda e dytë, gjithashtu e bazuar në fluoreshencën e dritës së polarizuar, njihet me emërtimin “SLFIA” (nga anglishtja: Substrate Labeled Fluorescent Immuno Assay), e cila përdor një substrat të markuar. Metoda “FPIA” (e komercializuar nga kompania “ABOOTT” në aparat TDx) shfrytëzon shpejtësinë e ndryshme të rrotullimit të analitit të markuar me fluorofor kur analiti është lidhur me antiserumin dhe kur është i lirë. Në qoftë se një moster analitike fluoreshente ndriçohet nga një rreze drite e polarizuar, shkalla e polarizimit të dritës së emetuar (rrezatuar) nga kampioni fluoreshent ndryshon në varësi të dimensionit gjeometrik të molekulës që përmban fluoroforin. Për këtë molekulë është e mundur të përcaktohet sasia e antigeneve të markuar të lidhur me antikorp të lirë, duke bërë të mundur përcaktimin e përqendrimit të substancës që analizohet. Ky tip përcaktimi kërkon përdorimin e një polarizatori të instaluar në një fluorometer. Ky polarizator është i përbërë nga filtra polarizues prej kristalesh të lëngët, të cilët janë të afte të masin dritën e rrezatuar në dy plane të vendosur 90° njëri ndaj tjetrit.

Polarizimi “P” matet në “njësi arbitrare” dhe shprehet me anë të raportit:

Intensiteti i dritës së polarizuar vertikalisht-Intensitetin e dritës së polarizuar horizontalisht
P=-----

Intensiteti i dritës së polarizuar vertikalisht-Intensitetin e dritës së polarizuar horizontalisht

Polarizimi i matur do të jetë atëhere në përpjestim të drejte me përqendrimin e hormonit apo markuesit tumoral të markuar dhe të lidhur me antikorpin specifik. Në të kundërt, polarizimi i matur është në përpjestim të zhdrejte me përqendrimin e markuesit tumoral në gjëndje të lire, i pranishëm në mjedisin e reaksionit. Përderisa në sistemin “FPIA” (Abbott-TDx) matet një variacion i polarizimit të dritës, interferenca që vjen nga fluoreshenca jo specifike do të zvoglohet në minimum. Megjithatë, kur maten përqendrime të ulta të hormoneve, markuesve tumoral apo analiteve të tjerë është e domosdoshne të bëhet një korrigjim i blankut të matjes. Në figuren e mëposhtme jepet skema analitike e metodës “SLFIA”.

Skema e dozimit “SLFIA”

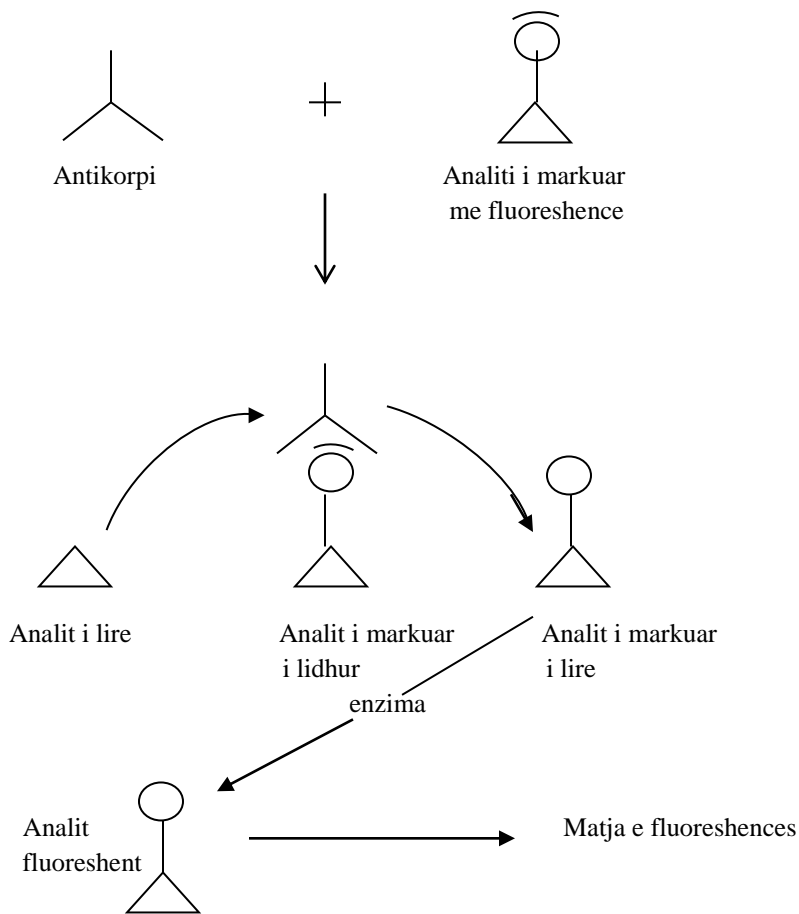


Figura 8, Skema e dozimit “SLFIA”.

Nga skema analitike e metodës “SLFIA” shihet qarte që përdoret një enzime e posaçme për të çliruar fluoroforin nga molekula e analitit të markuar. Metoda “SLFIA” përdor një gjurmues (traciant) të përbërë nga analiti i markuar me fluorofor.

Fluorofori është “beta-galaktozil-umbiliferon” dhe është një bashkëdyzim që funksionon si një substrat. Gjithashtu në këtë metodë përdoret një antikorp specifik ndaj analitit që analizohet, enzima beta-galaktoosidaze, si dhe kampioni biologjik (serum i gjakut) që do të analizohet. Enzima hidrolizon lidhjen kimike që bashkon umbeliferonin me grupin beta-galaktozil për të dhënë substancën fluoreshente. Megjithatë duhet theksuar se enzima nuk mund të ndërveproje me analitin e markuar për sa kohe ndodhet e lidhur me antikorpin specifik ndaj analitit. Analiti që përmbahet në kampionin biologjik konkuron me analitin e markuar nëpërmjet qendrave (sitave) të lidhjeve antikorpale dhe çdo molekulë e analitit të markuar në gjëndje të lire hidrolizohet nga enzima. Në përfundim të procesit analitik, do të kemi një intensitet të fluoreshencës së matur, i cili do të jetë në ndryshimin proporcional me përqendrimin e analitit në serum in e gjakut, apo në lëngje të tjera biologjike.

Metoda “FIA” heterogjene

Metoda më efikase për të eliminuar interferencat në matjen e fluoreshencës është ajo e realizimit të një përcaktimi të tipit heterogjen. Në figuren e mëposhtme jepet skema analitike e një dozimi të këtij tipi:

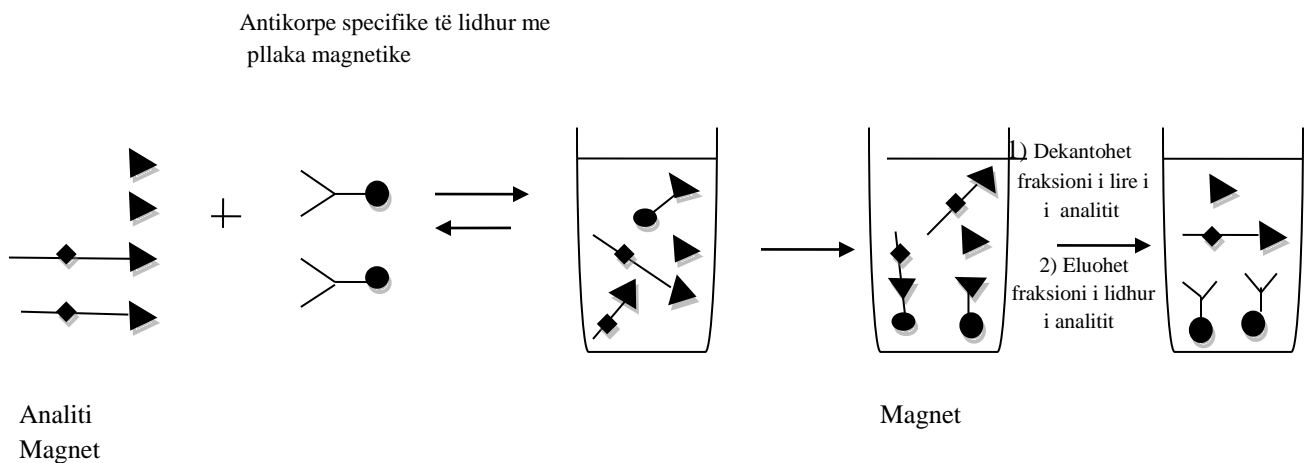


Figura 9, Dozimi fluoroimunokimik “FIA” i tipit heterogjen që përdor grimca magnetike (–) për të kryer ndarjen “B/F”.

Ky tip përcaktimi përdor një analit të markuar me një substance fluorofor, një antikorp specifik të lidhur me grimca magnetike dhe materialin biologjik për tu analizuar. Analiti i pranishëm në materialin biologjik konkuron me atë të markuarin nëpërmjet sitave të lidhjeve të antikorpit. Pjesa e analitit të markuar që mbetet e lirë ndryshon në mënyre

korrelative në lidhje më përqendrimin e analitit të pranishëm në materialin biologjik. Analiti i lidhur më antikorpin specifik ndahet nga analiti i lire më ane të aplikimit të një fushe magnetike në tubin ku zhvillohet reaksioni analitik.

Në mënyre suksesive analiti i lire (i markuar apo jo) i pranishëm në lengun supernatant, eleminohet me anë të procedurës së dekantimit. Analiti i lidhur me antikorpin, pas hollimit me tretësie buferike sedimentohet në fundin e tubit analitik më anë të fushës magnetike. Më tej matet fluoreshenca e pranishme në supernatant. Intensiteti i fluoreshencës së matur ndryshon në përpjestim të zhdrejtë me përqendrimin e analitit të pranishëm në kampionin biologjik.

Ndarja “B/F” e realizuar më ane të përdorimit të antikorpëve të lidhur më grimca magnetike lejon të eleminohet faza e centrifugimit. Kjo mundësi bën që të rritet shpejtësia e metodës, ndersa matja e fluoreshencës bëhet direkt në supernatant, pasi antikorpët janë precipituar në fund të epruvetës si rrjedhojë e veprimit të fushës magnetike.

Disa teknika të tjera “FIA” heterogjene për të realizuar ndarjen “B/F” përdorin metoda të tjera analitike. Një nga keto metoda është përdorimi i tretësirave të sulfatit të amonit me përqendrime të përshtatshme. Sulfati i amonit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ realizon precipitimin e imunokomplekseve antige-antikorp. Një mundësi tjetër teknike është ajo e “fazës solide”, në të cilën molekulat e antikorpëve janë lidhur në sferëza celuloze apo material tjetër inert.

Një teknologji tjetër, shumë interesante dhe krejt e automatizuar për matjen e markuesve tumorale, etj., është sistemi i njohur me emrin “RPIA” (nga anglishtja: Radial Partiton Immuno Assay). Kjo teknologji është komercializuar nga kompania Baxter. Kjo teknologji përfaqëson një teknike imunoenzimike me substrat fluoreshent. I gjithë procesi analitik duke përfshirë dhe ndarjen “B/F” ndodh mbi “faze solide” të përbëra nga fibra qelqi të cilat lejojnë të merret rezultati i pare analitik pas 8 minutash dhe çdo rezultat pasardhet çdo minute. Një përdorim të gjërë në kimin klinike për matjen e markuesve tumorale, etj., ka fituar teknika “FIA” e njohur me emërtimin “TR-FIA” (Time Resolved Fluoro Immuno Assay). Kjo teknologji përdor si gjurmues (traciant) Kelate të Europiumit (Eu) apo të lantanideve të tjera. Në fakt, shumë lantanide gëzojnë vetinë e fluoreshencës. Kur lantanidet në trajten e kelateve përdoren si traciante vihen në dukje përparësi të mëdha analitike.

Së pari, kelatet e lantanideve kanë rendiment të lartë kuantatik.

Së dyti, “stokes’ shift” është jashtëzakonisht i lartë.

Së treti, piku i emisionit është i ngushtë.

Për më tepër, gjatësia e vales së emisionit fluoreshent dhe gjatësia e vales së eksitimit të fluoreshencës janë shumë optimale për analizat e kampioneve biologjike. Këto karakteristika të rëndësishme i bëjnë kelatet e lantanideve të preferueshme në raport me substancat klasike fluoreshente. Në fakt për shkak të fluoreshencës natyrale, të prodhuar nga substanca të ndryshme, të pranishëm në lëngjet biologjike, siç janë proteinat, etj., përdorimi i markuesve klasike fluoreshente shoqërohet me kufizime të medha në ndjeshmërinë analitike të metodave “FIA”. Me kelatet e lantanideve është e mundur të ulët në mënyre të konsiderueshme nivelin e fonit “background” me anë të një matjeje të kujdesshme të fluoreshencës me zvoglim të gjatë të sinjalit. Koha e ulte e sinjalit të fluoreshencës për ketalet e lantanideve është shpesh e rendit 10-100 μ s (mikrosekonda =10⁶ sekonda). Ndërkaq rënia e sinjalit të fluoreshencës të prodhuar nga një kampion tipik biologjik është e rendit 1-20 ns (nanosekonda=10⁹ sekonda). Pikërisht për këtë arsye fluorometrat “TR” (Time-Resolved Fluorometers) të përdorur në kombinimin me kelatet e lantanideve, lejojnë disa rreze madhësie më të ndjeshme se sa matjet e realizuara me fluorometra konvencionale. Një ketal fluoreshent i qëndrueshëm, shumë i përdorshëm në teknologjinë “TR-FIA”, është një derivat i Europiumit (Eu). Bëhet fjalë pikërisht për “EDTA-Eu- β -NTA”(acidi etilendiaminotetraacetik) luan rolin e një substance kompleksuese (formon kompleks kimik) ndërsa “ β -NTA” (2-naftoiltrifluoroacetoni) bën fluoreshente lantanidet.

Parimi mbi të cilin bazohet matja e fluoreshencës në tekniken “TR-FIA”, tregohet skematikisht në figuren e mëposhtme:

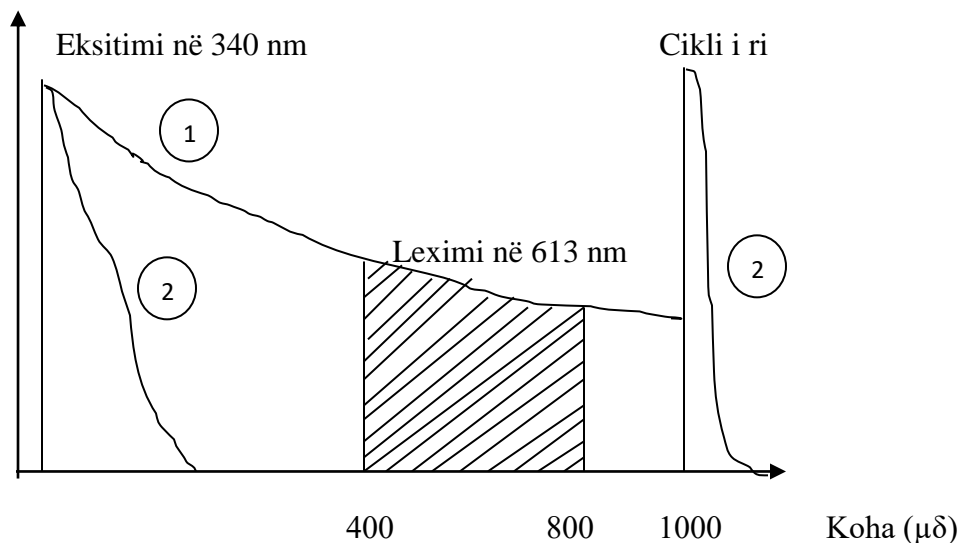


Figura 10, Parimi i matjes së fluoreshencës në matjet me teknologjinë “TR-FIA”

Zgjatja e një cikli është 1 ms (milisekonde) ndërsa impulsi i rrezatimit që eksiton fluoreshencën ($\lambda=340$ nm) zgjat më pak se sa 1 μ s (mikrosekonde). Koha e matjes të

fluoreshencës brenda një cikli është përfshirë midis 400 dhe 800 μ s. Lakorja e paraqet fluoreshencën e dhëne nga kelati i Europiumit. Lakorja 2 paraqet fluoreshencën e fonit.

Në tabelën e mëposhtme jepen kohet e rënies të impulsit të fluoreshencës ($t_{1/2}$) të disa proteinave të serumit, disa tracianteve fluoreshente klasike dhe të kelateve të Europiumit.

Tabela Nr.5, Koha e rënies së sinjalit të fluoreshencës për disa substanca fluoreshente dhe disa proteina thelbësore të organizimit.

Substanca	Koha e rënies së sinjalit në ns
Albumina e serumit të njeriut	4.1
Citokromi C	3.5
Hemoglobina	3.0
Izotiocianati i fluoreshines	4.0
Kloruri i dansilit	14
Kelatet e Europiumit	10^3 - 10^6

Koha e rënies së sinjalit të fluoreshencës (zvoglimit të tij) dhe intensiteti i fluoreshencës të Europiumit (Eu) janë në varesi të forte nga lidhjet kimike, që kelatojnë Europiumin dhe nga ambienti fizik rreth jonit të Europiumit (Eu^{3+}), i cili emeton rrezatimin fluoreshent.

Përderisa emisioni i rrezatimit të fluoreshencës e ka origjinën nga joni i Europiumit, lidhjet organike, të cilat e qarkojnë këtë jon, kanë një funksion shumë të rëndësishëm në procesin analitik global.

Për të shpjeguar rrezatimin fluoreshent të një kelati të Europiumit është propozuar një model, i cili përbëhet nga katër faza.

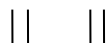
- a. Eksitimi me anë të rrezatimit i lidhjes organike.
- b. Bashkëveprimi brenda sistemit midis lidhjes së eksituar (energji e eksitimit do të kalojë nga gjendja e eksituar e një singoleti në gjendjen e eksituar të një tripleti të lidhjes).

- c. Transferimi brenda molekular i energjise (energjia do të transferohet nga gjëndje e eksituar e një tripleti të një lidhjeje, ne nivelet e rezonances të jonit europium).
- d. Emisioni i rrezatimit fluoreshent nga ana e jonit Europium.

Spektri i emisionit të fluoreshencës të jonit Europium është një karakteristike e vete jonit metalik. Përsa i përket emetimit dhe intensitetit të fluoreshencës kemi një varesi të tyre nga mjedisi që rrethon jonin, duke përfshirë ketu dhe vetite fiziko-kimike të lidhjes.

Modifikimet e ketij mjedisi rreth jonit Europium do të ndikojne në emërtimin dhe intensitetin e fluoreshencës.

Shumë tipe të “β-diketoneve” (R1-C-CH2-C-R2) janë në gjëndje të kelatojne jonet Eu^{3+}



si dhe kane veti karakteristike për eksitim. Kur ndryshojne grupet R1 dhe R2, ndryshon gjithashtu intensiteti i fluoreshencës së emetuar. Intensiteti i fluoreshencës ndikohet gjithashtu dhe nga natyra kimike e solventit që rrethon kelatin e jonit Europium. Në tretësira ujore vihet re një “quenching” që shkakton një humbje të energjisë, në formen e nxehtësise nga kompleksi i eksituar në molekulat e ujit, që e rrethojne. Për të shmangur këtë dispersion të energjisë përdoren detergjente jo-jonike (psh “Triton x-100”. Këta detergjente tresin në fazen micelare përbërsin organik pak të tretshëm dhe largojne nga afersia e kelatit të jonit Europium molekulat e ujit. Izolimi i kompleksit fluoreshent nga molekulat e solventit mund të bëhet shumë mirë duke shtuar në mjedisin analitik oksid të trictifosfinës.

Në figuren e mëposhtme jepet skema e plote e gjithë procesit.

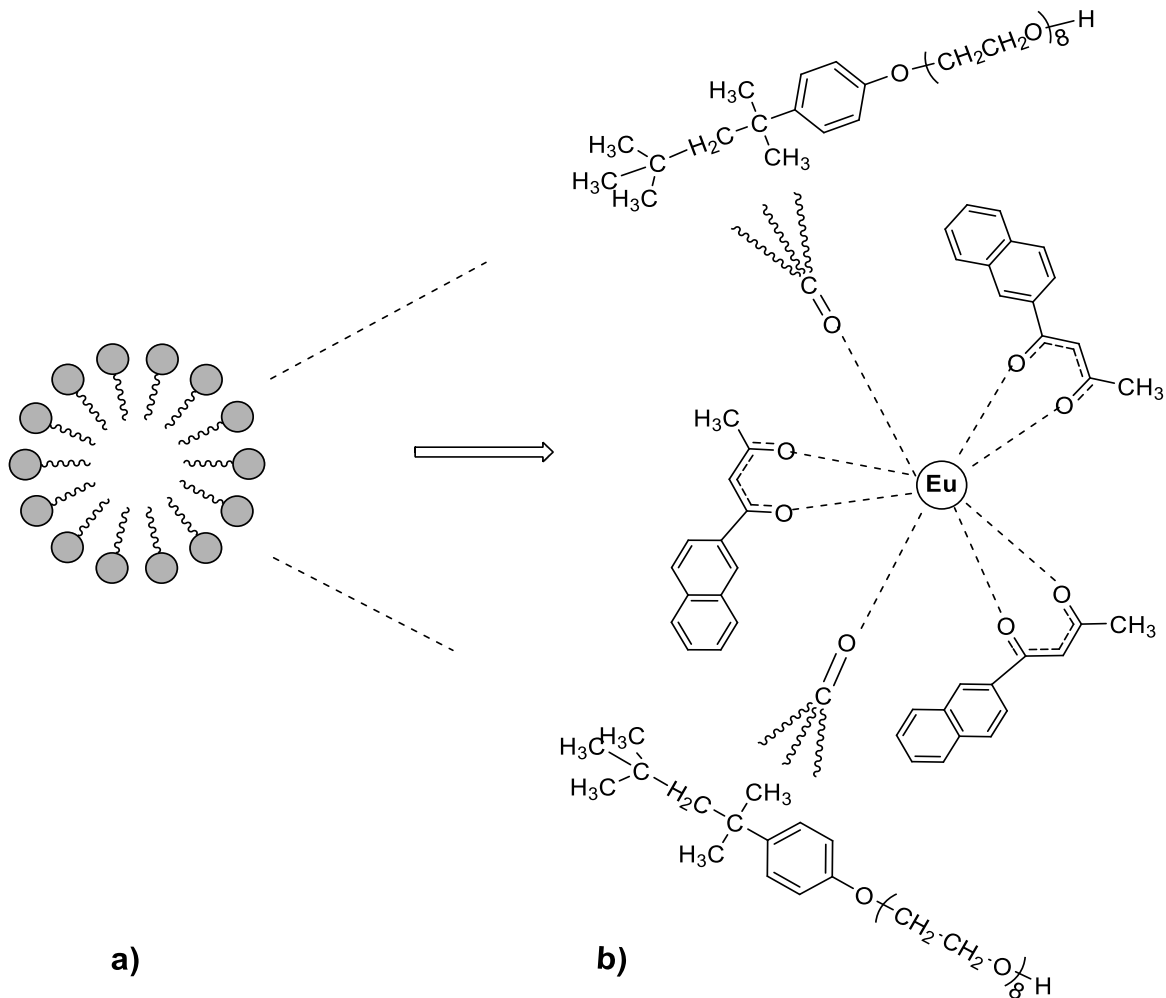


Figura 11, Dozimi “TR-FIA” që përdor kelate të Europiumit (Eu) të tretur në micela të “Triton x”.

- Një micela e përbërë nga molekula të “Triton x-100” me numër asociacioni rreth 140, në të cilën është tretur kelati i Europiumit fluoreshent.
- Forme e mundshme e kelatit të Europiumit, të përbërë nga një jon Europium, tre molekula të “2-naftoiltrifluoroacetone” dhe dy molekula të “oksidit tre (n-otil) fosfine”, që shërben si një tretës në strukturën e “Triton x-100”.

Kur kushtet analitike të metodës janë optimale dhe për matje përdoret teknologjia “TR” (Time-Resolved) Europiumi mund të matet në një interval përqëndrimesh, që ndryshon nga $5 \cdot 10^{14}$ deri në 10^7 mol/l.

Në këto kushte teknikat “TR-FIA” tentojnë të kapin një ndjeshmëri analitike të ngjashme me atë të teknikave të “RIA” dhe “IRMA” të cilat përdorin gjurmues të markuar me jod radioaktiv ^{125}I .

Përparësitë dhe mangësitë e dozimeve fluoroimunokimike “FIA” jepen si më poshte.

Përparësitë e metodës “FIA”

- a. Diapazon i gjërë i përcaktimit të substancave në lëngjet biologjike, duke përdorur fluoroflorin me të përshtatshëm.
- b. Aparature relativisht e thjeshtë.
- c. Preçizion dhe ndjeshmëri analitike e lartë.
- d. Reagente ekonomike dhe të qëndrueshëm.
- e. Metoda të zbatuara në sisteme homogjene dhe hetrogjene.

Mangësitë

- a. Interferenca nga fluorofort endogjen, të pranishëm në materialin biologjik.
- b. Humbje “Quenching” e sinjalit optik.
- c. Interferenca e lidhjeve jo specifike.

KAPITULLI I TRETË

Pjesa eksperimentale

3. PËRCAKTIMI I CEA ME METODËN E IMUNOFLUORESHENCËS NË PLLAKË NITROCELULOZE DHE KRAHASIMI I SAJ ME METODËN KLASIKE ELISA.

3.1 Metodat analitike për përcaktimin e CEA në serumin e gjakut, janë të shumta. Ndër to po përmendim:

- Metodat radioimunologjike

Kjo metodë bazohet në përdorimin e radioizotopëve radioaktive. Si rrjedhojë e pronësisë së rrezatimeve radioaktive, kjo metodë përdoret gjithmonë e më pak në laboratorët mjekësor.

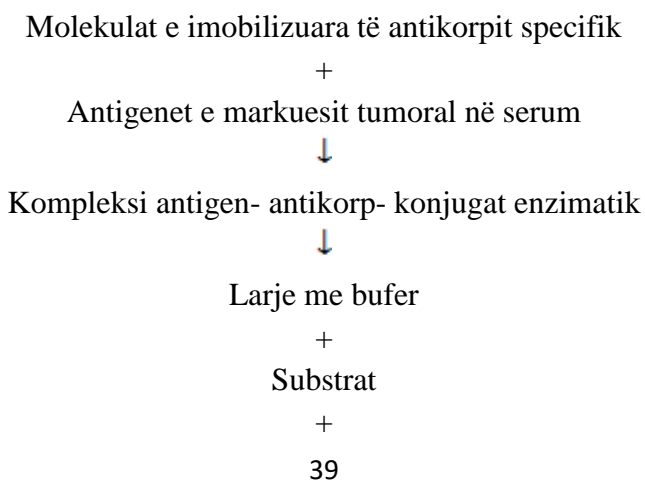
- Metoda e kemiolumineshencës

Kjo metodë, përdoret në laboratorët që kryejnë një numër të madh analizash, pasi ka një shkallë shumë të lartë automatizimi.

- Metoda ELISA.

Kjo metodë është metoda klasike, për përcaktimin e përqendrimit të markuesve tumoralë në serumin e gjakut. Kjo metodë është e saktë, dhe mund të përdoret, në mënyre manuale, gjysëm automatike dhe krejtësisht automatike. Kjo metodë zgjat në kohë dhe për çdo seri matjesh, kërkon përdorimin e lakores së kalibrimit, që rrit koston e saj analitike.

Skema analitike e metodës ELISA është si vijon:



Tretësire stopuese



Formim i produktit të ngjyrosur



Matje në mikro spektrofotometrin ELISA.

Intensiteti i ngjyrës së formuar është në përpjestim të drejtë, me përqëndrimin e markuesit tumoral, të pranishëm në serum in e gjakut.

- Metoda e imunofluoreshencës së polarizuar .

Kjo metodë është e saktë, totalisht e automatizuar, por ka kosto të lartë ekonomike.

Kohët e fundit po përdoret në praktikën laboratorike, një variant novator i kësaj metode, imunofluoreshencës në pllakë nitroceluloze. Në këtë metodë analitike, përdoret teknika sandwich e dedektimit. Në fazën e parë bufferi i dedektimit, i pranishëm në pocetën analitike, përzihet me serum in e gjakut, ku ndodhet CEA, në trajtën e antigenit. Antikorpët analitikë anti-CEA të markuar në mënyre kovalente me një bashkëdyzim fluoreshent (të pranishëm në bufferin e dedektimit) lidhen me antigenët e CEA. Kjo përzjerje analitike hidhet në sistemin e migrimit, i cili përfaqësohet nga një pllakë (matrik) nitroceluloze me kapilarë uniforme. Në këtë sistem gjëndet një bashkësi antikorpësh të CEA, të imobilizuar në rrjetën e kapilarëve uniforme. Përzjerja analitike duke migruar në sistemin kapilar të pllakës së nitrocelulozës kapet nga antikorpët anti-CEA të imobilizuar, duke formuar një sistem të modelit Sandëich. Ky kompleks i nënshtrohet rrezatimit analitik, si rrjedhojë e të cilit lind rrezatimi i fluoreshencës. Intensiteti i rrezatimit të fluoreshencës, është në përpjestim të drejtë, me përqëndrimin e CEA, në serum in e gjakut. Përparsia e kësaj metode, ka të bëjë me faktin, që lakorja e kalibrimit, është e gatshme, në çipin parametrik, të pranishëm në kitin analitik. Kjo ul në mënyrë të dukshme, koston ekonomike të analizës, dhe kohën e realizimit të saj. Metoda është shumë e përshtatshme për qellime depistimi.

3.2 Përcaktimi i CEA, me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitroceluloze, në 30 subjekte, të shëndoshë.

Është shumë e rëndësishme, të dihet intervali i vlerave normale për çdo analizë mjeksore. Një gjë e tillë, është e domosdoshme për një interpretim sa më të saktë të të dhënave laboratorike. Sipas rekomandimeve të IFCC (International Federation of Clinical Medicine) çdo laborator mjeksor në përputhje me teknologjinë që zotëron dhe kushtet e

popullatës, që mbulon, duhet të përcaktojë intervalin e tij të vlerave normale. Për të nxjerrë intervalin e vlerave normale me metodën e imunofluoeshencës në pllakë nitrocelulozë, në kushtet e laboreve tona u proçedua si më poshtë.

3.3 Përfitimi i materialit biologjik për analizë, dhe metoda analitike e përdorur.

U përzgjedhën 30 subjekte të shëndoshë, jo duhanpirës. Tek këta subjekte, në tuba me xhel aktivizues, u mor gjak me anë të punktimin, në venoz. Tubat u lanë për 10 minuta, në temperaturë ambiente, për tu formuar kuaguli i kuq. Pas kësaj tubat u centrifuguan për 10 minuta me shpejtësi rrotullimi 3000 rrot/min. Në këtë mënyrë u përfuan mostra të pastra serumi, të përshtatshme për të matur përqëndrimin e CEA, në këtë grup subjektësh të shëndoshe. Për përcaktimin e CEA u përdor një kit me imunofluoeshencë në pllakë nitroceluloze të modelit i- Chroma.

Përbërja analitike e këtij kiti është:

- 25 poceta analitike me buffer dedektimi të CEA.

Bufferi i dedektimit përmban antikorpe anti humane ndaj CEA të lidhur (markuar) në mënyrë kovalente, me një bashkëdyzim fluoeshent. Në bufferin e dedektimit, janë gjithashtu të pranishëm antikorpe IgG të serumit të lepurit.

- 25 pllaka nitroceluloze, për proçesim e migrim.

Në rrjetën kapilare ndodhen antikorpe anti-CEA dhe antikorpe IgG të serumit të lepurit.

- Çipi analitik (chip) për metodikën analitike të përcaktimit të CEA.

Në këtë çip, që montohen në mikrofluorometrin që realizon matjet e fluoeshencës, ndodhen të gjitha të dhënat analitike të metodës të përcaktimit të CEA, duke përfshirë dhe lakoren e kalibrimit, që është e vlefshme për këtë kit analitik. Proçedura analitike e përcaktimit të CEA, me metodën analitike të lartpërmendur, kalon nëpër këto etapa.

- 1- Në mikrofluorometër vendoset çipi (chipi) analitik, me të dhënat parametrike të metodës, për përcaktimin e CEA. Ndër këto të dhëna është dhe lakorja e kalibrimit.
- 2- Pocetat analitike, me bufferin e dedektimit, të CEA, nxirren nga frigoriferi dhe lihen të paktën për 10 minuta, që të marrin temperaturën e dhomës.
- 3- Në çdo pocetë shtohen 150 µl serum gjaku. Përzihet mirë përmbajtja e pocetës.

- 4- Nga përzierja analitike e pocetës merren 75 µl përzierje dhe kalohet në të thelluarën migruese, të pllakës të nitrocelulozës. Pllaka lihet për inkubim, 12 minuta në temperaturë dhome.
- 5- Lexohet fluoreshenca e pllakës së nitrocelulozës, në mikrofluorometër. Madhësia e intensitetit të fluoreshencës, nëpërmjet lakores së kalibrimit, që ndodhet në çipin (chip) parametrik të CEA, konvertohet në përqëndrim të CEA, në serum in e gjakut. Me metodën e mësipërme, u percaktua përqëndrimi i CEA, në serum in e 30 subjekteve të shëndoshë. U përdor kiti analitik i-CHROMA CEA dhe matjet u bënë në lexuesin e fluoreshencës i-CHROMA Reader System.

Të dhënat e fituara jepen në tabelën Nr 6.

Tabela Nr.6. Përqëndrimi i CEA, në serum in e gjakut, të 30 subjekteve të shëndoshë, matur me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitroceluloze.

Nr	Përqëndrimi CEA ng/ml
1	1.40
2	1.42
3	2.90
4	2.95
5	1.60
6	1.62
7	3.10
8	3.15
9	2.69
10	2.71
11	3.46
12	3.50
13	5.00
14	5.09
15	4.30
16	4.27
17	2.80
18	2.89
19	3.10
20	3.15
21	5.20

22	5.29
23	2.75
24	2.80
25	3.05
26	2.95
27	2.84
28	5.50
29	2.10
30	2.44

Të dhënat e tabelës Nr.6. u përpunuan statistikisht. U llogarit vlera mesatare \bar{x} , shmangia standarte, deviacioni standart D.S (δ) si dhe intervali $\bar{x} \pm 2\delta$. Të dhënat e fituara nga përpunimi statistikor, paraqiten në tabelen Nr.7.

Tabela Nr.7, Vlerat normale të CEA, matur me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë, në kushtet e laboratoreve tona.

Përqëndrimi i antigenit karcino-embriionar	Numri i rasteve n	Vlera mesatare \bar{x} ng/ml	Shmangia standarte D.S (δ)	Intervali $\bar{x} \pm 2\delta$
Rezultatet e CEA të matura me imunofluoreshencë për subjekte normale	30	3.2	1.18	0.84 - 5.56
Vlerat normale të CEA, të cituara në literaturë	30	2.5	1.25	0 - 5

Nga të dhënat e tabelës, shihet qarte, që vlerat normale të CEA, përcaktuar me metodën e imunofluoreshencës, janë të përaferta me ato vlera, që citohen në literaturë. Ka një ndryshim, në kufijtë e sipërm të intervaleve të vlerave normale.

3.4. Përcaktimi i vlerave normale të CEA, me metodën ELISA, në kushtet e laboratoreve tona

Tek të njëjtët subjekte të shëndoshë, ku u përcaktua përqëndrimi i CEA me metodën e imunofluoeshencës, në pllakë nitroceluloze, u bë dhe përcaktimi i CEA me metodën ELISA. U përdor një kit ELISA klasik, i firmës Diametra, për përcaktimin e CEA në serum in e gjakut. Matjet e densitetit optik u bënë në mikrospektrofotometrin automatik HUMAN READER HS.

Përbërja analitike e kitit është si vijon.

- Poceta mikrotitrimi për metoden ELISA me streptavidinë, të imobilizuar në mënyre kovalente, në paretet e brendëshme të fazës solide të pocetave.
- Seria e tretësirave standarte, me përqëndrim të njohur të CEA.

Standard 0	0 ng/ml
Standard 1	5 ng/ml
Standard 2	10 ng/ml
Standard 3	25 ng/ml
Standard 4	50 ng/ml
Standard 5	250 ng/ml.

Kjo seri tretësirash standarde , është e nevojshme, për të ndërtuar lakoren e kalibrimit.

- Konjugati enzimatik.

Ky reagent përmban antikorpe anti- CEA të lidhur në mënyrë kovalente me biotinë dhe antikorpe anti – CEA të lidhur në mënyrë kovalente me HPR (peroksidazë).

- Tretësirë larëse (wash solution).

Tretësira e mësipërme është koncentrat për të pregatitur 1000 ml tretësire larëse. Koncentrati është buffer kripor MOPS me përqëndrim 5 mol/l.

- Substrat Reagent A.

Përbëhet nga:

3,3'. 5,5' tetrametil benzidinë (TMB) 1 g/l.

Buffer sodium acetat 0.05 mol/l.

- Substrat Reagent B.

Përbëhet nga:

Peroksid hidrogjeni 0.8 g/l

Buffer acetat natriumi 0.05 mol/l.

- Tretësirë stopuese e reaksionit.

Acid sulfurik H₂SO₄ 0.5 mol/l.

Për të pregatitur substratin analitik përzihen në volume të barabarta substrati A dhe substrati B.

Metodika analitike për përcaktimin e CEA në serum, me kitin e mësipërm, u zhvillua sipas këtij protokollit.

- Merren 12 poceta për standardet. Çdo standard matet me 2 paralele (dublikatë) për të siguruar një lakore kalibrimi sa më të saktë. Merren aq poceta sa analiza të CEA, do të realizohen. Pocetat dhe seria e tretësirave standarde lihen të paktën për 10 minuta, në temperaturë dhome. Pocetat vendosen, në pllakën e mikrotitrimin të pranishme në kit.
- Në çdo pocetë hidhet me pipetë automatike nga 25 µl standard nga seria e tretësirave standarde si dhe nga 25 µl serum nga serumet, që do të analizohen, për të përcaktuar përqëndrimin e CEA. Më pas në çdo pocetë shtohet nga 100 µl konjugat enzimatik. Përmbajtja analitike e pocetave përzihet me anë të rotacionit horizontal të pllakës të mikrotitrimin. Seria e pocetave, mbulohet me leter adezive.
- Pocetat inkubohen për 1 orë, në temperaturë dhomë 20⁰-25⁰ C.
- Shplahen pocetat 3 herë me nga 0.3 ml (300 µ) tretësirë larëse dhe thahen.
- Në çdo pocetë shtohet nga 100 µl tretësirë substrati e pregatitur (1 volum substrat A + 1 volum substrat B). Përzihen me anë të rotacionit horizontal të pllakës së mikrotitrimin. Lihen në inkubim për 15 minuta në temperaturë dhome 20⁰ - 25⁰ c. Gjate kësaj kohe ndodh reaksioni kolorimetrik në pocetë dhe formohet një ngjyrë blu.
- Në çdo pocetë pipetohet nga 100 µl tretësirë stopuese e reaksionit. Reaksioni ndërpritet dhe ngjyra e pocetës, kalon nga blu në të verdhë. Përzihen pocetat me anë të rotacionit horizontal të pllakës të mikrotitrimin.
- Maten absorbancat (densitetet optike) e pocetave më mikrospektrofotometrin ELISA. Duke ju referuar lakores së kalibrimit llogariten përqëndrimet e antigenit karcinoembrional në mostrat e analizës. Në figurën Nr.12, paraqitet lakorja e

kalibrimit, për përcaktimin e përqendrimit të antigenit, karcinoembrionar, me teknologjine e lart përmendur.

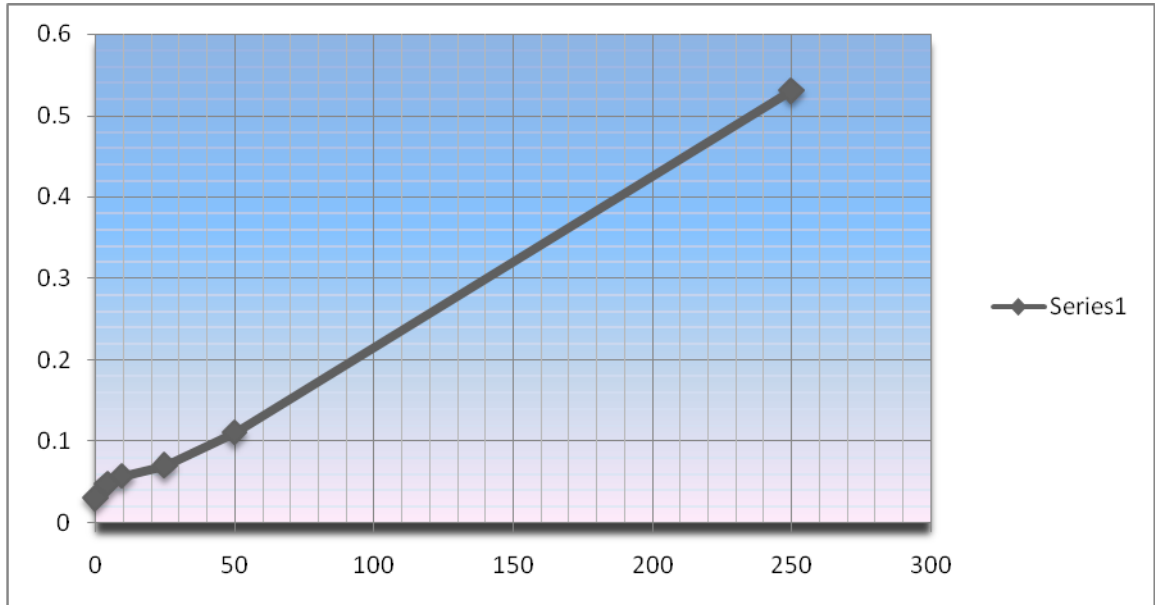


Figura 12, Kurba standarte e CEA

Të dhënat e fituara për përqëndrimin e CEA në serumin e 30 subjekteve të shëndoshë paraqiten në tabelën Nr.8.

Tabela Nr.8, Vlerat e CEA të matura me metodën ELISA, në 30 subjekte të shëndoshë.

Nr	Përqëndrimi i CEA në ng/ml
1	2.5
2	2.6
3	0.4
4	0.5
5	4.4
6	4.5
7	2.6
8	2.5
9	2.4

10	2.35
11	3.5
12	3.4
13	2.6
14	2.9
15	0.6
16	0.5
17	2.7
18	5.0
19	5.1
20	0.4
21	0.5
22	2.9
23	2.8
24	2.7
25	2.5
26	2.6
27	0.6
28	0.3
29	3.0
30	3.2

Të dhënat e fituara në tabelën Nr.8, u përpunuan nga ana matematiko-statistikore u llogarit mesatarja aritmetike \bar{x} , shmangia standarte δ (D.S) si dhe intervali $\bar{x} \pm 2\delta$.

Të dhënat e fituara parqiten në tabelën Nr.9.

Tabela Nr.9, Vlerat normale të CEA, të nxjerra nga matjet në 30 subjekte të shëndoshë me metodën ELISA.

Emërtimi i analizës	Numri i rasteve	Vlera mesatare \bar{x} ng/ml	Shmangia standarte δ	Intervali $\bar{x} \pm 2\delta$.
Përqëndrimi i CEA në 30 subjekte të shëndoshë	30	2.4	1.1	0.2-4.6

Vlerat normale të CEA të cituara në literaturë	30	2.5	1.25	0-5.0
--	----	-----	------	-------

Tabela Nr.9, vë në dukje, që intervali i vlerave normale të CEA, përcaktuar me metodën ELISA, në kushtet e laboratoreve tona, ndryshon pak, në krahasim me intervalin e vlerave normale, që citohet në literaturë.

3.5 Krahasimi i metodës së imunofluoreshencës në pllakë nitroceluloze me metodën ELISA

Metoda ELISA është metoda klasike për matjen e përqëndrimit të antigenit karcinoembrionar CEA. Për këtë arsye bëmë një krahasim midis metodës ELISA dhe metodës imunofluorometrike në pllakë acetat celuloze. Për të realizuar këtë eksperiment u bë fillimisht përcaktimi i CEA, me të dy metodat në pacientë apo subjekte normale. Matjet me metoden ELISA u bënë me një kit analitik ELISA për matjen e CEA, të firmës Human (Germany). Leximet e mostrave analitike u realizuan në lexuesin automatik Human Reader HS. Matjet me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitroceluloze, u bënë me anë të teknologjisë i-CHROMA. Numeri i matjeve për çdo metodë, për subjekte të shëndoshë është 20. Të dhënat e fituara jepen në tabelën e mëposhtme Nr.10.

Tabela Nr.10, Të dhënat e përqëndrimit të CEA në 20 subjekte të shëndoshë, të përcaktuara me metodën ELISA dhe metodën e imunofluoreshencës, në pllakë nitrocelulozë.

Nr	Vlerat e CEA me metodë ELISA ng/ml	Vlerat e CEA me metodën i- CHROMA ng/ml
1	1.0	1.42
2	1.2	1.62
3	2.5	2.95
4	2.65	3.10
5	2.25	2.69
6	3.0	3.46
7	4.6	5.09
8	3.8	4.27

9	2.45	2.89
10	2.70	3.15
11	4.8	5.29
12	2.35	2.80
13	2.60	3.05
14	2.50	2.95
15	2.60	3.05
16	2.4	2.84
17	5.0	5.50
18	1.7	2.10
19	4.7	5.09
20	2.0	2.44

Të dhënat e tabelës Nr.10, u përpunuan nga ana statistikore. U llogarit vlera mesatare \bar{X} , shmangia standart D.S (δ), koefiçenti i korelacionit r, ekuacioni i regresionit i formës $y= ax+b$, dhe T-testi. Të dhënat e fituara jepen në tabelën Nr.11.

Tabela Nr.11, Krahasimi i metodës ELISA me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë, për përcaktimin e CEA në serumit e gjakut.

Metoda analitike	Numri i rasteve n	Vlera mesatare \bar{x} ng/ml	Shmangia standarte δ ng/ml	Parametra të tjerë
Metoda analitike ELISA	20	2.84	1.15	Koeffiçenti i korelacionit $r=0.99$ Ekuacioni i regresionit $y=1.02x-0.4$ T-Testi $t_{log} < t_{tab}$ $p>0.05$
Metoda analitike e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë	20	3.2	1.18	

Të dhënat e tabelës Nr.11, tregojnë që nuk ka asnjë ndryshim statistikiqsh të besueshëm për përcaktimin e CEA, në serumit e gjakut me të dyja metodat. Midis dy metodave ka një korelacion shumë të mirë ($r=0.99$) dhe T-testi (T-testi student) vë në dukje se midis dy metodave nuk ka asnjë ndryshim statsistikisht të besueshëm ($P>0.05$). Kjo do të thotë që të dyja metodat janë të njëvlefshme për përcaktimin e CEA në serumit e gjakut. Që një metodë analitike të jetë e besueshme në praktikën mjeksore, metoda duhet të zotërojë

saktësinë e duhur dhe për vlerat e larta patologjike. Për këtë arsye u bënë matje paralele të përqëndrimit të CEA, me të dyja metodat. Matjet u bënë në serum të 20 pacientëve me patologji malinje të konfirmuar, të cilët i nënshtroheshin mjekimit. Për realizimin e matjeve me metodën ELISA, u përdor një kit analitik i firmës Diametra. Matjet u bënë duke u mbështetur në lakoren e kalibrimit, të ndërtuar me një seri tretësirash standarte me përqëndrime të njohura. Matjet me metodën e imunofluoreshencës u bënë me një kit analitik i-CHROMA CEA. Matjet e imunofluoreshencës janë bërë me lexuesin e fluoreshencës i-CHROMA. Të dhënat e fituara jepen në tabelën Nr.12.

Tabela Nr.12, Krahasimi i metodës ELISA dhe metodës imunofluorometrike në pllakë nitrocelulozë për përcaktimin e CEA në serum të 20 pacientëve me patologji malinje

Nr	Metoda ELISA ng/ml	Metoda e imunofluoreshencës ng/ml
1	5.0	5.5
2	7.0	7.5
3	9.0	9.6
4	3.0	3.5
5	14.0	14.7
6	500.0	510.0
7	15.0	16.0
8	35.0	37.0
9	42.0	43.2
10	24.0	25.0
11	60.0	62.0
12	45.0	46.1
13	40.0	41.2
14	6.0	6.62
15	4.0	4.48
16	51.0	52.4
17	60.0	63.0
18	80.0	82.0
19	15.0	16.0
20	55.0	56.5

Matjet e paraqitura në tabelën e mësipërme u përpunuan statistikisht. Të dhënat e fituara paraqiten në tabelën Nr.13.

Tabela Nr.13, Krahasimi i metodës ELISA dhe metodës imunofluorometrike në pllakë nitrocelulozë për përcaktimin e CEA në serumin e gjakut me patologji malinje.

Metoda analitike	Numri i rasteve n	Vlera mesatare \bar{x} ng/ml	Shmangia standarte δ	T-testi
Metoda analitike ELISA	20	53.5	108	R=0.96
Metoda analitike e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë	20	55.15	110	p>0.05

Tabela Nr.13, krahasimi i dy metodave në përcaktimin e CEA, në patologji malinje. Të dhënat e tabelës vënë në dukje se dhe në rastet patologjike, ku vlerat e CEA janë të larta, metodat e mësipërme analitike janë të njëvlefshme. Metoda klasike ELISA është e përshtatshme për tu përdoruar në ato raste kur numri i mostrave që analizohen është i madh dhe justifikon bërjen e lakores së kalibrimit. Metoda e imunofluoreshencës përdoret në raste të veçanta apo depistime.

KAPITULLI I KATËRT

4 PËRCAKTIMI I ALFAFETOPROTEINËS ME METODËN E IMUNOFLUORESHENCËS NË PLLAKË NITROCELULOZË

4.1 Biokimia e alfafetoproteinës

Alfafetoproteina bën pjesë në proteinat e serumit dhe pikërisht në familjen e α -globulinave. Nga këndvështrimi biokimik alfafetoproteina (AFP) është një glikoproteinë me peshë molekulare 70 KDa (Kilodalton).

Alfafetoproteina sintetizohet në qelizat hepatocitare të mëlçsë dhe gjatë zhvillimit të fetusit. Alfafetoproteina është e pranishme në gjakun maternal dhe në lëngun amniotik, përderisa ajo sekretohet në serumin fetal. Një rritje e madhe e përqendrimit të alfafetoproteinës në serumin e gjakut, vihet re në disa patologji malinje. Ndër këto sëmundje malinje më të spikaturat janë:

- Karcinoma primare hepatocelulare.
- Kanceri testikular jo semiomatoz.

Në këto patologji malinje, përqëndrimi i alfafetoproteinës në serumin e gjakut mund të kalojë përqëndrimet 1000 ng/ml. Studime të shumta kanë vënë në dukje se 70% deri 90% e pacientëve me karcinomë hepatocelulare primare dhe kancer testikular kanë vlera shumë të larta, të përqendrimit të alfafetoproteinës në serumin e gjakut. Rritje të moderuara të përqendrimit të alfafetoproteinës në serumin e gjakut takohen gjithashtu në një numër të kufizuar pacientësh me patologjitë e mëposhtëme.

- Kancere të traktit gastrointestinal.
- Hepatitet virale.
- Hepatitet aktivë kronikë.
- Cirrozat e mëlçisë, me natyrë alkolike.
- Adenokarcinoma e mushkërive.
- Adenokarcinoma e pankreasit.
- Adenokarcinoma e tëmthit.

Përcaktimi i përqendrimit të AFP, në serumin e gjakut, ka një vlerë të madhe për monitorimin e patologjive të mësipërme, pas trajtimit të tyre mjeksor.

4.2 Metodatat e përcaktimit të alfafetoproteinës në serum dhe gjak

Metodat e përcaktimit të alfafetoproteinës në serum dhe gjak bazohen në reaksionin analitik imunologjik antigen-antikorp. Në varësi të teknikës së dedektimit të numrit të çifteve të formuara antigen- antikorp, këto metoda mund të klasifikohen.

- Metoda radioimunologjike.
- Metoda imunoenzimike ELISA.
- Metoda e imunofluoreshencës.
- Metoda e kemiolumineshencës.

Kohet e fundit, në praktikën e biokimisë klinike, sidomos në laboratorët e vegjel, po përdoret metoda e imunofluoreshencës në pllakë nitroceluloze. Kjo metodë është një variant i metodave analitike të kimisë së thatë (Dry Chemistry). Metoda ka disa përparësi. Ajo është e thjeshtë, e shpejtë, ekonomike dhe lakoren e kalibrimit e ka të gatshme, në një çip (chip) prametrik, i cili bashkëngjitet aparatit matës. Në këtë metodë AFP matet me teknikën e imunodedektimit të tipit sandwich. Në pocetën analitike të kitit ndodhet bufferi i dedektimit. Në buferin e dedektimit ndodhen antikorpët anti-AFP. Këto antikorpë anti-AFP janë të lidhur në mënyrë kovalente me një bashkëdyzim me veti fluoreshente. Në serum dhe gjak ndodhen molekulat e AFP që do të përcaktohen. Këto molekula janë gjithmonë në rolin e antigenit. Kur serum dhe gjak, i cili përmban antigenet e AFP, hidhet në pocetën e bufferit të dedektimit, ndosh reaksioni antikorp-antigen. Si rrjedhojë e këtij reaksioni formohet kompleksi analitik i mëposhtëm antigen-antikorp anti AFP- bashkëdyzim fluoreshent. Ky kompleks që ndoshet në pocetën e buferit të dedektimit kalohet në kavitetin e migrimit të pllakës së nitrocelulozës. Pllaka e nitrocelulozës përmban një bashkësi mikropilarësh homogjen, në paretet e brednshme të cilëve janë fiksuar në trajtë të imobilizuar çifte antikorpesh anti AFP të aftë për të realizuar teknikën Sandwich. Kur përzierja serum-bufer dedektimi hidhet në kavitetin e migrimit të matriksit të nitrocelulozës, në veprimin e forcave të kapilaritetit do të fillojë nitrimitin e saj në rrjeten kapilare. Në fund të migrimit formohet një kompleks analitik me veti fluoreshente. Intesiteti i fluoreshencës i kompleksit analitik është në përpjestim të drejtë me përqëndrimin e AFP në serum dhe gjak. Duke ju referuar lakores së kalibrimit që ndeshet në çipin (chip) prametrik të instaluar në mikrofluometër.

4.3 Përbërja e kitit analitik për përcaktimin e AFP me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë

Kiti analitik për përcaktimin e alfafetoproteinës me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë përbëhet nga elementët e mëposhtëm:

- 25 kartrixhe analitike. Çdo kartrixh analitik përmban një pllakë nitroceluloze, që përmban një rrjet kapilarësh uniformë. Në paretet e brendshme të çdo mikrokapilari janë fiksuar antikorpe anti-AFP nga serumi i miut dhe IgG me origjinë nga serumi i lepurit. Këto antikorpe janë fiksuar në trajtë të imobilizuara.
- Bufferi i dedektimit ndodhet i vendosur në 25 poceta analitike të posaçme ku do të zhvillohet reaksioni antigen-antikorp. Bufferi i dedektimit përmban antikorpe anti-AFP me natyrë humane dhe të markuar me bashkëdyzim fluoreshent. Gjithashtu në buferin e dedektimit përmbahen, antikorpe IgG me origjinë nga serumi i lepurit të markuar me bashkëdyzim fluoreshent.

Çipi (chip) prametrik që përmban programin analitik, për matjen e AFP me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë. Në këtë program ndodhen gjithashtu dhe lakorja analitike e kalibrimit që vendos lidhjen e gjeometrike midis përqëndrimit të AFP dhe intensitetit të fluoreshencës. Metodika analitike për përcaktimin e AFP në këtë kit është si vijon:

- Nxirret poceta me buferin e dedektimit dhe lihet në ambient të pakten për 10 minuta për të marrë temperaturën e dhomës.
- Hapet amballazhi i një pllake nitrocelulozë dhe vendoset mbi një sipërfaqe horizontale.
- Ndizet mikrofluorometri i-CHROMA dhe në të vendoset çipi parametrik matjes së AFP.
- Në pocetën analitike që përmban buferin e dedektimit shtohen 15 mikroliter serum gjaku.
- Përzihet mirë përmbajtja e pocetës analitike për të homogjenizuar sa më mirë përmbajtjen e saj.
- Nga përmbajtja e pocetës analitike merren 75 µl përzierje analitike dhe kalohet në pozicionin e migri të pllakës të nitrocelulozës.
- Pllaka e nitrocelulozës lihet për 15 minuta në temperaturë dhome, që të përfundojë reaksioni analitik imunologjik i tipit Sandëich.
- Vendoset pllaka e nitrocelulozës në mbajtësin e mikrofluorometrit dhe aktivizohet maja.
- Aparati lexon fluoreshencën e krijuar dhe jep në ekran përqëndrimin e AFP në ng/ml.

4.4 Studimi i precizionit të kitit i-CHROMA për matjene përqëndrimit të AFP në serum in e gjakut

Që një metodë analitike laboratorike, të jetë e besueshme duhet që precizioni i saj të jetë i lartë. Një gjë e till ndodhe atëhere kur në matjet pralele brënda serisë (intra-assay) dhe jashtë serisë (inter-assay), koeficienti i variancionit është më i vogël sesa 5 % (C.V.< 5%) për të llogaritur këtë koeficient variacioni u procedua në këtë mënyrë.

- U përzgjodhen tre kontrolle me përqënime të njohura të AFP dhe përkatësisht me përqënime 20 ng/ml, 80 mg/dl, 175 mg/dl. Për saktësin brenda serisë këto kontrolle u matën brenda ditës në 10 matje paralele. Për saktësin jashtë serise (precizionin) kontrollet e mësipërme u matën një herë në ditë, për 10 ditë të njëpasnjëshme. Të dhënat e fituara u përpunuan statistikisht duke llogaritur vleren mesatare \bar{x} , deviacionin standart D.S, dhe më pas koeficientin e variacionit C.V me anë të formulës $C.V \% = \frac{D.S}{\bar{x}} \times 100$

Të dhënat e fituara jepen në tabelën Nr.14.

Tabela Nr.14, studimi i precizionit të metodës për matjen brënda serisë dhe jashtë serisë.

Përqëndrimet e AFP në tre kontrollet ng/ml	Brënda serisë (Intre-assay)			Jashtë serisë (Inter-assay)		
	Mesatarja \bar{x} ng/ml	Shmangia standarte D.S	Koeficienti i variacionit c.v %	X ng/ml	D.S	c.v %
20	19.5	1.05	5.3	20.4	1.08	5.2
80	79.0	3.4	4.3	81.6	2.6	3.1
175	180.0	4.6	2.5	182.0	5.3	2.9

Të dhënat e tabelës Nr.14, tregojnë se precizioni i metodës është i mirë dhe rritet me rritjen e përqëndrimit të AFP në serum in e gjakut.

4.5 Përcaktimi i vlerave normale të AFP, matur në serum in e gjakut me metodën e imunofluoreshënës në pllakë nitrocelulozë.

Në instruksionin, që shoqëron kitin analitik thuhet që vlerat normale të AFP në serum in e gjakut në këtë teknologji variojnë nga 0-10.9 ng/ml. Megjithatë në këtë instruksion theksohet që çdo laborator në përputhje me popullatën, që mbulon duhet të përcaktojë intervalin e vlerave normale. Për këtë arsye ne matëm përqëndrimin e AFP, në serum in e gjakut të 30 subjekteve të shëndoshë. Përcaktimet u bënë në mostrat e gjakut venoz, të subjekteve të shëndoshë me vlera normale të enzimave hepatike dhe pankreatike. Matjet u bënë në mikrofluoremetrin i-CHROMA. Të dhënat e fituara paraqiten në tabelën e mëposhtme Nr.15.

Tabela Nr.15, Përcaktimi i matjeve të përqëndrimit të AFP në serum in e gjakut të 30 subjekteve të shëndoshë.

Nr	Përqëndrimi i AFP në subjekte të shëndoshë ng/ml
1	3.5
2	3.3
3	5.6
4	5.9
5	6.0
6	4.8
7	6.2
8	9.6
9	6.5
10	5.3
11	9.2
12	7.0
13	4.2
14	9.8
15	4.7
16	3.2
17	8.6
18	9.5

19	6.8
20	3.1
21	5.0
22	9.0
23	5.6
24	9.1
25	3.7
26	5.3
27	6.9
28	7.2
29	8.8
30	5.3

Të dhënat e tabelës Nr.15, u përpunuan statistikisht duke llogaritur vlerën mesatare \bar{x} , shmangien standarte D.S si dhe intervalin $\bar{x} \pm 2\delta$ (2 D.S). Të dhënat e këtij përpunimi jepen në tabelën Nr.16.

Tabela Nr.16, Përpunimi statistikor i përqëndrimit të AFP, në 30 subjekte të shëndoshë, si dhe krahasimi me të dhënat e katalogut të kitit.

Emërtimi	Numri i rasteve n	Vlera mesatare \bar{x} ng/ml	Shmangia standarte D.S	Intervali $\bar{x} \pm 2\delta$ për vlerat normale të AFP ng/ml
Përqëndrimi i AFP, në subjekte të shëndoshë në kushtet e laboratorit	30	6.2	2.1	2÷10.4
Vlerat normale të AFP cituar në katalogun e kitit	-	6.9	2.0	2.9÷10.9

Nga të dhënat e tabelës duket qartë që midis intervalit të vlerave normale të katalogut dhe intervalit të vlerave normale të gjetura nga ne, nuk ka asnjë ndryshim statistikisht të

rëndësishëm. ($P > 0.05$). N.q.s metodika analitike zbatohet me korrektësi, rezultatet e matjes janë të besueshme.

4.6 Krahasimi i metodës së imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë me metodën klasike ELISA.

Metoda klasike, e provuar në praktikën klinike për matjen e përqëndrimit të AFP në serum in e gjakut është metoda ELISA. Metoda ELISA mund të përdoret në laborator në të gjitha variantet, manuale, automatike apo totalisht e kompjuterizuar. Kjo metodë siç është theksuar tashmë është shumë e saktë dhe zotëron preçizion të saktë. Megjithatë kjo metodë zgjat në kohë dhe për çdo seri matjesh kërkon ndërtimin e lakores së kalibrimit. Për këtë arsye përcaktimi i një numri të vogël analizash me metodën ELISA, ka kosto të lartë ekonomike. Në të kundërt me teknologjinë i-CHROMA, mund të matësh dhe një moster të vetme serumi. Nuk është e nevojshme të ndërtohet lakorja e kalibrimit pasi ajo ndodhet e gatshme në çipin parametrik, që i bashkëngjitet mikrofluometrit matës. U krahasua metoda e imunofluoreshencës me metodën ELISA, duke përdorur serum in e 30 subjekteve të shëndoshë. Për të realizuar matjet me metodën ELISA u përdor një kit analitik i firmës DIAMETRA, ndërsa matjet u bënë në mikrospektrofotometrin ELISA, të firmës HUMAN. Të dhënat e fituara praqiten në tabelën Nr.17.

Tabela Nr.17, Krahasimi i metodës së imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë me metodën ELISA, për matjen e AFP në serum in e gjakut.

Nr	Përqëndrimi i AFP imunofluoreshencë ng/ml	Përqëndrimi i AFP ELISA ng/ml
1	3.5	3.6
2	3.3	3.33
3	5.6	5.58
4	5.9	5.58
5	6.0	5.98
6	4.8	4.82
7	6.2	6.19
8	9.6	9.52
9	6.5	6.49
10	5.3	5.4
11	9.2	9.1
12	7.0	6.9

13	4.2	4.24
14	9.8	9.72
15	4.7	4.73
16	3.2	3.3
17	8.6	8.54
18	9.5	9.47
19	6.8	6.78
20	3.1	3.17
21	5.0	5.02
22	9.0	8.95
23	5.6	5.61
24	9.1	9.2
25	3.7	3.8
26	5.3	5.25
27	6.9	6.88
28	7.2	7.3
29	8.8	8.74
30	5.3	5.35

Të dhënat e tabelës Nr.17, u përpunuan statistikisht dhe të dhënat e fitura paraqiten në tabelën e mëposhtme Nr.18.

Tabela Nr.18, Krahasimi i metodës së imunofluoreshencës dhe metodës ELISA në 30 subjekte të shëndoshë

Emertimi i metodës	Numri i rasteve	Vlera mesatare \bar{x} , ng/ml	Shmangia standarte D.S	Intervali $\bar{x} \pm 2D.S$	Parametra të tjerë
Metoda e imunofluoreshencës	30	6.2	2.1	2÷10.4	Koefficienti i korelacionit $r=0.99$ Ekuacioni regresionit $y=0.98x+0.12$ $P>0.05$
Metoda ELISA	30	6.0	2.4	1.2÷10.8	

Nga tabela Nr.18, vihet në dukje se metodat janë të njëvlefshme, përsa i përket saktësisë dhe precizionit. Koefficienti i korelacionit midis dy metodave është shumë i mirë ($r=0.99$) dhe ndryshimet midis tyre janë statistikisht të parëndësishme (jo-sinjifikative, $P>0.05$).

Ekuacioni i regresionit midis metodës imunofluorometrike në pllakë nitrocelulozë dhe metodës ELISA është e formës $y=9.98x +0.12$. Si përfundim mund të themi.

- Metoda e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë dhe metoda ELISA janë të njëvlefshme.
- Midis tyre nuk ka asnjë ndryshim statistikisht të rëndësishëm.
- Metoda e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë është shumë e përshtatshme për tu përdorur në laboratorët e vogla ku numri i matjeve është i kufizuar.

4.7 Përcaktimi i CA 19-9 në serum të gjakut.

CA 19-9 është një gangliozid i identifikuar nga një antikorp mononukleal i prodhuar nga splenocitete të kavies të imunizuar me një linjë qelizore të kacinomës kolonorektale humane SE-1116. Determinanti i njohur nga antikorpe të tilla është një lakto-N-fruktozë II me acid cialik. Si rregull CA 19-9 rrit përqëndrimin në gjak vetëm në patologjitë malinje të traktit gastrointestinal. Sipas studimeve të deritanishme vetëm 1.5 % e pacientëve me patologji beninje. Ndër keto patologji beninje mund të përmendim sëmundjet autoimune, cirrozat hepatike, hepatite, kolit ulqeroz, ulqer gastrike dhe intestinale, sëmundjet e aparatit urogenital. Në këta pacient përqëndrimii CA 19-9 në serum të gjakut është rritur në mënyrë të moderuar, mbi vlerën 37 U/ml. Metodët analitike për përcaktimin e CA 19-9 në serum të gjakut janë :

- Metoda kalsike ELISA.
- Metoda e imunofluoreshencës së polarizuar.
- Metoda e kemioluminishencës.

Në studimin tonë u përdor metoda e kemioluminishencës, e bazuar në aparat të matës imulite. Ky aparat bazohet në metodën imunometrike kemioluminishente me fazë solide.

4.8 Përcaktimi i vlerave të CA 19-9 në serum të gjakut të 30 pacientëve të shëndoshë.

Përcaktimi i përqëndrimit të CA 19-9 u bë në serum të gjakut të 30 subjekteve të shëndoshë. Mostrata e gjakut u morën nga venat e krahut dhe serumit u përftua me metodat standarte. Serumet e hemolizuara u përjashtuan nga studimi. Mostrata e përftuara të serumeve, në ato raste që nuk u matën brenda distës, u ruajtën në konxhelator në temperaturën -20°C , Të gjitha matjet e bëra ju referuan përlllogaritje lakores së kalibrimit, të ndërtauar në një seri standartesh me përqëndrime të njohura. Të dhënat e fituara nga matjet paraqiten në tabelën e mëposhte Nr.19.

Tabela Nr.19, Përqëndrimi i CA 19-9 në serum in e gjakut të 30 subjekteve, të shëndoshë matur me metodën e kemiolumineshencës.

Nr i rasteve	Përqëndrimi i CA 19-9 në serum in e subjekteve të shëndoshë.
1	6.0
2	8.6
3	5.5
4	5.0
5	18.0
6	17.7
7	20.0
8	22.0
9	19.0
10	18.6
11	15.0
12	19.6
13	4.8
14	6.5
15	16.8
16	18.0
17	32.0
18	36.0
19	35.0
20	25.0
21	27.0
22	24.0
23	19.5
24	32.0
25	3.8
26	29.0
27	29.6
28	3.6
29	17.0
30	21.0

Të dhënat e fituara, u përpunuan statistikisht duke llogaritur vlerën mesatare \bar{x} , shmangien standarte D.S. δ dhe intervalin $\bar{x} + 2$ D.S, i cili shërben si interval i vlerave normale, në metodat e laboratorike. Këto të dhëna paraqiten në tabelën Nr.20.

Tabela Nr.20, Përpunimi statistikor i përqëndrimit të CA 19-9, në serum in e gjakut të 30 subjekteve të shëndoshë, për të nxjerre intervalin e vlerave normale, në kushtet e laboratoreve tona

Emërtimi i metodës	Numeri i rasteve n	Vlera mesatare U/ml, \bar{x}	Shmangia standarte D.S.U/ml	Intervali $\bar{x} \pm 2$ D.S.
Vlerat e CA 19-9, në subjekte të shëndoshë, Kemiolumineshencë	30	18.12	9.70	0 - 37.94
Vlerat normale të CA 19-9 Literaturë	30	18.50	9.25	0 – 37.0

Të dhënat e tabelës Nr.20, Dëshmojnë se midis vlerave normale të CA 19-9, gjetur për kushtet e laboratoreve tona me metodën e kemiolumineshencës dhe atyre të cituara në literaturë nuk ka asnjë ndryshim statistikisht të besueshëm (sinjifikativ, $P > 0.05$).

4.9 Krahasimi i metodës së kemiolumineshencës për matjen e CA 19-9 në serum in e gjakut, me metodën klasike ELISA.

Metoda e kemiolumineshencës është një metodë e re, në metodologjinë analitike të laboratoreve mjeksorë. Në këtë punim e krahasuam këtë metodë me metodën klasike ELISA, të përdorur gjërësisht. Të dhënat e fituara jepen në tabelën Nr.21.

Tabela Nr.21, Krahasimi i metodës së kemiolumineshencës me metodën klasike ELISA.

Nr	Metoda e Kemiolumineshencës U/ml	Metoda ELISA U/ml
1	6.0	5.9
2	8.6	8.0

3	5.5	5.5
4	5.0	1.1
5	18	15.5
6	17.7	16.3
7	20.0	17.1
8	22.0	18.7
9	19.0	16.4
10	18.6	16.0
11	15.0	14.0
12	19.6	16.8
13	4.8	5.0
14	6.5	6.3
15	16.8	14.5
16	18.0	15.5
17	32.0	27.0
18	36.0	30.0
19	35.0	29.0
20	25.0	21.0
21	27.0	23.0
22	24.0	20.3
23	19.5	17.0
24	22.0	18.7
25	3.8	4.2
26	29.0	24.3
27	29.6	24.8
28	3.6	4.0
29	17.0	14.7
30	21.0	17.9

Të dhenat e tabelës Nr.21, u përpunuan statistikisht dhe paraqiten në tabelën e mëposhtëme Nr.22.

Tabela Nr.22, Krahasimi i përcaktimit të CA 19-9 me metodën e kemiolumineshencës dhe metodën klasike ELISA, në 30 serume gjaku.

Emërtimi i metodës	Numri i rasteve n	Vlera mesatare \bar{x}	Shmangia standarte D.S.	Korelacioni, regresioni, T-testi
Metoda e Kemiolumineshencës	30	18.52	9.71	Koefficienti i korelacionit $r=0.95$. Ekuacioni i regresionit $y=0.8x+1.1$ T-testi $t_{log} < t_{tab}$ $p > 0.05$
Metoda klasike ELISA	30	16.0	8.0	

Të dhënat e tabelës Nr.22, dëshmojnë se metoda e kemiolumineshencës dhe metoda klasike ELISA janë të njëvleshme. Koefficienti i korelacionit është i nivelit shumë të lartë ($r=0.95$) ndersa ekuacioni i regresionit është i formës $y=0.8x + 1.1$. Midis dy metodave nuk ka asnjë ndryshim statistikisht të rëndësishem (sinjifikativ $p > 0.05$). Si përfundim metoda e kemiolumineshencës mund të përdoret në të njëjtën saktësi dhe siguri si metoda klasike ELISA, për të përcaktuar, përqëndrimin e CA 19-9 në serumit e gjakut.

KAPITULLI I PESTË.

5 STUDIMI I PËRQËNDRIMIT TË CEA, CA 19-9, AFP DHE ENZIMAVE HEPATIKE NË PATOLOGJITË MALINJE TË MËLÇISË DHE TRAKTIT DIGJESTIV.

5.1 Metodatat analitike të përdorura për përcaktimin e CEA, CA 19-9, AFP dhe enzimave hepatike.

Antigeni karcinoembrionar CEA është përcaktuar me metodën e imunofluoreshencës në pllakë acetat celulozë. Antigeni CA 19-9 u përcaktua me metodën e kemioluminishencës, duke përdorur si aparat matës automatizuar Imulyte. Alfafetoproteina u mat me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë. Enzimave hepatike u matën me metodën kinetike të analizës. Kjo metodë bazohet në llogaritjen e aktivitetit katalitik të enzimës që ndodhet në serum dhe gjakut. Llogaritja e aktivitetit katalitik bëhet duke kryer matje optike në atë interval të reaksionit enzimatik ku procesi është linear. Formula matematike, e cila lejon llogaritjen e përqendrimit të enzimës është:

$$U/I = \frac{\Delta A/\text{min}}{\epsilon d} * \frac{V_t}{V_s}$$

Në këtë formulë elementët e saj përfaqësojnë:

- $\Delta A/\text{min}$: Ndryshimi i absorbancës optike për njësi të kohës (minutë)
- ϵ : Koeficienti molar ose koeficienti i ekstensionit molar të substratit. Ky koeficient përfaqëson madhësinë e absorbancës optike të tretësirës së substratit me përqendrim një mol/l, ku matet me rezatimin optik që përfaqëson absorbimin maksimal të kësaj tretësire.
- d : është rruja optike e rezatimit që përshkon tretësirën, zakonisht 1 cm.
- V_t : Vëllimi i përgjithshëm i përzierjes analitike të reaksionit. (vëllimi i reagentit të punës plus vëllimin e serumit të gjakut).
- V_s : Vëllimi i serumit të gjakut.

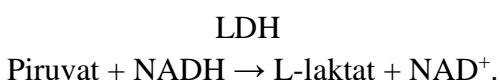
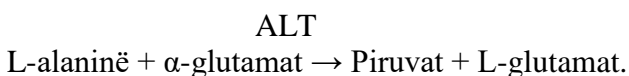
Në tabelën Nr.23, jepen koeficientët e ekstensionit gram molekular të substancave të enzimave kryesore hepatike.

Tabela Nr.23, koeficientët e ekstensionit gram-molekular, të enzimave hepatike.

Substrati analitik	Gjatësia e valës matëse nm	ϵ_{λ}	Testi enzimatik
NADH ose NADPH	340	6.300	ALT(SGPT),AST(SGOT)
4-nitrofenol	405	18.500	Fosfotaza alkaline (ALP)
4-nitroanilina	405	9.900	Gamma-glutamil transferaza GGT

5.2 Metoda analitike e përcaktimit të alaninë transferazës (ALT) ose transaminazës SGPT.

ALT është një enzimë, që gjendet në citozalin e hepatociteve, qelizave funksionale të mëlçisë. Enzima ALT është një enzimë që katalizon transferimin e grupeve aminike nga një aminoacid tek një alfa-ketoacid. Vlerat normale të ALT në serum in e gjakut janë 0-46 U/l. Përqëndrimi i ALT në serum in e gjakut rritet në sëmundjet e mëlçisë, duke përfshirë dhe patologjitë malinje të saj. Përqëndrimi (aktiviteti) i ALT në serum in e gjakut matet me metodën kinetike të analizës. Metoda kinetike e analizës është një metodë e mirfilltë optike. Parimi analitik i përcaktimit të ALT bazohet në një reaksion enzimatik. ALT katalizon transformimin L-alaninës dhe dhe 2-oksoglutamatit, në kushtet që mjedisi analitik të ketë pH optimal dhe temperaturë 37 °C. Gjatë këtij reaksioni çlirohet piruvat. Piruvati nën veprimin e enzimës laktatdehidrogjenazë (LDH), në prani të koenzimës NAD, shëndërrohet në L-laktat. Gjatë këtij reaksioni koenzima NADH me anë të një procesi oksido-reduktimi kalon në NAD⁺. Ky shëndërrim kimik shoqërohet me një dukuri fiziko-optike, që ka të bëjë me uljen e dukshme të absorbancës në gjatësin e valës 340 nm. Ndryshimi i absorbancës në njesinë e kohës është në përpjestim të drejtë me përqëndrimin (aktivitetin) e enzimës në serum in e gjakut. Në mënyrë skematike reaksioni analitik i matjes së ALT paraqitet si më poshtë:



Kiti analitik për përcaktimin e ALT në serumin e gjakut përbëhet nga dy reagent.

- Reagenti R1.
 - Tris buffer (pH=7.5) 110 mmol/l
 - L-alaninë 550 mmol/l
- Reagenti R2.
 - LDH 1200 U/l
 - NADH 0.2 mmol/l
 - α -Ketoglutarat 16 mmol/l

Për të përgatitur reagentin e punës përzihen bashkë reagenti R1 dhe reagenti R2, reagenti i punës është i qëndrueshëm në frigorifer në temperaturën 2 °C deri në 8°C. Raporti volumor midis reagentit të punës dhe serumit të gjakut është 10 me 1 (1000 μ l Rp+100 μ l serum).

Programi analitik për matjen e ALT (SGPT) në një fotometer të programueshëm është si vijon:

- Metoda: Kinetike
- Njësia: U/l
- Gjatësia e valës: 340 nm
- Temperatura e kyvetës 37 °C.
- Zerimi i fotometrit: Kundrejt H₂O destile.
- Koha e inkubimit: 60 sekonda.
- Koha e matjes: 60 sekonda.
- Faktori analitik: 1746
- Drejtimi i reaksionit: zbritës (decreasing).
- Rruga optike: 1 cm.
- Vlera normale minimale: 0 U/l
- Vlera normale maksimale: 46 U/l

Nga këndvështrimi i biokimisë klinike dallojmë:

- Rritje shumë të lartë të ALT, takohen në keto patologji:
 - Karcinomë hepatocelulare.
 - Hepatite.
 - Nekrozë hepatike.
 - Ishemi hepatike.
- Rritje të modeuara të ALT, vihen re në këto patologji:
 - Cirrozë hepatike.
 - Kolestazë.
 - Tumore të heparit.
 - Obstruksionet e koleçistes.
 - Tumoret hepatike.
- Rritje të moderuar të ALT takohen:

Pankreatite.
Mononukleozë infektive.
Miozite.
Infarkt miokardi.
Gjëndje shoku.

5.3 Metoda analitike e përcaktimit të aspartatit transferazës (AST) ose transaminazës SGOT.

Aspartat transferaza AST është një enzimë që bën pjesë në grupin e transferazave. Kjo enzimë ndodhet në përqëndrime të larta në ato inde dhe organe që kanë aktivitet të madh metabolik, siç janë muskujt skeletik, zemra, mëlçia. Në përqëndrime më të vogla AST ndodhet në veshka, pankreas dhe eritrocite. Në dëmtimet hepatoqelizore niveli i AST në serumin e gjakut, rritet mbi nivelin e vlerave normale. Vlerë ka dhe raporti AST/ALT. Raporti AST/ALT është më i lartë se 1 në pacientë që kanë metastaza hepatike. Parimi i matjes së AST, në serumin e gjakut, bazohet në dy reaksione analitike.

AST

Aspartat + α -ketoglutarat \rightarrow Oksalacetat + L-glutamat.

MDH

MDH

Oksalacetat + NADH + H^+ \rightarrow L-Malat + NAD^+ + H_2O

Aspartat aminotransferaza AST katalizon transferimin e grupit aminik nga L-aspartati në α -ketoglutarati. Oksalacetati në bashkëveprim me NADH në prani të joneve të hidrogjenit, nën veprimin katalitik të enzimës malat dehidrogjenazë (MDH) transferohet në L-Malat. Kalimi i NADH në NAD^+ më anë të një reaksioni oksido-reduktimi shoqërohet me ndryshimin e absorbancës në njësinë e kohës për gjatësin e valës 340 nm. Përqëndrimi (aktiviteti) i AST në serumin e gjakut është në përpjestim me $\Delta A/\text{min}$. Reagenti i punës për matjen e AST me metodën kinetike përmban këtë reagent analitik: acid L-aspartik ≥ 200 nM, acid α -ketoglutarik 12 nM, LDH >1000 U/l, MDH >800 nM, NADH >0.18 nM, buffer me pH 7.8 ± 0.1 . Raporti volumor midis reagentit të punës Rp dhe serumit të gjakut me metodën kinetike për matjen e AST, është 10 me 1 (1000 μ l reagent pune + 100 μ l gjak). Programi analitik për matjen e AST, në një fotometer të programueshëm është si vijon:

- Metoda: Kinetike
- Njësia: U/l
- Gjatësia e valës: 340 nm
- Temperatura e kyvetës: 37 °C.
- Zerimi i fotometrit: Kundrejt H_2O destile.
- Koha e inkubimit: 60 sekonda.
- Koha e matjes: 60 sekonda.

- Faktori analitik: 1746
- Drejtimi i reaksionit: zbritës (decreasing).
- Rruga optike d: 1 cm.
- Vlera normale minimale: 0 U/l
- Vlera normale maksimale: 46 U/l

5.4 Përcaktimi i gama-glutamil transferazë me metodë kinetike.

Gama-glutamil transferaza (GGT) është enzimë e ciklit të glutamatit. Enzima e mësipërme (GGT) katalizon transportin e glutamatit brënda qelizave hepatike. Reaksioni analitik për përcaktimin e GGT në serumin e gjakut praqitet skematikisht në trajtën e mëposhtme.

GGT

L- γ -glutamil-3-karboksi+glicilglicinë \rightarrow L- γ -glutamil-glicilglicinë + 5-amino-2-nitrobenzoat- 4-nitroanilit.

Bashkëdyzimi 5-amino-2-nitro-benzoat formohet nga hidroliza e substratit nën veprimin e GGT. Ky bashkëdyzim ka një ngjyrë të lehtë të verdhë në një maksimum absorbimi në gjatësinë e valës 405 nm. Intesiteti i ngjyrës apo ndryshimi i absorbanës në njësinë e kohës është në përpjestim të drejtë me përqëndrimin(aktivitetin) e GGT në serumin e gjakut. Kiti analitik për përcaktimin e GGT, me metodën kinetike, përbëhet nga 2 reagent.

Reagenti R1.

Tampon Tris pH=8.3 100 mmol/l

Glicilglicinë 100 mmol/l

Reagenti R2.

L- γ -glutamil-3-karbosi-4-nitroanalid 4nmol/l

Për të përgatitur reagentin e punës, një volum reagent R2 (substrat) përzihen me 4 volume reagent R1 (buffer). Reagenti i punës i përgatitur si më lart është i qëndrueshëm 6 javë në frigorifer në temperaturën 2 °C-8°C. Programi i matjes së GGT në fotometer të programueshëm është si vijon:

- Metoda: Kinetike
- Njësia: U/l
- Gjatësia e valës: 405 nm
- Temperatura e kyvetës 37 °C.
- Rruga optike d: 1 cm.
- Zerimi i fotometrit: Kundrejt H₂O destile.
- Drejtimi i reaksionit: ngritës (increasing).

- Vlera normale minimale: 0 U/l
- Vlera normale maksimale: 46 U/l

Vlerat normale të GGT në serumin e gjakut janë nga 0-55 U/l. Përqëndrimi (aktiviteti) i GGT në serumin e gjakut rritet në shumë sëmundje duke përfshirë dhe tumoret metastazike të mëlçisë.

5.5 Markuset tumoral CEA, CA 19-9, AFP në pacient me patologji malinje të mëlçisë që ka cënuar funksionin hepatic.

Markuset tumoral CEA, CA 19-9 dhe AFP u përcaktuan në 100 pacientë me patologji malinje të mëlçisë. Në këta pacientë diagnoza ishte vendosur në bazë të anamnezës, vizitës klinike, egzaminimeve imazherike. Në egzaminimet imazherike përfshihet echo abdominale, skaneri i thjeshtë, skaneri me kontrast dhe rezonanca magnetike. Në mjaft raste diagnoza është verifikuar dhe me anën e punktionit biopsi të mëlçisë. Në këtë grup pacientësh, e veçanta ka të bëjë me faktin e prekjes së funksionit hepatic. Kjo prekje e funksionit hepatic është vërtetuar duke matur në serumin e gjakut enzimat hepatic ALT, AST, GGT dhe ALP. Grupi i studimit i takon periudhës tre vjeçre 2012-2013-2014. Në këtë grup bëjnë pjesë 100 pacientë tek të cilët janë bërë përcaktime të mësipërme duke përdorur metodat analitike të përmendura në kapitujt e mësipërm. Përcaktimi i markuesve tumoral dhe enzimeve hepatic u përcaktuan në serumin e gjakut. Mostrat e gjakut u morën me anë të punktionit venoz, në tuba me gjel aktivizues. Tubat me gjel aktivizues janë përdorur për të fituar një serum gjaku sa më cilësor dhe për të shmangur dukurin e hemolizës. Pas qëndrimit në inkubim, në temperaturë dhomë për 30 minuta, për tu formuar koaguli i kuq, tubat u centrifuguan për 10 minuta në 3000 rrot/min. Në përfundim të centrifugimit serumi i përftuar u veçua nga koagulimi i kuq. Në ato raste kur matjet nuk u bënë brenda ditës, mostrat e serumit u vendosen në kongjellator në temperaturën – 20 °C, gjëja që lejon konservimin e tyre për të pakten 2 muaj.

- CEA u mat me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë.
- CA 19-9 u mat me metodën e kemiolumineshencës, duke përdorur automatim Imulyte 1000.
- AFP u mat me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë.
- ALT u mat me metodën kinetike fotometrike.
- AST u mat me metodë kinetike fotometrike.
- GGT u mat me metodë kinetike fotometrike.
- ALP u mat me metodë kinetike fotometrike.

Matjet fotometrike janë realizuar duke përdorur fotometrën e programueshëm BTS 30 plus dhe autoanalizatorët biokimik. Liza 500 plus, Sinova dhe Hitachi. Të dhënat e fituara u përpunuan statistikisht duke përdorur formulat e mëpshtme.

Mesatarja aritmetike \bar{x}

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Ku: $\sum_{i=1}^n x_i$ përfaqëson shumën e rezultateve të matjes.

Shmangia standarte D.S ose δ .

$$D.S = \delta = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{n}$$

Testi student ose t-testi. Ky test përdoret për të vërtetuar nëse ndryshimet e një parametri janë statistikisht të besueshëm ose (sinjifikative) apo jo. Testi student ose t-testi llogaritet me anë të formulës.

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\delta} \sqrt{n - 1} \quad \text{Ku:}$$

\bar{x} - është vlera mesatare

μ - është mesatarja e vërtet.

$n-1$ është numri i gradëve të lirisë.

δ është deviacioni standart (shmangia standarte).

Kur seritë analitike, që krahasohen kanë numra të ndryshëm të parametrave të matjes formula e Testit Student ose t-testi llogaritet me anë të formulës:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\frac{\sqrt{n_1 \delta_1^2 + n_2 \delta_2^2}}{n_1 + n_2 - 2} * \left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right)}$$

Ku:

\bar{x}_1 – mesatarja aritmetike e matjeve të serisë së parë.

\bar{x}_2 . mesatarja aritmetike e matjeve të serisë së dytë.

δ_1 .deviacioni standart i matjeve të serisë së parë.

δ_2 . deviacioni standart i matjeve të serisë së dytë.

n_1+n_2-2 – numri i gradëve të lirisë të dy serive.

Pas llogaritjes së t, ajo krahasohet me tabelën student dhe në bazë të saj llogaritet niveli probabilitar P. Të dhënat e fituar paraqiten në tabelën Nr.24.

Tabela Nr.24, Përqëndrimi i CEA, CA 19-9 dhe AFP në serum in e gjakut të pacientëve me patologji malinje të mëlçisë dhe krahasimi i tyre me vlerat normale të tyre.

Emërtimi i analizës	Numri i rasteve	Vlera mesatare ng/ml ose U/ml	Shmangia standarte	Intervali $\bar{x} \pm 2\delta$	T-testi
CEA në patologjitë malinje të mëlçisë	100	51.45 ng/ml	19.56	12.3-90.5	$t_{log} > t_{tab}$
CEA në pacient normale	30	2.5	1.25	0-5	P<0.01
CA 19-9 në patologji malinje të mëlçisë	100	525 U/ml	126	272-788	$t_{log} > t_{tab}$
CA 19-9 në pacientë normale	30	18	9	0-36	P<0.001
AFP në patologji malinje të mëlçisë	46	9.9 ng/ml	8.7	0-27.3	$t_{log} > t_{tab}$
AFP në pacientë normal	30	5 ng/ml	2.5	0-10	P<0.05

Nga të dhënat e tabelës Nr.24, mund të nxjerrim këto përfundime:

Vlerat e përqëndrimit të antigenit karcinoembrionar në patologjitë malinje të mëlçisë janë të rritura.

Kjo rritje mesatarisht tejkalon 10 herë kufirin e sipërm të intervalit të vlerave normale. Kjo rritje krahasur me intervalin e vlerave normale të CEA është statistikiisht e besueshme (sinjifikative p <0.01). Kjo do të thotë që krahas metodave të tjera investiguese për patologji malinje të mëlçisë, vlera ka dhe përcaktimi i përqëndrimit të CEA në serum in e gjakut. Më i ndjeshëm paraqitet markuesi tumoral CA 19-9. Përqëndrimi i CA 19-9 në patologji malinje të mëlçisë (kancere primare apo metastaza hepatike) rritet në mënyrë të konsiderueshme. Vlera mesatare e CA 19-9, sipas tabelës Nr.24, tejkalon mbi 25 herë vlerën mesatare të intervalit të vlerave normale, duke paraqitur në këtë mënyrë një rritje statistikiisht të besueshme (p <0.001). Shihet qartë që CA 19-9 është shumë i ndjeshëm në kanceret e mëlçisë. Ai mund të sherbejë si një tregues alarmi për tu thelluar në investigime mjeksore më të specializuara duke filluar që

nga skaneri dhe rezonanca magnjetike deri tek punkcioni biopsie mëlçisë. Për sa i përket alfafetoproteinës AFP, ajo paraqet një rritje mjaft të moderuar, në raport me CEA dhe CA 19-9. Kjo rritje është statistikisht e besueshme, por shkalla e sinjifikancës është minimale ($p < 0.05$). Si përfundim mund të themi, që përcaktimi i CEA, CA 19-9 dhe AFP në patologjitë malinjë të mëlçisë shërben si ndihmesë krahas metodave të tjera, për të vënë një diagnozë të sakët dhe të shpejtë të këtyre patologjive. Tek grupi i pacientëve të mësipërm, krahas markuesve tumoraleë, më të njëjtët serume, u bë përcaktimi i enzimave hepatike ALT, AST, GGT dhe ALP. Matjet e enzimave hepatike, u bënë me metodën kinetike fotometrike, sipas programeve analitike përkatëse, për çdo enzimë.

Të dhënat e fituara paraqiten në tabelën e mëposhtme Nr.25, ku krahasohen me intervalet e vlerave normale.

Tabela Nr.25, Përqëndrimet e enzimave hepatike ALT, AST, GGT dhe ALP në serum in e gjakut të pacientëve me patologji malinje dhe krahasimi i tyre me intervale të vlerave normale

Emërtimi i analizës	Numri i rasteve	Mesatarja aritmetike \bar{x} U/l	Shmangia standarte δ U/l	Intervali $\bar{x} \pm 2\delta$	T-tesi
Enzima ALT në patologji malinje të mëlçisë	100	71 U/l	22 U/l	27-115	$t_{log} > t_{tab}$
Enzima ALT në subjekte normale	30	23 U/l	12.5 U/l	0-46	$P < 0.01$
Enzima AST në patologji malinje të mëlçisë	100	56 U/l	14 U/l	28-84	$t_{log} > t_{tab}$
Enzima AST në subjekte të shëndoshë	30	23 U/l	12.5 U/l	0-46	$P < 0.05$
Enzima GGT në patologji malinje të mëlçisë	75	52 U/l	21 U/l	10-96	$t_{log} > t_{tab}$
Enzima GGT në subjekte të shëndoshë	30	28 U/l	14 U/l	0-56	$P < 0.05$
Enzima ALP në patologji malinje të mëlçisë	60	93 U/l	27 U/l	39-147	$t_{log} > t_{tab}$
Enzima ALP në subjekte të shëndoshë	30	60 U/l	30 U/l	0-120	$P > 0.05$

Të dhënat e tabelës Nr.25, për enzimat hepatike, të grupit të studiuar japin këto përfundime:

- Enzima specifike hepatocitare ALT ka një përqëndrim (aktivitet) të lartë në krahasim me intervalin e vlerave normale. Kjo rritje është relativisht e moderuar, që përbën një mesatare afërsisht dyfishin e kufirit të sipërm të intervalit të vlerave normale. Kjo rritje është statistikisht e besueshme (sisnjifikative $p < 0.01$). Kjo lejon të konsiderohet që në këtë grup pacientësh, me patologji malinje të mëlçisë, funksioni hepatic i parenkimës hepatike, është i dëmtuar.
- Enzimë tjetër, AST, e cila përveç hepatociteve gjëndet dhe në inde apo organe të tjera, ka një rritje mjaft të lehtë. Vlera mesatare e AST në këtë grup është 56 U/l. Pra vetëm 10 U/l mbi kufirin e sipërm të intervalit të vlerave normale. Megjithatë raporti $\frac{AST}{ALT}$ në këtë grup (duke iu referuar mesatareve) është 0.78, pra më i vogël se 1, gjë që dëshmon dëmtimin e funksionit hepatic në këtë grup pacientësh.
- Gamaglutamil transferaza GGT paraqet gjithashtu një rritje të lehtë në krahasim me intervalin e vlerave normale. E njëjta gjë mund të thuhet dhe për fosfotazën alkaline ALP. Si përfundim analiza e të dhënave të tabelës Nr.25, vë në dukje një dëmtim të lehtë të funksionit hepatic.

5.6 Përqëndrimet në serum të mikroelementeve bakër (Cu) dhe Zink (Zn) në serumin e gjakut të pacientëve me kancer mëlçie.

Bakri (Cu) është një element thelbësor për organizmin e njeriut. Bakri është një nga mikroelementët e rëndësishëm të organizmit. Sëbashku me hekurin, bakri është shumë i rëndësishëm për sitezën e grupit të hemoglobinës. Në eritrocite, është e pranishme një proteinë që përmban baker. Kjo proteinë është eritrokupreina me peshë molekulare P.M. 33000 Dalton dhe që përmban dy atome bakër për molekulë. Bakri është i rëndësishëm për ostogjenezën (rritjen e qelizave kockore) dhe merr pjesë në konservimin e mielinës në sistemin nervor. Në brendësi të hepatociteve (qelizave funksionale të mëlçisë), bakri lidhet me metaltioneinën. Metaltioneina është proteinë me peshë molekulare 8000 D (Dalton) e pasur me radikale sulfidrike. Kjo proteinë është e fatë të lidhë bakrin dhe mikroelement të tjerë, të pranishëm në gjak. Pasi bakri lidhet me metaltioneinën në brendësi të hepatociteve bakri merr pjesë në dy procese të rëndësishme. Një pjesë e bakrit përdoret për të sintetizuar enzimet hepatike, që përmbajnë bakër. Pjesa tjetër e bakrit lidhet në mënyrë të kthyeshme (reversible) me një proteinë acide të kromatinës të përmbajtur në bërthamën e qelizave hepatike. Kjo proteinë është interesuar për rregullimin e transkricionit të D.N.A. Vlerat normale të bakrit në serumin e gjakut janë

70 µg/dl deri në 170 µg/dl. Rritja e përqëndrimit të bakrit në serumin e gjakut është vënë re në mjaft patologji malinje. Ndër këto patologji më specifiket janë leucemia dhe limfoma. Për të përcaktuar bakrin në serumin e gjakut të pacientëve me patologji malinje të mëlçisë, ne përdorem metodën kolorimetrike të analizës.

Përcaktimi i bakrit me metodën kolorimetrike.

- Parimi i metodës.

Në mjedis acid, bakri shkëputet nga proteinat e serumit, me të cilën ai është lidhur. Pas procedurës së deproteinizimit bakri në trajta atomike, reduktohet me anë të acidit askorbik. Atomet e bakrit të reduktuara, hyjnë në reaksion me batokuproinën dhe formojnë një bashkëdyzim me ngjyrë të verdhë në portokalli. Ky bashkëdyzim ka një koeficient të absorbimit molar të barabartë me $\epsilon=14000$ dhe mund të përdoret për matje kolorimetrike.

- Reagentët e metodës

1. Acid trikloracetik 10 %.
2. Acid askorbik në trajtë pudre.
3. Acid klorhidrik 1.4 N.
4. Batokuproinë 8.9×10^{-4} M në acetat natriumi 3N.
5. Standart bakri me përqëndrim 200 µg/dl.

- Proçedura analitike.

Merren tre tuba qelqi analitikë. Këta tuba do të shërbejnë për blankun, standardin dhe analizën. Tek tubi i blankut hedhim 0.5 ml H₂O destile, tek tubi i standadit shtohen 0.5 ml standart bakri, me përqëndrim 200 µg/dl dhe tek tubi i analizës shtohen 0.5 ml serum. Në çdo tub shtohen nga 0.2 ml acid klorhidrik HCL 1.4 N. Përzihen mirë tubat dhe vendosen për 5 minuta në banjomari në temperaturë 100 °C. Pasi tubat ftohen, në secilin prej tyre shtohet nga 0.4 ml trikloracetik dhe përmbajtja analitike e tubave përzihet me thupër qelqi. Tubat centrifugohen për pesë minuta. Në fund të procedurës së centrifugimit përftohet supernatanti. Merren tre tuba të pastër dhe në secilin prej tyre kalohen nga 0.75 ml blank, standart dhe analizë. Në secilin tub hidhen nga 5 mg acid askorbik. Tubat tunden deri sa të tretet acidi askorbik. Pas kësaj në secilin tub shtohen nga 0.25 ml batokuproine dhe pritet dy deri në tre minuta dërsa të stabilizohet ngjyra. Maten absorbancat e tubave në fofotmetër me gjatësi vale 480 nm. Llogaritja e përqëndrimit të bakrit në serum, llogaritet me anë të formulës.

$$\text{Cu } (\mu\text{g/dl}) = \frac{200}{A_S - A_B} (A_A - A_B)$$

Ku:

A_B - Absorbanca e blankut

A_S -Absorbanca e standardit

A_A -Absorbanca e analizës

200- Përqëndrimi i standardit $\mu\text{g/dl}$.

Vlerat normale të metodës janë:

Meshkuj: 70-140 $\mu\text{g/ml}$

Femra: 80-150 $\mu\text{g/dl}$

- **Përcaktimi i zinkut me metodë kolorimetrike.**

Një person i rritur me anë të dietës merr për 24 orë 12 der në 20 mg zink. Në qelizat hepatocitare (hepatocyte) zinku është i lidhur me një numër të konsiderueshëm enzimash dhe proteinash kryesisht me metalotioninën, e cila është një proteinë e pasur me cisteinë. Kjo proteinë formon komplekse me metale të ndryshme biovalente. Zinku është një përbërës i rëndësishëm i shumë metaloproteinave e makromolekualve. Në të njëjtën kohë zinku është kofaktor për enzima të ndryshme. Zinku është i rëndësishëm në sitezën e kolagenit, në replikimi, transkriptimin etj. Të kodit gjenetik pasi DNA dhe RNA polimeraza kanë nevojë për zinkun. Prania e zinkut ndihmon aktivitetin e tyre normal dhe ndihmon në integritetin e saj struktural. Vlerat normale të zinkut në serumin e gjakut ndodhen në intervalin 60-150 $\mu\text{g/dl}$. Për përcaktimin e zinkut në punimin tonë u përdor metoda kolorimetrike fotometrike, e cila përdor metodën fotometrike të analizës. Për të gjykuar mbi vlerat e bakrit Cu dhe ato të zinkut Zn në pacientet me patologji malinje të mëlçisë në 40 pacientë. Përcaktimi i bakrit Cu dhe i zinkut Zn u bënë me metodën kolorimetrike duke përdorur fotometrën e programueshëm. Përcaktimet u bënë në serumin e gjakut duke bërë kujdes që të shmanget në maksimum hemoliza. Të dhënat e fituara nga matjet u përpunuan statistikisht duke llogaritur vlerën mesatare \bar{x} , shmangien standarte D.S. (δ) si dhe intervalin $\bar{x} \pm 2\delta$ dhe T-testin.

Në një grup me 40 pacientë, të cilët mjekoheshin për patologji malinje, krahas antigenit karcino-embrionar CEA dhe antigenit CA 19-9 u përcaktuan gjithashtu përqëndrimi i bakrit dhe i zinkut në serumin e gjakut. Përcaktimi i bakrit dhe i zinkut në serum u bënë me anë të metodave kolorimetrike përkatëse. Matjet u bënë duke përdorur kitet analitike

të firmës Tulip dhe fotometrin e programueshëm. Të dhënat e fituara jepen në tabelën Nr.26.

Emërtimi i parametrit	Numri i rasteve n	Vlera mesatare \bar{x} $\mu\text{g/dl}$	Shmangia standarte δ $\mu\text{g/dl}$	T-testi (testi student)
Përqëndrimi i bakrit Cu, në patologji malinje të mëlçisë	40	203.1	42.2	$t_{\text{log}} > t_{\text{tab}}$ $P < 0.01$
Përqëndrimi i bakrit Cu, në subjekte të shëndoshë	40	100	25	
Përqëndrimi i zinkut Zn, në patologji malinje të mëlçisë	40	30.72	8.97	$t_{\text{log}} > t_{\text{tab}}$ $P < 0.01$
Përqëndrimi i Zn në subjekte të shëndoshë	40	105	22.5	

Tabela Nr.26, Përqëndrimi i bakrit Cu dhe i zinkut Zn, në serum in e gjakut të pacientëve me patologji malinje të mëlçisë. Krahasimi i vlerave të fituara, me vlerat normale.

Të dhënat e tabelës Nr.26, dëshmojnë që përqëndrimi i bakrit Cu, në serum in e gjakut të pacientëve me patologji malinje të mëlçisë është i lartë. Mesatarisht ky përqëndrim është rreth 50 $\mu\text{g/dl}$ më i lartë sesa kufiri i sipërm i intervalit të vlerave normale që varion nga 50 $\mu\text{g/dl}$ deri në 150 $\mu\text{g/dl}$. Ky rezultat përkon dhe me të dhënat e literaturës. Sipas një studimi të paraqitur nga autori KUO, përqëndrimi i bakrit në serum rritet dukshëm në pacientët me tumore malinje. (KUO. HW, Chen SF, WU, CC, et al). Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. Biol Trace Elen Res 2002; 89; 1-11; [Pub Med]. Disa autorë mendojnë që bakri luan një rol të rëndësishëm në ndarjen dhe proliferimin e qelizave tumorale kjo dukuri do të çojë në rritjen e përqëndrimit të bakrit në serum si rrjedhojë e shkatërrimit. Shumë studiues janë të mendimit që nivelet e larta të bakrit ulin apoptozën dhe janë një kofaktor në angiogjenezë gjatë karcinogjenezës dhe metastazave. Sipas Al-Ebraheem në patologjitë malinje të mëlçisë përqëndrimi i bakrit në serum in e gjakut është në mënyrë të dukshme i lartë në krahasim me intervalin e vlerave normale ($p < 0.01$). (Al-Ebrahim A, Merso VA, Gurusamy K, et al. Distribution of Ca, Fe, Cu and Zn in primany colorectal cancer and secondary colorectal liver metastases. Nuclear istruments and methods in Physics research A 2010; 619, 338-343). Mjaft studiues mendojnë që rritja e përqëndrimit të bakrit në serum in e gjakut, mund të përdoret si një markues potencial për të gjykuar mbi mundësin e fillimit të aktivitetit të një tumori malinjë në mëlçi. Të dhënat e tabelës Nr.26, dëshmojnë gjithashtu, që në krahasim me intervalin e vlerave normale, përqëndrimi i zinkut, në serum in e pacientëve me patologji malinje të mëlçisë, është i ulët. Zinku është një mikroelement thelbësorë në ndërtimin

strukturor të proteinave dhe enzimave. Qelizat malinje (tumorable) kanë si veti të përdorin sasi të madhe zinku si rrjedhojë e metabolizimit dhe proliferacionit të shpejtë. Ky mekanizëm çonë në akumulimin e zinkut në indin e mëlçisë dhe reduktimin e tij në serumin e gjakut. Ulja e përqendrimit të zinkut në serum, ul imunitetin, redukton numrin e qelizave T. Si përfundim mund të themi, që në pacientë me patologji malinje të mëlçisë kemi rritje të përqendrimit të bakrit Cu në serumin e gjakut dhe ulje të përqendrimit të zinkut.

6. PËRFUNDIME

- 1- Metoda e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë është një risi dhe tendencë e teknologjisë së sotme laboratorike, sidomos për laboratorët e vegjël.
- 2- Përcaktimi i antigenit kacinoembrionar CEA me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë, është i saktë, i shpejtë dhe ekonomik.
- 3- Kjo metodë ka korelacion shumë të mirë me metodën klasike ELISA dhe metodat e tjera për matjen e CEA në serum të gjakut, ($r > 0.9$).
- 4- Intervali i vlerave normale të CEA, matur me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë, nuk ka ndryshime statistikisht sinjifikative, në krahasim me intervalin e vlerave normale të CEA, matur me metodat e tjera analitike.
- 5- Përcaktimi i alfafetoproteinës AFP, me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë është i shpejtë, i saktë dhe ekonomik.
- 6- Kjo metodë ka korelacion shumë të mirë me metodën klasike ELISA dhe metodat e tjera, për matjen e AFP, në serum të gjakut, ($r > 0.9$).
- 7- Intervali i vlerave normale të AFP, matur me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë, nuk ka ndryshime statistikisht të besueshme, në krahasim me intervalet e vlerave normale të AFP, të matura me metodat e tjera analitike, ($p > 0.05$).
- 8- Përcaktimi i përqendrimit të CEA dhe AFP, me metodën e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë nuk ka nevojë për ndërtimin e lakores së kalibrimit. Lakorja e kalibrimit ofrohet e gatshme në çipin parametrik (chip) që shoqëron kitin analitik. Ndërkohë metodat e tjera analitike, e kanë të nevojshme ndërtimin e lakores së kalibrimit, për çdo seri matjesh.
- 9- Në 100 pacientë me patologji malinje të mëlçisë, përqëndrimi i CEA, CA 19-9 dhe AFP është i lartë, në krahasim me intervalet e vlerave normale. Kjo rritje e përqendrimit të markuesve tumoralë të mësipërm është statistikisht sinjifikative ($p < 0.05$).

- 10- Tek këta pacientë ka prekje të funksionit hepatic, gjë që dëshmohet nga rritja e aktivitetit të enzimave hepaticke, ALT, AST, GGT dhe ALP.
- 11- Në pacientët me patologji malinje të mëlçisë, vihet re një rritje e përqendrimit të mikroelementit bakër Cu dhe ulja e përqendrimit të mikroelementit zink Zn.
- 12- Përcaktimi i markuesve tumoral CEA, CA 19-9 dhe AFP jep një ndihmesë të vlefshme në dignozën, monitorimin e mjekimit dhe prognozën e patologjive malinje të mëlçisë.

7. REKOMANDIME

- 1- Metoda e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë, rekomandohet të përdoret pasi, është një metodë e shpejtë e saktë dhe ekonomike.
- 2- Kjo metodë është shumë e përshtatshme për laboratorët e vegjel dhe të mesëm, të cilët kanë një numër të kufizuar analizash sepse nuk kërkon ndërtimin e kurbës ose lakokes së kalibrimit sa herë që matet. Kjo për arsye se lakorja e kalibrimit ndodhet në çipin parametrik që shoqëron kitin.
- 3- Kjo metodë praktike dhe ekonomike rekomandohet të përdoret edhe për përcaktime të tjera të hormoneve, metabolitëve, antigeneve virale, pasi mjafton të ndërrohet në aparatit matës çipi parametrik që ndodhet në kitin përkatës.
- 4- Metoda e imunofluoreshencës në pllakë nitrocelulozë është e njëvlefshme me metodën klasike ELISA, ku ka korelacion shumë të mirë me të dhe rekomandohet të përdoret në çdo laborator mjeksorë pasi është e suksesshme.
- 5- Rekomandohet në përdorim pasi, intervalet e vlerave normale të kësaj metode për CEA dhe AFP janë të njëjta me atë të metodës klasike ELISA, duke siguruar një interpretim korrekt të matjeve të bëra me këtë metodë.
- 6- Krahas metodave të tjera që përdoren për të përcaktuar patologjitë malinje të mëlçisë siç janë imazheria, laparoscopia, punkcioni biopsi, vlerë kanë edhe matja e CEA, AFP dhe CA 19-9, të cilat rezultojnë në përgjithësi me përqëndrime të larta në këto patologji.
- 7- Rekomandohet që në patologjitë malinje të mëlçisë të matet zinku, i cili e ul përqëndrimin dhe bakri që në të kundërt, rrit përqëndrimin. Kjo matje rekomandohet të bëhet sipas studimit tonë me metodën End Point e realizueshme në çdo laborator me kosto shumë më të ulët sesa absorbimi atomik.

8. REFERENCA

1. Abelev GI; Tsvetkov VS; Biryulina TI; Elgort DA; Olovnikov AM; Gusev AI; Uazova AK; Perova SD; Rubtsov IV; Shaborina SV; Assessment of the use of highly sensitive methods of determining alpha-fetoprotein for the diagnosis of hepatocellular cancer and teratoblastoma. 1971; 4:75-81.
2. Bast RC, Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jesup JM, et al. 2000 Update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* 2001;19: 1865–78.
3. Bates SE, Longo DL. Use of serum tumor markers in cancer diagnosis and management. *Semin Oncol*. 1987;14:102–138.[PubMed](#)
4. Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM. Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur J Cancer*. 1997; 33:1075–1107.[PubMed](#)
5. Byrne DJ, Browning MC, Cuschieri A. CA72-4: a new tumor marker for gastric cancer. *Br J Surg*. 1990; 77:1010–1013.[PubMed](#)
6. Carpelan-Holmström M, Louhimo J, Stenman UH, Alfthan H, Haglund C. CEA, CA 19-9 and CA 72-4 improve the diagnostic accuracy in gastrointestinal cancers. *Anticancer Res*. 2002; 22:2311–2316.[PubMed](#)
7. Chang YC, Nagasue N, Kohno H, et al. Clinicopathologic features and long-term results of α -fetoprotein-producing gastric cancer. *Am J Gastroenterol*. 1990;85:1480–1485.[PubMed](#)
8. Choi SR, Jang JS, Lee JH, et al. Role of serum tumor markers in monitoring for recurrence of gastric cancer following radical gastrectomy. *Dig Dis Sci*. 2006; 51:2081–2086.[PubMed](#)
9. Duraker N, Celik AN. The prognostic significance of preoperative serum CA 19-9 in patients with respectable gastric carcinoma: comparison with CEA. *J Surg Oncol*. 2001;76:266–271.[PubMed](#)
10. Erkki Ruoslahti, Helena Pihko and Markku Seppälä Alpha-fetoprotein: Immunochemical Purification and Chemical Properties. Expression in Normal State and in Malignant and non-Malignant Liver Disease. *Immunological reviews*. 2006.
11. Ersan Semerci, Hasan Ustun, Tugba Yetim, Can Huzmeli, Murat Gullu Prognostic value of preoperative CEA, CA 19-9, CA 72-4, and AFP levels in gastric cancer.
12. Gaspar MJ, Arribas I, Coca MC, Diez-Alonso M. Prognostic value of carcinoembryonic antigen, CA 19-9 and CA 72-4 in gastric carcinoma. *Tumor Biol*. 2001; 22:318–322.

13. González A, Vizoso F, Allende MT, Sánchez MT, Balibrea JL, Ruibal A. Preoperative CEA and TAG-72 serum levels as prognostic indicators in resectable gastric carcinoma. *Int J Biol Markers*. 1996;11:165–171.[PubMed](#)
14. Guadagni F, Roselli M, Cosimelli M, Ferroni P, Spila A, Casaldi V, et al. Correlation between positive CA 72-4 serum levels and lymph node involvement in patients with gastric carcinoma. *Anticancer Res* 1993;13: 2409–13.
15. Japanese Gastric Cancer Association. Japanese classification of gastric carcinoma. 2nd English Ed. *Gastric Cancer* 1998;1:10–24.
16. Kim YH, Ajani JA, Ota DM, Lynch P, Roth JA. Value of serial carcinoembryonic antigen levels in patients with resectable adenocarcinoma of the esophagus and stomach. *Cancer* 1995;75: 451–456.
17. Kodama I, Koufuji K, Kawabata S, Tetsu S, Tsuji Y, Takeda J, et al. The clinical efficacy of CA 72-4 as serum marker for gastric cancer in comparison with CA19-9 and CEA. *Int Surg* 1995;80: 45–8.
18. Kono K, Amemiya H, Sekikawa T, et al. Clinicopathologic features of gastric cancers producing alpha-fetoprotein. *Dig Surg*. 2002;19:359–365.[PubMed](#)
19. Ladd J., Lu H, Taylor AD, et al. Direct detection of carcino-embryonic antigen auto antibodies in clinical human serum samples using a surface Plasmon resonance sensor. *Colloids Surf B Bio interfaces* 2009;70: 1–6 (Pub Med)
20. Li N, Xia B, Chen XB, et al. Relationship between expression of CEA, E-Catherin and liver metastases in colorectal cancer. *Chin. J clin oncol* .2008: 429-32
21. Lai IR, Lee WJ, Huang MT, et al. Comparison of serum CA72-4, CEA, TPA, CA19-9 and CA125 levels in gastric cancer patients and correlation with recurrence. *Hepatogastroenterology*. 2002;49:1157–1160.[PubMed](#)
22. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*. 1965;64:31–49.[PubMed](#)
23. Libman E, Lemberger J, Kollin J. Alphafetoprotein in the serum of patients with primary gastric cancer and liver metastases. *Acta Hepatogastroenterol*. 1979;26:198 –202.
24. Marchesi Mc, Conti MB, Pieramati C, et al. Assessment and behavior of Alpha fetoprotein (AFP), Antigen Cancer 15/3 (CA 15/3), carcinembional Antign (CEA) in clinical oncology of the dog. Preliminary study. *Vet Res Commun* 2007; 31 301-4 (Pub Med).
25. Mattar R, Alves de Andrade CR, DiFavero GM, Gama-Rodrigues JJ, Laudanna AA. Preoperative serum levels of CA 72-4, CEA, CA 19-9, and alpha-fetoprotein in patients with gastric cancer. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2002;57:89–92.[PubMed](#)

26. Marrelli D, Roviello F, De Stefano A, et al. Prognostic significance of CEA, CA 19-9 and CA 72-4 preoperative serum levels in gastric carcinoma. *Oncology*. 1999;57:55–62.[PubMed](#)
27. Nakajima K, Takenori O, Suzuki T, et al. Impact of preoperative serum carcinoembryonic antigen, CA 19-9 and alpha-fetoprotein levels in gastric cancer patients. *Tumor Biol*. 1998; 19:464–469.
28. Nakamura T, Tabuchi Y, Nakae S, Ohno M, Saitoh Y. Serum carcinoembryonic antigen levels and proliferating cell nuclear antigen labeling index for patients with colorectal carcinoma. Correlation with tumor progression and survival. *Cancer*. 1996;77:1741–1746.[PubMed](#)
29. Novatec imunodiagnostica GMBH, Germany. 2009.
30. Ohkura H. Tumor markers in monitoring response to chemotherapy for patients with gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1999; 29:525–6.
31. Ozkan H , Kaya M , Cengiz A., Comparison of tumor marker CA 242 with CA 19-9 and carcinoembryonic antigen (CEA) in pancreatic cancer. Journal Article
32. Pectasides D, Mylonakis A, Kostopoulou M, Papadopoulou M, Triantafyllis D, Varthalitis J, et al. CEA, CA 19-9, and CA-50 in monitoring gastric carcinoma. *Am J Clin Oncol* 1997; 20:348–53.
33. Reiter W. , Stieber P., Reuter C., Nagel D., Lau-Werner U, Lamerz R., Multivariate analysis of the prognostic value of CEA and CA 19-9 serum levels in colorectal cancer. Journal Article.
34. R. Kolpepaj, S.Buzo, Biokimia klinike 2009.
35. Safi F, Kuhns V, Beger HG. Comparison of CA 72-4, CA 19-9 and CEA in the diagnosis and monitoring of gastric cancer. *Int J Biol Markers* 1995;10:100–6.
36. Shiraishi N, Sato K, Yasuda K, Inomata M, Kitano S. Multivariate prognostic study on large gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2007;96:14–18.[PubMed](#)
37. Takahashi Y., Takeuchi T., Sakamoto J., Touge T., i Mai M, Ohkura H., Kodaira S., Okajima K, Nakazato H., The usefulness of CEA and/or CA19-9 in monitoring for recurrence in gastric cancer patients: a prospective clinical study. Original study.2003; 142–145.
38. Tan HT, Low J, Lim SG et al. Serum auto antibodies as biomarkers for early cancer dedection. *FEBS J*. 2009, 276: 6880-694 (Pub Med)
39. Terry MB, Gaudet MM, Gammon MD. The epidemiology of gastric cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2002;12:111–127.[PubMed](#)
40. Touge T, Fujita M, Hirata K, Kunii Y, Kitamura M, Nagawa K, et al. Interim report of JFMTTC study no. 20 on the effectiveness of high dose CDDP plus 5-FU regimen as an adjuvant therapy for far-advanced cancer of the stomach. *Gan To Kagaku Ryoho (Jpn J Cancer Chemother)* 2000; 27:395–403.

41. Tocchi A, Costa G, Lepre L, et al. The role of serum and gastric juice levels of carcinoembryonic antigen, CA19.9 and CA72.4 in patients with gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1998;124: 450–455. [PubMed](#)
42. Yamao T, Kai S, Kazami A, Koizumi K, Handa T, Takemoto N, et al. Tumor markers CEA, CA19-9 and CA125 in monitoring of response to systemic chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol* 1999; 29:550–5.
43. Yamashita K, Sakuramoto S, Kikuchi S, Katada N, Kobayashi N, Watanabe M. Surgical resection of stage IV gastric cancer and prognosis. *Anticancer Res*. 2007;27:4381–4386. [PubMed](#)
44. Ychou M, Duffour J, Kramar A, Gourgou S, Grenier J. Clinical significance and prognostic value of CA72-4 compared with CEA and CA19-9 in patients with gastric cancer. *Dis Markers* 2000;16: 105–10.
45. Webb A, Scott-Mackie P, Cunningham D, et al. The prognostic value of serum and immunohistochemical tumor markers in advanced gastric cancer. *Eur J Cancer*. 1996; 32:63–68.