

AZƏRBAYCAN MİLLİ ELMLƏR AKADEMİYASI
A.İ.QARAYEV adına FİZİOLOGİYA İNSTİTUTU

Əlyazması hüququnda

MƏHƏRRƏMZADƏ MƏSUD CABBAR OĞLU

**PROSTAT VƏZİNİN XOŞ VƏ BƏDXASSƏLİ ŞİŞLƏRİNİN
DIFFERENSİAL DİAQNOSTİKASINDA VƏ MÜALİCƏNİN
NƏTİCƏLƏRİNİN QIYMƏTLƏNDİRİLMƏSİNDƏ ONKOLOJİ
MARKERLƏRİN TƏDQİQİNİN ROLU**

2406.02 – “Biokimya”

**Biologiya üzrə fəlsəfə doktoru elmi dərəcəsi
almaq üçün təqdim edilmiş dissertasiyanın**

A V T O R E F E R A T I

Bakı–2017

Dissertasiya işi Azərbaycan Tibb Universitetinin “Biokimya” kafedrasında və Bakı Dövlət Universitetinin “Biokimya və biotexnologiya” kafedrasında yerinə yetirilmişdir.

Elmi rəhbərlər:

A.M.ƏFƏNDİYEV,
Biologiya üzrə elmlər doktoru, professor

A.Ə.QULİYEV
Biologiya üzrə elmlər doktoru, professor

Rəsmi opponentlər:

Ş.Ə. TOPÇİYEV
Biologiya üzrə elmlər doktoru

N.S. SƏFƏROV
Biologiya üzrə fəlsəfə doktoru, dosent

Aparıcı təşkilat:

Əziz Əliyev adına Azərbaycan Dövlət
Həkimləri Təkmilləşdirmə İnstitutu,
Mərkəzi Elmi-Tədqiqat laboratoriyası

Müdafiə “___” _____ 2017-ci il tarixində saat _____-də
AMEA-nın A.İ.Qarayev adına Fiziologiya İnstitutu nəzdində fəlsəfə
doktoru elmi dərəcəsi almaq üçün təqdim olunan dissertasiyaların
müdafiəsini keçirən FD.01.051 Dissertasiya Şurasının əsasında yaradılmış
Birdəfəlik Dissertasiya Şurasının iclasında keçiriləcək.

Ünvan: AZ 1100, Bakı Şəhəri, Şərif-zadə küç. 78

Dissertasiya işi ilə Azərbaycan MEA-nın A.İ.Qarayev adına
Fiziologiya İnstitutunun kitabxanasında tanış olmaq olar.

Avtoreferat “___” _____ 2017-ci il tarixində göndərilmişdir.

B/FD 01.051 Dissertasiya Şurasının
elmi katibi, biologiya üzrə
fəlsəfə doktoru, dosent

Y.O. BAYRAMOVA

İŞİN ÜMUMİ XARAKTERİSTİKASI

Mövzunun aktuallığı. Prostat vəzinin xoş- və bədxassəli şişləri kişilər arasında ən geniş yayılmış patologiyalardan hesab edilir [Gerald,1999]. Bir sıra ölkələrdə prostat vəzinin şişləri ağciyər və mədə xərçəngindən sonra 2-ci və 3-cü yerləri tutur [Kranse, 1999]. ABŞ-da isə bu xəstəlik birinci yerdədir [Thompson, 2006]. Bütün onkoloji xəstəliklər arasında prostat vəzinin xərçəngi səbəbindən ölüm halları ağciyər və mədə xərçəngindən sonra 3-ci yerdədir [Thompson, 2006]. Keçən əsrin 80-ci illərində prostat vəzinin xərçənginin kəskin artımı müşahidə olunmuşdur, lakin sonrakı illərdə bu göstəricinin nəzərə çarpacaq dərəcədə azalması müşahidə olunmuşdur ki, bu da gündəlik laborator praktikada simptomsuz formaların skriningi və aşkarlanması üçün diaqnostika məqsədilə şiş markeri olan – prostat spesifik antigenin (PSA) istifadə olunması ilə izah olunur [Hankey, 1999]. Rusiyanın və Azərbaycan da daxil olmaqla, MDB ölkələrinin kişi kontingenti arasında prostat vəzinin xərçəngi durmadan artır. Bu xəstəlik üçün orta göstərici hər 100000 kişiə 30 nəfər Rusiyada və 2.8 nəfər Azərbaycanda təşkil etmişdir. Bu nisbətən ayrı orta Asya ölkələrdə Gürcüstan, Qazaxıstan, Qırğızıstan, Özbəkistan və Tacikistan üçün müvafiq 7.0, 3.0, 1.2, 0.6 və 0.5 edir [Medscape, 2014]. 66-70 yaş arasında olan kişilərin 40%-də prostatın mikroskopik (latent) xərçəngi vardır. Bunlardan yalnız 10%-i latent formadan kliniki cəhətdən aşkar formaya keçir və 3-5%-i ölümlə nəticələnir. Kliniki gedişin xüsusiyyətlərindən asılı olaraq, bu şiş uzun illər boyunca xəstənin əhval-ruhiyyəsinə təsir etmir. Qarşıdakı 30 ildə bu növ xərçəngin epidemiya şəkli olaraq 3 dəfə artması mülahizələri irəli sürülür [Peron, 2002]. Prostat vəzi şişinin ilkin diaqnostikası bu xəstəliyin profilaktikasında və müalicəsində mühüm addımlardan biridir. Bu istiqamətdə tətbiq olunan ən müasir diaqnostika metodu prostat spesifik antigenin (PSA) biomarker kimi istifadə olunmasıdır [Ludwig, 2004]. PSA ilk dəfə 1979-cu ildə prostat vəzi toxumasından alınan kiçik zülaldır [Steven, 2006]. 1980-ci ildə PSA-nı qanda aşkarlayan seroloji test hazırlanaraq tətbiq edilmişdir. PSA-nın yarım parçalanma dövrü 2,2-3,2 gün təşkil edir. Prostat vəzi üzərində aparılan istənilən prosedür və manipulyasiya PSA-nın artımına səbəb olur və onun normallaşması üçün bir neçə həftə tələb olunur. Biopsiya və transuretral rezeksiya mütləq şəkildə PSA-nın qan serumunda 5,9-7,9 nq/ml artımına səbəb olur və 15-17 günə normallaşır. Kəskin və xroniki prostatitlərdə prostat epitelisinin zədələnməsi nəticəsində, həmçinin PSA-nın təyini prostat vəzi xərçənginin

ilkin və lokal formalarının aşkar olunması üçün əvəzsiz bir metoddur. Lakin metodun həssaslığı latent mikroskopik formada olan prostat vəzi xərçənginin müəyyən edilməsi üçün yetərli deyil. Belə ki, 20-40% hallarda PSA-nın qan serumunda normal qatılığı müşahidə edilir. Bundan əlavə, PSA-nın 4 nq/ml-dən 10 nq/ml-ə qədər diapazonda olan qiymətlərinin düzgün interpretasiyasında da müəyyən çətinliklər üzə çıxır ki, bunlar da PSA-nın tətbiqində yeni metodologiyanın işlənilməsi üçün zərurətini yaradır.

Dissertasiya işinin məqsədi 40 yaşdan yuxarı olan kişilərdə PSA-nın qan serumunda qatılığının müəyyən edilməsi üçün yeni, daha həssas reaktiv dəstənin işlənilməsi və hazırlanmasından ibarət olmuşdur. Bundan əlavə, tədqiqat işinin məqsədinə yaş 40-dan yuxarı kişilərdə prostat vəzinin xərçənginin ilkin diaqnostikası, xoş- və bədxassəli şişlərin differensiasiyası və klinikaya qədər olan pasientlər qrupunda skriningin aparılması məqsədilə yeni reaktiv dəstələrinin hazırlanması, bu reaktivin istifadəsinə əsaslanaraq, daha müasir diaqnostik metodologiyanın təklif olunması, köhnə tətbiq olunan reaktiv dəsti ilə müqayisəsi və üstün cəhətlərinin aşkar edilməsi də daxildir. Təklif olunan metodun əsas prinsipi İmmuno-Radio-Metrik-Analiz (İRMA) üsulu ilə qanda PSA-nın təyini edilməsinə əsaslanır.

Qarşıya qoyulan məqsədə çatmaq üçün aşağıdakı vəzifələrin yerinə yetirilməsi nəzərdə tutulmuşdur.

1. Radioaktiv ^{125}I un (Nordon şirkəti Belçika) alınması.
2. Reaktiv dəstələrinin hazırlanması üçün tələb olunan anticisimlərin alınması (Finlandiya).
3. Anticisimlərin epitopunun ^{125}I -lə nişanlanması.
4. Anti-PSA həcirlənmiş şüşələrin hazırlanması.
5. Standart zərədlərin (WHO və EQAS standartlarına əsasən) hazırlanması İRMA metodunun hazırlanması.
6. İRMA metodunun əsas mərhələlərinin işlənilməsi və hazırlanması.
7. Sağlam şəxslərdən ibarət olan nəzarət qrupunda alınan reaktiv dəstənin yoxlanılması
 - 40-50 yaş diapazonunda olan qrupda PSA-nın səviyyəsinin təyini.
 - 50-60 yaş diapazonunda olan qrupda PSA-nın səviyyəsinin təyini.
 - 60-70 yaş diapazonunda olan qrupda PSA-nın səviyyəsinin təyini.
 - 70 dən yuxarı yaş diapazonunda olan qrupda PSA-nın səviyyəsinin təyini.
8. Lazım olan hallarda digər diaqnostik metodların (rəqəmsal rektal müayinə, biopsiya) tətbiq olunmasının məsləhət görülməsi.

İşin elmi yeniliyi. Bu tədqiqat işində təklif olunan yanaşma PSA nın

şiş markeri kimi istifadəsi metodunun modifikasiya olunmuş daha həssəs variantı olub prostat vəzi xərçənginin həmçinin onun residivinin diaqnozunda ilk dəfə olaraq istifadə olunmuşdur. Təcrübələrdə istifadə edilən İRMA reaktiv dəsti bizim tərəfimizdən hazırlanmışdır və daha sərfəli və yüksək həssaslığı ilə fərqlənir. Qeyd etmək lazımdır ki, tədqiqat işləri Londonda (BK) Müqəddəs Bartelamyu xəstəxanasında təcrübə və təlim zamanı alınan biliklərə əsaslanır. Magistr dissertasiyasında qalxanabənzər vəzinin xəstəliklərini öyrənmək üçün free-T4 RIA kitinin hazırlanması prinsipi təklif olunan dəstin ərsəyə gəlməsinə əsas vermişdir. Tədqiqat işində həmçinin yerli PSA kiti ilə qərb şirkətlərinin PSA kitləri müqayisə edilmiş və qənaətbəxş nəticələr alınmışdır. Bu o deməkdir ki, bütün ölkədə prostat xərçənginin kütləvi skriningi üçün daha səmərəli yerli kitdən istifadə edilə bilər. Təklif olunan reaktiv dəstinin iş prinsipi əvvəllər təklif olunan immunoferment metoduna əsaslanır, lakin radioaktiv olduğundan çox həssasdır və maddi cəhətdən sərfəlidir.

İşin praktiki əhəmiyyəti ondan ibarətdir ki təklif olunan metod PSA təyini üçün kliniki biokimyəvi laboratoriyalarda rutin testlərin aparılması məqsədilə çox uşurla tətbiq edilə bilər

Tədqiqatın aprobasiyası. Aparılan işin nəticələri əsasında 5 məqalə yazılmış və həmin məqalələr xarici ölkələrin jurnallarında (Moldova, İran), eləcə də Azərbaycan Metabolizm Jurnalında və Azərbaycan Əczaçılıq və Farmakoterapiya jurnalında dərc edilmişdir. Dissertasiyanın nəticələri BDU-nun Biokimya kafedrasının elmi seminarında, attestasiya-hesabat iclaslarında, Respublika elmi-praktik konfranslarında müzakirə və məruzə edilmişdir. Eyni zamanda, dissertasiya işinin nəticələri müəllifin müvafiq məqalə və tezislərində öz əksini tapmış və bu yolla aprobasiyadan keçmişdir. Tədqiqatın nəticələri Nüvə Təbabəti üzrə 5-ci Beynəlxalq və 17-ci İran konqresində (Şiraz, İran, May 2013); 10-cu Asiya-Okeaniya Nüvə Təbabəti və Biologiya konqresində (Tehran, İran, May 2012) və III Beynəlxalq Elmi Konfransın Materiallarında (Bakı-Azərbaycan, May 2013) müzakirəyə çıxarılmışdır.

Tədqiqat işinə aid nəşr olunmuş işlər. Aparılan işin nəticələri əsasında 5 məqalə (2-si xarici ədəbiyyatda olmaqla) və 3 tezis çap olunmuşdur.

Dissertasiyanın quruluşu və həcmi. “Prostat vəzinin xoş- və bədxassəli şişlərinin differensial diaqnostikasında və müalicənin nəticələrinin qiymətləndirilməsində onkoloji markerlərin tədqiqinin rolu” adlı dissertasiya işi giriş hissədən, üç fəsildən, nəticələrdən və istinad olunan ədəbiyyat siyahısından ibarət olaraq 129 səhifə, 20 şəkildə və 15 cədvəldə əks olunmuşdur.

MATERIAL VƏ METODLAR

Eksperimentin əsası: PSA-nın təyini İRMA metoduna əsaslanır və bunun üçün biz PSA molekulunun iki müxtəlif epitopuna qarşı işlənmiş iki monoklonal anticisimdən istifadə etmişik. Nümunələr və yaxud standartlar monoklonal anticisim hopdurulmuş sınaq şüşələrində ikinci ^{125}I nişanlı anticisimlə inkubasiya edilmişlər. Inkubasiya başa çatdıqda sınaq şüşələrinin daxilindəki maye kənar edilmiş və sınaq şüşələri yuyulmuşlar. Beləliklə də, sərbəst siqnal anticisimi kənar edilmiş, birləşmiş radioaktivlik isə qamma sayğacı vasitəsilə ölçülmüşdür. Sonda təyin edilən radioaktivliyin standartlardan asılılığını ifadə edən dərəcəli əyri qurulmuşdur. Naməlum nümunədəki PSA qatılığı bu dərəcəli əyri vasitəsilə təyin edilmişdir. RIA struktura görə spesifik immunokimyəvi analiz metodudur. Onun spesifik adlandırılmasına səbəb antigen (Ag) və anticisim (Ac) arasında yüksək dərəcədə spesifik olan immunokimyəvi reaksiyanın baş verməsidir. RIA metodunun yüksək dərəcədə həssas olmasına səbəb qismən anticisimlərin çox “həris” olması, qismən də radioaktiv (nişanlanmış) maddənin çox az miqdarının belə sayğacda böyük kəmiyyət göstərməsidir. Məsələn, orta səviyyəli sayğacın 1 dəqiqədə 2000 sayması üçün bizə yalnız 10^{-15} M qatılığında ^{125}I ilə nişanlanmış anticisim lazımdır.

RIA təcrübəsinin aparılması üçün aşağıdakılar tələb olunur:

- İzotop indikatoru və yaxud nişanlanmış liqand,
- Birləşdirici maddə və yaxud immun zərdabı,
- “Birləşmiş” və “sərbəst” fazaları ayırmaq üçün ayırma sistemi,
- Müxtəlif qatılıqlı standartlar və yaxud liqandlar,
- Sıfır standart kimi - liqanda malik olmayan insan zərdabı.

Yuxarıda adı çəkilən reagentlər adətən daha yaxşı nəticə əldə etmək üçün istifadə qaydaları göstərilən təlimatla birlikdə İRMA kiti şəklində mövcud olur. Biz standart kimi Beckman şirkətinin PSA-IRMA kitlərini və həmçinin qiymətləndirmə məqsədi ilə yerli reagentləri istifadə etmişik. Bu tədqiqat üçün klinik simptomlara malik, yaşı 40-dan yuxarı olan iki yüz kişi (və bundan əlavə 50 sağlam kişi) seçilmişdir. Nümunələr təmizlənmiş, antikoagulyantsız sınaq şüşələrinə yığılmış və bir saat və yaxud daha artıq müddətdən sonra zərdab ayrılmış və alikvotalar analiz başlayana kimi - 20°C -də dondurularaq saxlanılmışdır.

İzotop indikatorunun hazırlanması. İzotop indikatoru spesifik radionuklid ilə nişanlanmış liqanddır. Bu məqsədlə istifadə edilən izotoplardan ən çox uyğun gələn yod (^{125}I) izotopudur və liqandın

radioaktiv yodla nişanlanması üçün 125 I izotopunu molekula daxil edilir. Yodlaşdırılma üçün xloramin-T kimi oksidləşdiricilərdən istifadə edən kimyəvi metodlar tətbiq edilir. İzotop indikatoru immuno-radio analiz sisteminin əsas reagentlərindən biridir.

O radioaktiv yod atomunun (125 I) antigen (rəqabət metodu və ya RİA üçün) və yaxud anticisim molekuluna (sandviç metodu və ya İRMA üçün) daxil etməklə alınır.



Reaksiyaya bir dəqiqə vaxt sərf olunur və çıxım 70%-lə 100% arasında olur. İdeal çıxım təqribən 90%-dir. Bu o deməkdir ki, təqribən 10% yod birləşməmiş qalır və beləliklə, təmizlənmə profilinin xromatoqramında yodlaşmış və yodlaşmamış zülalın pikləri aydın görünür. (Cədvəl 1)

Cədvəl 1.

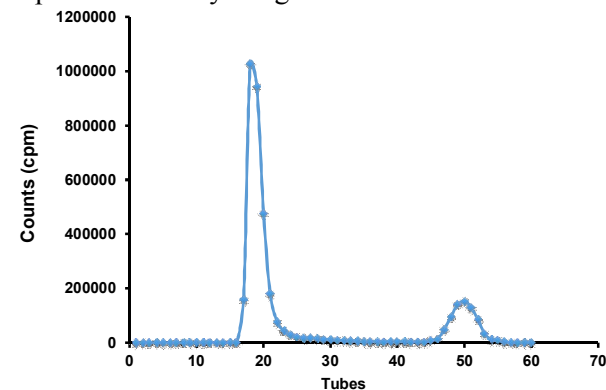
Sınaq şüşələrinin sırası və müfəfiq radioaktivlik

No.	Sayı (cpm)	No.	Sayı (cpm)	No.	Sayı (cpm)	No.	Sayı (cpm)
1	450	16	1200	31	9978	46	14986
2	500	17	158106	32	8857	47	49967
3	550	18	1026613	33	7296	48	97122
4	600	19	943780	34	6794	49	141654
5	650	20	475573	35	5735	50	152704
6	700	21	180562	36	4589	51	129312
7	750	22	77624	37	4111	52	85813
8	800	23	45613	38	3672	53	34854
9	850	24	29685	39	4039	54	11841
10	900	25	21946	40	4446	55	10212
11	950	26	18223	41	4956	56	3975
12	1000	27	18731	42	3574	57	1521
13	1050	28	16039	43	3174	58	910
14	1100	29	13898	44	3685	59	812
15	1150	30	11315	45	9181	60	657

Adətən anticismin nişanlanmasından alınan izotop indikatorunun təmizlənməsi üçün ən münasib metod gel filtrasiya xromatoqrafiyası hesab olunur. Bu məqsədlə açıq borulu maye xromatoqrafiyası istifadə edilə bilər. Bu diaqramda iki əsas pik görünür:

- Birinci pik izotop indikatoru olan yodlaşmış anticismə (IgG) uyğundur. Bu verilən sistemdə yoxlanılaraq iş üçün yararlı izotop indikatoru seçilməlidir. Bu fraksiyadan izotop indikatoru hazırlanır.

- İkinci pik isə sərbəst yodu göstərir.



Sək. 1. G-25 gel sütünlü xromatoqrafiya üsulundan istifadə etməklə nişanlanmış PSA-nın təmizlənməsi diaqramı (Üfüqi = radioaktiv hesablanması və şaquli=sınaq şüşələri)

İşçi bufer: Adətən pH təqribən 7 ətrafında olur, lakin bəzən immun reaksiya pH-ın aşağı qiymətlərində daha yaxşı gedir. Zülalın optimal qatılığını təyin etmək üçün müvafiq təcrübə aparılmalıdır. Adətən bu kəmiyyət BSA və yaxud ekvivalent zülalın 0,1-1%-ni təşkil edir. Bundan əlavə kondensasiya buferinin tərkibində adətən 0,01% - 0,1% qatılığında NaN_3 kimi qoruyucu maddə olmalıdır.

Saxlanması: Radiolizi minimuma endirmək üçün izotop indikatorunun ilkin məhlulu durulaşdırılmalıdır. Bu məqsədlə biz seçilmiş fraksiyanı 20µCi/ml –dən aşağı qatılığa kimi durulaşdırmışdıq. Yekun işçi məhlul dondurularaq qurudulmuş (liofilizə edilmiş) və ya maye formada saxlanmalıdır. Hər iki halda izotop indikatorunu müvafiq temperaturda (2-8 °C) saxlamaq məsləhət görülür.

Anti-PSA hopdurulmuş sınaq şüşələrinin hazırlanması. Son zamanlar immun analiz metodlarında monoklonal anticisimdən (mAb) çox

geniş istifadə olunur. Bu tədqiqat işində biz kommersiya şirkətindən əldə etdiyimiz bir cüt monoklonal anticisim istifadə etmişik. Onlardan biri ^{125}I ilə izotop indikatoru hazırlamaq üçün əvvəllər istifadə edilmişdi. Digəri isə polistiroil sınaq şüşələri kimi bərk fazaların hopdurulmasında istifadə edilir. Bərk faza analizlərində anticisimlər fiziki adsorbsiyaya məruz qalırlar və yaxud da bərk faza ilə kimyəvi yolla birləşirlər. Bu reaksiya maye fazadakı antigen molekulları ilə bərk fazadakı anticisim molekulları arasında baş verir və buna görə də bərk faza analizi adlanır.

Anti-PSA monoklonal anticisimlərin hopdurulması.

Reagent və materiallar:

NaN ₃ H ₂ O (təmizlənmiş) Tris Limon turşusu	Natrium sitrat BSA saxaroza Anti PSA Mab	NaH ₂ PO ₄ , 2 H ₂ O & Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O
---	---	---

Addım 1: Hopdurma əməliyyatı.

- Bufer preparatı:

Duz	Çəkisi
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O	0.31 g
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	1.20 g
NaN ₃	0.5 g
H ₂ O	1 litrə qədər

Kommersiya monoklonal anticisiminin (Mab) məhlulunun qatılığı 7,5 mg/ml-dir və hopdurulma zamanı bu məhlul 7,5 µg/ml-ə kimi durulaşdırılmalıdır. Bu məqsədlə biz bu məhluldan 100 µl götürüb üzərinə 100 ml bufer əlavə etmiş və homogenləşməsi üçün ehtiyatla qarışdırmışıq. Sonra hər bir sınaq şüşəsinə 0,4 ml ayıraraq hopdurulma prosesinə başlamış və gecə səhərə kimi inkubasiya aparmışıq.

Addım 2: hopturulmadan sonra

- Hopturmadan sonra istifadə olunan bufer preparatı

Reagent	Çəkisi
Tris	6.0 g
Limon turşusu	3.2 g
Natrium sitrat	10.0 g
NaN ₃	1.0 g
BSA	10.0 g
Saxaroza	10.0 g
H ₂ O	1 litrə qədər

- Hopdurmadan sonrakı əməliyyat

Birinci mərhələdən alınan anticisim məhlulu kənar edilir, hər bir sınaq şüşəsinə 0.5 ml bufer ayrılaraq gecə səhərə kimi inkubasiya aparılır.

Hopdurulma prosesi zamanı anticisim molekullarının çoxu bərk fazanın səthinə möhkəm birləşmiş olur. Lakin bəzi molekullar (xarici təbəqə molekulları) daha zəif birləşir. Gələcək antigen-anticisim reaksiyasına mane olmamaq üçün hopdurulma prosesindən sonrakı əməliyyat zamanı zəif birləşmiş anticisim molekulları kənar edilməlidir. Eyni zamanda alınan hopmuş anticisim molekulları çevrilmə zamanı qorunmalıdır. Bu məqsədlə əməliyyatdan sonra istifadə edilən buferə bəzi müdafiə inqrediyentləri də əlavə edilməlidir. Hopdurulma əməliyyatından sonra sınaq şüşələri müvafiq otaqda qurudulmalıdır. Qurudulma prosesi gecə səhərə kimi davam edir.

Kondensasiya və saxlanma: Hopdurulmuş sınaq şüşələri nəm və ya quru formada saxlanıla bilər. *Nəm forma* qısa müddətli saxlama üçün istifadə edilir (bir neçə həftə). Bu halda hopdurulmuş sınaq şüşələri tərkibində 0.1% NaN₃ olan buferdə (hopdurulmadan sonrakı bufer) 4–8°C temperaturunda saxlanılır. Quru forma isə uzun müddətli saxlama üçündür (bir neçə aydan bir neçə ilə kimi). Bu məqsədlə hopdurulmuş, quru sınaq şüşələri bəzi quruducularla birlikdə müvafiq qutulara yerləşdirilir.

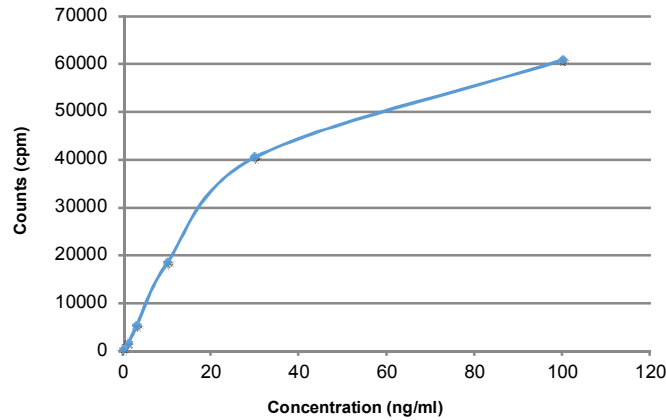
Standartların hazırlanması: Biologiya sahəsində istinad standartı WHO kimi rəsmi təşkilatdan, konsensus standartları isə beynəlxalq EQAS proqramından əldə edilir. İmmun analizdə istifadə olunan standartın (kalibrator) diapazonu bir neçə standart qatılıqdan ibarət olur ki, bu da maddənin müəyyən ölçüdə analiz edilməsinə imkan verir. Hər bir standart matriks adlanan uyğun mühitdə antigenin durulaşdırılmasından alınır.

Matriks analiz üçün götürülən maye nümunənin (zərdab və ya plazma) davranışını əks etdirməlidir. PSA üçün matriks qadın qan zərdabıdır. Çünki adətən qadınlar PSA antigeninə malik olurlar. Zərdab yığıldıqdan sonra qoruyucu kimi 0,1% natrium azid (NaN₃) əlavə edilir və əvvəl 0 ng/ml olan PSA-nın miqdarı yoxlanılır.

Əvvəlcə biz WHO istinad standartından ən qatı standartı və ya standart 6 (100 ng/ml)-ni, sonra isə digər standartları St.₅ (30 ng/ml), St.₄ (10 ng/ml), St.₃ (3 ng/ml), St.₂ (1 ng/ml), St.₁ (0 ng/ml) hazırladıq. Yerli kiti hazırladıqdan və yoxladıqdan sonra biz onu Beckman şirkətinə məxsus olan kit ilə müqayisə etdik. Aldığımız nəticələr bu iki kit arasında korelyasiyanın olduğunu göstərdi və bu bizi xəstələrlə daha çox tədqiqatlar aparmağa və gələcək layihələrin yaradılmasına ruhlandırdı.

Cədvəl 2: Standartların müvafiq radioaktivlər

Standartlar	qatılıq. ng/ml	Sayı (cpm)
st. 1	0	298
st.2	1	1456
st.3	3	5198
st.4	10	18352
st.5	30	40357
st.6	100	60686



Şəkil 2. Standart məhlullardan istifadə etməklə alınan standart əyri

Analiz üçün tələb olunan materiallar:

PSA İRMA kiti aşağıdakılardan ibarətdir:

- Anti-PSA monoklonal anticisim hopdurulmuşsınaq şüşələri: 2 x 50 sınaq şüşələri
- Monoklonal ¹²⁵I –nişanlı anti-PSA anticismi : bir flakon (11 ml)
- Kalibratorlar (Standartlar) : beş 0,8 ml-likflakon və sıfır kalibratorun bir 2 ml-lik flakonu. Flakonlardaöküzün zərdab albumini və natrium aziddən (<0.1%) ibarət buferin tərkibində qatılığı 0-100 ng/ml olan insan PSA-sı vardır.
- Kontrol zərdab: içərisində öküz zərdabı və natrium aziddə (<0.1%) liofilizə edilmiş insan PSA-sı olaniki flakon.
- Yuyucu məhlul: su ilə 500 dəfə durulaşdırılmalı olan 1ml-lik flakon.

1. Mikropipet (100 µl)
2. Avtomatik pipet (2 ml)
3. Vortex Mikseri
4. Üfiqi və ya orbital şeyker
5. ¹²⁵I üçün qamma sayğacı seti

Nümunələrin toplanması, işlənməsi, saxlanması və durulaşdırma

- Qan nümunələri heç bir əlavəsi olmayan və yaxud içərisində heparin, EDTA və yaxud natrium sitrat olan sınaq şüşələrinə yığılır.

- Sentrifuqa vasitəsilə zərdab və ya plazma hüceyrələrdən ayrılır.

- Əgər analiz 24 saat ərzində aparılacaqsa, zərdab və plazma nümunələri 2-8 °C temperaturunda saxlanıla bilər.

Əgər nümunələr daha uzun müddət saxlanılacaqsa, təkrar donma və ərimənin baş verməməsi üçün alikvotlara ayırıqdan sonra onları donmuş vəziyyətdə (<-18°C) saxlamaq lazımdır. Nümunənin əridilməsi otaq temperaturunda aparılmalıdır.

- Əgər nümunənin qatılığı ən yüksək qatılıqlı kalibratorun qatılığından çoxdursa, o «sıfır» kalibratora kimi durulaşdırılmalıdır (sümük metastazı ilə nəticələnən inkişaf etmiş prostat karsinomasına malik xəstələrdən alınan nümunələr).

Analizin protokolu:

1. Reagentlər otaq temperaturualana kimi saxlanılır.
2. Analiz duplikatlarda aparılır.
3. Pipet vasitəsilə ardıcıl olaraq 100 µl standart (kalibratorlar), control zərdab və ya nümunələr götürülür.
4. Hər bir sınaq şüşəsinə 100 µl izotop indikatoru əlavə edilir. Vortex mikseri vasitəsilə sınaq şüşələrinin tərkibindəki maye köpüklənmədən qarışdırılır.
5. Ümumi radioaktivliyi (T) ölçmək üçün hər birində 100 µl izotop indikatoru olan iki müxtəlif sınaq şüşəsi hazırlanır.
6. Sınaq şüşələri 2 saat ərzində otaq temperaturunda (18-20°C) qarışdırılaraq inkubasiya edilir.



Şəkil 3. İmmunoassay laboratoriyası

7. Ümumi aktivliyi (T) ölçmək üçün istifadə edilən sınaq şüşəsindən başqa bütün sınaq şüşələri tamamilə təmizlənir və maye dərhal kənar edilir. Bu mərhələni təkrar edərək sınaq şüşələrində mayenin qalmadığına diqqət yetirmək lazımdır.

8. Bütün sınaq şüşələrindəki radioaktivlik ¹²⁵I izotopuna görə tənzimlənmiş pəncərəsi olan qamma saygacında ən azı bir dəqiqə müddətində ölçülür.

Tədqiqatların nəticələri və onların müzakirəsi. Nəticələr standart əyri vasitəsilə əldə edilir. Dərəcəli əyrinin qurulması üçün istifadə edilən standartların qatılıq diapazonu 0-100 ng/ml-dir. Dərəcəli əyri eyni zamanda analiz edilən nümunələrdə PSA qatılığını təyin etmək üçün qurulur. Standart əyri sayılan impulsların PSA qatılığından asılılığını ifadə edir.

Cədvəl 2.

PSA-nın miqdarına müvafiq müxtəlif qruplar

PSA miqdarına müvafiq qruplar	qrup 1 PSA miqdarı (0 – 4 ng/ml)	qrup 2 PSA miqdarı (4 – 10 ng/ml)	qrup 3 PSA miqdarı ≥10 ng/ml
Nümunələrin sayı	116	88	6
Xəstələtin faizi	58%	39%	3%
PSA miqdarı (M ±2sd)	2.0 ±0.78	6.31±1.67	18 ± 6.0
Prostat karsinoması	0	2	2

Cədvəl 3.

Yaş həddinə müvafiq müxtəlif qruplar

Qruplar	Yaş	Xəstələrin sayı	PSA miqdarı (Mean ± SD)
A	40 – 49	15	1.2 ± 2.3
B	50 – 59	60	4.1 ± 3.5
C	60 – 69	80	4.3 ± 2.9
D	>70	45	6.2 ± 3.2

Dəqiqlik, qeyri-obyektivlik, düzgünlük. İstənilən ölçmə zamanı həmişə müəyyən qədər xəta baş verə bilər. Xəta bəzi hallarda az, bəzən isə daha çox olur, lakin xətasız ölçmə olmur. Ümumi xətanı yaradan bir-birindən asılı olmayan iki komponent mövcuddur. Onlar təsadüfi və sistematik xəta adlanır. Dəqiqlik xətanın olmaması deməkdir və beləliklə də, ölçmə o zaman dəqiq adlanır ki, təsadüfi və sistematik xəta baş verməsin. Başqa sözlə aparılan ölçmə dəqiq və obyektiv olmalıdır.

İntra və inter analizlər. Bu dəqiq profillər adətən bir sıra keyfiyyətə nəzarət nümunələrinin seçilməsi ilə qurulur. İntra və inter analizlərdə dəyişkənliyi təyin etmək üçün 4 zərdab nümunəsi istifadə edilmişdir. Biz hər iki halda CV-nin 10%-dən az olduğunu müşahidə etmişdik ki, bu da etibarlı sınaq üçün məqbul hesab edilir.

Yekun nəticələr. Apardığımız tədqiqat işində prostat xərçənginin skriningi üçün prostat problemlərinin əlamətləri olan 40 yaşından yuxarı 200 kişi seçilmişdir. Bundan əlavə xəstəliyin əlamətləri olmayan 50 sağlam kişi kontrol kimi seçilmişdir. Qan nümunələri götürüldükdən sonra bir saat müddətində otaq temperaturunda saxlanılmış və sonra zərdabın ayrılması üçün sentrifüqalaşdırılmışdır. Nəhayət, PSA-nı ölçmək üçün immun analizi metodu tətbiq edilmişdir. Bütün sağlam kişilərdə PSA 0,5 ng/ml-dən az olmuşdur. Lakin digərlərində (200 kişi) PSA-nın fərqli qatılığı aşkar edilmişdir.

Cədvəl 4.

4 müxtəlif yaş qrupunda PSA nəticələri:

Yaş	PSA miqdarı ± 2SD ng/ml
40 – 49	1.16 ± 2.25
50 – 59	4.10 ± 3.50
60 – 69	4.30 ± 2.90
> 70	6.20 ± 3.20

Beləliklə, biz onlara uroloqa müraciət etməyi və Rəqəmsal Rektal Müayinədən keçməyi tövsiyə etdik. Təqribən 70 kişi (67 nəfərdə PSA 4,0 ng/ml-dən çox olmuşdur, 3 nəfərində isə PSA bu kəmiyyətdən az olsa da, şübhəli hal hesab olunmuşdur) Ultra Səs (TRUS) müayinəsindən keçmiş və onlardan 46 nəfərinin üzərində biopsiya aparılmışdır. Apardığımız tədqiqatın nəticəsində 42 halda (təqribən 91%) xoş xassəli Prostat Hiperplaziyası və 4 halda (təqribən 9%) bəd xassəli şiş aşkar edilmişdir. Hazırda həmin dörd xəstə kimyəvi və radioterapiya alır.

Prostat xərçəngi qarşısının alınması: Ümumiyyətlə, prostat xərçənginin qarşısının alınması üçün heç bir təsirli yol yoxdur, lakin biz risk faktorlarını azalda bilərik. Xərçəng riskini artıran material və ya vəziyyətlər risk faktorları adlanır. Xərçənglərin çoxu bir neçə risk faktorlarının nəticəsidir.

Əgər bir kişinin nəsində (Atası və ya qardaşı) prostat xərçənginin diaqnozu varsa, biz əminliklə deyə bilərik ki, onda xərçəngin inkişafı riski daha yüksək ola bilər. Həmçinin, əgər diaqnoz zamanı xəstənin yaşı 65-dən azdırsa, xərçəng inkişafının riski yüksəkdir [Schroder, 2001]. Qidada qızıl və ya tuna kimi balıq növlərinin istifadəsi prostat xərçəngi riskini azaltmaq üçün yaxşı vasitədir. Bundan əlavə yaşıl çay, soya, lobya, noxud, fıstıq (Isoflavinin yüksək miqdarda olmasına görə) kimi məhsulların istifadəsi və alqaqolun qəbulunun azaldılması tövsiyə olunur. Yağ, süd və süd məhsulları, qırmızı ət və ya kolbasa, prostat xərçəngi riskini artırma bilər [Moyer, 2012]. Normal bədən çəkisi bu xəstəliyin başvermə riskini azaldır; ümumiyyətlə, BMI-in 30 dan az olması tövsiyə olunur. İdman etmək, kalorilərin miqdarının azaldılması və ya arıqlamaq xəstəliyin riskini azaldır. Ümumiyyətlə, idman etmək digər başqa xəstəliklərin də riskini azaltmağa kömək edir. Bir sıra tədqiqatlarda göstərilir ki, nar şirəsi içmək prostat xərçəngi inkişafını ləngidir [Hong, 2008].

Bir nəzəriyyə var ki, vitamin C böyük dozada, xərçəng hüceyrələrin inkişafını dayandırır, lakin bu iddia sübut olunmayıb və bu sahədə daha geniş araşdırmalara ehtiyac var [Verras, 2008]. Tədqiqatlar göstərir ki, bir neçə irsi gen mutasiyası prostat xərçəngi inkişafı ehtimalını artırır. BRCA gen mutasiyası olan kişilərdə xəstəliyin riski daha yüksəkdir [Coughlin, 2002].

Uzun müddət və yüksək dozada testosteron istifadəsi prostat xərçəngi riskini artırma bilər. Pestisidlər və rezin istehsal sənayesində çalışan insanlarda prostat xərçəngi riski yüksəkdir.

Təklif etdiyimiz test dəsti xərçəngi vaxtında aşkarlamaq və müalicə müddətində və ya sonra prosesin qedişini izləmək çox vacibdir. Tədqiqatçılar yeni və daha yaxşı şiş markerləri axtarışındadırlar. Lakin hazırda PSA test və DRE birləşməsi erkən prostat xərçənginin aşkar olunması üçün müvəffəqiyyətlə istifadə ola bilər [Cookson, 2010].

NƏTİCƏLƏR

1. PSA ölçülməsi üçün, IRMA (Immuno-Radio-Metrik-Assay) metodu tətbiq olunmuşdur. Aparılan tədqiqatlara əsasən müəyyən olunmuşdur ki, yerli dəst Immunotech şirkətinin PSA dəsti ilə müqayisədə müsbət nəticə verir.
2. Bu klinik tədqiqatında, iki yüz kişi prostat xərçəngi skreening üçün və bundan əlavə qırx sağlam kişi (simptom olmayan) kontrol kimi seçildilər. Bütün iki yüz nəfər, PSA analizdən sonra (onların PSA miqdarı nəzərə alınmadan), digital rektal müayinə (DRE) üçün, Ürologa yönəldilmişdir.
3. Təxminən 70 kişidən 67 nəfərində PSA miqdarı 4.0 ng/ml-dən artıq və 3 nəfərdə PSA miqdarı 4.0 ng ml-dən aşağı olmuşdur. Lakin sübhəli-lər ultra səs (TRUS) müayinəsinə yönəldilmişdir. Onların arasında, 46 kişi biopsiyaya məruz qaldı.
4. Nəhayət bu 46 nəfərdən, 42-sində (91%) Benign Prostat Hiperplazi və 4-ündə (9%) malignite təsbit edildi ki, onların hamısında PSA miqdarı 4.0 ng /ml-dən çox olmuşdur.
5. Biz bu tədqiqat işlərindən belə başa düşürük ki, kişi əhalisində adətən prostat xərçəngi o zaman baş verir ki, onların PSA miqdarı 4.0 ng / ml-dən daha çox olsun. Lakin bu iş, regionda daha geniş miqyasda və müxtəlif əhalidə təsdiq olmalıdır.

PRAKTİKİ TÖVSIYYƏLƏR

1. 45-70 yaş arası kişilər üçün hər il PSA analizindən keçmək tövsiyə olunur. Ailədə prostat vəzinin xərçəngi olduğu halda müayinəyə 40 yaşdan başlamaq məsləhət olunur. 70 yaşdan yuxarı kişilər üçün PSA skreeningi artıq tövsiyə olunmur.
2. Prostat vəzinin biopsiyası haqqında qərar yalnız yüksək PSA və ya anormal DRE əsasında deyil, eləcə də xəstənin yaşı, sərbəst və tam PSA nisbəti (azad/tam), PSA sürəti və ailə tarixi əsasında verilməlidir.
3. İrimiqyaslı əhali tədqiqatından əldə olunmuş nəticələrlə digər tədqiqatlar və başqa regionlar üçün əldə edilmiş nəticələrlə təsdiq edilməlidir. Bu ərazi üçün yerli komplektlərin münasib qiymətlərlə istehsalı bahalı kommersion komplekslərinin idxalının qarşısını almaq üçün alternativ yol ola bilər.

Dissertasiya mövzusunə dair çap olunmuş elmi işlərinin siyahısı

1. Moharamzadeh M., Əfəndiyev A.M., Quliyev A.Ə. // The preparation of Tracer for prostate-specific antigen (PSA) kit, International medical scientific journal (Medicus), Volgograd, 2015. p. 61-63.
2. Moharamzadeh M., Əfəndiyev A.M., Quliyev A.Ə. // Production of anti-prostate specific antigen coated tubes, Curierul Medical Journal, Nicolae Testemitsanu State University of Medicine and Pharmacy, Feb. 2014.vol.57, N 1.p. 17-20.
3. Moharamzadeh M., Əfəndiyev A.M., Quliyev A.Ə., Omarov Y. // Quality Control (QC) in radio immunoassay for measuring the Hormones or Oncology markers in clinical laboratories, Journal of Baku State University, no. 4 , 2013. s. 65-71.
4. Moharamzadeh M., Əfəndiyev A.M., Quliyev A.Ə. // Evaluation of Prostate Specific Antigen (PSA) for early diagnosis of prostate cancer, Azərbaycan Əczaçılıq və Farmakoterapiya Jurnalı, no.1, 2012. s.44-47.
5. Moharamzadeh M., Əfəndiyev A.M., Quliyev A.Ə. // The Production of Biological Standards sera for measuring of the Prostate Specific Antigen(PSA) in Blood, for Screening of the Prostate cancer, Azərbaycan Metabolizm Jurnalı, no. 2 , 2014.s.16-19.
6. Moharamzadeh M., Əfəndiyev A.M., Quliyev A.Ə. // The possibility of total automation in Radio Inmunoassay(RIA) , 5th International and 17th Iranian Congress of Nuclear Medicine, Shiraz, Iran, 2013. p.20.
7. Moharamzadeh M., // Evaluation of Prostate Specific Antigen (PSA) for screening of the prostate cancer, 10th Asia Oceania Congress of Nuclear Medicine and Biology, Tehran, Iran, 2012.vol.20.p.41-42.
8. Moharamzadeh M., Brachytherapy, as a Radiobiological Method for Treatment of the Prostate Cancer //The III International Scientific Conference on Inovation Problems of Modern Biology, Baku. 2013. p.37.

MASOUD MOHARAMZADEH JABAR OĞLU

THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF BENIGN AND MALIGNANCY OF THE PROSTATE GLAND BY STUDYING THE ROLE OF ONCOLOGY MARKERS IN DIAGNOSIS & EVALUATION OF THE RESEARCH

SUMMARY

This thesis is devoted to determine the effectiveness of measuring the PSA(Prostate-Specific Antigen) in men over 40 for screening of the prostate cancer. We also planned to manufacture a local kit with Immuno-Radio-Metric-Assay(IRMA) including: tracer, anti-PSA coated tubes and standard sera, that is used for measuring. Among the numerous solid phases available, coated tube is the most popular one, due to its user friendly feature. In solid phase method, we use the adsorption technique for coating anti-PSA monoclonal antibody in polystyrene tubes. The mechanism of adsorption is a hydrophobic interaction between the plastic material and the molecules of protein (antibody). After running the assay, we see a good correlation between the results of the commercial and the local-made kits. In our clinical study, 200 men over 40 selected to screen for prostate cancer. In addition, 40 healthy men (who had no symptoms) were selected as witness. All 200 men who had the symptoms, were referred to the Urologist and examined for Digital Rectum Examination (DRE). About 70 patient (67 patients who had PSA more than 4.0 ng/ml, and 3 patients who had PSA lower than 4 ng/ml but were suspicious), referred to do Ultra Sound (TRUS) examination. Among them, 46 men underwent to the biopsy. Finally 42 case (about 91%) of Benign Prostate Hyperplasia and 4 case (about 9%) of malignancy were detected of this study. These 4 patients went under chemo & radiotherapy. As we understand from this research, the studied male population, develop prostate cancer quite commonly if their serum-PSA level, are greater than 4.0 ng/ml. However, this study needs to be confirmed in a larger scale and different population in the region. Also, we can use the local-made kit to measure the PSA, not only for the laboratories performing a large number of tests, but also for the whole country in screening program of the prostate cancer.

РОЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ ОНКОМАРКЕРОВ В ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКЕ И ОЦЕНКЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ЛЕЧЕНИЯ ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫХ И ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.

РЕЗЮМЕ

Целью данной работы являлось исследование применения онкологического маркера - простат-специфического антигена (ПСА), у мужчин старше 40 лет в исследованиях рака предстательной железы. Одной из задач исследования было также производство набора иммунорадиометрического анализа (ИРМА) для измерения уровня ПСА в сыворотке крови. В результате проведения данной работы был изготовлен набор «ПСА-ИРМА» (включающий радиоактивную метку, пробирки с покрытием для специфической адсорбции ПСА и стандартную сыворотку), который был протестирован при определении содержания ПСА у мужчин старше 40 лет. В работе были использованы очищенные специфические к ПСА моноклональные антитела. Полистироловые пробирки с покрытием являются наиболее часто используемой твердой фазой из ряда доступных твердых фаз, так как такая форма является экономичной и удобной для пользователей. Механизм абсорбции антител основан на гидрофобных взаимодействиях между пластиковым материалом и молекулами белка (антитела). Анализы выявили хорошую корреляцию с результатами, получаемыми при использовании аналогичных коммерческих наборов. В клиническом исследовании был проведен скрининг на наличии рака предста-

тельной железы у двухсот мужчин старше сорока лет. Также было проведено исследование содержания ПСА у 50-ти здоровых мужчин. Все 200 мужчин, у которых были выявлены симптомы с разным количеством ПСА, были направлены к урологу для ректального обследования. Из 70 пациентов уровень ПСА у 67 пациентов был выше 4.0 нг/мл, а у 3 пациентов не превышал предела 4.0 нг/мл. Для подтверждения анализа указанные 70 пациентов были направлены на трансректальное ультразвуковое обследование (ТРУЗИ). У 46 из них была произведена биопсия. В результате, у 42 человек (примерно 91%) была обнаружена доброкачественная гиперплазия, а у 4 (около 9 %) - злокачественная опухоль. Этим больным рекомендовано прохождение химио- и / или радиотерапии.

В настоящей работе установлено, что в исследуемой выборке мужского населения вероятность развития рака простаты была выше в случае, если уровень сывороточного ПСА превышал 4.0 нг/мл. Отмечается необходимость и целесообразность подтверждения этих результатов в более масштабных региональных исследованиях в различных популяциях. Предлагается использовать наборы местного производства для оценки ПСА не только в лабораториях, проводящих большое количество тестов, но и на территории всей страны в рамках скрининг программ рака предстательной железы.

İXTİSARLARIN SIYAHISI

Ag	Antigen
Ac	Anticisim
CV	Variasiya əmsalı
DRE	Digital rektal ekspertizası
EDTA	Etilen di-amin tetrametil amin
mAc	Monoklonal anticisim
NSB	Qeyri spesifik əlaqə
PSA	Prostata həssas antigen
QC	Keyfiyyət nəzarət
RIA	Radio İmmunoloji analiz
IRMA	Radio metrik ölçmə analizatoru
SD	Standart kənarlanma
TRUS	Adi trans rektal ultura səs

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АЗЕРБАЙДЖАНА ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. А.И.КАРАЕВА

На правах рукописи

Роль исследования онкомаркеров в дифференциальной диагностике и оценке результатов лечения доброкачественных и злокачественных опухолей предстательной железы.

2406.02 – “Биохимия”

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации представленной на соискание ученой степени
доктора философии по биологическим наукам**

БАКУ - 2017