

**ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG GẮN CỦA PHỨC HỢP <sup>131</sup>I-ANA TRÊN CÁC VẬT LIỆU KHÁC NHAU**  
**HỒ ANH SƠN, NGUYỄN VIỆT TRUNG**  
**Học viện Quân y**

**TÓM TẮT**

Chúng tôi cân nhắc lựa chọn hai loại ống nhựa hoặc thủy tinh dùng trong nghiên cứu kháng thể kháng nhân đánh dấu <sup>131</sup>I (<sup>131</sup>I-ANA). Kháng thể này được cho vào các ống nghiệm nhựa và thủy tinh với lượng bằng nhau. Dung dịch đệm PBS được cho vào các ống nghiệm và ủ trong tủ ấm 37°C trong khoảng thời gian 120-180 phút. Sau đó, dung dịch được ly tâm và tách riêng phần cặn và dịch nổi. Hoạt tính phóng xạ của cặn và dịch nổi được đo bằng máy đếm phóng xạ. Kết quả cho thấy hoạt tính phóng xạ của kháng thể đánh dấu trong ống cặn-nhựa cao hơn đáng kể so với ống thủy tinh.

**SUMMARY**

In this study, selection of material for labeling ANA (<sup>131</sup>I-ANA) was considered between glass tube and plastic tube. Labeling ANA was added to serial of glass and plastic tubes in similar amount. PBS buffer was added to those tube and incubated in 37°C within 120-180 minutes. Then, the solution was centrifuged and supernatant was separated. Radioactivity of residue and supernatant was measured by scintillation counter. The result showed labeling ANA activity in residual-plastic tube was significant higher than those in glass tube.

**ĐẶT VẤN ĐỀ**

Sử dụng kháng thể đơn dòng gắn đồng vị phóng xạ trong nghiên cứu đánh giá hiệu quả điều trị ung thư đang được nhiều quốc gia trên thế giới quan tâm. Trước khi các sản phẩm này được đánh giá hiệu quả trên mô hình động vật, cần có giai đoạn thử nghiệm in vitro. Qua đó, có thể đánh giá hiệu quả gắn của phức hợp phóng xạ-miễn dịch (PX-MD) với các dòng tế bào ung thư trong ống nghiệm. Tuy nhiên, khi đi vào phương pháp cụ thể, chúng tôi gặp nhiều khó khăn khi sử dụng chất liệu (ống nghiệm) nghiên cứu khác nhau. Điều này thể hiện ở chỗ, với các chất liệu ống nghiệm khác nhau, kết quả gắn của phức hợp PX-MD với tế bào ung thư có sự khác biệt rất lớn. Điều này phản ánh có một tỉ lệ nhất định phức hợp PX-MD gắn lên

thành ống mà không gắn với tế bào gây ảnh hưởng tới kết quả nghiên cứu. Mặc dù đã tìm các nguồn tài liệu, nhưng chúng tôi không tìm được hướng dẫn chi tiết cách sử dụng loại vật liệu trong đánh giá khả năng gắn của phức hợp PX-MD in vitro dùng cho kháng thể kháng nhân (ANA). Do vậy, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm lựa chọn loại ống nghiệm phù hợp cho các nghiên cứu đánh giá khả năng gắn phức hợp PX-MD in vitro.

**PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

**1. Đối tượng nghiên cứu**

- Ống nghiệm thủy tinh
- Ống nghiệm nhựa Eppendorf

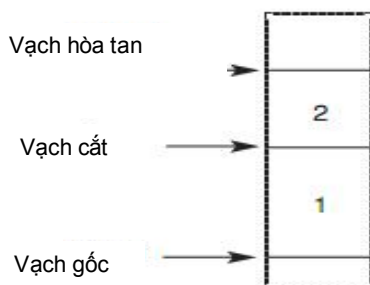
**2. Hóa chất nghiên cứu**

- Kháng thể kháng nhân: kháng thể kháng nhân (anti nuclear antibody, ANA) có bản chất là globulin được tách chiết từ huyết tương bệnh nhân bị bệnh tự miễn bởi Smith Henry (Công ty Dược AQP, Hoa Kỳ) với nồng độ 1,65 mg/ml. Bảo quản ở điều kiện 2-8°C tới khi sử dụng.

- phức hợp <sup>131</sup>I-ANA: ANA dưới dạng tinh khiết đánh dấu với đồng vị phóng xạ I-131 theo phương pháp đánh dấu trực tiếp dùng chất oxy hóa chloramin T, công việc được tiến hành tại viện Hạt nhân Đà Lạt với nồng độ 1mCi/ml. Bảo quản ở điều kiện 2-8°C tới khi sử dụng.

**3. Phương pháp nghiên cứu**

\* Kiểm tra hoạt tính của phức hợp <sup>131</sup>I-ANA tại thời điểm nghiên cứu: nhỏ 10µl phức hợp <sup>131</sup>I-ANA tại vị trí dưới vạch gốc của que thử Chromatography strip (Biodex). Ngâm que thử vào đệm PBS với mức dưới vạch gốc. Quan sát màu di chuyển trên que thử từ vị trí dưới vạch gốc tới vạch hòa tan thì lấy que thử ra.

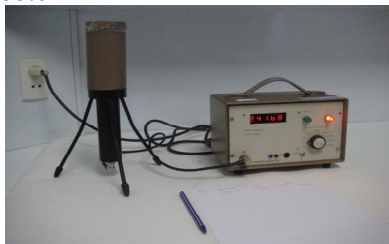


Hình 1: vị trí các mốc trên que thử Chromatography strip

Cắt tại vị trí giữa que thử tương ứng với vạch cắt có sẵn. Đo hoạt độ phóng xạ (CPM) của phần 1 (phần chỉ có <sup>131</sup>I) và phần 2 (phần chứa <sup>131</sup>I-ANA). Tính tỉ lệ hoạt độ phóng xạ của phần 2 so với toàn bộ theo công thức:

$$\text{Tỉ lệ} = \frac{(\text{CPM2})}{(\text{CPM1} + \text{CPM2})} \times 100$$

Trong các nghiên cứu của chúng tôi, tỉ lệ này luôn đạt trên 95%.



Hình 2: Máy đếm tia gama (National Instrument, Hoa Kỳ)

\*Bố trí đánh số các loại ống nghiệm:

Mỗi loại ống nghiệm gồm 6 chiếc, đánh số thứ tự từ 1-6 (theo bảng 1). Cho các loại dung dịch và hóa chất với thể tích theo bảng 1.

Bảng 1: Thứ tự đánh số và hóa chất

Vật liệu ống	a. Đệm PBS (μl)	b. ANA lạnh (μl)	c. <sup>131</sup> I-ANA (μl)	d. Đệm PBS (μl)
1	100	50	50	800
2	100	50	50	800
3	100	x	50	850
4	100	x	50	850
5	100	x	50	850
6	100	x	50	850

- Ống 1 và 2: Lần lượt cho a và b vào ống, ủ và lắc ở 60 rpm/ 37°C/120 phút. Tiếp theo, cho c vào ống, ủ và lắc 60 rpm/ 37 độ/60 phút. Tiếp theo, cho d vào ống, ly tâm 3400 rpm x 10 phút, tách riêng cận và dịch nổi.

- Ống 3 và 4: Cho a và c vào ống, ủ và lắc ở 60 rpm/ 37°C/120 phút. Tiếp theo, cho d vào ống, rút hết hỗn dịch sang ống mới, ly tâm 3400rpm x 10 phút, tách riêng cận và dịch nổi.

- Ống 5 và 6: Cho a, c và d vào ống, ủ và lắc ở 60 rpm/37°C/120 phút. Ly tâm 3400rpm x 10 phút, tách riêng cận và dịch nổi để đếm số phóng xạ.

- Ống đựng cận được rửa bằng PBS 37°C /3 lần, sau đó đếm số phóng xạ trong ống.

\* Phương pháp đếm số tia gama

Máy đếm tia gama (National Instrument, Hoa Kỳ) có thể đếm số tia gama phát ra (CPM, count per minute) từ mẫu cần đo với các khoảng thời gian khác nhau: 1,5, 10, 20 và 60 giây. Trong nghiên cứu này, mỗi ống nghiệm được đo 3 lần trong vòng 20 giây, và CPM được tính là trung bình của 3 lần đo trừ đi phòng nền. Phòng nền là số CPM có trong trụ đo ở trong điều kiện bình thường, không chứa bất cứ vật gì. Phòng này được đo trong vòng 20 giây sau khi hoàn thành thí nghiệm.

### KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

#### - CPM trong ống thủy tinh

Bảng 2: CPM trên ống thủy tinh và trong dịch nổi (20 giây)

Ống	A, CPM ống chứa cận	B, CPM ống cận sau rửa	C, CPM dịch nổi	A/C (%)	B/A (%)	B/C (%)
1	6639	1384	77813	8,53	20,85	1,78
2	5996	1796	71572	8,38	29,95	2,51
3	6633	1891	68782	9,64	28,51	2,75
4	7530	947	71386	10,55	12,58	1,33
5	5336	1611	85595	6,23	30,19	1,88
6	6318	1754	83538	7,56	27,76	2,1
Trung bình	6408,7	1563,8	76447,7	8,5	25	2,1
SD	733,5	349,9	6985,2	1,55	7	0,5

Nhận xét:

- Việc có sử dụng ANA lạnh (ống 1 và 2), không gây sự khác biệt kết quả CPM trong ống thủy tinh không sử dụng chất này (ống 3 và 4).

- Việc sử dụng thời gian ủ 120 min hay 180 min (2 giai đoạn) không ảnh hưởng tới kết quả đáng kể giữa các ống thủy tinh (ống 1,2 so sánh với 3,4).

- Thay đổi thể tích trong quá trình ủ không ảnh hưởng tới kết quả đáng kể giữa các ống thủy tinh (ống 3, 4 và 5, 6).

- Tỉ lệ CPM trong ống cận chiếm khoảng 6-10% số CPM trong dịch nổi (tỉ lệ A/C).

- Rửa ống chứa cận 3 lần bằng dung dịch PBS làm giảm CPM còn lại trong thành ống thủy tinh, trung bình còn 25% so với trước khi rửa ống (tỉ lệ B/A).

- Rửa ống chứa cận 3 lần bằng dung dịch PBS làm giảm CPM còn lại trong thành ống thủy tinh, chỉ đạt quanh khoảng 2% tổng số CPM trong dịch nổi (tỉ lệ B/C).

Như vậy, việc sử dụng ống thủy tinh trong thí nghiệm in vitro để đánh giá khả năng gắn của phức hợp <sup>131</sup>I-ANA sẽ giảm được sai số của phức hợp này gắn lên thành ống mà không phải gắn vào tế bào.

#### - CPM trong ống nhựa Eppendorf

Bảng 3: CPM trên ống nhựa Eppendorf và trong dịch nổi (20 giây)

Ống	A. CPM ống chứa cặn	B. CPM ống cặn sau rửa	C. CPM dịch nổi	A/C (%)	B/A (%)	B/C (%)
1	55919	51739	21573	259,21	92,52	239,83
2	57049	51739	19339	294,99	90,69	267,54
3	63905	61542	14339	445,67	96,30	429,19
4	66628	63231	14566	457,42	94,90	434,1
5	51216	49542	21125	242,44	96,73	234,52
6	50363	47231	21931	229,64	93,78	215,36
Trung bình	57513,3	54170,7	18812,2	321,6	94,1	303,4
SD	6595	6600,5	3493,3	103,1	2,3	100,7

Nhận xét:

- Tỷ lệ CPM trong ống cặn cao hơn dịch nổi từ 2-4 lần (tỷ lệ A/C) ở tất cả các ống nghiệm.

- Rửa ống chứa cặn 3 lần bằng dung dịch PBS làm giảm không đáng kể CPM còn lại trong thành ống nhựa (tỷ lệ B/A), với lượng còn lại đạt từ 90% CMP trước khi rửa ống.

- CMP trên ống nhựa sau rửa vẫn cao hơn CMP trong dịch nổi từ 2-4 lần (tỷ lệ B/C).

Như vậy, thành ống nhựa có gắn một lượng đáng kể phức hợp  $^{131}\text{I}$ -ANA, điều này sẽ làm sai lệch rất lớn tới kết quả thí nghiệm.

#### KẾT LUẬN

So sánh hai loại ống nghiệm được sử dụng có thể nhận thấy tỷ lệ phức hợp  $^{131}\text{I}$ -ANA bám trên thành ống nhựa là cao hơn nhiều lần so với thành ống thủy tinh

trước rửa cũng như sau khi rửa. Để tránh sai số trong quá trình đếm số đếm phóng xạ còn trong dịch cặn sau li tâm, nên sử dụng ống nghiệm thủy tinh.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Burvenich I, Schoonoghe S, Cornelissen B, Blanckaert P, Coene E, Cuvelier C, Mertens N, Slegers G (2005). In vitro and in vivo targeting properties of iodine-123- or iodine-131-labeled monoclonal antibody 14C5 in a non-small cell lung cancer and colon carcinoma model. *Clin Cancer Res.*;11(20):7288-96.

2. Dias CR, Jeger S, Osso JA Jr, Müller C, De Pasquale C, Hohn A, Waibel R, Schibli R (2011). Radiolabeling of rituximab with (188)Re and (99m)Tc using the tricarbonyl technology. *Nucl Med Biol.* 2011 Jan;38(1):19-28.

3. Smith-Jones PM, Vallabahajosula S, Goldsmith SJ, Navarro V, Hunter CJ, Bastidas D, Bander NH (2000). In vitro characterization of radiolabeled monoclonal antibodies specific for the extracellular domain of prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.*;60(18):5237-43.

4. Steffens MG, Oosterwijk E, Kranenborg MH, Manders JM, Debruyne FM, Corstens FH, Boerman OC (1999). In vivo and in vitro characterizations of three  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled monoclonal antibody G250 preparations. *J Nucl Med.*;40(5):829-36.

5. Tran L, Baars JW, de Boer JP, Hoefnagel CA, Beijnen JH, Huitema AD (2011). The pharmacokinetics of  $^{131}\text{I}$ -rituximab in a patient with CD20 positive non-Hodgkin Lymphoma: evaluation of the effect of radioiodination on the biological properties of rituximab. *Hum Antibodies.*;20(1-2):37-40.