

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

ĐÀM THỊ TÚ ANH

**NGHIÊN CỨU TẠO KHÁNG THỂ
ĐẶC HIỆU KHÁNG NGUYÊN UNG THƯ
TUYẾN TIỀN LIỆT ỨNG DỤNG TRONG
CHẨN ĐOÁN**

Chuyên ngành : Dị ứng và miễn dịch

Mã số : 62720109

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y HỌC

HÀ NỘI – 2016

CÔNG TRÌNH ĐƯỢC HOÀN THÀNH TẠI:

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. PGS TS PHẠM THIÊN NGỌC

2. PGS TS LÊ QUANG HUẤN

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Trường họp tại Trường Đại học Y Hà Nội.

Vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại

- Thư viện Đại học Y Hà Nội
- Thư viện Quốc gia
- Thư viện thông tin Y học Trung ương

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ung thư tuyến tiền liệt (UTTTL) được mô tả lần đầu tiên năm 1853. Các kết quả nghiên cứu đã chứng minh hiệu quả điều trị UTTTL rất phụ thuộc vào thời điểm phát hiện bệnh. Với những trường hợp ung thư (UT) còn ở giai đoạn khu trú trong tuyến tiền liệt (TTL), khoảng 70- 85% bệnh nhân sống đến 10 năm sau khi điều trị triệt để. Với các trường hợp khối u đã xâm lấn bao tuyến lan rộng, tỷ lệ sống sau 5 năm chỉ là 70% và 10 năm là 40%. Vì vậy yêu cầu chẩn đoán sớm ung thư nói chung hay UTTTL nói riêng là rất quan trọng.

Kháng nguyên sớm ung thư tuyến tiền liệt (EPCA-2) là một dấu ấn phân tử đã được công nhận là đặc hiệu cho UTTTL. Dấu ấn này có 3 vị trí kháng nguyên đã được biết rõ trình tự và có thể được phát hiện ở cả mô và các dịch sinh học của bệnh nhân UTTTL bằng kháng thể (KT) đặc hiệu. EPCA-2 còn được chứng minh là xuất hiện sớm 2 năm trước khi có các biểu hiện ở mô bệnh học, đồng thời sử dụng KT xác định EPCA-2 trong máu cho phép chẩn đoán UTTTL với độ nhạy là 92% độ đặc hiệu là 94%.

Sử dụng kháng thể đặc hiệu để phát hiện các dấu ấn ung thư tại mô và các dịch sinh học có giá trị sớm trong các phương pháp chẩn đoán. Đồng thời, nhiều nghiên cứu còn sử dụng kháng thể như một chất dẫn đường cho các thuốc chống ung thư đến đúng các tế bào ung thư cần tiêu diệt, hạn chế tác dụng không mong muốn trên tế bào lành. Ứng dụng kháng thể trong chẩn đoán và điều trị là những lĩnh vực đang ngày càng được phát triển hoàn thiện để có thể ứng dụng rộng rãi.

Đề tài nghiên cứu này được thực hiện với 2 mục tiêu:

- 1. Tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên tái tổ hợp EPCA-2.**
- 2. Đánh giá khả năng ứng dụng kháng thể đặc hiệu kháng EPCA-2 trong chẩn đoán ung thư tuyến tiền liệt.**

2. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Ung thư tuyến tiền liệt là vấn đề nan y ở hầu hết các quốc gia. Bệnh thường biểu hiện các triệu chứng khi đã ở giai đoạn muộn. Bệnh có thể chữa khỏi hoàn toàn nếu được chẩn đoán sớm. Điều này cho thấy

tầm quan trọng của chẩn đoán sớm ung thư tuyến tiền liệt. Tỷ lệ bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt ngày càng tăng ở Việt Nam đòi hỏi cần chẩn đoán nhanh, sớm, dễ thực hiện, độ chính xác đạt yêu cầu. Các dấu ấn đặc hiệu cho mỗi bệnh ung thư trong huyết thanh là điều lý tưởng để chẩn đoán ung thư sớm, dễ dàng và không xâm lấn. Bằng việc tạo cấu trúc kháng nguyên ung thư bằng phương pháp tái tổ hợp, luận án giải quyết việc chẩn đoán sớm ung thư tuyến tiền liệt bằng kháng thể đặc hiệu kháng nguyên tuyến tiền liệt theo cách chủ động tạo kháng thể từ cấu trúc kháng nguyên đã biết. Từ đó sử dụng kháng thể tạo ra ứng dụng trong chẩn đoán.

3. NHỮNG ĐÓNG GÓP CỦA LUẬN ÁN

- Đây là công trình đầu tiên ở Việt Nam kết hợp các kĩ thuật phân tử hiện đại liên hoàn để tạo sản phẩm miễn dịch là kháng thể đặc hiệu EPCA-2 và sử dụng kháng thể tạo ra để chẩn đoán ung thư tuyến tiền liệt.

- Đề tài đã thiết kế thành công vector biểu hiện *polEPCA-2* tái tổ hợp mang gen mã hóa epitop EPCA-2.22 và EPCA-2.19 của kháng nguyên ung thư tuyến tiền liệt sớm.

- PolEPCA-2 tái tổ hợp thu được có hoạt tính với kháng thể đặc hiệu trong kit ELISA phát hiện EPCA-2 của hãng CUSABIO.

- Tạo thành công kháng thể thô đặc hiệu kháng nguyên sớm ung thư tuyến tiền liệt (tổng lượng kháng huyết thanh thô thu được là 330 ml, nồng độ kháng thể tạo được là 229,17ng/ml).

- Giá trị xác định EPCA-2 bước đầu ở bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt của kháng thể thô do đề tài tạo ra tương đương kit thương phẩm của CUSABIO.

- Kháng thể được tạo thành có thể hoàn thiện tiếp để tạo kit xác định kháng nguyên EPCA-2.

4. BỐ CỤC LUẬN ÁN

Luận án gồm 135 trang, 6 phần: Đặt vấn đề 2 trang, chương 1: Tổng quan 47 trang, chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu 30 trang, chương 3: Kết quả nghiên cứu 30 trang, chương 4: Bàn luận 20 trang, kết luận 1 trang.

Luận án có 26 bảng, 37 hình, 2 sơ đồ, 99 tài liệu tham khảo trong đó tiếng Việt 18, tiếng Anh 81.

NỘI DUNG LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. ĐẠI CƯƠNG VỀ UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT

Ung thư tuyến tiền liệt (UTTTL) là nguyên nhân gây tử vong đứng hàng thứ hai trong các bệnh ung thư ở nam giới. Thực tế đã cho thấy UTTTL có thể điều trị khỏi hoàn toàn nếu được phát hiện sớm. Tuy nhiên, giống như mọi ung thư, các triệu chứng lâm sàng của bệnh thường chỉ xuất hiện khi ung thư đã ở giai đoạn muộn, đây chính là nguyên nhân gây thất bại trong điều trị và dẫn tới tử vong của UTTTL.

1.1.1. Tình hình ung thư tuyến tiền liệt trên thế giới

Theo công bố của Tổ chức Y tế thế giới, tính đến hết năm 2012 trên toàn thế giới có khoảng 1.111.689 người mắc UTTTL, 307.481 người đã tử vong vì bệnh. Bệnh có tỷ lệ mắc cao nhất ở các nước có nền kinh tế phát triển. Năm 2008, tính riêng Châu Âu có 338.000 đàn ông được chẩn đoán UTTTL. Theo thống kê của Hiệp hội ung thư Mỹ, năm 2015 ở Mỹ đã có khoảng 220.800 người mắc UTTTL mới và 158.040 người đã chết vì UTTTL [11]. Trong 5 năm (2001-2005) các thống kê cho thấy tỷ lệ mắc UTTTL ở những người da đen cao nhất 249 người trên 100.000 và thấp nhất ở những người Mỹ gốc Á là 94 người trên 100.000.

Tỷ lệ mắc UTTTL nhìn chung tăng nhanh theo tuổi hơn so với bất kỳ loại ung thư nào khác.

1.1.2. Tình hình ung thư tuyến tiền liệt tại Việt Nam

Việt Nam tuy nằm trong số các nước có tỷ lệ UTTTL không cao. Nhưng theo ước tính của Tổ chức y tế thế giới số lượng mắc UTTTL ở Việt Nam hết năm 2012 là khoảng 1275 người. Trong đó số tử vong khoảng 872 người. Một nghiên cứu trong nước của Nguyễn Văn Hưng trên 633 bệnh nhân đã được phẫu thuật TTL. Kết quả mô bệnh học cho thấy tỷ lệ UTTTL được phát hiện là 7,9 %. Trong đó chủ yếu gặp là dạng ung thư biểu mô tuyến biệt hóa cao (95,2%). Ở một nghiên cứu khác công bố năm 2010 của Vũ Lê Chuyên khi sàng lọc UTTTL cho 87 nam giới tại thành phố Hồ Chí Minh dựa trên kết quả sinh thiết TTL, mức PSA huyết thanh và kết quả siêu âm trực tràng thấy có 10/87 (2,5%) được chẩn đoán là UTTTL.

1.2. CÁC HIỂU BIẾT VỀ CHẨN ĐOÁN UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT

1.2.1. Các hiểu biết mới trong chẩn đoán UTTTL

Siêu âm cắt lớp: siêu âm cắt lớp (ULT) là phương pháp chẩn đoán hình ảnh hiện đại. Phương pháp này cho phép thăm dò về hình thái với nhiều lớp mô với độ bao phủ của hình ảnh tại các vị trí là 100% và tính chính xác về quang học là 95%. Phương pháp siêu âm cắt lớp hiện vẫn đang tiếp tục được nghiên cứu và thử nghiệm trước khi đưa vào ứng dụng rộng rãi trên lâm sàng.

❖ *PET/CT*

Chụp cắt lớp phát xạ positron (PET/CT) là một hình thức chẩn đoán bằng hình ảnh các chuyển hóa sinh học hoặc chức năng trong cơ thể ở mức độ tế bào. Trong UTTTL hình ảnh PET/CT có khả năng dự đoán thời gian sống thêm ở những bệnh nhân UTTTL bị suy giảm các chức năng sinh hóa sau điều trị nội tiết tố androgen.

❖ *Các dấu ấn sinh học trong ung thư tuyến tiền liệt*

Dấu ấn sinh học là các phân tử được sản xuất bởi các tế bào bình thường, tế bào bất thường và do phản ứng của cơ thể với ung thư. Các phân tử này lưu hành trong huyết thanh, huyết tương, trong các dịch sinh học của cơ thể, nước tiểu và tại mô TTL ung thư. Vì vậy, các phân tử này có thể được xác định bằng các xét nghiệm. Nhiều các dấu ấn trong huyết thanh đã được ứng dụng và có giá trị lâm sàng tốt trong chẩn đoán và chẩn đoán giai đoạn của UTTTL như: Kháng nguyên sớm ung thư tuyến tiền liệt (EPCA). Kháng nguyên tế bào gốc tiền thân của tuyến tiền liệt (PSCA). Hexokinase 2 (hK2). Osteoprotegerin (OPG). Human Glandular Kalikrein 2 (huK2). Transforming Growth Factor - β and Interleukin-6 (TGF- β). Yếu tố tăng trưởng nội mô mạch máu (VEGF).

Kháng nguyên ung thư tuyến tiền liệt sớm (EPCA).

EPCA được phát hiện từ các nghiên cứu proteomic về các protein trong chất nền nhân tế bào ung thư. Tháng 4 năm 2007, lần đầu tiên Leman, Getzenberg và cộng sự đã xác định chính xác một protein xuất hiện trong nhân của tế bào UTTTL với lượng nhỏ mà không có trong nhân của tế bào TTL bình thường, đó là EPCA-2. EPCA-2 không có liên quan với EPCA. Tên của các loại kháng nguyên này là do lịch sử

phát hiện ra chúng. EPCA là protein kháng nguyên UTTTL sớm phát hiện đầu tiên còn EPCA-2 là protein kháng nguyên UTTTL sớm phát hiện thứ hai. EPCA-2 là protein chỉ tăng mạnh ở tế bào ác tính TTL vì vậy nó rất đặc trưng cho UTTTL nên đã được đề xuất là một dấu ấn sinh học mới trong tổn thương ác tính của TTL.

Năm 2008 Getzenberg và cộng sự đã công bố 3 trình tự peptid được cho là 3 epitope của EPCA-2 đó là đoạn EPCA-2.22, EPCA-2.19 và EPCA-2.4.

Năm 2009, Getzenberg được cấp bằng sáng chế cho những nghiên cứu về giá trị chẩn đoán UTTTL của EPCA-2. EPCA-2 tăng ở tế bào TTL bị ung thư và tổ chức xung quanh nhưng không xuất hiện ở các mô TTL bình thường cũng như ở mô bệnh nhân u phì đại lành tính TTL. Một nghiên cứu trên các bệnh nhân có kết quả sinh thiết ban đầu đều âm tính, đã có tới 75% các trường hợp có EPCA-2 dương tính và tiến triển thành ung thư 5 năm sau đó. Đáng chú ý, EPCA-2 còn được phát hiện trong tuyến tiền liệt của những người này ít nhất hai năm trước khi có các biểu hiện hình thái học của ung thư. Như vậy sự hiện diện của EPCA-2 là đặc hiệu với UTTTL ở giai đoạn rất sớm.

Bằng phản ứng kết hợp kháng nguyên (KN)-KT, người ta có thể sử dụng KT đặc hiệu với EPCA để xác định sự có mặt của EPCA-2 ở trong máu, mô, huyết thanh hay các dịch sinh học của bệnh nhân UTTTL. KT này còn có thể giúp cho việc dự đoán mức độ và nguy cơ hình thành ung thư và nguy cơ di căn của UTTTL. Một nghiên cứu của Getzenberg khi đo nồng độ EPCA-2 ở 330 đàn ông. Kết quả xác định chính xác tới 90% cho những người đàn ông bị UTTTL còn khu trú và 98% những người có khối u đã lan ra ngoài tuyến. Các thử nghiệm này âm tính ở 97% những người đàn ông không UTTTL. Một nghiên cứu khác sử dụng phương pháp ELISA xác định nồng độ EPCA trong huyết thanh 449 bệnh nhân đã được phẫu thuật cắt bỏ TTL do phì đại so sánh với 112 nam giới khỏe mạnh. Với ngưỡng cutoff 10ng/ml, kết quả cho thấy 100% những người đàn ông khỏe mạnh không thấy EPCA-2 trong huyết thanh còn ở những nam giới UTTTL phương pháp ELISA đã xác định đúng với độ đặc hiệu 98% và độ nhạy 100%. Nghiên cứu này kết

luận: có thể sử dụng EPCA-2 như một dấu ấn sinh học huyết thanh có độ nhạy cao để chẩn đoán sớm UTTTL.

1.2.2. Các nghiên cứu tại Việt nam

Nguyễn Văn Hưng năm 2005 cho thấy tỷ lệ UTTTL phát hiện bằng sinh thiết là 7,9 %. Trong đó chủ yếu gặp là dạng ung thư biểu mô tuyến biệt hóa cao (95,2%).

Đỗ Khánh Hỷ và Hoàng Thị Phương Liên kết luận giá trị PSA trên lâm sàng không cho phép chẩn đoán xác định UTTTL đặc biệt với PSA có giá trị trong vùng xám (4 - 10ng/ml).

Nguyễn Thị Phương Ngọc năm 2009: Có tăng nồng độ PSA trong máu ở cả nhóm bệnh nhân ung thư và bệnh nhân u phì đại lành tính TTL.

Về EPCA, duy nhất có một nghiên cứu của Lê Quang Huân đã tách dòng và xác định thành công trình tự nucleotide gen mã hóa KN EPCA từ mẫu bệnh phẩm bệnh nhân UTTTL.

Học viện quân Y đã cấy ghép thành công khối UTTTL của người trên chuột thiếu hụt miễn dịch (chuột Nude) và đánh giá độ tập trung của ANA - ¹³¹I vào khối ung thư. Nhóm nghiên cứu còn thử nghiệm tác dụng phân giải tế bào UTTTL trên chuột Nude bằng phức bộ 2 vi rút dạng vắc xin sợi và quai bị. Kết quả cho thấy hai vi rút sợi và quai bị có tác dụng hạn chế kích thước khối UTTTL.

1.3. KHÁNG THỂ VÀ CHẨN ĐOÁN UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT

1.3.1. Kháng thể.

Định nghĩa: Kháng thể có bản chất là protein do tế bào lympho tiết ra để loại bỏ các yếu tố lạ với cơ thể.

1.3.2. Cấu tạo của kháng thể

Một KN xâm nhập cơ thể, hệ thống miễn dịch sẽ nhận biết, và được hoạt hoá để loại trừ KN này. Đáp ứng miễn dịch tế bào và đáp ứng miễn dịch dịch thể là hai phương thức đặc hiệu bảo vệ cơ thể. Đối với đáp ứng miễn dịch dịch thể, các kháng thể (KT) là các globulin miễn dịch (Ig) ở dạng hòa tan, đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào được thực hiện bởi tế bào lympho T. Mỗi phân tử KT có cấu trúc gồm một

hay nhiều đơn vị cơ bản, mỗi đơn vị có 4 chuỗi polypeptid giống nhau từng đôi một: 2 chuỗi nhẹ và 2 chuỗi nặng. Cả chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đều gồm 2 phần: Phần hằng định, có trật tự acid amin tương đối ổn định. Phần thay đổi với trật tự acid amin có một số đoạn cực kỳ thay đổi, chính những vùng cực kỳ thay đổi, tham gia trực tiếp vào việc hình thành vị trí kết hợp KN (paratop).

1.3.3. Kháng thể đơn dòng

Kháng thể đơn dòng là một tập hợp các KT có đầy đủ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có cùng một loại paratope vì vậy chỉ kết hợp đặc hiệu với một loại epitope.

Kháng thể đơn chuỗi là một tập hợp các KT không đầy đủ thường chỉ có vùng thay đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ mang cùng một loại paratope vì vậy chỉ kết hợp đặc hiệu với một loại epitope (ví dụ: KT đơn chuỗi ScFV).

Để tạo ra kháng thể đơn dòng hay kháng thể đơn chuỗi người ta có thể sử dụng một trong các phương pháp: (1) Phương pháp gây miễn dịch trên động vật. (2) Phương pháp tạo tế bào lai. (3) Phương pháp DNA tái tổ hợp. (4) Phương pháp sàng lọc từ các thư viện KT (thư viện các thể thực khuẩn thể Phage display, thư viện kháng thể Aptamer).

1.4. CÁC KỸ THUẬT SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

1.4.1. Kỹ thuật tái tổ hợp DNA

Công nghệ protein là một hướng nghiên cứu quan trọng của công nghệ sinh học với tiềm năng ứng dụng rất lớn trên cơ sở công nghệ DNA tái tổ hợp. Nhờ công nghệ protein có thể tạo ra protein nguyên thể, protein đã được sửa đổi hoặc protein mới thông qua sự sản xuất của vi khuẩn *E.coli* ... Các bước chính của công nghệ protein:

1. Nhận dạng trình tự, 2. Xác định cấu trúc và mô hình hóa, 3. Biến đổi trình tự. 4. Phát triển phân tử. 5. Thiết kế trình tự de novo. 6. Biểu hiện. 7. Phân tích. 8. Quá trình tách chiết và tinh sạch protein

1.4.2. Kỹ thuật tạo kháng thể bằng gây miễn dịch trên động vật

Điều chế kháng huyết thanh bằng gây miễn dịch trên động vật là một trong những phương pháp tạo kháng thể đã được sử dụng từ lâu và ngày càng được hoàn thiện bên cạnh sự ra đời của nhiều kỹ thuật tạo kháng

thể hiện đại. Kết quả tạo kháng huyết thanh bằng gây miễn dịch phụ thuộc một số yếu tố: *Chất lượng kháng nguyên*: tính KN của một chất phụ thuộc vào cấu trúc, trọng lượng, phân tử, tính lạ và khả năng chuyển hóa của chất đó trong cơ thể. *Đường tiêm của kháng nguyên*. *Liều lượng của kháng nguyên, thời gian giữa các lần tiêm*: Tùy thuộc KN và yêu cầu điều chế kháng huyết thanh mà lựa chọn tiến hành gây miễn dịch với các dung dịch và thời gian tiêm khác nhau. Dung dịch gây miễn dịch có 3 loại: (1) dung dịch kháng nguyên đơn thuần, (2) kháng nguyên cùng tá chất Freund, (3) Dung dịch phối hợp của cả (1) và (2).

Phương pháp thường sử dụng hiện nay là gây miễn dịch bằng dung dịch hỗn hợp KN với tá chất vì kết quả cho hiệu giá KT cao hơn so với phương pháp dùng KN đơn thuần.

1.4.3 Kỹ thuật ELISA

ELISA là kỹ thuật chẩn đoán dựa trên nguyên lý miễn dịch học rất phổ biến trong rất nhiều lĩnh vực. ELISA là kỹ thuật hấp phụ miễn dịch gắn enzym dựa vào tính hấp phụ tự nhiên của protein trên một số chất như polystyren. Các kỹ thuật ELISA hiện có bao gồm: ELISA trực tiếp, ELISA gián tiếp, ELISA cạnh tranh và ELISA sandwich.

Kỹ thuật ELISA sandwich

Nguyên lý: KT không đánh dấu (biết trước) được gắn lên chất mang (polystyren), KN cần tìm được ủ với chất mang có KT. Rửa bỏ KN thừa và cho tiếp KT có gắn enzym. Như vậy, KN cần tìm sẽ bị kẹp giữa hai KT. Sau khi rửa lần 2 để loại bỏ KT gắn enzyme thừa, dung dịch cơ chất được thêm vào để sinh màu đặc trưng. Mức độ lên màu của phản ứng được đo mật độ quang bằng quang phổ kế ở bước sóng thích hợp. Kỹ thuật ELISA sandwich có khá nhiều ưu điểm vượt trội: thứ nhất là giảm được nhuộm màu nền và các phản ứng không đặc hiệu. Thứ hai phản ứng được thực hiện dễ dàng, KT một có thể được gắn sẵn trên bề mặt rắn tạo thành các bộ KIT và có thể thực hiện các chẩn đoán mà trong đó KN không thể gắn được lên mặt rắn.

CHƯƠNG 2 ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1 Đối tượng nghiên cứu của mục tiêu tạo kháng thể đặc hiệu kháng nguyên UT TTL.

- Gen mã hóa KN ung thư tuyến tiền liệt sớm theo thiết kế của nhóm nghiên cứu gắn trong vector tách dòng pBSK-GS53545 được đặt hàng tổng hợp từ hãng Cosmo Genetech.

- Protein tái tổ hợp mang 8 lần lặp lại của hai epitope EPCA-2.22 và 2.19 đã được xác định có hoạt tính với KT đặc hiệu trong bộ Kit ELISA của CUSABIO.

- Mười tám thỏ xám giống Việt nam, khỏe mạnh, trọng lượng trung bình 2,5kg/con không phân biệt đực cái được nuôi trong điều kiện thí nghiệm tại labo Bộ môn Sinh lý bệnh - Miễn dịch, trường Đại học Y Hà Nội.

2.1.2. Đối tượng nghiên cứu cho mục tiêu tạo bộ sinh phẩm bằng kháng thể và bước đầu ứng dụng trong chẩn đoán UT TTL.

- Bốn mươi bệnh nhân đã được chẩn đoán là ung thư tuyến tiền liệt bằng phương pháp hóa mô bệnh học (nhuộm Hematoxylin Eosin (HE) các mô bệnh phẩm sau phẫu thuật). Bệnh nhân không bị các bệnh ung thư khác và chưa điều trị bằng các thuốc chống ung thư.

- Bốn mươi bệnh nhân u phì đại lành tính TTL đã được chẩn đoán xác định bằng phương pháp hóa mô bệnh học (nhuộm HE các mô bệnh phẩm sau phẫu thuật).

- Ba mươi người nam khỏe mạnh không có bệnh lí của TTL, không bị các bệnh ung thư khác, tuổi từ 50 đến 89 (cùng lứa tuổi với 2 nhóm bệnh nhân nói trên).

2.1.3. Sinh phẩm

- Kháng thể thô đặc hiệu kháng hai epitope EPCA-2.22 và 2.19 đã được xác định có hoạt tính

- Các enzyme: cắt giới hạn *Nco* I, *Not* I (Biolabs). *Taq* DNA polymerase, *T4* DNA ligase (Biolabs). Thang DNA: 1kb (Fermentas). Thang protein: SM0431 (Fermentas). *E. coli* chủng DH5 α , BL21 (DE3). Vector pET-28a(+) (Novagen). Tá dược Freund' Adjuvant, Bộ Kit ELISA xác định EPCA-2 của hãng CUSABIO, CSB - EQ 027679HU.

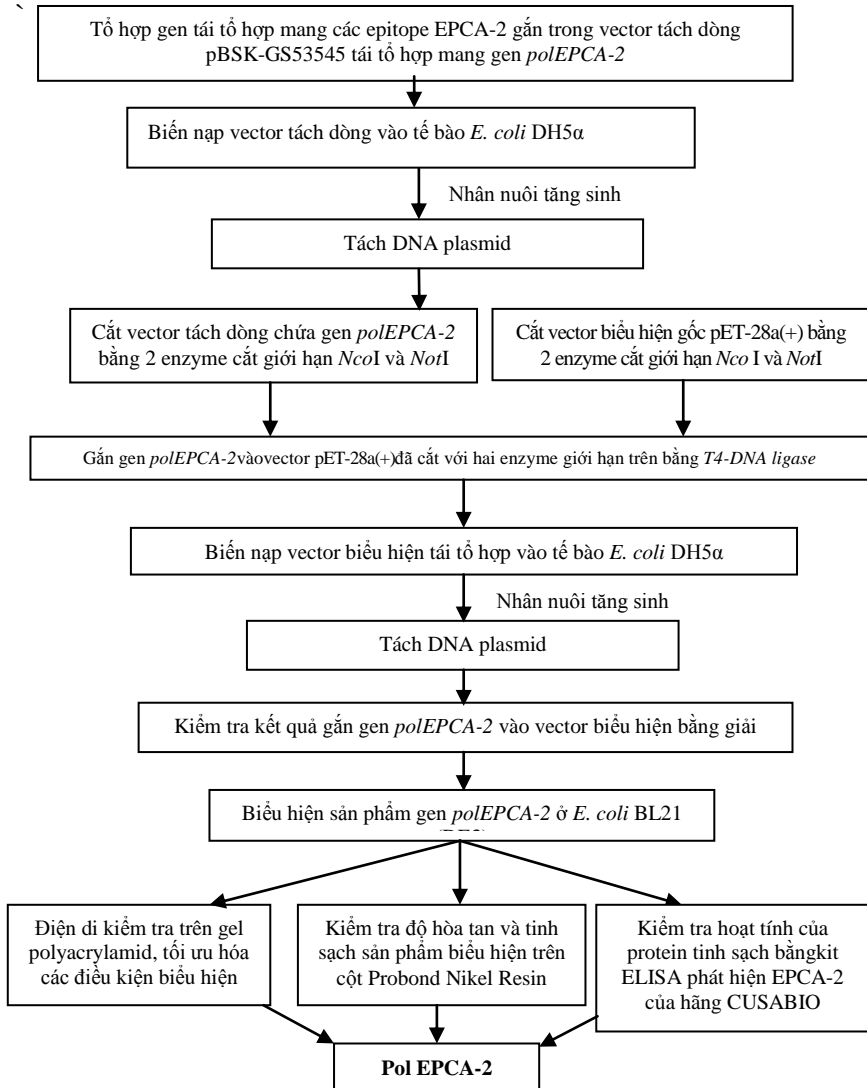
2.2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu thử nghiệm tạo sinh phẩm cho kỹ thuật: ELISA xác định EPCA-2 trong chẩn đoán UTITL.

2.3. CÁC KỸ THUẬT SỬ DỤNG TRONG NGHIÊN CỨU

2.3.1. Tạo kháng nguyên tái tổ hợp mang các epitope EPCA-2

Quy trình tái tổ hợp polEPCA -2 được thực hiện theo sơ đồ:



2.3.2. Các kĩ thuật gây miễn dịch cho thỏ tạo kháng thể đặc hiệu kháng EPCA-2.22,2.19

- Các thỏ trong nghiên cứu được chia thành 2 nhóm, mỗi nhóm gồm 3 thỏ.

- Thời gian tiêm lặp lại: Các thỏ thí nghiệm được gây miễn dịch theo phác đồ 4 mũi tiêm. Mỗi mũi cách nhau 7 ngày.

- Cách chia nhóm và dung dịch tiêm được trình bày ở bảng sau:

Mũi tiêm	Dung dịch tiêm gây miễn dịch		Đường tiêm
	Nhóm thí nghiệm	Nhóm chứng	
Mũi 1	2ml polEPCA-2 + 2ml Freund' Adjuvant hoàn toàn	2ml NaCl 9‰ + 2ml Freund' Adjuvant hoàn toàn	Tiêm cơ đùi
Mũi 2	2ml polEPCA-2 + 2ml Freund' Adjuvant không hoàn toàn	2ml NaCl 9‰ + 2ml Freund' Adjuvant không hoàn toàn	Tiêm cơ đùi
Mũi 3	2ml polEPCA-2 + 2ml Freund' Adjuvant không hoàn toàn	2ml NaCl 9‰ + 2ml Freund' Adjuvant không hoàn toàn	Tiêm cơ đùi
Lấy máu tĩnh mạch rìa tai thỏ, định lượng kháng thể trong huyết thanh			
Mũi 4	4ml polEPCA -2	4ml NaCl 9‰	Tiêm ổ bụng

- Kháng huyết thanh thu của thỏ được thực hiện kĩ thuật phân lập albumin bằng phương pháp tủa của Rodkey với mục đích là loại bỏ albumin trong kháng huyết thanh thỏ. Kĩ thuật sử dụng nguyên tắc tủa protein bằng muối trichloroacetate acid 2% (TCA 2%) và ethanol 84,5%.

2.3.3 Kĩ thuật ELISA xác định nồng độ và tính đặc hiệu của kháng thể thỏ thu được với polEPCA-2.

Kĩ thuật được thực hiện theo nguyên lí ELISA gián tiếp.

Qui trình kĩ thuật được thực hiện như sau:

1. Ủ 100 µl dung dịch polEPCA-2.22, 2.19 nồng độ 0.87µg/ml.
2. Ủ 4⁰C qua đêm.
3. Rửa 3 lần với PBS 1X + Tween 20 và 3 lần với PBS 1X.
4. Phủ 200 µl PBS+2% skim milk.
5. Ủ nhiệt độ phòng 1 - 2 giờ.
6. Rửa 3 lần với PBS 1X + Tween 20 và 3 lần với PBS 1X.
7. Phủ 100 µl

kháng thể thô. 8. Ủ 37⁰C trong 2 giờ. 9. Rửa 3 lần với PBS 1X + Tween 20. Rửa 3 lần với PBS 1X. 10. Phủ 100 µl kháng thể kháng thô gắn enzyme. 11. Ủ ở 37⁰ C trong 1- 2 giờ. Rửa 3 lần PBS 1X, Tween 20. 12. 100 µl TMB, ủ nhiệt độ phòng 10 -15 phút. 15. 50µl H₂SO₄ 1N. Đọc kết quả ở bước sóng 450nm

2.3.4. Kỹ thuật ELISA xác định EPCA-2.

2.3.4.1. Định lượng EPCA-2 bằng kỹ thuật ELISA sử dụng kháng thể thô đặc hiệu kháng EPCA-2.22,2.19 tái tổ hợp.

Kỹ thuật ELISA sử dụng KT thô đặc hiệu xác định EPCA-2 trong 3 nhóm nghiên cứu được thực hiện theo nguyên lí ELISA sandwich:

1. Nhỏ 100µl huyết thanh thô cho mỗi giếng. 2. Ủ 4⁰C từ 8 - 16 giờ.
3. Rửa 3 lần với PBS 1X-Tween 20, 3 lần với PBS 1X. 4. Nhỏ 200µl skim milk ủ 2 giờ. 5. Rửa 3 lần với PBS 1X-Tween 20, 3 lần với PBS 1X.
6. Nhỏ 100µl: huyết thanh/mẫu thử. 7. Ủ ở 37⁰C trong 2 giờ. 8. Hút hết dịch, rửa 3 lần với PBS 1X-Tween 20, và PBS 1X. 9. Nhỏ 100µl kháng thể gắn enzym. 10. Ủ 37⁰C trong 2 giờ. 11. Rửa 3 lần với BS 1X-Tween 20, 3 lần với PBS 1X. 12. Nhỏ 100µl TMB. 13. Ủ nhiệt độ phòng 15 phút. 14. Nhỏ 50µl H₂SO₄ 1N. 15. Đo OD ở bước sóng 450nm trên dàn máy ELISA Bio-Rad iMarkTM (Có phần mềm lưu trữ và xử lý số liệu). Nồng độ EPCA-2 được định lượng dựa trên đường chuẩn của bộ Kít ELISA của CUSABIO, CSB - EQ 027679HU.

2.3.4.2 Định lượng EPCA-2 bằng kit ELISA của CUSABIO, CSB - EQ 027679HU.

Kỹ thuật ELISA xác định EPCA-2 sử dụng kit thương phẩm được thực hiện theo nguyên lí ELISA sandwich.

Qui trình kỹ thuật được tiến hành theo chỉ dẫn của hãng:

2.4. ĐỊA ĐIỂM TIẾN HÀNH NGHIÊN CỨU

- Phòng thí nghiệm trọng điểm về công nghệ gen, Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam

- Bộ môn Sinh lí bệnh-Miễn dịch, Trường Đại học Y Hà Nội.

- Các mẫu nghiên cứu được thu thập tại Bệnh viện Hữu Nghị Hà Nội.

CHƯƠNG 3 KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. TẠO PROTEIN TÁI TỔ HỢP MANG CÁC EPITOPE EPCA-2

3.1.1. Tạo vector tái tổ hợp mang gen *polEPCA-2*

Vector pET-28a(+) nguồn gốc từ hãng Novagen (Mỹ) đã được lựa chọn làm vector mang gen mã hóa *polEPCA-2.22,2.19* và có thể biểu hiện trong tế bào *E.coli* và cho sản phẩm protein mong muốn dưới dạng tiết. Trong vùng cắt gọt đa vị của vector này và của gen *polEPCA-2.22,2.19* đều có vị trí nhận biết của 2 enzyme *Nco* I và *Not* I. Gen *polEPCA-2* với trình tự chứa 2 epitop của gen mã hóa kháng nguyên ung thư tuyến tiền liệt sớm (EPCA-2) được lặp lại 8 lần nối đuôi nhau do nhóm nghiên cứu thiết kế.

3.1.2. Xác định trình tự gen trong vector biểu hiện tái tổ hợp

Chúng tôi sử dụng plasmid tái tổ hợp làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi của vector pET-28a(+) là T7F và T7R, sau đó tinh sạch sản phẩm PCR. Mẫu thu được đem xác định trình tự bằng máy giải trình tự tự động. Kết quả dịch mã gen thu được suy diễn trình tự protein cho thấy sản phẩm protein nguyên vẹn sẽ gồm 210 acid amin tương ứng với khối lượng phân tử khoảng 23,1 kDa. Đến đây chúng tôi có thể khẳng định đã gắn được gen *polEPCA-2* vào vector pET-28a(+) đúng chiều và đúng khung đọc.

3.1.3. Biểu hiện vector tái tổ hợp trong vi khuẩn *E.coli* chủng BL21 (DE3) để tạo protein *polEPCA-2*

Biến nạp vector biểu hiện tái tổ hợp pET-28a(+)/*polEPCA-2* vào vi khuẩn *E.coli* BL21 (DE3)

Sau khi đã xác định được đúng trình tự gen *polEPCA-2* trong vector biểu hiện pET-28a(+), chúng tôi biến nạp plasmid của cả 4 dòng vào chủng biểu hiện *E.coli* BL21 (DE3). Kết quả điện di trên gel polyacrylamid cho thấy sản phẩm tốt đúng với kích thước protein dự kiến 23,1kDa. Khảo sát điều kiện thích hợp cho quá trình biểu hiện protein trong nghiên cứu của chúng tôi là thời gian biểu hiện qua đêm và ở 37°C.

Tinh sạch protein tái tổ hợp bằng Kit ProBondTM Nikel Resin

Do chúng tôi đã thiết kế protein tái tổ hợp có đuôi 6-Histidin có ái lực với Ni²⁺, vì vậy chúng tôi sử dụng cột tinh sạch theo phương pháp sắc ký ái lực, với chất giá đỡ nhồi cột là agarose-Ni²⁺. Các *polEPCA-2* có His- Tag

sẽ có ái lực với Ni^{2+} và được bám chặt vào chất giá trên cột. Sau đó protein có ái lực ra khỏi cột nhờ buffer đẩy (NEB). Sau khi tinh sạch protein tái tổ hợp, sản phẩm được kiểm tra bằng điện di trên gel polyacrylamid 12,6%. Kết quả cho thấy băng protein tái tổ hợp rất đậm ở vị trí tương đương kích thước 23,1 kDa.

Như vậy, protein polEPCA-2 đã được tinh sạch thành công bằng cột sắc ký ái lực His- Tag, sản phẩm này có thể sử dụng để làm các thí nghiệm tiếp theo.

3.1.5. Xây dựng đường chuẩn định lượng kháng nguyên hoặc kháng thể

Chúng tôi tiến hành dựng đường chuẩn theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Kit xác định EPCA-2, CSB-EQ 027679HU). Biểu đồ đường chuẩn dựng được có $r^2 = 0,986$.

3.1.6. Kiểm tra hoạt tính của sản phẩm polEPCA sau tinh sạch bằng kit ELISA

Protein tái tổ hợp polEPCA-2 được tiến hành thử hoạt tính đồng thời sơ bộ kiểm tra nồng độ protein EPCA-2 sau tinh sạch bằng phản ứng ELISA với kháng thể đặc hiệu trong kit chẩn đoán của CUSABIO. Kết quả: polEPCA-2 có hoạt tính, kết hợp đặc hiệu với kháng thể kháng EPCA-2 trong kit ELISA. Khi so sánh với đường chuẩn, nồng độ kháng nguyên thu được tương đương 41,185 ng/mL.

3.2. KẾT QUẢ GÂY MIỄN DỊCH Ở THỎ BẰNG KHÁNG NGUYÊN TÁI TỔ HỢP PoEPCA-2.

Quy trình gây miễn dịch được tiến hành lặp lại 3 lần độc lập với 3 lô thí nghiệm khác nhau. Kết quả trình bày trong báo cáo này là lô thỏ có nồng độ kháng thể tốt nhất.

Nồng độ kháng thể kháng polEPCA-2 ở huyết thanh thỏ.

Chúng tôi tiến hành lấy máu tĩnh mạch tai thỏ để thử nồng độ KT ở các thời điểm 7 ngày sau mũi tiêm 3 và các ngày thứ 15 và 20 sau mũi tiêm 4. **Nhận xét:** Sau tiêm mũi 3 ngày thứ 7 thỏ có KT đặc hiệu trong huyết thanh với nồng độ cao gấp 3,5 lần ở thỏ chứng (28.3 ng/ml). Ở ngày thứ 15 sau mũi tiêm 4, nồng độ KT thu được cao gấp 3,5 lần sau mũi tiêm 3 (95.65ng/ml). Nồng độ KT thời điểm 20 ngày sau mũi tiêm 4 đạt cao nhất gấp 8,4 lần nồng độ KT sau mũi 3 (229.17ng/ml).

3.3. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH EPCA-2 TRONG HUYẾT THANH 3 NHÓM NGHIÊN CỨU

3.3.1. Thông tin chung của nhóm bệnh nhân tuyến tiền liệt

3.3.1.1 Thông tin về tuổi của nhóm bệnh nhân tuyến tiền liệt

Bệnh nhân UTTTL và u phì đại TTL đều có độ tuổi mắc bệnh cao nhất là từ 76 đến 85, độ tuổi mắc bệnh thấp nhất là dưới 60.

3.3.1.2 Nồng độ tPSA trong huyết thanh của ba nhóm nghiên cứu

Với các mức nồng độ tPSA được xét đến: <4ng/ml, 4-10, >10-20, >20-30 và >30ng/ml. Kết quả cho thấy cả hai nhóm bệnh nhân TTL có nồng độ tPSA phân bố ở tất cả các mức từ cao đến thấp. Nồng độ tPSA > 30 ng/ml chiếm tỷ lệ cao ở nhóm UTTTL (30%). Nồng độ tPSA < 4 ng/ml chiếm tỷ lệ 100% ở nhóm nam bình thường.

3.3.2. Nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh 2 nhóm bệnh nhân TTL định lượng bằng kháng thể thử kháng EPCA-2 và kit CUSABIO

3.3.2.1. Nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt

Nhận xét: Bệnh nhân UTTTL có nồng độ EPCA-2 từ 100 đến < 400ng/ml chiếm tỷ lệ cao nhất là 28/40 với kết quả xác định bằng kit ELISA, và 30/40 với xác định bằng KT thử đặc hiệu.

3.3.2.2. Nồng độ EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân u phì đại lành tính tuyến tiền liệt.

Nhận xét: Kết quả xác định bằng kit thương phẩm cũng tương tự như kết quả xác định bằng KT thử cho thấy: có 38/40 mẫu thử âm tính. Có 2/40 mẫu thử có EPCA-2 với nồng độ thấp.

3.3.3. Nồng độ EPCA- 2 trong huyết thanh nam giới khỏe mạnh.

Ở huyết thanh nhóm người nam khỏe mạnh, kết quả xác định KT bằng kit thương phẩm cũng tương tự như kết quả xác định bằng KT thử cho thấy EPCA-2 âm tính trong 100 % mẫu thử.

3.3.4. So sánh độ nhạy, độ đặc hiệu của kháng thể thử đặc hiệu kháng EPCA-2 với kháng thể trong kit xác định EPCA-2 của CUSABIO

Cả 2 phương pháp ELISA xác định EPCA-2 dùng KT thử và dùng kit CUSABIO đều cho kết quả tương đương nhau:

- Nhóm UTTTL kết quả là 40/40, EPCA-2(+), độ nhạy đạt 100%.
- Nhóm U phì đại TTL kết quả là 38/40, EPCA-2(-), độ đặc hiệu đạt 95%.

CHƯƠNG 4 BÀN LUẬN

4.1. VỀ THIẾT KẾ GEN MÃ HÓA POLYEPILOPE CỦA KHÁNG NGUYÊN UNG THƯ TUYẾN TIỀN LIỆT SỚM

4.1.1. Lựa chọn biểu hiện các epitope của kháng nguyên thay vì biểu hiện toàn bộ phân tử kháng nguyên

Sự liên kết giữa kháng nguyên với kháng thể hòa tan luôn mang tính đặc hiệu cao. Sự liên kết đặc hiệu này xảy ra với chỉ với một phần nhất định của KN. Các vùng cấu trúc có sự liên kết đặc hiệu này gọi là epitope. Phần tương ứng trên mỗi kháng thể gọi là paratope.

Dựa trên trình tự hai epitope EPCA-2.22, 2.19 của nhóm tiền sử Robert H Getzenberg, cùng nhiều nghiên cứu trong nước và nước ngoài về tính sinh miễn dịch của KN tái tổ hợp vẫn đảm bảo khi KN chỉ mang các epitope mà không cần cấu trúc toàn bộ. Nhóm nghiên cứu chúng tôi đã thiết kế gen mã hóa KNUTTTTL sớm mang 8 lần lặp lại của hai trình tự epitope EPCA-2.22 và EPCA-2.19 thay vì biểu hiện toàn bộ phân tử KN. Bên cạnh đó do chưa biết rõ toàn bộ cấu trúc và trình tự acid amin của EPCA-2, nên bằng việc không biểu hiện toàn bộ phân tử KN chúng tôi sẽ tránh được một số bất lợi có thể xảy ra do chức năng ở những phần chưa biết.

4.1.2. Thiết kế lặp nhiều lần trình tự các epitope

Chúng tôi chủ định thiết kế trình tự gen mã hóa *polEPCA-2* được tạo thành từ 8 lần lặp lại liên tiếp nối đuôi nhau của cặp trình tự epitope EPCA-2.22 và EPCA-2.19. Giữa các đoạn lặp là đoạn nối gồm 3 acid amin prolin (PPP). Việc thiết kế lặp 8 lần epitope trong gen *polEPCA-2* của chúng tôi nhằm tới hai mục đích:

Thứ nhất, các epitope được lặp lại nhiều lần sẽ làm tăng khả năng bắt cặp của KN với KT. Một phân tử protein tái tổ hợp có nhiều epitope sẽ có khả năng cao trình diện được các vị trí epitope để kết hợp với các paratope tương ứng trên KT.

Thứ hai, nhờ việc lặp lại nhiều lần epitope làm phân tử protein tái tổ hợp đạt được kích thước đủ lớn để có thể quan sát và phát hiện bằng điện di trên gel polyacrylamid thông thường. Trong nghiên cứu này, protein *polEPCA-2.22*, và *2.19* với 8 lần lặp lại đã đạt được kích thước 23,1 kDa (thay vì 4,49 kDa nếu chúng tôi chỉ biểu hiện một lần cặp epitope này).

Với kích thước 23,1 kDa sản phẩm tạo ra dễ dàng kiểm tra được khi điện di trên gel polyacrylamid 12,6% và marker protein Unstained (Fermentas).

Trong thiết kế gen *polEPCA-2*, chúng tôi thiết kế đoạn nối giữa các cặp EPCA-2.22,2.19 là 3 prolin liên tiếp tức là cấu trúc xoắn polyprolin giữa các đoạn lặp để protein *polEPCA-2* có cấu trúc gấp khúc mà không bị cuộn xoắn che lấp các epitope trong phân tử protein tái tổ hợp. Do đó, các epitopetrong protein tái tổ hợp do chúng tôi tạo ra sẽ dễ dàng tương tác với các paratope tương ứng trên kháng thể.

4.1.3. Thiết kế gen *polEPCA-2* có trình tự nhận biết của các enzyme cắt giới hạn

Để phục vụ cho việc tách dòng và biểu hiện được gen *polEPCA-2*, ở hai đầu của gen trước trình tự của các epitope, chúng tôi thiết kế trình tự ACCATGGGG là vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn *Nco* I. Tương tự như vậy, phía cuối của gen *polEPCA-2*, sau trình tự của các epitope, chúng tôi cũng thiết kế trình tự GCGGCCGCA là vị trí nhận biết của enzyme cắt giới hạn *Not* I. Hai enzyme cắt giới hạn mà chúng tôi lựa chọn cũng là các enzyme cắt duy nhất ở vị trí MCS (multiple cloning site) của vector pET-28a(+). Điều này đảm bảo sản phẩm sau khi cắt gắn, được biểu hiện chắc chắn là *polEPCA-2* như thiết kế.

4.1.4. Tạo vector tái tổ hợp mang gen *polEPCA-2*

Chúng tôi sử dụng sốc nhiệt để biến nạp DNA plasmid vào tế bào *E.coli* BL21 (DE3). Các tế bào sau biến nạp được chọn lọc bằng phương pháp chọn lọc dương tính trên đĩa agar chứa môi trường LB với kháng sinh Kanamycin. Ở đây, sở dĩ chúng tôi sử dụng *E.coli* BL21 (DE3) làm chủng vi khuẩn biểu hiện bởi vì *E.coli* BL21 (DE3) là vật chủ thích hợp cho cả việc biểu hiện gen đồng thời cũng là vật chủ thích hợp cho biểu hiện protein khi dùng vector biểu hiện có chứa promoter lac như vector pET-28a(+). Trong nghiên cứu này, từ các khuẩn lạc mọc được trên môi trường chọn lọc chứa gen kháng kháng sinh của vector tái tổ hợp, chúng tôi kiểm tra bằng kỹ thuật PCR với 2 cặp mồi T7F và T7R. Kết quả cho thấy sản phẩm thu được tương đương với kích thước tính toán. Như vậy, chúng tôi đã biến nạp thành công vector biểu hiện tái tổ hợp pET-28a(+)/*polEPCA-2* vào tế bào *E.coli* BL21 (DE3).

4.1.5. Biểu hiện protein tái tổ hợp

4.1.5.1. Tối ưu hóa điều kiện biểu hiện của protein tái tổ hợp

Việc tối ưu hóa các điều kiện biểu hiện protein tái tổ hợp sẽ giúp chúng tôi tạo được lượng protein EPCA-2 tái tổ hợp cao nhất làm

nguyên liệu cho qui trình tinh sạch. Kết quả cho thấy tính hòa tan của polEPCA-2 không được cải thiện khi biểu hiện ở nhiệt độ thấp. Điều kiện tối ưu cho biểu hiện polEPCA-2 là 37⁰C và cảm ứng qua đêm.

4.1.5.2. Tinh sạch protein tái tổ hợp bằng Kit ProBondTM Nikel Resin

Tinh sạch để thu nhận protein mong muốn sau tái tổ hợp là bước tiếp theo của công nghệ protein. Để thu được khối lượng lớn protein còn hoạt tính đòi hỏi phương pháp tinh sạch phải phù hợp với dạng tồn tại của protein sau tái tổ hợp. DopolEPCA-2 tồn tại chủ yếu ở dạng thể vùi không hòa tan, với mục đích thu được sản phẩm protein sau tinh sạch vẫn còn hoạt tính, chúng tôi lựa chọn phương pháp hybrid để tinh sạch. Bởi hybrid là phương pháp kết hợp vừa gây biến tính để đưa protein không hòa tan về dạng hòa tan ở giai đoạn đầu, đồng thời loại chất có thể gây biến tính protein ở giai đoạn sau, kết hợp rửa nhiều lần để protein gắn trên cột được hồi tính.

Chúng tôi sử dụng đệm DBB có chứa 8M urea để gây biến tính các cận tế bào trong quá trình siêu âm. Sau đó rửa bằng NWB. Đây là bước rất quan trọng vì có tác dụng loại các chất gây biến tính giúp protein dần cuộn xoắn về trạng thái hồi tính, tức là trạng thái có hoạt tính. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã rửa bằng NWB với thể tích khoảng 80 mL.

Thời gian tiến hành siêu âm cũng có vai trò quyết định đến chất lượng sản phẩm protein sau tinh sạch. Vì nếu lựa chọn thời gian nghỉ và phát sóng siêu âm không phù hợp sẽ gây nóng protein dẫn đến protein bị biến tính không hồi phục và mất hoạt tính. Trong nghiên cứu, chúng tôi sử dụng máy siêu âm Labsonic với chu kì phát sóng và nghỉ là 30 giây kế tiếp nhau trong tổng thời gian phát sóng siêu âm là 20 phút.

4.1.5.3. Kiểm tra hoạt tính của protein tái tổ hợp

Trong qui trình nghiên cứu chúng tôi sử dụng polEPCA-2 đóng vai trò là KN để gây miễn dịch cho thỏ tạo KT. Vì vậy, polEPCA-2 sau tinh sạch nếu không có hoạt tính, các bước tiến hành tiếp theo sẽ không có giá trị. Hoạt tính của polEPCA-2 được chúng tôi đánh giá với kháng thể kháng EPCA-2 trong kit của CUSABIO. Kết quả thử nghiệm thu được: sản phẩm polEPCA-2.22, 2.19 sau tinh sạch có hoạt tính kháng nguyên và có nồng độ 41,185 ng/mL, có thể sử dụng để thực hiện các bước gây miễn dịch.

4.2.VỀ KẾT QUẢ TẠO KHÁNG THỂ THỎ ĐẶC HIỆU KHÁNG PolEPCA-2

❖ *Lựa chọn phương pháp tạo kháng thể*

PolEPCA-2 tiếp tục được sử dụng để tạo kháng thể đặc hiệu bằng phương pháp gây miễn dịch trên thỏ. Sở dĩ chúng tôi lựa chọn phương pháp gây miễn dịch trên động vật bởi đây là phương pháp tạo kháng thể tương đối dễ thực hiện và có tính ứng dụng cao. Đồng thời bằng kết quả của nhiều nghiên cứu trên thế giới cũng đã thành công với việc gây miễn dịch trên động vật với kháng nguyên là protein tái tổ hợp [86][95]. Các nghiên cứu đều chỉ ra rằng nhược điểm lớn nhất của phương pháp này là phải sử dụng đến một lượng lớn KN trong qui trình triển khai kĩ thuật. Vì những lý do trên chúng tôi quyết định chọn phương pháp gây miễn dịch trên thỏ để tạo kháng thể.

❖ *Lựa chọn qui trình gây miễn dịch và thời điểm thu nhận kháng thể phù hợp*

Có nhiều qui trình khác nhau để gây miễn dịch tạo kháng thể. Nhìn chung kết quả tạo kháng thể bằng phương pháp gây miễn dịch trên động vật phụ thuộc chủ yếu vào 3 yếu tố: (1) Bản chất của kháng nguyên. (2) Đường vào của kháng nguyên. (3) Thời điểm thu nhận kháng thể.

Trong nghiên cứu này chúng tôi dùng *PolEPCA-2* có bản chất là protein (kích thước 210 a amin) như một KN để gây miễn dịch cho thỏ. Cấu tạo và kích thước này của KN đạt tiêu chuẩn là một KN tốt để gây kích thích hệ miễn dịch thỏ tạo KT đặc hiệu. Kinh nghiệm của chúng tôi cho thấy các kháng nguyên có cấu tạo protein có khả năng gây kích thích sinh kháng thể tốt với cả 2 hệ thống đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch qua trung gian tế bào của cơ thể. Đồng thời kích thích này còn để lại các tế bào trí nhớ miễn dịch, vì vậy với nhiều lần tiêm lặp lại của kháng nguyên, cơ thể thỏ sẽ có phản ứng của trí nhớ miễn dịch và việc tạo kháng thể ở các lần tiêm gây miễn dịch sau sẽ nhanh và mạnh hơn.

Chúng tôi chọn qui trình gây miễn dịch cho thỏ theo phác đồ 4 lần tiêm, thời gian giữa các lần tiêm cách nhau 7 ngày và dung dịch gây miễn dịch là hỗn hợp *polEPCA-2* tái tổ hợp kết hợp với Freund. Đây là một qui trình gây miễn dịch tạo KT rất tốt trên thỏ tại labo Miễn dịch của bộ môn Sinh lí bệnh - Miễn dịch trường Đại học Y Hà Nội. Qui trình này sử dụng 2 đường vào của KN đó là đường tiêm vào cơ đùi và tiêm ổ bụng. Cả 2 đường tiêm này đều được đánh giá là có khả năng sinh

miễn dịch tốt hơn so với đường tiêm tĩnh mạch hay đường uống, đặc biệt là với kháng nguyên có bản chất protein.

Về thời điểm thu hoạch kháng thể, chúng tôi căn cứ theo lý thuyết và kinh nghiệm về thời gian sinh kháng thể của quá trình đáp ứng miễn dịch. Thông thường kháng thể bắt đầu được sinh ra từ ngày thứ 6 sau lần tiếp xúc đầu tiên của kháng nguyên với cơ thể. Ở lần tiếp xúc thứ 2 của cơ thể với KN chỉ cần 10 giờ sau đã có KT trong máu. Phản ứng tạo KT tăng dần và nồng độ KT đạt tối đa khoảng 48 - 72 giờ sau. Tuy nhiên nồng độ kháng thể sau lần gây miễn dịch mũi thứ 2 thường chưa cao nên thường chưa định lượng được. Nồng độ KT thường tăng cao đáng kể và có thể định lượng được từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 10 sau mũi tiêm nhắc lại từ lần 3 trở đi. Và đặc biệt nồng độ KT sẽ đạt đỉnh tại thời điểm ngày thứ 15 đến 20 sau mũi tiêm 4.

Vì vậy, để kiểm tra và thu được KT với nồng độ cao nhất, chúng tôi tiến hành kiểm tra nồng độ KT trong huyết thanh ở các thời điểm ngày thứ 7 sau mũi tiêm 3, ngày thứ 15 và 20 sau mũi tiêm 4.

Kết quả cho thấy KT kháng polePCA-2 trong huyết thanh ở thời điểm 7 ngày sau mũi tiêm 3 còn thấp, nhưng đã định lượng được đạt nồng độ trung bình là 28,3ng/ml (thỏ chứng là 8,5ng/ml). Kết quả KT ở ngày thứ 15 sau mũi thứ 4 đã tăng cao gấp 3,5 lần so với nồng độ kháng thể tại thời điểm 7 ngày sau mũi tiêm 3 (95,65ng/ml so với 28,3ng/ml). Đặc biệt, tại thời điểm 20 ngày sau mũi tiêm 4 kết quả KT tăng cao rõ rệt, gấp 8,4 lần so với sau mũi 3 và 2,3 lần so với thời điểm ngày thứ 15 sau mũi tiêm 4 (229,17ng/ml so với 28,3 và 95,65ng/ml). Như vậy là KT ở thời điểm 20 ngày sau mũi tiêm 4 đã có nồng độ đạt đỉnh đúng như dự kiến. Chúng tôi tiến hành lấy máu thỏ toàn bộ thu tối đa lượng huyết thanh được tổng lượng kháng huyết thanh thỏ là 330 ml, nồng độ kháng thể tạo được là 229,17ng/ml. Huyết thanh được lập tức đông khô để hạn chế sự giảm hiệu giá của KT.

4.3. KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH EPCA-2 TRONG HUYẾT THANH 3 NHÓM NGHIÊN CỨU

Huyết thanh thỏ có KT đặc hiệu kháng hai epitope EPCA-2.22 và 2.19 được chúng tôi cho kiểm tra xác định có hoạt tính với KN có đối chứng với KT trong kit xác định EPCA-2 của CUSABIO, được chúng tôi sử dụng trong kỹ thuật ELISA để xác định KN trong mẫu huyết thanh của 3 nhóm nghiên cứu đó là: 40 bệnh nhân UTTTL, 40 bệnh

nhân u phì đại lành tính TTL và 30 mẫu huyết thanh đối chứng âm của người nam bình thường cùng nhóm tuổi với hai nhóm bệnh nhân TTL.

4.3.1. Một số thông tin của 2 nhóm bệnh nhân tuyến tiền liệt.

4.3.1.1. Thông tin về tuổi

Trong nghiên cứu của chúng tôi với 110 mẫu nghiên cứu đã gặp tuổi thấp nhất là 55 và tuổi cao nhất là 101. Cả hai nhóm bệnh nhân UTTTL và u phì đại lành tính tuyến tiền liệt (UPĐLTTL) đều có độ tuổi mắc bệnh cao nhất là từ 76 đến 85. Ở nhóm UTTTL tỷ lệ mắc bệnh ở độ tuổi này là 55% và nhóm UPĐLTTL là 45%. Tỷ lệ mắc bệnh thấp nhất của 2 nhóm là dưới 60 tuổi. với nhóm UTTTL không có bệnh nhân dưới 60 còn nhóm UPĐLTTL có 2 bệnh nhân tuổi dưới 60 (5%). Kết quả này của chúng tôi cũng tương đương với kết quả của Nguyễn Thị Phương Ngọc nghiên cứu trên 1270 nam giới trên 50 tuổi cũng thấy độ tuổi thấp nhất của các bệnh nhân TTL là 50, cao nhất là 89 và độ tuổi mắc UPĐLTTL cao nhất trong nghiên cứu của Thị Phương Ngọc là trên 70.

4.3.1.2. Chỉ số PSA

PSA là một protein được sản xuất bởi tế bào TTL. Bình thường chỉ một lượng rất nhỏ của PSA thoát được vào hệ tuần hoàn. Trong UTTTL, cấu trúc mô học bị phá vỡ, PSA được tiết trực tiếp vào khoảng gian bào, đi thẳng vào hệ tuần hoàn. Do đó trong UTTTL, nồng độ PSA huyết thanh thường tăng cao có thể gấp 10 lần so với mô tuyến tăng sinh lành tính. Tuy nhiên theo các nghiên cứu của Thompson, Catalon, Đỗ Khánh Hỷ và Hoàng Thị Phương Liên, nồng độ PSA tăng không là dấu hiệu đặc trưng của UTTTL bởi PSA còn có thể tăng do UPĐLTTL, viêm, hay sau các thủ thuật thăm khám TTL... Trong nghiên cứu của chúng tôi giá trị tPSA trung bình của nhóm UTTTL cao gấp 1,4 lần nhóm u phì đại lành tính TTL, và gấp 28 lần nhóm nam bình thường. Nếu chỉ xét riêng 2 nhóm bệnh nhân TTL kết quả cho thấy cả nhóm UTTTL và u phì đại TTL đều có bệnh nhân ở tất cả các mức nồng độ tPSA từ thấp < 4ng/ml đến cao trên 30ng/ml. Tuy nhiên chiếm tỷ lệ cao nhất ở nhóm UTTTL là những bệnh nhân có nồng độ tPSA > 30 ng/ml (30%) còn nhóm UPĐLTTL tỷ lệ cao là ở mức nồng độ 4-20 ng/ml (55%) (bảng 3.2). Kết quả của chúng tôi cũng phù hợp với các nghiên cứu của Thomson và Catalon cho rằng có sự tăng cao có ý nghĩa của chỉ số PSA ở những bệnh nhân UTTTL, tuy nhiên cũng có bệnh nhân UTTTL không có tăng PSA trong huyết thanh.

4.3.2. Kết quả xác định EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt bằng kháng thể thô có đối chứng với kit thương phẩm

EPCA-2 là dấu ấn sinh học đặc trưng của tuyến tiền liệt bị ung thư. Hai epitope EPCA-2.22, 2.19 đã được chứng minh là xuất hiện sớm và phổ biến trong huyết thanh các bệnh nhân UTTTL. Sử dụng KT đặc hiệu để xác định EPCA-2 không chỉ cho phép xác định bệnh mà còn có thể chẩn đoán giai đoạn bệnh. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng KT đặc hiệu kháng EPCA-2.22,2.19 do chúng tôi tạo ra để xác định nồng độ KN trong huyết thanh 3 nhóm nghiên cứu. Các kết quả được đối chứng với kết quả xác định EPCA-2 của bộ Kit ELISA (CUSABIO, mã số CSB - EQ 027679HU). Nồng độ EPCA-2 của hai phương pháp ELISA được định lượng dựa trên đường chuẩn của kit ELISA.

Đường chuẩn kit ELISA được dựng trên 5 điểm nồng độ có $r^2 = 0,986$ gần tương đương với 1 cho thấy đây là đường chuẩn đáng tin cậy để suy ra nồng độ các kết quả đo được.

Kết quả xác định nồng độ EPCA-2 của cả hai phương pháp ELISA trong nghiên cứu của chúng tôi đều khẳng định có sự hiện diện của EPCA-2 ở 100% huyết thanh bệnh nhân UTTTL. Đồng thời chiếm đa số là nồng độ EPCA-2 ở mức cao từ trên 100ng/ml đến 400 ng/ml. Số lượng bệnh nhân ở mức nồng độ này là 28/40 bệnh nhân với kết quả xác định bằng kit ELISA, và 30/40 bệnh nhân với kết quả xác định bằng kháng thể thô đặc hiệu. Đồng thời kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương đồng với kết quả của kit thương phẩm ở chỗ phát hiện có bệnh nhân UTTTL với mức nồng độ EPCA-2 ngưỡng thấp nhất có thể phát hiện được (12,5ng/ml). Giá trị dương tính thu được ở nghiên cứu của chúng tôi cao bởi khi chọn mẫu nghiên cứu cho nhóm bệnh, chúng tôi đã chọn những bệnh nhân UTTTL chắc chắn có bệnh. Do tất cả các bệnh nhân này đều đã có đầy đủ kết quả dương tính với UTTTL bằng phương pháp nhuộm hóa mô miễn dịch nhiều lát cắt (8 đến 10 lát cắt) tại khối u sau phẫu thuật từ hai trung tâm giải phẫu bệnh của bệnh viện Hữu Nghị và bệnh viện Việt Đức. Kết quả này không chỉ khẳng định giá trị đặc hiệu của dấu ấn sinh học mới EPCA-2 mà còn cho thấy giá trị ứng dụng tốt của KT đặc hiệu kháng EPCA-2 trong chẩn đoán UTTTL. Để so sánh giá trị nồng độ phát hiện EPCA-2 của hai phương pháp ELISA. Chúng tôi tính giá trị trung bình của nồng độ EPCA-2 trong 40 mẫu huyết thanh bệnh nhân UTTTL được xác định song song bằng 2 phương pháp ELISA (phương pháp ELISA sử dụng KT thô so

sánh với ELISA dùng kit thương phẩm). Kết quả cho thấy giá trị trung bình nồng độ EPCA- 2 được phát hiện bằng kit ELISA cao hơn kết quả được phát hiện bằng KT thô. Giá trị trung bình và phương sai của kết quả từ hai phương pháp ELISA lần lượt là 279.8974 ± 172.1579 so với 208.658 ± 136.651 .

4.3.3. Kết quả xác định EPCA-2 trong huyết thanh bệnh nhân u phì đại lành tính tuyến tiền liệt và nam giới bình thường bằng 2 phương pháp ELISA.

Để thêm khẳng định kết quả nghiên cứu, chúng tôi chọn 2 nhóm đối chứng cho nghiên cứu đó là: Nhóm bệnh nhân UPĐLTTL, và nhóm người nam bình thường cùng nhóm tuổi với nhóm nghiên cứu.

Sở dĩ chúng tôi chọn nhóm bệnh nhân UPĐLTTL, bởi thực tế hiện nay các xét nghiệm đều khó khăn trong chẩn đoán phân biệt UTTTL và UPĐLTTL. Các bệnh nhân chỉ được chọn vào nhóm nghiên cứu của chúng tôi khi đã có kết quả mô bệnh học nhuộm HE âm tính với UTTTL trên các mẫu mô sau phẫu thuật cắt bỏ TTL.

Kết quả thu được khá tương đồng từ cả 2 phương pháp ELISA là 38/40 bệnh nhân của nhóm UPĐLTTL không có EPCA-2 trong huyết thanh. Điều này càng cho thấy EPCA-2 xuất hiện là đặc hiệu với UTTTL. Sở dĩ kết quả đạt được từ cả hai phương pháp ELISA xác định EPCA-2 ở đây gần như tuyệt đối là do chúng tôi đã chọn tiêu chuẩn vàng trong chẩn đoán bệnh nhân TTL đó là kết quả mô bệnh học làm cơ sở đối chứng cho nghiên cứu của chúng tôi. Điều này đã góp phần làm tăng độ tin cậy của các kết quả nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Hansel (2009) và Barbara (2005) về giá trị của EPCA-2 trong chẩn đoán UTTTL.

Chúng tôi sử dụng huyết thanh của 30 nam giới bình thường không có các biểu hiện lâm sàng của bệnh TTL, không mắc các bệnh ung thư khác, có cùng nhóm tuổi với hai nhóm bệnh nhân của TTL để làm đối chứng âm. Kết quả từ cả hai phương pháp ELISA đều trả lời 100% các mẫu huyết thanh của nhóm đối chứng âm này không có sự hiện diện của EPCA- 2. Kết quả này một lần nữa khẳng định tính đặc hiệu cao của EPCA-2 đối với UTTTL cũng như giá trị đặc hiệu tốt của xét nghiệm xác định EPCA-2 bằng KT thô đặc hiệu kháng EPCA-2.22, 2.19.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng phù hợp với nghiên cứu của Getzenberg khi đo nồng độ EPCA-2 ở 330 đàn ông, thấy rằng kết quả của thử nghiệm EPCA-2 âm tính ở 97% những người đàn ông không UTTTL. Phù hợp với kết quả của một nghiên cứu khác sử

dùng ELISA định lượng EPCA trong huyết tương bệnh nhân UT TTL. Kết quả thu được ở nghiên cứu này: độ nhạy của xét nghiệm là 92% độ đặc hiệu là 94%. Độ đặc hiệu của nhóm người khỏe mạnh là 100%.

4.3.4. So sánh độ nhạy, độ đặc hiệu của 2 phương pháp ELISA sử dụng kháng thể thô đặc hiệu kháng EPCA-2.22,2.19 và kháng thể trong kit xác định EPCA-2 của CUSABIO

Để củng cố dữ liệu cho giá trị chẩn đoán của phương pháp ELISA sử dụng kháng thể thô đặc hiệu kháng EPCA-2. Chúng tôi tiến hành kiểm tra độ nhạy và độ đặc hiệu của kỹ thuật. Với kết quả EPCA-2 dương tính ở 100 % mẫu huyết thanh nhóm bệnh nhân UT TTL cho thấy độ nhạy của kỹ thuật đạt 100%. Đồng thời phương pháp này cũng cho kết quả EPCA-2 âm tính ở 38/40 mẫu huyết thanh nhóm bệnh nhân u phì đại lành tính TTL tương đương độ đặc hiệu đạt 95%.

Độ nhạy và độ đặc hiệu của phương pháp ELISA sử dụng kháng thể thô đặc hiệu kháng EPCA-2 của chúng tôi hoàn toàn tương đồng với độ nhạy và độ đặc hiệu của kit thương phẩm xác định EPCA-2 của hãng Cusabio.

Độ nhạy và độ đặc hiệu này cũng phù hợp với kết quả của Barbara khi sử dụng kỹ thuật ELISA nghiên cứu trên 385 mẫu huyết thanh nam giới cũng thu được kết quả với độ nhạy và độ đặc hiệu tương ứng là 92% và 94%.

KẾT LUẬN

1. Chúng tôi đã tái tổ hợp thành công polyepitpe EPCA-2.22,2.19 có hoạt tính với kháng thể đặc hiệu.

2. Bằng qui trình gây miễn dịch trên thỏ, đề tài đã tạo thành công kháng thể thô đặc hiệu với EPCA-2 (với tổng lượng huyết thanh thỏ thu được là 330ml và nồng độ kháng thể là 229,17ng/ml).

3. Kháng thể thô do đề tài tạo ra đã được ứng dụng bước đầu trong kỹ thuật ELISA sandwich xác định EPCA-2 ở bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt. Kết quả cho thấy việc xác định EPCA-2 bằng kháng thể thô cho kết quả tương đương với kit thương phẩm của CUSABIO.

4. Kháng thể thu được của đề tài có thể tiếp tục hoàn thiện và sử dụng cho việc tạo kit xác định EPCA-2.

NHỮNG CÔNG TRÌNH KHOA HỌC CÓ LIÊN QUAN**ĐỀ TÀI LUẬN ÁN ĐÃ ĐƯỢC CÔNG BỐ**

1. Đàm Thị Tú Anh, Phan Mai Hoa, Ngô Thị Thu Hiền, Lê Minh Phúc (2013), Tạo kháng thể thử đặc hiệu kháng kháng nguyên ung thư sớm tuyến tiền liệt (EPCA-2), *Y học Việt Nam*, tháng 11, 1.
2. Đàm Thị Tú Anh, Phan Mai Hoa, Lê Quang Huấn, Phạm Thiệp Ngọc (2014), Xác định kháng nguyên ung thư sớm tuyến tiền liệt (EPCA-2) trong huyết thanh bệnh nhân ung thư tuyến tiền liệt, *Y học lâm sàng*, tháng 10, 80.
3. Ngô Thị Thu Hiền, Đàm Thị Tú Anh, Lê Thị Minh Phúc, Phạm Thiệp Ngọc, Lê Quang Huấn (2014), Nghiên cứu biểu hiện gen mã hóa Polyepitop của kháng nguyên ung thư tuyến tiền liệt sớm (EPCA-2) trên vi khuẩn E.coli, *Y học lâm sàng*, tháng 10, 80.
4. Giải nhì, Hội nghị Khoa học nghiên cứu sinh, Trường Đại học Y Hà nội, năm 2013.

MINISTRY OF EDUCATION
AND TRAINING

MINISTRY OF HEALTH

HANOI MEDICAL UNIVERSITY

DAM THI TU ANH

**RESEARCH TO CREATE
SPECIFIC ANTIBODIES ANTIGEN
OF PROSTATE CANCER
FOR DIAGNOSTIC APPLICATIONS**

Speciality : Allergy and Immunology

Code : 62720109

MEDICAL DOCTORATE THESIS SUMMARY

HA NOI – 2016

**THESIS COMPLETED IN:
HA NOI MEDICAL UNIVERSITY**

Supervisor:

1. Prof. Pham Thien Ngoc MD, Ph.D

2. Prof Le Quang Huan Ph.D

Reviewer 1:

Reviewer 2:

Reviewer 3:

Thesis will be defended at Univeristy level Doctoral thesis assessment committee

At: on

Thesis can be found out in:

- National library of Viet Nam
- Ha Noi Medical University library
- Central Health Information library

INTRODUCTION THESIS

1. BACKGROUND

Prostate cancer (PC) was the first described in 1853. The research results have proved the effectiveness of PC treatment depends much on the time of disease detection. For cases that the cancers are still in the localized stage in prostate, about 70- 85% of patients alive up to 10 years after a thorough treatment. For cases of tumors that invaded to the sheath of the prostate spreadly, the survival rate is only 70% after 5 years and 40% after 10 years of treatment. Thus the requirement of early diagnosis of cancer in general or prostate cancer in particular is very important.

Early prostate cancer antigen - 2 (EPCA-2) which is a molecule marker has been acknowledged as specific for prostate cancer. This marker has 3 antigen-positions that are well- known sequences and can be detected in both tissue and biological fluids of prostate cancer patients by specific antibody. EPCA-2 was proven to appear two years earlier than the first manifestation in histopathology, simultaneously using antibody to determine EPCA-2 in the blood allow diagnosing prostate cancer with the sensitivity of 92%, the specificity of 94%.

Using specific antibodies to detect cancer markers in tissues and biological fluids has early value in the diagnostic methods. Simultaneously, many studies have used antibodies as a directive substance for the anti-cancer drugs to effect on cancer cells, restrict unwanted effects on healthy cells. Applications of antibodies in diagnosis and treatment are the sectors that are increasingly being developed perfectly for widely applicable.

This research project was conducted with two goals:

1. *Create specific antibody of recombinant EPCA-2.*
2. *Assessment of the applicability of specific antibodies anti-EPCA-2 in diagnosing prostate cancer.*

2. THE NECESSITY OF RESEARCH

Prostate cancer is incurable problem in most countries. The disease usually manifests the symptoms when you had already been at a later stage. But if diagnosed early, the disease can be completely cured. This shows the importance of early diagnosis of prostate cancer. The propotion of patients with prostate cancer is increasing in Vietnam which requires rapid diagnosis, early, easy to implement, satisfactory accuracy. The markers specific for each cancer in the human serum is ideal for early cancer diagnosis, easy and non-invasive. With the creation of the cancer antigen structure by recombinant methods,

thesis has resolved early diagnosis of prostate cancer by using specific antibody proactively generated antibodies from known antigenic structure. Since then uses of antibodies has generated in diagnostic applications.

3. THE NEW CONCLUSIONS OF THE THESIS

- This is the first research in Vietnam that combines continuously of modern molecular methods to create EPCA-2 specific antibody and uses it to diagnose prostate cancer.

- Has successfully designed expression vector recombinant *polEPCA-2* carrying the encoded gene epitop EPCA-2.22 and EPCA-2.19 of the early prostate cancer antigen.

- Obtained recombinant *PolEPCA-2* has bio-active with specific antibodies in ELISA kits to detect EPCA-2 of the CUSABIO Company.

- Successfully creating specific rabbit antibody to early prostate cancer antigen (total amount of rabbit serum obtained was 330 ml, the concentration of antibodies generated is 229,17ng / ml).

- Initial values determined EPCA-2 in serum of prostate cancer patients with rabbit antibody generated by the thesis are in equivalent to the commercial product of CUSABIO.

- The generated antibodies can be completed to create kits to determine EPCA-2 antigen.

4. THE LAYOUT OF THE THESIS

The thesis included of 135 pages, 6 servings: Background 2 pages, chapter 1: Literature review 47 pages, chapter 2: Research subject and methodology 30 pages, chapter 3: Research results 30 pages, chapter 4: Discussion 20 pages, Conclusion 1 page.

The thesis has 26 tables, 37 figures, 2 diagrams, 99 reference which 18 Vietnamese and 81 English.

THE CONTENTS OF THESIS

CHAPTER 1

LITERATURE REVIEW

1.1. OVERVIEW OF PROSTATE CANCER

Prostate cancer causes the second most fatal of cancer diseases in men. Reality has shown that prostate cancer can be cured if it is detected early. However, the same as all of cancers, the clinical symptoms are usually appeared when the cancer is at a later stage, this is the cause of failed-treatment and leading to death of PC.

1.1.1. The situation of prostate cancer in the world

According to the World Health Organization, by the end of 2012, there are about 1,111,689 people with prostate cancer worldwide, 307 481 people have died of the disease. The disease has the highest incidence in countries with developed economies. In 2008, Europe only has 338,000 men who were diagnosed with prostate cancer. According to the American Cancer Society, in 2015 there were about 220 800 new prostate cancer suffers in the United States and 158,040 people died of prostate cancer. In five years (2001-2005), the statistics showed that the incidence of prostate cancer in Negro is the highest with 249 per 100,000 and lowest in Asian Americans with 94 per 100,000. In general, the incidence of prostate cancer increases rapidly with age than any other types of cancer.

1.1.2. The situation of prostate cancer in Vietnam

Eventhough, Vietnam has been among the countries that the prevalence of prostate cancer is not high, according to estimate by the World Health Organization the prevalence of prostate cancer in Vietnam by the end of 2012 is about 1275 people. In which, the number of mortality is about 872 people. A local study of Nguyen Van Hung was conducted in 633 patients who have had prostate surgery. Histopathological results showed that prostate cancer rate was found to be 7.9%. In which, the main is the high differentiated adenocarcinoma (95.2%). In another study was published in 2010 by Vu Le Chuyen when screening prostate cancer for 87 men in Ho Chi Minh City based on prostate biopsy results, serum PSA level and rectal ultrasound results showed that there were 10 / 87 people (2.5%) who were diagnosed with prostate cancer.

1.2. THE KNOWLEDGE OF PROSTATE CANCER DIAGNOSIS

1.2.1. The new understanding of prostate cancer diagnosis

Ultrasound scans: Ultrasound tomography (ULT) is the methods of modern image diagnosis. This method allows the exploration of form with multiple layers of tissue with the coverage of the image at the position is 100% and the accuracy of optics is 95%. The ultrasound tomography method is still continuing to be studied and tested before being widely applied in clinical practice.

❖ *PET/CT*

Positron emission tomography (PET / CT) is a form of diagnosis by images of biological metabolism or function of the body at the cellular level. The prostate cancer PET / CT image has the ability to

predict the survival time in patients with prostate cancer who have reduced the biochemical function after treating with androgens.

❖ ***The biomarkers in prostate cancer***

Biomarkers are molecules produced by normal cells, abnormal cells and due to the body's response to cancer. These molecules circulate in serum, plasma, in the biological fluids of the body, urine and prostate cancer tissue. Therefore, these molecules can be determined by tests. Many serum markers have been applied and have good clinical value in diagnosis and stage of prostate cancer diagnosed such as: Early prostate cancer antigen (EPCA). Prostate stem cell antigen precursor (PSCA). Hexokinase 2 (hK2). Osteoprotegerin (OPG). Human Glandular Kalikrein 2 (huK2). Transforming Growth Factor - β and Interleukin-6 (TGF- β). Vascular endothelial growth factor (VEGF).

❖ ***Early prostate cancer antigen (EPCA).***

EPCA is detected from the proteomic studies of the proteins in substrate of the cancer cell nucleus. April 2007, the first time, Leman, Getzenberg at al have pinpointed a protein that also appears in nucleus of prostate cancer cells with small amount but not in the normal prostate cell, which is EPCA- 2. EPCA-2 is not relevant to the EPCA. The names of these antigens are detected by their history. EPCA is the first early prostate cancer antigen protein discovered while EPCA-2 is the second early prostate cancer antigen protein discovered. EPCA-2 with an important feature of this protein is increased only in malignant prostate cells so it is very specific to prostate cancer and it has been proposed as a new biomarker in malignant lesions of prostate.

In 2008 Getzenberg at al published 3 peptide sequences which are said to be 3 epitopes of EPC, including EPCA-2:22, EPCA- 2:19 and EPCA-2.4. In 2009, Getzenberg was patented for researches on prostate cancer diagnostic value of EPCA-2. EPCA-2 increased in prostate cancer cells and surrounding tissues but do not appear in prostate normal tissues as well as in benign prostatic hyperplasia. According to a study in patients with negative result in initial biopsy, there was up to 75% of cases have positive EPCA-2 and progressing to cancer five years later. Notably, EPCA-2 was detected in the prostate of these people at least two years before morphological manifestations of cancer have manifested. Thus the presence of EPCA-2 is specific for prostate cancer at a very early stage. By combined antigen- antibody reaction, people can use specific antibody with EPCA to determine the presence of EPCA-2 in the blood, tissue, serum or other biological fluids of prostate cancer patients. This antibody also may help to predict the extent and forming risk of cancer and metastatic risk of prostate cancer. A study

by Getzenberg measured EPCA-2 levels in 330 men. The results pinpointed that up to 90% of men with prostate cancer was localized and 98% who have a tumor has spread outside the gland. These tests were negative in 97% of the non- prostate cancer men. Another study applied the ELISA method to determinate serum EPCA levels of 449 patients who have been surgically removed prostate gland due to hypertrophic prostate compared with 112 healthy men. With a cut – off threshold of 10ng / ml, the results showed that 100% of the healthy men did not have EPCA-2 in serum, meanwhile in men with prostate cancer, ELISA method correctly identified with a specificity of 98% and sensitivity of 100%.

1.2.2. In Vietnam

In Nguyen Van Hung's study in 2005 on 633 patients who had prostate surgery, the histopathological results showed that the rate of prostate cancer detected by biopsy method was 7.9%. In which the main was the highly differentiated adenocarcinoma cancer (95.2%).

Research by Do Khanh Hy and Hoan Thi Phuong Lien concluded PSA value in clinical does not allow definitive diagnosis of prostate cancer particularly with PSA valuable in the gray area (4 - 10ng / ml).

Research by Nguyen Thi Phuong Ngoc in 2009 showed that: (1) there is an increasing in the concentration of PSA in the blood of both groups of cancer patients and patients with benign tumors hypertrophy prostate. (2) There is an enhancing gene and HIP -protein expression in prostate cancer tissue compared with tumor benign hypertrophy prostate tissue and begin tumor with a significance statistical difference ($p < 0.01$). About EPCA, There is only a study by Le Quang Huan that was cloned and successfully identified the gene encoding nucleotide sequence of antigen- EPCA from prostate cancer patient samples.

The reseach of the Vietnam Military Medical Academy has been successfully implanted prostate cancer tumor of human in immune deficiency mouse (Nude mouse) and assessed the concentration of radioactive iodine bound drugs (ANA – ^{131}I) to the cancer tumor. The researchers also tested the effects of the prostate cancer cell resolution in Nude mouse with multiple sets of two virus form of measles vaccine and mumps vaccine. Results showed that treatment with both measles and mumps viruses have effected on limiting size of prostate cancer blocks.

1.3. ANTIBODIES AND PROSTATE CANCER DIAGNOSTIC

1.3.1. Antibody.

Definition: Antibodies are proteins in nature and are secreted by lymphocytes to eliminate the strange factors to the body.

1.3.2. Structure of antibody

An antigen enters the body; the immune system will recognize and are activated to eliminate this antigen. Cell immune response and humoral immune response are two specific methods to protect the body. For humoral immune response, the antibodies are the immunoglobulins (Ig) in soluble form; the immune response mediated by cells is executed by T lymphocytes. Each antibody molecule has a structure that consists of one or more basic units; each unit has four polypeptide chains with identical pairs: two light chains and two heavy chains. Both light chain and heavy chain are composed of two parts: a constant part denoted C (constant). Part change, ends -NH₂ with amino acid order that has some sections extremely changes, these extremely changes sections participate directly in the formation of the antigen binding sites (paratop).

1.3.3. Monoclonal Antibodies

Monoclonal antibody is a fusion antibody of the whole heavy chain and light chain that have the same kind of paratope so it combine specifically with a type of epitope only Single-chain antibody is a set of incomplete antibodies, usually only the change area of the heavy chain and light chain are presented and it carries the same kind of paratope so it combine specifically with a type of epitope only (eg, single-chain antibody ScFV) .

To produce monoclonal antibodies, or single-chain antibodies one of these methods can be used:(1) Immunogenic in animal method. (2) Hybridoma technology.(3) Recombinant DNA method. (4) Screening from antigen libraries method (phage display bacteriophage library, library of Aptamer antibody).

1.4. TECHNIQUES WERE USED IN THE STUDY

1.4.1. Recombinant DNA techniques

Protein technology is an important research of bio-technology with enormous potential application based on recombinant DNA technology. Thanks to protein technology that can produce native protein, proteins have been modified or new proteins have been produced by the E. coli....

The key steps of protein technology: 1. Sequence identity. 2. Determine the structure and modeling. 3.Change the sequence. 4.Development of molecules. 5. Designing de novo sequencing. 6. Expression. 7. Analysis. 8. The process of extraction and purification of proteins

1.4.2. Genetic immunization for antibody generation in research animal technology.

Antiserum modulation by genetic immunization in animals is one of the creating antibody methods that has been used long ago and have been completed alongside the introduction of many modern generating antibody techniques. The result of antiserum modulation by genetic immunization in animals depends on a number of factors: *Quality of antigens*: Natural antigen of a material depends on the structure, weight, molecular, strangeness and metabolic capabilities of the substance in the body. *Injection method of antigens*. *The dose of antigen*, the interval between injections: Depending on the type of antigens and the requirement of modulation of serum antibodies that choose to induce immunization with different solution and interval between injections. The induced immunity solutions have 3 categories: (1) native antigen solution, (2) antigen with Freund adjuvant, (3) combination of the solution (1) and (2). The method is commonly used nowadays are inducing immunization by solution of antigen mixed with adjuvant because of higher antibody titre result when comparing with method using antibody only.

1.4.3 ELISA technique

ELISA is a diagnostic technique based on immunological principles commonly in many fields. ELISA is an enzyme-linked immunosorbent assay technique that based on the natural adsorption properties of proteins on a number of substances such as polystyrene. The existing ELISA techniques include: direct- ELISA, indirect-ELISA, ELISA sandwich and competitive ELISA. ELISA sandwich technique Principle: Unmarked antibodies (anticipated) are binded to the carrier (polystyrene), the antigen which is needed to find is annealed with carriers which have antibody. Wash away excessive antigen and add more enzyme-binded antibody. Thus, the needed antigen is stuck between two antibodies. After washing 2 times to remove excessive enzyme-binded antibody, a substrate solution is added to produce specific colors. The level of colouring of the reaction is measured for optical density by a spectrometer at the appropriate wavelength. ELISA sandwich technique had several advantages: firstly, reduced colored substrate and nonspecific reactions. Secondly, reactions are conducted easily, antibodies can be bind to a solid surface kit form in advanced and can perform diagnosis in which antigen is unable to bind to the solid surface.

CHAPTER 2

RESEARCH SUBJECT AND METHODOLOGY

2.1. RESEARCH SUBJECT

2.1.1 Study subject of targets generate prostate cancer antigen-specific antibody.

- The polyepitope encoding gene of early prostate cancer antigen in designation of the research group (gen polEPCA-2) built-in halfstone vector pBSK -GS53545 was ordered from Cosmo Genentech Company.

- Recombinant Proteins which carry 8 repetitions of two epitopes as EPCA-2:22 and 2:19 was identified having activity with specific antigen in the Kit ELISA of CUSABIO.

- Eighteen gray rabbit are originated from Vietnam, healthy, average weight of 2.5 kg per one asexual and were reared in experiment conditions at laboratory of Immuno-Pathophysiology Department, Hanoi Medical University.

2.1.2. Study subject for the purpose of producing biological product by antibody and the initial application in the diagnosis of prostate cancer.

- Forty patients have been diagnosed with prostate cancer by chemical histopathology method (stain tissue specimens after surgery by Hematoxylin Eosin (HE)). Patients without other cancers and have not been treated with anticancer drugs.

- Forty patients with benign hypertrophy tumor prostate have been diagnosed and definitived by chemical histopathology method (stain HE tissue specimens after surgery).

- Thirty healthy men without prostate disease and were not suffering from other cancers and aged from 50 to 89 (the same age with 2 patients group above)

2.1.3. Biological products

- Rabbit specific antibody resist to two epitopes EPCA-2.22 and 2.19 which were identified with activity

- Enzymes: Cutting limit *Nco I*, *Not I* (Biolabs). *Taq DNA polymerase*, *T4 DNA ligase* (Biolabs). DNA ladder: 1kb DNA ladder SM0311 (Fermentas). Protein ladder: Unstained protein molecular weight marker SM0431 (Fermentas).

- Escherichia coli bacteriation: DH5 α , BL21 (DE3).

- Vector expression pET-28a (+) (Novagen).

- Pair of primers used in sequencing: was offered by Animal Cell Technology Department, Science and Technology Institute of Vietnam.

T7 F: 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG 3'

T7 R: 5' TAG TTA CTC TTG GG GGT AGC 3'

- Excipients: Freund'Adjuvant complete and incomplete Freund'Adjuvant, ELISA Kit determine EPCA-2 of CUSABIO, CSB - EQ 027679HU.

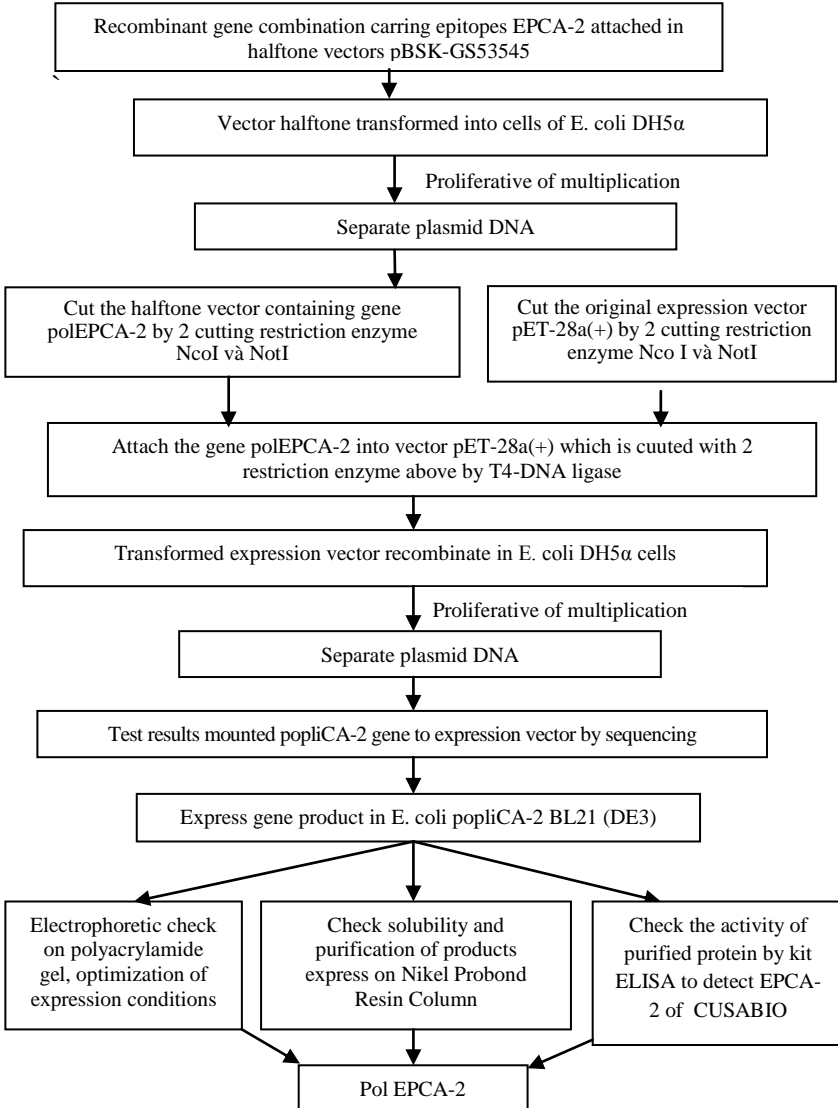
2.2 RESEARCH METHODS

The trial study creates biology products for technique : ELISA determinate EPCA-2 in prostate cancer diagnosis.

2.3. TECHNIQUES USED IN RESEARCH

2.3.1. Create recombinant antigen carrying epitopes EPCA-2

Recombination processes of polEPCA -2 is complied diagram:



2.3.2. The immunization technique for rabbit generating specific antibody anti EPCA-2.22, 2.19

- The rabbit in the study were divided into two groups; each group consists of 3 rabbits.

- Time for repeat injections: The experimental rabbits were immunized according to the 4 shots protocol. The interval among shots is 7 days.

- Collection of rabbit antisera are performed isolated albumin technique by precipitation method of Rodkey with the aim of removing albumin in rabbit antiserum. The technique uses protein precipitation principle by trichloroacetate acid 2% (2% TCA) and ethanol 84.5%.

2.3.3 ELISA technique in determining the concentration and specificity of rabbit antibodies obtained with polEPCA-2.

The technique is performed according to the principle of indirect ELISA. The technical process is performed as follows: 1. Anneal 100 μ l solution of polEPCA- 2:22 with 2:19 concentrations of 0.87 μ g / ml and was diluted in Coating buffer. Anneal in 4⁰C overnight, ensure that polEPCA be fixed well; 3. Wash 3 times with PBS 1X + Tween 20 and wash 3 times with PBS 1X; 4. Cover each well with 200 l PBS + 2% skim milk.; 5. Anneal at room temperature for 1-2 hours to inactivate nonspecific binding sites; 6. Wash 3 times with PBS 1X + Tween 20 and washed 3 times with PBS 1X; 7. Cover each well 100 μ l rabbit antibodies, incubated 37⁰C for 2 hours; 8. Wash 3 times with PBS 1X + Tween 20. Wash 3 times with PBS 1X; 10. Cover with 100 μ l in the rabbit enzyme binded-antibody wells (HRP); 11. Anneal the wells at 37⁰ C for 1- 2 hours. Wash 3 times with PBS 1X and Tween 20; 12. Add 100 μ l TMB substrate, anneal at room temperature for 10 -15 minutes; 15. Drop 50 μ l H₂SO₄ 1N. Read results at 450nm wavelength

2.3.4. ELISA technique identified EPCA-2.

2.3.4.1. Quantitate EPCA-2 by ELISA technique using specific rabbit antibodies anti-recombinant EPCA 2.22,2.19. ELISA technique using specific rabbit antibody in indentifying EPCA-2 in three research groups re performed based on ELISA sandwich theory. The technical process is conducted according to the following steps: 1. Drop 100 μ l rabbit serum

per test well; 2. Anneal at 4 ° C from 8-16 hours to antibody adsorbed well on the bottom of the well; 3. Wash 3 times with PBS 1X-Tween 20 buffer, 3 times with PBS 1X buffer; 4. Add 200µl skim milk Small into each well and anneal it for 2 hours to inactivate non-specific binding sites on the bottom of the well; 5. Wash 3 times with PBS 1X-Tween 20 buffer, 3 times with PBS 1X buffer solution; 6. Continue to add 100µl: serum need to be tested in each test well, the solution polEPCA-2 if the positive control wells, and the distilled water if the blank wells; 7. Cover the wells and anneal at 37 ° C for 2 hours for EPCA-2 can bind well with the antibodies that have been fixed on the bottom of the well; 8. After 2 hours, suck the fluid in the wells, washed 3 times with PBS 1X-Tween 20 buffer, and PBS 1X buffer; 9. Continue to add 100µl conjugated antibody into each well; 10. Cover and anneal at room temperature 37 ° C for 1-2 hours; 11. Wash 3 times with PBS 1X-Tween 20 buffer, 3 times with PBS 1X buffer; 12. Add 100µl TMB substrate to each well; 13. Anneal at room temperature for 10-15 minutes; 14. Add 50µl colorless 1N H₂SO₄ solution to stop the reaction; 15. Measure OD at 450nm wavelength on the ELISA Bio-Rad iMark TM machine (Has storage and data processing software). EPCA-2 concentrations were quantified based on the calibration curve of Kit ELISA of CUSABIO, CSB - EQ 027679HU.

2.3.4.2 Quantitate EPCA-2 by kit ELISA of CUSABIO, CSB - EQ 027679HU.ELISA technique determines EPCA-2 by using commercial kit was complied with ELISA sandwich theory. The technical process is performed following the instruction of the company:

2.4. RESEARCH LOCATION

- National Key Laboratory of Gene Technology, Vietnam Academy of Science and Technology
- Department of Pathophysiology-Immunology, Hanoi Medical University.
- The study sample were collected at the Hanoi Friendship Hospital.

CHAPTER 3 RESEARCH RESULTS

3.1. Create recombinant proteins carrying epitopes EPCA-2

3.1.1. Create recombinant vector carrying the gene pole PCA-2

Vector pET-28a (+) which is derived from the Novagen company (USA) was chosen as the vector carrying the encoding gene polEPCA-2.22,2.19 and could be expressed in *E. coli* cells and produced the desired protein product in secretion form. In the multi-position mounting cut site of this vector and gene-2.22,2.19 polEPCA both contained a known position of two enzymes I and Not I. Pol EPCA-2 gene with the sequence that contains 2 epitopes of gene encoding early prostate cancer antigen (EPCA-2) was repeated 8 times in tandem, and was designed by the research team.

3.1.2. Identify the gene sequence in the recombinant expression vector

We used recombinant plasmid as a template for PCR reaction with a pair of primers of the vector pET-28a (+) that were T7 F and T7 R, then purified PCR products. Obtained samples were sent to determine the sequence by automated sequence analysis machines.

Results of obtained gene transcription deduced protein sequence showed that the intact protein will consist of 210 amino acids corresponding with a molecular weight of about 23.1 kDa. At this point, we can claim to have the ability to link gene *polEPCA-2* to vector pET-28a (+) in upright and correct reading frame.

3.1.3. Express recombinant vector in E. coli bacteria strain BL21 (DE3) to create polEPCA-2 protein

Transformed recombinant expression vector pET-28a (+) / polEPCA-2 into *E. coli* BL21 (DE3) bacteria. After having determined correctly the gene sequence of polEPCA-2 in expression vector pET-28a (+), the plasmids of all 4 clones were transformed into expression strain *E. coli* BL21 (DE3). Electrophoresis results on polyacrylamide gel showed good product with corrected size of expected protein of 23.1 kDa was presented. Surveying appropriate conditions for the expression process of the protein in our study was the time manifested.

3.1.4. Purify recombinant protein by nickel Resin Kit ProBond™

By we made the recombinant protein with the end of 6-Histidine that has affinity with Ni^{2+} , so we use purity column by affinity chromatography method, with chelating agent for stuffing into column is agarose- Ni^{2+} . The His-Tag polEPCA-2 will have an affinity for Ni^{2+} and were clinging to the chelating agent on the

column. Then the affinity protein gets out of the column by pushing buffer (NEB). After purifying of the recombinant proteins, the products are checked by electrophoresis on gel polyacrylamide 12.6%. The results showed that the recombinant protein was very dark in the position that equivalent to a size of 23.1 kDa.

Thus, protein polEPCA-2 was purified successfully by column chromatography affinity His- Tag, this product can be used for subsequent experiments.

3.1.5. Develop baseline curve quantitating antigen or antibody

We conducted to build baseline curve as instructed by the manufacturer (Kit determine EPCA-2, CSB-EQ 027679HU). Chart baseline curve kit (with $r^2 = 0.986$)

3.1.6. Checking the activity of the product polEPCA after purification by kit ELISA

Recombinant protein polEPCA-2 was conducted trialing activity simultaneously preliminary testing EPCA-2 protein levels after purification by ELISA with specific antibodies in the diagnosis kit of CUSABIO. Results: polEPCA-2 activated, combined specifically with anti-EPCA-2 antibody in kit ELISA. When compare to baseline curve, the concentration of obtained antigen equivalent to 41.185 ng / mL.

3.2. RESULTS OF IMMUNIZATION IN RABBIT BY RECOMBINANT ANTIGEN PolEPCA -2.

Immunization procedure was conducted repeatedly 3 times independently with three different experiment batches. The results presented in this report are in rabbit batch with the best antibody concentration.

The concentration of anti-polEPCA-2 antibodies in rabbit serum.

Theoretically, the specific antibody will be presented in experiment rabbit serum after the 3rd injection from day 7 onwardly. So we conducted taking venous blood in the edge ear of rabbit to test antibody concentration in different time 7 days after the 3rd injection and 15 and 20 days after the 4th injection.

Comment: After the 3rd injection in day 7, the rabbit has specific antibody in serum with the concentrations 3.5 times higher than in control rabbit. On the 15th day, after the 4th injection, the concentration of obtained antibody 3.5 times higher than after the 3th injection. Concentration of antibody in the time of 20 days after the 4th injection reached the highest concentrations 8.4 times higher than concentration of antibody after the 3rd injection.

3.3. RESULTS DETERMINATION OF SERUM EPCA-2 IN 3 STUDY GROUPS

3.3.1. General Information of prostate patients group.

3.3.1.1 Information about the age of prostate patients group.

Comment: Patients with prostate cancer and hypertrophic prostate tumor both have the highest susceptible age range from 76 to 85, the lowest susceptible age range that is less than 60.

3.3.1.2 The concentration of serum tPSA of three research groups

Comment: Two groups of prostate patients with tPSA concentration at all levels from high to low concentration. tPSA concentrations > 30 ng / ml is in high percentage of prostate cancer group (30%).

3.3.2. Serum EPCA-2 concentration of 2 prostate patient –groups were quantitated by rabbit anti *EPCA-2 antibody* and kit *CUSABIO*

3.3.2.1. EPCA-2 concentration in the serum of patients with prostate cancer

Comment: Prostate cancer patients with EPCA-2 concentration from 100 to <400ng / ml made up the highest proportion of 28/40 that was determined by kit ELISA, and 30/40 with determination by srabbit pecific antibody.

3.3.2.2. EPCA-2 concentration in the serum of patients with benign hypertrophic prostate tumor.

Comment: The results determined by commercial kit are similar to the results determined by rabbit antibody showed that 38/40 of test samples was negative. There are 2/40 test samples which have low concentrations of EPCA-2.

3.3.3. Serum EPCA-2 concentrations of healthy men.

In serum of healthy male group, the result determined antibody by the commercial kit is similar to result determined by rabbit antibody showed negative EPCA-2 in 100% of testing samples.

3.3.4. Compare sensitivity, specificity of specific rabbit antibody anti EPCA-2 to antibody in determination EPCA-2 kit of CUSABIO

Both ELISA methods determined EPCA-2 by rabbit antibody and CUSABIO kit have similar result:

- For the patients with prostate cancer group, the result was 40/40, EPCA-2 (+), sensitivity reached 100%.

- For the patients with hypertrophic prostate tumor group, the result was 38/40, EPCA-2 (-), specificity reached 95%.

CHAPTER 4 DISCUSSION

4.1. ABOUT DESIGNING POLYEPITOPE ENCODING GENE OF EARLY PROSTATE CANCER ANTIGEN

4.1.1. Select expressing antigen epitopes instead of expressing whole antigen molecule

The link between antigens with soluble antibody or between antigens with lymphocyte always has high specificity. This specific link does not happen with the whole antigen but only for a certain part of antigen. The structural areas that have the specific link called antigen decision or epitope. The corresponding part that is binded with antigen in each antibody called paratope.

Based on the two epitope sequence EPCA-2:22,2:19 of the group Dr. Robert H Getzenberg Johns belongs to Hopkins Hospital was published in 2008, accompanying with many researches at home and abroad about the immunogenicity of recombinant antigen which is still guaranteed when the antigen has only epitopes, not the whole structure. Our research team designed the encoding gene of the early prostate cancer antigen which carries 8 repetitions of two epitope sequences EPCA-2:22 and EPCA-2:19 instead of expressing whole antigen molecule. Besides, because of unknown whole structure and amino acid sequence of EPCA-2, by not expressing the whole antigen molecules we would avoid some disadvantages that may occur due to the function in unknown parts.

4.1.2. Designation of iterations repeated epitope sequence

We intentionally designed the gene coding sequence polEPCA-2 by making from 8 consecutive repetitions of epitope sequence pairs EPCA-2:22 and EPCA-2:19. Between repeated segments is the connector segment including 3 amino acids proline (PPP). The design of repeat 8 times epitope in gene polEPCA-2 targeted to dual purpose:

Firstly, the epitope which is repeated many times will improve the ability to pair antigen with antibody. A recombinant protein molecule consists of many epitopes will be able to appear highly the epitope position to bind with the corresponding paratope on antibody.

Secondly, by repeating many times epitope recombinant protein molecule achieved size large enough to be able to be observed and

detected by electrophoresis on normal electrophoresis gel. In this study, protein polEPCA-2:22, and 2:19 with 8 times repeated reached to 23.1 kDa size (instead of 4.49 kDa if we only express once this epitope pair). With size of 23.1 kDa the created product was easily tested when electrophoresing on 12.6% polyacrylamide gel and marker protein Unstained (Fermentas).

In designing polEPCA-2 gene, we designed the connector segment between pairs of EPCA-2.22 and EPCA-2.19 as 3 consecutive prolines; it means helix structure polyprolin between repeated segments to polEPCA-2 protein has folded structure without being twisted covering the epitopes of recombinant protein molecule. Therefore, the epitope of the recombinant protein which was created by us will be easily interacts with the corresponding antibody on paratope.

4.1.3. Design gene polEPCA having recognition sequences of the cutting restriction enzymes

To cater for the cloning and expression of the polEPCA-2 gene, at two ends of the gene before the sequence of the epitopes, we designed sequences ACCATGGGG to be regconized location of cutting restriction enzymes Nco I and Not I. Similarly, at the end of the gene PopCap-2, after the epitopes sequence, we also design the sequence GCGGCCGCA as an identification location of the cutting restriction enzyme Not I.

The two cutting restriction enzymes that we choose were the only cutting enzymes in MCS position (multiple cloning site) of the vector pET-28a (+). This ensures the product after cutting mounting, manifested certainly to be polEPCA-2 as designed.

4.1.4. Create recombination vector carrying polePCA-2 gene

We used heat shocking to transform DNA plasmid into E. coli BL21 cells (DE3). The transformed cells were selected by positive selection method on agar plate containing LB environment with antibiotic Kanamycin. Each colony on antibiotic plate represent a single transformation.

Here, the reason why we use E. coli BL21 (DE3) bacteria as expression bacteria chain in the study is that E.coli BL21 (DE3) is a suitable host for both gene expression as well as protein expression when using expression vector containing promoter lac such as vector pET-28a (+).

In this study, from the colonies grown on selective environment containing antibiotic genes of the recombinant vector, we examined by PCR technique with two primers T7 F and T7 R. The result shows that the product obtained in wells 1 to 8 is a clear tape with a size equivalent to the size calculated when compared with standard marker ladder. Thus, we have successfully transformed the recombinant expression vector pET-28a (+) /polEPCA-2 in E. coli BL21 cells (DE3).

4.1.5. Express recombinant protein

4.1.5.1. Optimizing conditions for the expression of recombinant protein

The purpose of our study is producing the highest amount of recombinant protein EPCA-2 to be raw materials for purity process. So besides the culture following the process we also conducted the optimization conditions for the expression of recombinant proteins. In the study, we also surveyed the temperature factors, induction time to assess the impact of these two factors to the solubility of recombinant proteins. The results showed that the solubility of polEPCA-2 was not improved when expressed at low temperature; they exist mainly in inclusion bodies. The optimal condition for expression of polEPCA-2 was 37⁰C and induced time overnight.

4.1.5.2 Purification of recombinant proteins by Kit ProBond™ Nikel Resin

Purified to obtain the desired protein after recombination is the next step of protein technology. To obtain a large amounts of activated protein requires appropriate purification methods to existing forms of protein after recombination. Because polEPCA-2 exists mainly in the form of insoluble inclusion bodies, with the aim of obtaining active protein product after purification, we chose hybrid method to purify. By hybrid is a combine method that causes denaturation to transform insoluble protein into soluble form in the early stages, simultaneously the substance that can cause protein denaturation at a later stage, combined with washing repeatedly so protein-mounted columns can be recovery.

We used buffer DBB containing 8M urea to induce denaturation of residue cells during ultrasound process. Then wash with NWB. This step is very important because of the effect removing the substances inducing denaturation, helps protein gradually to be volute to the

conscious state or activate state. In this study, we washed by NWB with volume of about 80 mL.

Duration of the ultrasound has a crucial role to quality of purified protein products. Because if we select time off and inappropriate ultrasonic wave, it will cause overheating to protein, leading to protein irreversible denatured, and inactivate. In the study, we used Labsonic ultrasound machine with broadcast and break cycle of 30 succession seconds in total time of emitting ultrasonic wave is 20 minutes.

4.1.5.3. Test the activity of the recombinant protein

During the research process we used polEPCA-2 as an antigen to induce immunization for rabbit making antibody. Thus, if polEPCA-2 after purification is inactive, the next steps will not be valid. PolEPCA-2 activity are evaluated with anti-EPCA-2 antibody in the kit of CUSABIO. Test results obtained: the product polEPCA-2:22, 2:19 after purification has antigen activity and has concentration of 41.185 ng / mL, can be used to implement the immunization steps.

4.2. RESULTS OF PRODUCING RABBIT-SPECIFIC ANTIBODY RESISTANCE PolEPCA-2

**** Select the method to create antibody***

PolEPCA-2 continue to be used to generate specific antibody by method of induced immunization in rabbit. The reason why we choose the method of induced immunization in animals because it is a method of induced immunization that is relatively easy to be implemented and has high applicability. Simultaneously with the results of many worldwide studies that have been successfully induced immunization in the animals with the antigen was recombinant protein. The studies have shown that the biggest weakness of this method is that a large amount of antigen need to be used in the technical implementation procedures. For these reasons we decided to choose the immunization method in rabbits to produce antibody.

**** Select the process of induced immunization and the time collect appropriate antibody***

There are many different processes to induce immunization to produce antibody. In general, the result of producing antibody by immunization method in animals depends mainly on three factors: (1)

The nature of the antigen. (2) The entrances of antigen. (3) The time of acquisition antibody.

In this study we used PolEPCA-2, its nature is protein (size 210 a amine) as an antigen to induce immunization for rabbit. This structure and size of the standard antigen is a good antigen for stimulating the immune system of rabbit producing specific antibody. Our experience shows that the antigen with protein structure has potential ability to stimulates producing good antibody in both 2 immune systems: humoral immunity and cell-mediated immunity. Simultaneously, this stimulation leaves immune memory cells, so with repeated injections of antigen, the rabbit body will have reaction of immune memory and producing antibody and antigen is going to happened faster and stronger than previous injection.

We chose to conduct the induced immunization for rabbit process obeying to 4 injections regimen, the time between injections was 7 days and immunization solution was mixture recombinant polEPCA-2 combined with Freund (table 2.7). This is a good induced immunization process in order to produce antibody in rabbit at Immunology laboratory of the Department of Pathophysiology – Immunology, Hanoi Medical University. This process uses 2 entrance ways of antigen that are abdominal cavity injection and thigh intramuscular injections. These both 2 ways of injection were considered that have potential ability to induce immunization better than in intravenously or orally way, especially with antigen having protein nature.

About the time collecting antibody, we based on the theory and experience about time produced antibody of immune response process. Normally, antibody begins to be borned from the 6th day after the first contact of the antigen to the body. In the 2nd contact of the body with antigen, it takes only 10 hours to produce antigen in blood. Antibody produced reaction was increasing and antibody concentration reached the maximum at about 48-72 hours. However the concentration of antibody after the 2nd injection of inducing immunization was often not so high so it often was not quantified. Antibody concentrations usually increased significantly and could be quantitated from the 7th day to the 10th day after the 3rd repeated injections onwards. And particularly antibody concentrations will peak at the 15th day to the 20th day after the 4th injection.

So, to check and obtain antibody with the highest concentration, we examined serum antibody concentration of rabbit at the time of the 7th day after the 3rd injection, 15th and 20th day after 4th injection.

Results showed antibody resists popliCA-2 in rabbit serum at the time of day 7 after the 3rd injection is low, but it has quantitated average concentration of 28,3ng / ml (control rabbit is 8,5ng / ml). Results on the 15th day after the 4th injection was 3.5 times higher than the antibody concentration on day 7 after the 3rd injection (95,65ng / ml versus 28,3ng / ml). In particular, on day 20 after the 4th injection the antibody increased remarkably, 8.4 times higher than after the 3rd injection and 2.3 times compared to the day 15 after 4th injection (229,17ng / ml compared to 28.3 and 95,65ng / ml - Table 3.1). That rabbit antibody on 20 days after the 4th injection had peak concentration as expected. We conducted to take the entire rabbit blood, obtained maximum amount of serum that total rabbit antiserum was 330 ml, the concentration of antibody generated is 229,17ng / ml. Plasma was immediately lyophilized to limit the reduction of antibody titer.

4.3. RESULTS DETERMINATION OF SERUM EPCA-2 STUDY OF 3 GROUPS

Rabbit serum with specific antibody anti two epitope EPCA-2:22 and 2:19 which are tested identified activity with antigen controlling with antibody in the kit determined EPCA-2 of CUSABIO which we used in ELISA technique to determine antigen in serum samples of 3 study groups were: 40 patients with prostate cancer, 40 patients with benign prostatic hypertrophic tumor and 30 negative control serum samples of normal men who are at the same age group with two prostate patient groups.

4.3.1. Some information of 2 prostate patient groups.

4.3.1.1. Information on age

In our study with 110 samples the minimum age was 55 and the oldest was 101. Both two groups with prostate cancer and benign prostate hypertrophic tumor (BPHT) have the highest susceptible age range from 76 to 85. In the group of prostate cancer the incidence in this age group was 55% and in the BPHT group is 45%. The lowest

incidence rate of these two groups was under 60 years old. There was no patient aged under 60 in prostate cancer group and in BPHT group there were 2 patients aged under 60 (5%)(Figure 3.5). Our result is equivalent to the result of Nguyen Thi Phuong Ngoc 's study on 1270 men aged over 50, it also showed that the lowest age of the prostate patients was 50, the highest was 89 and highest age of BPHT patients in the study of Thi Phuong Ngoc were over 70.

4.3.1.2. PSA index

PSA is a protein that was produced by prostate cells. Typically only a very small amount of PSA could escape into the circulation. In prostate cancer, histological structure is disrupted; PSA is secreted directly into the interstitial space, goes straight into the circulatory system. Therefore, in prostate cancer, serum PSA concentration often increases up to 10 times compared with benign proliferative glandular tissue. However according to the studies of Thompson, Catalon, Do Khanh Hy and Hoang Thi Phuong, PSA concentrations increased is not a cardinal sign of prostate cancer by PSA can increased in BPHT, inflammation, or after the prostate examination procedure In our study the tPSA mean value of the prostate cancer group was 1.4 times higher than benign prostatic hypertrophic tumor group, and approximately 28 times in normal male group. If only two groups of prostate patients are considered separately, the results showed that both groups of prostate cancer and benign prostatic hypertrophic tumor there are patients at all levels of tPSA from lower than 4ng / ml to over 30 ng / ml. However, the highest percentage in the prostate cancer group are patients of tPSA levels > 30 ng / ml (30%) while the highest percentage of BPHT group at concentration of 4-20 ng / ml (55%). Our results are also consistent with studies of Thomson and Catalon that said there is a significant increase of the PSA index in patients with prostate cancer, but there were prostate cancer patients who have no increase in serum PSA.

4.3.2. Results determining EPCA-2 in serum of patient with prostate cancer by a rabbit antibody controlled with commercial kit

EPCA-2 is the specific biomarker of prostate cancer. Two epitopes EPCA-2:22, 2:19 have proven that appearing early and being popular in the serum of patients with prostate cancer. Using specific antibody to determine EPCA-2 not only allows us to identify the disease, but also can diagnose stage of disease. In this study, we used specific antibody resisted to EPCA-2.22,2.19 which we have created to determine concentration of antigen in serum of 3 research groups. The result is controlled to the results of the determination of the EPCA-2 of Kit ELISA (CUSABIO, codes CSB - EQ 027679HU). EPCA-2 concentrations of the two ELISA methods was quantitated based on the baseline curve of kit ELISA.

The baseline curve of kit ELISA was built based on 5 concentration points with $r^2 = 0.986$ roughly equivalent to 1 showed that it is a reliable baseline curve to infer the concentration of the measured results.

Results determined EPCA-2 concentration of both 2 ELISA-methods in our study have confirmed the presence of EPCA-2 100% in the serum of prostate cancer patients. Simultaneously the majority were high EPCA-2 concentrations that range from 100ng /ml to 400 ng / ml. The number of patients at this concentration level was 28/40 patients with results determined by kit ELISA, and 30/40 patients with results determined by rabbit specific antibody. Simultaneously, the results in our study are similar to the results of commercial kit in detecting there were prostate cancer patients with EPCA-2 concentration at the lowest detectable level(12,5ng / ml). Positive values obtained in our study are high because when selecting the samples for disease group, we selected patients who definitely have prostate cancer. Because all patients had fully positive results with prostate cancer by method of immunohistochemistry staining multiple slices (8 to 10 slices) in the tumor after surgery from two central pathology of Friendship Hospital and Vietnam- Germany Hospital. This result confirms not only the specific value of new biomarkers EPCA-2, but also the best application - value of specific antibody anti EPCA-2 in the diagnosis of prostate cancer. To compare the value of the detectable concentration of EPCA-2 of two ELISA- methods. We calculated the mean value of EPCA-2 concentration in 40 serum samples of prostate cancer patients that were determined parallel by 2

ELISA- methods (ELISA- method using rabbit antibody compare with the ELISA- method using kit commercial ELISA). Results showed that the mean value of EPCA- 2 concentration was detected by kit ELISA was higher than results were detected by rabbit antibody. The mean value and the variance of the results from two ELISA-methods respectively are 279.8974 ± 172.1579 compared to 208.658 ± 136.651 .

4.3.3. Results determine EPCA-2 in serum of patients with benign prostatic hypertrophic tumor and normal male by 2 ELISA - methods

To further confirm the results of the research, we selected two control groups for the study they were: group of BPHT patients, and group of normal men having the same age with the research group.

The reason why we chose group of BPHT patients is that by the fact that currently the tests are difficult in differential diagnosis of prostate cancer and BPHT. The patients were only selected in our research group when histopathological results with staining HE were negative for prostate cancer on the tissue after removal surgery of the prostate gland.

The results were quite similar in both 2 ELISA methods that 38/40 patients of BPHT group have no EPCA-2 in serum . This result showed that appearing EPCA-2 is specific for prostate cancer. The reason for the almost absolute results obtained from both 2 ELISA-methods determined EPCA-2 here is because we chose the gold standard in diagnosing prostate patients and that histopathology results is the reference basis for our study. This has helped increasing the reliability of the research results. Our research results are also consistent with the studies of Hansel (2009) and Barbara (2005) about the value of EPCA-2 in diagnosing prostate cancer.

We used the serum of 30 normal men which do not have the clinical manifestations of the prostate disease, no other cancer diseases, with the same age with two groups of prostate patients for negative control. The results from both ELISA methods indicate 100% serum samples of negative control group did not have the presence of EPCA- 2. This result once again confirms the high specificity of EPCA-2 with prostate cancer as well as good specificity value of test determined EPCA-2 by rabbit specific antibody anti EPCA-2:22, 2:19.

Our research results are also consistent with the measurement of the EPCA-2 concentration in Getzenberg's study that conducted in 330 men, it found that the results of the EPCA-2 test were negative in

97% of the men without prostate cancer. It is consistent with the results in another study using ELISA to quantitate serum EPCA of prostate cancer patients. The results obtained in this study: the test's sensitivity was 92%, the specificity was 94%. The specificity of the healthy group was 100%. Currently, the use of both EPCA-2 and tPSA to diagnose prostate cancer screening.

4.3.4. Compare the sensitivity, specificity of 2 ELISA methods using rabbit specific antibody anti EPCA-2.22,2.19 with antibody in the kit determined EPCA-2 of CUSABIO

To consolidate data for diagnostic value of ELISA method using rabbit specific antibody anti EPCA-2, we conducted testing the sensitivity and specificity of the technique. With the results that EPCA-2 was positive in 100% serum samples of prostate cancer patients, it showed that the sensitivity of the technical is 100%. Simultaneously, this method also has results EPCA-2 negative in 38/40 serum samples of patients with benign prostatic hypertrophic tumor that equivalent specificity of 95%.

The sensitivity and specificity of ELISA method using rabbit specific antibodies anti EPCA-2 in our study were completely homologous with the sensitivity and specificity of commercial kit determine EPCA-2 of Cusabio.

This sensitivity and specificity were also consistent with the results of Barbara when using ELISA technique study in 385 male serum samples that obtained the results of a sensitivity and specificity, respectively 92% and 94%.

CONCLUSIONS

1. We have been successful recombinant EPCA-2.22,2.19 polyepitpe activity with specific antibody.

2. By the process of induced immunization in rabbit, the project has successfully created rabbit specific antibody for EPCA-2 (with a total amount of serum rabbit obtained was 330ml and antibody concentration was 229,17ng / ml).

3. Rabbit antibody which was created in our project has been applied initially in the ELISA sandwich technique identified EPCA-2 in prostate cancer patients. Results showed that the determination of EPCA-2 by rabbit antibody has result equivalent with commercial kit of CUSABIO.

4. The antibody obtained in the project may continue to be completed and used for creating kit determinate EPCA-2.

PUBLISHED SCIENTIFIC WORKS RELATED TO THESIS

1. Dam Thi Tu Anh, Phan Mai Hoa, Ngo Thi Thu Hien, Le Minh Phuc (2013), The create rabbit specific antibody of early prostate cancer antigen 2 (EPCA-2), *Vietnam Medical Journal*.
2. Dam Thi Tu Anh, Phan Mai Hoa, Le Quang Huan, Pham Thien Ngoc (2014), Determination of early prostate cancer antigen (EPCA-2) in the serum of prostate cancer patients , *Juornal of clinical medicine..*
3. Ngo Thi Thu Hien, Đam Thi Tu Anh, Le Thi Minh Phuc, Pham Thien Ngoc, Le Quang Huan (2014), Expression of gene encoding for polyepitope of early prostate cancer antigen (EPCA-2) in Escherichia coli, *Journal of clinical medicine*.
4. Second Prize Conference Science Fellows.