



Tạp chí Khoa học và Kinh tế Phát triển
Trường Đại học Nam Cần Thơ

Website: jsde.nctu.edu.vn



Phương pháp đánh giá gắn kết giữa hoạt chất và đích tác động trên Interleukin 21

Nguyễn Ngọc Lê^{1*}, Trần Quang Đệ^{2,3}, Nguyễn Cường Quốc^{2,3}

¹Khoa Dược, Trường Đại học Nam Cần Thơ

²Bộ môn Hoá học, Khoa Khoa học Tự nhiên, Đại học Cần Thơ

³Phòng thí nghiệm Kỹ thuật phân tích (1.16/ATL), Toà nhà Công nghệ cao, Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm bài viết: Nguyễn Ngọc Lê (email: nnle@nctu.edu.vn)

Ngày nhận bài: 25/11/2023

Ngày phản biện: 10/12/2023

Ngày duyệt đăng: 10/1/2024

Title: Method to evaluate the binding between active ingredients and targets acting on Interleukin 21

Keywords: drug targeting, immune-related diseases, interleukin 21

Từ khóa: bệnh, interleukin 21, miễn dịch, mục tiêu tác động,

ABSTRACT

Research on drugs targeting Interleukin 21 (IL-21) is a pivotal focus in contemporary medical studies. IL-21, a key immune system cytokine, is under scrutiny for its regulatory role in immune responses. Studies aimed to develop drugs that interact with IL-21 to open new avenues for treating immune-related diseases, including inflammation, autoimmune disorders, and cancer. The goal was to enhance our understanding and devise innovative treatments by leveraging the influence of drugs on IL-21.

TÓM TẮT

Nghiên cứu về tác động của thuốc lên Interleukin 21 (IL-21) là một hướng nghiên cứu quan trọng trong y học hiện đại. Cytokine này, đặc trưng trong hệ thống miễn dịch, đang là trọng tâm của các nghiên cứu nhằm phát triển các loại thuốc mới có thể điều trị các bệnh liên quan đến miễn dịch. Nghiên cứu tập trung vào việc hiểu rõ cơ chế hoạt động của IL-21 và cách thuốc có thể tương tác với nó để điều chỉnh phản ứng miễn dịch. Thông tin từ nghiên cứu này có thể giúp định rõ mục tiêu cho các phương pháp điều trị mới và mở rộng kiến thức về mối quan hệ giữa IL-21 và sức khỏe miễn dịch.

1. GIỚI THIỆU

Tương tác phối tử - thụ thể hay tương tác protein – protein đóng một vai trò cơ bản trong quá trình khám phá và phát triển thuốc. Một số phương pháp đánh giá đã

được phát triển nhằm mô tả đặc điểm và việc phát hiện những thông tin về các tương tác này có thể dẫn đến việc lựa chọn các phân tử tiềm năng và cuối cùng là phát triển thành các thuốc mới.

Interleukin 21 (IL-21) là một protein mới thuộc họ cytokin loại 1, thụ thể của nó là IL-21R. IL-21 có vai trò điều hoà miễn dịch toàn thân bao gồm điều hoà sự phát triển, biệt hoá và chức năng của các tế bào lymphoid-myeloid [1]. Cụ thể hơn, IL-21 điều hoà các chức năng tác động của các tế bào T, tế bào B và tế bào NK (tế bào tiêu diệt tự nhiên), không chỉ có vai trò quan trọng trong miễn dịch kháng ung thư và kháng virus mà còn có tác dụng đối với các phản ứng viêm, thúc đẩy sự phát triển của các bệnh tự miễn [2].

Trong các nghiên cứu gần đây cho thấy, interleukin-21 (IL-21) góp phần vào bệnh sinh của các bệnh viêm mạn tính và bệnh tự miễn vì đặc tính gây viêm và trung gian miễn dịch của nó. Ngoài ra, đã có bằng chứng cho thấy sự ức chế con đường IL-21/IL-21R sẽ cải thiện bệnh ở các mô hình động vật bị RA và ức chế đáng kể sản xuất cytokin gây viêm trong ống nghiệm. Với việc nghiên cứu sàng lọc các thuốc phân tử nhỏ ức chế hoạt tính của IL-21, thì sự hiểu biết về các phương pháp đánh giá khả năng gắn kết của hoạt chất với thụ thể IL-21R là hết sức cần thiết. Những thông tin được trình bày trong bài tiểu luận này sẽ là cơ sở giúp chúng tôi xây dựng quy trình cho các thử nghiệm đánh giá khả năng gắn kết của các thuốc phân tử nhỏ trên đích tác động là IL-21/IL-21R mà chúng tôi đang thực hiện.

2. PHƯƠNG PHÁP

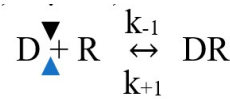
Bản chất của sự gắn kết gắn kết giữa hoạt chất và đích tác động là sự tương tác giữa protein với protein. Tương tác protein-protein (PPI) tham gia vào tất cả các quá trình sinh học quan trọng trong cơ thể sống, chẳng hạn như xúc tác các phản ứng trao đổi chất, sao chép ADN, phiên mã ADN, đáp ứng các kích thích vận chuyển các phân tử từ vị trí này sang vị trí

khác, hoặc sự gắn kết giữa phối tử (ligand) vào thụ thể (receptor) tương ứng. Các phương pháp đánh giá PPI được áp dụng trong rất nhiều lĩnh vực khác nhau, mà trong đó lĩnh vực dược học đặc biệt là việc khám phá và phát triển thuốc mới là một ví dụ điển hình. Bằng việc áp dụng các phương pháp đánh giá này có thể giúp quá trình tìm kiếm và phát triển tối ưu hơn khi tiết kiệm được rất nhiều thời gian và kinh phí mà vẫn có thể xác định được các thông số bao gồm ái lực gắn kết, động học, nhiệt động lực học và cấu dạng gắn kết với sự phát triển của các thiết bị và công nghệ [3].

2.1 Đại cương về định lượng tương tác giữa phối tử với thụ thể (protein-protein)

2.1.1 Động học của sự tương tác giữa hoạt chất và đích tác động

Các phương trình tốc độ đơn giản mô tả sự tương tác giữa hai phân tử bất kỳ hay cụ thể là giữa hoạt chất (ligand, phối tử, D) và đích tác động (receptor, thụ thể, R) có thể được biểu diễn theo phương trình sau:



Trong đó k_{+1} hay k_{on} hoặc K_A được gọi là hằng số tốc độ kết hợp, có đơn vị là $M^{-1}.s^{-1}$. Giá trị k_{-1} hay k_{off} hoặc K_D là hằng số tốc độ phân ly, có đơn vị là s^{-1} . Và các giá trị $[D]$, $[R]$, $[DR]$ lần lượt là nồng độ mol/L của hoạt chất, đích tác động và phức hợp gắn kết giữa hoạt chất-đích tác động.

Ở trạng thái cân bằng, cả hai phản ứng kết hợp và phân ly xảy ra với tốc độ như nhau, do đó ta có phương trình:

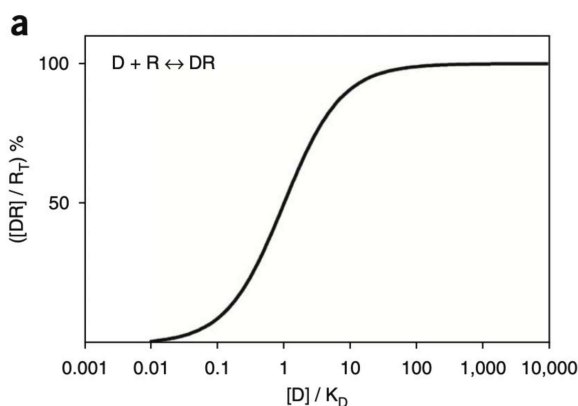
$$D + R \leftrightarrow DR$$

$$k_{+1}[D][R] = k_{-1}[DR]$$

$$K_A = \frac{k_{+1}}{k_{-1}} = \frac{[DR]}{[D][R]} \rightarrow K_D = \frac{[D][R]}{[DR]} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

Giá trị K_D có đơn vị là M, được ưu tiên lựa chọn đánh giá ái lực (sức mạnh) của sự tương tác giữa hoạt chất và đích tác động vì dễ xác định hơn và không làm xáo trộn trạng thái cân bằng, cũng như bị ảnh hưởng bởi nồng độ của hoạt chất và phối tử.

Từ phương trình cho thấy giá trị K_D nhỏ thì phức hợp giữa hoạt chất và đích tác động sẽ thể hiện ái lực gắn kết cao và ngược lại.



Hình 1. Sự thay đổi giá trị K_D trong tương tác giữa hoạt chất và đích tác động

2.1.2 Nhiệt động lực học của sự tương tác giữa hoạt chất và đích tác động

Giá trị K_D cung cấp thước đo về sự tương tác giữa hoạt chất và đích tác động, đồng thời cũng giúp dự đoán mối liên hệ của tương tác này sẽ thay đổi như thế nào khi nồng độ của hoạt chất hoặc đích tác động thay đổi. Giá trị K_D có thể được giải thích thêm từ góc độ của nhiệt động lực học với sự đóng góp của giá trị tổng entanpy (ΔH^0) và entropy ($T\Delta S^0$) thông qua giá trị năng lượng tự do liên kết Gibbs (ΔG^0). Sự gắn kết chỉ có thể xảy ra khi năng lượng tự do liên kết Gibbs có giá trị âm, ta có phương trình: $\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$.

Ngoài ra, hằng số phân lý ở trạng thái cân bằng có liên quan đến năng lượng tự do liên kết theo công thức sau:

$$K_D = e^{\frac{\Delta G^0}{R.T}} \text{ hay } \Delta G^0 = R.T. \ln K_D$$

Trong đó, R là hằng số khí lý tưởng, T là nhiệt độ tuyệt đối. Giá trị năng lượng tự do ΔG^0 thường đường quan tâm cải thiện làm giảm nhằm tối ưu hoá hoạt chất trong quá trình nghiên cứu, tìm kiếm và phát triển thuốc mới [4].

2.2 Phân loại các phương pháp đánh giá sự gắn kết giữa hoạt chất và đích tác động

Nội dung xem Bảng 1.

2.3 Ứng dụng của các phương pháp đánh giá sự gắn kết giữa hoạt chất và đích tác động trong khám phá thuốc mới

Khám phá thuốc là một quá trình lâu dài, tốn kém và đầy thử thách, từ việc xác định được mục tiêu đến tối ưu hoá các chất tiềm năng, thử nghiệm tiền lâm sàng và thử nghiệm lâm sàng. Sự gắn kết với protein đích tác động từ lâu đã được công nhận là chìa khóa cho các hoạt động sinh lý của các phân tử thuốc. Với những tiến bộ trong công nghệ đã xuất hiện rất nhiều phương pháp lý sinh thực nghiệm và tính toán để xác định mọi khía cạnh quan trọng của tương tác giữa thuốc và mục tiêu tác động, bắt đầu từ cấu trúc đến ái lực, động học và nhiệt động lực học. Những thông tin bổ sung như vậy đã và sẽ tiếp tục đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao hiệu quả của quá trình khám phá và phát triển mới.

Khả năng đánh giá tương tác giữa thuốc và mục tiêu có thể được đánh giá bằng cách sử dụng các kỹ thuật liên kết phối tử dựa trên cấu trúc bao gồm X-quang, NMR, và *insilico*. Các phương pháp tiếp cận dựa trên cấu trúc này có thể cung cấp dữ liệu cấu trúc có độ phân giải cao cho phép các định các tương tác và hình học liên phân tử được ưa chuộng, do đó cung cấp nhiều thông tin có thể khai thác để hợp lý hoá nhận dạng phân tử và phát triển các công cụ dự đoán cho thiết kế thuốc. Sàng lọc phân đoạn NMR có thể hữu ích để xác định các vị trí thuốc

có thể tác động trên các mục tiêu đã biết. Do độ nhạy phát hiện đơn phân tử của nó, cảm biến sinh học chế độ có thể được sử dụng để nhận dạng dấu ấn sinh học.

2.4 Đích tác động Interleukin-21 và thụ thể Interleukin-21

2.4.1 Interleukin-21

Interleukin 21 (IL-21) là một cytokin được phát hiện gần đây có tác dụng toàn thân trên hệ thống miễn dịch mới bắt đầu được nghiên cứu. Gen IL-21 nằm trên nhiễm sắc thể của người đoạn 4q26-q27 và được mã hóa một protein gồm 162 acid amin và xấp xỉ 180kb từ gen IL-2. Các quy tắc phân cắt bằng peptidase dự đoán từ tín hiệu sau vị trí Gly 31. IL-21 được bảo tồn giữa các loài với hơn 57% trình tự nhận dạng giữa chuột và người [5].



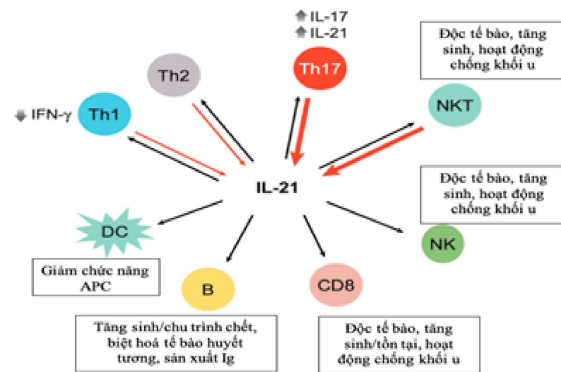
Hình 2. Cấu trúc Interleukin-21 ở người

(Nguồn: <https://www.rcsb.org/structure/2oqp>)

2.4.2 Sinh tổng hợp Interleukin-21

IL-21 là cytokin loại 1 có cấu trúc bốn vòng xoắn được sắp xếp theo cấu trúc liên kết lên-xuống-xuống điển hình [6]. IL-21 được tiết ra từ các tế bào T CD4, đặc biệt là các tế bào trợ giúp như tế bào nang TH17 và tế bào T, cũng như các tế bào NK theo cơ chế chuyển tiếp. Ngoài ra, IL-21 hợp tác với các cytokin khác để tăng

độ tính tế bào của tế bào T CD8 và thúc đẩy sự tăng sinh của tế bào CD8 khi có kháng nguyên. Các nghiên cứu gần đây chỉ ra rằng IL-21 được sản xuất bởi tế bào CD4 là rất quan trọng đối với khả năng của tế bào T CD8 trong việc kiểm soát sự lây nhiễm virus [7].

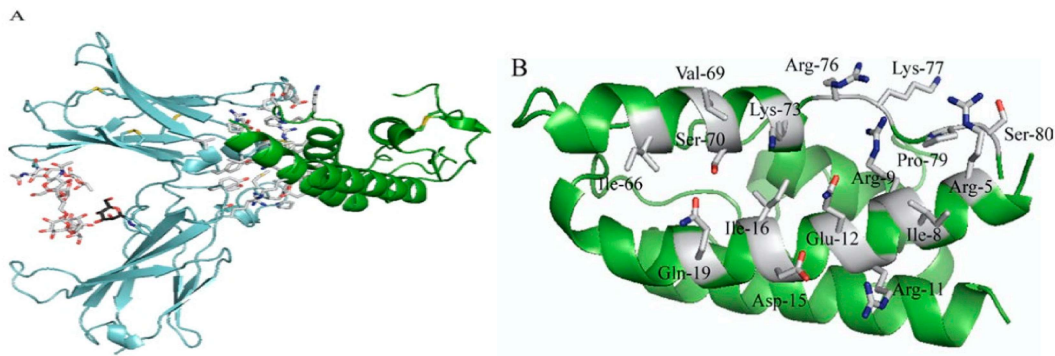


Hình 3. Sinh tổng hợp IL-21

(Nguồn: <https://www.annualreviews.org>)

2.4.3 Thụ thể của Interleukin-21

Thụ thể IL-21R được phát hiện vào năm 2000, được xem là một thụ thể hiếm, lần đầu tiên được ký hiệu là NILR cho thụ thể IL mới và bây giờ là IL-21R. IL-21 được nhân bản làm phôi tử cho thụ thể mới này và lần đầu tiên được sử dụng để sản xuất bởi các tế bào T CD4 có chức năng điều chỉnh sự tăng sinh và chức năng hiệu ứng của các tế bào lympho khác. IL-21R lần đầu tiên được giải trình tự gen và cDNA cho thấy sự mã hoá bởi một khung tương đối như cytokin-1 [8]. Trình tự acid amin của IL-21R có liên quan nhiều đến β, và giống như IL-2Rβ. Ngoài ra, IL-21R nằm ngay phía dưới IL-4Rα trên nhiễm sắc thể 16 của người. Thụ thể chức năng là cho IL-21 là IL-21R + γc [9].

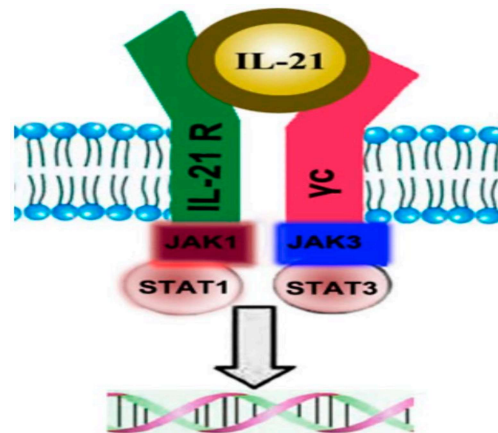


Hình 4. Mô tả cấu trúc phân tử IL-21R (A) và IL-21 (B)

(Nguồn: Protein Data Bank file (code 3TGX))

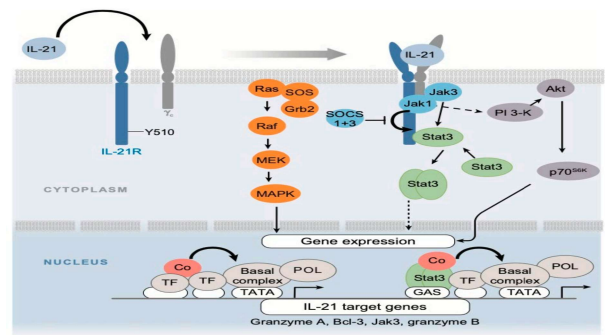
2.4.4 Sự tương tác giữa Interleukin-21 và thụ thể Interleukin-21R

Cũng giống như các thành viên khác trong họ cytokin-1, IL-21 tác động bằng cách gắn vào thụ thể IL-21R và thụ thể cytokin γ c thông qua con đường Jak-STAT. Cụ thể, khi gắn vào thụ thể cytokin γ c IL-21 sẽ kích hoạt Janus tyrosin kinase 3 (Jak3) và Jak1 sẽ được kích hoạt khi IL-21 gắn với IL-21R [12]. Hình 7 cho thấy rõ hơn sự liên kết của IL-21 với IL-21R và chuỗi γ c. Khi liên kết IL-21, Jak1 và Jak3 tương tác với IL-21R và γ c sẽ kích hoạt và phosphoryl hoá mạnh trên STAT 3 và STAT 1 và phosphoryl hoá yếu trên STAT5. Điều này dẫn đến sự đồng phân hoá các STAT và chuyển vị vào nhân, sau đó liên kết với các yếu tố điều hoà ở gen mục tiêu. Một tyrosin quan trọng trong miền tế bào chất là IL-21R (Y510) chịu trách nhiệm chính trong việc gắn STAT 1 và STAT 3. Ngoài ra, liên kết IL-21 với IL-21R có thể dẫn đến kích hoạt các con đường MAP kinase (MAPK) và PI 3-kinase (PI 3-K). Các gen mục tiêu được kích hoạt bởi IL-21 đã được xác định, nhưng sự tham gia của từng con đường trong quá trình điều hòa các gen này vẫn chưa được xác định [10].



Hình 5. IL-21 gắn với IL-21R và thụ thể cytokin γ c

(Nguồn: Mol Biol Rep (2011) 38:1717–1721)



Hình 6. Các đường dẫn truyền tín hiệu của IL-21

(Nguồn: <https://www.annualreviews.org/>)

2.4.5 Vai trò sinh học của Interleukin-21

Vai trò và chức năng của IL-21 trong cơ thể là có thể điều hoà một cách mạnh mẽ các đáp ứng miễn dịch bẩm sinh hoặc do tác nhân từ bên

ngoài trong các trường hợp rối loạn tự miễn dịch và dị ứng [10]. Cụ thể, IL-21 hoạt động điều hoà sự phát triển, biệt hoá và chức năng của các tế bào lymphoid-myeloid, bằng cách IL-21 sẽ điều hoà các chức năng của tế bào T, B, và NK. Không những có vai trò quan trọng trong miễn dịch kháng dị ứng và kháng virus mà còn có tác dụng chính đối với các phản ứng viêm, thúc đẩy sự phát triển của các bệnh tự miễn dịch. Các nghiên cứu gần đây đã cho thấy vai trò bất ngờ của IL-21 trong điều hoà miễn dịch. Hiện nay, IL-21 được xem là đích tác động tiềm năng trong điều trị các bệnh liên quan đến miễn dịch, dị ứng, ung thư và nhiễm virus (HIV) [8].

2.4.6 Các thuốc ức chế hoạt tính của Interleukin-21

Các cytokin đóng vai trò quan trọng đối với hệ miễn dịch của cơ thể, có vai trò điều hoà nhiều quá trình như tăng sinh, phát triển, biệt hóa và chu trình chết của tế bào và biệt hóa các tế bào miễn dịch. IL là một nhóm cytokin với hơn 40 thành viên có vai trò khác nhau trong phản ứng miễn dịch của cơ thể. Hiện nay, đã có các thuốc ức chế IL-1, IL-2, IL-5, IL-6, IL-17, IL-16 và IL-23. Các thuốc này có thể chia thành hai loại là kháng thể đơn dòng (protein tái tổ hợp) và thuốc phân tử nhỏ. Tuy nhiên, hầu hết các thuốc hiện có đều có cấu trúc protein. Các thuốc ức chế các loại interleukin trên thị trường cùng có cấu trúc là protein tái tổ hợp kèm cơ chế tác động và chỉ định được trình bày tại Bảng 4.

Hiện nay, chưa có thuốc ức chế IL-21 nào được chấp thuận mà chỉ có các bằng sáng chế được đăng ký cho chất ức chế IL-21, nhưng lại là các thuốc sinh học. Cụ thể, đó là hỗn hợp protein dung hợp gồm các thụ thể như IL-21R, IL-21R.Fc được tạo ra bằng kỹ thuật tái tổ hợp. Khi dùng dung hợp IL-21R.Fc trên chuột MRL-Fas^{lpr} cho thấy kết quả làm giảm cả hai loại tế bào lympho T trong lá lách và góp phần làm giảm bệnh tật [11]. Ngoài ra, trên những con chuột MRL-Fas^{lpr} được điều trị 10 tuần với IL-21R.Fc đã giảm protein niệu, ít lắng đọng IgG hơn ở cầu thận, không dày màng đáy cầu thận, giảm nồng độ tự kháng thể dsDNA lưu hành và tổng số huyết thanh IgG1 và IgG2a, đồng thời cũng giảm tổn thương da và nổi hạch so với nhóm chứng [12].

3. KẾT QUẢ

3.1 Phương pháp nhuộm huỳnh quang miễn dịch

Năm 2019 Linnebacher và các cộng sự đã có báo cáo về tương tác giữa interleukin 21 và thụ thể IL-21R có liên quan đến sự tiến triển của bệnh trong ung thư tuyến tụy. Ung thư biểu mô tuyến tụy (PDAC) biểu hiện viêm xơ rõ rệt ở môi trường vi mô trong đó các tế bào miễn dịch xâm nhập không thể loại bỏ các tế bào khối u và thường thúc đẩy sự phát triển của khối u. Một quan tâm đặc biệt là các tế bào T thúc đẩy khối u có kiểu hình giống Th17 vì sự hiện diện của các tế bào này trong mô PDAC có liên quan đến tiên lượng xấu.

Bảng 1. Phân loại các phương pháp đánh giá sự gắn kết giữa hoạt chất và đích tác động

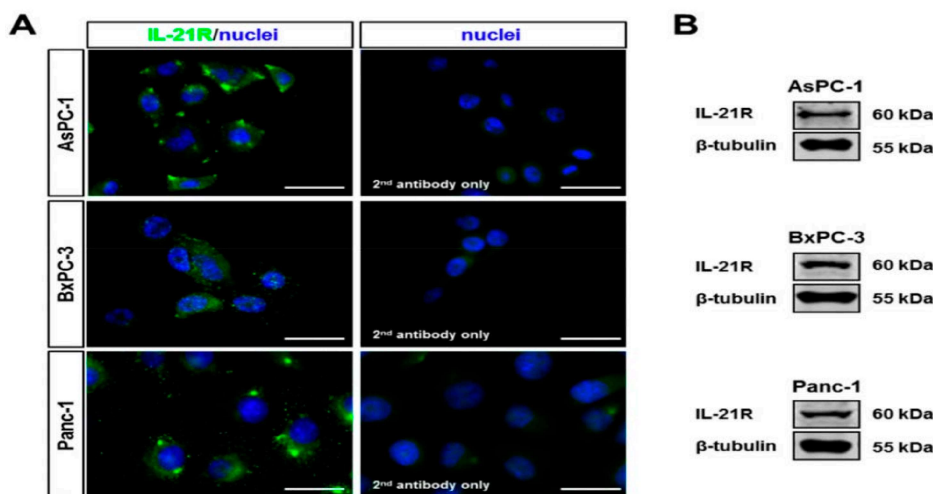
Các phương pháp đánh dấu	Phương pháp phóng xạ	PP thụ thể phóng xạ (Radioreceptor assay-RRA) PP phối tử phóng xạ (Radioligand binding assay-RLA) PP thử nghiệm lân cận nhấp nháy (Scintillation Proximity assay-SPA)
	Phương pháp huỳnh quang	PP phân cực huỳnh quang (Fluorescence Polarization-FP) PP truyền năng lượng cộng hưởng huỳnh quang (Fluorescence Resonance Energy Transfer-FRET)

		PP truyền năng lượng cộng hưởng phát quang (Bioluminescence Resonance Energy Transfer-BRET)
		PP đo huỳnh quang vi lượng (Fluorometric microvolume assay technology-FMAT)
		Phương pháp ALPHAScreen™
		Phương pháp Flow cytometry
		PP quang phổ tương quan huỳnh quang (Fluorescence correlation spectroscopy-FSC)
		PP Time-Resolved Fluorescence (TRF)
		PP Homogeneous Time-Resolved Fluorescence (HTRF)
Các phương pháp đánh dấu	Phương pháp phân tích đẳng nhiệt	PP chuẩn độ nhiệt lượng đẳng nhiệt (Isothermal Titration Calorimetry-ITC)
		PP đo lường sự thay đổi nhiệt (Thermal Shift Assay-TSA)
Các phương pháp khác	Phương pháp sử dụng chip sinh học	PP cộng hưởng bề plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance-SPR)
		PP giao thoa kế lớp sinh học (Biolayer Interferometry-BLI)
		PP Resonant waveguide grating (RWG)
		PP Whispering gallery microresonators (WGM)
		PP Backscattering interferometry (BSI)
		Sắc ký ái lực
		Khối phổ chọn lọc ái lực
		Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Trong bối cảnh đó, vai trò của IL-21, một cytokine chính được giải phóng bởi các tế bào giống Th17, đã được đánh giá. Trong tất cả các mẫu mô (n=264), các tế bào miễn dịch IL-21+ được phát hiện bằng hoá mô miễn dịch và mật độ cao của các tế bào có liên quan đến tiên lượng xấu. Ở phần lớn các bệnh nhân (221/264), các tế bào khối u biểu hiện thụ thể cho IL-21 là IL-21R và cũng là mục tiêu đánh giá gắn kết [13].

Trong nghiên cứu này tác giả đã sử dụng phương pháp nhuộm huỳnh quang miễn dịch để đánh giá IL-21R. Cụ thể là các tế bào tuyến tụy

(50 x 10³/500 μL) đã được gieo vào Lab-Tek®Chamber Slides (Thermo Fisher). Sau 24 giờ, các tế bào được cố định với 2% PFA và được ủ với kháng thể IL-21R của thỏ (NBP1-76739; Novus Biologicals) ở 4°C qua đêm. Là một kháng thể thứ cấp, kháng thể của thỏ được kết hợp với Alexa 488 (Dianova, Jackson, Hamburg, Đức) đã được sử dụng. Các phiên kính được gắn với một lớp phủ bằng cách sử dụng ProLong®Diamond Antifade Mountant với DAP (Thermo Fisher) và được xem bằng kính hiển vi kỹ thuật số (Keyence, Neu-Isenburg, Đức) [13].



Hình 9. Biểu hiện IL-21R trong các dòng tế bào PDAC của người

Các dòng tế bào PDAC của người chưa được xử lý AsPC-1, BxPC-3 và Panc-1 đã được kiểm tra biểu hiện IL-21R trong hình 9A có nhuộm màu miễn dịch huỳnh quang (trái: tế bào IL-21R+, phải: chỉ IgG kháng thể Alexa 488; nhân: DAPI (xanh dương), IL-21R: Alexa 488 (xanh lá cây) và hình 9B là các vết. Thanh màu trắng là 20 μm .

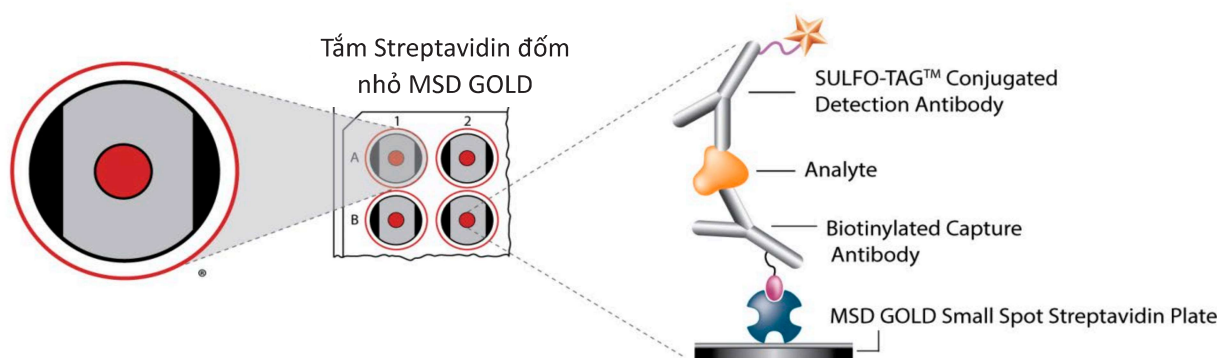
3.2 Bộ xét nghiệm IL-21 của chuột U-PLEX

3.2.1 Giới thiệu

Nền tảng MSD U-Plex kết hợp độ nhạy cao và thời gian đọc kết quả nhanh (thường dưới 2 phút) với tính linh hoạt để dễ dàng thiết kế và xây dựng các xét nghiệm tùy chỉnh cũng như

chuyển đổi hiệu quả từ xét nghiệm đơn phức hợp đến xét nghiệm ghép kênh. Xét nghiệm đơn phức hợp U-Plex có độ nhạy cao, cung cấp tới 5 bản ghi dãy hoạt động tuyến tính và sử dụng thể tích mẫu tối thiểu [14].

Dấu ấn sinh học U-Plex nhóm 1 (chuột) chứa 50 phân tích được thể hiện ở bảng 5 rất quan trọng trong nhiều quá trình sinh học. Tập hợp dữ liệu đại diện cho từng xét nghiệm trong U-Plex Biomaker được trình bày trong bảng dữ liệu dành riêng cho từng sản phẩm tại https://www.mesoscale.com/en/support/product_information/search_data_sheets



Hình 10. Xét nghiệm U-Plex Singleplex trên đĩa Streptavidin Spot nhỏ MSD GOLD với 96 giếng. Xét nghiệm 384 giếng cũng tương tự



Hình 11. Các giai đoạn xây dựng U-Plex

Bảng 2. Các phân tích trong U-Plex Biomarker nhóm 1 (chuột)

Assays				
6CKine/Ccl21	IL-1 β	IL-15	IL-27p28/IL-30	MIP-2 (Cxcl2)
BAFF	IL-2	IL-16	IL-31	MIP-3 α (Ccl20)
BCA-1/BLC	IL-4	IL-17A	IL-33	MMP-9 (total)
CD40	IL-5	IL-17A/F	IP-10 (Cxcl10)	NGAL/LCN2
Eotaxin (Ccl11)	IL-6	IL-17C	KC/GRO	RANTES (Ccl5)
EPO	IL-9	IL-17E	MCP-1 (Ccl2)	SDF-1 α (Cxcl12)
GM-CSF (Csf3)	IL-10	IL-17F	MCP-5 (Ccl12)	TARC (Ccl17)
IFN- α	IL-12/IL-23p40	IL-21	MDC (Ccl22)	TNF- α
IFN- β	IL-12p70	IL-22	MIP-1 α (Ccl3)	TNF-R1
IFN- γ	IL-13	IL-23	MIP-1 β (Ccl4)	VEGF-A

Bảng 3. Bảng dữ liệu các loại U-Plex xét nghiệm IL-21 của chuột

Tuỳ chọn	Mã số sản phẩm	Miêu tả
Ghép kênh	K15069M, K25069M	U-Plex Biomarker Nhóm 1 (ms)
	K152ACM, K252ACM	U-Plex Metabolic Nhóm 1 (ms)
	K152WBK-1/-2/-4	Thử nghiệm IL-21 của chuột U-Plex với các tấm SECTOR™
Dạng đơn	K152WBK-21/-22/-24	Thử nghiệm IL-21 của chuột U-Plex với các tấm QuickPlex®
	K252WBK-2/-4	Thử nghiệm IL-21 của chuột U-Plex với 384 giếng
Bộ kháng thể	B22WB-2/-3	Bộ kháng thể IL-21 của chuột U-Plex
Giao thức	Phụ trang sản phẩm U-Plex có sẵn tại https://www.mesoscale.com/	

Bảng 4. Thông số kỹ thuật của bộ kit xét nghiệm U-Plex IL-21 của chuột

Các ứng dụng	Cytokine và Chemokines, Miễn dịch học/Viêm nhiễm
Chất phân tích	IL-21
Giống loài	Chuột
Dụng cụ	MESO QuickPlex SQ 120, MESO QuickPlex SQ 120MM, MESO SECTOR S 600, MESO SECTOR S 600MM, SECTOR Imager 2400, SECTOR Imager 6000
Khả năng tương thích nhóm U-Plex	Dấu ấn sinh học nhóm 1
Loại tấm	96 giếng
Chụp kháng thể	Đê đa dòng
Kháng thể phát hiện	Chuột đơn dòng
LLOD (Độ nhạy)	6,5 pg/mL
Dải động	6,5 – 40.600 pg/mL
Loại mẫu	Huyết thanh, huyết tương, nuôi cấy tế bào nổi
Tiêu chuẩn tái tổ hợp	Thể hiện bằng E. coli
Tuyên bố sử dụng	Chỉ sử dụng cho nghiên cứu. Không sử dụng trong các thủ tục chẩn đoán
Điều kiện bảo quản	Bảo quản riêng biệt theo yêu cầu của từng thành phần cụ thể
ID gen	60505
ID UniProt	Q9ES17

3.2.2 Nguyên tắc của phương pháp đánh giá

Xét nghiệm Singleplex được cung cấp trên đĩa MSD GOLD™ Small Spot Streptavidin 96 giếng hoặc MSD Streptavidin 384 giếng (hình 10). Những tấm này cung cấp độ nhạy rất cao, hiệu suất đồng nhất và khả năng đồng nhất giữa các khe cũng rất tốt. Mỗi U-Plex được thực hiện gồm có 3 giai đoạn chính là bắt cặp, bao phủ và hoàn thiện (Hình 11).

3.2.3 Điểm nổi bật của xét nghiệm U-Plex

- Được thiết kế và xây dựng đa dạng, có thể sử dụng hệ thống ghép kênh hoặc đơn lẻ cho nhiều đối tượng cụ thể với các xét nghiệm phù hợp và nhanh chóng.

- Tạo kết hợp tùy chỉnh từ một lựa chọn xét nghiệm MSD®, kháng thể của đối tượng hoặc cả hai.

- Quy trình làm việc dễ dàng và giao thức đơn giản tương tự như ELISA, không cần phát hiện.

- Tương thích với tất cả công cụ và phần mềm từ MSD®.

- Nền tảng mở: tương thích với kháng thể, protein, peptide, carbohydrate, axit nucleic và oligonucleotide.

3.2.4 Xét nghiệm U-Plex Mouse IL-21

Nền tảng U-plex để thiết kế để cung cấp tính linh hoạt cao nhất cho việc phát hiện dấu ấn sinh học trong nhiều loại mẫu khác nhau. Các dữ liệu ở bảng 6 cung cấp hiệu suất đại diện của xét nghiệm IL-21 của chuột U-Plex được thử nghiệm trên các phiên có 96 giếng U-Plex chạy dưới dạng ghép kênh. Dữ liệu trên không đại diện cho thông số kỹ thuật của sản phẩm. Trong các điều kiện thử nghiệm khác nhau, xét nghiệm

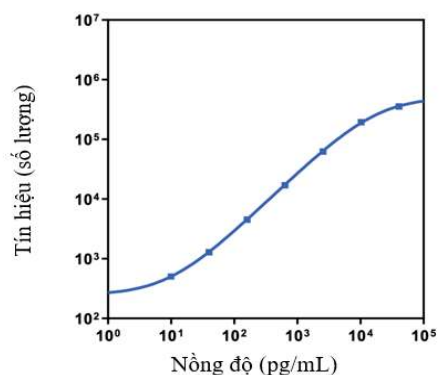
có thể hoạt động khác với dữ liệu đã cung cấp. Các xét nghiệm U-Plex có thể được cung cấp ở dạng đơn hoặc ghép kênh, cả hai dạng này đều có sẵn trong các phiên 96 hoặc 384 giếng [14].



Hình 12. Bộ kit xét nghiệm U-Plex IL-21 của chuột

Bộ kit xét nghiệm U-Plex IL-21 của chuột dung cấp các thành phần đã được kiểm chứng có thể kết hợp tạo ra các xét nghiệm chất lượng cao một cách nhanh chóng và dễ dàng. Xét nghiệm U-Plex IL-21 của chuột có các thành phần thiết yếu cho xét nghiệm IL-21 ở định chất phân tích đơn, với các dữ liệu và thông số kỹ thuật như sau:

Đường cong hiệu chuẩn và độ nhạy đại diện [14]



Xét nghiệm	LLOD* trung bình (pg/mL)	Phạm vi LLOD* (pg/mL)
IL-21	6,5	4,3 – 10

* LLOD được xem như giới hạn phát hiện dưới, là nồng độ được tính toán tương ứng với 2,5 lần độ lệch chuẩn trên nền

Mỗi bộ kit xét nghiệm U-Plex IL-21 sẽ có nhiều thành phần và có điều kiện bảo quản khác nhau, trong số đó nhà cung cấp đã giới thiệu 3 bộ kit lần lượt có mã sản phẩm là K152WBK-1, K152WBK-2 và K152WBK-4. Số lượng các chi tiết và điều kiện bảo quản cụ thể các bộ kit này được trình bày trong các bảng sau đây.

Bảng 5. Mô tả sản phẩm xét nghiệm U-Plex IL-21 mã K152WBK-1

Mô tả sản phẩm	Kho	Số lượng mỗi bộ
Bộ kháng thể IL-21 U-Plex của chuột		
Kháng thể bắt giữ: 1X	2 – 8 ⁰ C	Mỗi loại 1 cái (cỡ 1 đĩa)
Kháng thể phát hiện: 100X		
Bộ hiệu chuẩn 7	2 – 8 ⁰ C	1 lọ
Gói tám SA MSD GOLD 96 giếng, tám SECTOR	2 – 8 ⁰ C	Mỗi loại 1 cái (cỡ 1 đĩa)
Chất pha loãng 100	2 – 8 ⁰ C	1 chai (50 mL)
Chất pha loãng 41	≤ - 10 ⁰ C	1 chai (10 mL)
Chất pha loãng 45	≤ - 10 ⁰ C	1 chai (8 mL)
MSD GOLD đọc bộ đệm B	RT	1 chai (18 mL)

Bảng 6. Mô tả sản phẩm xét nghiệm U-Plex IL-21 mã K152WBK-2

Mô tả sản phẩm	Kho	Số lượng mỗi bộ
Bộ kháng thể IL-21 U-Plex của chuột		
Kháng thể bắt giữ: 1X	2 – 8 ⁰ C	Mỗi 1 cái (cỡ 5 tấm)
Kháng thể phát hiện: 100X		

Mô tả sản phẩm	Kho	Số lượng mỗi bộ
Bộ hiệu chuẩn 7	2 – 8 ^o C	5 lọ
Gói tám SA MSD GOLD 96 giếng, tám SECTOR	2 – 8 ^o C	5 cái (cỡ 1 đĩa)
Chất pha loãng 100	2 – 8 ^o C	1 chai (50 mL)
Chất pha loãng 41	≤ - 10 ^o C	1 chai (50 mL)
Chất pha loãng 45	≤ - 10 ^o C	1 chai (40 mL)
MSD GOLD đọc bộ đệm B	RT	1 chai (90 mL)

Bảng 7. Mô tả sản phẩm xét nghiệm U-Plex IL-21 mã K152WBK-4

Mô tả sản phẩm	Kho	Số lượng mỗi bộ
Bộ kháng thể IL-21 U-Plex của chuột		
Kháng thể bắt giữ: 1X	2 – 8 ^o C	Mỗi 1 cái (cỡ 5 tấm)
Kháng thể phát hiện: 100X		
Bộ hiệu chuẩn 7	2 – 8 ^o C	25 lọ
Gói tám SA MSD GOLD 96 giếng, tám SECTOR	2 – 8 ^o C	25 cái (c 1 đĩa)
Chất pha loãng 100	2 – 8 ^o C	5 chai (50 mL)
Chất pha loãng 41	≤ - 10 ^o C	5 chai (50 mL)
Chất pha loãng 45	≤ - 10 ^o C	5 chai (40 mL)
MSD GOLD đọc bộ đệm B	RT	5 chai (90 mL)

4. KẾT LUẬN

Các nghiên cứu đã chỉ ra được vai trò của IL-21 liên quan đến các quá trình sinh học và bệnh lý kèm theo. Sự tương tác giữa IL-21 và thụ thể IL-21R đã được chứng minh trong các nghiên cứu trước đó, với các bệnh như lupus ban đỏ hệ thống (SLE), viêm khớp dạng thấp (RA), và một số bệnh lý khác. So với các interleukin khác thì IL-21 là một đích tác động còn tương đối mới nên chưa thật sự có nhiều phương pháp đánh giá sự gắn kết giữa IL-21 với IL-21R. Trong bài tiểu luận này đã trình bày một phương pháp đánh giá dựa trên nhuộm huỳnh quang miễn dịch do tác giả Linnebacher và các cộng sự đã thực hiện và công bố năm 2019. Bên cạnh đó, một bộ kit xét nghiệm trên IL-21 của chuột có tên là U-Plex đã được phát triển và công bố sản phẩm trên thị trường. Bộ kit U-Plex IL-21 này có rất nhiều

điểm nổi bật như có thể tiến hành xét nghiệm nhanh chóng và cho kết quả chính xác. Theo tìm hiểu thì có mã sản phẩm liên quan đến bộ kit xét nghiệm U-Plex IL-21 của chuột là K152WBK-1, K152WBK-2, và K152WBK-4 với các thông số và thiết bị đi kèm đã được trình bày ở các bảng trên. Việc áp dụng các kỹ thuật này để đánh giá sự gắn kết IL-21 với IL-21R tại Việt Nam sẽ phải gặp một số trở ngại về thiết bị, nhưng hy vọng có thể sẽ liên hệ được nhà cung cấp để mua về và tiến hành thử nghiệm. Với mục tiêu nghiên cứu sàng lọc thuốc phân tử nhỏ ức chế tương tác giữa IL-21 và IL-21R thì bên cạnh việc áp dụng các quy trình kỹ thuật đã được công bố trong nghiên cứu trước, việc ứng dụng các phương pháp đánh giá khác đơn giản và dễ thực hiện nhưng đem lại kết quả chính xác cao là điều rất cần thiết.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Kopic E., Becic F., & Kusturica J. (2004), "Basiliximab, mechanism of action and pharmacological properties", *Med Arh*, 58(6), pp. 373-376.
- [2] Kang, L., Bondensgaard, K., Li, T., Hartmann, R., & Hjorth, S. A. (2010). Rational design of interleukin-21 antagonist through selective elimination of the C binding epitope. *J. Biol. Chem.* 285, 12223–12231
- [3] Chevalier, M.F., Jülg, B., Pyo, A., Flanders, M., Ranasinghe, S., Soghoian, D.Z., Kwon, D.S., & Rychert, J. (2011). HIV-1-specific interleukin-21+ CD4+ T cell responses contribute to durable viral control through the modulation of HIV-specific CD8+ T cell function. *Journal of Virology*. 85 (2): 733–41. doi:10.1128/JVI.02030-10. PMC 3020027. PMID 21047960.
- [4] Christianson, G. J., R. L. Blankenburg, T. M. Duffy, D. Panka, J. B., Roths, A., Marshak-Rothstein, & Roopenian, D.C. (1996). 2-Microglobulin dependence of the lupus-like autoimmune syndrome of MRL-lpr mice. *J. Immunol.* 156: 4932–4939.
- [5] Spolski, R., & Leonard, W.J. (2008). Interleukin-21: basic biology and implications for cancer and autoimmunity, *Annu. Rev. Immunol.* 26 (2008) 57–79, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090316>.
- [6] Li, J., Shen, W., & Kong K et al. (2006). Interleukin-21 induces T-cell activation and proinflammatory cytokine secretion in rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 64:515–522
- [7] Vogelzang, A., McGuire, H. M., Yu, D., Sprent, J., Mackay, C. R., & King, C. (2008). A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. *Immunity* 29, 127–137.
- [8] Parrish-Novak, J., Dillon, SR., Nelson, A. (2000). Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408:57–63.
- [9] Herber, D (2007). IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression. *J. Immunol.* 178, 3822–3830.
- [10] Rossi, A., & Taylor, C. (2011). Analysis of protein-ligand interactions by fluorescence polarization. *Nat Protoc* 6, 365–387 (2011). <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.305>
- [11] Herber, D. (2007). IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression. *J. Immunol.* 178, 3822–3830 (2007).
- [12] Jang, E., Cho, SH., & Park H. (2009). A positive feedback loop of IL-21 signaling provoked by homeostatic CD4⁺CD25⁺ T cell expansion is essential for the development of arthritis in autoimmune K/BxN mice. *J Immunol* 182:4649–4656
- [13] Deborah, H., & Thomas, P. (2007). IL-21 has a pathogenic role in a lupus-prone mouse model and its blockade with IL-21R.Fc reduces disease progression. *J Immunol*, 15;178(6):3822-30.
- [14] <https://www.mesoscale.com/en/products/u-plex-mouse-il-21-assay-k152wbk/>. Truy cập ngày 14/05/2023.