



Xây dựng quy trình phân tích đa hình rs1057910 trên gen *CYP2C9* và rs9923231, rs9934438 trên gen *VKORC1* ở mẫu máu bệnh nhân thay van tim sử dụng thuốc chống đông acenocoumarol

Đỗ Thị Lệ Hằng, Phạm Thị Hồng Nhung, Nguyễn Hữu Hiếu, Nguyễn Thị Nga,
Đình Đoàn Long, Phạm Trung Kiên, Vũ Thị Thơm

Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 23 tháng 8 năm 2018

Chỉnh sửa ngày 08 tháng 11 năm 2018; Chấp nhận đăng ngày 25 tháng 12 năm 2018

Tóm tắt: Acenocoumarol là thuốc chống đông máu đường uống được kê đơn phổ biến nhất cho bệnh nhân có nguy cơ bị huyết khối tĩnh mạch tại Việt Nam. Nhiều nghiên cứu đã cho thấy đa hình di truyền gen *CYP2C9* và gen *VKORC1* là các yếu tố di truyền quan trọng ảnh hưởng đến sự đáp ứng thuốc acenocoumarol. Chính vì vậy, trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành nghiên cứu xây dựng quy trình phân tích đa hình gen *CYP2C9* và gen *VKORC1* trên bệnh nhân sau thay van tim sử dụng thuốc chống đông acenocoumarol tại Việt Nam. Phương pháp nghiên cứu chính được sử dụng bao gồm: tách DNA tổng số từ máu ngoại vi, khuếch đại gen bằng PCR, xác định kiểu gen bằng phương pháp giải trình tự hoặc đa hình độ dài đoạn cắt giới hạn. Bài báo mô tả các kết quả nghiên cứu xây dựng quy trình phân tích đa hình rs1057910 trên gen *CYP2C9* và đa hình rs9923231, rs9934438 trên gen *VKORC1*.

Từ khóa: Gen *CYP2C9*, gen *VKORC1*, acenocoumarol, giải trình tự, đa hình độ dài đoạn cắt giới hạn.

1. Đặt vấn đề

Acenocoumarol là thuốc chống đông máu nhóm kháng vitamin K dạng uống được kê đơn phổ biến tại Việt Nam để ngăn ngừa và điều trị huyết khối ở bệnh nhân: rung nhĩ, thay van tim, huyết khối tĩnh mạch, phôi thuyên tắc và những

bệnh nhân đã trải qua phẫu thuật chỉnh hình [1-3]. Acenocoumarol có phạm vi điều trị hẹp và chỉ với một sự thay đổi liều nhỏ cũng có thể gây ra các biến chứng chảy máu hay huyết khối nhất là trong 3-6 tháng đầu sử dụng [4]. Liều dùng của thuốc phụ thuộc vào các yếu tố như: tuổi, chế độ dinh dưỡng, yếu tố di truyền, các bệnh kèm theo.... Trong tất cả các yếu tố trên thì yếu tố di truyền được cho là đóng vai trò quan trọng đến sự thay đổi liều thuốc ở từng bệnh nhân. Các nghiên cứu trước đã chỉ ra rằng

* Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-377968818.

Email: thomtbk5@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4103>

có đến 50 % sự thay đổi liều thuốc có thể giải thích bởi đa hình gen *CYP2C9* (gen mã hóa cho siêu họ enzym chuyển hóa thuốc cytochrome P450) và gen *VKORC1* (gen mã hóa enzym đích tác dụng của thuốc) [5-7].

Gen *CYP2C9* nằm trên nhiễm sắc thể số 10 ở người. *CYP2C9* là enzym thiết yếu cho sự chuyển hóa thuốc acenocoumarol tại gan ở người. Trong đó, alen *CYP2C9**3 (rs1057910) có ảnh hưởng đến 80 % hoạt động của enzym *CYP2C9*. Những người mang alen đột biến rs1057910 có enzym *CYP2C9* làm giảm hoạt động so với kiểu gen đại, dẫn đến làm chậm quá trình chuyển hóa của acenocoumarol vì vậy sẽ cần một liều dùng thấp hơn [8]. Theo nghiên cứu của Thijssen và cs (2001) liều dùng thuốc acenocoumarol cần thiết ở người mang alen đột biến rs1057910 thấp hơn so với người mang alen kiểu đại khoảng 19-29 % [9-10]. Alen đột biến rs1057910 chiếm tỉ lệ khá thấp ở quần thể người châu Á (3,3 %) so với quần thể người da trắng (4-16 %) [11].

Gen *VKORC1* nằm trên nhiễm sắc thể số 16 ở người. Năm 1970, người ta phát hiện enzym Vitamin K epoxide reductase được mã hóa bởi gen *VKORC1*. Vitamin K epoxide reductase là enzym đích tác dụng của acenocoumarol, chịu trách nhiệm chuyển hóa vitamin K epoxide thành vitamin K tham gia vào quá trình đông máu. Một số đa hình trên gen *VKORC1* có liên quan tới hiện tượng tăng nhạy cảm với acenocoumarol [12]. Đa hình 1639G>A liên kết chặt chẽ với đa hình 1173C>T có liên quan tới biểu hiện hoạt tính enzym khác nhau ở các chủng người khác nhau. Reitsma và cs (2005) đã thực hiện khảo sát trên đối tượng bệnh nhân người Hà Lan: những người mang một hoặc hai alen 1173T cần giảm liều tương ứng là 28 % và 47 % so với người không mang alen này [13].

Trong bối cảnh của Việt Nam hiện nay, chưa có thông tin về mặt di truyền học liên quan tới việc chỉ định liều acenocoumarol sử dụng cho bệnh nhân cũng như quy trình phân tích gen áp dụng được cho các phòng phân tích, phòng xét nghiệm. Do đó, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này nhằm xây dựng quy trình phân tích đa hình rs1057910 trên gen *CYP2C9* và đa hình

rs9923231, rs9934438 trên gen *VKORC1* ở mẫu máu bệnh nhân thay van tim sử dụng thuốc chống đông acenocoumarol. Phương pháp phân tích đa hình gen sử dụng là giải trình tự và RFLP.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Thu thập và bảo quản mẫu máu: 150 mẫu máu toàn phần được lấy từ tĩnh mạch của bệnh nhân sau phẫu thuật thay van tim có điều trị thuốc chống đông máu bằng thuốc chống đông acenocoumarol tại Bệnh viện Tim Hà Nội. Các mẫu máu được đựng trong ống chuyên dụng có sẵn chất chống đông EDTA và giữ lạnh ở -30°C cho đến khi sử dụng.

Tách chiết DNA tổng số: Chúng tôi sử dụng E.Z.N.A blood DNA Mini kit (Omega-Biotek) để tách chiết DNA tổng số theo quy trình khuyến cáo của hãng.

Trình tự môi đặc hiệu cho phản ứng nhân dòng đoạn gen chứa các SNP rs1057910, rs9923231 và rs9934438: cặp môi với trình tự môi xuôi và môi ngược tham chiếu trên NCBI được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Trình tự môi

Alen	Trình tự môi	Độ dài sản phẩm
rs1057910	GCATCTGTAACCATCCCTCTC GTGTCAAGATTCAGTTCCTTCC	719 bp
rs9923231	TTCCATCTGCAACCTTAATTCCC TCCTTACCAGCCTCCTCTC	771 bp
rs9934438	GGTGCCTTAATCCCAAGTACTC AAAGACTCCTGTTAGTTACCTCCC	714 bp

Nhân dòng đoạn gen chứa các SNP rs1057910, SNP rs9923231 và SNP rs9934438 bằng phương pháp PCR: để có quy trình nhân dòng đoạn gen chứa các SNP đặc hiệu và ổn định, chúng tôi xác định nhiệt độ gắn môi tối ưu, nồng độ môi tối ưu, nồng độ DNA tối ưu trong phản ứng. Các thành phần khác trong phản ứng PCR có nồng độ hoạt động: HF buffer 1 X; Phusion DNA polymerase 0,05 u/μl; dNTPs 0,02 mM trong tổng thể tích của một

phản ứng là 30 μ l. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR gồm 3 giai đoạn: biến tính ban đầu 98 $^{\circ}$ C trong 3 phút; 35 chu kì: 98 $^{\circ}$ C trong 10 giây, gắn mồi trong 30 giây, 72 $^{\circ}$ C trong 30 giây; thời gian kéo dài cuối 72 $^{\circ}$ C trong 2 phút. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1,5 %.

Xác định kiểu gen SNP rs1057910, SNP rs9923231 và SNP rs9934438 bằng phương pháp RFLP và giải trình tự: 25 μ l sản phẩm PCR được tinh sạch bằng kit E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit (Omega-biotek). Để xác định kiểu gen của SNP rs9923231 và SNP rs9934438 trên gen *VKORC1*. Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch được cắt lần lượt bằng enzym Msp1 và HinfI. Sản phẩm RFLP sau đó sẽ được kiểm tra chất lượng bằng cách điện di trên gel agarose 1,5 %.

SNP rs1057910 trên gen *CYP2C9* và SNP rs9923231, rs9934438 trên gen *VKORC1* đều có thể xác định kiểu gen bằng phương pháp giải trình tự sử dụng máy phân tích phân đoạn DNA tự động 3500 (Applied Biosystems) và kit BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing (Applied Biosystems). Kết quả giải trình tự được mở bằng phần mềm BioEdit version 7.1.9, qua đó xác định kiểu gen của bệnh nhân.

3. Kết quả

Kết quả bước đầu tách chiết DNA tổng số: nồng độ DNA dao động từ: 41,15 - 209,10 ng/ μ l, có độ tinh sạch cao với chỉ số OD-A_{260/280} trong khoảng 1,8-2,2.

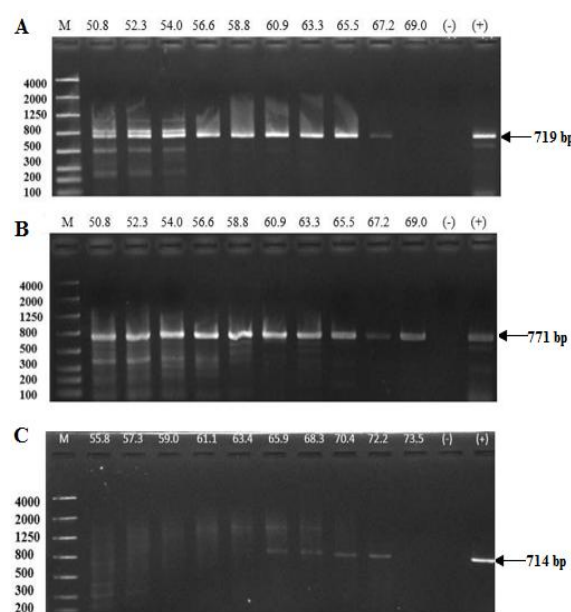
Chúng tôi thực hiện PCR với 10 nhiệt độ dao động quanh nhiệt độ gắn mồi được hằng khuyến cáo. Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn mồi phản ứng nhân dòng đoạn gen chứa SNP rs1057910, SNP rs9923231 và SNP rs9934438:

Kết quả điện di ở Hình 1A: ở dải nhiệt độ từ 50,8-56,6 $^{\circ}$ C xuất hiện các băng điện di không đặc hiệu. Ở nhiệt độ 67,7-69,0 $^{\circ}$ C băng điện di giảm độ sáng và không lên băng. Trong dải nhiệt độ 58,8-65,5 $^{\circ}$ C băng điện di lên đặc hiệu, đặc biệt là ở 63,3 $^{\circ}$ C băng lên sáng rõ, đặc hiệu. Do đó chúng tôi chọn nhiệt độ gắn mồi tối ưu

cho phản ứng nhân dòng đoạn gen chứa SNP rs1057910 trên gen *CYP2C9* là 63,3 $^{\circ}$ C.

Kết quả điện di ở Hình 1B: ở dải nhiệt độ từ 50,8-58,8 $^{\circ}$ C xuất hiện các băng điện di không đặc hiệu. Ở nhiệt độ 67,2 $^{\circ}$ C băng điện di giảm độ sáng. Trong dải nhiệt độ 60,9-65,5 $^{\circ}$ C và ở 69,0 $^{\circ}$ C băng điện di lên sáng, đặc biệt là ở 65,5 $^{\circ}$ C băng lên sáng rõ nhất, đặc hiệu. Do đó chúng tôi chọn nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho phản ứng nhân dòng đoạn gen chứa SNP rs9923231 trên gen *VKORC1* là 65,5 $^{\circ}$ C.

Kết quả điện di ở Hình 1C: ở dải nhiệt độ từ 55,8-63,4 $^{\circ}$ C và 73,5 $^{\circ}$ C không xuất hiện băng điện di, ở nhiệt độ 65-70,4 $^{\circ}$ C băng điện di giảm độ sáng. Tại nhiệt độ 72,2 $^{\circ}$ C băng lên sáng rõ, đặc hiệu. Do đó chúng tôi chọn nhiệt độ gắn mồi tối ưu cho phản ứng nhân dòng đoạn gen chứa SNP rs9934438 trên gen *VKORC1* là 72,2 $^{\circ}$ C.



Hình 1. Kết quả điện di trên gel agarose 1,5 % của thí nghiệm PCR tối ưu nhiệt độ gắn mồi phản ứng nhân dòng đoạn gen chứa SNP rs1057910 (Hình A), SNP rs9923131 (Hình B) và rs9934438 (Hình C).

Làn M: Plus DNA Marker (Lonza)

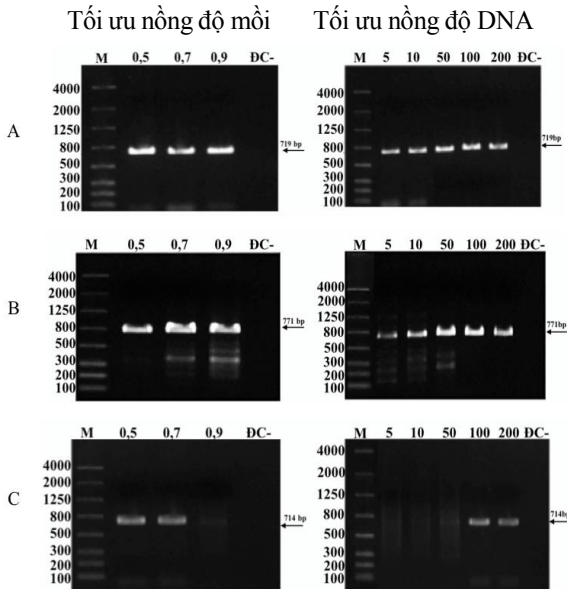
Làn ĐC (-): đối chứng âm.

Làn ĐC (+): đối chứng dương.

Kết quả tối ưu nồng độ môi và nồng độ DNA cho phản ứng nhân dòng đoạn gen chứa SNP rs1057910, SNP rs9923231 và SNP rs9934438:

Chúng tôi thực hiện PCR ở các nồng độ môi lần lượt: 0,5; 0,7 và 0,9 μ M. Kết quả điện di ở Hình 2 cho thấy với nồng độ môi 0,5 μ M phản ứng nhân dòng đoạn gen chứa các SNP trong nghiên cứu được tối ưu tốt với các băng DNA sáng rõ, đặc hiệu.

Tiếp tục PCR ở nồng độ DNA lần lượt: 5, 10, 50, 100 và 200 ng/ μ l. Kết quả điện di ở Hình 2 cho thấy với nồng độ DNA 100 ng/ μ l phản ứng nhân dòng đoạn gen chứa các SNP trong nghiên cứu lên băng điện di đặc hiệu, các băng DNA lên sáng rõ.

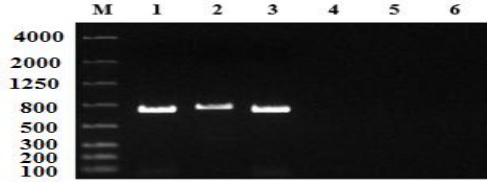


Hình 2. Kết quả điện di trên gel agarose 1,5 % của thí nghiệm tối ưu nồng độ môi và nồng độ DNA của phản ứng nhân dòng đoạn gen chứa SNP rs1057910 trên gen *CYP2C9* (Hình A), SNP rs9923231 trên gen *VKORC1* (Hình B), SNP rs9934438 trên gen *VKORC1* (Hình C).

Làn M: Plus DNA Marker (Lonza)
Làn DC (-): đối chứng âm

Áp dụng quy trình phân tích kiểu gen của các SNP trên cho bệnh nhân, chúng tôi nhận thấy đã nhân dòng thành công đoạn gen chứa SNP rs1057910 trên gen *CYP2C9* và SNP

rs9923231, SNP rs9934438 trên gen *VKORC1* với kết quả ổn định như thể hiện trong Hình 3.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1,5 %.

Làn M: Plus DNA Marker (Lonza), làn 1-3: lần lượt là sản phẩm PCR của SNP rs1057910, SNP rs9923231 và SNP rs9934438.

Làn 4, 5, 6: Đối chứng âm lần lượt của SNP rs1057910, SNP rs9923231 và SNP rs9934438.

Kết quả giải trình tự rs1057910			
Hình trình tự		Kiểu gen	
Chưa xuất hiện trong 150 mẫu		CC	
		AC	
		AA	
Kết quả giải trình tự rs9923231		Kết quả giải trình tự rs9934438	
Hình trình tự	Kiểu gen	Hình trình tự	Kiểu gen
	GG		GG
	GA		GA
	AA		AA

Hình 4. Kết quả giải trình tự SNP rs1057910, SNP rs9923231 và SNP rs9934438.

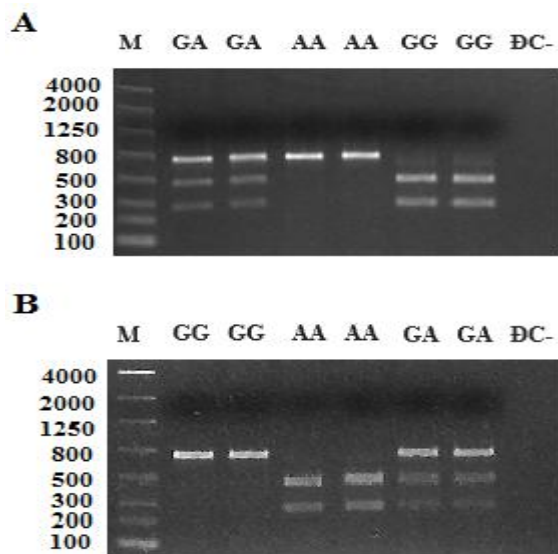
Xác định kiểu gen của 3 SNP trong nghiên cứu bằng phương pháp giải trình tự: kết quả giải trình tự của 3 SNP được trình bày trong Hình 4.

Các kiểu gen của SNP rs1057910 trên gen *CYP2C9*: dị hợp tử AC và đồng hợp tử đột biến AA.

Các kiểu gen của SNP rs9923231 và SNP rs9934438 trên gen *VKORC1*: đồng hợp tử GG, dị hợp tử GA, đồng hợp tử AA.

Xác định kiểu gen SNP rs9923231 và SNP rs9934438 trên gen *VKORC1* bằng phương pháp RFLP:

Do phương pháp giải trình tự đòi hỏi chi phí cao, thời gian thực hiện lâu. Chính vì vậy, ngoài giải trình tự, chúng tôi xác định kiểu gen của SNP rs9923231 và SNP rs9934438 trên gen *VKORC1* bằng kỹ thuật RFLP cho kết quả:



Hình 5. Kết quả điện di trên gel agarose 1,5 % sản phẩm RFLP của SNP rs9923231 (A) và SNP rs9934438 (B).

Làn M: DNA Marker 100 bp-4 kb (Lonza).

Làn DC-: đối chứng âm.

Đối với SNP rs9923231: kiểu gen đồng hợp tử AA điện di cho 1 băng duy nhất có kích thước: 771 bp; kiểu gen đồng hợp tử GG điện di cho 2 băng có kích thước khác nhau: 493 và 278 bp; kiểu gen dị hợp tử GA điện di cho 3

băng có kích thước khác nhau: 771, 493 và 278 bp. Điều kiện tối ưu cho phản ứng RFLP SNP rs9923231 bằng enzyme MspI: 0,15 μ l enzyme cắt; 40-50 ng/ μ l DNA ở 37°C trong tổng thể tích 7,5 μ l tại điều kiện 30 phút và 45 phút.

Đối với SNP rs9934438 kết quả RFLP: kiểu gen đồng hợp tử GG điện di cho 1 băng duy nhất có kích thước: 714 bp; kiểu gen đồng hợp tử AA điện di cho 2 băng có kích thước khác nhau: 417 và 297 bp; kiểu gen dị hợp tử GA điện di cho 3 băng có kích thước khác nhau: 714, 417 và 297 bp. Điều kiện tối ưu cho phản ứng RFLP SNP rs9934438 bằng enzyme HinfI là: 0,15 μ l enzyme cắt; 40-50 ng/ μ l DNA trong tổng thể tích 7,5 μ l tại 37°C trong điều kiện 15 phút và 30 phút.

So sánh kết quả kiểu gen của SNP rs9923231 và rs9934438 trên gen *VKORC1* xác định bằng phương pháp RFLP với kết quả giải trình tự, chúng tôi nhận thấy hai phương pháp này đều cho kết quả tương đồng nhau. Nhưng phương pháp RFLP với kỹ thuật thao tác đơn giản, rẻ và nhanh hơn, tiết kiệm chi phí cho bệnh nhân, tiết kiệm thời gian cho nghiên cứu.

4. Thảo luận

Để phân tích kiểu gen của các SNPs, hiện nay có nhiều phương pháp đã được nghiên cứu và chứng minh hiệu quả như: kỹ thuật đa hình độ dài đoạn cắt giới hạn (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), giải trình tự, kỹ thuật sử dụng đầu dò DNA (DNA-probe). Tuy nhiên, trong số đó, PCR-RFLP và giải trình tự Sanger là hai phương pháp được sử dụng phổ biến nhất. Trong nghiên cứu này, chúng tôi xác định được kiểu gen SNP trên gen *CYP2C9* bằng phương pháp giải trình tự, còn đối với SNP rs9923231 và SNP rs9934438 trên gen *VKORC1* bằng cả hai phương pháp giải trình tự và cắt bằng enzyme giới hạn. Kết quả nghiên cứu đã cho thấy quy trình phân tích gen của chúng tôi ổn định, có thể xác định được kiểu gen của cả 3 SNP một cách tốt nhất.

Áp dụng quy trình phân tích kiểu gen trên phân tích kiểu gen của 150 bệnh nhân cho thấy quy trình phân tích kiểu gen của chúng tôi có tính ổn định, dễ dàng lặp lại với độ chính xác cao. Phản ứng nhân dòng đoạn gen chứa alen xảy ra với độ nhạy cao chỉ với lượng DNA lớn hơn 20 ng/μl.

Với SNP rs9923231 và rs9934438 trên gen *VKORC1* khi so sánh kết quả giữa hai phương pháp giải trình tự và RFLP chúng tôi thấy không có sự khác biệt về kết quả. Trong khi đó, kỹ thuật RFLP không yêu cầu trang thiết bị hiện đại, kỹ thuật đơn giản đồng thời cho ra kết quả nhanh với chi phí rẻ hơn nhiều so với phương pháp giải trình tự. Vì vậy, chúng tôi khuyến khích sử dụng phương pháp RFLP để xác định kiểu gen cho gen *VKORC1*.

Kết quả phân tích gen của chúng tôi có sự tương đồng với các nghiên cứu trước đó. Với gen *CYP2C9* nghiên cứu của nhiều tác giả sử dụng phương pháp giải trình tự sử dụng cặp mỗi nhân dòng khác nhau [11,14]. Với gen *VKORC1* ngoài phương pháp giải trình tự trực tiếp thì đa số các nghiên cứu của các nhóm tác giả khác đều sử dụng phương pháp cắt bằng enzym giới hạn. Nhóm tác giả D.J. Harrington và cs (2008) từ Vương Quốc Anh cũng sử dụng enzym cắt Hinf để xác định trình tự của SNP rs9934438 trên gen *VKORC1* [12]. Và nghiên cứu của tác giả Y.A. Chua (2015) ở Malaysia cũng sử dụng enzym MspI để cắt SNP rs9923231 trên gen *VKORC1* [15]. Kết quả của những nhóm tác giả này cũng tương đồng so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi.

Nhằm đưa quy trình có thể sử dụng tại các bệnh viện, cơ sở khám chữa bệnh và cơ sở nghiên cứu có thiết bị phù hợp, chúng tôi đã cố gắng đơn giản hóa quy trình. DNA được tách từ mẫu máu toàn phần, là dạng mẫu dễ thu thập và bảo quản. Chúng tôi cũng đã tối ưu thành công phản ứng nhân dòng đoạn gen chứa SNP rs1057910 trên gen *CYP2C9* và rs9923231, rs9934438 trên gen *VKORC1* trong nghiên cứu, các thành phần và các điều kiện trong phản ứng được tối ưu tốt nhất. Việc tối ưu được các điều kiện như vậy có ý nghĩa quan trọng trong thực

tế vì tiết kiệm được thời gian, công sức và thao tác.

Quy trình xây dựng thành công trong nghiên cứu này sẽ là công cụ hỗ trợ cho các nghiên cứu về mối liên quan giữa kiểu gen của SNP rs1057910 trên gen *CYP2C9* và SNP rs9923231, SNP rs9934438 trên gen *VKORC1* đến sự đáp ứng thuốc acenocoumarol ở bệnh nhân sau thay van tim, nhằm hỗ trợ các Bác sĩ về chuẩn đoán lâm sàng và cận lâm sàng, thuận tiện cho việc điều chỉnh liều dùng thuốc chống đông acenocoumarol phù hợp cho các bệnh nhân sau thay van tim.

5. Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng được quy trình xác định kiểu gen của SNP rs1057910 trên gen *CYP2C9* và SNP rs9923231, SNP rs9934438 trên gen *VKORC1* liên quan đến đáp ứng thuốc chống đông acenocoumarol. Quy trình này phân tích kiểu gen SNP rs1057910 trên gen *CYP2C9* và SNP rs9923231, SNP rs9934438 trên gen *VKORC1* đã được áp dụng hiệu quả ở nhóm bệnh nhân sau thay van tim sử dụng thuốc chống đông acenocoumarol ở Bệnh viện Tim Hà Nội, Việt Nam.

Lời cảm ơn

Các tác giả trân trọng cảm ơn sự tài trợ của Đại học Quốc gia Hà Nội và Khoa Y Dược cho đề tài mã số QG.17.29 để thực hiện nghiên cứu này. Trân trọng cảm ơn Bệnh viện Tim Hà Nội đã phối hợp và cung cấp các mẫu sinh phẩm phục vụ nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

- [1] A.J. Camm, Focused update of the ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation: an update of the 2010 ESC Guidelines for the management of atrial fibrillation. Developed with the special contribution of the

- European Heart Rhythm Association, Euro Heart 33 (2012) 2719-47.
- [2] J.C Sun, D.M., A. Lamy, Antithrombotic management of patients with prosthetic heart valves: current evidence and future trends, *Lancet* 374 (2009) 565–76.
- [3] R.G. Hart, P.L.v.A.M, Meta-analysis: antithrombotic therapy to prevent stroke in patients who have nonvalvular atrial fibrillation. *Ann Intern Med* 146 (2007) 857-67.
- [4] T.L. Verhoef, Long-term anticoagulant effects of the CYP2C9 and VKORC1 genotypes in acenocoumarol users. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 10 (2012) 606–614.
- [5] L. Bodin , C. Verstuyft , D.A. Tregouet et al, Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood* 106 (2005) 135–40.
- [6] M. Wadelius , L.Y. Chen, J.D. Lindh et al, The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting. *Blood* 113 (2009) 784–92.
- [7] M. Teichert , M. Eijgelsheim , A.G Uitterlinden et al, Dependency of phenprocoumon dosage on polymorphisms in the VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 genes. *Pharmacogenet Genomics* 21 (2011) 26–34.
- [8] M.S. Wen, M.T.M. Lee, J.J. Chen et al, Prospective study of warfarin dosage requirements based on CYP2C9 and VKORC1 genotypes. *Clin Pharmacol Ther* 84(1) (2008) 83-89.
- [9] M.J. Drittij, H.H. Thijssen, V.L., J.C. de Vries-Hanje, Altered pharmacokinetics of R- and S-acenocoumarol in a subject heterozygous for CYP2C9*3, *Clin Pharmacol Ther* 70 (2001) 292-8.
- [10] G.J, T.G.M, Warfarin: what are the clinical implications of an outof-range-therapeutic International Normalized Ratio, *Thrombolysis* 27 (2009) 293-9.
- [11] PharmGKB [Internet]. Palo Alto (CA): Stanford University. Haplotype CYP2C9*3. [Cited 2012 Feb 22]. Available from: <http://www.pharmgkb.org/haplotype/PA165816544>, ngày truy cập 11/02/2018
- [12] D.J. Harrington, G.R.H. et al, Pharmacodynamic resistance to warfarin is associated with nucleotide substitutions in VKORC1, *Haemost* 6 (2008).
- [13] P.H. Reitsma, v.d.H.J., A.P. Groot et al, A C1173T dimorphism in the VKORC1 gene determines coumarin sensitivity and bleeding risk, *PLoS Med* 2 (2002).
- [14] A.D. Buzoianu, A.P. Trifa, D.F. Muresanu, S. Crisan, Analysis of CYP2C9*2, CYP2C9*3 and VKORC1 -1639 G>A polymorphism in a population from South-Eastern Europe, *Journal of Cellular and Molecular Medicin* 16 (12) (2012) 2919-2924.
- [15] Y.A. Chua, W.Z. Abdullah, Z. Yusof et al (2015), "VKORC1 and CYP2C9 genotypic data-based dose prediction alone does not accurately predict warfarin dose requirements in some Malaysian patients", *Turk J Med Sci*, 45(2), p. 913-8.

Establishing the Protocol for Genotyping SNPs rs1057910 in *CYP2C9* and rs9923231, rs9934438 in *VKORC1* genes Derived from Blood Samples of Cardiac Valve Replacement Patients Treated with Acenocoumarol

Do Thi Le Hang, Pham Thi Hong Nhung, Nguyen Huu Hieu, Nguyen Thi Nga,
Dinh Doan Long, Pham Trung Kien, Vu Thi Thom

VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Abstract: Acenocoumarol is widely prescribed for patients with risk of thromboembolism in Vietnam. Several previous studies revealed that genetic polymorphisms of *CYP2C9* and *VKORC1* genes are the important genetic factors inducing a high-impact upon the response of acenocoumarol. Therefore, this study was subjected to establish a rapid and efficient protocol for genotyping SNPs of

CYP2C9 and *VKORC1* genes in Vietnamese cardiac valve replacement patients treated with acenocoumarol. The protocol consists of DNA extraction from peripheral blood samples, polymerase chain reaction (PCR) for amplification of target genes, identifying the genotypes by either Sanger sequencing or restriction fragment length polymorphism PCR (PCR-RFLP). The protocol was established based on the identified optimal conditions to amplify targeted polymorphisms, ie. rs1057910 in *CYP2C9* gene and rs9923231, rs9934438 in *VKORC1* gene.

Keywords: *CYP2C9* gene, *VKORC1* gene, acenocoumarol, DNA sequencing, PCR-RFLP.