



Original Article

Establishing the Genotyping Method for *NAT2* Polymorphism in Vietnamese Tuberculoma Patients

Pham Thi Hong Nhung^{1,*}, Kieu Hong Nhung¹, Nguyen Thi Thu Ha²,
Dinh Doan Long¹, Vu Thi Thom¹, Le Thi Luyen¹

¹VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

²National Hospital of Tropical Diseases, 78 Giai Phong, Dong Da, Hanoi, Vietnam

Received 14 March 2019

Revised 08 May 2019; Accepted 21 June 2019

Abstract: The metabolism of Isoniazid, one of the first-line antituberculosis drugs for TB treatment and prophylaxis, depends on the acetyltransferase 2 acetylation (*NAT2*) phenotype. Different phenotypes of *NAT2* will lead to differences in drug concentration and the risk of uncontrolled side effects, such as hepatitis, peripheral neuropathy, gastrointestinal disorders (nausea, vomiting, and stomach pain). These risks are related to the presence of mutant *NAT2* alleles such as *NAT2**5 (c.341T> C), *6 (c.590G> A) and *7 (c.857G> A), that reduce the N-acetyltransferase activity. Therefore, the genotyping method for *NAT2* polymorphism using RFLP and Sanger sequencing was established. The method was successfully applied to determine the polymorphism of 84 TB patients. This study provides a better tool for analyzing *NAT2* gene to assist clinicians in treating isoniazid.

Keywords: Enzyme *NAT2*, isoniazid, single nucleotide polymorphism, RFLP, Sanger sequencing.

* Corresponding author.

Email address: nhungpham_smp@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4137>



Tối ưu hóa quy trình phân tích đa hình gen *NAT2* ở bệnh nhân lao Việt Nam

Phạm Thị Hồng Nhung^{1,*}, Kiều Hồng Nhung¹, Nguyễn Thị Thu Hà²,
Đình Đoàn Long¹, Vũ Thị Thơm¹, Lê Thị Luyến¹

¹*Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

²*Bệnh viện Nhiệt Đới Trung Ương, 78 Giải Phóng, Đống Đa, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 14 tháng 3 năm 2019

Chỉnh sửa ngày 08 tháng 5 năm 2019; Chấp nhận đăng ngày 21 tháng 6 năm 2019

Tóm tắt: Isoniazid là một trong các thuốc chống lao hàng một trong điều trị và dự phòng lao, sự chuyển hóa của thuốc này phụ thuộc vào kiểu hình acetyl hóa của enzym N-acetyltransferase 2. Kiểu hình chuyển hóa isoniazid khác nhau sẽ dẫn đến khác biệt về nồng độ thuốc và nguy cơ tác dụng không mong muốn (viêm gan, bệnh lý thần kinh ngoại vi, tác dụng phụ trên đường tiêu hóa như buồn nôn, nôn, đau dạ dày). Sự khác biệt về kiểu hình chuyển hóa isoniazid có liên quan đến sự xuất hiện của các alen đột biến thuộc gen *NAT2* làm giảm hoạt tính acetyl hóa của enzym N-acetyltransferase 2 như *NAT2* *5 (c.341T > C), *6 (c.590G > A) và *7 (c.857G > A). Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình phân tích gen *NAT2* trên bệnh nhân lao sử dụng phương pháp RFLP và giải trình tự gen. Quy trình phân tích gen đã được áp dụng thành công để xác định đa hình gen *NAT2* ở 84 bệnh nhân lao. Kết quả của nghiên cứu này sẽ cung cấp thêm công cụ hỗ trợ các bác sĩ trong y học cá thể hóa với điều trị isoniazid.

Từ khóa: Enzym NAT2, isoniazid, đa hình đơn nucleotit, RFLP, giải trình tự.

1. Đặt vấn đề

Theo Hướng dẫn của Tổ chức Y tế thế giới và Chương trình Chống lao Quốc gia, các thuốc chống lao hàng 1 gồm có isoniazid, rifampicin, ethambutol, pyrazinamid, streptomycin. Trong đó, isoniazid (viết tắt là INH) đóng vai trò then

chốt và được sử dụng rộng rãi trong điều trị và dự phòng lao [1]. Isoniazid ở dạng tự do (chiếm 40%) có tác dụng ức chế sự tổng hợp acid mycolic của vi khuẩn lao. Thuốc được chuyển hóa chủ yếu bằng con đường acetyl hóa nhờ enzym N-acetyltransferase 2 (viết tắt là NAT2) có trong gan và ống tiêu hóa. Sự chuyển hóa này có thể tạo nhiều sản phẩm gây độc cho gan như hydrazine, acetyldiazin... Tốc độ acetyl hóa của enzym NAT2 thay đổi ở mỗi người và được chia làm 3 dạng kiểu hình là acetyl hóa

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: nhungpham_smp@vnu.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4137>

chậm, acetyl hóa trung gian và acetyl hóa nhanh [2-3]. Các nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng, bệnh nhân mang kiểu hình acetyl hóa chậm có nồng độ INH trong huyết tương cao hơn 2 kiểu hình còn lại, làm tăng tỉ lệ tổn thương gan [4]. Mặt khác một số nghiên cứu cũng cho thấy kiểu hình acetyl hóa INH khác nhau cũng ảnh hưởng đến được động học của INH trong huyết tương. Nghiên cứu trên 224 bệnh nhân điều trị lao bằng isoniazid đã chứng minh những bệnh nhân có kiểu hình acetyl hóa chậm gây độc cho gan nhiều hơn bệnh nhân có kiểu hình acetyl hóa nhanh (26,4 % so với 11,1 %) [5]. Ngoài ra, các tác dụng không mong muốn cũng gia tăng do giảm tốc độ thanh thải khi điều trị đơn lẻ hoặc khi phối hợp giữa isoniazid và rifampicin trên bệnh nhân lao có kiểu hình acetyl hóa chậm [6]. Hoạt tính enzym NAT2 thấp làm xuất hiện tổn thương đa dây thần kinh khi điều trị bằng isoniazid không phối hợp với pyridoxal [3]. Như vậy, nhiều nghiên cứu lâm sàng đã chỉ ra hiệu quả điều trị khác biệt giữa các dạng kiểu hình của enzym NAT2, bệnh nhân mang kiểu hình acetyl hóa chậm có nguy cơ thất bại cao hơn các nhóm khác [7-8].

Trong các alen gây ra kiểu hình acetyl hóa chậm, các alen NAT2*5, *6, *7 phổ biến và được tập trung nghiên cứu nhiều nhất [9]. Alen NAT2*5 (c.341T > C) và NAT2*7 (c.857G > A) gây ra sự thay đổi cấu hình protein, qua đó gây giảm hoạt tính enzym. Alen NAT2*6 (c.590G>A) làm giảm độ bền của enzym NAT2 [2].

Năm 1973, một báo cáo của tổ chức Y tế Thế giới đã nhấn mạnh tầm quan trọng của việc xác định kiểu hình acetyl hóa của bệnh nhân mắc lao trong tiên lượng đáp ứng điều trị với isoniazid [10]. Tuy nhiên, việc nghiên cứu cũng như ứng dụng quy trình phân tích kiểu gen NAT2 vào thực hành lâm sàng ở Việt Nam vẫn chưa được quan tâm đúng mức. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành quy trình phân tích gen NAT2 sử dụng phương pháp phân tích đa hình độ dài đoạn cắt giới hạn (restriction fragment length polymorphism, viết tắt RFLP) và giải trình tự. Đây là hai phương pháp xác định các

đột biến điểm được sử dụng phổ biến và dễ dàng ứng dụng tại các cơ sở phân tích gen, khám chữa bệnh của Việt Nam hiện nay. Mục tiêu của của nghiên cứu này là: (1) Tối ưu hóa quy trình xác định các đa hình NAT2*5, *6 và *7 trên mẫu máu bệnh nhân mắc lao tại Việt Nam, (2) Áp dụng quy trình để xác định kiểu gen của một số bệnh nhân lao.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành theo phương pháp mô tả cắt ngang, sử dụng phương pháp chọn mẫu thuận tiện. Đối tượng nghiên cứu là 84 bệnh nhân mắc lao tại Bệnh viện Phổi Trung ương, Bệnh viện Phổi Hà Nội, Bệnh viện 74 Trung. Nghiên cứu tuân thủ theo quy định và được thông qua bởi Hội đồng đạo đức của Khoa Y Dược, ĐHQG Hà Nội. Các thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm của Bộ môn Y dược học Cơ sở, Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội.

Thu thập và bảo quản mẫu máu: Mẫu máu toàn phần lấy từ tĩnh mạch của bệnh nhân được bảo quản trong ống chuyên dụng chống đông bằng EDTA, lưu ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Tách chiết ADN tổng số: ADN tổng số được tách chiết từ 84 mẫu máu bằng E.Z.N.A Blood DNA mini kit (Omega-Biotek). Kết quả thu được được đánh giá chất lượng thông qua điện di trên gel agarose 1,2 %, sử dụng thang chuẩn DNA λ /HindIII ladder và đo quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260 nm và 280 nm.

Nhân dòng gen đoạn gen NAT2 bằng PCR: Cặp mồi 5'-GGA ACA AAT TGG ACT TGG-3' và 5'-TCT AGC ATG AAT CAC TCT GC-3' đã sử dụng trong một số nghiên cứu trước đây [11] được đặt tổng hợp hóa học ở công ty PHUSA Biochem (Việt Nam). Để có quy trình nhân dòng đặc hiệu và ổn định, chúng tôi tiến hành tối ưu nhiệt độ gắn mồi, nồng độ ADN khuôn tham gia phản ứng sử dụng Kapa2G Robust Hotstart ADN polymerase (Technismax). Chu trình nhiệt gồm 3 giai đoạn: biến tính 95 °C trong 3 phút; 35 chu kỳ: 95 °C

trong 10 giây, gắn mỗi trong 15 giây, 72 °C trong 60 giây; thời gian kéo dài cuối 72 °C trong 10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 1,5 %. Những sản phẩm nhân dòng thành công được tinh sạch bằng E.Z.N.A.® CyclePure Kit (Omega-biotek) trước khi tiến hành phân tích gen.

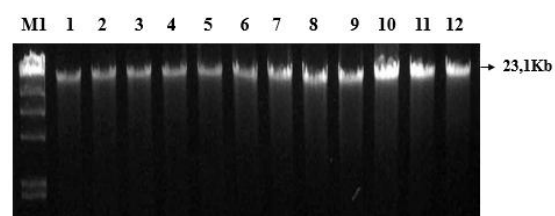
Xác định kiểu gen NAT2 bằng RFLP: Sản phẩm PCR sau khi được tinh sạch sẽ được pha loãng về nồng độ 100 ng/μl dùng cho phản ứng cắt. Các enzym cắt giới hạn loại FastDigest mua từ hãng Thermo Scientific. Alen NAT2*5 không có vị trí nhận biết của enzym cắt, tuy nhiên lại liên kết chặt chẽ với c.481C > T có vị trí nhận biết của *KpnI*. Chính vì vậy, chúng tôi xác định kiểu gen NAT2*5 thông qua kiểu gen của c.481C > T. Alen NAT2 *6, *7 được xác định thông qua phản ứng cắt với các enzym lần lượt là *TaqI*, *BamHI*. Mỗi phản ứng cắt có tổng thể tích 10 μl bao gồm 3,5 μl ADN, 1 μl 10X enzym Buffer, 1 μl FastDigest enzym và 4,5μl nước khử ion. Thời gian ủ chung cho các enzym cắt là 5 phút ở 37 °C, bất hoạt enzym trong 5 phút ở 80 °C. Sản phẩm cắt NAT2*5 và *7 được điện di trên gel agarose 2 %. Sản phẩm cắt NAT2*6 điện di trên gel acrylamide 10 %, hiện hình bằng phương pháp nhuộm bạc.

Xác định kiểu gen bằng giải trình tự. Sản phẩm PCR sau khi tinh sạch sẽ gửi đến hãng First base (Malaysia) để giải trình tự. Kết quả gửi về sẽ được phân tích trên phần mềm BioEdit version 7.1.9, qua đó xác định kiểu gen của bệnh nhân.

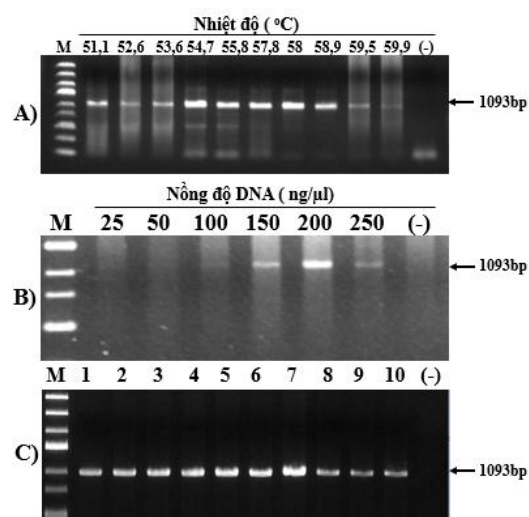
3. Kết quả

Tách chiết DNA tổng số: DNA tổng số được tách chiết thành công với một băng DNA rõ nét, cho thấy DNA thu được ít bị đứt gãy. Chất lượng DNA từ các mẫu khác nhau tương đối đồng đều và ổn định, thể hiện qua các băng điện di có độ sáng cao. Kết quả đo quang phổ hấp thụ cho chỉ số OD_{260/280} dao động trong khoảng từ 1,6 đến 2,0. Kết quả này cho thấy

DNA đảm bảo độ tinh sạch và đủ điều kiện để tiến hành phản ứng nhân dòng tiếp theo.



Hình 1. Kết quả DNA tổng số tách chiết điện di trên gel agarose 1,2%.Làn M1: thang chuẩn DNA λ/HindIII; Làn 1 – 12: sản phẩm DNA tổng số của 12 mẫu nghiên cứu.



Hình 2. Kết quả tối ưu phản ứng PCR nhân dòng gen NAT2 trên gel agarose 1,5%. (A) Kết quả tối ưu nhiệt độ gắn mỗi DNA; (B) Kết quả tối ưu nồng độ; (C) Kết quả nhân dòng gen NAT2 10 của mẫu nghiên cứu theo điều kiện tối ưu. Làn M: O Gene Ruler Ladder DNA marker, Làn (-): đối chứng âm.

Nhân dòng gen đoạn gen NAT2 bằng PCR: Chúng tôi tiến hành PCR trên 10 nhiệt độ khác nhau trong dải nhiệt từ 51,1 °C đến 59,9 °C. Nồng độ DNA nhân dòng tối ưu được xác định từ dải nồng độ của mẫu lần lượt là 25, 50, 100, 150, 200 và 250 ng/μl. Kết quả điện di trên Hình 2A cho thấy tại nhiệt độ gắn mỗi 58°C cho băng sáng nhất nên được chọn là nhiệt độ gắn mỗi cho các phản ứng tiếp theo. Kết quả điện di trên Hình 2B cho thấy PCR thành công

với nồng độ DNA tổng số từ 150-250 ng/μl, tuy nhiên nồng độ DNA khuôn tối ưu nhất là 200 ng/μl. Dựa vào kích thước của marker, chúng tôi nhận thấy đã nhân dòng thành công 33 mẫu bệnh phẩm trong nghiên cứu với kích thước phù hợp với kích thước tính toán lý thuyết ban đầu là 1093 bp. Hình 2C là ảnh điện di sản phẩm nhân dòng gen NAT2 của một số bệnh nhân lao. Tất cả các thí nghiệm đều có đối chứng âm đảm bảo mẫu nghiên cứu không bị ngoại nhiễm.

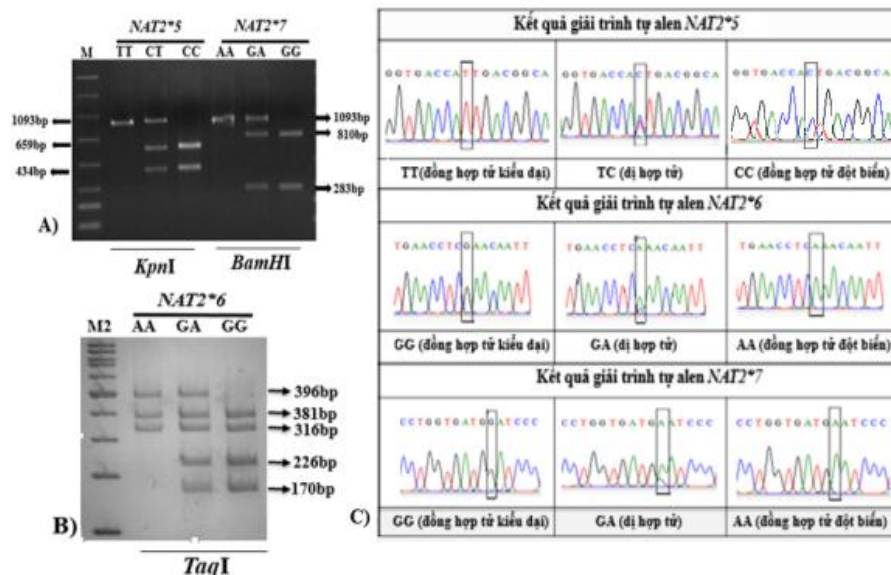
Xác định kiểu gen NAT2 bằng RFLP.

Xác định kiểu gen NAT2*5 bằng KpnI: KpnI cắt alen kiểu dại 481C thành 2 băng có kích thước 659 bp và 434 bp và không cắt đối với alen đột biến 481T. Chính vì vậy, kiểu gen đồng hợp tử kiểu dại CC sẽ cho hai băng với kích thước là 659 bp và 434 bp; kiểu gen dị hợp tử CT cho ba băng có kích thước lần lượt là 1093, 659 và 434 bp; kiểu gen đồng hợp tử đột biến TT không bị cắt cho một băng với kích thước 1093 bp. Từ kết quả nghiên cứu về alen 481C, chúng tôi xác định alen NAT2*5 bởi vì khi xảy ra đột biến 481T thì đồng thời cũng xảy

ra đột biến thay 341C và ngược lại (Hình 3A).

Xác định kiểu gen NAT2*6 bằng TaqI: TaqI có 3 vị trí nhận biết của alen kiểu dại G và chỉ có 2 vị trí nhận biết của alen đột biến A. Chính vì vậy, kiểu gen đồng hợp tử kiểu dại GG sau khi cắt bằng enzym giới hạn sẽ cho 4 băng điện di với kích thước 316, 226, 170 và 381 bp. Kiểu gen dị hợp tử GA cho 5 băng điện di với kích thước 396, 381, 316, 226 và 170 bp. Kiểu gen đồng hợp tử đột biến AA sẽ cho 3 băng điện di với kích thước 396, 381 và 316 bp (Hình 3B).

Xác định kiểu gen NAT2*7 bằng BamHI: BamHI cắt alen kiểu dại G thành 2 băng có kích thước 810 bp và 283 bp và không cắt đối với alen đột biến A. Chính vì vậy, kiểu gen đồng hợp tử kiểu dại GG sẽ cho 2 băng với kích thước 810 bp và 283 bp, kiểu gen dị hợp tử GA cho 3 băng với kích thước 1093, 810 và 283 bp. Kiểu gen đồng hợp tử đột biến AA không bị cắt cho 1 băng duy nhất với kích thước 1093 bp (Hình 3A).



Hình 3. Phân tích kiểu gen NAT2 dựa vào RFLP (A, B) và giải trình tự (C). (A) Các kiểu gen NAT2*5, *7 điện di trên gel agarose 2%. (B) Kiểu gen NAT2*6 điện di trên gel acrylamide 10%. Làn M: 100 bp DNA marker. Làn M2: Lonza DNA marker.

Xác định kiểu gen NAT2 bằng giải trình tự: Giải trình tự là tiêu chuẩn vàng để xác định các đột biến điểm. Trên phần mềm BioEdi version 7.1.9, mỗi loại nucleotit được thể hiện bằng một đỉnh với màu đặc trưng (A: màu xanh lá cây, C: màu xanh da trời, G: màu đen, T: màu đỏ). Hình 3 là kết quả giải trình tự thu được sau khi phân tích 33 bệnh nhân. Tiến hành phân tích kiểu gen bằng RFLP và giải trình tự cho kết quả khớp nhau 100% cho thấy độ chính xác cao của 2 phương pháp. Như vậy, cả hai phương pháp này đều có thể dùng để phân tích gen NAT2 một cách độc lập.

84 bệnh nhân lao đều xác định được kiểu gen NAT2 thành công với quy trình phân tích được xây dựng và tối ưu. Với NAT2*5, có 78 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử kiểu dại TT, 10 bệnh nhân có kiểu gen dị hợp tử TC và 1 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử đột biến CC. Với NAT2*6, có 41 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử kiểu dại GG, 31 bệnh nhân có kiểu gen dị hợp tử GA và 12 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử đột biến AA. Với NAT2*7, có 66 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử kiểu dại GG, 16 bệnh nhân có kiểu gen dị hợp tử GA và 2 bệnh nhân có kiểu gen đồng hợp tử đột biến AA.

4. Bàn luận

Trên thế giới hiện nay có nhiều phương pháp phân tích SNP được sử dụng như sử dụng đầu dò DNA (DNA probe), phân tích đa hình cấu tạo sợi đơn (single strand conformational polymorphism), giải trình tự, phân tích đa hình độ dài đoạn cắt giới hạn (RFLP), sắc ký lỏng cao áp biến tính (Denaturing high performance liquid chromatography), phân tích DNA bằng vi dãy (DNA microarray),... Với gen NAT2 hầu hết các nghiên cứu sử dụng hai phương pháp là giải trình tự và RFLP. RFLP có ưu điểm là kỹ thuật thao tác đơn giản, cho kết quả nhanh, có độ tin cậy cao và chỉ yêu cầu các thiết bị nghiên cứu cơ bản cho phân tích gen như máy PCR và hệ thống điện di nên nhiều cơ sở có thể áp dụng. Để phân tích 3 SNP đã nêu của NAT2,

hiện nay giá thành của RFLP rẻ bằng 1/3 so với giải trình tự, phân tích và trả kết quả 6 tiếng (bằng thời gian nếu tự giải trình tự). Tuy nhiên để hạ chi phí giải trình tự Sanger, các cơ sở thường phải gom tối thiểu 8 phản ứng cho mỗi lần chạy. Nếu gửi giải trình tự tại cơ sở khác, thời gian phân tích sẽ dài hơn do mất thêm thời gian chuyển mẫu. Tuy nhiên, RFLP chỉ phân tích được 1 đột biến trên gen NAT2 với mỗi loại enzym cắt. Đối với phương pháp giải trình tự, hiện nay giá thành mẫu phân tích ngày càng giảm, số lượng các cơ sở có máy giải trình tự trong nước ngày càng nhiều. Vì vậy, tại các cơ sở y tế nghiên cứu không có hệ thống giải trình tự vẫn có thể tiến hành gửi mẫu sang cơ sở khác đọc. Ưu điểm chính của giải trình tự là cung cấp đầy đủ thông tin về các điểm đột biến có trong phân đoạn gen được khuếch đại, vì vậy rất phù hợp cho các nghiên cứu chưa xác định rõ được đa hình liên quan đến bệnh lý quan tâm. Trong nghiên cứu này, cặp mồi sử dụng cho phép nhân dòng toàn bộ vùng gen mã hóa cho enzym NAT2, vì vậy ngoài alen *5, *6, *7 thì các alen khác cũng được xác định. Như vậy, khi áp dụng vào thực hành lâm sàng, đối với các bệnh nhân yêu cầu gửi kết quả sớm, phương pháp RFLP thể hiện rõ ưu điểm về thời gian. Còn với các nghiên cứu xác định mối liên quan giữa các đột biến trên gen NAT2 với một bệnh lý nào đó, giải trình tự là lựa chọn để cung cấp tối đa các thông tin di truyền trên gen NAT2 của bệnh nhân.

Kết quả nghiên cứu trên 84 bệnh nhân cho thấy quy trình phân tích kiểu gen NAT2 của chúng tôi đảm bảo tính chính xác, độ lặp lại và ổn định. Việc nhân dòng gen NAT2 có kích thước dài hơn 1 kb thường gây khó khăn trong quá trình khuếch đại gen. Bên cạnh đó, bệnh nhân lao thường phải điều trị phối hợp nhiều thuốc, các thuốc có thể tồn lưu trong mẫu DNA thu được và ức chế PCR. Chính vì vậy, chúng tôi lựa chọn Kapa2G™ Robust Hotstart Ready Mix với ưu điểm là khả năng khuếch đại gen dù có hiện diện của một số chất ức chế PCR hoặc với các mẫu DNA có độ tinh sạch thấp. Ngoài hoạt tính 5'-3' DNA polymerase, Kapa2G còn

có hoạt tính 5'-3' exonuclease cho phép tăng độ chính xác trong quá trình khuếch đại gen. Ngoài ra, dòng sản phẩm này giúp giảm 20% -50% thời gian thao tác so với các dòng enzym polymerase khác. Ngoài enzym Kapa2G, HotStartTaq DNA polymerase của hãng QIAGEN cũng được chúng tôi thử nghiệm và cho thấy kết quả nhân dòng với hiệu suất và độ đặc hiệu cao hơn hẳn các dòng enzym như Pfu polymerase.

Các biến thể di truyền *NAT2* đóng vai trò quan trọng trong khả năng acetyl hóa của gan, có thể tác động đến chuyển hóa thuốc và tính nhạy cảm với một số bệnh nhất định. Tốc độ acetyl hóa là không đổi ở một cá thể, nhưng biến đổi giữa các bệnh nhân khác nhau. Phần lớn các nghiên cứu bỏ qua phân tích các đa hình không làm thay đổi chức năng của enzym, tập trung vào số ít các đột biến "chỉ thị" cho phép dự đoán được trạng thái acetyl hóa như *NAT2**5,*6 và *7. Dựa vào kết quả phân tích kiểu gen tại 3 vị trí trên, kiểu hình acetyl hóa được xác định như sau: nếu không có alen đột biến thì bệnh nhân có kiểu hình acetyl hóa nhanh, nếu có một alen đột biến thì bệnh nhân có kiểu hình acetyl hóa trung gian, nếu xuất hiện trên 2 đột biến thì bệnh nhân có kiểu hình acetyl hóa chậm [6]. Ngoài ra, thuật toán và phần mềm dự đoán kiểu hình acetyl hóa dựa vào kiểu gen *NAT2* cũng đã được công bố. Nếu kết hợp kiểu gen của 6 SNP là c.282C>T, c.341T>C, c.481C>T, c.590G>A, c.803A>G và c.857G>A, dự đoán kiểu hình acetyl hóa có thể đạt được độ chính xác 99,9%, độ nhạy và độ đặc hiệu từ 99,6 đến 100% [12]. Trong trường hợp cần xác định đồng thời nhiều SNP như vậy, giải trình tự Sanger lại là phương pháp kinh tế nhất.

Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã tiến hành xác định tỷ lệ các kiểu hình acetyl hóa, kết quả cho thấy tỷ lệ này là khác nhau giữa các chủng tộc, quốc gia [13]. Nhiều nghiên cứu về mối tương quan giữa kiểu gen với nồng độ INH trong huyết thanh, liều điều trị hiệu quả với mỗi kiểu hình acetyl hóa đã được tiến hành. Cụ thể, Kinzig-Schipper (2005) đã nghiên cứu về sự biến đổi dược động học của INH ở những người

tình nguyện khỏe mạnh sau khi dùng liều chuẩn. Nghiên cứu chỉ ra có mối quan hệ về nồng độ INH với các biến thể di truyền của *NAT2* và các đặc điểm nhân khẩu học. Nồng độ INH huyết thanh tăng lên ở các cá thể có kiểu hình acetyl hóa chậm do giảm hoạt tính enzym *NAT2* [3]. Trong một nghiên cứu của Parkin và cộng sự, bệnh nhân có kiểu hình acetyl hóa chậm có nồng độ INH trong huyết thanh cao hơn bệnh nhân acetyl hóa nhanh 4-6 lần sau 2 đến 6 giờ uống INH, kết quả này khiến các tác giả đề xuất phác đồ liều isoniazid riêng cho mỗi kiểu gen *NAT2* [14]. Nghiên cứu trên 172 bệnh nhân Nhật Bản đã chứng minh điều trị liều INH theo kiểu gen *NAT2* cải thiện rõ khả năng dung nạp thuốc so với phác đồ chuẩn. Kết quả của nghiên cứu cũng đưa ra tỷ lệ kiểu hình acetyl hóa chậm là 9,3% và acetyl hóa nhanh là 53,3% trong quần thể người Nhật. 78% bệnh nhân có kiểu hình acetyl hóa chậm điều trị theo phác đồ chuẩn được xác định có tổn thương gan do INH, trong khi điều trị liều INH theo kiểu gen *NAT2* ghi nhận không có bệnh nhân nào tổn thương gan do INH hoặc thất bại điều trị sớm [2].

NAT2 có vai trò quan trọng trong chuyển hóa của nhiều loại thuốc khác INH như hydralazine, procainamide, sulphamethazine, sulphonamide, nitrazepam,... Sự acetyl hóa chậm ảnh hưởng đến chuyển hóa thuốc và quá trình giải độc của cơ thể, có thể làm tăng nguy cơ mắc một số bệnh và phát sinh các phản ứng quá mẫn với các loại thuốc. Năm 1979, Lower và cộng sự lần đầu tiên chứng minh sự liên quan giữa kiểu hình acetyl hóa chậm với ung thư bàng quang [15], sau đó các tác giả khác chứng minh mối liên quan giữa đa hình gen *NAT2* với ung thư vú, ung thư đại tràng... Gần đây, một số nghiên cứu cho thấy người có kiểu hình *NAT2* acetyl hóa chậm tăng nguy cơ mắc các bệnh liên quan đến suy giảm chức năng thần kinh như Parkinson, Alzheimer. Như vậy, phân tích đa hình gen *NAT2* không chỉ có ý nghĩa trong dự đoán liều điều trị isoniazid mà còn có thể cung cấp thêm các dữ liệu liên quan đến đáp ứng của nhiều thuốc khác.

5. Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng được quy trình phân tích các đa hình *NAT2**5,*6,*7 bằng phương pháp RFLP và giải trình tự và áp dụng quy trình phân tích thành công kiểu gen của 84 bệnh nhân mắc lao. Kết quả này sẽ giúp phát triển các nghiên cứu tiếp theo về đa hình gen *NAT2* ứng dụng trong điều trị lâm sàng.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu sử dụng kinh phí từ đề tài nghiên cứu KHCN cấp nhà nước (Mã số HNQT/SPĐP/01.16) do PGS.TS Lê Thị Luyến chủ trì. Đề tài được Bộ Khoa học và công nghệ tài trợ, thuộc Chương trình hợp tác Song phương và Đa phương về khoa học và công nghệ đến năm 2020 và Chương trình Newton Fund Việt Nam.

Chúng tôi cũng xin chân thành cảm ơn Bệnh viện Phổi Trung Ương, Bệnh viện Phổi Hà Nội và Bệnh viện 74 Trung Ương đã cung cấp các mẫu phẩm phục vụ cho nghiên cứu.

Tài liệu tham khảo

- [1] U.A. Boelsterli, K.K. Lee, Mechanisms of isoniazid-induced idiosyncratic liver injury: emerging role of mitochondrial stress, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 29 (2014) 678–687.
- [2] A. Zabost, S. Brzezinska, M. Kozinska, M. Blachnio, J. Jagodzinski, Z. Zwolska, E. Augustynowicz-Kopec, Correlation of N-acetyltransferase 2 genotype with isoniazid acetylation in Polish tuberculosis patients, *Biomed Res Int.* 2013 (2013) 1-5.
- [3] M. Kinzig-Schippers, D. Tomalik-Scharte, A. Jetter, B. Scheidel, V. Jakob, M. Rodamer, I. Cascorbi, O. Doroshenko, F. Sorgel, U. Fuhr, Should we use N-acetyltransferase type 2 genotyping to personalize isoniazid doses? *Antimicrob Agents Chemother.* 49 (2005) 1733-8
- [4] K. Walker, G. Ginsberg, D. Hattis, D.O. Johns, K.Z. Guyton, B. Sonawane, Genetic polymorphism in N-Acetyltransferase (NAT): Population distribution of NAT1 and NAT2 activity, *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 12 (2009) 440-472.
- [5] G. Ramachandran, S. Swaminathan, Role of pharmacogenomics in the treatment of tuberculosis: a review, *Pharmacogenomics Pers Med.* 5 (2012) 89-98.
- [6] J. Azuma, M. Ohno, R. Kubota, S. Yokota, T. Nagai, K. Tsuyuguchi, Y. Okuda, T. Takashima, S. Kamimura, Y. Fujio, I. Kawase, Pharmacogenetics-based tuberculosis therapy research group, *NAT2* genotype guided regimen reduces isoniazid-induced liver injury and early treatment failure in the 6-month four-drug standard treatment of tuberculosis: a randomized controlled trial for pharmacogenetics-based therapy, *Eur J Clin Pharmacol.* 69 (2013) 1091-1101.
- [7] P.S. Adole, P.S. Kharbanda, S. Sharma, N-acetyltransferase 2 (*NAT2*) gene polymorphism as a predisposing factor for phenytoin intoxication in tuberculous meningitis or tuberculoma patients having seizures - A pilot study, *Indian J Med Res.* 143 (2016) 581-590.
- [8] WHO Scientific Group on Pharmacogenetics and World Health Organization, *Pharmacogenetics: report of a WHO scientific group*, World Health Organization Technical Report Series. (1973)
- [9] T.D. Da Silva, A.V. Felipe, J.M. De Lima, C.T. Oshima, N.M. Forones, N-Acetyltransferase 2 genetic polymorphisms and risk of colorectal cancer, *World J Gastroenterol.* 17 (2011) 760-765.
- [10] E.Y. Lau, J.S. Felton, F.C. Lightstone, Insights into the o-acetylation reaction of hydroxylated heterocyclic amines by human arylamine N-acetyltransferases: a computational study, *Chem Res Toxicol.* 19 (2006) 182-1190.
- [11] Ensembl - EBI, http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=8:18399844-18400844;v=rs1801280;vdb=variation;vf=1243314,2019 (Ensembl release 96 - April 2019).
- [12] I.B. Kuznetsov, M. McDuffie, R. Moslehi, A web server for inferring the human N-acetyltransferase-2 (*NAT2*) enzymatic phenotype from *NAT2* genotype, *Bioinformatics.* 25 (2009) 1185-1186.
- [13] P. Wang, K. Pradhan, X.B. Zhong, X. Ma, Isoniazid metabolism and hepatotoxicity, *Acta Pharm Sin B.* 6 (2016) 384-392.
- [14] M. Ohno, I. Yamaguchi, I. Yamamoto, T. Fukuda, S. Yokota, Slow N-acetyltransferase 2 genotype affects the incidence of isoniazid and rifampicin-induced hepatotoxicity, *Int J Tuberc Lung Dis.* 4 (2000) 256-261.
- [15] G.M. Lower, T. Nilsson, C.E. Nelson, H. Wolf, T.E. Gamsky, G.T. Bryan, N-acetyltransferase phenotype and risk in urinary bladder cancer: approaches in molecular epidemiology. Preliminary results in Sweden and Denmark, *Int J Epidemiol.* 36 (2007) 11-18.