

NGHIÊN CỨU GIÁ TRỊ ĐẶC ĐIỂM DƯỢC DI TRUYỀN CYP3A5 TRONG THEO DÕI NỒNG ĐỘ THUỐC TACROLIMUS Ở BỆNH NHÂN GHEP THẬN

ThS. TRẦN THỊ THU HUYỀN, TS. HOÀNG XUÂN SỬ
DS. NGUYỄN THỊ THANH HẰNG
Viện nghiên cứu Y dược học Quân sự
HV. TRẦN MẠNH THÁI
Lớp Dài hạn Y 51A, Hệ 2, Học viện Quân y
Phản biện khoa học: (1) TS. HOÀNG VĂN TỔNG
(2) TS. TRẦN BÁ HIẾU

TÓM TẮT: Nghiên cứu mô tả cắt ngang có phân tích, so sánh 57 mẫu máu ngoại vi bệnh nhân sau ghép thận sử dụng cho tách DNA xác định đa hình di truyền CYP3A5, tại Khoa Thận, lọc máu, Bệnh viện Quân y 103. **Kết quả:**

- Xác định đa hình gen CYP3A5: Bệnh nhân mang kiểu gen hoang dại CYP3A5*1/*1 là 3,5%, kiểu gen dị hợp CYP3A5*1/*3 là 45,6% và kiểu gen đột biến CYP3A5*3/*3 là 50,9%.

- Phân tích sự liên quan giữa kiểu gen CYP3A5 và nồng độ Tacrolimus: Bệnh nhân mang kiểu gen CYP3A5*1*1 + CYP3A5*1*3 có nồng độ đáy của Tacrolimus thấp hơn so với bệnh nhân mang kiểu gen đột biến CYP3A5*3*3 tại thời điểm tuần 1, tháng 1 và tháng 3 ($7,85 \pm 3,16$ so với $10,38 \pm 3,16$; $7,30 \pm 3,38$ so với $11,74 \pm 5,10$ và $7,14 \pm 3,46$ so với $9,73 \pm 2,61$; $p < 0,001$). Bệnh nhân mang kiểu gen CYP3A5*1*1 + CYP3A5*1*3 có tỉ số giữa nồng độ đáy và liều thấp hơn so với bệnh nhân mang kiểu gen đột biến CYP3A5*3*3 tại thời điểm tuần 1, tháng 1 và tháng 3.

Từ khóa: CYP3A5, Tacrolimus, ghép thận

ABSTRACT: Cross-sectional descriptive study with analysis, comparing 57 peripheral blood samples of patients after kidney transplant used for DNA separation determined with CYP3A5 genetic polymorphism, at the Department of Kidney and Haemodialysis, Military hospital 103. **Result:**

- Determination of CYP3A5 genetic polymorphism: Patients with wild genotype CYP3A5 *1/*1 was 3.5%, heterozygous genotype CYP3A5 *1/*3 was 45.6% and mutant genotype CYP3A5 *3/*3 was 50.9%.

- Analysis of relationship between CYP3A5 genotype and Tacrolimus concentration: Patients with the CYP3A5 *1*1 + CYP3A5 *1*3 genotypes had trough concentrations of Tacrolimus lower than patients with the mutant genotype CYP3A5 *3*3 at the moment of week 1, month 1 and month 3 (7.85 ± 3.16 vs 10.38 ± 3.16 ; 7.30 ± 3.38 vs 11.74 ± 5.10 and 7.14 ± 3.46 vs 9.73 ± 2.61 ; $p < 0.001$). Patients with the CYP3A5 *1*1 + CYP3A5 *1*3 genotypes had the ratio of trough concentrations and dose lower than patients with the mutant genotype CYP3A5 *3*3 at the moment of week 1, month 1, and month 3.

Keywords: CYP3A5, Tacrolimus, kidney transplant.

Chịu trách nhiệm nội dung: ThS. Trần Thị Thu Huyền, SĐT: 0966188882.

Ngày nhận bài: 15/01/2021; mời phản biện khoa học: 02/2021; chấp nhận đăng: 15/3/2021.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ.

Hiện nay, ghép thận là phương pháp điều trị thay thế hiệu quả nhất cho bệnh nhân (BN) suy thận giai đoạn cuối. Kết quả ghép thận ngày càng được cải thiện, giúp nâng cao chất lượng cuộc sống người bệnh. Đặc biệt gần đây, sự ra đời của các thuốc ức chế miễn dịch mới đã làm giảm đáng kể tỉ lệ thải thận ghép. Tuy nhiên, vẫn có một tỉ lệ đáng kể BN xuất hiện rối loạn chức năng thận tiến triển theo thời gian, thải ghép mạn tính và thậm chí mất mô ghép.

Tacrolimus hiện là lựa chọn đầu tiên trong phác đồ chuẩn điều trị ức chế miễn dịch ở hầu hết các

trung tâm ghép tạng ở châu Âu, Hoa Kỳ, hay Việt Nam. Một điểm đặc trưng của Tacrolimus là có khoảng điều trị hẹp, sự biến thiên lớn về dược động học cũng như đáp ứng điều trị trong cùng một cá thể và giữa các cá thể [1, 2]. Do đó, việc theo dõi nồng độ thuốc điều trị là yêu cầu bắt buộc trong quá trình sử dụng Tacrolimus ở BN ghép thận.

Các khuyến cáo gần đây thống nhất duy trì nồng độ đáy của Tacrolimus (C trough, C0) ở khoảng từ 5-15 ng/ml để bảo đảm nồng độ đích tối ưu trong điều trị chống thải ghép, giảm thiểu độc tính của thuốc, cũng như tránh các nhiễm trùng cơ hội mắc phải khi BN sử dụng Tacrolimus nồng độ quá cao [3].

Ngày nay, kĩ thuật xét nghiệm phân tích được di truyền không chỉ phát hiện các đa hình nucleotide đơn (single nucleotide polymorphisms - SNPs), mà toàn bộ trình tự gen đã có thể được xác định ở nhiều trung tâm giải mã gen trên thế giới. Cục quản lí thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ (Food and Drug Administration - FDA) đã đưa thông tin được di truyền vào nhãn sản phẩm của hơn 150 loại thuốc được phê duyệt gần đây, hướng dẫn các bác sĩ lâm sàng thuận tiện trong việc đưa ra phác đồ và liều điều trị phù hợp. Một số nghiên cứu đã chỉ ra: nồng độ thuốc Tacrolimus trong máu bị ảnh hưởng bởi đa hình di truyền của CYP3A4, CYP3A5 và ABCB1, trong đó, điểm đa hình di truyền của CYP3A5 được tập trung nghiên cứu nhiều nhất. Ảnh hưởng của kiểu gen CYP3A5 tại điểm đa hình G6986A (rs776746) đã được nghiên cứu chủ yếu ở BN điều trị Tacrolimus liều lượng chuẩn sử dụng 2 lần/ngày. Dữ liệu gần đây cũng cho thấy, kiểu gen CYP3A5 có tác động tương tự đối với liều chuẩn khi sử dụng 1 lần/ngày [4, 5, 6].

Tại Việt Nam, các công trình nghiên cứu về đặc điểm được di truyền của Tacrolimus ở BN ghép thận hiện còn hạn chế. Chúng tôi thực hiện đề tài này nhằm xác định tỉ lệ phân bố kiểu gen CYP3A5 ở BN ghép thận; phân tích sự liên quan giữa kiểu gen CYP3A5 với nồng độ Tacrolimus ở BN ghép thận.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.

2.1. Đối tượng nghiên cứu:

57 mẫu máu ngoại vi của 57 BN sau ghép thận tại Khoa Thận, lọc máu, Bệnh viện Quân y 103, được sử dụng cho tách DNA xác định đa hình di truyền CYP3A5.

2.2. Phương pháp nghiên cứu:

- Thiết kế nghiên cứu: mô tả cắt ngang có phân tích so sánh.

- Các kĩ thuật sử dụng:

+ Tách chiết và tinh sạch DNA tổng số: DNA được tách chiết từ tế bào máu ngoại vi của BN đủ cho các phản ứng PCR sử dụng bộ kit của QIA amp DNA Blood Kit (Qiagen). Nồng độ DNA được đo bằng máy Nano Drop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Hoa Kỳ), các mẫu DNA được bảo quản ở - 20°C cho đến khi sử dụng cho phản ứng PCR.

+ Kĩ thuật khuếch đại đoạn gen có chứa điểm đa hình rs776746 G/A. Cặp mồi sử dụng cho phản ứng PCR và giải trình tự gen được đặt tổng hợp bởi hãng IDT (Hoa Kỳ)

+ Kĩ thuật sử dụng phản ứng cắt enzyme giới hạn: sử dụng enzyme Sspl để cắt sản phẩm PCR.

+ Kĩ thuật giải trình tự gen: sản phẩm nhân gen được tinh sạch bằng kit Gene JET PCR Purification Kit (Thermo Fisher, Hoa Kỳ), giải trình tự trực tiếp trên hệ thống Beckman Cloulter CEQ 2000.

+ Định lượng nồng độ Tacrolimus trên hệ thống UPLC/MS/MS.

- Xử lí số liệu: nhập số liệu bằng phần mềm Excel 2013; phân tích, thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0 với các thuật toán thống kê χ^2 cho biến phân loại, T student và Mann-Whithney cho biến định lượng; $p < 0,05$ được xem là có ý nghĩa thống kê.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.

3.1. Đặc điểm chung của nhóm nghiên cứu:

Bảng 1. Đặc điểm chung của BN nghiên cứu.

Đặc điểm		Số BN	Tỉ lệ %
Giới tính	Nam	39 BN	(68,4%)
	Nữ	18 BN	(31,6%)
Tuổi ($\pm$ SD)		38,70 $\pm$ 10,25	
HLA ($\pm$ SD)		3,53 $\pm$ 1,42	
Creatinin T0 (μ mol/ml)		98,32 $\pm$ 22,13	
Nhiễm BK virus (%)		37 BN	64,9%
log BK viremia ($\pm$ SD)		3,56 $\pm$ 1,12	
log BK viruria ($\pm$ SD)		4,83 $\pm$ 2,65	

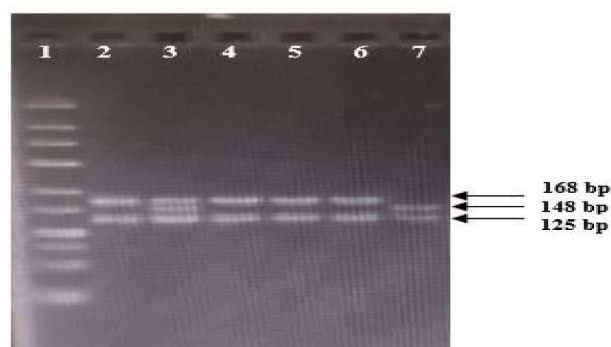
Độ tuổi trung bình của BN là 38,70 $\pm$ 10,25 tuổi. Tỉ lệ BN nam chiếm 68,4%, nữ chiếm 31,6%.

Các chỉ số xét nghiệm gồm: điểm hòa hợp HLA trung bình là 3,53 $\pm$ 1,42 điểm; nồng độ creatinine tháng đầu sau ghép (T0) là 98,32 $\pm$ 22,13 μ mol/ml; tỉ lệ nhiễm BK virus được quan sát là 64,91%, trong đó tải lượng BK virus trong máu và trong nước tiểu lần lượt là 3,56 $\pm$ 1,12 và 4,83 $\pm$ 2,65.

3.2. Xác định đa hình gen CYP3A5 ở BN ghép thận:

Khi tiến hành xác định kiểu gen bằng phương pháp PCR-RFLP, kết quả cho thấy BN mang kiểu gen hoang dại CYP3A5*1/*1 là 2/57 (3,5%), kiểu gen dị hợp CYP3A5*1/*3 là 26/57 (45,6%) và kiểu gen đột biến CYP3A5*3/*3 là 29/57 (50,9%).

Để khẳng định sự chính xác của phương pháp PCR-RFLP xác định kiểu gen CYP3A5, chúng tôi tiến hành giải trình tự so sánh kết quả quan sát sự phù hợp 100% giữa hai phương pháp (kết quả được minh họa ở hình 1 và 2).



Hình 1. Hình ảnh điện di phân biệt kiểu gen CYP3A5 bằng enzyme cắt giới hạn Sspl.



Hình 2. Phân bố kiểu gen CYP3A5 ở BN ghép thận.

3.3. Phân tích mối liên quan giữa kiểu gen CYP3A5 với các đặc điểm chung của BN ghép thận:

Bảng 2. So sánh đặc điểm chung của BN giữa hai nhóm mang kiểu gen CYP3A5*1*1 + CYP3A5*1*3 với CYP3A5*3*3.

Thông số		CYP3A5*1*1 + CYP3A5*1*3	CYP3A5*3*3	p
Giới tính	Nam	18 (31,58%)	21 (36,84%)	0,167
	Nữ	10 (17,54%)	8 (14,04%)	
Tuổi ($\pm$ SD)		38,32 $\pm$ 10,36	39,07 $\pm$ 10,31	0,786
Creatinin To ($\pm$ SD)		96,76 $\pm$ 18,15	99,83 $\pm$ 25,64	0,678
Creatinin T1 ($\pm$ SD)		98,33 $\pm$ 19,52	107,32 $\pm$ 32,18	0,355
Nhiễm BK virus		19 (33,33%)	18 (31,57%)	0,647
log BK viremia ($\pm$ SD)		3,30 $\pm$ 0,95	3,71 $\pm$ 1,21	0,374
log BK viruria ($\pm$ SD)		4,86 $\pm$ 2,49	4,80 $\pm$ 2,89	0,939
Kiểu gen BKV	I	9 (47,37%)	7 (36,84%)	1
	IV	2 (10,53%)	1 (5,26%)	

Để xác định vai trò của kiểu gen CYP3A5 với các đặc điểm chung của BN, chúng tôi phân tích, so sánh các chỉ số của hai nhóm BN mang kiểu gen hoang dại và dị hợp với nhóm BN mang kiểu gen đột biến. Kết quả phân tích cho thấy, khác biệt không có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm liên quan đến tuổi, giới tính, nồng độ creatinine và đặc điểm của nhiễm BK virus.

3.4. Phân tích sự liên quan giữa kiểu gen CYP3A5 và nồng độ Tacrolimus:

Bảng 3. Sự liên quan giữa kiểu gen CYP3A5 và nồng độ Tacrolimus.

Thông số		CYP3A5*1*1 + CYP3A5*1*3	CYP3A5*3*3	p
Tacrolimus Co (ng/ml)		7,85 $\pm$ 3,16	10,38 $\pm$ 3,16	0,001
Tacrolimus C1 (ng/ml)		7,30 $\pm$ 3,38	11,74 $\pm$ 5,10	< 0,001
Tacrolimus C3 (ng/ml)		7,14 $\pm$ 3,46	9,73 $\pm$ 2,61	< 0,001
Tacrolimus C6 (ng/ml)		7,68 $\pm$ 4,40	8,13 $\pm$ 2,68	0,133
Tacrolimus Ctb (ng/ml)		5,99 $\pm$ 2,63	7,99 $\pm$ 1,96	< 0,001
Co/D		4,12 $\pm$ 2,06	5,44 $\pm$ 1,79	0,001
C1/D		3,82 $\pm$ 2,14	6,16 $\pm$ 2,75	< 0,001
C3/D		3,77 $\pm$ 2,39	5,09 $\pm$ 1,48	< 0,001
C6/D		4,04 $\pm$ 2,72	4,27 $\pm$ 1,55	0,131
Ctb/D		3,94 $\pm$ 2,20	5,24 $\pm$ 1,44	< 0,001
Nồng độ thuốc	< 6 (ng/ml)	9 (15,79%)	2 (3,5%)	0,012
	6-12 (ng/ml)	17 (29,8%)	18 (31,6%)	
	> 12 (ng/ml)	2 (3,5%)	9 (15,8%)	

Phân tích sự liên quan giữa kiểu gen CYP3A5 và nồng độ Tacrolimus trên BN ghép thận tại các thời điểm khác nhau giữa nhóm mang kiểu gen hoang dại kết hợp kiểu gen dị hợp tử với nhóm mang kiểu gen đột biến, kết quả cho thấy sự liên quan có ý nghĩa thống kê. BN mang kiểu gen CYP3A5*1*1 + CYP3A5*1*3 có nồng độ đáy của Tacrolimus thấp hơn so với BN mang kiểu gen đột biến CYP3A5*3*3 tại thời điểm tuần 1, tháng 1 và tháng 3 ($7,85 \pm 3,16$ so với $10,38 \pm 3,16$; $7,30 \pm 3,38$ so với $11,74 \pm 5,10$ và $7,14 \pm 3,46$ so với $9,73 \pm 2,61$; $p < 0,001$). So sánh về tỉ số giữa nồng độ đáy/liều cũng thấy, nhóm BN mang kiểu gen CYP3A5*1*1 + CYP3A5*1*3 thì có tỉ số nồng độ đáy/liều thấp hơn so với nhóm BN mang kiểu gen đột biến CYP3A5*3*3 tại thời điểm tuần 1, tháng 1 và tháng 3.

4. BÀN LUẬN.

Vấn đề quan trọng là sau khi BN ghép thận, phải dùng các thuốc ức chế miễn dịch dài ngày để chống thải ghép và duy trì chức năng mô ghép, dẫn đến tiềm ẩn nguy cơ mắc phải các nhiễm trùng cơ hội hoặc độc tính của thuốc khi sử dụng liều quá cao. Vì vậy, sự cân bằng giữa nồng độ đích điều trị; yêu cầu tránh nguy cơ nhiễm trùng và độc tính đóng vai trò quan trọng trong theo dõi, quản lí BN sau ghép thận. Một số nghiên cứu đã chứng minh, trong thực hành lâm sàng, khi tăng gấp đôi liều Tacrolimus khởi đầu ở những BN biểu hiện CYP3A5, có thể giúp đạt được nồng độ đích điều trị tối ưu để dự phòng thải ghép và tránh độc tính của thuốc khi sử dụng liều quá cao [7].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng phương pháp PCR-RFLP để xác định kiểu gen CYP3A5 ở BN ghép thận. Phương pháp này có nhiều ưu điểm, như đơn giản, chính xác, không cần phải đầu tư các trang thiết bị hiện đại và sinh phẩm, hóa chất đắt tiền như realtime PCR hay giải trình tự gen. Kết quả so sánh với phương pháp giải trình tự gen cho thấy sự phù hợp 100% giữa hai phương pháp. Kết quả khảo sát cho thấy tỉ lệ BN mang kiểu gen của CYP3A5 cũng tương tự như các báo cáo gần đây ở các nước trong khu vực Đông Á và Đông Nam Á [8].

Đi sâu phân tích vai trò của kiểu gen CYP3A5 đối với các chỉ số xét nghiệm của BN ghép thận, không thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê liên quan đến tuổi, giới tính, HLA, nồng độ creatinine, đặc điểm nhiễm BK virus. Tuy nhiên, có sự liên quan rõ rệt với nồng độ đáy của Tacrolimus và tỉ số nồng độ đáy/liều của Tacrolimus giữa nhóm BN mang kiểu gen CYP3A5*1*1 và CYP3A5*1*3 so với nhóm BN mang kiểu gen CYP3A5*3*3 tại các thời điểm trong tuần 1, tháng 1 và tháng thứ 3.

Kết quả này tương tự báo cáo gần đây khi phân tích sự liên quan giữa đa hình di truyền CYP3A5 và nồng độ Tacrolimus trên 41 BN ghép thận ở Myanmar [8]. Điều này cho thấy, BN mang kiểu gen đột biến chuyển hóa Tacrolimus chậm hơn so với BN mang kiểu gen hoang dại và kiểu gen dị hợp. Như vậy, nếu các BN đều được cho liều lượng Tacrolimus như nhau ở các thời điểm trong vòng 3 tháng đầu sau ghép, thì những BN mang kiểu gen đột biến CYP3A5*3*3 sẽ có nguy cơ dẫn đến tổn thương thận ghép do độc tính của thuốc ở liều quá cao cũng như tiềm ẩn nguy cơ tăng các nhiễm trùng cơ hội mắc phải (như nhiễm CM virus và BK virus đã được báo cáo). Do đó, để tối ưu hóa liều lượng Tacrolimus điều trị BN ghép thận, bên cạnh việc theo dõi nồng độ thuốc thường quy thì việc xác định kiểu gen CYP3A5 sẽ giúp cá thể hóa điều trị cho từng BN ghép thận để tránh tác dụng không mong muốn của thuốc và các nhiễm trùng cơ hội mắc phải.

5. KẾT LUẬN.

Nghiên cứu 57 mẫu máu ngoại vi của 57 BN sau ghép thận, tại Khoa Thận, lọc máu, Bệnh viện Quân y 103, được sử dụng cho tách DNA xác định đa hình di truyền CYP3A5, kết quả:

- Xác định đa hình gen CYP3A5: 3,5% BN mang kiểu gen hoang dại CYP3A5*1*1, 45,6% BN mang kiểu gen dị hợp CYP3A5*1/*3 và 50,9% BN mang kiểu gen đột biến CYP3A5*3/*3.

- Phân tích sự liên quan giữa kiểu gen CYP3A5 với nồng độ Tacrolimus: BN mang kiểu gen CYP3A5*1*1 + CYP3A5*1*3 có nồng độ đáy của Tacrolimus thấp hơn so với BN mang kiểu gen đột biến CYP3A5*3*3 tại thời điểm tuần 1, tháng 1 và tháng 3 ($7,85 \pm 3,16$ so với $10,38 \pm 3,16$; $7,30 \pm 3,38$ so với $11,74 \pm 5,10$ và $7,14 \pm 3,46$ so với $9,73 \pm 2,61$; $p < 0,001$). BN mang kiểu gen CYP3A5*1*1 + CYP3A5*1*3 có tỉ số nồng độ đáy/liều thấp hơn so với BN mang kiểu gen đột biến CYP3A5*3*3 tại thời điểm tuần 1, tháng 1 và tháng 3.

TÀI LIỆU THAM KHẢO:

1. Staatz C.E. and S.E Tett (2004), "Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation", *Clin Pharmacokinetics*, 43 (10): pp. 623-53.
2. Mohammadpour N et al (2011), "A review on therapeutic drug monitoring of immunosuppressant drugs", *Iranian journal of basic medical sciences*, 14 (6): p. 485-498.
3. Böttiger Y et al (1999), "Tacrolimus whole blood concentrations correlate closely to side-effects in renal transplant recipients". *British journal of clinical pharmacology*, 48 (3): p. 445-448.

(Xem tiếp trang 199)