

NGHIÊN CỨU ĐA HÌNH ĐƠN GEN OPRM1 VÀ ABCB1 Ở BỆNH NHÂN NGHIỆN CHẤT DẠNG THUỐC PHIỆN ĐIỀU TRỊ METHADONE THAY THỂ

Nguyễn Quỳnh Giao¹, Trần Văn Chiếu¹, Trần Khánh Chi¹,
Vũ Văn Quý¹, Trịnh Thị Phương Dung¹,
Lê Hoàng Nam¹, Đặng Thị Ngọc Dung¹

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu dược lý di truyền học, biểu hiện của các đa hình đơn (Single nucleotide polymorphism – SNP) khác nhau có thể làm thay đổi đáp ứng với thuốc. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xác định đa hình nucleotid đơn rs1799971 gen OPRM1 và rs1045642 gen ABCB1 ở bệnh nhân điều trị methadone thay thế và đánh giá mối liên quan với liều điều trị. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả cắt ngang, 302 bệnh nhân được chẩn đoán lệ thuộc và các chất dạng thuốc phiện theo QĐ 3140/QĐ-BYT năm 2010 và nghị định 90/2016/NĐ-CP năm 2016 đang được điều trị methadone. **Kết quả:** Biến thể rs1799971 mang alen G có liều điều trị cao hơn so với cá thể mang alen A ($p = 0.044 < 0.05$). Không có sự khác biệt về liều điều trị giữa các biến thể rs1045642 gen ABCB1 với các cá thể hoang dại. **Kết luận:** Cung cấp cái nhìn thực tế về sự khác biệt giữa các cá nhân với liều điều trị ảnh hưởng bởi các đa hình gen.

Từ khóa: Dược lý di truyền học, đa hình đơn rs1799971, đa hình đơn rs1045642, gen ABCB1, gen OPRM1, liều methadone

SUMMARY

DETERMINE OPRM1, ABCB1 POLYMORPHISMS IN OPIOID- DEPENDENT PATIENTS UNDERGOING METHADONE MAINTENANCE THERAPY

The large interindividual variability of methadone maintenance dose therapy may be partially explained by the variations found in multiple genes that are involved in the pharmacokinetic and pharmacodynamic pathways of methadone. **Objective:** Determining OPRM1 rs1799971 and ABCB1 rs1045642 genotypes in patient undergoing methadone maintenance therapy and assessing relationship between genotypes and methadone doses **Material and methods:** Genomic DNA was extracted from 302 opioid-dependent patients and Sanger sequencing were conducted to determine the genotypes **Results:** In our study, with rs 1799971, individuals with G allele should take higher methadone dosage compared to those with A allele ($p = 0.044 < 0.05$). On the other hand, there is no significance difference with methadone dose between rs1045642 and wild-type carriers. **Conclusion:** These findings provide new insight to the fact that the interindividual variability of methadone dosage requirement is genetic polymorphism.

Keywords: Pharmacogenetic, rs1799971, OPRM1 gene, ABCB1 3435C>T, ABCB1 gene, methadone dose

¹Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Quỳnh Giao

Email: quynhgioa@hmu.edu.vn

Ngày nhận bài: 25.11.2021

Ngày phản biện khoa học: 30.11.2021

Ngày duyệt bài: 30.11.2021

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nghiện chất dạng thuốc phiện nói chung và ma túy nói riêng gây ra những tác hại nghiêm trọng về mặt sức khỏe, tổn hại về mặt xã hội. Methadone một chất chủ vận của receptor μ (receptor opioid), là thuốc giảm đau thuộc nhóm opioid được sử dụng để điều trị nhằm làm giảm các triệu chứng cai nghiện và thèm thuốc. Trong điều trị methadone có sự dao động lớn giữa liều lượng của các cá thể, có những cá thể với liều 2 mg/ngày đã có cải thiện giảm sử dụng heroin trong khi những bệnh nhân khác đòi hỏi với liều rất cao 160 mg/ngày. Dược lý di truyền học (pharmacogenetics) đã chứng minh phản ứng với thuốc trong điều trị sẽ gây ra các phản ứng và hiệu quả điều trị khác nhau dẫn đến sự khác biệt giữa các cá nhân trong quá trình điều trị. Trong nghiên cứu dược lý di truyền học, tập trung vào hai nội dung liên quan là dược động học (pharmacokinetic) và dược lực học (pharmacodynamic). Nghiên cứu về nội dung dược động học, gen OPRM1 (opioid receptor $\mu 1$) mã hóa thụ thể receptor $\mu 1$, là vị trí hoạt động chính của methadone được tập trung nghiên cứu trong đó có đa hình đơn rs1799971. Đa hình rs1799971 do sự thay thế acid amin asparagine thành aspartic (Asn40Asp) tại vị trí glycosyl hóa đầu tận ngoại bào của gen OPRM1 làm thay đổi cấu trúc và chức năng của thụ thể μ , làm thay đổi nhạy cảm thụ thể với opioid. Những cá thể mang alen G giảm hiệu lực với methadone do đó đòi hỏi liều opioid cao hơn để tạo ra hiệu quả điều trị¹⁻². Bên cạnh đó, đa hình gen ABCB1 được tập trung nghiên cứu liên quan đến dược lực học. Nhiều nghiên cứu tập trung vào c.3435C>T (dbSNP rs1045642) (exon 26), đây là một biến thể phổ biến trong vùng mã hóa của gen ABCB1³. Biến thể T của SNP này có liên

quan đến chức năng bị suy yếu và/hoặc giảm biểu hiện của p-glycoprotein in vitro và in vivo do đó cần liều điều trị cao hơn biến thể hoang dại. Tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về lĩnh vực dược lý di truyền học liên quan đến điều trị methadone

Do đó, đề tài này được thực hiện với mục tiêu: “Xác định đa hình nucleotid đơn rs1799971 gen OPRM1 và rs1045642 gen ABCB1 ở bệnh nhân điều trị thay thế bằng methadone và mối liên quan với liều điều trị”.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu:

Đối tượng nghiên cứu: 302 bệnh nhân được chẩn đoán lệ thuộc vào các chất dạng thuốc phiện điều trị methadone thay thế thỏa mãn các điều kiện sau:

+ Tuổi ≥ 18 tuổi

+ Đã đạt được liều điều trị methadone duy trì ít nhất 1 tháng cho tới thời điểm nghiên cứu với tiêu chuẩn đạt liều duy trì:

- Người bệnh được sử dụng liều có hiệu quả tối ưu duy trì trong ít nhất 4 tuần liên tục.

- Người bệnh không tái sử dụng CDTP trong ít nhất 4 tuần liên tục

Thiết bị và hóa chất sử dụng: Hóa chất và vật tư tiêu hao trong tách DNA, hóa chất khuếch đại gen, hóa chất chạy điện di.

Thời gian nghiên cứu: 11/2020 đến tháng 8/2021

Địa điểm nghiên cứu: Các cơ sở điều trị methadone tỉnh Ninh Bình, Đại học Y Hà Nội

2.2 Phương pháp nghiên cứu:

Phương pháp nghiên cứu: mô tả cắt ngang

Quy trình nghiên cứu:

- Tiến hành thu thập bệnh nhân

- Tách DNA từ máu toàn phần
 - Quy trình phân tích đa hình gen OPRM1
 + Trình tự mỗi rs1799971 trong nghiên cứu tự thiết kế với trình tự như sau
 Mỗi xuôi: 5'-CGCTTGGAACCCAAAAGTC- 3'
 Mỗi ngược: 5'-AGCCTTGGGAGTTAGGTGTCT- 3'
 + Trình tự mỗi rs1045642 trong nghiên cứu tự thiết kế với trình tự như sau:
 Mỗi xuôi: 5'-CAAAGTGTGCTGGTCCTGAAGT- 3'

Mỗi ngược: 5'-GTAAGGGTGTGATTTGGTTGCT- 3'
 + Tiến hành phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen OPRM1 và ABCB1 với 35 chu kỳ nhiệt
 + Điện di trên gel agarose phát hiện 2% phát hiện sản phẩm có mặt.
 + Tinh sạch sản phẩm PCR và giải trình tự

2.3 Đạo đức nghiên cứu: Đề cương nghiên cứu được thông qua Hội đồng đạo đức trường Đại học Y Hà Nội

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Bảng 3.1. Phân bố bệnh nhân theo nhân khẩu học (n = 302)

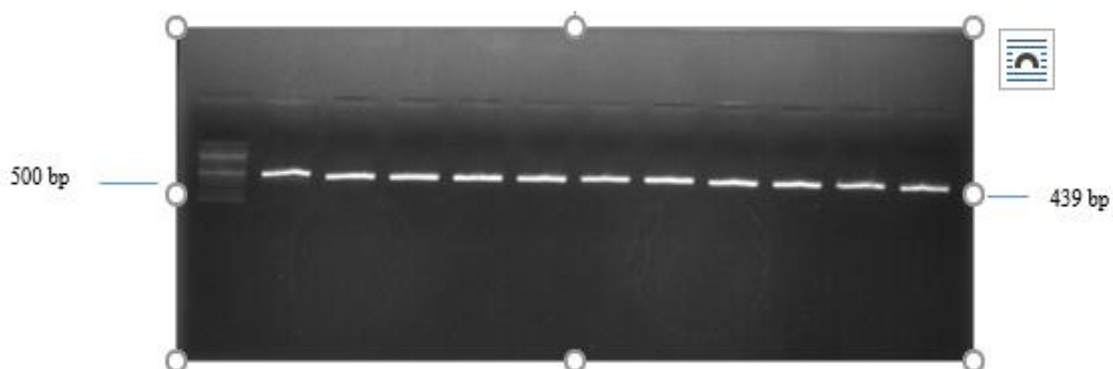
Đặc điểm	Số lượng	Tỷ lệ (%)
Giới tính		
Nam	301	99.6 %
Nữ	1	0.4 %
Tuổi		
< 30	21	7.0 %
30 - 39	122	40.4 %
40 - 49	121	40.1 %
≥ 50	38	12.6 %

Nhận xét: Tổng số có 302 bệnh nhân đủ tiêu chuẩn lựa chọn vào nghiên cứu hầu hết bệnh nhân là nam giới (99.6 %), chỉ có 1 bệnh nhân là nữ giới chiếm tỷ lệ 0.4 %. Phần lớn bệnh nhân của nghiên cứu nằm trong độ tuổi từ 30 – 39 với 40.4 %.

Bảng 3.2. Liều điều trị methadone của đối tượng nghiên cứu

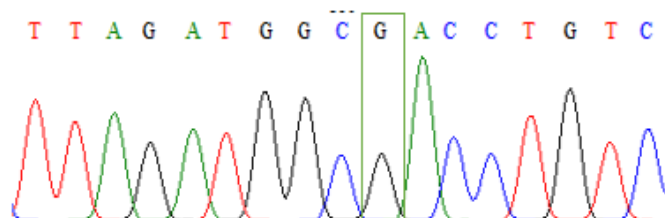
Liều methadone	Tổng số bệnh nhân	Tỷ lệ
Liều điều trị duy trì (mg/ngày)		
< 60 mg	138	45.7 %
60- 90 mg	119	39.4 %
>90 mg	45	14.9 %
Nhỏ nhất: 5 mg Trung bình 64.29 mg Lớn 275 mg		

Nhận xét: Liều duy trì điều trị methadone dao động rất lớn, nhỏ nhất 5 mg/ngày, lớn nhất là 275 mg/ngày. Liều điều trị trung bình là 64.29 mg/ngày.

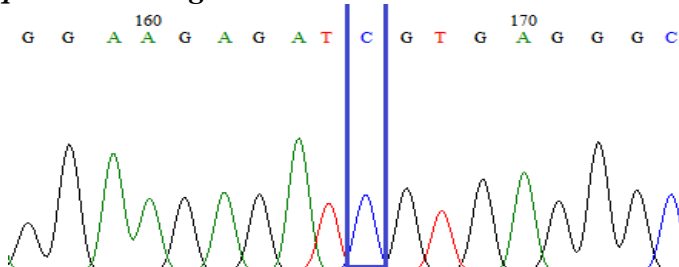


Hình 3.1. Hình ảnh khuếch đại gen OPRM1 chứa đa hình đơn rs1799971

Nhận xét: Sản phẩm khuếch đại chứa đa hình đơn rs1799971 có chiều dài 439 bp trên gel agarose 2% với hiệu điện thế 90V trong 40 phút. Băng điện di rõ nét, không có vạch phụ, đạt tiêu chuẩn cho bước tiếp theo giải trình tự đoạn gen khuếch đại. Kết quả thu được tương tự với sản phẩm khuếch đại chứa đa hình đơn rs1045642 gen ABCB1 với chiều dài 376 bp



Hình 3.2. Kết quả GTT kiểu gen GG đa hình đơn rs 1799971 trên BN mã 100043



Hình 3.2. Kết quả GTT kiểu gen CC đa hình đơn rs1045642 trên BN mã 100043

Nhận xét: Kết quả giải trình tự các kiểu gen với các đường baseline đạt tiêu chuẩn, hình ảnh rõ nét, các peak tương ứng các nucleotide cao, nhọn, cân đối.

Bảng 3.3. Đặc điểm alen và gen OPRM1

Tỷ lệ	Alen		Kiểu gen		
	A	G	AA	AG	GG
	354 58.6%	250 41.3%	103 34.0%	148 48.8%	51 17.2%
Tổng số	604		302		

Nhận xét: Tỷ lệ phân bố alen A và G trong nhóm nghiên cứu tương đương nhau. Tỷ lệ phân bố kiểu gen GG chiếm tỷ lệ nhỏ nhất là 15.6%, kiểu gen AG chiếm tỷ lệ cao nhất là 48.2%.

Bảng 3.4. Đặc điểm alen và gen ABCB1

Tỷ lệ	Alen		Kiểu gen		
	C	T	CC	CT	TT
	379 62.7%	225 37.3%	120 39.6%	139 45.9%	43 14.2%
Tổng số	604		302		

Nhận xét: Tỷ lệ phân bố alen C và T trong nhóm nghiên cứu với tỷ lệ 62.7 và 37.3%.

Bảng 3.5. Liều điều trị duy trì các kiểu gen đa hình đơn rs1799971

Kiểu gen	Liều điều trị duy trì	p
AA	58.74 ± 26.83	0.077
AG	64.29 ± 30.05	
GG	70.73 ± 31.53	
AA	58.74 ± 26.83	0.044*
AG + GG	65.94 ± 33.51	

Nhận xét: Liều điều trị methadone trung bình của cá thể mang alen G cao hơn so với các cá thể mang alen A, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p=0.044 < 0.05$)

Bảng 3.5. Liều điều trị duy trì các kiểu gen đa hình đơn rs1045642

Kiểu gen	Liều điều trị duy trì	p
CC	61.6 ± 29.57	0.472
CT	64.09 ± 33.55	
TT	66.77 ± 30.45	

Nhận xét: Liều điều trị methadone duy trì trung bình của cá thể CC, CT và TT không có sự khác biệt ($p > 0.05$)

Bảng 3.6: Liều điều trị duy trì của các đa hình đơn gen OPRM1 và ABCB1

Nhóm	OPRM1	ABCB1	Liều điều trị duy trì	p
Nhóm 1	AA	TT	67.64 ± 36.96	0.218
Nhóm 2	AA	CC/CT	59.55 ± 25.71	
	GG/AG	TT		
Nhóm 3	GG/AG	CC/CT	65.87 ± 34.51	

Nhận xét: Liều điều trị methadone trung bình của 3 nhóm kiểu gen phối hợp OPRM1 và ABCB1 không có sự khác biệt ($p = 0.218 > 0.05$).

IV. BÀN LUẬN

Đặc trưng nhóm nghiên cứu

Hầu hết các bệnh nhân tham gia nghiên cứu là nam giới (99.6%). Trong nghiên cứu của chúng tôi, tuổi từ 30 -39 chiếm 40.4% và

từ 40 – 49 chiếm 40.1%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với báo cáo mới nhất của FHI năm 2014, khi ghi nhận độ tuổi trung bình của những bệnh nhân điều trị Methadone là 31.4 tuổi, với nhóm tuổi từ 30

tuổi trở lên có tỷ lệ cao nhất⁴

Bàn luận về đa hình đơn rs1799971 gen OPRM1 với liều điều trị

Tần suất phân bố của các biến thể mang alen G ở các quần thể có sự khác nhau trong đó cao nhất ở quần thể Châu Á. Trong nghiên cứu của chúng tôi các biến thể mang alen G với tần suất phân bố là 41.3%. Nghiên cứu này tương đồng với các nghiên cứu về đa hình đơn trên quần thể người Nhật của Ide năm 2004 là 45.3%⁵. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy các cá thể mang alen G với liều điều trị duy trì cao hơn so với các thể mang alen A. Nghiên cứu của chúng tôi có tương đồng với nghiên cứu của Wang 2012¹. Giả thuyết cho rằng alen G làm giảm mức độ biểu hiện mRNA của thụ thể MOP dẫn đến làm giảm hiệu quả lâm sàng của opioid. Tuy nhiên có rất nhiều nghiên cứu cho thấy không có mối tương quan giữa các biến thể rs1799971 với liều điều trị methadone như nghiên cứu của Crettol⁶. Sự khác nhau giữa các nghiên cứu có thể giải thích do tác động của đa hình này liên quan đến sự hiện diện của các đa hình trong gen khác. Một lý do nữa liên quan đến sự không đồng nhất của các nghiên cứu là do đặc điểm các mẫu được nghiên cứu khác nhau, liều điều trị duy trì trong các quần thể khác nhau. Do vậy không thể khái quát hóa các phát hiện liên quan đến tác động đa hình của OPRM1 đối với liều methadone.

Bàn luận về đa hình đơn rs1045642 gen ABCB1 với liều điều trị

Biến thể ABCB1 với sự biến đổi alen C thành T tại vị trí nucleotid 3435 của exon 26. Mặc dù sự biến đổi không làm thay thế acid amin tuy nhiên nhiều giả thuyết cho rằng

biến thể TT liên quan đến mức giảm biểu hiện trên mRNA. Trong nghiên cứu của chúng tôi, không tìm thấy sự khác biệt giữa các kiểu gen ABCB1 với liều điều trị methadone duy trì. Nghiên cứu của Lervan khi đánh giá haplotype gen ABCB1 (1236C > T, 2677G > T, 3435C > T) cần liều điều trị methadone cao hơn⁷. Nghiên cứu này nhấn mạnh tầm quan trọng của việc đánh giá các haplotype ABCB1 hơn là đánh giá từng đa hình nucleotide đơn lẻ. Do đó nghiên cứu của chúng tôi cần phân tích phối hợp haplotype của gen ABCB1 để có thể đánh giá đầy đủ mối liên quan với liều điều trị.

V. KẾT LUẬN

Cá thể mang alen G của đa hình đơn rs1799971 gen OPRM1 đòi hỏi liều điều trị trung bình methadone cao hơn so với các cá thể mang alen A ($p = 0.044 < 0.05$).

KIẾN NGHỊ

Cần tiến hành phân tích phối hợp các đa hình đơn gen ABCB1 để đánh giá đầy đủ mối liên quan với liều điều trị

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Wang SC, Tsou HH, Chen CH, et al. Genetic polymorphisms in the opioid receptor mu1 gene are associated with changes in libido and insomnia in methadone maintenance patients. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology.* Oct 2012;22(10):695-703.
2. Bauer IE, Soares JC, Nielsen DA. The role of opioidergenic genes in the treatment outcome of drug addiction pharmacotherapy: A