

BƯỚC ĐẦU KHẢO SÁT BIẾN THỂ NUDT15 TRÊN BỆNH NHÂN BẠCH CẦU CẤP DÒNG LYMPHO BẰNG KỸ THUẬT GIẢI TRÌNH TỰ CHUỖI DNA

Cao Văn Đông¹, Hoàng Anh Vũ², Võ Thị Thanh Trúc¹,
Nguyễn Tấn Bình³, Phù Chí Dũng¹, Phan Thị Xinh³

TÓM TẮT

Mục tiêu: Biến thể NUDT15 trên tế bào mầm là một yếu tố quyết định quan trọng trong khả năng dung nạp thiopurine (6-MP: 6-mercaptopurine). Thuốc 6-MP được sử dụng trong điều trị bệnh bạch cầu cấp dòng lympho (BCCDL), đặc biệt sử dụng kéo dài trong giai đoạn duy trì. Các biến thể NUDT15 được khảo sát giúp lựa chọn liều 6-MP thích hợp cho người bệnh BCCDL.

Đối tượng và phương pháp: Từ tháng 6/2016 đến tháng 6/2017, 30 người bệnh BCCDL là trẻ em, được xác định biến thể NUDT15 bằng kỹ thuật giải trình tự chuỗi DNA tại Bệnh viện Truyền máu Huyết học.

Kết quả: Kết quả nghiên cứu cho thấy 23,3% (7 người bệnh) mang biến thể NUDT15, trong đó có 01 trường hợp mang biến thể p.R139C dạng đồng hợp tử, 04 trường hợp mang p.R139C dạng dị hợp tử, 01 trường hợp mang dị hợp tử p.V18_V19insGV và 01 trường hợp mang dị hợp tử kép p.V18_V19insGV và p.R139C. Ngoài ra, còn ghi nhận 01 người bệnh mang kiểu biến thể mới, p.R11Q dạng dị hợp tử. Các biến thể này có thể xuất hiện đồng thời trên 1 người bệnh. Hai trường hợp bao gồm biến thể dạng đồng hợp tử và dạng dị hợp tử kép thuộc nhóm nhạy 6-MP hơn.

Kết luận: Kết quả nghiên cứu đã giúp các bác sĩ lâm sàng lựa chọn liều thuốc 6-MP phù hợp cho từng người bệnh, là tiền đề cho việc triển khai ứng dụng xác định biến thể NUDT15.

Từ khóa: Bạch cầu cấp dòng lympho (BCCDL), trẻ em, biến thể NUDT15, 6-mercaptopurine, giải trình tự chuỗi DNA.

ABSTRACT

DETECTION OF NUDT15 VARIANTS IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA PATIENTS USING DIRECT DNA SEQUENCING

Cao Van Dong¹, Hoang Anh Vu², Vo Thi Thanh Truc¹,
Nguyen Tan Binh³, Phu Chi Dung¹, Phan Thi Xinh³

Objective: Germline NUDT15 variants is critical determinant of thiopurine intolerance (6-MP: 6-mercaptopurine). 6-MP is used for treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL), especially during maintenance therapy. NUDT15 variants were identified helping to select suitable 6-MP dose for ALL patients.

Subjects and Methods: From June 2016 to June 2017, 30 ALL patients were investigated for NUDT15 variants using direct sequencing method at the Blood Transfusion and Hematology Hospital.

Results: We found that 23.3% of the patients harbored NUDT15 variants, in which 1 patient was

1. BV Truyền máu Huyết học TP Hồ Chí Minh

2. Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh.

3. Sở Y tế TP. Hồ Chí Minh

- Ngày nhận bài (Received): 12/9/2017; Ngày phản biện (Revised): 2/10/2017;

- Ngày đăng bài (Accepted): 31/10/2017

- Người phản hồi (Corresponding author): Cao Văn Đông

- Email: caovdong18@gmail.com, ĐT: 0986878046

homozygous, 4 were heterozygous at p.R139C, and 1 patient was heterozygous at p.V18_V19insGV. In addition, 1 patient was heterozygous for NUDT15 p.V18_V19insGV in combination with p.R139C. We also detected a heterozygous for NUDT15 p.R11Q, which has not been reported before. These NUDT15 variants can occur in the same patients. The patients harboring homozygous and 2 heterozygous NUDT15 variants are more sensitive to 6-MP than other variants.

Conclusion: Results of this study help to select suitable 6-MP dose and to apply direct DNA sequencing technique for detection of NUDT15 variants in ALL.

Key words: Acute lymphoblastic leukemia (ALL), children, NUDT15 variants, 6-Mercaptopurine, direct DNA sequencing.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạch cầu cấp dòng lympho (BCCDL) đặc trưng bởi sự gia tăng quá mức của các tế bào lympho chưa trưởng thành, lấn át các tế bào bình thường trong tủy xương gây nhiễm trùng, thiếu máu, xuất huyết. BCCDL có nhiều thể khác nhau và có thể được phân loại dựa vào hình thái tế bào, dấu ấn miễn dịch và các kỹ thuật di truyền phân tử [5], [8]. Bệnh BCCDL chiếm 76% các bệnh bạch cầu ở trẻ em [13]. Tuy nhiên BCCDL cũng gặp ở người trưởng thành và chiếm khoảng 20% bệnh bạch cầu cấp ở người lớn [13]. Ngoài những nghiên cứu về lâm sàng, những hiểu biết ngày càng sâu sắc về bệnh trong lĩnh vực di truyền học phân tử, các bất thường nhiễm sắc thể và gen cũng đóng một vai trò quan trọng trong việc chẩn đoán, phân nhóm tiên lượng, giúp lựa chọn phác đồ điều trị thích hợp và theo dõi điều trị đối với người bệnh (NB) BCCDL [3], [6].

Có nhiều loại thuốc khác nhau sử dụng trong các phác đồ điều trị BCCDL, trong đó thuốc 6-Mercaptopurine (6-MP) được sử dụng xuyên suốt các giai đoạn của phác đồ. Các nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng liều lượng của 6-MP có liên quan với nucleoside diphosphate-linked moiety X-type motif 15 (NUDT15), một loại enzyme chuyển hoá 6-MP [7], [10], [12], [16]. Các biến thể của NUDT15 trên tế bào mầm là một yếu tố quyết định quan trọng trong khả năng dung nạp thiopurine.

NUDT15 nằm trên NST 13q14.2, là gen có 3 exon, với 164 amino acid và mã hóa cho một nucleoside diphosphatase [15]. Vai trò của NUDT15 được biết đến như một chất có hoạt tính chống

đột biến (anti-mutagenic) [2], [11]. Trong tế bào, NUDT15 thủy giải 8-oxo-dGTP và 8-oxo-dGDP, là các nucleoside triphosphate purine gây ra sự bắt cặp sai của các base như AT với CG hoặc GC với TA. Mất chức năng của NUDT15 có thể dẫn đến 8-oxo-dGTP và 8-oxo-dGDP giữ ở mức cao trong các tế bào. Kết quả là sự bắt cặp sai của các base xảy ra thường xuyên và gây ra sự chết tế bào theo lập trình (apoptosis). Như vậy, NB BCCDL mang protein NUDT15 biến thể bị giảm hoặc bị mất chức năng có sử dụng 6-MP trong phác đồ điều trị, đặc biệt trong giai đoạn duy trì sẽ bị ức chế tủy xương dẫn đến suy tủy [1], [9].

Các biến thể NUDT15 có thể kể đến như p.V18I, p.V18_V19insGV, p.R139C, p.R139H, chúng nằm trên các exon 1 và 3 của gen [7]. Trong đó, p.R139C (rs116855232) được khảo sát nhiều nhất và cho thấy kiểu gen quy định mức độ nhạy cảm với 6-MP, khi mà p.R139C đồng hợp tử nhạy cảm hơn p.R139C dị hợp tử. Tần suất của biến thể này thay đổi tùy vào chủng tộc, tại Đài Loan là 11,6%, ở người Hàn Quốc là 10,4%, Nhật Bản 7%, Trung Quốc 13%, so với Mỹ là 2%, và tỷ lệ rất thấp ở chủng tộc châu Âu. Trong một nghiên cứu theo khu vực vùng địa lý, Yang JJ và cộng sự ghi nhận tỷ lệ biến thể NUDT15 p.R139C trên BCCDL trẻ em là 9,8% ở khu vực Đông Á, 3,9% ở Tây Ban Nha, chỉ 0,2% trong châu Âu và châu Phi. Các biến thể khác như p.V18I, p.V18_V19insGV, p.R139H, ít được khảo sát hơn do chúng mới được phát hiện. Tuy nhiên, chúng đã được chứng minh là có ảnh hưởng đến khả năng chuyển hoá và dung nạp thiopurine bằng các thử nghiệm lâm sàng [7].

Bệnh viện Trung ương Huế

Tại Bệnh viện Truyền Máu Huyết Học TP.HCM, người bệnh BCCDL sáu khi được phân nhóm tiên lượng và lựa chọn phác đồ điều trị, chúng tôi ghi nhận được các trường hợp nhạy cảm với 6-MP. Đối với những trường hợp này, cần có những bằng chứng về tình trạng di truyền phân tử, đặc biệt là kiểu gen của *NUDT15* nhằm giúp các bác sĩ điều chỉnh liều thuốc 6-MP thích hợp, tránh các biến chứng do nhạy thuốc gây tổn kém và kéo dài thời gian điều trị của người bệnh. Việc xác định kiểu gen (các biến thể) của *NUDT15* bao gồm cả tình trạng đồng hợp tử hay dị hợp tử của gen và các biến thể này nằm trên các vị trí khác nhau của gen. Các nghiên cứu trên thế giới khảo sát biến thể của *NUDT15* chủ yếu dựa trên 2 phương pháp Real-time PCR và giải trình tự chuỗi DNA [4], [9], [12], [14]. Với khả năng phát hiện chính xác các đột biến điểm, mất đoạn, thêm đoạn, kỹ thuật giải trình tự chuỗi DNA thường được lựa chọn để phát hiện các đột biến trên gen, đặc biệt là trong nghiên cứu trên dân số mới. Hơn nữa, đối với các biến đổi di truyền tế bào mầm như *NUDT15*, kỹ thuật giải trình tự chuỗi DNA giúp dễ dàng xác định được tính đồng hợp tử của các biến thể.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu khảo sát trên 30 NB là trẻ em mắc bệnh BCCDL được điều trị đặc hiệu bằng phác đồ Fralle 2000, trước khi vào giai đoạn duy trì.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu mô tả loạt ca.

2.2.2. Phương pháp tiến hành

Tách chiết genomic DNA: Tiến hành lấy 2 ml máu tĩnh mạch, cho vào ống chống đông có EDTA, lắc đều nhẹ nhàng. Genomic DNA được tách chiết trong vòng 24 giờ bằng bộ kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, Mỹ) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất.

Thiết kế môi: Các đoạn môi được thiết kế dựa trên trình tự chuỗi DNA của gen *NUDT15* mang

accession number NP_060753.1 trong GenBank và được tổng hợp bởi Integrated DNA Technologies (Mỹ), để khuếch đại exon 1 và 3.



Hình 1: Các đoạn môi dùng trong nghiên cứu

Phản ứng PCR gen *NUDT15*: Mỗi tube PCR có thể tích 25 ml chứa các thành phần: PCR buffer, dNTP (250 mM cho mỗi loại), 2 môi xuôi và ngược (0,5 mM cho mỗi loại), 1,25U TaKaRa Taq™ HotStart Polymerase (Takara, Nhật Bản) và 50-100 ng genomic DNA. Tiến hành thử điều kiện của phản ứng PCR với nhiệt độ bắt cặp mỗi 58°C, 60°C, 62°C và 65°C. Chu kỳ luân nhiệt trên máy Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler (Life Technologies, Hoa Kỳ) bao gồm 98°C trong 3 phút; theo sau là 40 chu kỳ của 98°C trong 10 giây, hoặc 58°C, 60°C, 62°C, 65°C trong 20 giây và 72°C trong 30 giây và kết thúc bằng giai đoạn kéo dài sản phẩm ở 72°C trong 2 phút. Sản phẩm PCR sau đó được phát hiện bằng điện di trên thạch agarose.

Thực hiện quy trình giải trình tự chuỗi DNA:

Thực hiện phản ứng PCR với mẫu DNA của bệnh nhân theo điều kiện được chọn từ phản ứng thử điều kiện PCR ở trên. Sản phẩm PCR sau đó được phát hiện bằng điện di trên thạch agarose 1,5% có nhuộm ethidium bromide và quan sát dưới hệ thống chụp ảnh Geldoc-It™ (UVP, Mỹ). Kích thước khuếch đại các exon gen *NUDT15* tương ứng theo từng cặp môi như ở bảng 1. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch bằng illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) theo hướng dẫn sử dụng của nhà sản xuất. Sản phẩm PCR đã được tinh sạch sẽ được thực hiện phản ứng cycle sequencing với BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Mỹ) theo hai chiều xuôi và ngược (sử dụng môi PCR). Sản phẩm sau đó được kết tủa bằng ethanol, hòa tan trong Hi-Di formamide, biến tính ở 95°C trước khi làm lạnh đột ngột. Trình tự DNA được đọc bằng máy ABI 3130 Genetic

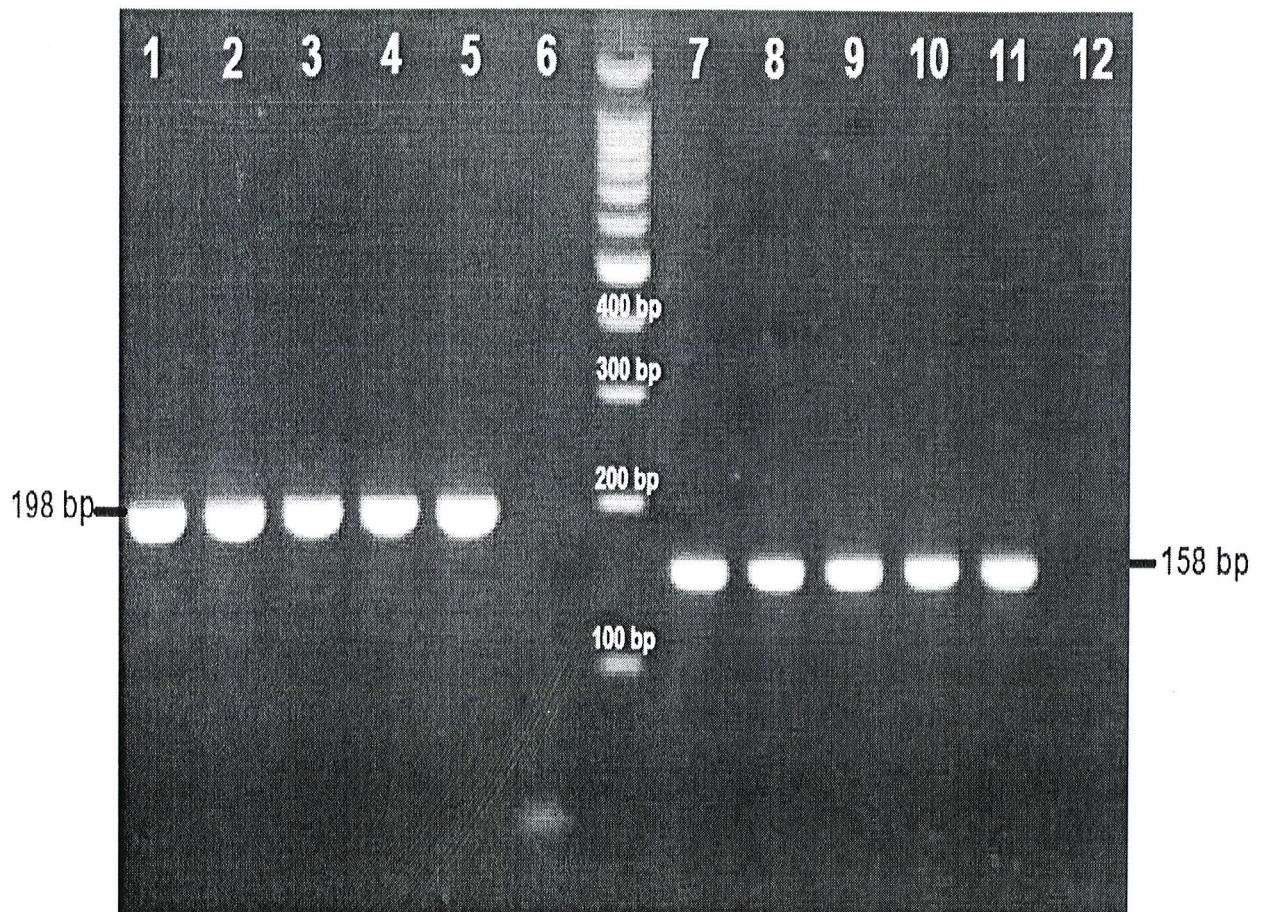
Bước đầu khảo sát biến thể *NUDT15* trên bệnh nhân bạch cầu...

Analyzer, với POP-7 polymer và capillary 50 cm (Applied Biosystems, Mỹ). Kết quả giải trình tự sẽ được phân tích bằng phần mềm SeqScape, so sánh với trình tự chuẩn của gen *NUDT15* (NP_060753.1) trong GenBank để xác định các biến thể gen.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Xây dựng quy trình giải trình tự DNA của gen

NUDT15: Trong nghiên cứu này, trước tiên chúng tôi thiết lập quy trình giải trình tự cho exon 1 và exon 3 của gen *NUDT15*. Sau khi thay đổi các nhiệt độ bắt cặp mỗi 58°C, 60°C, 62°C và 65°C cho từng cặp mỗi, chúng tôi chọn được nhiệt độ thích hợp nhất là 60°C để khuếch đại exon 1 với cặp mỗi NUD-1F1/1R và exon 3 với cặp mỗi NUD-3F2/3R1, có kích thước tương ứng 198 bp và 158 bp.



Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *NUDT15*

Các giếng từ 1 – 6: PCR exon 1 gen *NUDT15* bằng cặp mỗi NUD-1F1/1R. Các giếng 7 – 12: PCR exon 3 gen *NUDT15* bằng cặp mỗi NUD-3F2/3R1. Trong đó, L: 100 bp ladder; 1-4 và 7-10: mẫu người bệnh; 5 và 11: chứng dương; 6 và 12: chứng âm.

*Xác định biến thể gen *NUDT15* trên mẫu NB:*

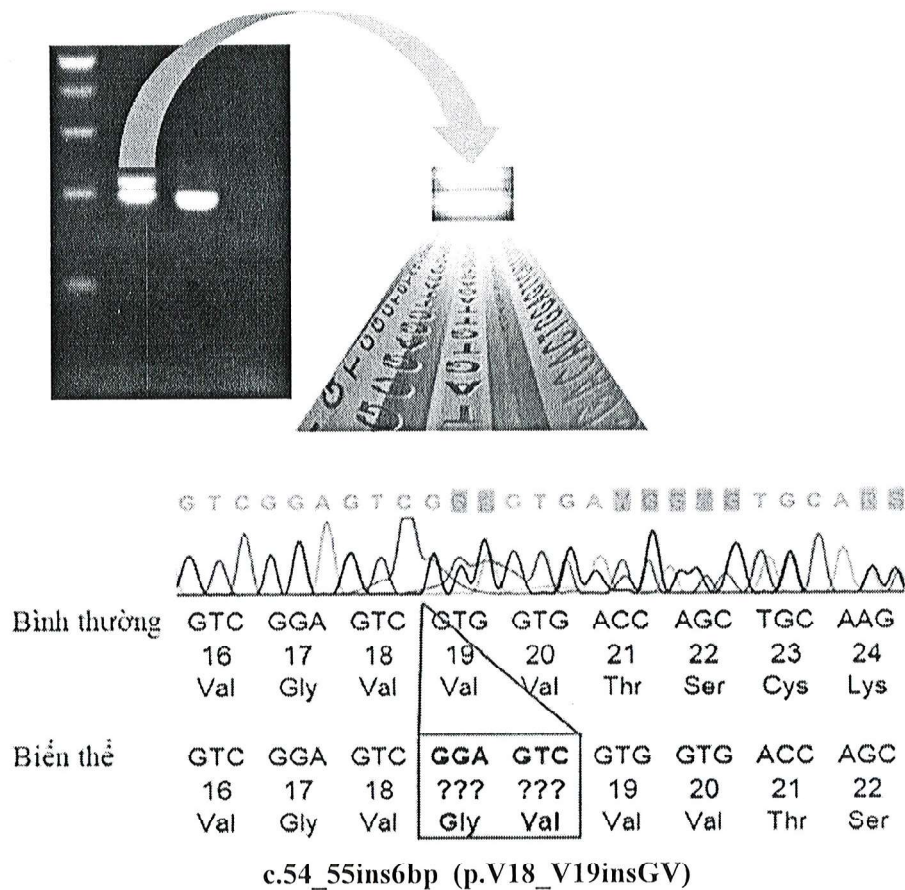
Từ tháng 6/2016 đến tháng 6/2017, 30 NB là trẻ em mắc bệnh BCCDL được xác định biến thể *NUDT15* bằng kỹ thuật giải trình tự chuỗi DNA. Phân tích dữ liệu giải trình tự thô cho thấy, ở tất cả các mẫu cho trình tự phù hợp với trình tự chuỗi của các exon 1 và 3 gen mục tiêu *NUDT15*. Như vậy, chúng tôi đã

thành công trong việc giải trình tự gen *NUDT15* để xác định biến thể. Tiến hành phân tích cụ thể trên từng exon của mỗi NB và tổng hợp kết quả chúng tôi ghi nhận, có 7 NB mang các biến thể đã được chứng minh trên lâm sàng là nhạy cảm với 6-MP, chiếm 23,3%. Các đặc điểm lâm sàng theo kiểu biến thể cũng được mô tả trong bảng 1.

Bảng 1: Đặc điểm lâm sàng của NB theo biến thể *NUDT15*

Đặc điểm	Biến thể <i>NUDT15</i>		
	c.415C>T (p.R139C) và c.54_55ins6bp (p.V18_V19insGV)	c.32G>A (p.R11Q)	WT
Số ca	07	1	22
Tuổi (trung bình, khoảng tuổi)	8,3 (4-15)	5	6,7 (2-13)
Giới (nam/nữ)	3/4	0/1	14/8
(%)	23,3%	3,3 %	73,4 %

Khi tiến hành điện di các sản phẩm khuếch đại exon 1 chúng tôi ghi nhận có 02 trường hợp xuất hiện hai băng trên hình ảnh điện di. Kết quả giải trình tự các sản phẩm này cho thấy, đây là những NB mang gen *NUDT15* bị chèn thêm 6 bp tại vị trí c.54_55 (p.V18_V19) của exon 1 (hình 3).



Hình 3: Điện di sản phẩm PCR và giải trình tự gen *NUDT15* của người bệnh NUD-06

L: 100 bp ladder; 1: mẫu người bệnh NUD-06; 2: chứng dương; 3: chứng âm.

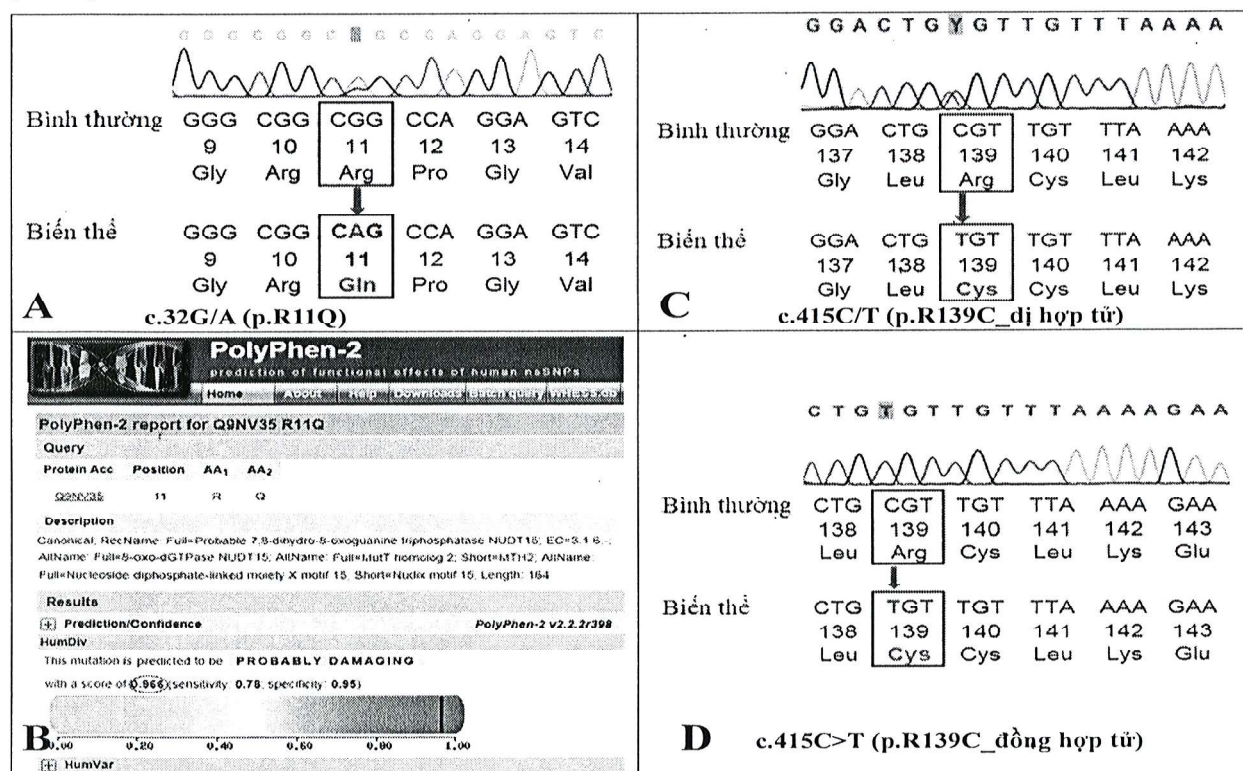
Trong số 7 NB mang biến thể được thống kê ở trên, có 01 NB mang biến thể p.R139C dạng đồng hợp tử, 04 trường hợp mang p.R139C dạng dị hợp tử, 01 trường hợp mang dị hợp tử p.V18_V19insGV và 01 trường hợp mang dị hợp tử kép p.V18_V19insGV và p.R139C. Ngoài ra, còn ghi nhận 01 NB mang kiểu biến thể mới, p.R11Q dạng dị hợp tử (bảng 2).

Bước đầu khảo sát biến thể NUDT15 trên bệnh nhân bạch cầu...

Bảng 2: Kết quả những người bệnh mang biến thể gen NUDT15

STT	Mã nghiên cứu	Vùng bị thay đổi	Kiểu biến thể NUDT15
1	NUD-01	Exon 3	c.415C>T (p.R139C_dị hợp tử)
2	NUD-05	Exon 3	c.415C>T (p.R139C_đồng hợp tử)
3	NUD-06	Exon 1	c.54_55ins6bp (p.V18_V19insGV, dị hợp tử)
4	NUD-08	Exon 1	c.32G>A (p.R11Q_dị hợp tử)
5	NUD-11	Exon 3	c.415C>T (p.R139C_dị hợp tử)
6	NUD-14	Exon 3	c.415C>T (p.R139C_dị hợp tử)
7	NUD-22	Exon 1 và exon 3	c.54_55ins6bp (p.V18_V19insGV, dị hợp tử) và c.415C>T (p.R139C, dị hợp tử)
8	NUD-28	Exon 3	c.415C>T (p.R139C_dị hợp tử)

Một số hình ảnh minh họa chi tiết các kiểu biến thể và vị trí thay đổi trên gen NUDT15 của NB BCCDL (hình 4).



Hình 4: Các biến thể gen NUDT15

A: Biến thể R11Q của người bệnh NUD-08; B: Điểm ảnh hưởng của R11Q đến cấu trúc, chức năng protein NUDT15; C: c.415C>T (p.R139C) dạng dị hợp tử; D: c.415C>T (p.R139C) dạng đồng hợp tử.

IV. BÀN LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật PCR với 2 cặp mồi chuyên biệt, cùng hoạt động tối ưu ở 60°C, được thiết kế để khuếch đại hai vùng mã hoá exon 1 và 3 của gen NUDT15.

Hiện nay có nhiều loại polymerase có độ trung thực cao để dùng cho giải trình tự DNA. Tuy nhiên, khi sử dụng các polymerase khác nhau thì có thể cần điều chỉnh lại điều kiện PCR để có được sản phẩm đặc hiệu. Tất cả phản ứng PCR được chúng tôi

thực hiện với TaKaRa Taq™ HotStart Polymerase (Takara, Nhật Bản), là một polymerase có độ trung thực cao. Trong 30 mẫu NB, kết quả điện di sản phẩm PCR của các exon cần nghiên cứu của gen *NUDT15* cho thấy hầu hết các mẫu trên hình ảnh điện di cho một băng duy nhất và có các kích thước tương ứng với các exon. Tất cả các mẫu chứng âm không chứa gDNA không cho băng trên gel điện di, không có hình ảnh của băng dimer. Sản phẩm PCR được giải trình tự theo kỹ thuật Sanger trên hệ thống ABI 3130 Genetic Analyzer đều cho kết quả trình tự chuỗi phù hợp với từng exon 1 và 3 gen *NUDT15* đã được khuếch đại. Ngoài ra, trên hình ảnh điện di có 02 mẫu chúng tôi quan sát thấy có thêm một băng phụ xuất hiện ở exon 1, kích thước lớn hơn kích thước chuẩn cần khuếch đại của exon này. Điều này hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích giải trình tự sau đó, khi băng phụ đã xuất hiện trong hai trường hợp là biến thể thêm đoạn 6 bp (c.54_55ins6bp). Đây là một biến thể thường được tìm thấy trên exon 1 của gen *NUDT15* và đã được chứng minh là có ảnh hưởng đến khả năng chuyển hoá và dung nạp thiopurine bằng các thử nghiệm lâm sàng [7].

Các nghiên cứu trên thế giới phân tích với số mẫu lớn đã chứng minh rằng một số kiểu biến thể *NUDT15* (p.V18I, p.V18_V19insGV, p.R139C, p.R139H) quy định mức độ nhạy cảm với 6-MP, trong đó kiểu đồng hợp tử nhạy cảm hơn kiểu dị hợp tử [1], [7], [9]. Tại Bệnh viện Truyền máu Huyết học TP.HCM, chúng tôi sử dụng kỹ thuật giải trình tự chuỗi DNA để xác định các biến thể *NUDT15*, giúp các bác sĩ điều chỉnh liều 6-MP phù hợp với từng NB BCCDL. Kết quả phân tích trên 30 NB cho thấy, có 7 NB mang biến thể *NUDT15*, chiếm 23,3% cao hơn các báo cáo khác có tỷ lệ dao động từ 7 -22,6% [4], [15]. Sự khác biệt về tần suất các biến thể *NUDT15* trong nghiên cứu này so với các nghiên cứu khác là do các nghiên cứu khác chỉ báo cáo trên 1 loại biến thể p.R139C, trong khi ở nghiên cứu này chúng tôi tiến hành khảo sát trên cả các loại biến thể ghi nhận được (p.V18_V19insGV, p.R139C), và cũng có thể do chúng tôi chọn các

trường hợp có suy tủy sâu sau hóa trị liệu trên lâm sàng. Tuy nhiên, tần suất cao cũng phù hợp với các nhận định của nhiều báo cáo khi cho rằng các biến thể *NUDT15* thường gặp hơn ở các chủng tộc vùng đông Á, Châu Á [4], [14]. Trong 7 NB mang các biến thể thường gặp thì có 1 NB mang biến thể p.R139C dạng đồng hợp tử và 1 trường hợp mang đồng thời 02 biến thể p.V18_V19insGV và p.R139C dạng dị hợp tử (dị hợp tử kép). Điều này cho thấy, các biến thể tồn tại trên cùng một NB là không loại trừ nhau, do đó kỹ thuật giải trình tự chuỗi DNA là một tiêu chuẩn vàng để xác định các biến thể gen *NUDT15* tránh bỏ sót, đặc biệt là các biến thể mới. Nhiều thử nghiệm trước đây ghi nhận, những NB mang các biến thể dị hợp tử kép nhạy cảm với 6-MP tương tự như các trường hợp mang 01 biến thể đơn lẻ dạng đồng hợp tử [7]. Vì thế, đây là một bằng chứng rất quan trọng, giúp các bác sĩ lựa chọn liều 6-MP kịp thời, phù hợp với NB. Ngoài ra, chúng tôi còn phát hiện 1 NB mang biến thể p.R11Q (c.32G/A) dạng dị hợp tử (hình 4A), chưa từng được báo cáo trước đây. Vì đây là một thay đổi chưa từng được ghi nhận, nên chúng tôi lặp lại toàn bộ quy trình chẩn đoán biến thể *NUDT15* với NB này từ việc lấy mẫu máu lại, ly trích DNA, phản ứng PCR và giải trình tự chuỗi DNA để khẳng định. Kết quả thu được giống như lần khảo sát trước. Tiến hành phân tích sự thay đổi này bằng thuật toán trên phần mềm PolyPhen-2, nhằm đánh giá mức độ ảnh hưởng của nó lên chức năng của protein *NUDT15*. Mức điểm PolyPhen-2 chỉ ra sự ảnh hưởng của p.R11Q đến cấu trúc và chức năng của protein *NUDT15* là 0,966 trên mức điểm tối đa cho sự ảnh hưởng là 1 (hình 4B). Kết quả truy xuất của phần mềm cũng nhận định sự thay đổi này có lẽ dẫn đến tổn thương cấu trúc và chức năng của protein *NUDT15*. Tuy nhiên, đây chỉ là những phân tích trên điện toán. Do đó, cần có những nghiên cứu sâu hơn về mặt sinh học phân tử cũng như trên lâm sàng đối với NB mang biến thể này nói riêng và những trường hợp mang biến thể mới khác (nếu có) nói chung nhằm cung cấp bằng chứng rõ ràng cho các bác sĩ lâm sàng.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu phát hiện 23,3% NB mang biến thể p.V18_V19insGV và/ hoặc p.R139C gen *NUDT15*, trong đó 1 NB mang biến thể p.R139C dạng đồng hợp tử và 1 trường hợp mang dị hợp tử kép biến thể

p.V18_V19insGV và p.R139C, chiếm tỉ lệ 28,6%. Kỹ thuật giải trình tự chuỗi DNA gen *NUDT15* phù hợp để xác định các biến thể nhạy cảm với thuốc 6-MP, giúp các bác sĩ lâm sàng lựa chọn liều thuốc phù hợp cho NB BCCDL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Carter M., Jemth AS., Hagenkort A., et al. (2015), Crystal structure, biochemical and cellular activities demonstrate separate functions of MTH1 and MTH2, *Nature Communications*, 6(7871), pp.1-10.
2. Hori M., Satou K., Harashima H., Kamiya H. (2010), Suppression of mutagenesis by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate) by human MTH1, MTH2, and NUDT5, *Free Radic Biol Med*, 48, pp.1197-1201.
3. Joanne M., Hilden, Patricia A., et al. (2006), Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group, *Blood*, 108, pp.441-451.
4. Liang DC., Yang CP., Liu HC., et al. (2015), NUDT15 gene polymorphism related to mercaptopurine intolerance in Taiwan Chinese children with acute lymphoblastic leukemia, *The Pharmacogenomics Journal*, 16, pp.536-539.
5. Meir Wetzler, Richard K., Dodge, Mrozek K., et al. (1999), Prospective Karyotype Analysis in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia: The Cancer and Leukemia Group B Experience, *Blood*, 93(11), pp.3983-93.
6. Michael A., Teitell and Pandolfi PP., et al. (2009), Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia, *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 4, pp. 175-198.
7. Moriyama T., Nishii R., Perez-Andreu V., et al. (2016), *NUDT15* Polymorphisms Alter Thiopurine Metabolism and Hematopoietic Toxicity, *Nat Genet*, 48(4), pp.367-73.
8. Riccardo Riccardi (2004), Acute Lymphoblastic Leukemia, *Orphanet*, pp.1-13.
9. Suzuki H., Fukushima H., Suzuki R., et al. (2016), Genotyping *NUDT15* can predict the dose reduction of 6-MP for children with acute lymphoblastic leukemia especially at a preschool age, *Journal of Human Genetics*, 61(9), pp.797-801.
10. Suzuki R., Fukushima H., Noguchi E., et al. (2015), Influence of *SLCO1B1* polymorphism on maintenance therapy for childhood leukemia, *Pediatr. Int.*, 57, pp.572-77.
11. Takagi Y., Setoyama D., et al. (2012), Human MTH3 (*NUDT18*) protein hydrolyzes oxidized forms of guanosine and deoxyguanosine diphosphates: comparison with MTH1 and MTH2, *J Biol Chem*, 287, pp.21541-49.
12. Tanaka Y., Kato M., Hasegawa D., et al. (2015), Susceptibility to 6-MP toxicity conferred by a *NUDT15* variant in Japanese children with acute lymphoblastic leukaemia, *British Journal of Haematology*, 17, pp.109-115.
13. Williams Hematology, 8e/ Part XI. Neoplastic Lymphoid Diseases/Chapter 93. Acute Lymphoblastic Leukemia.
14. Yang JJ., Landier W., Yang W., et al. (2015), Inherited *NUDT15* Variant Is a Genetic Determinant of Mercaptopurine Intolerance in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia, *Journal Of Clinical Oncology*, 33(11), pp.1235-46.
15. Yang SK., Hong M., Baek J., et al. (2014), A common missense variant in *NUDT15* confers susceptibility to thiopurine-induced leukopenia, *Nature Genetics*, 46(9), pp.1017-20.
16. Zeglam HB., Benhamer A., Aboud A., et al. (2015), Polymorphisms of the thiopurine S-methyltransferase gene among the Libyan population, *Libyan J Med*, 10, pp.27053.