

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM**

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



NCS. NGUYỄN TRẦN MINH THẮNG

**NGHIÊN CỨU TÍNH ĐA HÌNH CỦA MỘT SỐ GEN
TRÊN BỆNH NHÂN GÚT**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Hà Nội – Năm 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

NCS. NGUYỄN TRẦN MINH THẮNG

NGHIÊN CỨU TÍNH ĐA HÌNH CỦA MỘT SỐ GEN
TRÊN BỆNH NHÂN GÚT

Chuyên ngành: Hoá sinh học

Mã số: 9420116

LUẬN ÁN TIẾN SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

PGS. TS. Nguyễn Thùy Dương

GS. TS. Nông Văn Hải

Hà Nội – Năm 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan:

Luận án là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Nghiên cứu được thực hiện trong khuôn khổ đề tài Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam mã số VAST02.04/17-18, “*Nghiên cứu đa hình nucleotide đơn (SNP) của một số gen liên quan đến bệnh gút ở người Việt Nam*”, thời gian thực hiện 2017 - 2018 do PGS. TS. Nguyễn Thùy Dương làm chủ nhiệm đề tài.

Các số liệu và kết quả trình bày trong luận án là trung thực. Một số đã được công bố trên các tạp chí khoa học chuyên ngành trong nước và quốc tế với sự đồng ý và cho phép của đồng tác giả, một số còn lại chưa được công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Hà Nội, ngày 13 tháng 04 năm 2023

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Trần Minh Thắng

LỜI CẢM ƠN

Đầu tiên, tôi xin phép được bày tỏ sự kính trọng và lòng biết ơn sâu sắc đến PGS. TS. Nguyễn Thuỳ Dương, Trưởng phòng Hệ gen học người, Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, người đã tận tình hướng dẫn, giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận án này.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn sâu sắc và sự kính trọng đến GS.TS. Nông Văn Hải, nguyên Viện trưởng Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, người đã tận tình giúp đỡ, đưa ra những lời chỉ dẫn để tôi có thể hoàn thành tốt luận án của mình. Những lời nhận xét, góp ý của Thầy về hướng giải quyết vấn đề trong suốt quá trình nghiên cứu là những bài học vô cùng quý giá đối với tôi, không chỉ trong quá trình học tập nghiên cứu, mà còn cả trong hoạt động chuyên môn sau này.

Tôi xin trân trọng được gửi lời cảm ơn tới Ban Giám đốc Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện để tôi có thể hoàn thành luận án của mình.

Tôi xin trân trọng được gửi lời cảm ơn tới GS. TS. Nguyễn Huy Hoàng, Viện trưởng Viện Nghiên cứu hệ gen và các Thầy Cô, các Anh Chị ở trong Viện Nghiên cứu hệ gen cũng như các Thầy Cô, các Anh Chị ở phòng Đào tạo của Học viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giúp đỡ, tạo mọi điều kiện tốt nhất để tôi hoàn thành tốt luận án của mình.

Tôi xin trân trọng gửi lời cảm ơn đến lãnh đạo các cấp và đồng nghiệp ở Bệnh Viện Nguyễn Trãi và Phòng khám đa khoa Đại Phước, Thành phố Hồ Chí Minh, đã tạo mọi điều kiện để tôi có thể hoàn thành nhiệm vụ học tập và nghiên cứu của mình.

Cuối cùng, tôi xin được dành sự biết ơn sâu sắc tới bố, mẹ, vợ, con, gia đình và bạn bè đã luôn bên cạnh động viên, hỗ trợ để tôi có thể hoàn thành luận án này.

Nghiên cứu sinh

MỤC LỤC

Trang

Trang phụ bìa	
Lời cam đoan	
Lời cảm ơn	
Mục lục	
Danh mục các chữ viết tắt	
Danh mục bảng	
Danh mục hình	
MỞ ĐẦU	1
TÍNH CẤP THIẾT CỦA VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU	1
MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU.....	2
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN.....	2
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	4
1.1. ĐẠI CƯƠNG VỀ BỆNH GÚT.....	4
1.1.1. Khái niệm.....	4
1.1.2. Dịch tễ học	4
1.1.3. Cơ chế bệnh sinh.....	6
1.1.4. Phân loại bệnh gút.....	9
1.1.5. Chẩn đoán bệnh gút	12
1.1.6. Khó khăn trong việc chẩn đoán bệnh gút giai đoạn sớm:.....	13
1.1.7. Điều trị bệnh gút	13
1.1.8. Dự phòng bệnh gút.....	15
1.2. TỔNG QUAN VỀ ĐA HÌNH NUCLEOTIDE ĐƠN (SNPs).....	16
1.2.1. Đặc điểm của đa hình nucleotide đơn (SNP).....	16
1.2.2. Các phương pháp xác định đa hình đơn nucleotide đơn (SNP).....	16
1.2.3. Tầm quan trọng và ứng dụng của đa hình nucleotide đơn (SNP).....	20

1.3. NGHIÊN CỨU VAI TRÒ CỦA CÁC GEN ĐỐI VỚI BỆNH GÚT TRÊN THẾ GIỚI VÀ VIỆT NAM.....	23
1.3.1. Tình hình nghiên cứu tổng quát về bệnh gút trên thế giới.....	23
1.3.2. Các nghiên cứu tương quan toàn bộ nhiễm sắc thể với bệnh gút.....	24
1.3.3. Vai trò của gen ABCG2 đối với bệnh gút.....	26
1.3.4. Mối tương quan của gen SLC22A12 và bệnh gút.....	27
1.3.5. Tầm quan trọng của gen SLC2A9 và bệnh gút.....	28
1.3.6. Mối tương quan của gen TNF α và bệnh gút.....	30
1.3.7. Sự liên quan của gen TLR4 và bệnh gút.....	30
1.3.8. Gen SLC17A1 và bệnh gút.....	31
1.3.9. Các nghiên cứu về gút trong nước.....	31
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	33
2.1. ĐỊA ĐIỂM THU MẪU VÀ THỜI GIAN NGHIÊN CỨU.....	33
2.1.1. Địa điểm thu mẫu nghiên cứu.....	33
2.1.2. Thời gian nghiên cứu.....	33
2.2. THIẾT KẾ NGHIÊN CỨU.....	33
2.3. ĐỐI TƯỢNG VÀ CỖ MẪU NGHIÊN CỨU.....	33
2.3.1. Đối tượng nghiên cứu.....	33
2.3.2. Cỡ mẫu.....	34
2.4. QUY TRÌNH CHỌN MẪU VÀ NGHIÊN CỨU.....	35
2.4.1. Nhóm bệnh.....	35
2.4.2. Nhóm chứng.....	35
2.5. DỤNG CỤ, TRANG THIẾT BỊ VÀ HOÁ CHẤT NGHIÊN CỨU.....	36
2.6. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	36
2.6.1. Quy trình thực hiện nghiên cứu.....	36
2.6.2. Phương pháp thu thập số liệu.....	37
2.7. PHƯƠNG PHÁP VÀ KỸ THUẬT SỬ DỤNG.....	38
2.7.1. Phương pháp sinh hoá và huyết học.....	38
2.7.2. Phương pháp thiết kế mồi cho PCR.....	38

2.7.3. Tách chiết DNA tổng số	39
2.7.4. Phương pháp định lượng DNA bằng quang phổ kế.....	40
2.7.5. Nhân đoạn DNA bằng PCR	41
2.7.6. Tinh sạch sản phẩm PCR	43
2.7.7. Giải trình tự Sanger.....	44
2.7.8. Phân tích đa hình/đột biến gen.....	44
2.8. CÁC BIẾN SỐ TRONG NGHIÊN CỨU.....	44
2.8.1. Nhóm biến số đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu.....	45
2.8.2. Nhóm các biến số cận lâm sàng.....	46
2.8.3. Nhóm các biến số về gen	46
2.9. PHƯƠNG PHÁP XỬ LÝ VÀ PHÂN TÍCH SỐ LIỆU.....	46
2.9.1. Xử lý số liệu thô.....	46
2.9.2. Phân tích số liệu.....	47
2.10. VẤN ĐỀ ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU Y SINH HỌC	48
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	49
3.1. KẾT QUẢ.....	49
3.1.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở mẫu nghiên cứu	49
3.1.2. Tách chiết DNA tổng số	52
3.1.3. Đánh giá tương quan giữa ABCG2 rs72552713 và bệnh gút.....	53
3.1.4. Đánh giá tương quan của rs12505410 gen ABCG2 và bệnh gút.....	57
3.1.5. Đánh giá tương quan của rs11231825 gen SLC22A12 và bệnh gút....	63
3.1.6. Đánh giá tương quan của rs7932775 gen SLC22A12 và bệnh gút.....	68
3.1.7. Đánh giá tương quan của rs12510549 gen SLC2A9 và bệnh gút.....	71
3.1.8. Đánh giá tương quan của rs16890979 gen SLC2A9 và bệnh gút.....	75
3.1.9. Đánh giá tương quan của rs1800629 gen TNFa và bệnh gút.....	79
3.1.10. Đánh giá tương quan của rs2149356 gen TLR4 và bệnh gút	83
3.1.11. Đánh giá tương quan của rs1165196 gen SLC17A1 và bệnh gút.....	89
3.1.12. Tương quan giữa đặc điểm lâm sàng và chỉ số cận lâm sàng với bệnh gút	93

3.2. THẢO LUẬN	98
3.2.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của đối tượng nghiên cứu	98
3.2.2. Tương quan giữa đa hình gen ABCG2 với bệnh gút	99
3.2.3. Tương quan giữa đa hình gen SLC22A12 với bệnh gút.....	103
3.2.4. Tương quan giữa đa hình của gen SLC2A9 với bệnh gút	105
3.2.5. Tương quan giữa đa hình gen TNFa với bệnh gút.....	110
3.2.6. Tương quan giữa đa hình gen TLR4 với bệnh gút.....	111
3.2.7. Tương quan giữa đa hình gen SLC17A1 với bệnh gút.....	113
3.2.8. Mối liên quan của các chỉ số cận lâm sàng với bệnh gút.....	114
KẾT LUẬN.....	115
KIẾN NGHỊ.....	117
TÀI LIỆU THAM KHẢO	118
DANH SÁCH CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT

ANOVA	Analysis of variance	Phân tích phương sai
ALT	Alanine aminotransferase	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate transaminase	Aspartate transaminase
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosine triphosphate
BMI	Body mass index	Chỉ số khối cơ thể
bp	base pair	Cặp base
BUN	Blood urea nitrogen	Urea nitrogen máu
COPCORD	Community Oriented Program for Control of Rheumatic Diseases	Chương trình Định hướng cộng đồng kiểm soát bệnh khớp
CI95%	Confident interval 95%	Khoảng tin cậy 95%
CREA	Creatinine	Creatinine
CRP	C-reactive protein	Protein phản ứng C
cs		Cộng sự
DBP	Diastolic blood pressure	Huyết áp tâm trương
DNA	Deoxy ribonucleic acid	Deoxyribonucleic acid
GLU	Glucose	Đường máu
GWAS	Genome wide association study	Nghiên cứu tương quan toàn bộ nhiễm sắc thể
HDL-C	High density lipoprotein – cholesterol	Cholesterol có lipoprotein tỉ trọng cao
HWE	Hardy – Weinberg equilibrium	Cân bằng Hardy - Weinberg
ILAR	International League Against Rheumatism	Hội thấp khớp học thế giới
Kb	Kilo base pair	1000 base
LDL-C	Low density lipoprotein – cholesterol	Cholesterol có lipoprotein tỉ trọng thấp
MSU	Monosodium urate	Muối urate natri

n	number	Số lượng
NST		Nhiễm sắc thể
OR	Odd ratio	Chỉ số odd
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
SBP	Systolic blood pressure	Huyết áp tâm thu
SNP	Single nucleotide polymorphism	Đa hình nucleotide đơn
TAE	Tris – Acetate - EDTA	Tris – Acetate - EDTA
TG	Triglyceride	Chất béo trung tính
WBC	White blood cells	Bạch cầu

DANH MỤC HÌNH

Trang

Bảng 1.1. Các tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh gút theo ACR / EULAR 2015	12
Bảng 2.1. Trình tự các cặp môi sử dụng cho phản ứng PCR.....	39
Bảng 2.2. Thành phần các chất trong một mẫu phản ứng PCR.....	41
Bảng 3.1. Kết quả đặc điểm lâm sàng ở hai nhóm bệnh và chứng	49
Bảng 3.2. Kết quả phân tích đặc điểm cận lâm sàng liên quan	50
Bảng 3.3. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele của đa hình ABCG2 rs72552713.....	55
Bảng 3.4. Tương quan đơn biến giữa đa hình ABCG2 rs72552713 và bệnh gút	56
Bảng 3.5. Đánh giá tương quan giữa đa hình rs72552713 với các yếu tố khác	57
Bảng 3.6. Thống kê kiểu gen và tần số allele đa hình ABCG2 rs12505410 .	60
Bảng 3.7. Đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs12505410 đối với bệnh gút	61
Bảng 3.8. Đánh giá tương quan giữa đa hình rs12505410 với một số yếu tố khác.....	63
Bảng 3.9. Bảng thống kê tần số allele và kiểu gen của đa hình rs11231825..	66
Bảng 3.10. Kết quả đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs11231825 với bệnh gút	67
Bảng 3.11. Đánh giá tương quan giữa đa hình rs11231825 với các chỉ số lâm sàng.....	68
Bảng 3.12. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele đa hình rs7932775	70
Bảng 3.13. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele của SLC2A9 rs12510549	73
Bảng 3.14. Kết quả đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs12510549 với bệnh gút	73
Bảng 3.15. Tương quan giữa đa hình rs12510549 với một số chỉ số lâm sàng	75

<i>Bảng 3.16. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele của SLC2A9 rs16890979</i>	77
<i>Bảng 3.17. Kết quả đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs16890979 với bệnh gút</i>	78
<i>Bảng 3.18. Tương quan giữa đa hình gen rs16890979 với một số chỉ số lâm sàng</i>	79
<i>Bảng 3.19. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele đa hình rs1800629</i>	81
<i>Bảng 3.20. Kết quả đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs1800629 với bệnh gút</i>	82
<i>Bảng 3.21. Đánh giá tương quan giữa đa hình rs1800629 với chỉ số lâm sàng</i>	83
<i>Bảng 3.22. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele đa hình rs2149356</i>	86
<i>Bảng 3.23. Kết quả đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs2149356 với bệnh gút</i>	87
<i>Bảng 3.24. Đánh giá tương quan giữa đa hình rs2149356 với chỉ số lâm sàng</i>	88
<i>Bảng 3.25. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele của đa hình SLC17A1 rs1165196</i>	91
<i>Bảng 3.26. Kết quả đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs1165196 với bệnh gút</i>	92
<i>Bảng 3.27. Đánh giá tương quan giữa đa hình rs1165196 với chỉ số lâm sàng</i>	93
<i>Bảng 3.28. Kết quả đánh giá sự tương quan giữa chỉ số cận lâm sàng và bệnh gút</i>	94
<i>Bảng 3.29. Kết quả tương quan giữa từng kiểu gen với tình trạng bệnh gút</i>	95
<i>Bảng 3.30. Tương quan đa biến giữa yếu tố đa hình gen và các chỉ số chuyển hóa với tình trạng bệnh gút</i>	96

DANH MỤC BẢNG

Trang

Hình 1.1. Tỷ lệ bệnh nhân gút ở các nước gia tăng theo tuổi [11]	4
Hình 1.2. Tỷ lệ bệnh nhân gút theo giới ở các nước trên thế giới [16].....	5
Hình 1.3. Sơ đồ chuyển hóa acid uric	7
Hình 1.4. Ảnh tinh thể urat trong dịch khớp dưới kính hiển vi phân cực [9] ..	9
Hình 1.5. A. Tổn thương dạng nốt tophi trên ngón tay cái bàn tay trái [25] .	10
Hình 1.6. Hình ảnh nốt tophi trên phim X-quang [29]	11
Hình 1.7. Ảnh minh họa phương pháp Dynamic allele-specific hybridization [51].....	19
Hình 1.8. Ảnh minh họa cách thiết lập bản đồ SNPs [56].....	21
Hình 1.9. Tỷ lệ ước tính của bệnh nhân gút trên toàn thế giới [11].....	24
Hình 1.10. Biểu đồ Manhattan của nghiên cứu tương quan trên	25
Hình 1.11. Vị trí vùng gen ABCG2 trên nhiễm sắc thể số 4 [68].....	26
Hình 1.12. Vị trí vùng gen SLC22A12 trên nhiễm sắc thể số 11 [68]	27
Hình 1.13. Vị trí vùng gen SLC2A9 trên nhiễm sắc thể số 4 [68]	28
Hình 1.14. Vị trí vùng gen TNFa trên nhiễm sắc thể số 6 [68]	30
Hình 1.15. Vị trí vùng gen TLR4 trên nhiễm sắc thể số 9 [68]	30
Hình 1.16. Vị trí vùng gen SLC17A1 trên nhiễm sắc thể số 6 [68]	31
Hình 2.1. Quy trình thực hiện nghiên cứu	37
Hình 3.1. Điện di đồ sản phẩm DNA tách chiết từ một số mẫu máu điển hình của nhóm người không mắc bệnh gút trên gel agarose 1%	52
Hình 3.2. Điện di đồ sản phẩm DNA tách chiết từ một số mẫu máu điển hình từ nhóm người mắc bệnh gút trên gel agarose 1%	53
Hình 3.3. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại vùng trình tự đích chứa ABCG2 rs72552713 từ một số mẫu điển hình.....	53
Hình 3.4. Điện di đồ sản phẩm PCR sau khi được xử lý bằng enzyme RsaI trên một vài mẫu đại diện.....	54

Hình 3.5. Trình tự đoạn nucleotide 2 mẫu đại diện có kiểu gen GG và GA của đa hình ABCG2 rs72552713.....	54
Hình 3.6. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại vùng trình tự đích chứa đa hình ABCG2 rs12505410 ở một số mẫu đại diện.....	58
Hình 3.7. Điện di đồ sản phẩm PCR sau khi được xử lý bằng enzyme NsiI một số mẫu đại diện	58
Hình 3.8. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen TT, GG và TG của đa hình ABCG2 rs12505410.....	59
Hình 3.9. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại vùng trình tự đích chứa đa hình SLC22A12 rs11231825 một số mẫu đại diện.....	64
Hình 3.10. Điện di đồ sản phẩm được xử lý với enzyme BclI	64
Hình 3.11. Trình tự nucleotide đa hình SLC22A12 rs11231825 của 3 mẫu đại diện có kiểu gen TT, CC và TC	65
Hình 3.12. Điện di đồ sản phẩm PCR vùng trình tự đích chứa đa hình SLC22A12 rs7932775 của một số mẫu	69
Hình 3.13. Điện di đồ sản phẩm sau khi được xử lý bằng enzyme Eco130I.....	69
Hình 3.14. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen TT, CC và TC của đa hình SLC22A12 rs7932775	70
Hình 3.15. Điện di đồ sản phẩm PCR vùng trình tự đích chứa đa hình SLC2A9 rs12510549 một số mẫu đại diện	71
Hình 3.16. Điện di đồ sản phẩm sau khi xử lý với enzyme HindIII	72
Hình 3.17. Trình tự nucleotide 3 mẫu có kiểu gen TT, CC và TC của đa hình SLC2A9 rs12510549	72
Hình 3.18. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại vùng trình tự đích chứa đa hình SLC2A9 rs16890979 một số mẫu đại diện.....	76
Hình 3.19. Điện di đồ sản phẩm sau khi được xử lý với enzyme HpaI	76
Hình 3.20. Trình tự nucleotide 2 mẫu có kiểu gen GG và GA	77
Hình 3.21. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại vùng trình tự đích	79
Hình 3.22. Điện di đồ sản phẩm sau khi cắt bằng enzyme NcoI	80

Hình 3.23. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen GG, AA và AG của đa hình TNFα rs1800629	81
Hình 3.24. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại vùng trình tự đích	84
Hình 3.25. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại sau khi được xử lý với men cắt HinfI.....	84
Hình 3.26. Trình tự nucleotide của các mẫu đại diện có kiểu gen TT, GG và GT của đa hình TLR4 rs2149356	85
Hình 3.27. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại vùng trình tự đích chứa đa hình SLC17A1 rs1165196 một số mẫu đại diện.....	89
Hình 3.28. Điện di đồ sản phẩm PCR sau khi xử lý với enzyme TspRI	89
Hình 3.29. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen GG, AA và GA của đa hình SLC17A1 rs1165196	90
Hình 3.30. Tần số allele A của rs72552713 so sánh với các quốc gia khác NC: Tần số allele A trong nghiên cứu n.....	100
Hình 3.31. Tần số allele G của rs12505410 so sánh với các quốc gia trên thế giới	102
Hình 3.32. Tần số allele C của rs11231825 so sánh với các quốc gia trên thế giới	104
Hình 3.33. Tần số allele C của rs7932775 so sánh với các	105
Hình 3.34. Tần số allele C của rs12510549 so sánh với các quốc gia trên thế giới.....	107
Hình 3.35. Tần số allele T của rs16890979 so sánh với các quốc gia trên thế giới. NC: Tần số allele T trong nghiên cứu của chúng tôi.....	108
Hình 3.36. Tần số allele A của rs1800629 so sánh với.....	110
Hình 3.37. Tần số allele T của rs2149356 so sánh với các quốc gia trên thế giới	112
Hình 3.38. Tần số allele G của rs1165196 so sánh với các quốc gia trên thế giới	113

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của vấn đề nghiên cứu

Gút là bệnh lý rối loạn chuyển hoá gây ra bởi tình trạng lắng đọng acid uric ở các mô do tăng nồng độ acid uric máu. Triệu chứng lâm sàng của bệnh bao gồm viêm khớp, nốt tophi, bệnh thận và sỏi uric. Triệu chứng điển hình của bệnh là hiện tượng nổi cục hoặc viêm ở các khớp, gây đau đớn cho người bệnh. Bệnh nhân thường xuất hiện những đợt cấp hoặc tái phát nhiều lần. Bệnh gút nếu điều trị không đúng, không kiểm soát tốt acid uric máu sẽ để lại hậu quả nặng nề như biến dạng khớp bàn tay, bàn chân, sỏi thận, suy thận, các bệnh tim mạch và ảnh hưởng đến chất lượng sống của người bệnh. Bệnh gút hiện nay có tỷ lệ cao, đặc biệt ở các nước đang phát triển do chế độ ăn uống không được kiểm soát. Theo các nghiên cứu tại Châu Âu, bệnh chiếm khoảng 0,02 - 0,2% dân số [1], xuất hiện chủ yếu ở nam giới tuổi trung niên. Bệnh có khả năng di truyền. Ở Anh tỷ lệ mắc bệnh gút tăng từ 0,14% năm 1975 lên 1,4% năm 2005. Bệnh ảnh hưởng đến khoảng 600.000 người ở Anh và số người mắc bệnh này ngày càng tăng trong những năm gần đây [2]. Một nghiên cứu gần đây của Mỹ cho thấy bệnh gút đã tăng gần gấp đôi trong hai thập kỷ qua và có liên quan tới sự gia tăng số người béo phì [3]. Tại Việt Nam trong giai đoạn 1978-1989 tỷ lệ bệnh gút chiếm 1,5% các bệnh nhân mắc bệnh cơ xương khớp. Theo một nghiên cứu khác về mô hình bệnh tật tại khoa cơ xương khớp bệnh viện Bạch Mai trong 10 năm (1991-2000) gút chiếm tỷ lệ là 8,57% [4]. Gần đây, các nghiên cứu về mối tương quan giữa các biến thể nằm trên các vùng gen được quan tâm rất nhiều trên thế giới. Cụ thể, nghiên cứu GWAS có quy mô lớn nhất ở châu Âu được tiến hành với bộ mẫu trên 110.000 cá thể đã phát hiện ra 28 locus di truyền liên quan đến nồng độ urat huyết thanh và bệnh gút [5]. Một nghiên cứu khác cũng được tiến hành trên khoảng 33.000 cá thể ở Đông Á cũng đã xác định được bốn gen có liên quan đến nồng độ acid uric (*SLC2A9*, *ABCG2*, *SLC22A12* và *MAF*) [6].

Mặc dù bệnh có những biểu hiện đặc trưng trong giai đoạn nặng, nhưng việc chẩn đoán bệnh sớm hiện nay còn gặp nhiều khó khăn. Nguyên nhân là do giai đoạn gút cấp thường bị bỏ qua, đặc biệt trong trường hợp kết quả xét

nghiệm acid uric máu không cao. Vai trò phân tích dịch khớp để tìm tinh thể urat khó thực hiện được do điều kiện về cơ sở vật chất và nhân lực chưa đáp ứng được. Tiếp đến là tình trạng lạm dụng thuốc, một số thuốc có ảnh hưởng đến chuyển hóa acid uric máu gây ra những cơn gút cấp. Mặc dù biểu hiện tăng cao hàm lượng acid uric máu là dấu hiệu phát hiện sớm nguy cơ bệnh gút, tuy nhiên, hàm lượng acid uric máu cao không đồng nghĩa với mắc bệnh gút. Tuy nhiên nếu tình trạng tăng acid uric máu kéo dài sẽ dẫn đến nguy cơ mắc bệnh gút. Ngoài ra, những dấu hiệu của cơn gút cấp xuất hiện mà bệnh nhân có thể nhận biết như tình trạng khó chịu, cảm giác nặng chân, co rút các cơ, mỏi ở các khớp, đặc biệt là khớp ngón chân, tê bì ngón chân, đau đầu, đau thượng vị, tiểu nhiều. Các triệu chứng này thường không đặc hiệu và dễ bị nhầm lẫn với các bệnh lý khác. Gần đây nhiều công trình nghiên cứu về mối tương quan giữa tăng nồng độ acid uric trong máu và biến thể trên gen liên quan được chú trọng nghiên cứu trên thế giới. Kết quả của những nghiên cứu này nhằm hỗ trợ khả năng chẩn đoán sớm, hỗ trợ điều trị và phòng ngừa bệnh [7]. Việc phát hiện bệnh sớm để đưa ra phương pháp điều trị đúng đắn và có hướng dự phòng tích cực là cần thiết. Tuy nhiên, hướng nghiên cứu mối tương quan giữa bệnh gút và các biến thể trên gen liên quan chưa được tiến hành nhiều tại Việt Nam, do đó chúng tôi đã tiến hành đề tài “Nghiên cứu tính đa hình của một số gen trên bệnh nhân gút”.

Mục tiêu nghiên cứu

1. Xác định tần số các allele và kiểu gen của 6 gen *ABCG2*, *SLC22A12*, *SLC2A9*, *TNFA*, *TLR4* và *SLC17A1* trên bệnh nhân gút so với đối chứng là người khỏe mạnh
2. Phân tích mối liên quan giữa các đa hình của 6 gen *ABCG2*, *SLC22A12*, *SLC2A9*, *TNFA*, *TLR4* và *SLC17A1* với bệnh gút và một số chỉ số cận lâm sàng.

Những đóng góp mới của luận án

Đây là nghiên cứu mô tả bệnh - chứng với quy mô tương đối lớn đầu tiên ở Việt Nam, bao gồm 170 mẫu bệnh và 351 mẫu chứng. Sử dụng phương

pháp PCR, RFLP và giải trình tự Sanger, đã xác định được tần suất của 9 biến thể nằm trên 6 gen *ABCG2*, *SLC22A12*, *SLC2A9*, *TNFA*, *TLR4* và *SLC17A1*.

Nghiên cứu đã xác định được mối liên quan giữa 2 đa hình gen với nguy cơ mắc bệnh gút:

+ Đa hình *ABCG2* rs72552713 có mối liên quan khá mạnh với bệnh gút. Cụ thể, người có kiểu gen GA có nguy cơ mắc bệnh gút gấp gần 19 lần so với người mang kiểu gen GG.

+ Đa hình gen *SLC22A12* rs11231825 có liên quan với bệnh gút, làm tăng cao nguy cơ bệnh gút, cụ thể người mang kiểu gen CT và TT có nguy cơ mắc bệnh gút cao hơn kiểu gen CC lần lượt là 3,119 lần (95%CI: 1,122 - 8,669; p=0,029) và 3,195 lần (95%CI: 1,439 - 10,654; p=0,008).

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

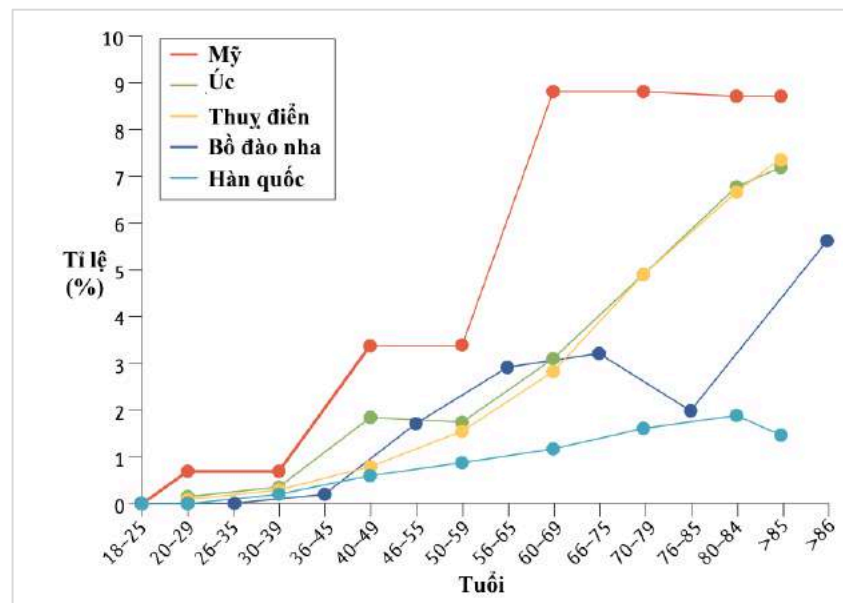
1.1. Đại cương về bệnh gút

1.1.1. Khái niệm

Gút là một bệnh lý về rối loạn chuyển hóa, được đặc trưng bởi những đợt viêm khớp cấp hay những đợt tái phát của tình trạng mạn tính và sự lắng đọng tinh thể urat trong các mô [8]. Bệnh nguyên là do tình trạng rối loạn chuyển hóa các nhân purin làm tăng acid uric máu kèm với sự bão hòa acid uric ở dịch ngoại bào gây lắng đọng tinh thể urat ở các mô [9].

1.1.2. Dịch tễ học

Gút là bệnh lý thường gặp ở các nước phát triển và ngày càng có xu hướng lan rộng sang các nước đang phát triển. Theo các nghiên cứu tại Anh tỷ lệ gút đã tăng từ 0,14% năm 1975 lên 1,4% năm 2005 [10].



Hình 1.1. Tỷ lệ bệnh nhân gút ở các nước gia tăng theo tuổi [11]

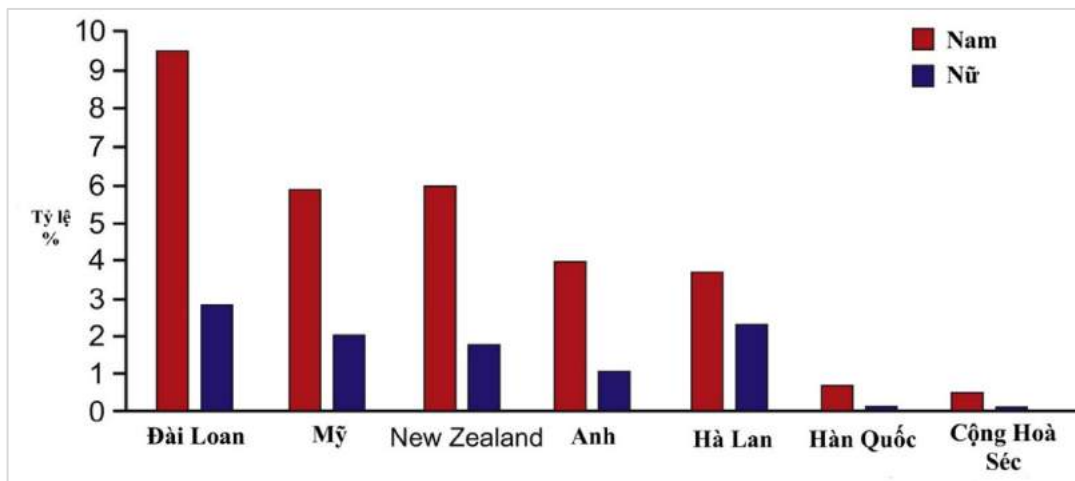
Các đường biểu diễn với các màu sắc khác nhau thể hiện tỷ lệ bệnh nhân gút ở các nước khác nhau trên thế giới

Đã có nhiều nghiên cứu được thực hiện để tìm hiểu về dịch tễ học của bệnh gút. Trong nghiên cứu khác nhau đã được công bố trên thế giới cho thấy tỷ lệ lưu hành và tỷ lệ mắc bệnh gút có sự phân bố địa lý và chủng tộc rõ rệt. Một nghiên cứu về bệnh gút ở Vương quốc Anh cho thấy tỷ lệ mắc bệnh là 2,49% và tỷ lệ lưu hành bệnh là 1,77 trên 1.000 người-năm vào năm 2012. Cả hai số liệu đều cao hơn

so với các ước tính trước đó [2]. Và một nghiên cứu được thực hiện tại Mỹ cũng đã chỉ ra rằng tỷ lệ mắc bệnh gút cao, đạt đến 3,9% trong giai đoạn 2007-2008 [12]. Tại khu vực Châu Á, Đài Loan là một trong những quốc gia có tỷ lệ mắc bệnh gút cao nhất. Nghiên cứu khảo sát tỷ lệ mắc bệnh gút toàn đất nước Đài Loan giai đoạn từ năm 2005 đến năm 2008 ghi nhận tỷ lệ mắc bệnh ở nam giới và nữ giới tương ứng là 8,2% và 2,3%. Hơn nữa, nghiên cứu cũng cho thấy người bản địa Đài Loan có tỷ lệ mắc bệnh gút rất cao, điều này được cho là có liên quan đến tính chất di truyền của bệnh [3].

Tại Việt Nam, trong giai đoạn từ năm 1978 đến năm 1989, tỷ lệ bệnh nhân nhập viện vì gút chiếm 1,5% tổng số các bệnh nhân được điều trị nội trú tại khoa cơ xương khớp bệnh viện Bạch Mai và theo một nghiên cứu khác đã được công bố thì trong 10 năm (1991-2000) tỷ lệ này đã tăng lên khoảng 8,57% [4].

Một số nghiên cứu dịch tễ học của Tổ chức Y tế thế giới và hội thập khớp học châu Á – Thái Bình Dương tiến hành tại một số tỉnh miền Bắc nước Việt Nam vào những năm 2000 cho thấy tỷ lệ mắc bệnh gút là 0,14% ở người trưởng thành [13, 14, 15].



Hình 1.2. Tỷ lệ bệnh nhân gút theo giới ở các nước trên thế giới [16]

Cột màu đỏ thể hiện tỷ lệ % nam giới ở các nước và cột màu xanh dương đậm thể hiện tỷ lệ % nữ giới ở các nước trên thế giới

1.1.3. Cơ chế bệnh sinh

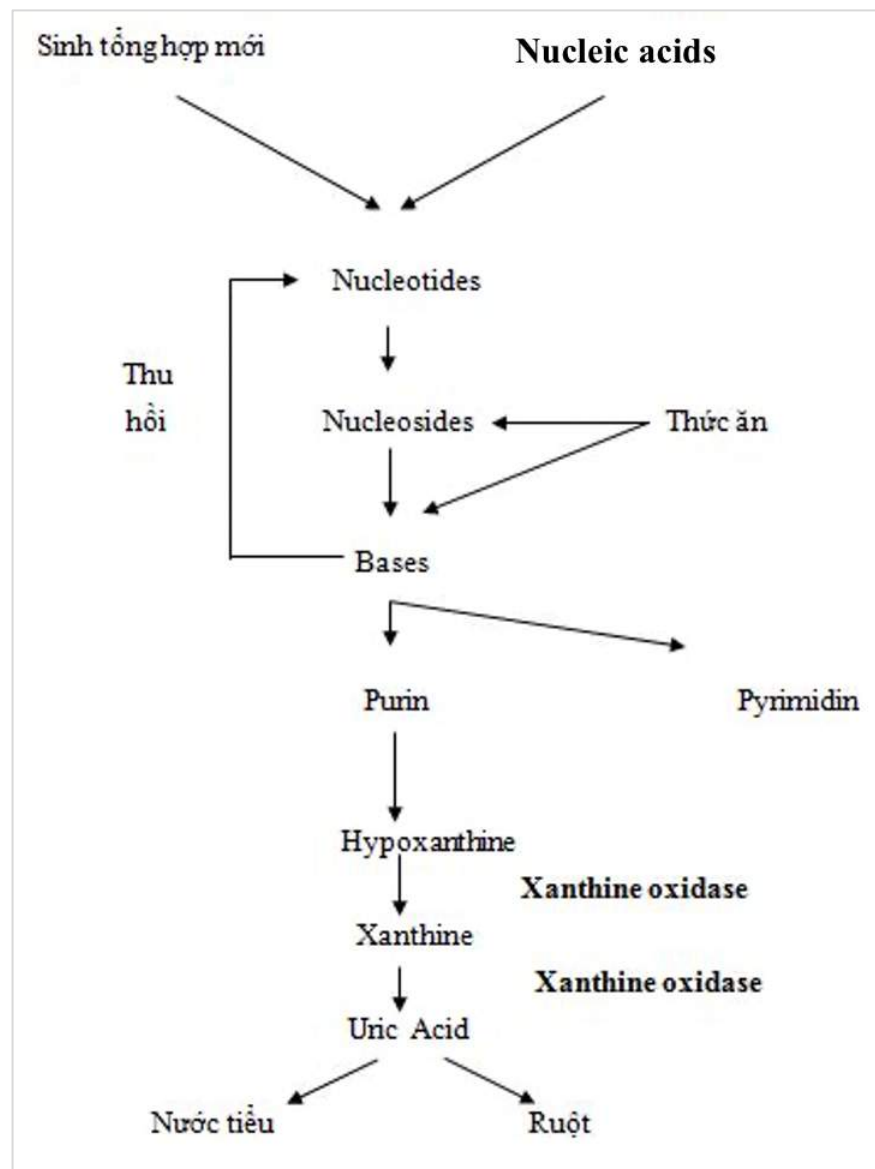
a) Chuyển hóa acid uric

Acid uric là một hợp chất hữu cơ dị vòng $C_5H_4N_4O_3$ (7,9-dihydro-1H-purine-2,6,8(3H)-trione) với trọng lượng phân tử là 168 Dalton. Nhiều enzyme có liên quan đến việc chuyển đổi hai acid nucleic purine, adenine và guanine, thành acid uric (hình 1.3). Ban đầu, adenosine monophosphate (AMP) được chuyển đổi thành inosine thông qua hai cơ chế khác nhau; (1) đầu tiên loại bỏ một nhóm amin bằng deaminase để tạo thành inosine monophosphate (IMP) tiếp theo là dephosphorylation với nucleotidase để tạo thành inosine, (2) hoặc loại bỏ một nhóm phot phát bằng enzyme nucleotidase để tạo thành adenosine tiếp theo là khử nhiễm để tạo thành inosine. Guanine monophosphate (GMP) được chuyển đổi thành guanosine bằng enzyme nucleotidase. Các nucleoside, inosine và guanosine, được chuyển đổi thêm thành purine, hypoxanthine và guanine, tương ứng, bởi enzyme purine nucleoside phosphorylase (PNP). Hypoxanthine sau đó bị oxy hóa để tạo thành xanthine xúc tác bởi xanthine-oxidase (XO), và guanine được khử nhiễm để tạo thành xanthine dưới hoạt động của guanine deaminase. Xanthine một lần nữa bị oxy hóa bởi xanthine oxidase để tạo thành sản phẩm cuối cùng, acid uric (hình 1.3).

Acid uric là sản phẩm cuối của con đường chuyển hóa purin ngoại sinh và nội sinh [17]. Tổng lượng purin ngoại sinh thay đổi đáng kể theo chế độ ăn uống và số lượng protein động vật mà cơ thể hấp thu vào mỗi ngày. Theo một số tài liệu nghiên cứu, các thực phẩm giàu purin có thể kể đến như rượu bia, thịt bò, thịt gia cầm, hải sản, nấm, rau bina, măng tây và súp lơ, ... [17]. Bên cạnh đó, quá trình sản xuất acid uric nội sinh chiếm khoảng hai phần ba tổng số lượng acid uric được tổng hợp, thành phần này chủ yếu đến từ gan, ruột và các một số các mô khác như cơ bắp, thận, nội mô mạch máu [18].

Bản thân acid uric là một loại acid yếu thường tồn tại dưới dạng este là muối urat hòa tan trong huyết tương. Ở những nam giới khỏe mạnh, nồng độ acid uric trong máu thường duy trì ở mức trung bình vào khoảng 5,1mg/dl. Trong khi đó, đối với nữ giới, nồng độ acid uric có thể thấp hơn với chỉ số nồng độ đạt khoảng 4,0mg/dl [17].

Trong điều kiện bình thường nồng độ acid uric trong cơ thể được giữ ở mức hằng định do sự cân bằng giữa quá trình tổng hợp và đào thải. Lượng acid uric do cơ thể tạo ra sẽ được đào thải qua đường thận và một phần qua đường tiêu hoá [14, 19, 20]. Ở người bình thường lượng acid uric được tạo ra trong một ngày vào khoảng 1200mg [21]. Khi quá trình này bị mất cân bằng sẽ gây nên biến đổi lượng acid uric trong cơ thể.



Hình 1.3. Sơ đồ chuyển hóa acid uric

Vì nhiều lý do, hiện tượng tăng acid uric máu xảy ra nhưng không luôn luôn dẫn tới lắng đọng tinh thể urat. Hầu hết những bệnh nhân giai đoạn đầu

tăng uric máu có thể không có triệu chứng và không ghi nhận những biến cố lâm sàng do lắng đọng tinh thể urat.

Khi có tình trạng lắng đọng tinh thể urat, thời điểm đó cơ thể có hiện tượng bão hòa urat dịch ngoại bào, biểu hiện bằng tình trạng tăng uric máu với nồng độ acid uric huyết thanh vượt qua ngưỡng giới hạn tối đa, xấp xỉ khả năng hòa tan của urat.

Nồng độ của acid uric trong máu được xem là tăng khi nó vượt quá ngưỡng giới hạn của độ hòa tan urat trong huyết thanh, giá trị vượt ngưỡng được xác định khác nhau tùy thuộc vào giới tính [19, 22] :

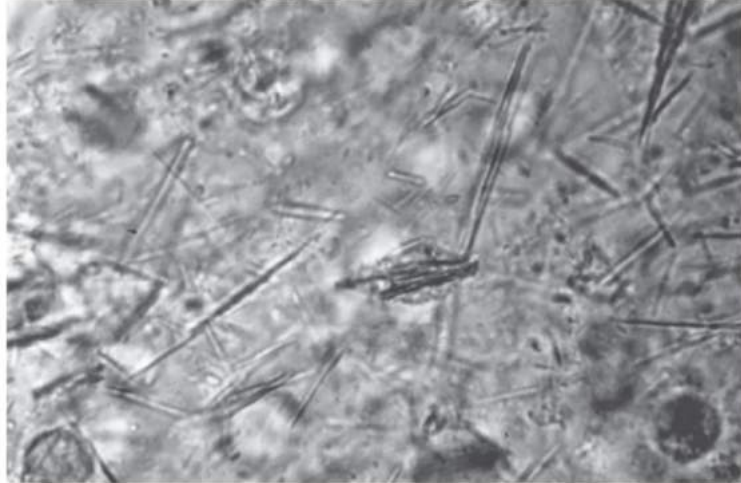
- Nồng độ acid uric ở nam > 7mg/l (420 μ mol/l)
- Nồng độ acid uric ở nữ > 6mg/l (360 μ mol/l)

b) Cơ chế bệnh sinh

Theo các tài liệu nghiên cứu hiện này, có rất nhiều yếu tố nguy cơ dẫn tới tình trạng tăng uric máu, có thể kể đến như sự giảm thải urat qua đường thận và đường tiêu hóa hoặc sự tăng sản xuất urat quá mức trong cơ thể [20, 23]. Khi có sự tăng nồng độ uric máu quá mức vượt quá khả năng hòa tan dẫn tới lắng đọng các tinh thể urat tại nhiều vị trí, khởi phát phản ứng viêm.

Trong số các yếu tố nguy cơ được liệt kê, một số yếu tố không thay đổi được bao gồm giới tính nam, tuổi tác cao, và chủng tộc. Ngoài ra, một số yếu tố nguy cơ thay đổi được bao gồm béo phì, dùng nhiều các thức uống chứa cồn, các loại soda và nước trái cây chứa nhiều đường fructose hay sucrose, tăng huyết áp, dùng lợi tiểu quai hoặc thiazide, bệnh thận mạn, ... [19].

Sự tích lũy acid uric ở mô, tạo nên các nốt tophi. Khi các nốt tophi tại sụn khớp vỡ sẽ khởi phát cơn gút cấp do sự lắng đọng vi tinh thể tại khớp, trong màng hoạt dịch, trong mô sụn và mô xương sẽ dẫn đến bệnh xương khớp mạn tính do gút, sự có mặt vi tinh thể urat tại mô mềm, bao gân tạo nên nốt tophi và cuối cùng viêm thận kẽ là do tinh thể urat lắng đọng tại tổ chức kẽ của thận. Acid uric niệu tăng và sự toan hóa nước tiểu dẫn đến sỏi tiết niệu trong bệnh gút [19, 21, 24].



*Hình 1.4. Ảnh tinh thể urat trong dịch khớp dưới kính hiển vi phân cực [9]
 Các tinh thể urat có hình đầu kim và hình que, có thể quan sát được dưới kính hiển vi ánh sáng phân cực bù trừ (vật kính 400x)*

1.1.4. Phân loại bệnh gút

Bệnh được phân loại dựa trên nhiều yếu tố và có nhiều cách phân loại. Tuy nhiên hiện nay, bệnh gút thường được phân loại dựa vào nguyên nhân và theo thể lâm sàng. Phân loại theo nguyên nhân bao gồm bệnh gút nguyên phát và bệnh gút thứ phát.

a) Gút nguyên phát

Bệnh gút nguyên phát theo các nghiên cứu hiện nay cho thấy chiếm đa số, tuy nhiên các nguyên nhân hiện còn chưa rõ, nhiều giả thuyết cho thấy có thể do di truyền, thức ăn, hoặc các nguyên nhân khác. Bệnh thường hay gặp ở nam giới, ăn nhiều hải sản, uống bia rượu. Một số trường hợp có thể liên quan đến yếu tố di truyền.

b) Gút thứ phát

Bệnh gút thứ phát thì ít gặp hơn. Theo các tài liệu nghiên cứu cho thấy thì nguyên nhân chính là do suy thận mạn tính và dùng thuốc lợi tiểu. Bên cạnh đó, các nguyên nhân khác có thể gặp là bệnh máu (bệnh bạch cầu, thiếu máu tán huyết, đa u tủy xương,...), bệnh da vảy nến diện rộng, bệnh suy giáp, tình trạng chấn thương, tình trạng nhiễm khuẩn và một số tình trạng khác.

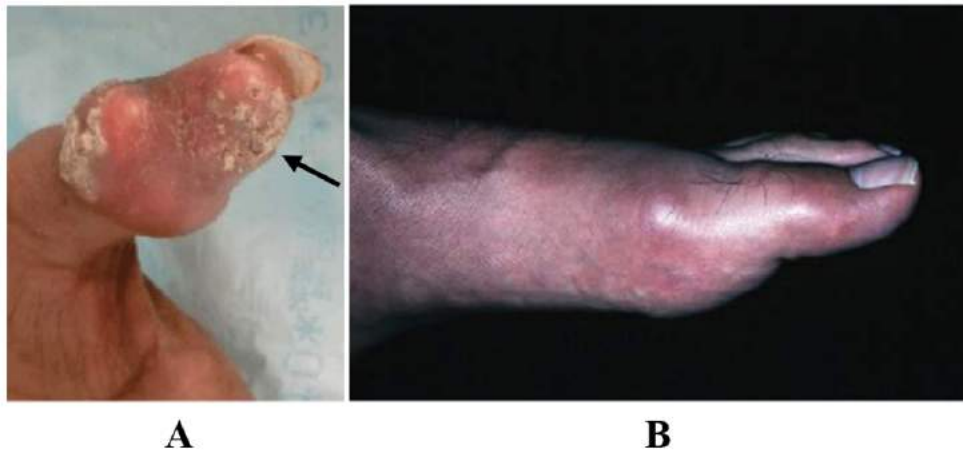
Đối với cách phân loại bệnh gút theo thể lâm sàng, các thể bệnh được liệt kê bao gồm bệnh gút cấp tính và bệnh bệnh gút mạn tính.

c) Bệnh gút cấp tính

Con gút cấp tính điển hình có thể xuất hiện tự phát hoặc khởi phát sau bữa ăn uống nhiều rượu thịt, sau phẫu thuật, stress, ... Trong đó, các triệu chứng có thể xuất hiện được mô tả trong y văn.

Triệu chứng cơ năng bao gồm khớp đau dữ dội, bóng rát, thường xuyên đau đến cực độ, đau làm bệnh nhân mất ngủ. Con đau tăng lên về đêm, có thể kèm theo sốt 38 – 39°C, có thể sốt rét run. Con đau từ vài ngày đến vài tuần giảm dần không để lại di chứng.

Triệu chứng thực thể của bệnh gút có thể có như tình trạng các khớp bị tổn thương sưng lên, vùng da trên các khớp tương ứng bị ửng hồng hoặc đỏ, đối với các khớp lớn có thể sự tràn dịch, còn các khớp nhỏ có thể có hiện tượng phù nề.



A

B

*Hình 1.5. A. Tổn thương dạng nốt tophi trên ngón tay cái bàn tay trái [25]
Vị trí mũi tên là tổn thương dạng nốt tophi, gây ra hiện tượng sưng đỏ vùng
nền ngón tay cái bàn tay trái*

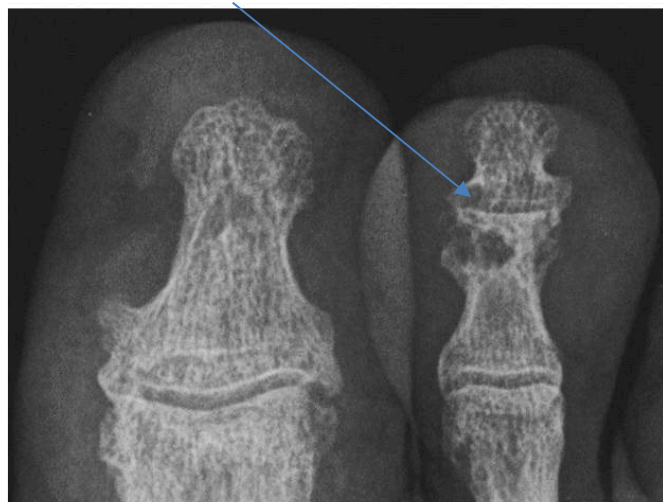
*B. Tổn thương dạng nốt tophi trên ngón chân cái bàn chân trái [26]
Vị trí mũi tên là tổn thương dạng nốt tophi, gây ra hiện tượng sưng đỏ vùng
nền ngón chân cái bàn chân trái*

Khi thực hiện xét nghiệm nồng độ acid uric máu, có thể thấy hiện tượng gia tăng về nồng độ. Ở nam giới, nồng độ có thể tăng lớn hơn 7 mg/l (420 $\mu\text{mol/l}$), và ở nữ giới lớn hơn 6 mg/l (360 $\mu\text{mol/l}$). Khi thực hiện lấy dịch khớp viêm đem đi soi dưới kính hiển vi huỳnh quang, có thể xuất hiện tinh thể urat hình kim hai đầu nhọn như trong hình đã mô tả ở trên.

Ở một số trường hợp, bệnh nhân có thể có đáp ứng điều trị với thuốc colchicin, các cơn đau sẽ thuyên giảm hoàn toàn sau 48 giờ [21, 27, 28].

d) Bệnh gút mạn tính

Bệnh gút mạn tính thường gặp ở những bệnh nhân đã từng xuất hiện cơn gút cấp từ một tới vài năm. Ở những bệnh nhân mạn tính này, các triệu chứng có thể xuất hiện trên nhiều cơ quan hoặc vùng của cơ thể, bao gồm sự xuất hiện nốt tophi, các tổn thương xương, tổn thương thận. Những triệu chứng này có thể được khảo sát bằng các cận lâm sàng như sinh hóa, chẩn đoán hình ảnh nhằm tìm các tích lũy urat ở các mô. Tình trạng gút mạn tính có thể gây ra các biến chứng từ việc lắng đọng tinh thể muối urat như trong thận gây ra bệnh sỏi thận dẫn đến làm tăng nguy cơ thận ứ nước, ứ mủ dẫn đến suy thận, tăng huyết áp. Có những trường hợp chất urat còn lắng đọng ở dưới da tạo nên các u, cục gây đau và mất thẩm mỹ.



Hình 1.6. Hình ảnh nốt tophi trên phim X-quang [29]

Hình mũi tên cho thấy các tổn thương mạn tính dạng nốt tophi trên phim X-quang xương, tổn thương này có dạng nang, bào mòn vỏ, gây mất sụn và sưng mô mềm

1.1.5. Chẩn đoán bệnh gút

Trong tình hình hiện nay, mặc dù có nhiều tiêu chuẩn được dùng để chẩn đoán bệnh gút, trong số đó tiêu chuẩn thường được sử dụng rộng rãi hiện nay là tiêu chuẩn ACR/EULAR 2015 [22]. Tiêu chuẩn ACR/EULAR 2015 có ưu điểm vượt trội so với các tiêu chuẩn trước đây về độ nhạy (92%), độ đặc hiệu (89%) [22], đồng thời cũng là tiêu chuẩn được áp dụng bởi nhiều hiệp hội và tổ chức y tế trên thế giới hiện nay.

Bảng 1.1. Các tiêu chuẩn chẩn đoán bệnh gút theo ACR / EULAR 2015

Các bước chẩn đoán	Tiêu chuẩn	Điểm
Bước 1: Tiêu chuẩn đầu vào	≥ 1 đợt sưng đau 1 khớp ngoại vi hay bao hoạt dịch (bao thanh dịch)	Có/Không
Bước 2: Tiêu chuẩn vàng	Phát hiện tinh thể urat trong 1 khớp có triệu chứng hay bao hoạt dịch (tức là, trong dịch khớp) hoặc hạt tophi	Có/Không
Bước 3: Nếu không phát hiện được tinh thể urat		
* Lâm sàng		
1. Đặc điểm của viêm	+ Khớp cổ chân hay giữa	1
2. Tính chất đợt viêm		
3. Đặc điểm thời gian		
4. Nốt tophi	Không	0
* Cận lâm sàng		
1. Xét nghiệm acid	< 240 mmol/l	- 4
2. Xét nghiệm dịch	Không phát hiện tinh thể	- 2
3. Chẩn đoán hình ảnh		
4. Xquang:		
Chẩn đoán bệnh gút	TỔNG ĐIỂM	≥ 8

1.1.6. Khó khăn trong việc chẩn đoán bệnh gút giai đoạn sớm:

Mặc dù nồng độ acid uric là yếu tố quan trọng trong việc chẩn đoán sớm bệnh gút, tuy nhiên tình trạng tăng acid uric không đồng nghĩa với việc mắc bệnh gút. Bên cạnh đó, trong một vài trường hợp, bệnh nhân mắc bệnh gút ở giai đoạn sớm có kết quả xét nghiệm acid uric máu không cao. Các biểu hiện giai đoạn sớm của gút có thể bị nhầm lẫn với bệnh giả gút. Do đó gây ảnh hưởng đến quá trình chẩn đoán bệnh ở giai đoạn sớm.

Bệnh giả gút được định nghĩa là một dạng viêm khớp đặc trưng bởi những cơn đau đột ngột ở một hoặc nhiều khớp xương kèm theo hiện tượng sưng, nóng và tấy đỏ. Có biểu hiện tương tự bệnh gút nhưng gây ra bởi sự tích tụ các tinh thể canxi pyro-phosphat vào khớp. Sự tích lũy các tinh thể này tăng dần theo độ tuổi và xuất hiện trên 50% người trên 85 tuổi.

Để khắc phục các khó khăn trong việc chẩn đoán sớm bệnh gút và sự biểu hiện lâm sàng tương đồng với bệnh giả gút, mối tương quan giữa gút và các đa hình trên các gen liên quan cần được nghiên cứu để tăng độ tin cậy trong chẩn đoán bệnh sớm và có phác đồ điều trị phù hợp tránh dẫn đến các biến chứng của gút sau này.

1.1.7. Điều trị bệnh gút

a) Thuốc kháng viêm không steroids (NSAIDs)

Các thuốc thuộc nhóm kháng viêm không steroids có tác dụng giảm đau và kháng viêm được sử dụng trong cơn gút cấp với mục đích giảm triệu chứng đạt hiệu quả tương đối cao [30]. Tuy nhiên việc sử dụng các thuốc này cần chú ý đến tác dụng phụ trên đường tiêu hóa, tim mạch, ... Thời gian sử dụng thuốc tùy thuộc vào các yếu tố như tình trạng bệnh, mức độ nặng của đợt cấp, triệu chứng của bệnh nhân. Đa phần thuốc có hiệu quả giảm đau sau vài giờ [31]. Điều trị nên được tiếp tục trong vài ngày để ngăn ngừa các đợt tái phát. Chỉ định ngưng NSAIDs sau khi dấu hiệu lâm sàng được cải thiện [32].

b) Colchicine

Sử dụng Colchicine trong điều trị triệu chứng của bệnh gút được ghi nhận là đạt được hiệu quả tương đối cao. Bệnh nhân nên được khởi đầu sử dụng thuốc với liều thấp nhất có tác dụng. Thông thường thời điểm bắt đầu sử

dụng là trong 12-24 giờ sau khi khởi phát triệu chứng [32]. Thời gian sử dụng thuốc được khuyến cáo như sau [33]:

- Liều dùng từ 0,6-1,2 mg mỗi ngày, có thể chia 1-2 lần trong ngày, sao cho tổng liều tối đa cho cả ngày là 1,2 mg.

- Đối với các bệnh nhân có độ lọc cầu thận < 45 ml/phút, liều colchicine phải giảm hơn so với người bình thường.

- Thận trọng khi sử dụng đồng thời với các thuốc thuộc nhóm ức chế mạnh Cytochrome P450 hoặc ức chế P-glycoprotein, đặc biệt là trên bệnh nhân suy thận hoặc có bệnh lý gan mạn tính.

- Tác dụng phụ thường gặp của Colchicine là tiêu chảy và đau bụng, một số trường hợp dùng lâu có thể gây nên bệnh lý về thần kinh cơ.

c) Corticosteroids

Các thuốc corticosteroid có thể sử dụng ở nhiều dạng khác nhau như tiêm trong khớp, tiêm tĩnh mạch và dạng uống, được chỉ định sử dụng kết hợp trong trường hợp bệnh nhân đã dùng đủ liều NSAIDs hoặc Colchicine nhưng vẫn chưa đạt được mục tiêu điều trị [34]. Tuy nhiên, cần loại trừ tình trạng nhiễm trùng khớp và phải áp dụng đúng kỹ thuật đối với các trường hợp tiêm thuốc trực tiếp vào khớp. Liều dùng đối với những thuốc thuộc nhóm glucocorticoids dạng Triamcinolone acetonide được khuyến cáo sử dụng với các khớp lớn (khớp gối) 40-80mg, khớp trung bình (cổ tay, mắt cá chân, khuỷu tay) 30-40mg, khớp nhỏ 10-20mg hoặc liều tương đương của Methylprednisolone acetate [35]. Ngoài ra, corticosteroids đường uống hoặc tiêm có tác dụng toàn thân còn được chỉ định cho bệnh nhân viêm nhiều khớp. Tuy nhiên, có một số lưu ý khi sử dụng thuốc thuộc nhóm corticosteroid như [36]:

- Thận trọng ở bệnh nhân suy tim, tăng huyết áp khó kiểm soát, không dung nạp glucose

- Có thể sử dụng glucocorticoid ở những bệnh nhân suy thận vừa đến nặng

d) Điều trị nhiễm khuẩn

Đối với các bệnh nhân gút có hiện tượng nhiễm khuẩn, điều trị với kháng sinh được khuyến cáo sử dụng ngay khi phát hiện tình trạng bội nhiễm [37]. Kháng sinh thường được dùng theo phương pháp tiêm tĩnh mạch với thời gian điều trị kéo dài từ 2 đến 4 tuần. Trong trường hợp có xuất hiện các tổn thương ở da, cần rửa sạch vùng tổn thương tại chỗ bằng nước muối sinh lý hoặc dung dịch iod betadin pha loãng. Sau đó có thể đắp gạc tẩm dung dịch muối natri clorua 10%. Tiến hành thay băng định kỳ, dẫn lưu dịch nhiễm khuẩn. Trong trường hợp, các nốt tophi quá lớn hoặc vùng nhiễm khuẩn rộng, các can thiệp ngoại khoa nên được thực hiện như, phẫu thuật loại bỏ tổ chức sụn, xương khi có nhiễm khuẩn sụn khớp hay xương kèm theo [38].

e) Các thuốc làm giảm acid uric máu

Đối các thuốc thuộc nhóm làm giảm nồng độ acid uric trong máu, theo khuyến cáo thì bệnh nhân không nên sử dụng trong đợt viêm cấp [37]. Tuy nhiên, nếu bệnh nhân đang dùng mà khởi phát đợt cấp thì vẫn tiếp tục dùng. Liều lượng thuốc được sử dụng tăng dần từ liều thấp tới liều cao khi điều trị. Những thuốc thuộc nhóm này phải được sử dụng liên tục, không ngắt quãng, không tự ý ngưng thuốc. Trong giai đoạn khởi đầu, thuốc giảm nồng độ acid uric trong máu được sử dụng kết hợp với các thuốc khác để ngăn ngừa nguy cơ tiến triển đến cơn gút cấp. Khi sử dụng thuốc làm giảm acid uric máu, bệnh nhân cần phải có chế độ ăn uống và sinh hoạt hợp lý và khoa học [39]. Bệnh nhân cần giảm cân, tập thể dục thường xuyên, duy trì trọng lượng cơ thể ở mức sinh lý. Đặc biệt phải thực hiện chế độ ăn giảm đạm, tránh những thức ăn nhiều purin như phủ tạng động vật, thịt cá và tôm cua trong khẩu phần ăn hàng ngày, tăng lượng rau xanh và hoa quả. Bên cạnh đó, việc giảm hoặc loại bỏ hoàn toàn thức uống có cồn, nước ngọt có ga và uống nhiều nước lọc cũng giúp cải thiện tình trạng acid uric trong máu [40].

1.1.8. Dự phòng bệnh gút

Dự phòng bệnh gút đòi hỏi phải kết hợp nhiều các yếu tố [41]. Đầu tiên cần phải có chế độ ăn uống hợp lý như tránh ăn thức ăn hải sản, ăn ít chất béo

bão hòa và các sản phẩm chứa ít chất béo, ngưng hoặc giảm sử dụng các thức uống có cồn, đặc biệt là bia rượu ...

Đối với những bệnh nhân có yếu tố nguy cơ mắc bệnh gút bao gồm Đái tháo đường, béo phì ... cần phải thực hiện kiểm tra sức khỏe định kỳ hàng năm và thực hiện chế độ ăn hợp lý [37].

1.2. Tổng quan về đa hình nucleotide đơn (SNPs)

1.2.1. Đặc điểm của đa hình nucleotide đơn (SNP)

Đa hình nucleotide đơn (Single nucleotide polymorphism - SNP) được định nghĩa là những biến thể trình tự DNA xảy ra khi một đơn nucleotide (A, T, C, hoặc G) trong trình tự hệ gen bị thay đổi so với các cá thể khác trong cùng một loài hoặc so với NST còn lại trong cặp NST tương đồng [42]. Các đa hình này xuất hiện trong quần thể với tỷ lệ $\geq 1\%$ [42].

Trung bình cứ mỗi 1000 nucleotide sẽ xuất hiện 1 SNP, do đó có khoảng 4 đến 5 triệu SNP trong mỗi một hệ gen. Cho đến nay, các nhà khoa học đã thiết lập nhận diện được khoảng hơn 100 triệu SNP ở các cá thể thuộc nhiều dân tộc khác nhau trên thế giới [43, 44]. Hầu hết đa hình SNP nằm ở các vùng không mã hóa và xuất hiện ít hơn trong các vùng mã hóa [45]. SNP ở các vùng không mã hóa có thể trên các intron hoặc các vùng điều hoà gen. Những SNP trên vùng intron có thể đóng vai trò là các marker di truyền hoặc vật lý quan trọng cho các nghiên cứu so sánh và nhân chủng học tiến hóa phân tử. Các SNP có mặt ở các vùng điều hòa của gen, có thể gây ảnh hưởng đến quá trình ghép nối các gen và tác động đến các yếu tố phiên mã sẽ làm suy thoái RNA thông tin hoặc trình tự của RNA không mã hóa, dẫn đến sự tăng hoặc giảm biểu hiện gen. Các SNP khác ở các vùng mã hóa có thể làm thay đổi một amino acid trong chuỗi polypeptide, do đó có thể ảnh hưởng tới chức năng của protein. Các đa hình này được xem là một nguyên nhân chính gây nên một số bệnh di truyền [46]. Do đó chúng có thể được sử dụng như các marker phân tử trong nhiều nghiên cứu di truyền học và nghiên cứu dược lý học.

1.2.2. Các phương pháp xác định đa hình đơn nucleotide đơn (SNP)

Cùng với sự phát triển mạnh mẽ của khoa học kỹ thuật và đặc biệt là sự ra đời của các phương pháp giải trình tự gen thế hệ mới; các phương pháp xác

định SNP đã được cải thiện liên tục, cho phép xác định đồng thời một lượng lớn SNP với độ chính xác cao. Các phương pháp xác định SNP được chia thành 4 nhóm chính:

a) Phương pháp sử dụng Enzyme (Enzyme-based methods)

Các phương pháp này có độ đặc hiệu cao nhưng đòi hỏi các điều kiện tối ưu hóa cao để có được kết quả tốt nhất có thể. Ở những phương pháp này, các tính chất đặc trưng của DNA như nhiệt độ nóng chảy và cấu trúc sợi đơn được sử dụng để phân biệt các allele SNP. Có thể kể đến một số phương pháp như SSCP (Single strand conformation polymorphism), TGGE (Temperature gradient gel electrophoresis), DHPLC (Denaturing high performance liquid chromatography), ...

Các enzyme bao gồm DNA ligase, DNA polymerase và nuclease sử dụng làm nền tảng để xây dựng các phương pháp phát hiện và xác định SNP có độ chính xác cao.

❖ Đa hình chiều dài đoạn cắt giới hạn (RFLP - Restriction fragment length polymorphism):

RFLP là phương pháp đơn giản và sớm nhất được sử dụng để phát hiện SNPs. Phương pháp này được sử dụng phổ biến cho các đột biến và SNP đã biết. Kỹ thuật này sử dụng các enzyme cắt giới hạn khác nhau, cho phép cắt các trình tự gen ở vị trí cắt đặc hiệu. RFLP được tiến hành qua 2 bước: vùng trình tự DNA có chứa vị trí SNP được khuếch đại bằng PCR, sau đó sản phẩm PCR sẽ được xử lý bằng enzyme cắt giới hạn tương ứng RFLP. Chiều dài các sản phẩm cắt sẽ được xác định thông qua điện di trên gel. Từ đó, xác định liệu SNP có tồn tại ở vị trí cắt giới hạn hay không và kiểu gen của chúng.

So với các phương pháp khác, RFLP có ưu thế lớn về chi phí tuy nhiên độ chính xác thấp cùng với những hạn chế về mặt thời gian (cần thời gian để xử lý với enzyme và đã khiến phương pháp này trở thành lựa chọn thứ yếu để phát hiện và xác định SNP. Ngoài ra, rất nhiều các đột biến và đa hình không dẫn đến sự hình thành hoặc loại bỏ vị trí cắt đặc hiệu, do đó không thể phát hiện chúng bằng phân tích RFLP.

❖ Các phương pháp dựa trên nền tảng PCR (PCR-based methods):

Những phương pháp này dựa trên nền tảng sử dụng DNA polymerase trong phản ứng chuỗi trùng hợp PCR. Chúng được phát triển theo 2 hướng cụ thể: (1) sử dụng các đoạn mồi bắt cặp với nucleotide được thay thế (allele-specific PCR) hoặc sử dụng các oligonucleotide để chặn hoặc kẹp trình tự không chứa SNPs, (2) phân tích đường cong biến tính (melting curve) kết hợp với các kỹ thuật real-time PCR sử dụng các đầu dò thủy phân, các đầu dò lai hoặc thuốc nhuộm huỳnh quang gắn sợi DNA kép.

❖ Flap endonuclease: Flap endonuclease (FEN) là một endonuclease xúc tác sự phân cắt cấu trúc đặc thù. Sự phân cắt này rất nhạy cảm với những bắt cặp lỗi và có thể được sử dụng để xác định SNP với mức độ đặc hiệu cao [47].

❖ Phương pháp kéo dài mồi (Primer extension):

Kéo dài mồi là một quá trình gồm hai bước, bao gồm việc lai một đầu dò với các bazơ nằm bên cạnh SNP, sau đó là một phản ứng 'giải trình tự nhỏ' sử dụng DNA polymerase mở rộng đoạn mồi lai bằng cách thêm một bazơ bổ sung cho các nucleotide SNP. Bazơ bổ sung này được phát hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau, từ đó xác định allele SNP [48, 49]. Bởi vì phương pháp kéo dài mồi dựa trên enzyme DNA polymerase có độ chính xác cao, do đó phương pháp này thường rất đáng tin cậy. Kéo dài mồi cũng có thể xác định kiểu gen cho hầu hết các SNP trong các điều kiện phản ứng rất giống nhau, vì thế phương pháp này được đánh giá cao về độ linh hoạt.

❖ 5'-nuclease:

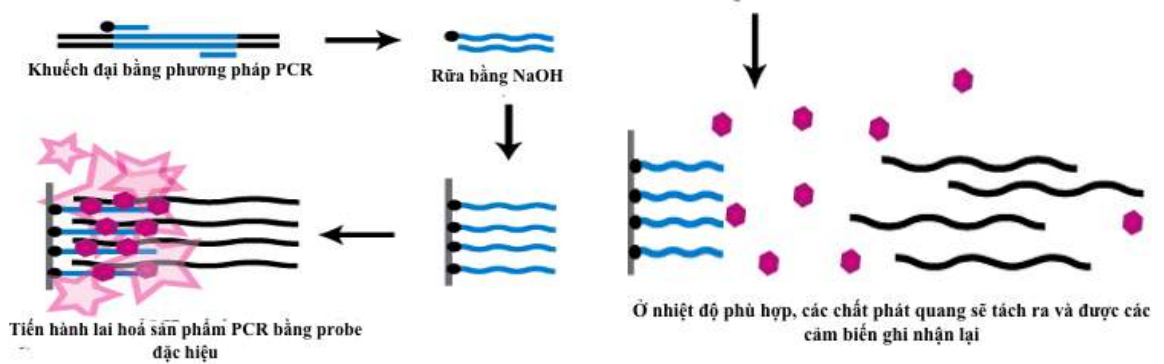
Hoạt tính 5'-nuclease của Enzyme Taq DNA polymerase sẽ được sử dụng trong các phân tích sử dụng các đầu dò Taqman [50]. Ở phương pháp này, sử dụng hai đoạn mồi được thiết kế nhằm khuếch đại đoạn trình tự có chứa SNP và hai đầu dò huỳnh quang TaqMan với Binder Groove nhỏ (MGB). Mỗi đầu dò được dán nhãn huỳnh quang khác nhau (VIC hoặc 6-FAM). Khi phản ứng PCR xảy ra, các đầu dò lai đặc hiệu với các đoạn DNA sẽ bị phá hủy và tín hiệu huỳnh quang tương ứng sẽ được giải phóng.

b) Phương pháp dựa trên phản ứng lai (Hybridization-based methods)

Một số phương pháp đã được phát triển để xác định SNP bằng cách lai các đầu dò DNA bổ sung vào vị trí SNP.

❖ **Dynamic allele-specific hybridization (DASH):**

Phương pháp này tận dụng sự khác biệt về nhiệt độ nóng chảy ở các phân tử DNA do sự không ổn định của các cặp bazơ bắt cặp lỗi.



Hình 1.7. Ảnh minh họa phương pháp Dynamic allele-specific hybridization [51]

*Các bước của phương pháp được tiến hành theo chiều của mũi tên
lần lượt từ trái qua phải*

❖ **Molecular beacons:**

SNP được phát hiện thông qua các đèn hiệu (beacons) phân tử sử dụng đầu dò oligonucleotide đơn sợi được thiết kế đặc biệt. Nếu trình tự thăm dò của đèn hiệu phân tử gặp trình tự đích, nó sẽ ụ và lai. Sự thay đổi về hình dạng trong quá trình lai làm cho phân tử huỳnh quang và chất khử cách xa nhau và phát ra tín hiệu huỳnh quang. Mặt khác, nếu trình tự thăm dò gặp một chuỗi mục tiêu chỉ bằng một nucleotide không bổ sung, đèn hiệu phân tử sẽ ưu tiên ở trạng thái kẹp tóc tự nhiên và không phát huỳnh quang.

❖ **SNP microarrays**

Ở phương pháp này, hàng trăm ngàn đầu dò được sắp xếp trên một con chip nhỏ, cho phép xác định được nhiều SNP cùng một lúc [52]. Vì các allele SNP chỉ khác nhau ở một nucleotide nên rất khó để đạt được điều kiện lai tối

ưu cho tất cả các đầu dò trên mảng và dẫn đến DNA đích có khả năng lai với các đầu dò không khớp. Do đó SNP microarrays không được đánh giá rất cao về mức độ đặc hiệu và độ nhạy. Tuy nhiên phương pháp này cực kì có ưu thế về số lượng SNP được xác định.

c) Phương pháp giải trình tự

❖ Phương pháp Sanger

Các trình tự nucleotide cần quan tâm sẽ được xác định trên nguyên tắc tạo ra các đoạn DNA một sợi hơn kém nhau một nucleotide, kết thúc bởi các ddNTP đã được đánh dấu huỳnh quang.

❖ Các kỹ thuật khác

Nhờ vào sự phát triển mạnh mẽ của các kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới, trình tự hệ gen của một cá thể có thể được giải trình tự toàn bộ trong thời gian ngắn, cung cấp một lượng thông tin dữ liệu khổng lồ về hệ gen và hệ biến thể ở người [7]. Nhằm đáp ứng nhu cầu xử lý lượng dữ liệu này, các công cụ tin sinh đã được thiết kế, cho phép lắp ráp và xây dựng hệ gen đồng thời tiến hành xác định và phân tích hệ biến thể ở các cá thể [53].

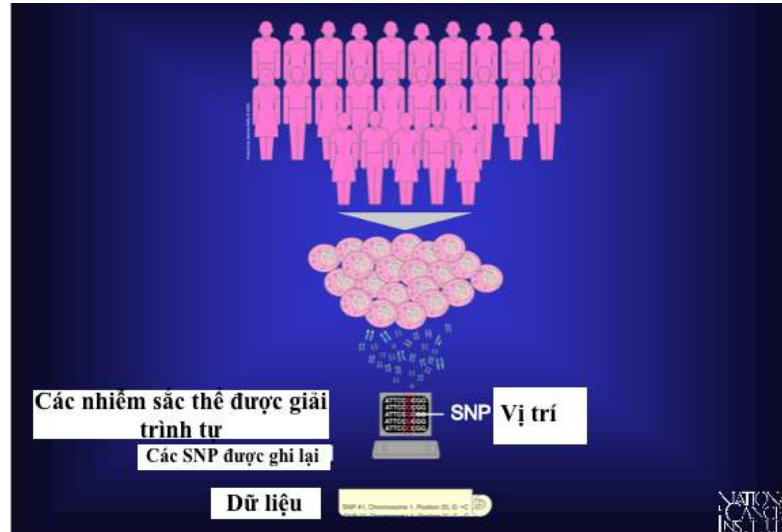
1.2.3. Tầm quan trọng và ứng dụng của đa hình nucleotide đơn (SNP)

Là kiểu đa hình cực kỳ phổ biến, chiếm đến 80% sự biến đổi trong hệ gen, các đa hình SNP nắm giữ chìa khóa phân tử quan trọng nhất đối với cơ thể người. Mặt khác các SNP cũng tiến hóa ổn định, không thay đổi nhiều từ thế hệ này sang thế hệ khác cho phép chúng ta dễ dàng nghiên cứu. Do vậy các SNP rất có giá trị trong các nghiên cứu về di truyền học ở người.

a) Bản đồ SNP

Các nhà khoa học tin rằng việc thiết lập một bản đồ SNP sẽ đem lại tiềm năng rất lớn, giúp xác định được nhiều gen liên quan đến các bệnh phức tạp như ung thư, tiểu đường hay một số dạng bệnh tâm thần. Chính vì vậy hai dự án nghiên cứu là Human Genome Project (HGP) và dự án The SNP Consortium (TSC) đã tập trung vào tìm kiếm, xác định và thiết lập bản đồ SNP. Kết quả của nghiên cứu này công bố rộng rãi trên thế giới vào tháng 10 năm 2000 [54, 55]. Sự xuất hiện của bản đồ SNP cho phép nghiên cứu đặc tính

của các biến thể trình tự DNA trên hệ gen người. Những dữ liệu này được sử dụng để mô tả phổ gen, cung cấp các nguyên liệu cho các nghiên cứu đa dạng di truyền quần thể người.



Hình 1.8. Ảnh minh họa cách thiết lập bản đồ SNPs [56]

Các bước thiết lập bản đồ SNPs được liệt kê tuần tự trong hình trên

Ngoài ra bằng cách sử dụng bản đồ SNP mô tả sự đa dạng haplotype trên hệ gen, các nhà khoa học sẽ thu được những hiểu biết về lịch sử tiến hóa của con người. Phần lớn cấu trúc haplotype vẫn chưa được khám phá, và bản đồ này cho phép xác định quy mô, sự biến đổi của các haplotype giống nhau, số lượng và tần số của haplotype phổ biến, sự phân bố của chúng giữa và trong các nhóm dân tộc hiện có.

b) Phát triển SNP và y học

Các kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, sự xuất hiện các SNP không phải là nguyên nhân gây ra các bệnh ở người. Tuy nhiên chúng có liên quan đến nguy cơ phát triển hoặc thuyên giảm của một số căn bệnh cụ thể. Nghiên cứu quan trọng ý tìm ra sự ảnh hưởng của SNP đối với bệnh ở người là nghiên cứu mối tương quan giữa SNP và bệnh Alzheimer [57]. Giống như các rối loạn mạn tính như bệnh tim, tiểu đường, hoặc ung thư, bệnh Alzheimer là một bệnh được gây ra bởi các biến thể trong một vài gen. Gen *APOE* chứa đến hai SNP trong ba allele của nó: E2, E3, E4. Nghiên cứu chỉ ra rằng, cá thể mang allele

E4 sẽ có khả năng phát triển bệnh Alzheimer hơn so với cá thể mang allele E2 [57, 58].

Để tiến hành nghiên cứu mối tương quan giữa SNP và bệnh quan tâm, nghiên cứu bệnh – chứng (case – control) cần được tiến hành. Thành phần và tỷ lệ kiểu gen của SNP được so sánh giữa nhóm người bệnh và nhóm chứng. Nhờ các so sánh này (còn gọi là "association study") các nhà khoa học có thể phát hiện sự khác biệt giữa các mô hình di truyền giả định như cộng gộp, di truyền lặn và di truyền trội của SNP giữa hai nhóm. Từ đó, xác định được mối liên quan của SNP trên gen nghiên cứu với bệnh quan tâm. Dựa vào kết quả của các nghiên cứu này, mối tương quan giữa một nhóm SNP với một bệnh cụ thể sẽ được xác định. Bên cạnh đó, các nhà nghiên cứu cũng có thể xác định mối tương quan giữa các SNP với khả năng hấp thụ một số loại thuốc nhất định, hoặc xác định khả năng phản ứng của từng cá nhân với tác dụng phụ bất lợi cho một loại thuốc cụ thể.

Với các bằng chứng cụ thể về tầm quan trọng của mối tương quan giữa SNP và các bệnh di truyền, các nghiên cứu về SNP sẽ cung cấp thông tin hữu ích cho quá trình việc phòng ngừa bệnh trong tương lai.

c) Mối liên quan giữa một số đa hình gen và bệnh gút

Các yếu tố nguy cơ đã biết đối với bệnh gút bao gồm tăng acid uric máu, béo phì, tăng huyết áp, sử dụng thuốc lợi tiểu ... Hiện nay đã có nhiều nghiên cứu về các cơ chế ảnh hưởng đến nồng độ acid uric huyết thanh ở người. Một số nghiên cứu về mối liên hệ trên toàn bộ bộ gen (GWAS) gần đây đã xác định được mối liên hệ quan trọng giữa các đa hình đơn nucleotide trong gen SLC2A9 với mức độ acid uric và bệnh gút.

Ngoài ra một số nghiên cứu gần đây cũng đã xác định mối liên hệ đáng kể giữa các đa hình đơn trong ABCG2 với nồng độ acid uric và bệnh gút ở các nhóm dân tộc khác nhau. Trong một nghiên cứu tại Trung Quốc, các đa hình đơn nucleotide rs1165205 trong SLC17A3 và rs2231142 trong ABCG2 có liên quan đến nồng độ acid uric và bệnh gút. Đa hình đơn rs6855911 nằm trong intron 7 của SLC2A9, cho thấy tín hiệu mạnh nhất với tác dụng bảo vệ của alen nhỏ trong quần thể người Đức. Tương tự như trên, đa hình rs3733591,

một biến thể bổ sung trong SLC2A9, đã được báo cáo là có liên quan đến bệnh gút ở một số quần thể Đông Á và Châu Âu.

1.3. Nghiên cứu vai trò của các gen đối với bệnh gút trên thế giới và Việt Nam

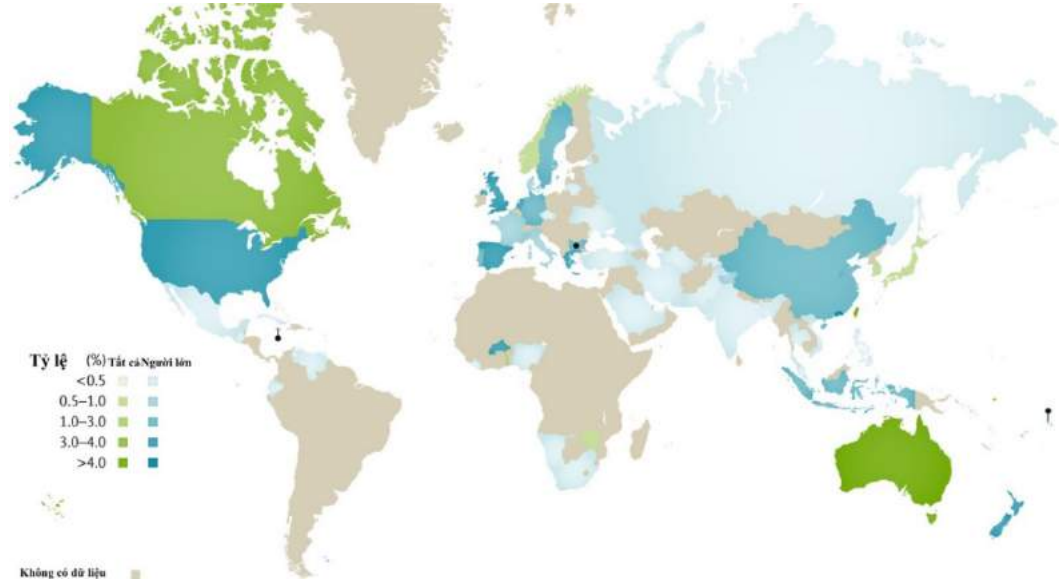
Gút được xem là bệnh viêm khớp do sự ứ đọng các vi tinh thể do tình trạng tăng acid uric dẫn đến sự bão hòa và lắng đọng tinh thể urat ở khớp và các cơ quan khác trong cơ thể. Bệnh gút đã được chứng minh có tính gia đình, do đó có liên quan đến các yếu tố di truyền. Các nhà nghiên cứu hiện đã xác định được mức độ ảnh hưởng của các yếu tố nguy cơ đối với bệnh gút là rất cao [59].

Trước đây, những hiểu biết về đặc điểm di truyền của bệnh gút chỉ giới hạn quanh các đột biến gen liên quan đến các hội chứng khác nhau. Tuy nhiên trong hai thập kỷ qua, những nghiên cứu về nguyên nhân và cơ chế di truyền liên quan đến bệnh gút cũng như bản chất của các liệu pháp điều trị bệnh đã đạt được những bước tiến đáng kể. Trong đó, nghiên cứu đáng chú ý nhất là phát hiện được các đa hình trên 28 locus liên quan đến nồng độ urat và nguy cơ mắc bệnh gút [5]. Ngoài ra, nghiên cứu chỉ ra allele HLA-B*58:01 có liên quan đến khuynh hướng của phản ứng quá mẫn với thuốc allopurinol ở các bệnh nhân gút [60]. Những tiến bộ này cùng với sự phát triển của các kỹ thuật di truyền hiện đại cho phép nhanh chóng xác định các đa hình, giúp cho việc xây dựng dữ liệu di truyền cá thể hóa ở bệnh nhân trở nên dễ dàng hơn. Từ đó, các nhà nghiên cứu có thể cung cấp đánh giá tiên lượng, dự đoán sớm nguy cơ mắc bệnh gút và tư vấn lối sống cho các cá nhân chưa mắc bệnh đồng thời phòng ngừa và xác định khả năng xảy ra các tác dụng phụ nghiêm trọng khi điều trị gút ở các bệnh nhân.

1.3.1. Tình hình nghiên cứu tổng quát về bệnh gút trên thế giới

Hiện nay trên thế giới có rất nhiều các nghiên cứu liên quan đến bệnh gút. Nhiều nghiên cứu về bệnh học của bệnh gút được thực hiện trên toàn thế giới. Tỷ lệ các bệnh nhân mắc bệnh gút ở các quốc gia thuộc các khu vực khác nhau rất khác nhau, dao động trong khoảng từ 0,1% cho đến 10% [11]. Tỷ lệ mắc bệnh cao nhất đã được báo cáo ở các nước thuộc châu Đại Dương, đặc biệt là

trong nhóm sắc tộc bản địa Đài Loan [61] và người Maori với tỷ lệ trên 10% [62]. Gút cũng phổ biến ở nhiều nước thuộc 2 khu vực Nam Mỹ và Tây Âu với tỷ mắc bệnh ước tính dao động từ 1-4% [12].



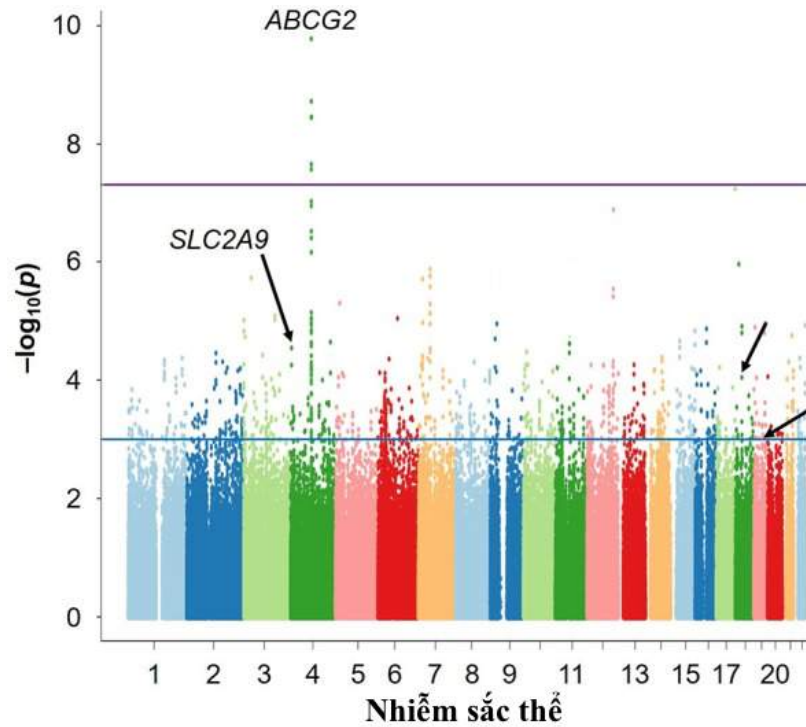
Hình 1.9. Tỷ lệ ước tính của bệnh nhân gút trên toàn thế giới [11]

Vai trò của các yếu tố đa hình đối với bệnh gút đã được phát hiện và nghiên cứu theo 2 hướng chính, bao gồm (1) bệnh gút có nguyên nhân từ các yếu tố di truyền đơn gen (đột biến xảy ra trên các gen liên quan đến con đường chuyển hóa purin, quá trình chết tế bào và sự suy giảm bài tiết acid uric ở thận) gây ra bệnh gút và các hội chứng di truyền có liên quan như hội chứng Lesch-Nyhan, Von Gierke, bệnh thận đa nang tủy loại I... Trong nhóm gen gây bệnh này phải kể đến các điểm biến đổi C77Y, C129R, N128S, C255Y và C300G trên gene *UMOD*; bên cạnh đó các điểm biến đổi R83C, Q347X trên gen *G6PC* cũng được báo cáo liên quan đến bệnh Von Gierke liên quan đến gút. (2) bệnh gút chịu ảnh hưởng của các đa hình nằm trên các gen liên quan đến các kênh vận chuyển urat, các gen mã hóa interleukin và các protein phản ứng viêm... Những đa hình này thường có tác động yếu, thông qua các quá trình điều hòa biểu hiện gen, ổn định và xử lý phiên mã [63].

1.3.2. Các nghiên cứu tương quan toàn bộ nhiễm sắc thể với bệnh gút

Trong những năm gần đây, các nghiên cứu trên toàn bộ hệ gen (GWAS), nghiên cứu nhân rộng và phân tích trên số mẫu lớn đã tìm ra nhiều gen mới liên

quan đến việc tăng lượng acid uric trong máu và bệnh gút. Năm 2015, nghiên cứu GWAS trên 140000 người Châu Âu đã xác định được đa hình trên 28 gen có liên quan đến hàm lượng acid uric trong máu và bệnh gút. Trong đó, đa hình trên các gen như *ABCG2* và *SLC22A12* được chứng minh là có mối liên quan lớn nhất tới hàm lượng acid uric [64].



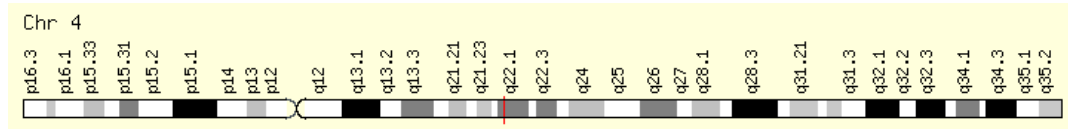
Hình 1.10. Biểu đồ Manhattan của nghiên cứu tương quan trên toàn bộ hệ gen [65]

Trục hoành hiển thị vị trí trên nhiễm sắc thể và trục tung hiển thị giá trị $-\log_{10}(p)$. Đường ngang màu tím phía trên đại diện cho ngưỡng ý nghĩa trên toàn bộ hệ gen ($p=5 \times 10^{-8}$). Đường màu xanh lam phía dưới cho biết mức giới hạn để chọn SNP sơ bộ ($p=5 \times 10^{-3}$). Tên của các gen đã được tìm thấy có liên quan với bệnh gút cũng được thể hiện trong hình.

Năm 2018, các nghiên cứu về đa hình trên các gen như *TNF α* và *TLR4* cũng được chứng minh là có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh gút [41]. Một số các nghiên cứu GWAS ở các nhóm cộng đồng khác nhau cũng nhấn mạnh tầm quan trọng tương đối của *SLC2A9* trong việc kiểm soát nồng độ urat huyết thanh và nguy cơ mắc bệnh gút ở các nhóm dân tộc [66].

1.3.3. Vai trò của gen *ABCG2* đối với bệnh gút

Gen *ABCG2* nằm trên nhiễm sắc thể số 4 (4q22) có kích thước khoảng 66 kb và gồm 16 exon. Gen này mã hóa cho protein *ABCG2* gồm 655 amino acid thuộc họ các protein vận chuyển. *ABCG2* có vùng cho ATP bám vào và sử dụng năng lượng từ sự thủy phân ATP để thực hiện quá trình vận chuyển các chất qua màng tế bào [67].



Hình 1.11. Vị trí vùng gen *ABCG2* trên nhiễm sắc thể số 4 [68]

Đường màu đỏ trong hình thể hiện vị trí của vùng gen *ABCG2* trên nhiễm sắc thể

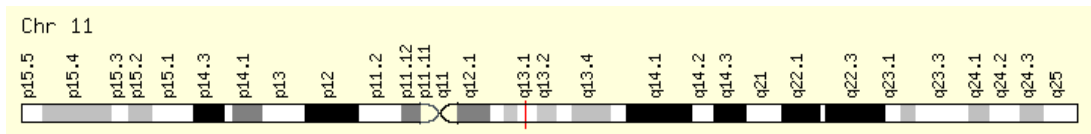
Hiện nay, đã có hơn 80 đa hình đơn nucleotide khác nhau trên *ABCG2* được phát hiện [69]. Đa hình rs2231142 trên *ABCG2* là đa hình có ảnh hưởng mạnh nhất, làm suy giảm khả năng bài tiết acid uric đến 50% [70]. Năm 2009, Matsuo và cộng sự đã tiến hành đánh giá chức năng của *ABCG2* dưới tác động của 2 đa hình rs2231142 (p.Q141K) và rs72552713 (p.Q126X) [71]. Kết quả cho thấy sự có mặt của các đa hình này làm giảm bài tiết acid uric ở ruột và làm tăng nồng độ acid uric trong nước tiểu [72].

Nghiên cứu đa hình trên gen *ABCG2* còn được thực hiện rộng rãi ở bệnh nhân gút trên một số quần thể khác. Nghiên cứu đa hình trên gen này ở người da trắng và da đen cho thấy, đa hình rs2231142 (Q141K) có mối liên quan mạnh nhất với nguy cơ mắc bệnh gút [64]. Trong một nghiên cứu khác về đa hình này ở người Nhật Bản, kết quả cho thấy đa hình rs2231142 cũng liên quan đến việc tăng hàm lượng acid uric trong máu [73]. Bên cạnh Q141K, một đa hình gây mất chức năng khác là rs72552713 (Q126X) cũng đã được chứng minh làm tăng nguy cơ mắc bệnh gút trong các nghiên cứu trên 1 quần thể người Hán tại Trung Quốc và 3 quần thể người Nhật Bản khác nhau. Ngoài ra, một nghiên cứu khác của Zhang và các cộng sự trên 1061 nam giới người Hán và Tibetan ở Trung Quốc đã xác định SNP rs12505410 có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh gút [69].

Không chỉ riêng đối với đa hình rs2231142, các đa hình khác cũng đang được nghiên cứu và có nhiều chứng minh cho việc liên quan đến sự gia tăng nồng độ acid uric hoặc nguy cơ của bệnh gút. Một nghiên cứu ở quần thể người Nhật Bản, các cá thể mang allele A của rs72552713 có nguy cơ mắc bệnh gút cao hơn 4,25 lần so với các cá thể mang allele G [74, 75]. Ở các nghiên cứu khác thì đa hình khác trên *ABCG2* như rs12505410 cũng được xác định có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh gút [66]. Tuy nhiên ở các nghiên cứu của các nước châu Á, các kết quả mâu thuẫn đã được quan sát trong một nghiên cứu về rs3114020, trong đó allele rủi ro được xác định là allele G ở nam giới Nhật Bản nhưng là allele A ở người Hán Trung Quốc [74].

1.3.4. Mối tương quan của gen *SLC22A12* và bệnh gút

Gen *SLC22A12* nằm trên nhiễm sắc thể số 11 (11q13) có kích thước khoảng 13 kb và gồm 10 exon. Gen này mã hóa cho protein URAT1, là kênh vận chuyển nằm trên bề mặt tế bào của ống lượn gần ở thận. Protein gồm 555 amino acid tham gia vào sự trao đổi giữa urat và anion, giúp điều hòa lượng urat trong máu.



Hình 1.12. Vị trí vùng gen *SLC22A12* trên nhiễm sắc thể số 11 [68]

Đường màu đỏ trong thể hiện vị trí của vùng gen *SLC22A12* trên nhiễm sắc thể

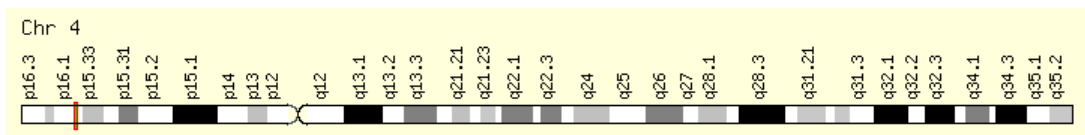
Đột biến mất chức năng của gen *SLC22A12* đã được tìm thấy ở những bệnh nhân có tiền sử gia đình với hàm lượng acid uric trong máu thấp. Nhiều nghiên cứu cho thấy mối liên quan giữa đột biến hoặc đa hình trên gen *SLC22A12* với hàm lượng acid uric trong máu và bệnh gút [76]. Các đột biến ảnh hưởng đến chức năng trong *SLC22A12* sẽ dẫn đến tình trạng rối loạn nồng độ acid uric máu. Một hội chứng gây ra do mất chức năng của *URAT1*, rối loạn nồng độ acid uric thận nguyên phát loại I, cũng đã được mô tả trong các quần thể khác nhau [77].

Sự tác động của các đa hình *SLC22A12* đến acid uric có thể khác nhau, và các ảnh hưởng lên triệu chứng lâm sàng có thể khác nhau dựa trên nguồn gốc các dân tộc. Một nghiên cứu trên quần thể người Hán chỉ ra 2 đa hình -103A/G ở intron

8 và T1309C rs7932775 trên *SLC22A12* có liên quan chặt chẽ tới tình trạng tăng acid uric [78]. Đa hình rs7932775 cũng được chứng minh có liên quan đến tình trạng tăng acid uric ở người Czech và 1 quần thể người Hán khác [79]. Ngoài ra, một đa hình khác trên *SLC22A12* là rs11231825 được xác định làm tăng nguy cơ mắc bệnh gút nói chung và dạng gút underexcretors (do suy giảm bài tiết) nói riêng ở người Czech, SNP này không liên quan đến dạng gút [80]. Trong các đột biến đó, đột biến C426T có liên quan mạnh nhất tới bệnh. Trong một nghiên cứu khác trên 326 nam giới người Nhật Bản đã phát hiện đa hình rs893006 có liên quan tới nồng độ acid uric. Đa hình trên gen *SLC22A12* cũng liên quan đến bệnh gút ở người Mexico và các nước châu Á khác [78]. Nghiên cứu khác trên quần thể người Đức chỉ ra cả 3 đa hình -788T>A trên vùng promoter, C258T trên exon 1 và C426T trên exon 2 đều có liên quan đến việc giảm lượng acid uric. Khi chứng minh chức năng của đa hình rs12800450 với tần số allele trong quần thể là 1%, kết quả chỉ ra chức năng vận chuyển urat của protein có mang đa hình rs12800450 bị giảm so với protein không mang rs12800450, do đó đa hình có thể đóng vai trò trong việc giảm hấp thụ urat [81].

1.3.5. Tầm quan trọng của gen *SLC2A9* và bệnh gút

Gen *SLC2A9* nằm trên nhiễm sắc thể số 4, dài khoảng 254 kb bao gồm 12 exon. Ban đầu *SLC2A9* được xác định là gen mã hóa kênh vận chuyển fructose, GLUT9. Tuy nhiên, các nghiên cứu sâu hơn cho thấy GLUT9 được mã hóa bởi hai RNA thay thế bao gồm GLUT9 ban đầu, hiện được gọi là GLUT9a và một biến thể cắt nối có đầu cuối NH₂ ngắn hơn gọi là GLUT9b [82].



Hình 1.13. Vị trí vùng gen *SLC2A9* trên nhiễm sắc thể số 4 [68]

Đường màu đỏ trong thể hiện vị trí của vùng gen *SLC2A9* trên nhiễm sắc thể

Trong nhiều nghiên cứu hiện này, tầm quan trọng của gen *SLC2A9* được biết đến trong việc kiểm soát nồng độ urat huyết thanh và nguy cơ mắc bệnh gút ở các nhóm dân tộc [80]. Kết quả nghiên cứu trên người Mỹ ở Pennsylvania cho thấy

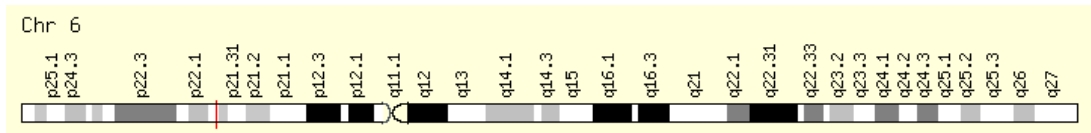
mỗi allele T của đa hình rs16890979 trên *SLC2A9* sẽ làm giảm 0,47 mg/dl nồng độ acid uric [83].

Trong năm 2008, nhóm nghiên cứu của tác giả Anita Brandstätter đã chứng minh sự xuất hiện của 4 đa hình SNP trên *SLC2A9* (rs6855911, rs7442295, rs6449213 và rs12510549) có tác dụng thúc đẩy khả năng vận chuyển urat của protein GLUT9, qua đó làm nồng độ acid uric trung bình giảm xuống từ 0,30 - 0,35 mg/dL [84]. Trong số chúng, chỉ có ảnh hưởng của rs12510549 tiếp tục được phân tích và đánh giá trong nhiều nghiên cứu tiếp theo. Cụ thể hơn, ở 2 nghiên cứu của các tác giả Brandstatter và Doring, sự xuất hiện của mỗi một allele hiếm C (minor allele) của rs12510549 được xác định sẽ làm nồng độ acid uric giảm xuống khoảng 0,229 - 0,428 mg/dL ở nam giới và 0,352 - 0,416 mg/dL ở nữ giới [84, 85]. Ngoài ra, trong nghiên cứu mới nhất năm 2017 của tác giả Lee trên 1472 bệnh nhân gút và 3269 người khỏe mạnh da trắng và gốc Á cũng đã xác định được đa hình rs12510549 có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh gút [86]. Các kết quả tương tự cũng đã được quan sát thấy trong nghiên cứu của Stark trên 2 nhóm quần thể người Ý và Tây Âu [87].

Trong số các đa hình của gen *SLC2A9*, ngoài đa hình *SLC2A9* rs12510549 đã được chứng minh làm giảm nguy cơ mắc bệnh gút ở người da trắng và châu Á [88], thì đa hình rs16890979 cũng có mối liên quan đến bệnh gút [89]. Bên cạnh đó, sự xuất hiện của các đa hình khác như rs6449213, rs7442295, rs13124007 và rs6850166 cũng có khả năng làm tăng nguy cơ mắc bệnh gút ở người Croatia và người Trung Quốc [90]. Sự ảnh hưởng của các đa hình trên *SLC2A9* đến nồng độ urat huyết thanh có thể được giải thích thông qua việc biểu hiện đồng phân protein khác nhau của *SLC2A9*. Theo đó, các biến thể di truyền là nguyên nhân gây tăng urat sẽ liên quan đến việc tăng biểu hiện đồng phân *SLC2A9*-S, bị mất 28 axid amin ở đầu N so với dạng bình thường *SLC2A9*-L [85, 90]. Đồng phân này được biểu thị ở phía đỉnh lượn gợn, nơi nó có thể làm tăng tái hấp thu acid uric được tiết ra, trong khi *SLC2A9*-L được biểu thị ở màng đáy bên, nơi nó là con đường tái hấp thu chính của acid uric vào máu [91].

1.3.6. Mối tương quan của gen *TNFA* và bệnh gút

Gen *TNFA* nằm trên nhiễm sắc thể số 6 (6p21), dài khoảng 3 kb và bao gồm 4 exon. Gen này mã hoá cho protein có kích thước 233 amino acid với khối lượng phân tử khoảng 26 kDa, vai trò chính của protein này hiện tại còn chưa rõ ràng, nhưng trong một số tài liệu được mô tả là có liên quan đến việc huỷ tế bào ung thư [92]. Kết quả nghiên cứu đa hình trên gen *TNFA* là rất đa dạng [93].



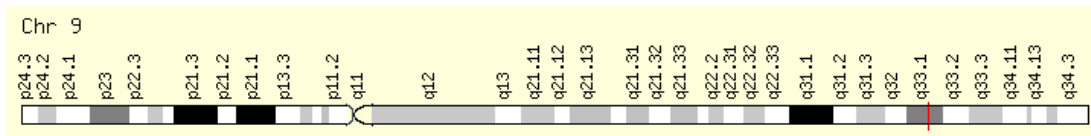
Hình 1.14. Vị trí vùng gen *TNFA* trên nhiễm sắc thể số 6 [68]

Đường màu đỏ trong thể hiện vị trí của vùng gen *TNFA* trên nhiễm sắc thể

Nghiên cứu được tiến hành trên 106 người Đài Loan đã cho thấy, đa hình -863C/A có mối liên quan với nguy cơ mắc bệnh gút trong khi đa hình rs1800629 không có mối liên quan với bệnh [94]. Bên cạnh đó, trong một nghiên cứu khác tổng hợp số liệu đa hình rs1800629 từ 14 nghiên cứu khác nhau trên 10 quần thể người Châu Âu, 3 quần thể Châu Mỹ Latin và 1 quần thể người Châu Á cho thấy rs1800629 có liên quan tới nguy cơ mắc bệnh gút ở người Mỹ Latin nhưng không có ảnh hưởng tới nguy cơ mắc bệnh ở người Châu Âu [95].

1.3.7. Sự liên quan của gen *TLR4* và bệnh gút

Gen *TLR4* nằm trên nhiễm sắc thể số 9 (9q33) có kích thước khoảng 14 kb và gồm 3 exon. Gen này mã hóa cho thụ thể xuyên màng *TLR4* gồm 839 amino acid đóng vai trò quan trọng trong hệ miễn dịch lúc cơ thể bị viêm nhiễm [96].



Hình 1.15. Vị trí vùng gen *TLR4* trên nhiễm sắc thể số 9 [68]

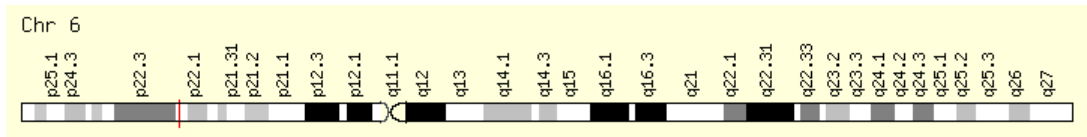
Đường màu đỏ trong thể hiện vị trí của vùng gen *TLR4* trên nhiễm sắc thể

Ngoài việc tham gia nhận biết lipopolysaccharide, protein tổng hợp từ gen *TLR4* còn tương tác với các phối tử trong cơ thể bao gồm cả tinh thể muối urat và các protein sốc nhiệt. Một số nghiên cứu về đa hình rs2149356 trên gen này đã được chứng minh có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh và có thể tham gia vào điều

hòa miễn dịch, quá trình như viêm nhiễm và trao đổi lipid [97]. Ngoài ra, mối liên quan giữa đa hình rs2149356 với hàm lượng acid uric trong máu và nguy cơ mắc bệnh cũng đã được quan sát thấy ở người Tây Ban Nha [98].

1.3.8. Gen *SLC17A1* và bệnh gút

Gen *SLC17A1* nằm trên nhiễm sắc thể số 6 (6p22.2) có kích thước vào khoảng 50 kb và bao gồm 16 exon. Gen này mã hóa cho kênh protein NPT1, tham gia vận chuyển acid uric ở tế bào gan và tế bào ống lượn gần ở thận [99].



Hình 1.16. Vị trí vùng gen *SLC17A1* trên nhiễm sắc thể số 6 [68]

Đường màu đỏ trong thể hiện vị trí của vùng gen *SLC17A1* trên nhiễm sắc thể

Nhiều nghiên cứu đã chứng minh mối liên quan giữa đột biến/đa hình trên *SLC17A1* với nguy cơ mắc bệnh gút [100]. Trong nghiên cứu của Chiba và Sakiyama, đa hình rs1165196 đã được xác định làm tăng khả năng vận chuyển urat của NPT1 [99]. Đa hình này cũng được chứng minh có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh gút ở nhiều quần thể như Nhật Bản, New Zealand và Tây Ban Nha. Ngoài ra, các đa hình *SLC17A1* rs1183201, rs3799352 cũng có liên quan đến tình trạng tăng acid uric và bệnh gút [101].

1.3.9. Các nghiên cứu về gút trong nước

Cho đến hiện nay, tại Việt Nam cũng đã có nhiều nghiên cứu về bệnh gút, tuy nhiên các nghiên cứu về căn bệnh này chủ yếu là khảo sát các vấn đề liên quan đến các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng và phương hướng chẩn đoán, điều trị cho bệnh nhân [102]. Đến gần đây, các nghiên cứu về ảnh hưởng của các yếu tố di truyền như SNPs hoặc đột biến gen đối với bệnh gút mới bắt đầu được quan tâm và dần có nhiều nghiên cứu xuất hiện liên quan đến các vấn đề này.

Cụ thể, trong nghiên cứu các đặc điểm dịch tễ học, lâm sàng và cận lâm sàng bệnh gút tại ba bệnh viện chính ở Thành phố Huế, nhóm tác giả Nguyễn Thị Ái Thủy và cộng sự [103] đã xác định được bệnh nhân gút có tuổi trung bình vào khoảng $50,59 \pm 12,7$ tuổi, bệnh xảy ra đa phần ở nam giới (95%), trong đó tiền sử gia đình có người mắc gút chiếm hơn 22%. Bệnh gút thường có các bệnh lý đi kèm

như tăng huyết áp (27,8%), đái tháo đường (15,6%) và thừa cân béo phì (hơn 68%). Con gút thường xuất hiện điển hình sau bữa ăn có nhiều rượu thịt (hơn 87%) và khởi phát bệnh đột ngột (75,6%), gây ra cơn đau và viêm khớp bàn ngón chân cái (73,7%), khớp cổ chân (47,8%) và khớp bàn chân (38%) và chỉ 13,2% bệnh nhân có nốt tophi. Theo nhóm nghiên cứu này, khi khảo sát các yếu tố liên quan đến bệnh gút, các nhà nghiên cứu đã tìm được mối liên quan có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa bệnh gút và tuổi (> 40 tuổi), giới nam, tình trạng uống rượu bia, và tình trạng thừa cân béo phì ($p < 0,01$) [104].

Một khảo sát bệnh gút ở Bệnh viện Quân đội 19.8 của tác giả Phạm Quang Cử cũng cho thấy các đặc điểm dịch tễ tương tự của bệnh gút, cụ thể bệnh tập trung ở nhóm bệnh nhân trên 50 tuổi (68,8%), nam giới chiếm 92,2% và các yếu tố nguy cơ như uống rượu chiếm 38,7% và béo phì là 31,8% và có đến 30% bệnh nhân có kèm sỏi thận [105]. Cũng ở Bệnh viện 19.8, một số các tác giả đã tiến hành một nghiên cứu và kết quả cho thấy đa phần các trị số acid uric trong máu bệnh nhân bị gút đều dao động ở mức cao đến rất cao từ 500 ± 100 (mg/dL) [106, 107].

Các đặc điểm bệnh nhân gút tương tự cũng được tìm thấy trong một nghiên cứu tương tự thực hiện tại khoa nội cơ xương khớp của Bệnh viện Thống Nhất tại Thành phố Hồ Chí Minh của nhóm tác giả Hồ Thị Thanh Tâm và cộng sự [106, 108]. Về mặt cận lâm sàng, hiện đã có các nghiên cứu về các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng acid uric và nước tiểu ở người bình thường và ở bệnh nhân gút [109].

Vào năm 2016, Bệnh viện Bạch Mai cũng đã bước đầu khảo sát tần số allele HLA-B*5801 trên bệnh nhân gút dị ứng nặng do với allopurinol và mối liên quan giữa allele HLA-B*5801 với nguy cơ dị ứng allopurinol [110]. Sự thiếu hụt những đánh giá về ảnh hưởng của các yếu tố di truyền tới bệnh gút cùng với thực trạng tăng lên đáng báo động của các ca gút mới đã đặt ra vấn đề cấp thiết về việc tiến hành một nghiên cứu có quy mô lớn nhằm đánh giá sự ảnh hưởng của một số gen quan trọng tới bệnh gút ở người Việt Nam.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm thu mẫu và thời gian nghiên cứu

2.1.1. Địa điểm thu mẫu nghiên cứu

Mẫu bệnh và đối chứng sử dụng cho nghiên cứu sẽ được thu thập tại hai cơ sở khám chữa bệnh:

- Bệnh viện Nguyễn Trãi: 314 đường Nguyễn Trãi, Phường 8, Quận 5, Thành phố Hồ Chí Minh.

- Phòng khám Đa khoa Đại Phước: 831 đường 3/2, Phường 7, Quận 11, Thành phố Hồ Chí Minh.

2.1.2. Thời gian nghiên cứu

Thời gian thực hiện đề tài: từ 01/01/2016 – 31/12/2018.

2.2. Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu bệnh - chứng mô tả được thực hiện trên người bệnh gút và nhóm chứng lấy từ Bệnh viện Nguyễn Trãi và Phòng khám Đa khoa Đại Phước. Tất cả các thí nghiệm trên mẫu nghiên cứu được thực hiện tại Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Đối tượng và cỡ mẫu nghiên cứu

2.3.1. Đối tượng nghiên cứu

- Nhóm bệnh bao gồm các người mắc bệnh gút cấp hoặc gút mạn tính đang điều trị tại Bệnh viện Nguyễn Trãi và Phòng khám Đa khoa Đại Phước thỏa mãn các tiêu chuẩn lựa chọn - loại trừ như sau:

Tiêu chuẩn lựa chọn:

+ Bệnh nhân có độ tuổi từ 18 tuổi trở lên;

+ Bệnh nhân được chẩn đoán bệnh gút với mã phân loại bệnh tật quốc tế ICD-10 là M10, có kết quả đánh giá dựa trên tiêu chuẩn ACER/EULAR năm 2015 (đã được trình bày chi tiết trong bảng 1.1), đang khám bệnh tại Bệnh viện Nguyễn Trãi và Phòng khám Đa khoa Đại Phước trong giai đoạn 2016 – 2017.

+ Hồ sơ bệnh án đầy đủ các thông tin lâm sàng và cận lâm sàng.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- + Bệnh nhân có các bệnh lý ác tính;
- + Bệnh nhân đang mắc các bệnh kèm như viêm khớp do lắng đọng các tinh thể khác như calci, viêm khớp nhiễm khuẩn, viêm khớp phản ứng, viêm khớp dạng thấp, viêm mô tế bào;
- + Bệnh nhân hoặc thân nhân (khi người bệnh không có khả năng tự quyết định việc tham gia nghiên cứu) từ chối tham gia nghiên cứu.
- Nhóm chứng bao gồm các cá nhân khoẻ mạnh đi kiểm tra sức khoẻ định kỳ tại Bệnh viện Nguyễn Trãi và Phòng khám Đa khoa Đại Phước được lựa chọn đáp ứng với tiêu chuẩn lựa chọn - loại trừ như sau:

Tiêu chuẩn lựa chọn:

- + Người khỏe mạnh độ tuổi trên 18 tuổi;
- + Đồng ý tham gia nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- + Người đồng ý tham gia nghiên cứu có biểu hiện lâm sàng và cận lâm sàng cho thấy mắc gút hoặc các bệnh khác.

2.3.2. Cỡ mẫu

Cỡ mẫu cho nghiên cứu bệnh - chứng được tính theo công thức:

$$n_{\text{chứng}} = n_{\text{bệnh}} \times r$$

$$p_2 = \frac{p_1 OR}{1 + p_1 (OR - 1)}$$

Trong đó:

- p_1 và p_2 : tỉ lệ lưu hành của gen *ABCG2* trong nhóm chứng và nhóm bệnh
- p : tỉ lệ lưu hành của gen *ABCG2* trong dân số chung
- *OR*: Tỉ số nguy cơ, $OR = p_1 / (1 - p_1) / (p_2 / (1 - p_2))$
- α : sai lầm loại I tra bảng phân phối chuẩn đặt ở mức 0,05 và $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$
- β : sai lầm loại II, đặt ở mức 0,20

- r : tỉ lệ chứng/bệnh đặt ở mức 0,5

Chọn:

- $Z_{1-\alpha/2} = 1,96$
- $Z_{1-\beta} = 0,842$
- $OR = 2,20$ là tỉ số nguy cơ của p.Q141K trích xuất từ nghiên cứu của Danqiu Zhou và cộng sự [111]

- $p_1 = 0,784$ là tỉ lệ rối loạn của gen *ABCG2* trích xuất từ nghiên cứu của Danqiu Zhou và cộng sự [111]

à Do đó cỡ mẫu tính được lần lượt là

$$p_2 = \frac{0.784 \times 2.2}{1 + 0.784(2.2 - 1)} = 0.89$$

$n_{bệnh}$

$$= \frac{(1,96\sqrt{2 \cdot 0,89 \cdot (1 - 0,89)} + 0,84\sqrt{0,784 \cdot (1 - 0,784) + 0,89(1 - 0,89)})^2}{(0,784 - 0,89)^2}$$

$$= 151$$

$$N_{Chứng} = N_{bệnh} \times r = 151 \times 2 = 302 \text{ (người)}$$

Ngoài ra, để tránh sai số trong quá trình thu thập mẫu, nghiên cứu sẽ tiến hành lấy nhiều hơn 20% cỡ mẫu tối thiểu. Như vậy cỡ mẫu dự kiến lấy ở nhóm bệnh là 181 người và nhóm chứng tối thiểu 362 người.

2.4. Quy trình chọn mẫu và nghiên cứu

2.4.1. Nhóm bệnh

Tại bệnh viện Nguyễn Trãi và Phòng khám Đa khoa Đại Phước, dựa vào các hồ sơ bệnh án người bệnh (Mã ICD10 - M10), nghiên cứu tiến hành thu thập dữ liệu những người bệnh đồng ý tham gia nghiên cứu cho đến khi đạt được cỡ mẫu tối thiểu.

Nghiên cứu đã thu thập dữ liệu, sau khi xem xét tiêu chí loại trừ, nghiên cứu thu được 170 mẫu mắc bệnh phù hợp với nghiên cứu.

2.4.2. Nhóm chứng

Dựa theo cỡ mẫu tối thiểu đã ước tính, nghiên cứu đã tiến hành thu thập số liệu từ những người khỏe mạnh khám sức khỏe đồng ý tham gia và lấy mẫu

thực hiện nghiên cứu. Sau khi khám sàng lọc và tiến hành lấy mẫu, nghiên cứu đã thu được 351 mẫu phù hợp với tiêu chí đề ra.

2.5. Dụng cụ, trang thiết bị và hoá chất nghiên cứu

- Dụng cụ và trang thiết bị

+ Ống chứa máu EDTA (Việt Nam); pipetman các loại (eppendorf); ống đựng mẫu thể tích (eppendorf);

+ Tủ lạnh sâu -20°C, -84°C (Sanyo); cân phân tích (Mettler Toledo); máy đo pH (Mettler); máy ly tâm (eppendorf); máy điện di PowerPac 300 (Bio-Rad); máy chụp ảnh GelDoc (BioSciences); máy GeneAmp[®] PCR System 9700 (ABI); máy xác định trình tự nucleotide tự động ABI 3500 Genetic Analyzer (ABI).

- Hóa chất sử dụng:

+ Hóa chất sử dụng để tách DNA tổng số, tinh sạch sản phẩm PCR của hãng Qiagen;

+ Hóa chất dùng cho phản ứng PCR: đệm, MgCl₂, dNTPs, Taq DNA polymerase của hãng Fermentas;

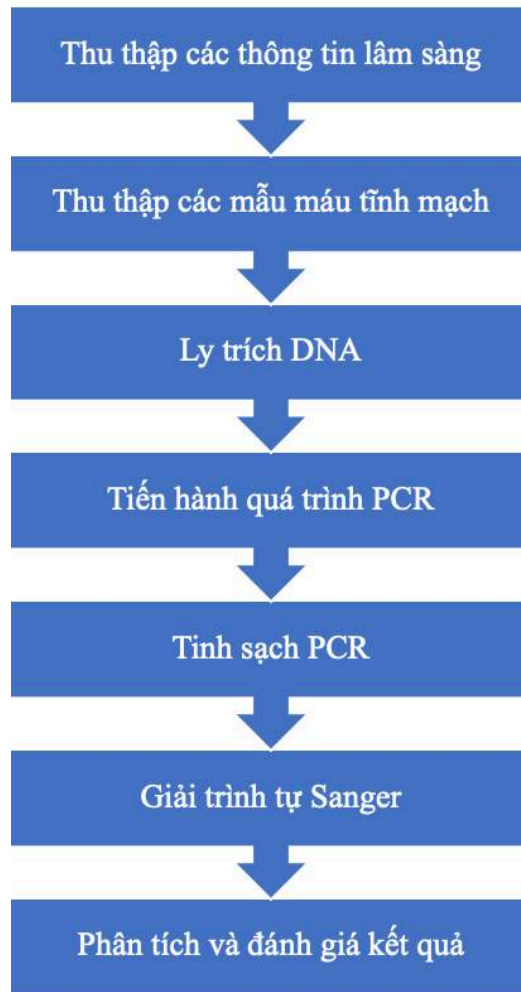
+ Bộ hóa chất sinh chuẩn BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing của hãng ABI;

+ Các hóa chất khác như nước khử ion, agarose, ethanol, acetic acid, EDTA, Tris HCl,... của các hãng Thermo, Merck, Sigma.

2.6. Phương pháp nghiên cứu

2.6.1. Quy trình thực hiện nghiên cứu

Nghiên cứu được tiến hành theo các bước theo sơ đồ hình 2.1.



Hình 2.1. Quy trình thực hiện nghiên cứu

2.6.2. Phương pháp thu thập số liệu

Thông tin của bệnh nhân và nhóm đối chứng trong nghiên cứu này được thu thập thông qua phiếu điều tra, bao gồm các thông tin cụ thể như sau:

- Các chỉ số nhân trắc như tuổi, giới tính, chiều cao, cân nặng, chỉ số khối (BMI);
- Các chỉ số lâm sàng như huyết áp (tâm thu và tâm trương);
- Các kết quả xét nghiệm sinh hóa, huyết học như nồng độ glucose, cholesterol toàn phần, triglycerid, LDL-c, HDL-c, CRP, acid uric, BUN, creatinine, AST, ALT, Tổng phân tích tế bào máu (WBC, RBC, PLT, NEU, HGB ...).

2.7. Phương pháp và kỹ thuật sử dụng

2.7.1. Phương pháp sinh hoá và huyết học

Các xét nghiệm định lượng trong sinh hóa như đo nồng độ AST, ALT, BUN, CRP, acid uric, creatinin, glucose, cholesterol, triglycerid, LDL, HDL được thực hiện bằng phương pháp đo quang điểm cuối và động học trên hệ thống máy Beckman Coulter AU640. Thể tích mẫu sử dụng khoảng 200 µl huyết tương, chất chống đông được dùng là Heparin.

Riêng xét nghiệm huyết học xác định số lượng WBC, HGB, RBC thực hiện bằng phương pháp đếm tế bào laser trên hệ thống máy Abbott Cell Dyn 3700. Thể tích mẫu sử dụng khoảng 200 µl huyết tương, chất chống đông được dùng là EDTA.

2.7.2. Phương pháp thiết kế môi cho PCR

Môi đặc hiệu nhân đoạn gen có chứa các SNPs sẽ được thiết kế dựa trên vị trí của từng SNP. Đối với các SNP có vị trí nhận biết enzyme cắt tự nhiên, trình tự môi được thiết kế sử dụng phần mềm NCBI Primer BLAST với các tham số mặc định.

Đối với các SNP không có vị trí cắt enzyme tự nhiên, năm nucleotide gần cuối đầu 3' của môi ngay trước vị trí SNP sẽ được biến đổi để tạo ra vị trí nhận biết enzyme cắt giới hạn theo tiêu chí như sau, nucleotide cải biến không trùng vào vị trí nucleotide cuối cùng của môi, số lượng nucleotide cải biến không vượt quá ba nucleotide (Phụ lục II, Bảng 2A).

Bảng 2.1. Trình tự các cặp môi sử dụng cho phản ứng PCR

Gen	SNP	Trình tự	Kích thước
<i>ABCG2</i> (NC_000004.12)	rs72552713	5'-TGGATTCAAAGTAGCCATGAGA-3'	~300
		5'-ATCAGCCAAAGCACTTACCC-3'	
	rs12505410	5'-CCCTTGGCACCTTAAATGAA-3'	~300
		5'-ATAGGTGGCTGGCCCTATTT-3'	
<i>SLC22A1</i> 2 (NC_000011.10)	rs11231825	5'-CCCTAGAGGTCACCAGACCA-3'	~170
		5'-ACTGGGCCATGGGCTTCTGATC-3'	
	rs7932775	5'-GCCTGAAAGTCAGGGACAAG-3'	~300
		5'-ACCACACAAGAGGGAGATGC-3'	
<i>SLC2A9</i> (NC_000004.12)	rs12510549	5'-ACTCGCAAGGCTGAAACAGTCA-3'	~350
		5'-CAGCAGTAGCACAGTCCATA-3'	
	rs16890979	5'-TGAGCAAATCATGGCATCTC-3'	~250
		5'-ACCTCCTCTACCTCTTGGTTAA-3'	
<i>TNFA</i> (NC_000006.12)	rs1800629	5'-AGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'	~150
		5'-GGGACACACAAGCATCAAG-3'	
<i>TLR4</i> (NC_000009.12)	rs2149356	5'-ATCTGTGACACTTATGTGTAATTAT-3'	~150
		5'-CCTTGGATCAAGTTTAGCCATT-3'	
<i>SLC17A1</i> (NC_000006.12)	rs1165196	5'-CCATATTGGCATCTCCCAGA-3'	~500
		5'-ATGTGTGCTGTTGCTGGAGT-3'	

2.7.3. Tách chiết DNA tổng số

Mẫu máu của đối tượng nghiên cứu sau khi thu thập sẽ được bảo quản ở -20°C. Quy trình tách chiết DNA tổng số tuân theo các bước sau:

- ❖ Mẫu máu lưu trữ ở -20°C sẽ được lấy ra và được ủ ở nhiệt độ 37°C trong tủ ấm từ 30 đến 60 phút;
- ❖ 300 µl máu sẽ được chuyển vào ống eppendorf. Sau đó, 400µl dung dịch AL và 20µl proteinase K sẽ được bổ sung vào và trộn đều bằng vortex hoặc pipet;
- ❖ Mẫu được ủ ở 56°C trong 30 phút, sau đó dùng tay lắc nhẹ, mỗi lần lắc cách nhau 10 phút;
- ❖ Thêm vào 300 µl ethanol (96-100%) và trộn đều bằng pipet hoặc vortex;
- ❖ Tất cả mẫu trong ống eppendorf được chuyển lên cột. Ly tâm trong 1 phút với tốc độ quay 10.000 vòng/phút;
- ❖ Thêm vào 500 µl Buffer AW1 (đã có sẵn ethanol). Ly tâm trong 2 phút với tốc độ quay 10.000 vòng/phút;
- ❖ Thêm vào 500µl Buffer AW2 (đã có sẵn ethanol) lên cột. Ly tâm trong 2 phút với tốc độ quay 10.000 vòng/phút. Di chuyển cột qua ống eppendorf 1,5 ml mới;
- ❖ Thêm vào 200µl Elution Buffer lên cột. Ly tâm trong 1 phút với tốc độ quay 8.000 vòng/phút;
- ❖ 3µl thành phẩm DNA sau khi tách chiết được sử dụng để điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%, sau đó đem lưu giữ ở -20°C.

2.7.4. Phương pháp định lượng DNA bằng quang phổ kế

- ❖ Nguyên tắc:

Lượng DNA được xác định dựa trên giá trị mật độ quang ở bước sóng 260nm (OD_{260nm} - Optical Density_{260nm}) của các mẫu nghiên cứu theo công thức như sau:

$$C_{DNA}(\mu\text{g/ml}) = OD_{260\text{ nm}} \times 50 \times \text{độ pha loãng}$$

- ❖ Các bước tiến hành

- ❖ Lấy 3 µl dung môi (TE pH 8,0 hoặc nước khử ion vô trùng) để làm blank.
- ❖ Sử dụng 3 µl mỗi mẫu để xác định nồng độ DNA ở bước sóng 260nm và 280nm.

- ❖ Ghi lại kết quả nồng độ DNA cho mỗi mẫu nghiên cứu sau mỗi lần đo.

2.7.5. Nhân đoạn DNA bằng PCR

Một chu kỳ phản ứng PCR gồm 3 giai đoạn sau:

- ❖ Giai đoạn biến tính: DNA mạch kép ban đầu tách thành hai mạch đơn nhờ nhiệt độ cao (94-95°C) trong thời gian ngắn.
- ❖ Giai đoạn gắn mồi: Ở nhiệt độ thích hợp (khoảng 50-60°C), hai mồi là oligonucleotide có chiều dài từ 15-30 nucleotide bám vào hai đầu của đoạn DNA đích theo nguyên tắc bổ sung.
- ❖ Giai đoạn kéo dài chuỗi: Hỗn hợp phản ứng được tăng nhiệt độ lên khoảng 70-80°C là nhiệt độ thích hợp để Taq DNA polymerase kéo dài chuỗi, tránh “hiện tượng tiếp hợp không đặc hiệu”.

Thành phần của phản ứng:

Một mẫu phản ứng PCR tiến hành trong tổng thể tích 25µl gồm có thành phần như sau:

Bảng 2.2. Thành phần các chất trong một mẫu phản ứng PCR

Thành phần	Thể tích (µl)
H ₂ O	(15,8 – X)
dNTP (2,5 mM)	2,5
Dung dịch đệm (10x)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	2,0
Mồi ngược (10 pmol)	1,0
Mồi xuôi (10 pmol)	1,0
DNA khuôn	X (0,5 - 1)
Taq polymerase	0,2

Chu trình nhiệt tối ưu được sử dụng để khuếch đại đoạn DNA chứa từng điểm SNP quan tâm sử dụng cho PCR được mô tả chi tiết tại Phụ lục II, Bảng 2B.

Sản phẩm sau quá trình chạy PCR sẽ được đánh độ đặc hiệu và nồng độ nhờ điện di trên gel agarose 1%. Sản phẩm đạt chất lượng tiếp tục được xử lý bằng enzyme giới hạn và đánh giá kết quả bằng điện di trên gel agarose 3%.

a) Phương pháp RFLP

Sau khi tiến hành phản ứng PCR, sản phẩm sẽ được ủ với enzyme cắt tương ứng với từng SNP của từng gen. Thành phần của phản ứng cắt bao gồm: 3 μ l DNA, 0,1 μ l enzyme, 0,35 μ l buffer và 1,55 μ l H₂O, với thể tích tổng là 5 μ l. Các thành phần của phản ứng sau khi được trộn đều, sau đó được ủ tại nhiệt độ tối ưu của enzyme hoạt động.

Sản phẩm sau khi tiến hành ủ với enzyme cắt (*RasI*, *BclII*, *NsiI*, *Eco130I*, *HindIII*, *HpaI*, *NcoI*, *HinfI*) sẽ được điện di trên gel agarose 3%, có kèm marker 100bp. Kết thúc điện di sẽ tiến hành đọc kết quả dưới máy soi UV.

b) Phương pháp điện di DNA trên gel agarose

Sản phẩm DNA đã chạy PCR sẽ được phân tích định tính nhờ phương pháp điện di trên gel agarose. Agarose là một loại polyme tách từ rong biển, cấu tạo của chúng gồm 2 monome là D-galactose và 3,6-anhydro L-galactose.

❖ Các bước tiến hành

Chuẩn bị gel agarose 1% hoặc 3%: Cho 1g hoặc 3g agarose vào 100 ml đệm TAE 1X, đem đun trong lò vi sóng cho đến khi agarose tan hoàn toàn. Để nguội đến khoảng 40°C thì đổ dung dịch agarose vào khuôn điện di đã cài lược sẵn. Bề dày gel khoảng 50 mm là thích hợp. Sau 30 - 40 phút khi agarose đã được polymer hóa hoàn toàn là có thể điện di được.

Tra mẫu DNA vào giếng điện di: Trộn đều DNA với đệm tra mẫu, sau đó tra vào các giếng trên bản gel. Mẫu DNA được chạy điện di cùng với marker DNA để xác định kích thước phân tử của DNA.

Chạy điện di: Chạy điện di với chương trình: Hiệu điện thế (U: 50 - 100 V), cường độ dòng điện (I: 80 - 100 mA).

Nhuộm DNA: Sau khi kết thúc điện di, bản gel được lấy ra và nhuộm trong dung dịch EtBr nồng độ 0,5 μ g/ml khoảng 10 - 15 phút. Sau đó lấy bản gel ra và rửa bằng cách ngâm trong nước sạch 2 lần, mỗi lần 5 - 10 phút.

Quan sát và chụp ảnh: Bản gel được nhìn thông qua tia tử ngoại UV₂₅₄ nm và được chụp hình bằng hệ thống chụp hình gel tự động.

2.7.6. Tinh sạch sản phẩm PCR

Quá trình tinh sạch “sản phẩm PCR” được triển khai theo đúng hướng dẫn của hãng Qiagen:

- Xác định thể tích của “sản phẩm PCR cần tinh sạch”;
- Hút tất cả thể tích của “sản phẩm PCR cần tinh sạch” qua ống eppendorf 1,5ml;
- Thêm vào ống eppendorf 1,5 ml đã có “sản phẩm PCR cần tinh sạch” dung dịch CP với lượng gấp 5 lần so với thể tích của “sản phẩm PCR cần tinh sạch”. (100 μ l “sản phẩm PCR cần tinh sạch” tương ứng cần 500 μ l dung dịch CP);
- Vortex nhẹ nhàng trong 20 giây rồi spindown;
- Đặt lên ống eppendorf 2 ml cột HiBind[®] DNA;
- Chuyển tất cả dung dịch mẫu lên cột HiBind[®] DNA và ly tâm 12.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 2 phút ;
- Trích bỏ phần dịch sau ly tâm và đặt cột HiBind[®] DNA trở lại ống collection;
- Thêm vào 700 μ l dung dịch DNA Wash và ly tâm 12.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 2 phút;
- Trích bỏ phần dịch sau ly tâm và đặt cột HiBind[®] DNA trở lại ống collection;
- Thêm vào 700 μ l dung dịch DNA Wash và ly tâm 12.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 2 phút;
- Trích bỏ phần dịch sau ly tâm và đặt cột HiBind[®] DNA trở lại ống collection;
- Ly tâm 12.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong thời gian 2 phút;
- Thêm vào 30 - 50 μ l đệm nước hay TE nhằm ion, ở nhiệt độ phòng trong 5 phút. Ly tâm 12.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng trong 2 phút;
- Dùng 3 μ l để điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

2.7.7. Giải trình tự Sanger

Áp dụng nguyên tắc của phương pháp Sanger nhằm xác định trình tự nucleotide quan tâm: Các đoạn DNA một sợi kết thúc bằng các ddNTP được đánh dấu huỳnh quang có chiều dài hơn kém nhau một nucleotide sẽ được lập ra. Máy GenAmp[®] PCR System 9700 chạy phản ứng PCR có chu trình nhiệt như sau: 96°C trong 1 phút; sau đó đến (96°C trong 10 giây; 50°C trong 5 giây; 60°C trong 4 phút) x 25 chu kỳ. Cuối cùng sản phẩm được giữ ở 4°C.

❖ Tinh sạch sản phẩm PCR bằng phương pháp EtOH/EDTA

- Thêm vào sản phẩm PCR 60µl EtOH 100% và 5µl EDTA 125 mM. Hỗn hợp để ở nhiệt độ phòng trong 15 phút rồi ly tâm trong 15 phút với tốc độ quay 12.000 vòng/phút mục đích tủa DNA có trong đó;
- Trích bỏ EtOH, rửa tủa bằng 60µl EtOH 70%. Ly tâm 10.000 vòng/phút trong 10 phút;
- Làm khô tủa và thêm vào 10µl Hi-DiTM Formamide để biến tính ở 95°C trong 5 phút;
- Đưa nguyên liệu vào máy đọc trình tự tự động ABI PRISMTM 3500 Genetic Analyzer;
- Điện di trong ống vi mao quản 80cm x 50µl;
- Thu nhận và xử lý kết quả bằng phần mềm ABI;
- PRISMTM 3500 - Avant Data Collection v2.0 và DNA Sequencing Analysis 5.2.

2.7.8. Phân tích đa hình/đột biến gen

Trình tự nucleotide của các đoạn gen quan tâm thu được sau quá trình giải trình tự Sanger được sử dụng để đối chiếu với các trình tự tham chiếu được công bố trên GenBank. Kết quả so sánh trình tự nucleotide trên các gen được phân tích thông qua các phần mềm tin sinh học đáng tin cậy: Bioedit 7.0; Seqscape 2.6.

2.8. Các biến số trong nghiên cứu

Chúng tôi dùng các biến số với cách xác định và giá trị của từng biến số được nêu phía dưới.

2.8.1. Nhóm biến số đặc điểm chung của đối tượng nghiên cứu

+ Giới tính (định tính, nhị biến): xác định dựa vào giấy chứng minh/giấy tờ định danh.

+ Tuổi (định lượng, theo năm): được xác định dựa vào hồ sơ hoặc giấy tờ định danh cá nhân

+ Chiều cao (định lượng, theo centimét): được đo trực tiếp nếu bệnh nhân tự đứng được, sử dụng thước đo chiều cao đứng, có hiệu chỉnh mỗi ngày, độ chính xác 0,1cm. Trong trường hợp bệnh nhân không tự đứng được thì được tính dựa theo hồ sơ gần nhất, hoặc nếu không có hồ sơ thì theo lời khai của bệnh nhân/người nhà (độ chính xác 1 cm).

+ Cân nặng (định lượng, theo kilogram): được đo trực tiếp bằng cân điện tử hiệu Tanita độ chính xác 0,1kg. Khi cân bệnh nhân được yêu cầu chỉ mặc quần áo mỏng nhẹ và không mang giày dép. Trong trường hợp bệnh nhân không tự đứng được để cân thì cân nặng được tính dựa trên hồ sơ gần nhất hoặc nếu không có hồ sơ thì theo lời khai của bệnh nhân/người nhà (độ chính xác 1 kg).

+ Chỉ số khối cơ thể (BMI) (định lượng, đơn vị m/kg^2): được tính từ chiều cao/cân nặng².

+ Chỉ số huyết áp tâm thu (SBP) và huyết áp tâm trương (DBP): là 2 chỉ số sinh hiệu quan trọng được đo bởi điều dưỡng/nhà nghiên cứu ngay vào hôm khảo sát cận lâm sàng. Khi đo, đối tượng được nghỉ ngơi ít nhất 15 phút, và không sử dụng các thuốc, hay các chất kích thích/ức chế làm thay đổi chỉ số huyết áp trong 24h trước. Huyết áp được đo bằng huyết áp kế bắp tay điện tử hiệu Omron (độ chính xác 1mmHg), máy được hiệu chỉnh định kỳ theo tiêu chuẩn của nhà sản xuất. Khi đo bệnh nhân ở tư thế nằm/ngồi nhưng thoải mái nhất và bắp tay đo ở vị trí ngang vị trí của tim. Tiến hành đo ít nhất 2 lần, cách nhau 5 phút ở 2 tay và giá trị được thu thập là giá trị trung bình. Nếu có sự chênh lệch quá 10% trong 2 lần đo ở bất kỳ trị số huyết áp nào, thì tiến hành đo lại lần thứ 3 sau đó 10 phút ở cánh tay bên trái của đối tượng và lấy trị số huyết áp là trung bình của 3 lần đo. Nếu đối tượng chỉ có 1 chi trên (1 tay) thì chỉ đo 2 lần và sử dụng số trung bình.

2.8.2. Nhóm các biến số cận lâm sàng

Các biến số được thực hiện dựa trên xét nghiệm lấy máu chẩn đoán, là các biến số định lượng liên tục, các biến số cụ thể như sau:

+ Các biến số về chức năng gan: AST, ALT (đơn vị U/L), BUN (mg/dL);

+ Các biến số chức năng thận: BUN (mg/dL), Creatinin (mg/dL), nồng độ acid uric (mg/dL);

+ Các biến số về mỡ máu: HDL-c (mg/dL), LDL-c (mg/dL) và triglyceride (mg/dL);

+ Trị số đường huyết: GLU (mg/dL);

+ Số lượng bạch cầu: WBC (số lượng bạch cầu đếm được/ μ L máu).

2.8.3. Nhóm các biến số về gen

Bao gồm 9 đa hình ở các gen tương ứng, được quy định thông qua phương pháp RFLP:

+ Đa hình *ABCG2* rs72552713: biến định tính, 3 giá trị là GG/GA/AA;

+ Đa hình *ABCG2* rs12505410: biến định tính, 3 giá trị là GG/TG/TT;

+ Đa hình *SLC22A12* rs11231825: biến định tính, 3 giá trị là TT/TC/CC;

+ Đa hình *SLC22A12* rs7932775: biến định tính, 3 giá trị là TT/TC/CC;

+ Đa hình *SLC2A9* rs12510549: biến định tính, 3 giá trị là TT/TC/CC;

+ Đa hình *SLC2A9* rs16890979: biến định tính, 3 giá trị là TT/CT/CC;

+ Đa hình *TNFA* rs1800629: biến định tính, 3 giá trị là GG/AG/AA;

+ Đa hình *TLR4* rs2149356: biến định tính, 3 giá trị là GG/TG/TT;

+ Đa hình *SLC17A1* rs1165196: biến định tính, 3 giá trị là AA/AG/GG.

2.9. Phương pháp xử lý và phân tích số liệu

2.9.1. Xử lý số liệu thô

Quy trình chung được thực hiện như sau:

+ Các biến định lượng được kiểm tra dạng phân phối, các outliers và các số liệu khuyết (missings). Các biến định lượng được kiểm tra tần số và các giá trị bất thường. Tất cả các giá trị bất thường và số liệu khuyết sẽ được loại bỏ trong quá trình phân tích chung.

+ Các biến số định tính được kiểm tra ngẫu nhiên theo tỉ lệ 10% đối với ca bệnh gút và 5% đối với không mắc bệnh. Kiểm tra dựa vào đối chiếu hồ sơ gốc và/hoặc liên hệ trực tiếp để xác minh. Nếu dữ liệu có bất thường sẽ tiến hành điều chỉnh phù hợp và các ca có dữ liệu bất thường sẽ được điều tra lại toàn bộ các dữ liệu đã thu thập. Sẽ cân nhắc không phân tích các ca có dữ liệu bất thường.

2.9.2. Phân tích số liệu

Số liệu được phân tích bằng phần mềm thống kê SPSS phiên bản 26.0 (2019). Sự khác biệt có ý nghĩa khi giá trị $p \leq 0,05$.

Các biến định lượng sẽ được trình bày dưới dạng số trung bình kèm độ lệch chuẩn nếu phân phối chuẩn. Nếu phân phối không chuẩn sẽ được trình bày dưới dạng trung vị và khoảng 25% - 75%. Các biến định tính được trình bày dưới dạng các tỉ lệ.

Đối với các biến định lượng: Phép kiểm t (t-test) sẽ được áp dụng để khảo sát so sánh sự khác biệt về trung bình của các biến số định lượng có phân phối chuẩn giữa 2 nhóm tính chất. Nếu cần so sánh nhiều hơn 2 nhóm, nghiên cứu sử dụng phép kiểm ANOVA (one-way ANOVA).

Đối với các biến định lượng có phân phối không chuẩn, phép kiểm Man-Whitney được sử dụng để kiểm tra sự khác biệt về trung vị giữa 2 nhóm của biến và phép kiểm Kruskal-Wallis được sử dụng để kiểm tra sự khác biệt về trung vị giữa của từ 3 nhóm giá trị trở lên.

Đối với các biến định tính: Phép kiểm Chi bình phương (Chi-square test) được áp dụng để kiểm tra mối liên hệ về tỷ lệ giữa các biến định tính khi các tần số mong đợi lớn hơn 5. Nếu xuất hiện tần số mong đợi ≤ 5 , nghiên cứu sử dụng phép kiểm chính xác Fisher (Fisher exact test).

Để xác định mối liên quan giữa các biến lâm sàng, cận lâm sàng (chiều cao, cân nặng, BMI, có bệnh gút, các chỉ số BUN, Creatinine, ALT, AST, ...) và các kiểu hình gen, chúng tôi sẽ phân tích mối liên quan giữa từng kiểu hình với từng đặc điểm lâm sàng hay cận lâm sàng bằng các phép kiểm đã nêu ở trên. Nếu kết quả có $p > 0,05$ thì kiểu hình gen đó không liên quan với đặc điểm đang khảo sát. Nếu kết quả có $p \leq 0,05$ thì kiểu hình gen có thể có liên quan với

đặc điểm khảo sát. Với các biến có liên quan này chúng tôi sẽ phân tích hồi quy đơn và đa biến để xác định mối tương quan thực sự như thế nào.

Tất cả các đặc điểm lâm sàng, cận lâm sàng có liên quan đến bệnh gút đều được đưa vào phân tích hồi quy logistic đơn biến. Nếu kết quả có giá trị $p < 0,2$, sẽ được đưa vào phân tích hồi quy đa biến (mức 0,2 được chọn để tránh bỏ sót các biến số có thể có liên quan). Sau khi phân tích bằng hồi quy logistic đa biến, các đặc điểm nào có giá trị $p < 0,05$ sẽ được xem là có mối liên quan chắc chắn với tình trạng bệnh gút.

2.10. Vấn đề đạo đức trong nghiên cứu y sinh học

Nghiên cứu này đã được Hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học của Viện Nghiên cứu hệ gen thông qua theo quyết định số 01-2017/NCHG-HDDD của Viện Nghiên cứu hệ gen.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả

3.1.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở mẫu nghiên cứu

a) Các đặc điểm lâm sàng

Các đặc tính lâm sàng được khảo sát trên 521 người tham gia (170 ca bệnh gút và 351 ca chứng) được trình bày trong bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả đặc điểm lâm sàng ở hai nhóm bệnh và chứng

Đặc điểm	Tổng số (n=521)	Nhóm chứng (n=351)	Nhóm bệnh (n=170)	Giá trị p
Số nam giới	505	351	154	1,9x10⁻³³
Độ tuổi	52,82±11,33	53,40±10,03	51,62±13,58	0,0469
Chiều cao (cm)	164,99±5,76	165,06±5,52	164,84±6,24	0,697
Cân nặng (kg)	66,3±9,52	65,75±9,72	67,47±9,00	0,026
BMI (kg/m ²)	24,57±3,35	24,45±3,54	24,82±2,91	0,038
SBP (mmHg)	120,06±11,3	119,83±10,8	120,53±12,32	0,84
DBP (mmHg)	74,74 ±7,77	74,59 ±7,77	75,06 ±7,79	0,533

Giá trị của biến liên tục được thể hiện bằng

giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn;

n: Số lượng cá thể; Giá trị p được tính bằng kiểm định t-test

Trong nghiên cứu của chúng tôi, phần lớn các bệnh nhân được khảo sát là nam giới, chiếm gần 97% toàn bộ bệnh nhân, cụ thể ở nhóm bệnh gút có hơn 90% là nam giới và 100% là nam giới ở nhóm chứng (vốn có nguy cơ bệnh gút cao hơn nữ), $p < 0,001$.

Tuổi trung bình của nhóm đối tượng là 52,82±11,33 tuổi, trong đó nhóm bệnh là 51,62±13,58 tuổi, thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (tuổi trung bình 53,40±10,03 tuổi), $p = 0,0469$.

Ngoài ra, nhóm bệnh gút cũng có cân nặng và BMI trung bình lần lượt là **67,47±9,00 kg** và **24,82±2,91 kg/m²**. Các giá trị này đều cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng không mắc bệnh gút, với giá trị cân nặng và BMI trung bình lần lượt là **65,75±9,72 kg** ($p = 0,026$) và **24,45±3,54 kg/m²** ($p = 0,038$).

Kết quả phân tích không tìm thấy sự khác biệt về giá trị chiều cao cũng như chỉ số huyết áp tâm thu (SBP), tâm trương (DBP) giữa nhóm bệnh gút và nhóm chứng.

Có thể đưa ra được nhận định đây là những đặc điểm sơ khởi và phản ánh đặc tính nền ban đầu của nhóm chứng và nhóm bệnh, tuy có sự khác biệt nhưng không thực sự lớn. Do đó, các đặc điểm nền tảng này ít có thể tác động lên sự hình thành bệnh gút. Đồng thời cho thấy nhóm bệnh nhân gút cũng không quá khác biệt so với nhóm bình thường và ít có khả năng xảy ra việc mẫu bệnh quá nặng hay quá khác biệt so với dân số chung.

b) Cận lâm sàng

Những đặc điểm cận lâm sàng được ghi nhận trên tổng cộng 521 đối tượng (170 ca bệnh gút và 351 ca chứng) và được trình bày trong bảng 3.2.

Bảng 3.2. Kết quả phân tích đặc điểm cận lâm sàng liên quan ở nhóm bệnh và chứng

Đặc điểm	Tổng số (n=521)	Nhóm chứng (n=351)	Nhóm bệnh (n=170)	Giá trị p
ALT (U/L)	32,77±23,88	32,03±22,74	34,31±26,08	0,1563
AST (U/L)	28,21±21,70	27,82±22,46	28,99±20,07	0,2842
BUN (mg/dL)	25,87 ± 12,30	26,29±9,71	25,00±16,41	0,1342
CREA (mg/dL)	1,09±0,23	1,08±0,17	1,11±0,31	0,9537
Acid uric (mg/dL)	7,72±1,94	6,29±1,51	9,29±1,81	2,7x10⁻³⁶
CRP (mg/dL)	3,92±4,507	3,42±4,37	4,96±4,61	0,048
GLU (mg/dL)	103,61±15,45	102,27±10,33	105,37±21,81	0,145
HDL-C (mg/dL)	47,2 ± 20,72	47,9 ± 22,64	45,76 ± 16,03	0,204
LDL-C (mg/dL)	104,5 ± 27,8	102,76 ± 26,9	108,12 ± 29,4	0,04
TG (mg/dL)	171,1±60,01	165,9±58,8	184,2±61,24	0,001
WBC (trên μ L)	7681±2306	7655±2222	7735±2478	0,778

Giá trị của biến liên tục được thể hiện bằng

giá trị trung bình cộng \pm độ lệch chuẩn;

n: Số lượng cá thể; Giá trị p được tính bằng kiểm định t-test

Dựa trên kết quả được nêu ở trên, chúng ta thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai nhóm bệnh - chứng về một số tình trạng sau đây:

- ❖ Nồng độ **acid uric** máu ở nhóm bệnh gút lớn gấp rưỡi so với nhóm chứng, với $p < 0,0001$. Tất nhiên như một hệ quả, tỉ lệ **tình trạng tăng acid uric máu** trong nhóm bệnh gút cao gần gấp đôi nhóm chứng, và sự khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,0001$).
- ❖ Nồng độ **CRP** máu của nhóm bệnh gút (**$4,96 \pm 4,61$ mg/dL**) lớn hơn gấp rưỡi so với nhóm chứng (**$3,42 \pm 4,37$ mg/dL**), với $p < 0,05$.
- ❖ Nồng độ **LDL-c** và **triglyceride máu** nhóm bệnh gút lớn hơn có ý nghĩa so với nhóm chứng (giá trị p lần lượt là 0,04 và 0,001).

Phân tích mối tương quan của các đặc điểm lâm sàng giữa hai nhóm bệnh - chứng cho thấy sự khác biệt về nồng độ acid uric giữa hai nhóm nghiên cứu. Ở nhóm bệnh, nồng độ acid uric máu là **$9,29 \pm 1,81$ mg/dL**, cao gần gấp 1,5 lần so với nhóm chứng **$6,29 \pm 1,51$ mg/dL** ($p < 0,001$). Giá trị acid uric thông thường trong máu được giữ ổn định ở mức dưới 7 mg/dL đối với nam giới và duy trì dưới mức 6 mg/dL đối với nữ giới [112, 113]. Từ những nghiên cứu trước đây khẳng định có sự khác biệt của nồng độ acid uric trong máu giữa hai giới. Sự khác biệt này được ghi nhận khi so sánh giữa các độ tuổi khác nhau [114]. Càng lớn tuổi, nồng độ acid uric sẽ càng cao (đặc biệt là nữ sau mãn kinh, khi nồng độ estrogen trong cơ thể sụt giảm làm giảm khả năng thanh thải acid uric [115]). Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỉ lệ nam giới và tuổi trung bình của nhóm chứng cao hơn so với nhóm bệnh, do đó kết quả so sánh về nồng độ acid uric và tình trạng tăng acid uric khác biệt giữa 2 nhóm có độ tin cậy cao (ít nguy cơ sai lầm, dương tính giả).

Bên cạnh sự sai biệt rõ rệt nồng độ acid uric giữa hai nhóm nghiên cứu, các chỉ tiêu định lượng như CRP, LDL-C và TG với các trị số trung bình ở nhóm bệnh (**CRP=4,96±4,61 mg/dL; LDL-c=108,12 ± 29,4 mg/dL; TG=184,2±61,24 mg/dL**) cũng cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với giá trị $p < 0,05$. Các kết quả chúng tôi thu nhận được (ngoại trừ sự khác biệt về CRP) hoàn toàn phù hợp với các nghiên cứu khác đã công bố trên thế giới [115]. Theo đó người có chỉ số khối cơ thể (BMI) càng cao thì nồng độ acid uric càng cao [112], nguy cơ bệnh gút càng tăng. Đồng thời, người thừa cân và béo phì (BMI cao) đều có rối loạn mỡ máu bao gồm hoặc tăng triglyceride máu hoặc

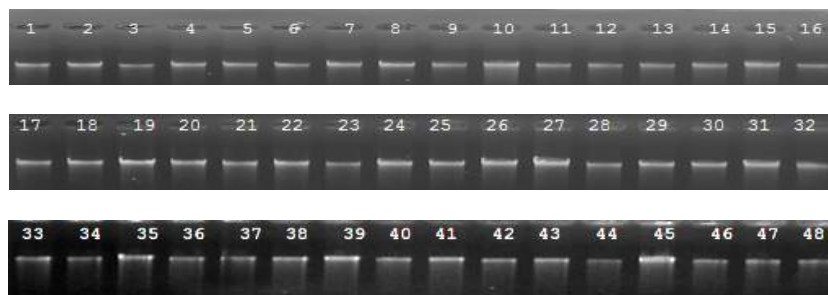
tăng thành phần LDL-cholesterol máu. Do đó các chỉ số LDL-c và Triglyceride có thể xem như hậu quả gián tiếp của thừa cân, béo phì và những rối loạn này cũng là tác động trực tiếp gây tăng nặng bệnh lý gút.

Chỉ số C-reaction protein (CRP) gợi ý tình trạng viêm nhiễm trong cơ thể. Sự sai biệt chỉ số này giữa hai nhóm bệnh - nhóm chứng, có thể được lý giải do đa số bệnh nhân tham gia nghiên cứu đang bị viêm gút cấp dẫn đến tình trạng chỉ số CRP tăng cao so với nhóm người bình thường.

Khi so sánh chỉ số độ tuổi, chiều cao, nồng độ ALT, AST, BUN, CREA, DBP, SBP, GLU, HDL-C và WBC không cho thấy khác biệt giữa 2 nhóm bệnh - chứng ($p > 0,05$). Do đó sự khác biệt giữa hai nhóm nghiên cứu gây ra bởi tình trạng bệnh gút và tăng nồng độ acid uric máu. Sự khác biệt này không bị ảnh hưởng bởi các yếu tố khác gây nhiễu. Điều này càng tăng độ tin cậy và tính khách quan cho những kết quả nghiên cứu.

3.1.2. Tách chiết DNA tổng số

DNA của mẫu nghiên cứu được đánh giá độ sạch và nồng độ bằng hai phương pháp: phương pháp quang phổ kế và phương pháp điện di trên gel agarose 1%. Một phần kết quả điện di kiểm tra DNA tổng số được trình bày trong hình 3.1 và hình 3.2. Các sản phẩm DNA còn lại được báo cáo đầy đủ trong phần phụ lục III, hình 3.

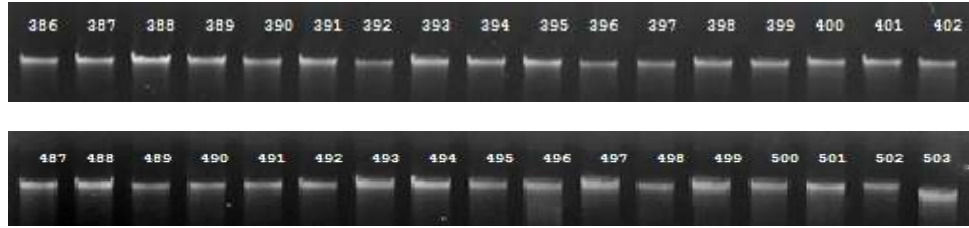


Hình 3.1. Điện di đồ sản phẩm DNA tách chiết từ một số mẫu máu điển hình của nhóm người không mắc bệnh gút trên gel agarose 1%

Sản phẩm của 48 mẫu DNA người khoẻ mạnh tương ứng với ký hiệu mẫu từ

1-48





Hình 3.2. Điện di đồ sản phẩm DNA tách chiết từ một số mẫu máu điển hình từ nhóm người mắc bệnh gút trên gel agarose 1%

Sản phẩm của 51 mẫu DNA người mắc bệnh gút tương ứng với ký hiệu mẫu từ 369-402 và 487-503

Kết quả điện di chỉ ra rằng DNA của mẫu đều có hình ảnh một băng rõ nét, độ đậm nhạt của băng điện di phản ánh nồng độ DNA thu được. Nồng độ DNA và độ sạch của 521 mẫu thu được đảm bảo chất lượng cho các nghiên cứu sau này.

3.1.3. Đánh giá tương quan giữa *ABCG2* rs72552713 và bệnh gút

a) Xác định kiểu gen của đa hình *ABCG2* rs72552713

Vùng DNA chứa SNP rs72552713 trên gen *ABCG2* được khuếch đại thành công bằng phương pháp PCR. Sản phẩm này được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Chúng tôi đã khuếch đại thành công trình tự đặc hiệu cho toàn bộ mẫu có kích thước phù hợp với ước tính lý thuyết. Một phần kết quả được mô tả trong hình 3.3, các kết quả còn lại sẽ được báo cáo đầy đủ trong phụ lục IV, hình 4A.

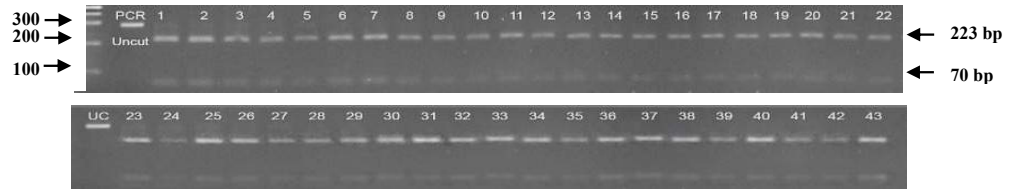


Hình 3.3. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại vùng trình tự đích chứa *ABCG2* rs72552713 từ một số mẫu điển hình

M: Marker 100bp, +: Sản phẩm PCR đối chứng; 1-46: Sản phẩm khuếch đại của 46 mẫu DNA tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-46

Sản phẩm PCR nhân đoạn gen chứa *ABCG2* rs72552713 được xử lý với enzyme *RsaI* trong 5 giờ ở nhiệt độ 65°C. Sau đó, sản phẩm này được điện di

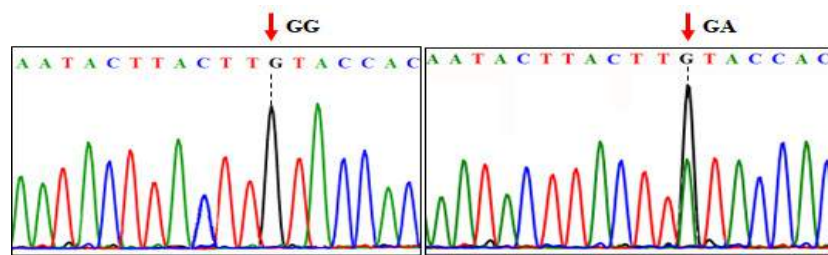
kiểm tra trên gel agarose 3%. Kiểu gen đa hình tương ứng sẽ được xác định từ số lượng và kích thước các băng DNA thu được (hình 3.4, mô tả đầy đủ tại phụ lục IV, hình 4B).



Hình 3.4. Điện di đồ sản phẩm PCR sau khi được xử lý bằng enzyme *RsaI* trên một vài mẫu đại diện

M: Marker 100bp, *UC*: Sản phẩm PCR không xử lý bằng enzyme *RsaI*, 1-43: Sản phẩm xử lý bằng enzyme *RsaI* của 43 mẫu PCR tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-43

Để khẳng định tính chính xác của phương pháp RFLP cho đa hình *ABCG2* rs72552713, 10% số lượng sản phẩm PCR được kiểm tra lại bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Một phần kết quả giải trình tự được mô tả trong hình 3.5. Các hình ảnh còn lại sẽ được báo cáo đầy đủ trong phụ lục IV, hình 4D.



Hình 3.5. Trình tự đoạn nucleotide 2 mẫu đại diện có kiểu gen GG và GA của đa hình *ABCG2* rs72552713

b) Xác định thành phần kiểu gen đa hình *ABCG2* rs72552713

Theo tính toán lý thuyết, sự khác nhau về kiểu gen trên các mẫu khác nhau có thể xác định bằng số lượng băng DNA và kích thước băng tương ứng. Cụ thể như sau, kết quả điện di của mẫu có kiểu gen AA sẽ thu được 1 băng DNA (293 bp), mẫu có kiểu gen GG kết quả điện di xuất hiện 2 băng (223, 70 bp) và mẫu có kiểu gen GA cho 3 băng DNA (293, 223 và 70 bp). Kiểu gen

và tần số allele của rs72552713 trên 521 mẫu được thống kê và ghi nhận trong bảng 3.3.

Bảng 3.3. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele của đa hình ABCG2 rs72552713

	Kiểu gen			Allele		Giá trị p	HWE
	GG	GA	AA	G	A		
Nhóm chứng	350 (0,997)	1 (0,003)	0 (0,0)	0,999	0,001	1,000	+
Nhóm bệnh	160 (0,94)	10 (0,06)	0 (0,0)	0,971	0,029	0,925	+
Tổng số	510 (0,98)	11 (0,02)	0 (0,0)	0,98	0,02	0,977	+

HWE: Cân bằng Hardy-Weinberg; “+”: Tuân theo định luật cân bằng HWE.

Căn cứ theo kết quả được ghi nhận ở trên, chúng ta thấy kết quả thống kê tần số allele cùng với kiểu gen của đa hình ABCG2 rs72552713 có phân bố tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg ($p > 0,05$).

Đa hình rs72552713 (G>A) được tìm thấy khá phổ biến ở người Đông Nam Á và Nhật Bản [116]. Dựa vào thống kê các mẫu cho thấy, allele G xuất hiện phổ biến trong khi đó allele A hiếm gặp hơn với tần số tương ứng là 0,98/0,02. Allele hiếm A xuất hiện chủ yếu ở nhóm bệnh với tần suất cao gấp 17 lần so với nhóm chứng. Ngoài ra, trong toàn bộ mẫu nghiên cứu không phát hiện thấy các cá thể có kiểu gen AA. Tuy nhiên, phân bố kiểu gen của rs72552713 vẫn tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg ở cả nhóm bệnh và nhóm chứng và trên quần thể nghiên cứu.

c) Phân tích sự tương quan giữa đa hình ABCG2 rs72552713 với bệnh gút

Trong nghiên cứu của chúng tôi, vì kiểu gen AA không xuất hiện, do đó sự tương quan giữa kiểu gen đa hình rs72552713 với khả năng mắc bệnh gút chỉ xét ở mô hình trội. Kết quả xử lý cho thấy tần số allele và kiểu gen của đa hình này đều liên quan đến khả năng mắc bệnh gút. Cụ thể, sự có mặt của allele A làm tăng nguy cơ mắc bệnh gút (OR=21,19; 95%CI: 3,00 - 918,96;

p=0,000038). Kiểu gen GA cũng có nguy cơ mắc bệnh cao hơn so với kiểu gen GG (OR=21,875; 95%CI: 2,77 - 172,34; p=0,0000025) (bảng 3.4).

Bảng 3.4. Tương quan đơn biến giữa đa hình ABCG2 rs72552713 và bệnh gút

Kiểu	Nhóm chứng	Nhóm bệnh	OR	95% CI	Giá trị p
Mô hình trội					0,0000025
GG	350 (99,7%)	160 (94,1%)	1,00		
GA	1 (0,3%)	10 (5,9%)	21,875	2,77 - 172,34	
Allele					0,0000038
G	701 (99,86%)	330 (97,06%)	1,00		
A	01 (0,14%)	10 (2,94%)	21,19	3,00 - 918,96	

(n, %): Số lượng cá thể (phần trăm); OR: Tỷ số odds; 95% CI: Khoảng tin cậy 95%

d) Đánh giá tương quan giữa đa hình rs72552713 với các yếu tố khác

Tiếp theo, chúng tôi cũng phát hiện ra mối tương quan giữa đa hình rs72552713 với nồng độ acid uric, cân nặng và chỉ số BUN ở người Việt (bảng 3.5). Bằng phân tích thống kê cụ thể, sự khác biệt được ghi nhận giữa tình trạng nồng độ acid uric, cân nặng và chỉ số BUN trung bình giữa 2 kiểu hình gen GG và GA với giá trị p trong phép kiểm so sánh đều <0,05.

Bảng 3.5. Đánh giá tương quan giữa đa hình rs72552713 với các yếu tố khác

<i>ABCG2</i> rs72552713	Kiểu gen		Giá trị p
	GA (n=11)	GG (n=510)	
Acid uric (mg/dL)	9,37 ± 1,80	7,66 ± 1,92	0,0001
Cân nặng (kg)	71,16± 8,20	66,15± 9,51	0,012
Chiều cao (cm)	164,93±5,79	166,47±4,82	0,1261
BMI	24,54±0,15	25,69±0,67	0,0723
CRP (mg/dL)	5,77±1,76	5,40±1,33	0,4838
HDL-C (mg/dL)	47,23±21,13	45,58±8,68	0,3669
LDL-C (mg/dL)	122,47±39,26	126,63±41,28	0,3255
Triglyceride	231,00±7,19	256,46±47,53	0,2504
Glucose máu	112,83±1,69	108,47±3,50	0,3074
AST (U/L)	28,35±0,99	24,57±1,15	0,2285
ALT (U/L)	32,90±1,08	29,48±4,58	0,2703
BUN (mg/dL)	26,05±0,56	21,18±2,57	0,0454
Creatinin	1,09±0,01	1,10±0,05	0,3877
WBC (trên μ L)	7646±105	8002±402	0,2546

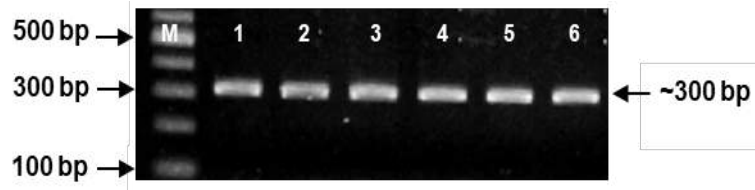
Mean \pm SD: Giá trị trung bình cộng \pm độ lệch chuẩn;

n: Số lượng cá thể; Giá trị p được tính bằng kiểm định t-test hoặc Mann-Whitney

3.1.4. Đánh giá tương quan của rs12505410 gen *ABCG2* và bệnh gút

a) Xác định kiểu gen của đa hình *ABCG2* rs12505410

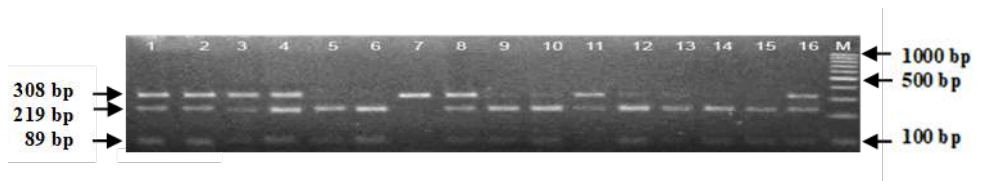
Vùng DNA chứa điểm SNP rs12505410 trên gen *ABCG2* sau khi được khuếch đại đặc hiệu bằng PCR được kiểm tra trên gel agarose 1%. Nghiên cứu đã khuếch đại thành công vùng DNA quan tâm cho toàn bộ mẫu, kích thước của băng điện di phù hợp với ước toán ban đầu. Một số kết quả đại diện được mô tả trong hình 3.6. Toàn bộ kết quả còn lại được báo cáo trong phần phụ lục V, hình 5A.



Hình 3.6. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại vùng trình tự đích chứa đa hình *ABCG2* rs12505410 ở một số mẫu đại diện

M: Marker 100bp, 1-6: Sản phẩm khuếch đại của 6 mẫu DNA tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-6

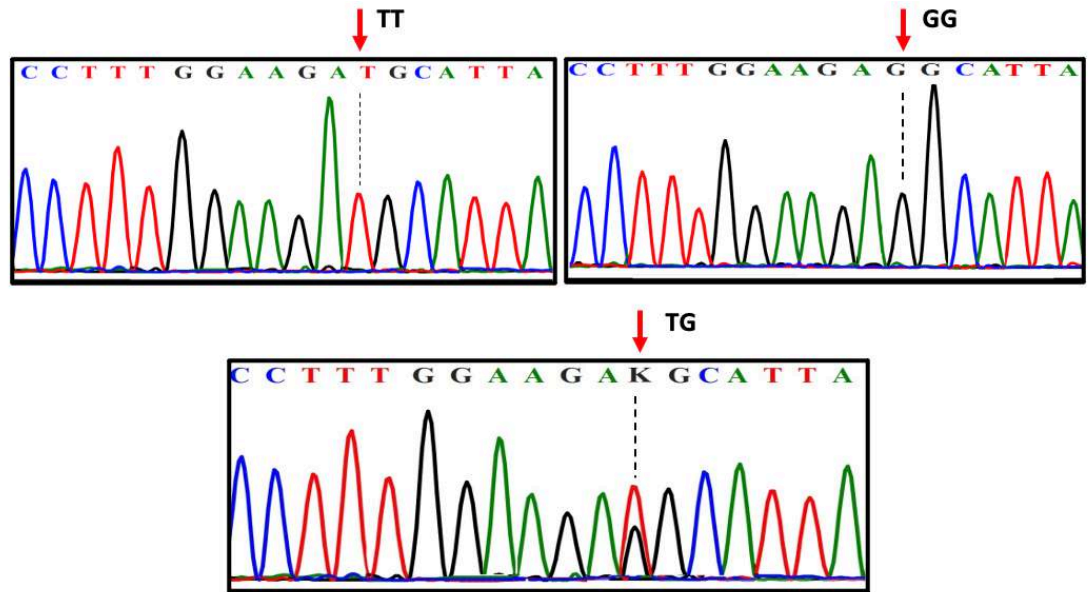
Sản phẩm PCR đặc hiệu được tiến hành xử lý trong 5 giờ với enzyme *NsiI* ở 65°C. Sản phẩm của phản ứng này được điện di kiểm tra trên gel agarose 3%. Kiểu gen của đa hình quan tâm sẽ được xác định từ số lượng và kích thước tương ứng của các băng DNA thu được sau khi xử lý với enzyme (hình 3.7). Kết quả điện di xác định kiểu đa hình gen được báo cáo đầy đủ trong phụ lục V, hình 5B.



Hình 3.7. Điện di đồ sản phẩm PCR sau khi được xử lý bằng enzyme *NsiI* một số mẫu đại diện

M: Marker 100bp, 1-16: Sản phẩm xử lý bằng enzyme cắt của 16 mẫu PCR tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-16

Độ chính xác và tin cậy của phương pháp RFLP được đánh giá bằng cách xác định trình tự 10% số lượng mẫu trong nghiên cứu đa hình rs12505410 trên gen *ABCG2* bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Ba kiểu gen đặc trưng đại diện cho kết quả giải trình tự được mô tả trong hình 3.8, phần đầy đủ xem thêm ở phụ lục V, hình 5D.



Hình 3.8. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen TT, GG và TG của đa hình ABCG2 rs12505410

b) Xác định thành phần kiểu gen đa hình ABCG2 rs12505410

Dựa vào sự khác nhau về số lượng và kích thước của các băng DNA (theo tính toán ban đầu) sau khi được xử lý với enzyme *NsiI*, kiểu gen của mẫu nghiên cứu có thể được xác định. Mẫu có kiểu gen GG sẽ thu được 1 băng DNA (308 bp), mẫu có kiểu gen TT điện di thu được 2 băng (219 và 89 bp) và mẫu có kiểu gen TG cho 3 băng DNA (308, 219 và 89 bp). Kiểu gen và tần số allele của rs12505410 ở 521 mẫu được thống kê và ghi nhận trong bảng 3.6.

Bảng 3.6. Thống kê kiểu gen và tần số allele đa hình ABCG2 rs12505410

	Kiểu gen			Tần số allele		Giá trị p	HWE
	TT	TG	GG	T	G		
Nhóm chứng	133 (0,38)	167 (0,48)	51 (0,14)	0,615	0,385	0,979	+
Nhóm bệnh	66 (0,39)	73 (0,43)	31 (0,18)	0,597	0,403	0,374	+
Tổng số	199 (0,38)	240 (0,46)	82 (0,16)	0,612	0,388	0,708	+

HWE: Cân bằng Hardy-Weinberg; “+”: Tuân theo định luật cân bằng HWE.

Giá trị p trong phép kiểm Chi-square giữa số lượng lý thuyết và thực tế của các thể mang ba kiểu gen tương ứng cho thấy: kiểu gen và tần số allele của đa hình ABCG2 rs12505410 tuân theo quy luật cân bằng HWE.

c) *Phân tích sự tương quan giữa đa hình ABCG2 rs12505410 với bệnh gút*

Do phân bố kiểu gen và tần số allele của đa hình rs12505410 tuân theo định luật HWE, do đó chúng tôi sử dụng kiểm định Chi-square để đánh giá sự tương quan giữa các kiểu gen với nguy cơ mắc bệnh gút giữa các nhóm đối tượng. Giá trị p quan sát được ở cả 3 mô hình đều lớn hơn mức ý nghĩa 0,05 (bảng 3.7).

Bảng 3.7. Đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs12505410 đối với bệnh gút

Kiểu gen	Nhóm chứng (n, %)	Nhóm bệnh (n, %)	OR	95% CI	Giá trị p
Mô hình cộng gộp					0,458
TT	133 (37,9%)	66 (38,8%)	1,00		
TG	167 (47,6%)	73 (43%)	0,881	0,588 - 1,319	0,538
GG	51 (14,5%)	31 (18,2%)	1,225	0,717 - 2,092	0,457
Mô hình trội					0,685
TT	133 (37,9%)	66 (38,8%)	1,00		
TG + GG	218 (62,1%)	104 (61,2%)	0,961	0,660 - 1,401	0,837
Mô hình lặn					0,856
TT + TG	300 (85,5%)	139 (81,8%)	1,00		
GG	51 (14,5%)	31 (18,2%)	1,312	0,804 - 2,141	0,276
Mô hình đồng trội					0,609
TT + GG	184 (52,4%)	97 (57%)	1,00		
TG	167 (47,6%)	73 (43%)	0,681	0,518 - 1,119	0,438
Allele					0,836
T	433 (61,7%)	205 (60,3%)	1,00		
G	269 (38,3%)	135 (39,7%)	1,06	0,805 - 1,393	0,684

(n, %): Số lượng cá thể (phần trăm); OR: Tỷ số odds; 95% CI: Khoảng tin cậy 95%

Kết quả trong các mô hình: mô hình cộng gộp, mô hình trội, mô hình lặn hay mô hình đồng trội đều không có sự khác biệt về phân bố kiểu gen giữa 2 nhóm bệnh gút và nhóm chứng. Do đó, trong phạm vi nghiên cứu này, đa hình này xuất hiện ngẫu nhiên trong cả quần thể bệnh và quần thể người thường, sự xuất hiện của các SNP này không liên quan đến khả năng mắc bệnh hay làm giảm nguy cơ mắc bệnh gút ở các nhóm quần thể nghiên cứu. Chúng tôi cũng không tìm thấy sự khác biệt về kiểu allele T và G giữa 2 nhóm bệnh và chứng.

Tỷ lệ kiểu allele và kiểu gen của đa hình *ABCG2* rs12505410 không liên quan đến nguy cơ mắc bệnh gút ở người Việt. Tuy nhiên, ở quần thể người

Hán và người Tibetan ở Trung Quốc, rs12505410 cho thấy có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh gút và gây ra ảnh hưởng khác nhau đối với mỗi quần thể. Theo đó, sự xuất hiện của allele G làm tăng nguy cơ mắc bệnh ở người Hán (OR=1,564; p=0,003) nhưng lại làm giảm nguy cơ mắc bệnh ở người Tibetan (OR=0,717; p=0,005) [111]. Vì thế, ảnh hưởng của rs12505410 đối với những quần thể khác nhau là không đồng nhất. Dù không tìm được sự liên quan giữa đa hình gen rs12505410 với nguy cơ bệnh gút, chúng tôi tìm được mối liên quan giữa đa hình này với nồng độ acid uric máu và tình trạng tăng huyết áp tâm thu khi khảo sát các phân nhóm nhỏ hơn. Điều này mở đường cho các nghiên cứu trong tương lai hướng đến mục tiêu xác định mức ảnh hưởng của *ABCG2* rs12505410 đối với huyết áp tâm thu trong các dân số khảo sát lớn hơn/đa dạng di truyền cao hơn cũng như cơ chế ảnh hưởng của di truyền này.

d) Đánh giá tương quan giữa đa hình rs12505410 với các yếu tố khác

Khi phân tích mối tương quan với các đặc điểm lâm sàng, chúng tôi cũng xác định sự liên quan của rs12505410 với một số các chỉ số lâm sàng và cận lâm sàng, những kết quả này được trình bày trong bảng 3.8.

Dựa trên kết quả phân tích, cho thấy các bệnh nhân có kiểu gen GG có chỉ số BUN có thể liên quan đến đa hình rs12505410 (p = 0,0187). Các đặc điểm lâm sàng còn lại như Creatinin, CRP định lượng, BMI ... đều không liên quan đến đa hình rs12505410.

Bảng 3.8. Đánh giá tương quan giữa đa hình rs12505410 với một số yếu tố khác

ABCG2 rs12505410	Kiểu gen			Giá trị p*
	TT (n=199)	TG (n=240)	GG (n=82)	
Acid uric (mg/dL)	7,92±1,93	7,70±1,98	7,35±1,79	0,0795
Cân nặng (kg)	65,93±9,20	66,34±9,81	67,25±9,37	0,5696
Chiều cao (cm)	164,59±5,82	165,19±5,73	165,33±5,70	0,4710
BMI	24,52±3,30	24,56±3,47	24,80±3,20	0,8043
CRP (mg/dL)	3,80±5,64	7,93±5,63	4,14±4,36	0,4969
HDL-c (mg/dL)	45,68±13,47	47,38±14,13	50,07±41,05	0,2688
LDL-c(mg/dL)	126,19±37,59	119,95±38,34	121,94±45,32	0,2591
Triglyceride	239,09±180,30	228,76±153,51	224,40±136,79	0,7230
Glucose máu	112,63±43,29	114,09±13,10	108,75±28,09	0,5281
AST (U/L)	29,30±27,96	27,68±16,67	27,15±17,35	0,6648
ALT (U/L)	32,17±26,48	32,93±18,91	33,74±29,74	0,8736
BUN (mg/dL)	24,34±10,05	26,07±13,08	28,85±14,20	0,0187
Creatinin	1,078±0,188	1,091±0,263	1,096±0,201	0,7751
WBC (trên μ L)	7616±2336	7708±2441	7625±1780	0,9090

Mean \pm SD: Giá trị trung bình cộng \pm độ lệch chuẩn; n (%): Số lượng cá thể (%);
* phép kiểm one-way ANOVA so sánh giá trị trung bình giữa 3 nhóm.

3.1.5. Đánh giá tương quan của rs11231825 gen SLC22A12 và bệnh gút

a) Xác định kiểu gen đa hình rs11231825 gen SLC22A12

Sau khi tiến hành phản ứng PCR khuếch đại đặc hiệu vùng chứa đa hình rs11231825 trên gen SLC22A12, sản phẩm khuếch đại được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Hình ảnh điện di cho thấy tất cả các mẫu đã được khuếch đại thành công trình tự đặc hiệu, kích thước băng điện di phù hợp với tính toán ban đầu. Một vài kết quả đại diện được trình bày trong hình 3.9. Kết quả đầy đủ được trình bày trong phần phụ lục VI, hình 6A.



Hình 3.9. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại vùng trình tự đích chứa đa hình *SLC22A12* rs11231825 một số mẫu đại diện

M: Marker 100bp, 1-22: Sản phẩm khuếch đại của 22 mẫu DNA tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-22

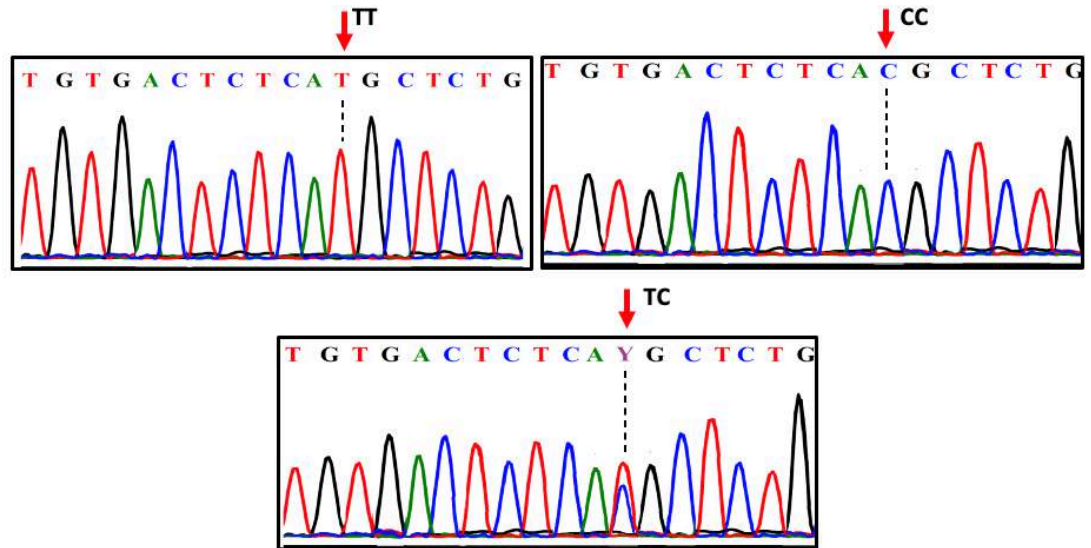
Chúng tôi sử dụng enzyme *BclI* để xử lý sản phẩm PCR ở nhiệt độ 65°C trong 5 giờ. Sau đó, điện di kiểm tra sản phẩm này trên gel agarose 3%. Xác định kiểu gen đa hình *SLC22A12* rs11231825 dựa trên số lượng và kích thước các băng DNA thu được. Một phần kết quả của phản ứng xử lý sản phẩm PCR với enzyme *BclI* được thể hiện trong hình 3.10. Phần phụ lục VI, hình 6B trình bày toàn bộ kết quả còn lại.



Hình 3.10. Điện di đồ sản phẩm được xử lý với enzyme *BclI* trên một số mẫu đại diện

M: Marker 100bp, *UC*: Sản phẩm PCR không xử lý bằng enzyme *BclI*, 1-16: Sản phẩm xử lý bằng enzyme *BclI* của 16 mẫu PCR tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-16

Chúng tôi sử dụng phương pháp giải trình tự Sanger để kiểm tra lại kết quả RFLP của 10% tổng số mẫu nghiên cứu. Hình 3.11 trình bày ba kiểu gen đặc trưng cho đa hình *SLC22A12* rs11231825. Phần phụ lục VI, hình 6D trình bày kết quả giải trình tự các mẫu còn lại.



Hình 3.11. Trình tự nucleotide đa hình SLC22A12 rs11231825 của 3 mẫu đại diện có kiểu gen TT, CC và TC

b) Xác định thành phần kiểu gen đa hình SLC22A12 rs11231825

Dùng gel agarose 3% điện di kiểm tra sản phẩm PCR của 521 mẫu nghiên cứu sau khi cắt bằng enzyme *Bcl*I. Theo tính toán lý thuyết, chúng tôi sẽ ghi nhận được 1 băng DNA kích thước 168 bp khi điện di mẫu có kiểu gen CC sau khi xử lý với enzyme giới hạn. Kết quả điện di của mẫu có kiểu gen TT xuất hiện 2 băng DNA có kích thước lần lượt là 146 và 22 bp. Tuy nhiên, do kích thước quá nhỏ, băng DNA 22 bp sẽ không nhìn thấy trên bản gel điện di. Mẫu có kiểu gen TC cho 3 băng DNA có kích thước là 168, 146 và 22 bp. Kết quả xác định thành phần kiểu gen đa hình rs11231825 ở 521 mẫu được ghi nhận bên dưới (bảng 3.9).

Bảng 3.9. Bảng thống kê tần số allele và kiểu gen của đa hình rs11231825

	Kiểu gen			Allele		Giá trị p	HWE
	TT	TC	CC	T	C		
Nhóm chứng	183 (0,52)	134 (0,38)	34 (0,1)	0,712	0,288	0,438	+
Nhóm bệnh	99 (0,58)	66 (0,39)	5 (0,03)	0,776	0,224	0,304	+
Tổng số	282 (0,54)	200 (0,38)	39 (0,08)	0,733	0,267	0,914	+

HWE: Cân bằng Hardy-Weinberg; "+": Tuân theo định luật HWE.

Các kết quả cho thấy kiểu gen TT/TC/CC và tần số allele T và C phân bố tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg trong cả 2 nhóm bệnh gút và nhóm chứng.

c) Phân tích sự tương quan giữa đa hình SLC22A12 rs11231825 với bệnh gút

Dựa trên các kết quả phân tích kiểu gen và tần số allele của đa hình trong bảng 3.10 cho thấy, ở 2 mô hình cộng gộp và lặn, tỉ lệ kiểu gen của rs11231825 liên quan đến nguy cơ mắc bệnh gút với giá trị p lần lượt là 0,0104 và 0,0006. Trong mô hình cộng gộp, kiểu gen CC và TC có khả năng làm giảm nguy cơ mắc bệnh so với TT (OR<1), khả năng này ở kiểu gen CC (OR=0,272) mạnh hơn TC (OR=0,910). Kiểu allele của rs1123185 cho thấy có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh gút. Sự hiện diện của allele hiếm C làm giảm nguy cơ mắc bệnh gút (OR=0,712; 95%CI: 0,612 - 0,942; p=0,0322).

Bảng 3.10. Kết quả đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs11231825 với bệnh gút

Kiểu gen	Nhóm chứng	Nhóm bệnh	OR	95%CI	Giá trị
Mô hình cộng gộp					0,0104
TT	183 (52,1%)	99 (58,2%)	1,00		
TC	134 (38,2%)	66 (38,8%)	0,910	0,621 - 1,335	0,031
CC	34 (9,7%)	5 (2,9%)	0,272	0,103 - 0,717	0,005
Mô hình trội					0,190
TT	183 (52,1%)	99 (58,2%)	1,00		
TC + CC	168 (47,9%)	71 (41,8%)	0,781	0,540 - 1,131	0,578
Mô hình lặn					0,006
TT + TC	317 (90,3%)	165 (97,1%)	1,00		
CC	34 (9,7%)	05 (2,9%)	0,283	0,108 - 0,736	0,233
Mô hình đồng trội					0,697
TT + CC	217 (61,8%)	104 (61,2%)	1,00		
TC	134 (38,2%)	66 (38,8%)	0,720	0,521 - 1,035	0,521
Allele					0,0302
T	500 (71,2%)	264 (77,6%)	1,00		
C	202 (28,8%)	76 (22,4%)	0,712	0,526 - 0,964	0,032

(n, %): Số lượng cá thể (phần trăm); OR: Tỷ số odds; 95% CI: Khoảng tin cậy 95%

d) Đánh giá tương quan giữa đa hình rs11231825 với các yếu tố khác

Khi thực hiện phân tích mối tương quan với các đặc điểm lâm sàng, chúng tôi cũng xác định sự liên quan của *SLC22A12* rs11231825 với nồng độ LDL-c và glucose máu. Sự khác biệt của hai chỉ số này trong hai nhóm chứng và bệnh có ý nghĩa thống kê với giá trị p tương ứng là 0,0245 và 0,0055 (bảng 3.11).

Nồng độ LDL-c ở những bệnh nhân có kiểu gen TC thấp hơn so với người có kiểu gen TT và kiểu gen CC ($p < 0,05$). Đối với nồng độ glucose, người mang kiểu gen TT có nồng độ thấp nhất khi so sánh với kiểu gen TC và kiểu gen CC ($p < 0,005$). Tại Việt Nam, hiện chưa có nhiều nghiên cứu khoa học đánh giá mối tương quan này. Kết quả tìm được cần được nghiên cứu với

cỡ mẫu lớn hơn cho những nghiên cứu đa hình rs11231825 với bệnh gút trong tương lai.

Bảng 3.11. Đánh giá tương quan giữa đa hình rs11231825 với các chỉ số lâm sàng

<i>SLC22A12</i> <i>rs11231825</i>	Kiểu gen			Giá trị p*
	TT (n=282)	TC (n=200)	CC (n=39)	
Acid uric	7,82±1,92	7,61±1,99	7,56±1,85	0,4515
Cân nặng (kg)	66,13±9,42	66,85±9,39	65,18±10,69	0,5311
Chiều cao (cm)	165,03±6,25	165,00±4,97	164,59±5,92	0,9030
BMI	24,55±3,35	24,62±3,14	24,67±4,45	0,9588
CRP (mg/dL)	7,00±51,94	4,20±5,88	4,74±5,78	0,7266
HDL-c (mg/dL)	46,82±24,77	47,76±14,58	46,74±16,34	0,8836
LDL-c (mg/dL)	124,56±41,07	117,56±36,59	134,33±36,73	0,0245
Triglyceride	222,11±135,30	240,74±196,01	257,62±137,54	0,2737
Glucose máu	108,83±25,46	115,09±38,27	127,79±76,27	0,0055
AST (U/L)	29,15±23,01	27,71±21,63	23,96±7,56	0,3510
ALT (U/L)	33,21±25,29	32,31±23,47	32,01±13,84	0,9024
BUN (mg/dL)	25,71±13,12	25,98±11,40	26,45±10,85	0,9290
Creatinin	1,07±0,24	1,11±0,22	1,04±0,10	0,0824
WBC (trên μ L)	7701±2380	7579±2177	7773±2396	0,8104

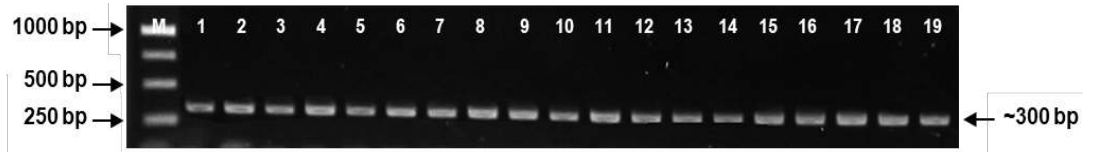
*Mean \pm SD: Giá trị trung bình cộng \pm độ lệch chuẩn; n (%): Số lượng cá thể (%); * phép kiểm one-way ANOVA so sánh giá trị trung bình giữa 3 nhóm.*

3.1.6. Đánh giá tương quan của rs7932775 gen *SLC22A12* và bệnh gút

*a) Xác định kiểu gen đa hình rs7932775 gen *SLC22A12**

Vùng DNA đặc hiệu chứa đa hình rs7932775 của gen *SLC22A12* đã được khuếch đại bằng phương pháp PCR. Sản phẩm nhân đoạn DNA quan tâm được điện di trên gel agarose 1% để kiểm tra. Hình ảnh điện di cho thấy tất cả các mẫu có trình tự đoạn DNA nhân lên đặc hiệu, với kích thước phù hợp như tính toán ban đầu. Hình 3.11 trình bày một phần kết quả điện di kiểm

tra sản phẩm khuếch đại nhân đoạn DNA chứa rs7932775. Phần phụ lục VII, hình 7A trình bày kết quả các mẫu còn lại.



Hình 3.12. Điện di đồ sản phẩm PCR vùng trình tự đích chứa đa hình

SLC22A12 rs7932775 của một số mẫu

M: Marker 100bp, 1-19: Sản phẩm PCR của 19 mẫu DNA

tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-19

Sản phẩm PCR đặc hiệu thu được từ thí nghiệm trên được tiến hành xử lý với enzyme *Eco130I* ở nhiệt độ 65°C trong 5 giờ. Sử dụng gel agarose 3% điện di sản phẩm sau cắt. Dựa trên kích thước và số lượng các băng DNA sản phẩm, kiểu gen đa hình rs7932775 được xác định. Hình 3.13 thể hiện một phần kết quả điện di sản phẩm cắt được. Phần phụ lục VII, hình 7B trình bày đầy đủ kết quả các mẫu còn lại.



Hình 3.13. Điện di đồ sản phẩm sau khi được xử lý bằng enzyme *Eco130I*

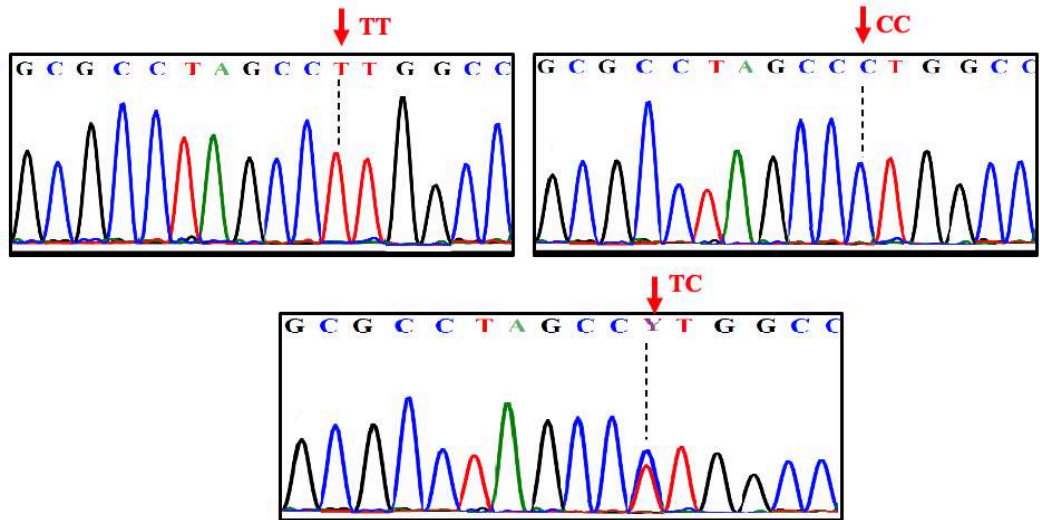
một số mẫu đại diện

*M: Marker 100bp, 1-21: Sản phẩm xử lý bằng enzyme *Eco130I* của 21 mẫu*

PCR tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-21, PCR: Sản phẩm PCR không xử lý

*bằng enzyme *Eco130I**

Để xác định kết quả thu được từ phương pháp RFLP, 10% số mẫu nghiên cứu được tiến hành giải trình tự bằng phương pháp Sanger. Hình 3.14 trình bày ba kiểu gen của đa hình rs7932775. Phần phụ lục VII, hình 7D trình bày đầy đủ kết quả của các mẫu còn lại.



Hình 3.14. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen TT, CC và TC của đa hình SLC22A12 rs7932775

b) Xác định thành phần kiểu gen đa hình SLC22A12 rs7932775

Sản phẩm PCR của 521 mẫu nghiên cứu sau khi cắt bằng enzyme *Eco130I* được điện di kiểm tra trên gel agarose 3%. Theo tính toán ban đầu, mẫu có kiểu gen CC sẽ thu được 1 băng DNA (325 bp), mẫu có kiểu gen TT điện di thu được 2 băng (208, 117 bp) và mẫu có kiểu gen CT cho 3 băng DNA (325, 208 và 117 bp). Kết quả xác định thành phần kiểu gen rs7932775 của 521 mẫu được ghi nhận bên dưới (bảng 3.12).

Bảng 3.12. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele đa hình rs7932775

	Kiểu gen			Allele		Giá trị p	HWE
	CC	CT	TT	C	T		
Nhóm chứng	103 (0,29)	154 (0,44)	94 (0,27)	0,513	0,487	0,0221	-
Nhóm bệnh	66 (0,39)	66 (0,39)	38 (0,22)	0,582	0,418	0,0085	-
Tổng số	169 (0,32)	220 (0,42)	132 (0,26)	0,536	0,464	0,0006	-

HWE: Cân bằng Hardy-Weinberg; "-": Không tuân theo định luật cân bằng HWE.

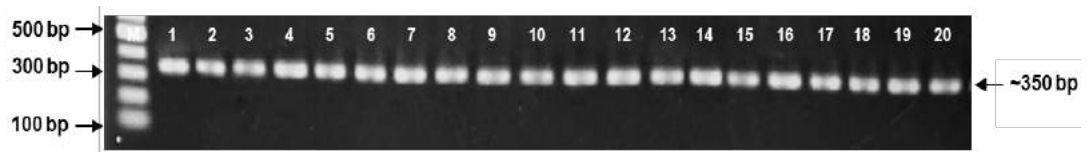
Dựa vào kết quả thống kê, tần số allele C và T trong quần thể không chênh lệch lớn (0,536/0,464). Tuy nhiên, sự phân li kiểu gen của đa hình rs7932775 không tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg ở hai nhóm

bệnh và chứng hay trên cả quần thể nghiên cứu. Điều này có thể do chọn mẫu ngẫu nhiên nên chưa khái quát với đa hình gen này hoặc có thể là đặc thù riêng của kiểu di truyền người Việt đối với đa hình này. Do đó, cần tìm hiểu thêm hoặc tăng số lượng mẫu nghiên cứu trong các nghiên cứu sau. Hơn nữa, chúng tôi không tiến hành phân tích tương quan kiểu gen hay allele của đa hình rs7932775 với bệnh gút cũng như các yếu tố lâm sàng và cận lâm sàng do đa hình này không tuân theo Hardy-Weinberg.

3.1.7. Đánh giá tương quan của rs12510549 gen *SLC2A9* và bệnh gút

a) Xác định kiểu gen đa hình rs12510549 gen *SLC2A9*

Chúng tôi khuếch đại đặc hiệu vùng có chứa đa hình rs12510549 của gen *SLC2A9* và kiểm tra sản phẩm khuếch đại bằng điện di trên gel agarose 1%. Hình ảnh điện di cho thấy tất cả các mẫu đã được khuếch đại trình tự đặc hiệu thành công, kích thước băng điện di phù hợp với tính toán ban đầu (hình 3.15). Phụ lục VIII, hình 8A trình bày đầy đủ các kết quả còn lại.



Hình 3.15. Điện di đồ sản phẩm PCR vùng trình tự đích chứa đa hình

SLC2A9 rs12510549 một số mẫu đại diện

M: Marker 100bp, 1-20: Sản phẩm PCR của 20 mẫu DNA tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-20

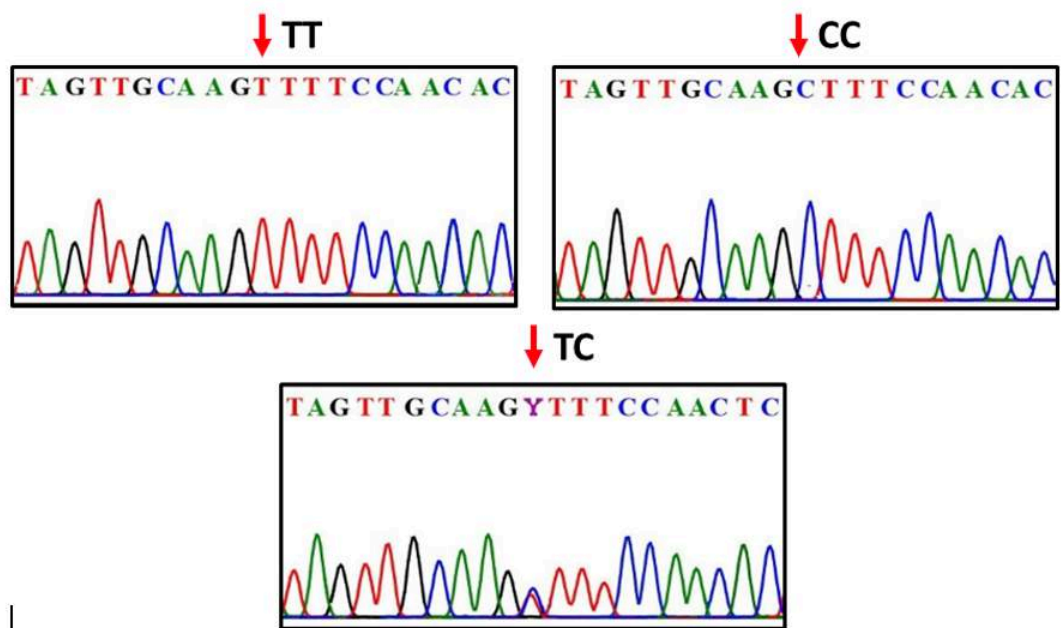
Sản phẩm sau khi khuếch đại sẽ được xử lý với enzyme *HindIII* ở nhiệt độ 65°C trong 5 giờ và được điện di kiểm tra trên gel agarose 3%. Từ số lượng các băng DNA thu được, dựa vào số lượng các vạch trên sản phẩm sau khi điện di, xác định kiểu gen đa hình. Một phần kết quả điện di được trình bày trong hình 3.16. Các kết quả còn lại được bổ sung đầy đủ trong phần phụ lục VIII, hình 8B.



Hình 3.16. Điện di đồ sản phẩm sau khi xử lý với enzyme *HindIII* một số mẫu đại diện

M: Marker 100bp, 1-20: Sản phẩm xử lý bằng enzyme *HindIII* của 20 mẫu PCR tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-20

Ngoài ra, chúng tôi dùng phương pháp giải trình tự Sanger kiểm tra kết quả xác định kiểu gen *SLC2A9* rs12510549. Hình 3.17 trình bày ba kiểu gen của đa hình rs12510549. Các kết quả còn lại được bổ sung trong phần phụ lục VIII, hình 8D.



Hình 3.17. Trình tự nucleotide 3 mẫu có kiểu gen TT, CC và TC của đa hình *SLC2A9* rs12510549

b) Xác định thành phần kiểu gen đa hình *SLC2A9* rs12510549

Sản phẩm khuếch đại của 521 mẫu nghiên cứu sau khi cắt bằng enzyme *HindIII* được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 3%. Theo tính toán ban đầu, mẫu có kiểu gen TT sẽ thu được 1 băng DNA (351 bp), mẫu có kiểu gen CC điện di thu được 2 băng (233, 118 bp) và mẫu có kiểu gen TC cho 3 băng DNA (351, 233 và 118 bp). Kết quả xác định thành phần kiểu gen rs12510549 của 521 mẫu được ghi nhận ở bảng 3.13.

Bảng 3.13. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele của *SLC2A9* rs12510549

	Kiểu gen			Allele		Giá trị p	HWE
	TT	TC	CC	T	C		
Nhóm chứng	253 (0,72)	91 (0,26)	7 (0,02)	0,850	0,150	0,491	+
Nhóm bệnh	126 (0,74)	39 (0,23)	5 (0,03)	0,854	0,146	0,372	+
Tổng số	379 (0,73)	130 (0,25)	12 (0,02)	0,852	0,148	0,813	+

HWE: Cân bằng Hardy - Weinberg; (+): Tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg.

Dựa trên bảng 13.3, chúng tôi thấy phân bố kiểu gen và tần số allele của *SLC2A9* rs12510549 trong mẫu nghiên cứu tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg. Các phép kiểm thống kê cho thấy không có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm bệnh và nhóm chứng về tỉ lệ kiểu gen và tần số allele của đa hình rs12510549.

c) Phân tích mối tương quan giữa *SLC2A9* rs12510549 với bệnh gút

Chúng tôi tiến hành khảo sát mối tương quan giữa tỉ lệ kiểu gen và tần số allele của rs12510549 với nguy cơ mắc bệnh gút. Các kết quả được thể hiện ở bên dưới (bảng 3.14).

Bảng 3.14. Kết quả đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs12510549 với bệnh gút

Kiểu	Nhóm	Nhóm bệnh	OR	95%CI	Giá trị
Mô hình cộng gộp					
TT	253 (72,1%)	126 (74,1%)	1,00		
TC	91 (25,9%)	39 (22,9%)	0,888	0,576 –	0,590
CC	07 (2%)	05 (3,0%)	1,463	0,455 –	0,521
Mô hình trội					0,606
TT	253	126 (74,1%)	1,00		
TC+CC	98 (27,92%)	44 (25,9%)	0,888	0,576 –	0,729

Mô hình lặn					0,541
TT+TC	344	165 (97%)	1,00		
CC	7 (1,99%)	5 (3,0%)	1,648	0,493 –	0,486
Mô hình đồng trội					0,426
TT+CC	260	131 (77,1%)	1,00		
TC	91 (25,93%)	39 (22,9%)	0,734	0,367 –	0,549
Allele					0,513
T	597 (85%)	291 (85,6%)	1,00		
C	105 (15%)	49 (14,4%)	0,827	0,461 – 1,482	0,679

(n, %): Số lượng cá thể (phần trăm); OR: Tỷ số odds; 95% CI: Khoảng tin cậy 95%

Chúng tôi nhận thấy cả 4 mô hình kiểu gen (trội, đồng hợp trội, lặn và cộng gộp) và kiểu allele đa hình đều có p lớn hơn 0,05. Vì vậy, không có sự liên quan giữa tỉ lệ kiểu gen, tần số allele của đa hình rs12510549 và nguy cơ mắc bệnh gút ở quần thể nghiên cứu.

Kết quả không liên quan của đa hình gen này với bệnh gút là phù hợp với các kết quả từ các nghiên cứu tương tự trên thế giới. Một nghiên cứu phân tích tổng hợp năm 2017 của Lee Y.H. et al cho thấy kiểu hình này dù có tương quan nghịch với bệnh gút ở sắc dân Âu Mỹ (Caucasian), nhưng hoàn toàn không có tương quan ở các quần thể sắc dân châu Á [86].

d) Đánh giá tương quan giữa đa hình rs12510549 với một số chỉ số lâm sàng

Chúng tôi tiếp tục khảo sát mối tương quan giữa kiểu gen của rs12510549 với các chỉ số lâm sàng của bệnh gút. Các kết quả được trình bày bên dưới (bảng 3.15).

Bảng 3.15. Tương quan giữa đa hình rs12510549 với một số chỉ số lâm sàng

SLC2A9 rs12510549	Kiểu gen			Giá trị p*
	TT (n=379)	TC (n=130)	CC (n=12)	
Acid uric	7,70±1,89	7,80±2,06	7,49±2,30	0,8217
BMI	24,70±3,41	24,91±3,77	23,79±0,68	0,5322
CRP (mg/dL)	4,26±6,03	3,54±3,39	4,13±4,96	0,5884
HDL-c (mg/dL)	47,81±22,72	45,88±12,92	42,61±24,57	0,4894
LDL-c (mg/dL)	124,07±38,74	119,32±38,82	105,89±49,39	0,1629
Triglyceride	235,13±165,03	232,42±176,49	244,06±121,24	0,9684
Glucose máu	112,10±38,66	115,76±33,78	100,76±31,63	0,3362
AST (U/L)	27,90±20,45	29,07±24,30	30,2±26,21	0,8270
ALT (U/L)	32,83±22,32	33,79±28,83	28,18±21,84	0,7267
BUN (mg/dL)	26,01±11,82	24,89±12,07	34,28±21,47	0,1375
Creatinin	1,07±0,21	1,12±0,27	1,19±0,24	0,0543
WBC (/μL)	7671±2277	7690±2424	7759±2277	0,9890

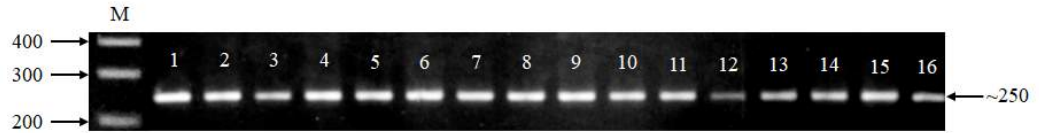
Mean ± SD: Giá trị trung bình cộng ± độ lệch chuẩn; n (%): Số lượng cá thể (%);
* phép kiểm one-way ANOVA so sánh giá trị trung bình giữa 3 nhóm.

Sau khi phân tích, chúng tôi không tìm được sự khác biệt hay mối liên quan giữa đa hình rs12510549 trên gen *SLC2A9* với chỉ số lâm sàng nào. Điều này có thể cho thấy các đa hình này không có hoặc ít đóng góp đến lâm sàng của bệnh gút. Tuy vậy, đây là nghiên cứu đầu tiên về gen này trên quần thể người Việt Nam nên cần được khảo sát thêm để khẳng định lại kết quả.

3.1.8. Đánh giá tương quan của rs16890979 gen *SLC2A9* và bệnh gút

a) Xác định kiểu gen đa hình rs16890979 gen *SLC2A9*

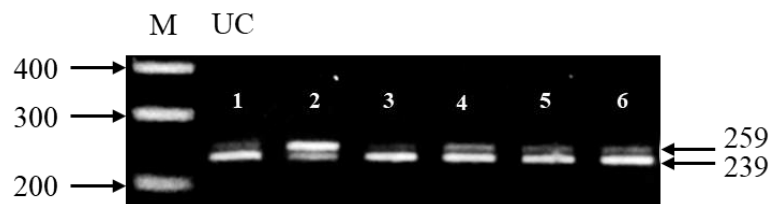
Chúng tôi thực hiện phản ứng khuếch đại đặc hiệu vùng có chứa đa hình rs16890979 của gen *SLC2A9*. Sản phẩm khuếch đại được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Hình ảnh điện di cho thấy tất cả các mẫu đã được khuếch đại trình tự đặc hiệu thành công, kích thước băng điện di phù hợp với tính toán ban đầu (hình 3.18). Phụ lục IX, hình 9A trình bày đầy đủ các kết quả còn lại.



Hình 3.18. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại vùng trình tự đích chứa đa hình *SLC2A9* rs16890979 một số mẫu đại diện

M: Marker 100bp, 1-16: Sản phẩm khuếch đại của 16 mẫu DNA tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-16

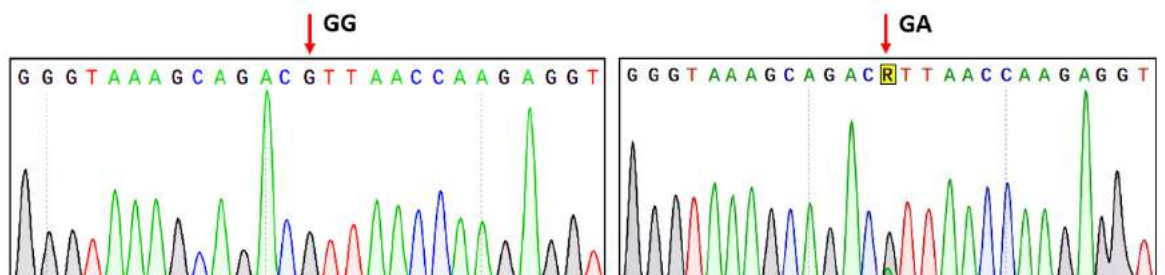
Sản phẩm sau phản ứng khuếch đại được cắt bằng enzyme *HpaI* trong 5 giờ ở nhiệt độ 65°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 3% bằng phương pháp điện di. Hình ảnh điện di cho thấy tất cả các mẫu đã được khuếch đại trình tự đặc hiệu thành công, kích thước băng điện di phù hợp với tính toán ban đầu (gồm các băng 259 bp (A/A), 239 bp và 20 bp (G/G), và 259bp, 239bp và 20bp (G/A)). Một phần kết quả điện di sản phẩm cắt được thể hiện trong hình 3.19. Kết quả còn lại được bổ sung trong phần phụ lục IX, hình 9B.



Hình 3.19. Điện di đồ sản phẩm sau khi được xử lý với enzyme *HpaI* một số mẫu đại diện

M: Marker 100bp, 1-6: Sản phẩm xử lý bằng enzyme *HpaI* của của 6 mẫu PCR tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-6

Bên cạnh đó, kết quả trình tự gen *SLC2A9* rs16890979 được kiểm tra lại bằng phương pháp giải trình tự Sanger theo mỗi ngược (hình 3.20). Các kết quả còn lại được thể hiện đầy đủ trong phần phụ lục IX, hình 9D.



Hình 3.20. Trình tự nucleotide 2 mẫu có kiểu gen GG và GA của đa hình SLC2A9 rs16890979

b) Xác định thành phần kiểu gen đa hình SLC2A9 rs16890979

Sản phẩm khuếch đại của mẫu nghiên cứu sau khi cắt bằng enzyme HpaI được kiểm tra trên gel agarose 3% bằng phương pháp điện di. Theo tính toán ban đầu, mẫu có kiểu gen TT sẽ thu được 1 băng DNA (259 bp), mẫu có kiểu gen CC điện di thu được 2 băng (239, 20 bp) và mẫu có kiểu gen CT cho 3 băng DNA (259, 239 và 20 bp). Kết quả xác định thành phần đa hình rs16890979 của mẫu được ghi nhận bên dưới (bảng 3.16). Đa hình gen rs16890979 được phân bố theo định luật Hardy-Weinberg.

Bảng 3.16. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele của SLC2A9 rs16890979

	Kiểu gen			Allele		Giá trị p	HWE
	CC	CT	TT	C	T		
Nhóm chứng	338 (0,96)	13 (0,04)	00 (0,0)	0,982	0,018	0,978	+
Nhóm bệnh	167 (0,98)	03 (0,02)	00 (0,0)	0,991	0,009	0,657	+
Tổng số	505 (0,97)	16 (0,03)	00 (0,0)	0,985	0,015	0,956	+

HWE: Cân bằng Hardy-Weinberg; (+): Tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg.

Dựa trên kết quả bảng 3.16, chúng tôi thấy phân bố kiểu gen và tần số allele của SLC2A9 rs16890979 trong mẫu nghiên cứu tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg. Các phép kiểm thống kê cho thấy không có sự chênh lệch có ý nghĩa thống kê giữa 2 nhóm bệnh và nhóm chứng về tỉ lệ kiểu gen và tần số allele của đa hình

c) *Phân tích mối tương quan giữa SLC2A9 rs16890979 với bệnh gút*

Do kiểu gen TT không ghi nhận được trường hợp nào nên chúng tôi tiến hành khảo sát mối tương quan giữa tỉ lệ kiểu gen và tần số allele của rs16890979 với nguy cơ mắc bệnh gút ở mô hình trội. Các kết quả được thể hiện ở bên dưới (bảng 3.17).

Bảng 3.17. Kết quả đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs16890979 với bệnh gút

Kiểu	Nhóm chứng	Nhóm bệnh	OR	95%CI	Giá trị
Mô hình trội					0,843
CC	338 (96,4%)	167 (98,2%)	1,00		
CT	13 (3,6%)	03 (1,8%)	0,496	0,132 – 1,861	0,289
Allele					0,147
C	689 (98,2%)	337 (99,1%)	1,00		
T	13 (1,8%)	03 (0,9%)	0,5	0,087 – 2,027	0,381

(n, %): Số lượng cá thể (phần trăm); OR: Tỉ số odds; 95% CI: Khoảng tin cậy 95%

Sau khi phân tích, chúng tôi thấy kết quả phân tích ở mô hình trội và kiểu allele đa hình đều có p lớn hơn 0,05. Vì vậy, không có sự liên quan giữa tỉ lệ kiểu gen, tần số allele của đa hình rs16890979 và nguy cơ mắc bệnh gút ở quần thể nghiên cứu.

d) *Đánh giá tương quan giữa đa hình rs16890979 với một số chỉ số lâm sàng*

Chúng tôi tiếp tục khảo sát mối tương quan giữa kiểu gen của rs16890979 với các chỉ số lâm sàng của bệnh gút. Các kết quả được trình bày bên dưới (bảng 3.18).

Chúng tôi ghi nhận mức nồng độ triglyceride là cao hơn ở người bệnh mang kiểu gen CC so với người bệnh mang kiểu gen CT. Trong khi đó, nồng độ creatinine ở nhóm có kiểu gen CC thấp hơn. Tuy sự khác biệt về chỉ số sinh hóa máu giữa 2 kiểu gen là tương đối nhỏ, nhưng có ý nghĩa thống kê (với p lần lượt là 0,007 và 0,046 với nồng độ triglyceride và creatinine) (bảng 3.18).

Điều này cho thấy có sự tương quan giữa biến thiên kiểu gen của rs16890979 với triglycerid và creatinine ở nhóm bệnh nhân gút.

Bảng 3.18. Tương quan giữa đa hình gen rs16890979 với một số chỉ số lâm sàng

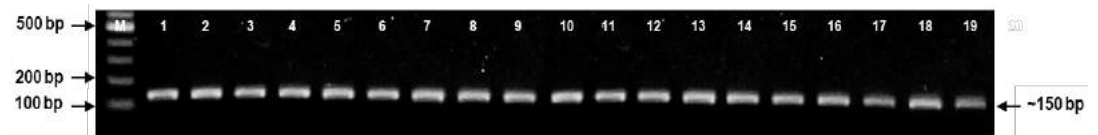
<i>SLC2A9</i> <i>rs16890979</i>	Kiểu gen		Giá trị p
	CC (n=505)	CT (n=16)	
Acid uric	5,69±4,11	4,83±3,96	0,5217
BMI	23,72±3,41	22,61±3,77	0,6322
CRP (mg/dL)	4,99±1,03	1,47±0,37	0,2884
HDL-c (mg/dL)	42,81±18,72	43,88±13,92	0,1894
LDL-c (mg/dL)	126,17±28,74	129,32±48,82	0,3629
Triglyceride	275,57±203,30	263,10±172,03	0,007
Glucose máu	119,10±32,66	110,76±31,78	0,2362
AST (U/L)	26,90±19,45	27,07±20,30	0,9270
ALT (U/L)	30,83±21,32	32,79±26,83	0,4267
BUN (mg/dL)	25,01±10,82	25,89±9,07	0,324
Creatinin	1,11±0,31	1,14±0,37	0,046
WBC (/μL)	7372±2077	7610±2224	0,789

Mean ± SD: Giá trị trung bình cộng ± độ lệch chuẩn; n (%): Số lượng cá thể (%); phép kiểm t-test so sánh giá trị trung bình giữa 2 nhóm

3.1.9. Đánh giá tương quan của rs1800629 gen *TNFA* và bệnh gút

a) Xác định kiểu gen đa hình *TNFA* rs1800629

Vùng DNA có chứa đa hình rs1800629 trên gen *TNFA* được khuếch đại đặc hiệu bằng phản ứng PCR. Sản phẩm sau đó được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1%. Hình ảnh điện di cho thấy tất cả các mẫu đã được khuếch đại trình tự đặc hiệu thành công, kích thước băng điện di phù hợp với tính toán ban đầu (hình 3.21). Phụ lục X, hình 10A trình bày đầy đủ các kết quả còn lại.

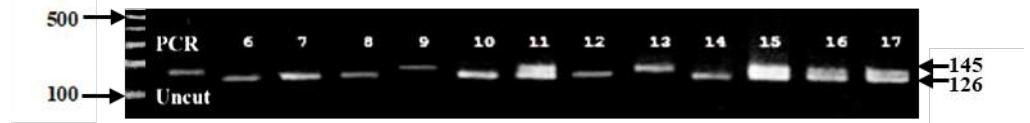


Hình 3.21. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại vùng trình tự đích

chứa đa hình TNFa rs1800629

M: Marker 100bp, 1-19: Sản phẩm khuếch đại của 19 mẫu DNA tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-19

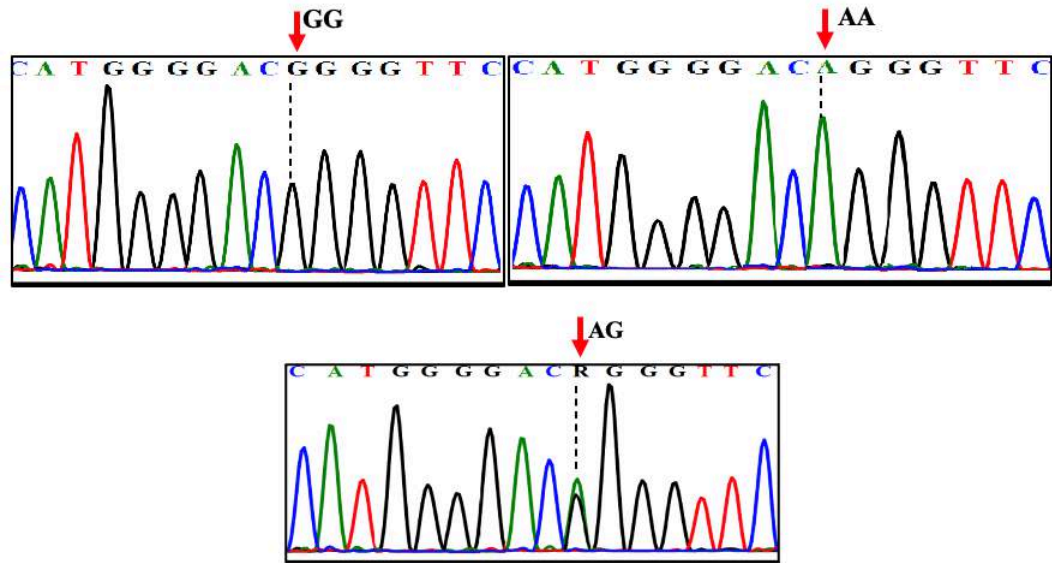
Sản phẩm khuếch đại được xử lý trong 5 giờ với enzyme *NcoI* ở nhiệt độ 65°C, sau đó được kiểm tra trên gel agarose 3% với phương pháp điện di. Từ số lượng các băng DNA thu được, xác định kiểu gen đa hình. Một phần kết quả điện di được trình bày trong hình 3.22. Các kết quả còn lại được bổ sung đầy đủ trong phần phụ lục X, hình 10B.



*Hình 3.22. Điện di đồ sản phẩm sau khi cắt bằng enzyme *NcoI* của một số mẫu đại diện*

*UC: Sản phẩm PCR không xử lý bằng enzyme *NcoI*, 6-17: Sản phẩm xử lý bằng enzyme *NcoI* của 12 mẫu PCR tương ứng với ký hiệu mẫu từ 6-17*

Bên cạnh việc xác định thành phần kiểu gen bằng phương pháp RFLP, phương pháp xác định trình tự nucleotide đoạn DNA quan tâm được tiến hành song song nhằm khẳng định độ tin cậy của phương pháp RFLP đã được sử dụng trước đó. Kết quả giải trình tự Sanger các đoạn DNA chứa đa hình rs1800629 trùng khớp với kết quả RFLP. Ba kiểu gen cơ bản của đa hình rs1800629 được trình bày trong hình 3.23. Kết quả của những mẫu còn lại được bổ sung trong phần phụ lục X, hình 10D.



Hình 3.23. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen GG, AA và AG của đa hình TNF α rs1800629

b) Xác định thành phần kiểu gen đa hình TNF α rs1800629

Theo tính toán ban đầu, sản phẩm cắt của kiểu gen AA sẽ thu được 1 băng DNA có kích thước 145 bp, mẫu có kiểu gen GG điện di thu được 2 băng (126, 19 bp) và mẫu có kiểu gen GA cho 3 băng DNA (145, 126 và 19 bp). Số lượng mẫu mang các kiểu gen tương ứng và tần số allele trong đa hình rs1800629 của 521 mẫu được mô tả chi tiết trong bảng 3.19.

Bảng 3.19. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele đa hình rs1800629

	Kiểu gen			Allele		Giá trị p	HWE
	GG	GA	AA	G	A		
Nhóm chứng	239 (0,68)	101 (0,29)	11 (0,03)	0,825	0,175	0,9339	+
Nhóm bệnh	117 (0,69)	48 (0,28)	5 (0,03)	0,832	0,168	0,9771	+
Tổng số	356 (0,68)	149 (0,29)	16 (0,03)	0,827	0,173	0,9319	+

HWE: Cân bằng Hardy-Weinberg; "+": Tuân theo định luật cân bằng HWE.

Kết quả phân tích thống kê Chi-square ở cả hai nhóm bệnh và chứng và trên tổng thể nhóm nghiên cứu: phân bố kiểu gen và tần số allele của TNF α rs1800629 tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg với giá trị p > 0,05.

c) Phân tích mối tương quan giữa TNFa rs1800629 với bệnh gút

Do sự phân ly của allele của đa hình rs1800629 tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weiberg do đó, trong quá trình phân tích mối tương quan kiểm định Chi-square sẽ được áp dụng. Kết quả phân tích được trình bày chi tiết trong bảng 3.20.

Bảng 3.20. Kết quả đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs1800629 với bệnh gút

Kiểu gen	Nhóm chứng	Nhóm bệnh	OR	95%CI	Giá trị p
Mô hình cộng gộp					0,983
GG	239 (68,1%)	117 (68,8%)	1,00		
GA	101 (28,8%)	48 (28,2 %)	1,03	0,68 - 1,55	0,564
AA	11 (3,1%)	5 (3,0%)	1,08	0,37 - 3,17	0,783
Mô hình trội					0,467
GG	239 (68,1%)	117 (68,8%)	1,00		
GA + AA	112 (31,9%)	53 (31,2%)	1,03	0,70 - 1,53	0,866
Mô hình lặn					0,513
GG + GA	340 (96,9%)	165 (97,0%)	1,00		
AA	11 (3,1%)	5 (3,0%)	1,07	0,36 - 3,12	0,905
Mô hình đồng trội					0,742
GG + AA	250 (71,2%)	122 (71,8%)	1,00		
GA	101 (28,8%)	48 (28,2 %)	1,01	0,58 - 1,25	0,454
Allele					0,811
G	579 (82,5%)	282 (82,9%)	1,00		
A	123 (17,5%)	58(17,1%)	1,05	0,51 - 2,42	0,954

(n, %): Số lượng cá thể (phần trăm); OR: Tỷ số odds; 95% CI: Khoảng tin cậy 95%

Bảng 3.20 cho thấy, không có sự khác biệt về tần số xuất hiện của các allele hay các kiểu gen trong cả 3 mô hình với giá trị p đều lớn hơn 0,05. Vì vậy, trong nghiên cứu này, đa hình rs1800629 không liên quan đến bệnh gút ở quần thể người Việt. Kết quả này tương đồng với kết quả nghiên cứu trước đó trên nhóm người Đài Loan [117].

d) *Đánh giá tương quan giữa đa hình rs1800629 với một số chỉ số lâm sàng*

Kết quả thống kê để đánh giá tương quan giữa đa hình rs1800629 với một số chỉ số lâm sàng được trình bày chi tiết trong bảng 3.21.

Đối với tất cả các chỉ tiêu khảo sát, không có sự khác biệt giữa nhóm người mắc bệnh gút và nhóm người bình thường với giá trị p lớn hơn 0,05. Vì vậy, đa hình này mang tính chất ngẫu nhiên, xuất hiện đồng thời ở cả người bình thường và người bệnh. Không có mối liên quan giữa đa hình rs1800629 với các chỉ số lâm sàng với bệnh gút.

Bảng 3.21. Đánh giá tương quan giữa đa hình rs1800629 với chỉ số lâm sàng

<i>TNFα</i> <i>rs1800629</i>	Kiểu gen			Giá trị p*
	GG (n=356)	GA (n=149)	AA (n=16)	
Acid uric	7,83±1,93	7,54±1,95	7,09±1,92	0,1348
BMI	24,52±11,12	24,65±3,46	24,48±3,06	0,5211
CRP (mg/dL)	6,35±46,26	4,42±5,00	4,80±5,27	0,8737
HDL-c (mg/dL)	46,06±13,74	49,69±32,42	48,75±12,28	0,2006
LDL-c (mg/dL)	120,08±35,28	124,88±40,40	121,47±40,80	0,4944
Triglyceride	228,13±131,13	235,60±175,92	229,83±163,04	0,8991
Glucose	111,67±30,09	114,72±49,75	116,13±41,05	0,6564
AST (U/L)	29,24±25,02	25,72±10,50	28,06±16,73	0,2598
ALT	33,19±25,35	31,58±20,15	34,44±22,71	0,7622
BUN (mg/dL)	25,95±13,08	25,60±10,77	26,46±6,97	0,9397
Creatinine	1,09±0,25	1,09±0,16	1,10±0,24	0,9760
WBC (trên μ L)	7701±2434	7482±1962	8368±2136	0,2882

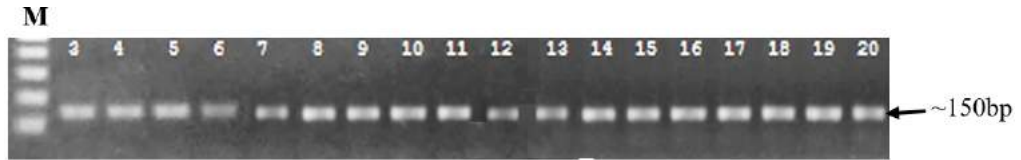
*Mean \pm SD: Giá trị trung bình cộng \pm độ lệch chuẩn; n (%): Số lượng cá thể (%); * phép kiểm one-way ANOVA so sánh giá trị trung bình giữa 3 nhóm.*

3.1.10. Đánh giá tương quan của rs2149356 gen TLR4 và bệnh gút

a) Xác định kiểu gen của đa hình TLR4 rs2149356

Kết quả PCR nhân đoạn DNA đặc hiệu chứa điểm đa hình rs2149356 được kiểm tra bằng điện di trên agarose 1%. Với hình ảnh băng điện di duy nhất, có kích thước trùng với lý thuyết và rõ nét, điều này chứng tỏ chúng tôi đã thành công khuếch đại đoạn DNA quan tâm trên mẫu nghiên cứu. Một số

hình ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR được trình bày trong hình 3.24. Kết quả điện di sản phẩm PCR của toàn bộ các mẫu được thể hiện trong phụ lục XI, hình 11A.



Hình 3.24. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại vùng trình tự đích chứa đa hình *TLR4* rs2149356 trên một số mẫu đại diện 3-20: Sản phẩm khuếch đại của 18 mẫu DNA tương ứng với ký hiệu mẫu từ 3-20

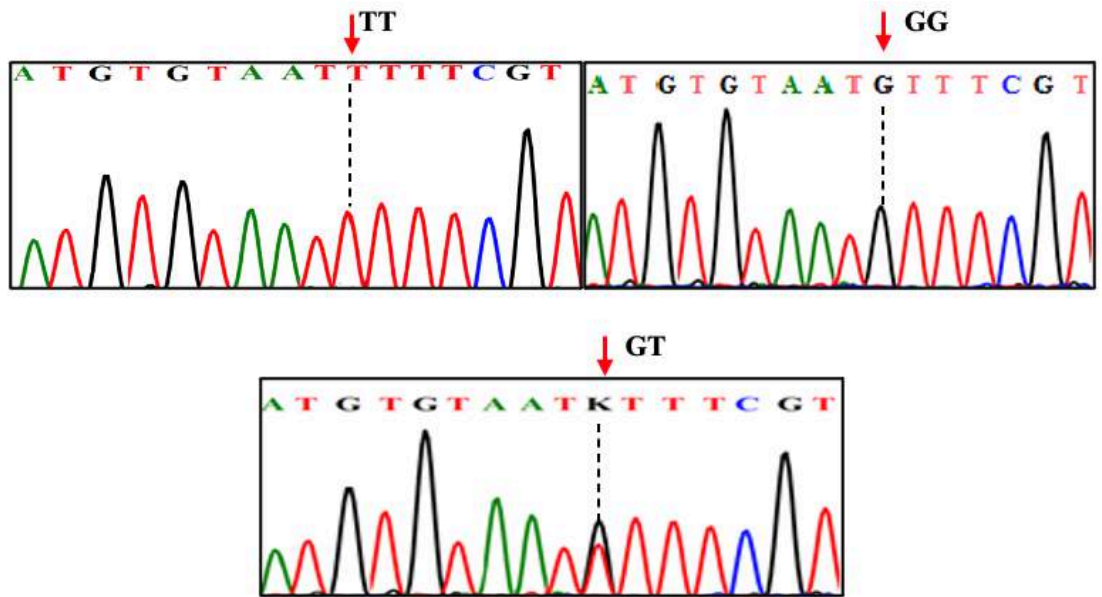
Với hình ảnh sáng rõ nét, sản phẩm PCR sẽ được chúng tôi xử lý với enzyme *HinfI* ở 65°C trong thời gian 5 giờ. Kết quả của phản ứng được thể hiện trên gel agarose 3%. Số lượng và kích thước các dải trình tự phản ánh kiểu gen trong các mẫu nghiên cứu. Một phần kết quả phản ứng cắt với enzyme *HinfI* được trình bày trong hình 3.25. Các kết quả còn lại được cung cấp đầy đủ trong phần phụ lục XI, hình 11B.



Hình 3.25. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại sau khi được xử lý với men cắt *HinfI* một số mẫu đại diện

UC: Sản phẩm PCR không lý bằng enzyme *HinfI*, 1-16: Sản phẩm xử lý bằng enzyme *HinfI* của 16 mẫu PCR tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-16

Chúng tôi đồng thời tiến hành kiểm tra lại sản phẩm xác định kiểu gen của đa hình *TLR4* rs2149356 bằng phương pháp giải trình tự Sanger. Ba kiểu gen của đa hình này được trình bày ở hình 3.26. Sản phẩm giải trình tự những mẫu còn lại được trình bày đầy đủ trong phần phụ lục XI, hình 11D.



Hình 3.26. Trình tự nucleotide của các mẫu đại diện có kiểu gen TT, GG và GT của đa hình TLR4 rs2149356

b) Xác định thành phần kiểu gen đa hình TLR4 rs2149356

Sản phẩm PCR của 521 mẫu nghiên cứu sau khi cắt bằng enzyme *Hinf*I được kiểm tra bằng kỹ thuật điện di trên gel agarose 3%. trên lý thuyết, mẫu có kiểu gen TT sẽ thu được 1 dải DNA (157 bp), mẫu có kiểu gen GG điện di thu được 2 băng (134, 23 bp) và mẫu có kiểu gen GT cho 3 băng DNA (157, 134 và 23 bp). Kết quả xác định kiểu gen và tần số allele rs2149356 của 521 trường hợp được ghi nhận bên dưới (bảng 3.22).

Bảng 3.22. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele đa hình rs2149356

	Kiểu gen			Allele		Giá trị p	HWE
	GG	GT	TT	G	T		
Nhóm chứng	155 (0,44)	157 (0,45)	39 (0,11)	0,665	0,335	0,936	+
Nhóm bệnh	74 (0,44)	77 (0,45)	19 (0,11)	0,662	0,338	0,879	+
Tổng số	229 (0,44)	234 (0,45)	58 (0,11)	0,664	0,336	0,878	+

HWE: Cân bằng Hardy-Weinberg; “+”: Tuân theo định luật cân bằng HWE.

Chúng tôi ghi nhận từ kết quả thống kê về kiểu gen và tần số allele đa hình rs2149356 cho thấy tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg. Kết quả ghi nhận sự xuất hiện với tần số cao của allele hiếm T.

c) Phân tích sự tương quan giữa bệnh gút và TLR4 rs2149356

Kết quả số lượng tần số allele và kiểu gen sử dụng để phân tích mối tương quan giữa rs2149356 với bệnh gút. (bảng 3.23)

Các giá trị p từ các mô hình phân tích đều lớn hơn mức ý nghĩa 0,05. Do đó, trong nghiên cứu này, không ghi nhận mối liên quan giữa đa hình rs2149356 và nguy cơ mắc bệnh gút ở quần thể người Việt trong mẫu nghiên cứu.

Bảng 3.23. Kết quả đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs2149356 với bệnh gút

Kiểu gen	Nhóm chứng	Nhóm bệnh	OR	95%CI	Giá trị p
Mô hình cộng gộp					0,991
GG	155 (44,2%)	74 (43,5%)	1,00		
GT	157 (44,7%)	77 (45,3%)	0,99	0,87 – 1,12	0,918
TT	39 (11,1%)	19 (11,2%)	0,98	0,53 – 1,81	0,864
Mô hình trội					0,744
GG	155 (44,2%)	74 (43,5%)	1,00		
GT + TT	196 (55,8%)	96 (56,5%)	0,97	0,67 – 1,81	0,892
Mô hình lặn					0,834
GG + GT	312 (88,9%)	151 (88,8%)	1,00		
TT	39 (11,1%)	19 (11,2%)	1,04	0,58 – 1,86	0,982
Mô hình đồng trội					0,704
GG + TT	194 (55,3%)	93 (54,7%)	1,00		
GT	157 (44,7%)	77 (45,3%)	0,89	0,67 – 1,01	0,718
Allele					0,844
G	467 (66,5%)	225 (66,2 %)	1,00		
T	235 (33,5%)	115 (33,8%)	0,99	0,64 – 1,34	0,959

(n, %): Số lượng (phần trăm); OR: Tỷ số odds; 95% CI: Khoảng tin cậy 95%

Các kết quả thu được trái ngược với kết quả của một số nghiên cứu khác. Cụ thể, trong nghiên cứu của Qing và các cộng sự, sự xuất hiện allele T của rs2149356 làm tăng nguy cơ mắc bệnh gút (OR=1,42; 95%CI: 1,20 - 1,69; $p=4 \times 10^{-5}$) [96]. Trong một nghiên cứu khác, sự xuất hiện của allele này lại gây ra ảnh hưởng trái ngược trên 2 quần thể: gây tăng nguy cơ xuất hiện bệnh gút ở chủng Caucasian (OR=1,12; $p=0,012$) nhưng lại làm giảm nguy cơ ở người Polynesian ở New Zealand (OR=0,80; $p=0,011$) [97]. Sự khác biệt về sự liên quan của allele này với bệnh gút ở các quần thể được giải thích do có sự khác biệt về chế độ dinh dưỡng cũng như lối sống, bản chất di truyền giữa các quần thể. Ngoài ra, trong nghiên cứu này, nhóm tác giả cũng không ghi nhận tương quan của rs2149356 với các yếu tố khác thuộc về lâm sàng của bệnh.

d) *Mối tương quan giữa đa hình rs2149356 với một số chỉ số lâm sàng*

Nhóm nghiên cứu cũng tiến hành đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs2149356 với các tình trạng lâm sàng và chỉ số cận lâm sàng tuy nhiên không ghi nhận bất kỳ sự liên quan nào giữa allele này với các yếu tố khảo sát (bảng 3.24).

Bảng 3.24. Đánh giá tương quan giữa đa hình rs2149356 với chỉ số lâm sàng

TLR4 rs2149356	Kiểu gen			Giá trị p*
	GG (n=229)	GT (n=234)	TT (n=58)	
Acid uric	7,71±1,96	7,69±1,96	7,89±1,80	0,7747
BMI	24,45±3,78	24,73±3,00	24,54±3,00	0,6815
CRP	3,94±4,22	7,84±8,98	4,52±8,69	0,5390
HDL-c	46,15±11,87	48,33±27,62	46,54±15,96	0,5184
LDL-c	123,56±41,59	121,73±38,11	122,53±35,06	0,8832
Triglyceride	227,88±144,74	233,80±180,11	240,52±146,43	0,8470
Glucose máu	112,96±40,16	112,59±33,78	111,84±37,08	0,9784
AST	29,15±26,58	27,68±17,33	26,61±15,26	0,6499
ALT	33,17±25,98	32,31±22,76	33,08±19,57	0,9248
BUN	25,81±13,67	25,80±11,00	26,37±11,79	0,9481
Creatinin	1,09±0,25	1,08±0,19	1,13±0,28	0,3426
WBC	7631±2470	7660±2152	7774±2239	0,9163

Mean ± SD: Giá trị trung bình cộng ± độ lệch chuẩn; n (%): Số lượng cá thể (%);

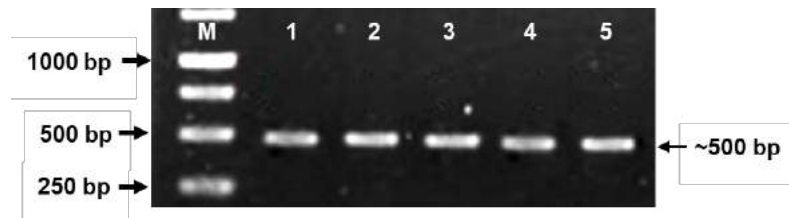
** phép kiểm one-way ANOVA so sánh giá trị trung bình giữa 3 nhóm.*

Chúng tôi không tìm được mối liên quan nào giữa đa hình rs2149356 với các chỉ số lâm sàng đã khảo sát ($p > 0.05$). Điều này phù hợp với kết quả không tương quan giữa allele này với bệnh gút (phía trên, bảng 3.23), phù hợp với kết quả của các tác giả từ New Zealand [97]. Tuy nhiên kết quả của chúng tôi lại không thống nhất với kết quả từ nghiên cứu trên quần thể người Hán [78].

3.1.11. Đánh giá tương quan của rs1165196 gen *SLC17A1* và bệnh gút

a) Xác định kiểu gen của đa hình *SLC17A1* rs1165196

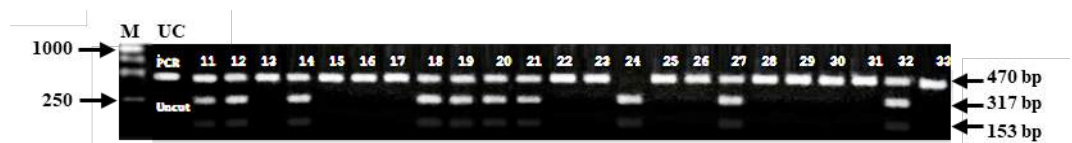
Nhóm nghiên cứu đã sử dụng PCR để khuếch đại đặc hiệu vùng có chứa đa hình rs1165196 trên gen *SLC17A1*. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%. Tất cả trình tự đặc hiệu của mẫu đều được chúng tôi khuếch đại thành công, kích thước của dải điện di phù hợp với những tính toán từ lý thuyết. Kết quả điện di sản phẩm PCR một số mẫu đại diện được trình bày trong hình 3.27. Sản phẩm điện di PCR của các mẫu còn lại được trình bày tại phần phụ lục XII, hình 12A.



Hình 3.27. Điện di đồ sản phẩm khuếch đại vùng trình tự đích chứa đa hình *SLC17A1* rs1165196 một số mẫu đại diện

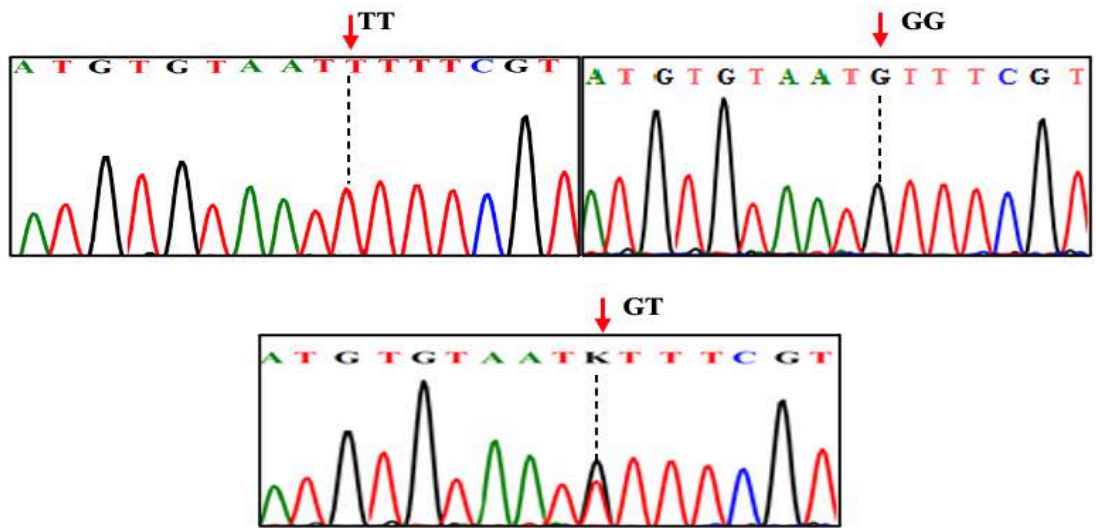
1-5: Sản phẩm khuếch đại của 5 mẫu DNA tương ứng với ký hiệu mẫu từ 1-5

Sản phẩm thu được sau phản ứng PCR sẽ được xử lý với enzyme *TspRI* ở 65°C trong 5 giờ. Thành phẩm sau phản ứng cắt được điện di trên gel agarose 3%. Số lượng và kích thước các băng DNA trong giếng điện di sẽ phản ánh kiểu gen tương ứng. Kết quả đa hình các băng DNA trong hình 3.28 phản ánh sự đa dạng trong kiểu gen trong đa hình rs1165196 nghiên cứu. Kết quả điện di đầy đủ của 521 mẫu được trình bày đầy đủ trong phụ lục XII, hình 12B.



Hình 3.28. Điện di đồ sản phẩm PCR sau khi xử lý với enzyme *TspRI*
UC: Sản phẩm PCR không xử lý bằng enzyme *TspRI*, 11-33: Sản phẩm xử lý bằng enzyme *TspRI* của 23 mẫu PCR tương ứng với ký hiệu mẫu từ 11-33

Bên cạnh đó, chúng tôi sử dụng phương pháp giải trình tự Sanger kiểm tra lại kết quả xác định kiểu gen *SLC17A1* rs1165196. Phản ứng này được sử dụng với mỗi ngược. Ba kiểu gen cơ bản của đa hình rs1165196 được trình bày trong hình 3.29. Kết quả trình tự những mẫu còn lại được trình bày đầy đủ trong phụ lục XII, hình 12D.



Hình 3.29. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen GG, AA và GA của đa hình *SLC17A1* rs1165196

b) Xác định thành phần kiểu gen đa hình *SLC17A1* rs1165196

Theo tính toán lý thuyết, mẫu có kiểu gen AA sẽ thu được 1 băng DNA (470 bp), mẫu có kiểu gen GG điện di thu được 2 băng (317, 153 bp) và mẫu có kiểu gen AG cho 3 băng DNA (470, 317 và 153 bp). Số lượng và tỷ lệ phần trăm kiểu gen và tần số allele của đa hình rs72552713 của 521 mẫu được mô tả chi tiết trong bảng 3.25.

Bảng 3.25. Bảng thống kê kiểu gen và tần số allele của đa hình *SLC17A1* rs1165196

	Kiểu gen			Allele		Giá trị P	HWE
	AA	AG	GG	A	G		
Nhóm chứng	189 (0,54)	144 (0,41)	18 (0,05)	0,744	0,256	0,1552	+
Nhóm bệnh	107 (0,63)	57 (0,33)	06 (0,04)	0,797	0,203	0,6215	+
Tổng số	296 (0,57)	201 (0,39)	24 (0,04)	0,761	0,239	0,1619	+

HWE: Cân bằng Hardy-Weinberg; “+”: Tuân theo định luật cân bằng HWE.

Chúng tôi ghi nhận kiểu gen và tần số các allele của đa hình *SLC17A1* rs1165196 tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg. Qua Bảng 3.25, có thể thấy allele A xuất hiện phổ biến ở quần thể nghiên cứu với tần số là 0,761.

c) Phân tích mối tương quan giữa *SLC17A1* rs1165196 với bệnh gút

Chúng tôi tiến hành phân tích sự tương quan giữa *SLC17A1* rs1165196 và bệnh gút. Các kết quả được trình bày bên dưới (bảng 3.26).

Bảng 3.26. Kết quả đánh giá sự tương quan giữa đa hình rs1165196 với bệnh gút

Kiểu gen	Nhóm chứng	Nhóm bệnh	OR	95%CI	Giá trị p
Mô hình cộng gộp					0,301
AA	189 (53,8%)	107 (62,9%)	1,00		
AG	144 (41,0%)	57 (33,5%)	0,706	0,479 – 1,040	0,078
GG	18 (5,2%)	06 (3,6%)	0,594	0,229 - 1,543	0,285
Mô hình trội					0,103
AA	189 (53,8%)	107 (62,9%)	1,00		
AG + GG	162 (46,2%)	63 (37,1%)	0,693	0,476 - 1,010	0,056
Mô hình lặn					0,608
AA + AG	333 (94,8%)	164 (96,4%)	1,00		
GG	18 (5,2%)	06 (3,6%)	0,681	0,265 - 1,748	0,422
Mô hình đồng trội					0,703
AA + GG	207 (59,0%)	113 (66,5%)	1,00		
AG	144 (41,0%)	57 (33,5%)	0,416	0,327 - 1,140	0,358
Allele					0,557
A	522 (74,4%)	271 (79,7%)	1,00		
G	180 (25,6%)	69 (20,3%)	0,744	0,543 - 1,02	0,311

(n, %): Số lượng cá thể (phần trăm); OR: Tỷ số odds; 95% CI: Khoảng tin cậy 95%

Từ kết quả phân tích thống kê, chúng tôi không ghi nhận mối liên quan giữa đa hình rs1165196 và nguy cơ mắc bệnh gút ở cả ba mô hình ($p > 0,05$). Hiện chưa có nhiều công trình công bố về đa hình gen này với tình trạng gút. Tuy nhiên, phát hiện của chúng tôi góp phần vào những hiểu biết về kiểu gen đa hình này tại Việt Nam cũng như cho dân châu Á.

d) Đánh giá tương quan giữa đa hình rs1165196 (A>G) với một số chỉ số lâm sàng

Chúng tôi cũng khảo sát mối liên quan giữa đa hình rs1165196 với các yếu tố lâm sàng và chỉ số cận lâm sàng. Bảng 3.27 thể hiện sự tương quan này.

Sau khi phân tích, nhóm nghiên cứu không ghi nhận mối liên quan nào giữa đa hình rs1165196 ($p > 0,05$) với các chỉ số lâm sàng được liệt kê trong bảng trên. Việc không tìm được liên quan giữa đa hình gen này với các yếu tố

lâm sàng có thể do nhiều yếu tố liên quan quan trọng hơn là với protein vận chuyển urat do đa hình gen này đảm nhiệm.

Bảng 3.27. Đánh giá tương quan giữa đa hình rs1165196 với chỉ số lâm sàng

<i>SLC17A1</i> <i>rs1165196</i>	Kiểu gen			Giá trị p*
	AA (n=296)	AG (n=201)	GG (n=24)	
Acid uric (mg/dL)	7,86±1,96	7,53±1,88	7,63±2,09	0,1707
BMI	24,66±3,39	24,64±3,26	23,27±3,73	0,1457
CRP (mg/dL)	7,59±51,06	3,54±3,78	2,27±2,21	0,4686
HDL-c (mg/dL)	45,56±13,15	49,41±28,88	47,96±12,70	0,1294
LDL-c (mg/dL)	123,41±39,13	122,05±39,93	118,00±37,20	0,7831
Triglyceride	230,39±139,58	237,05±193,42	208,06±109,25	0,6877
Glucose máu	113,40±41,68	112,45±31,17	105,83±16,70	0,6268
AST (U/L)	28,18±20,53	28,30±24,17	27,71±11,98	0,9917
ALT (U/L)	33,42±23,61	32,15±24,88	30,16±18,45	0,7281
BUN (mg/dL)	25,18±12,53	27,06±12,45	24,20±6,60	0,2024
Creatinin	1,09±0,23	1,09±0,23	1,03±0,11	0,4524
WBC (trên μ L)	7749±2121	7538±2281	7594±4049	0,6028

Mean \pm SD: Giá trị trung bình cộng \pm độ lệch chuẩn; n (%): Số lượng cá thể (%);

** phép kiểm one-way ANOVA so sánh giá trị trung bình giữa 3 nhóm.*

3.1.12. Tương quan giữa đặc điểm lâm sàng và chỉ số cận lâm sàng với bệnh gút

a) *Đánh giá tương quan giữa các chỉ số xét nghiệm sinh hoá với bệnh gút*

Nhóm nghiên cứu sử dụng mô hình hồi quy đơn biến để khảo sát mối liên quan giữa các chỉ số cận lâm sàng với tình trạng bệnh gút sử dụng (Bảng 3.28).

Bảng 3.28. Kết quả đánh giá sự tương quan giữa chỉ số cận lâm sàng và bệnh gút

Bệnh gút	OR	95%CI	Giá trị p
CRP (mg/dL)	1,04	1,00 - 1,07	0,030
BUN (mg/dL)	0,99	0,978 - 1,007	0,269
Creatinin	1,95	0,87 - 4,36	0,103
AST (U/L)	1,00	0,99 - 1,01	0,570
ALT (U/L)	1,00	0,99 - 1,01	0,316
HDL-c (mg/dL)	0,99	0,98 - 1,01	0,280
LDL-c (mg/dL)	1,005	1,000 - 1,009	0,040
Triglyceride	1,003	1,001 - 1,004	<0,001
Glucose	0,996	0,990 - 1,002	0,200

OR: Tỷ số odds; 95% CI: Khoảng tin cậy 95%.

Từ mô hình hồi quy đơn biến trên, chúng tôi ghi nhận có mối liên quan giữa yếu tố CRP, LDL-c và triglyceride với tình trạng bệnh gút ($p < 0,05$) ở cả 3 yếu tố này.

b) Phân tích tương quan giữa từng kiểu gen với tình trạng bệnh gút

sử dụng mô hình tương quan đơn biến để tìm mối liên quan giữa các biến số về đa hình gen được khảo sát với tình trạng bệnh gút (vì tình trạng mắc bệnh gút là dạng biến nhị biến) (bảng 3.29).

Riêng đa hình rs7932775 không tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg ở cả hai nhóm bệnh và chứng hay trên cả quần thể nghiên cứu nên chúng tôi không đưa vào phân tích

Các kết quả của phân tích đơn biến cho thấy các đa hình gen bao gồm rs72552713 và rs11231825 có liên quan đến bệnh gút, trong đó giá trị p đều $< 0,05$.

Bảng 3.29. Kết quả tương quan giữa từng kiểu gen với tình trạng bệnh gút

	Bệnh gút	OR	95%CI	Giá trị p
rs72552713	GA	1,00		
	GG	0,051	0,012 - 0,225	<0,001
rs12505410	GG	1,00		
	TG	0,885	0,588 - 1,331	0,557
	TT	1,202	0,703 - 2,054	0,502
rs11231825	CC	1,00		
	TC	3,297	1,231 - 8,829	0,018
	TT	3,723	1,411 - 9,826	0,008
rs12510549	CC	1,00		
	TC	1,392	1,036 - 4,129	0,517
	TT	1,463	1,221 - 5,836	0,698
rs1800629	AA	1,00		
	GA	1,022	0,336 - 3,113	0,969
	GG	1,086	0,369 - 3,197	0,881
rs16890979	CC	1,00		
	CT	0,496	0,132 - 1,861	0,289
rs2149356	TT	1,00		
	GT	0,987	0,533 - 1,826	0,967
	GG	0,941	0,507 - 1,746	0,847
rs1165196	GG	1,00		
	AG	0,678	0,458 - 1,002	0,051
	AA	0,581	0,224 - 1,509	0,265

OR: Tỷ số odds; 95%CI: Khoảng tin cậy 95%.

Tuy nhiên để kết luận chắc chắn hơn mối liên quan giữa các kiểu gen với tình trạng bệnh gút, chúng tôi tiến hành phân tích đa biến, các kết quả được trình bày trong phần tiếp theo bên dưới.

c) So sánh tương quan tổng hợp giữa các yếu tố đa hình gen và các chỉ số xét nghiệm sinh hóa với bệnh gút trong nghiên cứu

Sau khi khảo sát đơn biến, để xác định mối liên quan thực sự giữa các yếu tố với tình trạng bệnh gút, chúng tôi thực hiện đánh giá tương quan đa biến để kiểm soát tất cả các biến gây nhiễu.

Từ phân tích đa biến trong bảng 3.30 ghi nhận các yếu tố thực sự làm tăng nguy cơ bệnh gút:

+ Nồng độ CRP: mỗi đơn vị tăng thêm của CRP làm tăng nguy cơ bệnh gút với OR=1,036 (95%CI: 1,000 - 1,072; p=0,05).

+ Nồng độ triglyceride: mỗi đơn vị triglyceride (mg/dL) tăng thêm làm tăng nguy cơ bệnh gút với OR=1,003 (95%CI: 1,002 - 1,005; p<0,001).

Bảng 3.30. Tương quan đa biến giữa yếu tố đa hình gen và các chỉ số chuyển hóa với tình trạng bệnh gút

Bệnh gút	Tương quan đa biến		
	OR	95%CI	Giá trị p
CRP	1,036	1,000 – 1,072	0,05
Creatinin	2,089	0,857 – 5,095	0,105
LDL-c	1,002	0,996 – 1,007	0,489
Triglyceride	1,003	1,002 – 1,005	<0,001
Glucose	0,994	0,986 – 1,001	0,096
rs72552713			
GA	1,00		
GG	0,053	0,012 – 0,236	<0,001
rs11231825			
CC	1,00		
CT	3,119	1,122 – 8,669	0,029
TT	3,915	1,439 – 10,654	0,008

OR: Tỷ số odds; 95% CI: Khoảng tin cậy 95%.

Ngoài ra, có 2 đa hình gen thực sự có liên quan đến bệnh gút, với mức độ liên quan lần lượt như sau:

+ Đa hình rs72552713, trong đó kiểu allele GG có nguy cơ bệnh gút chỉ bằng 0,053 lần so với allele GA (OR=0,053; 95%CI: 0,012 - 0,236; p<0,001)

+ Đa hình rs11231825, trong đó các allele CT và TT có nguy cơ mắc bệnh gút cao hơn allele CC lần lượt là 3,119 lần (95%CI: 1,122 - 8,669; p=0,029) và 3,195 lần (95%CI: 1,439 - 10,654; p=0,008).

Các kết quả về mối tương quan giữa 2 đa hình gen này tương đồng với các nghiên cứu trên thế giới, điển hình như nghiên cứu meta-analysis của nhóm tác giả [118] khi phân tích tổng hợp 9 nghiên cứu về sự liên quan giữa gen rs72552713 và bệnh gút.

Đối với đa hình rs11231825, chúng tôi cũng tìm được kết quả liên quan với bệnh gút tương tự ở nghiên cứu với nhóm 900 đối tượng Hàn Quốc [119], mặc dù mối liên quan yếu hơn so với đa hình gen rs72552713.

3.2. Thảo luận

3.2.1. Đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của đối tượng nghiên cứu

Nghiên cứu của chúng tôi được thực hiện trên 521 người, gồm 351 người khỏe mạnh bình thường và 170 đối tượng bị bệnh gút. Tỷ lệ giới nam trong nhóm đối chứng là 100% và hơn 90% đối với nhóm đối chứng. Ở nhóm đối chứng với độ tuổi trung bình là 53,4, có khác biệt tương đối với nhóm bệnh là 51,6 ($p=0,0469$). Ngoài ra, BMI và cận nặng của nhóm chứng (cân nặng $65,75\pm 9,72$ kg và BMI $24,45\pm 3,54$) ghi nhận thấp hơn với nhóm bệnh ($p=0,038$) (bảng 3.1). Đây là những đặc điểm sơ khởi phản ánh đặc tính nền ban đầu của hai nhóm nghiên cứu. Sự khác biệt về giới tính, độ tuổi và cân nặng giữa nhóm đối chứng và nhóm bệnh nhân không gây ảnh hưởng đến tiêu chuẩn chọn mẫu. Ngược lại còn nâng cao độ tin cậy của các kết quả trong nghiên cứu.

Các yếu tố liên quan trực tiếp đến quá trình hình thành bệnh gút như nồng độ acid uric và acid uric máu (hyperuricemia) đều ghi nhận có khác biệt ở hai nhóm. Ở nhóm bệnh, nồng độ acid uric máu trung bình là $9,29\pm 1,81$, cao hơn 1,5 lần so với nhóm chứng $6,29\pm 1,51$ ($p<0,001$). Khi so với nhóm chứng, ghi nhận tỷ lệ các trường hợp có tăng acid uric máu ở nhóm bệnh là cao hơn nhóm chứng (92% so với 47%). Nồng độ acid uric máu trung bình ở nhóm bệnh cao hơn nhiều so với nồng độ acid uric trung bình trong máu ở mức dưới thông thường (7 mg/dL đối với nam và nhỏ hơn 6mg/dL đối với nữ) [112, 120]. Sự khác biệt này liên quan chặt chẽ đến giới tính và độ tuổi [114]. Sự gia tăng về độ tuổi tỷ lệ thuận với sự gia tăng nồng độ acid uric trong máu. Trong nghiên cứu này, tỷ lệ nam giới và độ tuổi trung bình của nhóm chứng cao hơn so với nhóm bệnh gút có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Do đó, những kết quả về nồng độ acid uric và tình trạng tăng acid uric khác biệt giữa 2 nhóm càng khẳng định sự khác biệt này là có ý nghĩa (ít nguy cơ sai lầm, dương tính giả).

Các chỉ tiêu định lượng khác như CRP, LDL-C và TG cũng cho kết quả khác biệt giữa nhóm bệnh và nhóm chứng (CRP= $4,96\pm 4,61$ mg/dL; LDL-c= $108,12 \pm 29,4$ mg/dL; TG= $184,2\pm 61,24$ mg/dL) với $p<0,05$. Ở nhóm bệnh

gút, các chỉ tiêu kể trên đều cao hơn đáng kể và có ý nghĩa thống kê. Ba chỉ số: nồng độ acid uric máu, LDL-C và TG, sự khác biệt này cũng phù hợp với các kết quả từ các nghiên cứu khác trên thế giới [3, 16] [115]. Tình trạng thừa cân (BMI cao) liên quan đến sự tăng nồng độ trung bình của acid uric [112], rối loạn mỡ máu bao gồm hoặc tăng triglyceride máu hoặc tăng thành phần LDL-cholesterol máu, dẫn đến nguy cơ bệnh gút càng tăng.

Chúng tôi cũng ghi nhận sự khác biệt về chỉ số C-reaction protein (CRP), đây là kết quả lần đầu được báo cáo theo sự ghi nhận của chúng tôi lần đầu được báo cáo. Chỉ số này phản ánh phản ứng viêm trong cơ thể, thể hiện rõ đặc tính mẫu được chọn lọc trong nghiên cứu. Do đó càng khẳng định độ tin cậy và sự chính xác của mẫu nghiên cứu cũng như kết quả từ nghiên cứu.

Kết quả so sánh các chỉ tiêu còn lại như chiều cao, nồng độ ALT, AST, BUN, CREA, DBP, SBP, GLU, HDL-C và WBC không cho thấy sự khác biệt giữa 2 nhóm bệnh - chứng ($p > 0,05$). Do đây là nhóm các chỉ tiêu không trực tiếp liên quan đến quá trình hình thành hoặc phát triển của bệnh. Do đó, sự tương đồng này phản ánh tính khách quan và chính xác trong quá trình chọn lọc mẫu nghiên cứu và phân tích. Giúp cho các kết luận trong nghiên cứu có độ tin cậy và chính xác cao.

3.2.2. Tương quan giữa đa hình gen *ABCG2* với bệnh gút

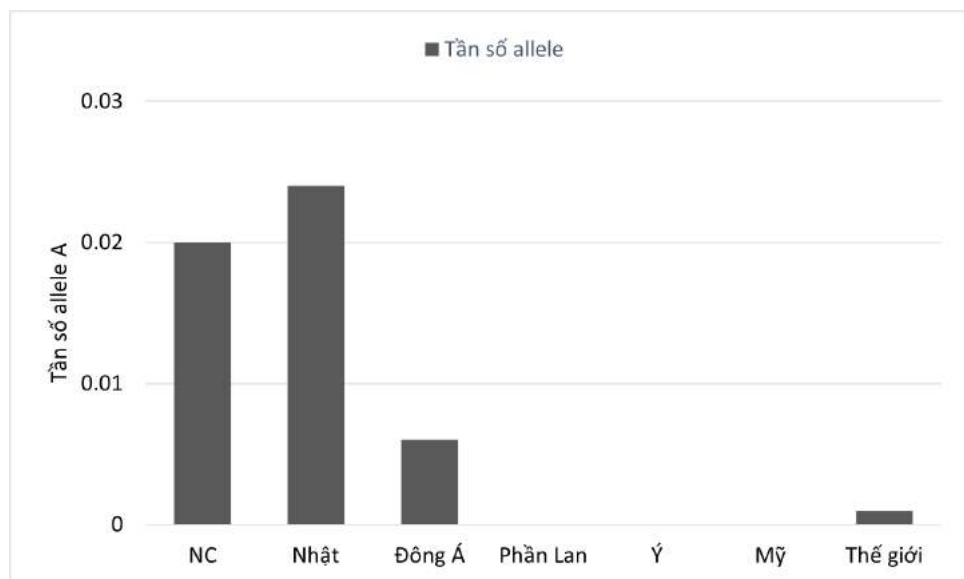
Gút là bệnh lý viêm các khớp gây ra bởi phản ứng miễn dịch với tinh thể urat lắng đọng trong dịch khớp [121]. Sự gia tăng nồng độ urat/acid uric máu là cần thiết, tuy nhiên chưa phải là điều kiện đủ để hình thành bệnh. Các yếu tố như vật chủ và yếu tố môi trường cũng đóng góp vào sự tiến triển của sự tăng nồng độ acid uric máu thành bệnh gút. Cho đến nay, có khoảng 30 locus gen, bao gồm cả nhóm gen *ABCG2* gây tác động đến quá trình kiểm soát nồng độ acid uric máu. Tuy nhiên đến nay vẫn chưa có dữ liệu nào làm sáng tỏ sự ảnh hưởng của gen đến quá trình hình thành các tinh thể urat và các phản ứng viêm sau đó. Đối với y học, liệu trình điều trị bệnh gút phụ thuộc vào sự đáp ứng của bệnh nhân với các thuốc giảm acid uric máu. Những loại thuốc này vẫn đang được phát triển liên tục và được sử dụng rộng rãi hiện nay. Mặc dù vậy, phương thức này chỉ có thể áp dụng được cho các đợt gút cấp. Vì vậy,

cần có thêm dữ kiện từ các nghiên cứu để phát triển các hướng điều trị khác hiệu quả hơn.

Protein ATP-binding cassette G2 được nghiên cứu lần đầu tiên trong mối liên quan đến các kiểu hình đề kháng đa thuốc phụ thuộc ATP trong điều trị một vài dòng ung thư vú [122]. Protein này chịu trách nhiệm tham gia vào quá trình trao đổi chất của tế bào, trong đó có acid uric [123, 124]. Gen mã hóa cho protein này biểu hiện phổ biến ở nhiều loại mô khác nhau. Vai trò vận chuyển tích cực acid uric thông qua ABCG2 mới được nghiên cứu gần đây [70, 125]. Một vài đột biến điểm trên gen này được báo cáo có ảnh hưởng trực tiếp đến mức độ biểu hiện của protein ABCG2, dẫn đến tình trạng rối loạn chu trình vận chuyển acid uric. Một số đột biến điển hình như V12M (rs2231137), Q141K (rs2231142) và ở người Đông Nam Á là Q126X (rs72552713).

a) Đa hình rs72552713 trên gen ABCG2

Kết quả so sánh với dữ liệu 1000 hệ gen thế giới (1000 Genomes Project) cho thấy tần số allele A của rs72552713 từ nghiên cứu này cũng tương đồng với các nghiên cứu ở Nhật Bản, nhưng cao hơn khi so với tần số ở các quốc gia châu Á khác, các nước Âu Mỹ và tần số chung của thế giới (Hình 3.30).



*Hình 3.30. Tần số allele A của rs72552713 so sánh với các quốc gia khác
NC: Tần số allele A trong nghiên cứu n*

Đa hình rs72552713 (G>A) dẫn đến sự biến đổi amino acid glutamine tại vị trí 126 trên chuỗi polypeptide thành một mã kết thúc sớm. Sự biến đổi

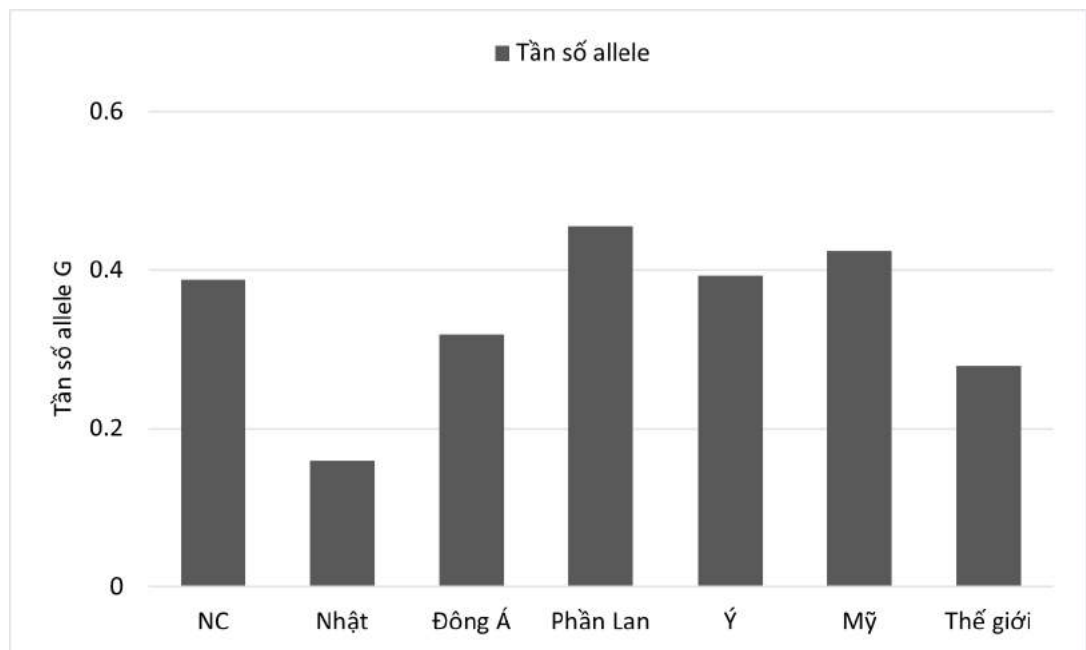
này làm rút ngắn chuỗi phân tử protein trong cơ thể. Đột biến Q126X xuất hiện phổ biến ở các quần thể Đông Nam Á và Nhật Bản [116]. Trong một nghiên cứu khác, đa hình rs72552713 có nguy cơ làm tăng khả năng mắc bệnh gút ở người châu Á (ở mô hình trội, OR=3,87, 95%CI: 2,07 - 7,24) [118]. Trong nghiên cứu này, allele G xuất hiện phổ biến trong khi đó allele A hiếm gặp hơn với tần số tương ứng là 0,98/0,02. Allele hiếm A xuất hiện chủ yếu ở nhóm bệnh với tần số cao gấp 29 lần so với nhóm chứng. Ngoài ra, trong toàn bộ mẫu nghiên cứu không phát hiện thấy các cá thể có kiểu gen AA. Với sự sai khác rõ rệt về mặt thống kê ở hai nhóm bệnh và chúng đã cho thấy sự xuất hiện của allele A có thể làm tăng nguy cơ xuất hiện bệnh gút (OR=21,19; 95%CI: 3,0 – 918,96; p=0,0000038). Kiểu gen GA cũng được ghi nhận làm tăng nguy cơ mắc bệnh gút hơn GG (OR=21,875; 95%CI: 2,77 – 172,34; p=0,0000025). Kết quả từ nghiên cứu của chúng tôi tuy không thống nhất với một nghiên cứu trên quần thể người Đài Loan [64] nhưng lại khá tương đồng với một số báo cáo trước đó trên quần thể người Nhật Bản và người châu Á [69], [126]. Trong các nghiên cứu trên, ghi nhận allele A chỉ làm tăng nguy cơ mắc bệnh từ 3 đến 4 lần, thấp hơn nhiều so với kết quả nghiên cứu của chúng tôi là 18 lần. Mặc dù sự tương quan giữa rs72552713 với nồng độ acid uric và tình trạng tăng acid uric máu ở quần thể người Việt Nam và ở các mẫu nghiên cứu khác là không đồng nhất. Điều này được cho là do sự khác biệt về lối sống, bản chất di truyền, hoặc các yếu tố từ môi trường giữa các nhóm dân tộc. Trong phạm vi nghiên cứu mối tương quan giữa đa hình rs72552713 trong quần thể người Việt mắc bệnh, đa hình rs72552713 (Q126X) được xem là một chỉ thị quan trọng trong các nghiên cứu xác định các nhân tố di truyền quan trọng liên quan đến bệnh gút.

Ngoài ra, trong nghiên cứu này, những cá thể có kiểu gen GA được ghi nhận có nồng độ acid uric máu trung bình cao. Tuy nhiên, trong nghiên cứu ở người Đài Loan cho thấy rs72552713 không liên quan đến yếu tố này [64]. Như vậy, sự tương quan giữa rs72552713 với nồng độ acid uric ở quần thể người Việt và các quần thể khác là không đồng nhất. Điều này được giải thích

do sự khác biệt về bản chất di truyền, lối sống hoặc các yếu tố từ môi trường giữa các nhóm dân tộc.

b) Đa hình rs12505410 trên gen ABCG2

Đa hình rs12505410 trên gen *ABCG2* là một đa hình ít phổ biến. Tần số allele G trong nghiên cứu này xuất hiện nhiều hơn ở nhóm bệnh với tần số là 0,403 so với 0,385 ở nhóm chứng. Tần số allele này trên toàn bộ quần thể nghiên cứu là 0,388; lớn hơn nhiều so với các quần thể khác đã được báo cáo ở Đông Á (0,32) và Nam Á (0,26) [127]. Kết quả so sánh với dữ liệu 1000 hệ gen thế giới (1000 Genomes Project) cho thấy tần số allele G chúng tôi ghi nhận tương đồng với tần số được báo cáo trong nghiên cứu ở người Ý, cao hơn so với các nghiên cứu trong quần thể người Nhật Bản và Đông Á hoặc tần số trung bình của thế giới và thấp hơn với các nước như Phần Lan hay Hoa Kỳ (Hình 3.31).



Hình 3.31. Tần số allele G của rs12505410 so sánh với các quốc gia trên thế giới

NC: Tần số allele G trong nghiên cứu của chúng tôi

Đa hình này còn được nghiên cứu có thể làm tăng nguy cơ mắc các loại ung thư như ung thư đại trực tràng [128] hay ung thư máu leukemia [129]. Đối với bệnh gút, sự xuất hiện của đa hình này làm tăng nồng độ acid uric máu trong quần thể người Hán và người Tibetan ở Trung Quốc. Theo đó, sự xuất

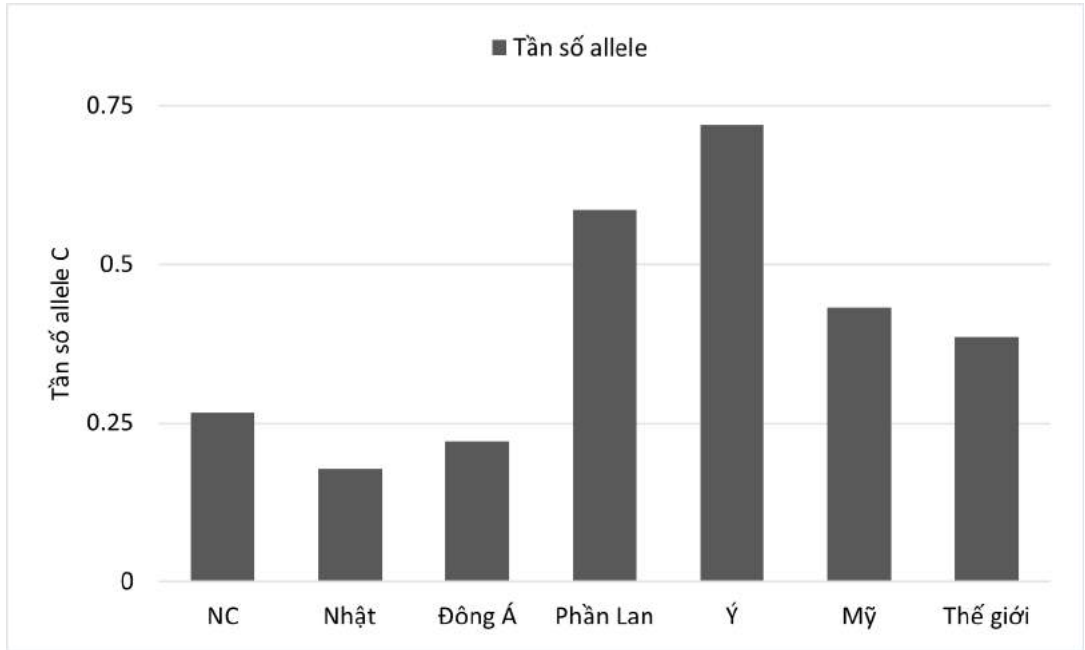
hiện của allele G làm tăng khả năng mắc bệnh ở người Hán (OR=1,564; p=0,003) nhưng lại làm giảm khả năng mắc bệnh ở người Tibetan (OR=0,717; p=0,005) [69]. Tuy nhiên, với kết quả trong nghiên cứu này, đa hình rs125051410 xuất hiện đồng thời ở cả hai nhóm nghiên cứu và không có sự liên kết nào với nồng độ acid uric trung bình trong máu. Như vậy, tác động của rs125051410 với những quần thể khác nhau là không đồng nhất. Kết quả này cho thấy các nghiên cứu trong tương lai cần hướng đến mục tiêu xác định mức ảnh hưởng của *ABCG2* rs125051410 đối với các quần thể khảo sát lớn hơn/đa dạng di truyền cao hơn cũng như cơ chế ảnh hưởng của di truyền này. Những ghi nhận này có ý nghĩa tương đối quan trọng không chỉ trong khảo sát bệnh gút mà còn gợi ý ứng dụng trong tìm kiếm khảo sát các yếu tố cần lưu ý khi khám và chẩn đoán bệnh nhân gút.

3.2.3. Tương quan giữa đa hình gen *SLC22A12* với bệnh gút

Gen *SLC22A12* mã hóa protein vận chuyển urat 1 (URAT1), là protein vận chuyển chính liên quan đến việc tái hấp thu acid uric trong màng tế bào của hệ thống thận - tiết niệu. Bên cạnh các đột biến gây tác động đến chức năng protein, các đa hình nucleotide cũng được báo cáo liên quan đến tình trạng giảm thải acid uric niệu (hoặc không thải acid uric qua đường tiêu) [76, 130, 131, 132, 133].

*a) Đa hình rs11231825 trên gen *SLC22A12**

Kết quả so sánh với dữ liệu 1000 hệ gen thế giới (1000 Genomes Project) cho thấy tần số allele C của đa hình rs11231825 trong quần thể nghiên cứu có sự khác biệt so với quần thể trong khu vực châu Á, cụ thể là tần số allele C trong báo cáo này cao hơn so với quần thể Nhật Bản và Đông Á, song có tỉ lệ thấp hơn so với allele này ở Châu Âu và Mỹ, và mức trung bình chung của thế giới (Hình 3.32).



Hình 3.32. Tần số allele C của rs11231825 so sánh với các quốc gia trên thế giới

NC: Tần số allele C trong nghiên cứu của chúng tôi

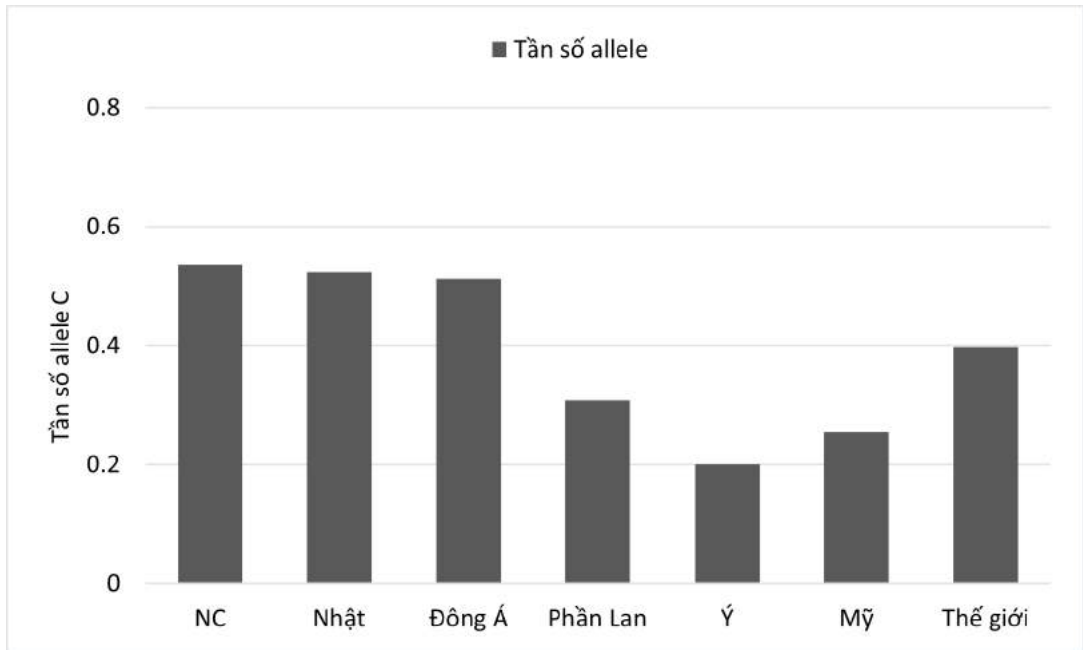
Sự khác biệt giữa nhóm chứng và nhóm bệnh được quan sát thấy ở các mô hình cộng gộp ($p=0,0104$) và mô hình lặn (TT+TC/CC) (Bảng 3.11). Kết quả này tương đồng với các nghiên cứu về rs11231825 trên các quần thể châu Âu và châu Á khác như Nhật Bản, Trung Quốc, Đức và Tây Ban Nha [134].

Kiểu gen TC có nồng độ LDL-c thấp hơn kiểu TT ($p<0,05$) và kiểu gen CC ($p<0,05$). Đối với nồng độ glucose, kiểu gen TT có nồng độ thấp nhất so với kiểu gen TC ($p<0,05$) và kiểu gen CC ($p<0,05$). Những phát hiện này của chúng tôi chưa được báo cáo ở bất cứ nghiên cứu nào trong nước và thế giới. Đây sẽ là yếu tố cần phát triển thêm khi tiến hành nghiên cứu đa hình gen rs11231825 trong tương lai. Những ghi nhận này có ý nghĩa tương đối quan trọng không chỉ trong khảo sát bệnh gút mà còn gợi ý ứng dụng trong tìm kiếm khảo sát các yếu tố cần lưu ý khi khám và chẩn đoán bệnh nhân gút.

b) Đa hình rs7932775 trên gen SLC22A12

Kết quả so sánh với dữ liệu 1000 hệ gen thế giới (1000 Genomes Project) cho thấy tần số phân bố allele C của đa hình rs7932775 của quần thể trong nghiên cứu tương đương với tần số phân bố trong quần thể Nhật Bản và

Đông Á, tuy nhiên thấp hơn khá nhiều so với trung bình phân bố của thế giới và các nước Châu Âu và Mỹ (Hình 3.33).



Hình 3.33. Tần số allele C của rs7932775 so sánh với các quốc gia khác trên thế giới

NC: Tần số allele C trong nghiên cứu của chúng tôi

Mặc dù những nghiên cứu khác trên thế giới đã chứng minh sự liên quan giữa đa hình rs7932775 tới tình trạng tăng acid uric ở người Czech và quần thể người Hán đã được báo cáo [78], [79]. Tuy nhiên, với kết quả từ nghiên cứu này, chúng tôi không phân tích tương quan giữa đa hình rs7932775 với tình trạng tăng acid uric cũng như các yếu tố lâm sàng và các chỉ số cận lâm sàng khác do đa hình này không tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg.

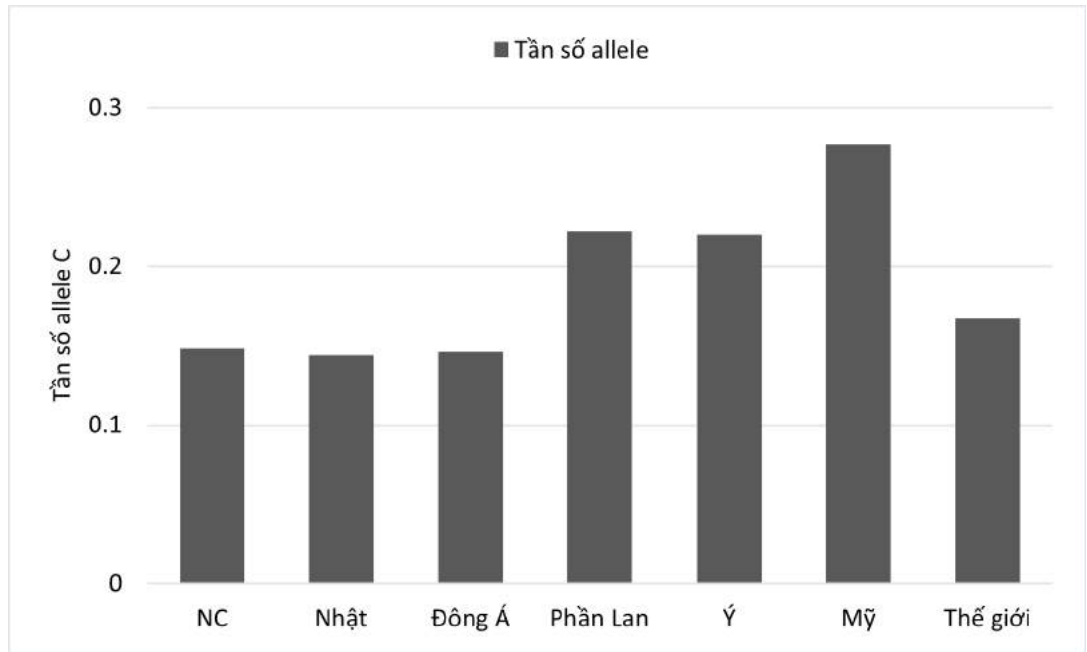
3.2.4. Tương quan giữa đa hình của gen *SLC2A9* với bệnh gút

Gen *SLC2A9* mã hóa cho protein kênh vận chuyển urat đặc hiệu với khả năng vận chuyển urat cao hơn khả năng vận chuyển glucose gấp 50 lần, đồng thời cũng cao hơn so với URAT1 đã được ghi nhận trước đó [90]. Do chức năng quan trọng trong vận chuyển và điều hòa sự cân bằng uric acid của *SLC2A9*, một số nghiên cứu tương quan trên toàn bộ hệ gen (GWAS) hay nghiên cứu đa hình nucleotide đơn trên các quần thể mắc bệnh gút ở người gốc đảo Thái Bình Dương, người Trung Quốc và người da trắng đã được tiến hành

[88, 135]. Kết quả của những nghiên cứu này chỉ ra rằng, các biến đổi trên gen *SLC2A9* làm tăng nồng độ urat lên 6% ở nữ giới - gấp 3 lần ở giới nam [135]. Một nghiên cứu khác trên quần thể người Ý, và những người gốc châu Âu ở Hoa Kỳ cũng cho thấy mối liên quan chặt chẽ đến việc giảm nồng độ uric trên những cá thể có xuất hiện allele hiếm C của rs12510549 [84]. Tương tự, hai tác giả Brandstter và Voruganti cũng ghi nhận mối liên quan này trên quần thể người da trắng ở châu Âu [84, 136]. Tuy nhiên, sự ảnh hưởng của đa hình rs12510549 là khác nhau đối với nguy cơ bệnh gút ở các quần thể khác nhau. Hollis-Moffatt thực hiện nghiên cứu ở những cá thể tại New Zealand đã cho thấy rs12510549 có liên quan đến tình trạng giảm khả năng mắc bệnh gút ở người da trắng (OR = 0,57; $p = 4,6 \times 10^{-3}$) tuy nhiên lại không liên quan đến nhóm bệnh nhân gút ở người bản địa Maori ($p = 0,36$) cũng như người bản địa gốc ở đảo Thái Bình Dương ($p = 0,15$) [88]. Trong nghiên cứu GWAS của Lee cũng cho thấy khả năng giảm nguy cơ mắc bệnh gút của đa hình rs12510549 trên người da trắng (OR = 0,647; $p = 1,2 \times 10^{-6}$) [86].

a) Đa hình rs12510549 trên gen SLC2A9

Kết quả so sánh với dữ liệu 1000 hệ gen thế giới (1000 Genomes Project) cho thấy tần số phân bố allele C của đa hình rs12510549 của quần thể trong nghiên cứu tương đương với tần số phân bố trong quần thể Nhật và Đông Á, tuy nhiên thấp hơn khá nhiều so với trung bình phân bố của thế giới, Hoa Kỳ và các nước Châu Âu (Hình 3.34).



Hình 3.34. Tần số allele C của rs12510549 so sánh với các quốc gia trên thế giới.

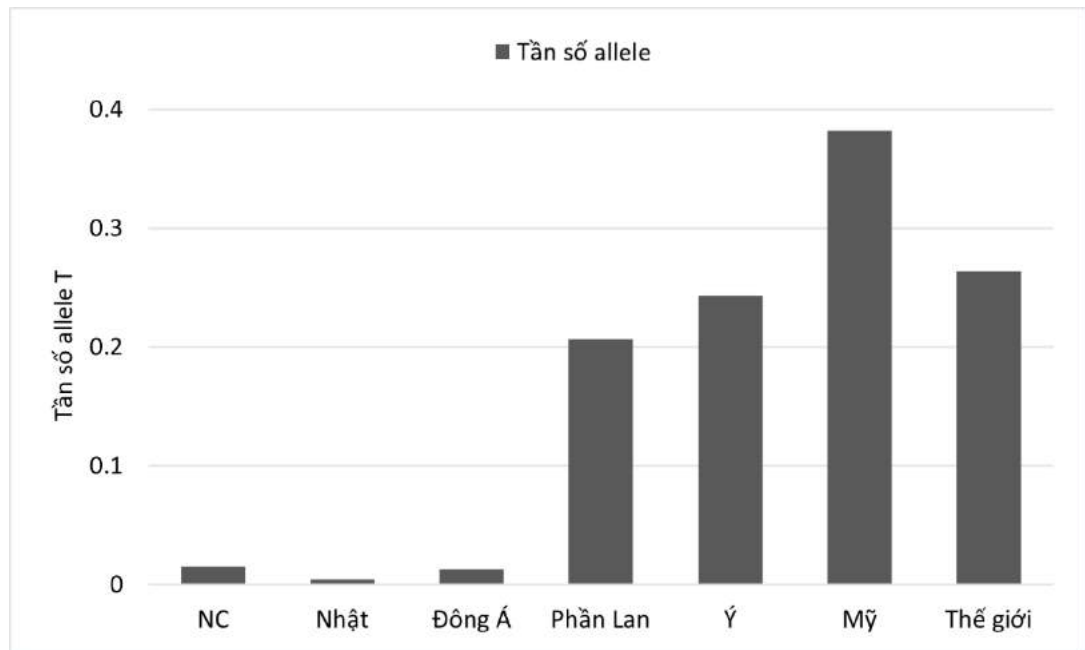
NC: Tần số allele C trong nghiên cứu của chúng tôi

Chúng tôi đã tiến hành thống kê kiểu gen và tỉ lệ allele của đa hình rs12510549 (T>C) trên 351 người khỏe mạnh và 170 người mắc bệnh gút. Ghi nhận có sự phân bố đồng đều ở cả 2 nhóm bệnh chứng về allele hiếm C. Sự tác động của rs12510549 lên nồng độ uric acid trung bình và nguy cơ mắc bệnh gút cũng được chúng tôi đánh giá trong nghiên cứu. Ghi nhận không có sự liên quan giữa đa hình rs12510549 và nồng độ uric acid trung bình cũng như nguy cơ mắc bệnh gút ở quần thể người Kinh tại Việt Nam trong nghiên cứu này với p lớn hơn 0,05 ở tất cả các mô hình, kiểu gen và kiểu allele. Kết quả này cho thấy có sự khác biệt về tác động của đa hình rs12510549 lên nồng độ uric acid trung bình ở quần thể người Việt so với các quần thể khác trên thế giới đã được báo cáo. Mặt khác, khi đánh giá tác động của đa hình rs12510549 trên nguy cơ mắc bệnh gút ở quần thể người Việt lại có sự đồng nhất với các quần thể có vị trí gần với người Việt Nam (người Maori hay người gốc tại đảo Thái Bình Dương hoặc người gốc Á). Tuy nhiên, các kết quả nghiên cứu trên các quần thể người tại khu vực châu Âu và New Zealand lại trái ngược với ghi nhận của chúng tôi. Như vậy, khi xét về phương diện tác động trên nồng độ uric acid và nguy cơ mắc bệnh gút của đa hình rs12510549 ở người Việt có

tồn tại những khác biệt nhất định với các quần thể trên thế giới, đặc biệt là ở người da trắng. Có thể giải thích sự khác biệt này là do sự khác biệt căn bản về di truyền, cũng như lối sống và các yếu tố tác động từ môi trường.

b) Tương quan giữa đa hình rs16890979 trên SLC2A9 và bệnh gút

Kết quả so sánh với dữ liệu 1000 hệ gen thế giới (1000 Genomes Project) cho thấy tần số phân bố allele T của đa hình rs16890979 của quần thể trong nghiên cứu tương đương với tần số phân bố trong quần thể Nhật và Đông Á, tuy nhiên thấp hơn khá nhiều so với trung bình phân bố của thế giới, Hoa Kỳ và các nước Châu Âu (Hình 3.35).



Hình 3.35. Tần số allele T của rs16890979 so sánh với các quốc gia trên thế giới. NC: Tần số allele T trong nghiên cứu của chúng tôi.

Một vài báo cáo gần đây ghi nhận có sự tác động của di truyền trên sự bài tiết acid uric qua thận. Các đa hình trong gen vận chuyển urat *SLC2A9* đã được ghi nhận là yếu tố nguy cơ của bệnh gút trong nhiều quần thể như người da trắng (Caucasian) qua các nghiên cứu của Dehghan [125] và Hollis-Moffatt [88]; trong quần thể Maori Polynesian qua nghiên cứu của Hollis-Moffatt [88]; trong quần thể người Hán và nhóm dân quần đảo Solomon qua nghiên cứu của Tu [78].

Bên cạnh đó, vào năm 2015, tác giả Qingxi Meng và cs thấy rằng đa hình rs16890979 hay V253I có thể có vai trò làm giảm nguy cơ mắc bệnh bệnh gút [96]. Dù vậy, trong các đối tượng của mẫu nghiên cứu, chúng tôi không ghi nhận mối tương quan giữa đa hình rs16890979 và nguy cơ mắc bệnh gút. Có thể giải thích do sự khác biệt về nền tảng di truyền giữa các quần thể khác nhau và cách biệt về địa lý. Điều này cũng được báo cáo trong nghiên cứu của Dehghan và cs trong các quần thể Mỹ Phi (African American) ghi nhận có sự khác biệt của rs16890979 giữa các sắc dân khác nhau về nguồn gốc [125].

Loại protein GLUT9 được phiên mã bởi gen *SLC2A9* có biểu thị chủ yếu ở thận và chịu trách nhiệm cho việc duy trì nồng độ urat trong máu và việc bài tiết acid uric qua nước tiểu [44]. Các đa hình của *SLC2A9* được báo cáo là có liên quan với nồng độ cao acid uric trong máu [84, 85, 125]. Nghiên cứu với cỡ mẫu 541 người từ Sardinia cũng ghi nhận mối liên quan giữa nồng độ acid uric và rs16890979 với giá trị p là 0,02 [62].

Kết quả chúng tôi ghi nhận, trong khi sự tăng acid uric máu là phổ biến ở nhóm 163 bệnh nhân gút (92.6%), tuy nhiên lại không ghi nhận bất kỳ sự liên hệ nào giữa rs16890979 và nồng độ acid uric cũng như với tình trạng có tăng acid uric máu (với p lần lượt là 0,215 và 0,622). Dù vậy, chúng tôi cũng ghi nhận có sự liên quan có ý nghĩa thống kê được tìm thấy giữa rs16890979 và triglyceride hay creatinine. Cả hai chỉ số triglyceride và creatinine đều đã được ghi nhận có liên quan với chức năng thận [86, 136]. Voruganti và cs đã báo cáo trong nghiên cứu của họ có mối liên quan giữa cụm gen *SLC2A9* và chức năng thận qua nồng độ creatinine hoặc qua độ lọc cầu thận eGFR [136]. Nồng độ cao của creatinine là một dấu hiệu của suy giảm độ lọc cầu thận, hay tổn thương thận gây ra bởi các bệnh lý khác ví dụ như tăng huyết áp hoặc các tổn thương tại mạch máu [137]. Tác giả Zubovic phát hiện được rằng mối liên quan giữa triglyceride và bệnh lý thận mạn qua từng giai đoạn ở trên quần thể nghiên cứu gồm 150 bệnh nhân ở Bosnia và Herzegovina [138]. Nồng độ Triglyceride cũng bắt đầu tăng khi bệnh nhân ở giai đoạn sớm nhất và đạt đỉnh khi ở giai đoạn IV và V của bệnh thận mạn [139]. Một số nghiên cứu gần đây

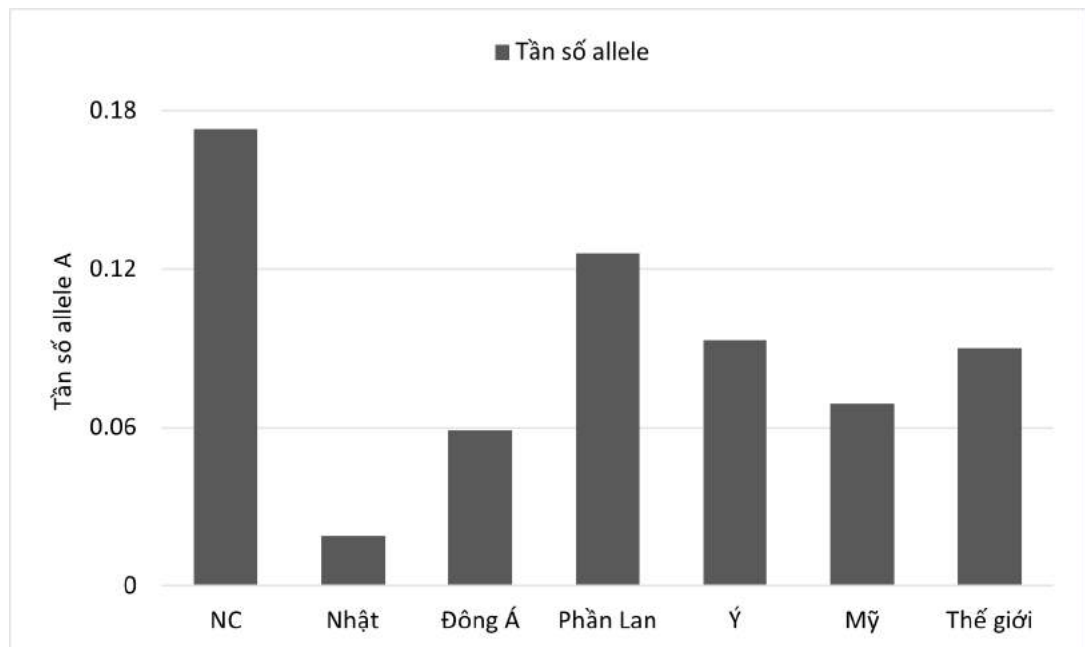
cho thấy mức nồng độ cao của Triglyceride ở các bệnh nhân thận mạn cũng có thể dẫn đến các bệnh lý mạch máu [91].

Các báo cáo từ nghiên cứu này đã cung cấp bằng chứng cho các nghiên cứu về sau về các ảnh hưởng của đa hình rs16890979 trong tổ hợp gen *SLC2A9* đối với các rối loạn chuyển hóa trong quần thể người Việt Nam.

3.2.5. Tương quan giữa đa hình gen *TNFA* với bệnh gút

Kết quả phân tích sự liên quan giữa các kiểu gen trong đa hình này ở cả 4 mô hình đều lớn hơn mức ý nghĩa 0,05. Do đó, trong nghiên cứu này, đa hình rs1800629 không liên quan đến bệnh gút ở quần thể người Việt. Kết quả tương đồng với kết quả của một nghiên cứu khác ở người Đài Loan [117].

Kết quả so sánh với dữ liệu 1000 hệ gen thế giới (1000 Genomes Project) cho thấy tần số phân bố allele A của đa hình rs1800629 của gen *TNFA* trong nghiên cứu của chúng tôi cao hơn so với trong các nghiên cứu tại các nước Đông Á, Nhật Bản, Ý, hay Mỹ. Tần số allele A của đa hình rs1800629 trong quần thể người Việt Nam cũng khác biệt rõ ràng so với tần số allele A chung của thế giới (Hình 3.36).



Hình 3.36. Tần số allele A của rs1800629 so sánh với các quốc gia khác trên thế giới

NC: Tần số allele A trong nghiên cứu của chúng tôi

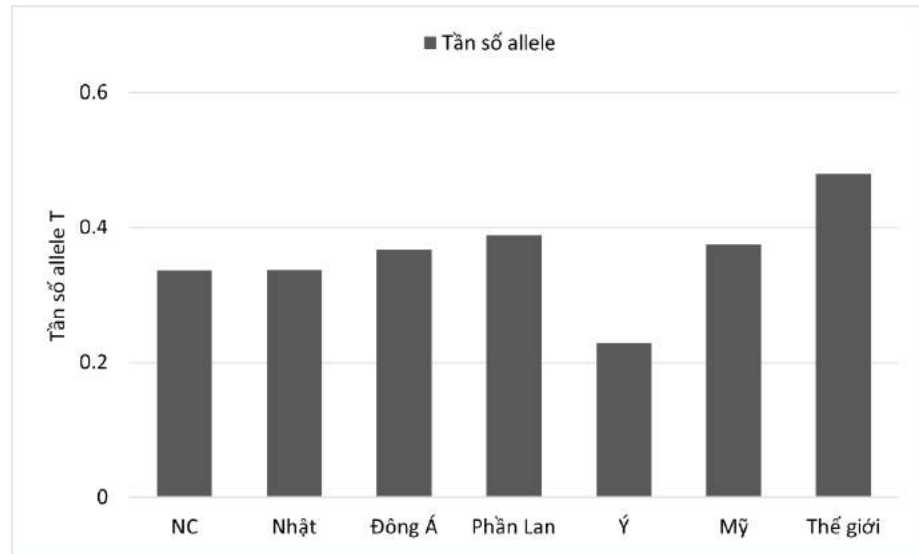
TNFA là một cytokine tiền phản ứng viêm, đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bệnh sinh của viêm khớp [93]. Gen *TNFA* được xác định nằm trên nhiễm sắc thể số 6: vị trí từ 31.575.567 - 31.578.336. Đa hình rs1800629 còn được gọi là *TNF-308*. Thình thoảng đa hình AA của gen này còn được gọi là *TNF2*, với đa hình gen GG còn gọi là *TNF1*. Vai trò của allele A cho thấy allele này làm tăng diễn giải của đoạn gen.

Phân bố kiểu gen và tần số allele của *TNFA* rs1800629 trong mẫu nghiên cứu tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg. Giá trị p ghi nhận ở cả 4 mô hình đều lớn hơn mức ý nghĩa 0,05. Do đó, đa hình rs1800629 không liên quan đến bệnh gút ở quần thể người Việt trong nghiên cứu của chúng tôi. Điều này cũng tương đồng với một nghiên cứu ở người Đài Loan [117]. Bên cạnh đó, chúng tôi cũng xác định được rs1800629 không có liên quan đến các đặc điểm lâm sàng ở quần thể người Việt.

Trong nghiên cứu này, đa hình rs1800629 không liên quan đến bệnh gút ở quần thể người Việt. Kết quả này gần tương đồng với kết quả tại Đài Loan [117]. Ngoài ra, chúng tôi cũng ghi nhận rs1800629 không liên quan đến các đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng ở quần thể người Việt trong phạm vi nghiên cứu này.

3.2.6. Tương quan giữa đa hình gen *TLR4* với bệnh gút

Kết quả so sánh với dữ liệu 1000 hệ gen thế giới (1000 Genomes Project) cho thấy tần số phân bố allele T của đa hình rs2149356 của gen *TNFA* của quần thể trong nghiên cứu của chúng tôi thấp hơn nhiều so với tần số phân bố của các nước Châu Á, Châu Âu, Mỹ và cũng như là của thế giới (Hình 3.40).



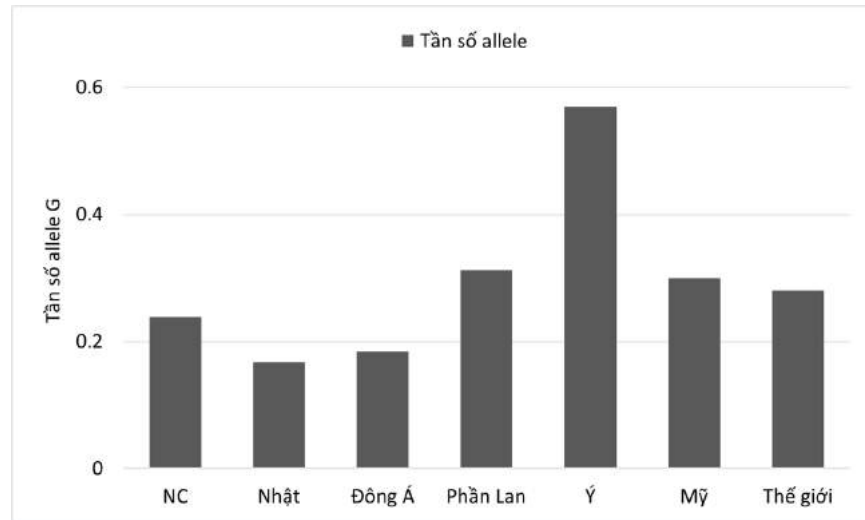
Hình 3.37. Tần số allele T của rs2149356 so sánh với các quốc gia trên thế giới

NC: Tần số allele T trong nghiên cứu của chúng tôi

Tần số allele của đa hình rs2149356 trong nghiên cứu này không chênh lệch đáng kể so với các nghiên cứu trên các quần thể người khác trong khu vực châu Á, châu Âu và châu Mỹ, tuy nhiên thấp hơn nhiều so với châu Phi (0,82) [127]. Ba kiểu gen GG/GT/TT của đa hình rs2149356 phân bố đều và tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) ở cả nhóm bệnh, nhóm chứng và trên toàn bộ quần thể. Kết quả này trái ngược với báo cáo từ các nghiên cứu khác. Cụ thể, Qing và các cộng sự, ghi nhận sự xuất hiện allele T của rs2149356 được xác định làm tăng khả năng mắc bệnh gút (OR=1,42; 95%CI: 1,20 - 1,69; $p = 4 \times 10^{-5}$) [96]. Trong một nghiên cứu khác, sự xuất hiện cũng của allele này lại gây ra ảnh hưởng trái ngược trên 2 quần thể: làm tăng nguy cơ mắc bệnh ở người Caucasian (OR=1,12; $p = 0,012$) nhưng lại làm giảm nguy cơ ở người Polynesian ở New Zealand (OR=0,80; $p = 0,011$) [97]. Sự khác biệt về mối liên quan của đa hình này với bệnh gút ở các quần thể từ các nghiên cứu khác có thể được giải thích do sự khác biệt về lối sống và chế độ dinh dưỡng, bản chất di truyền giữa các quần thể. Ngoài ra, chúng tôi cũng không ghi nhận có sự tương quan của đa hình rs2149356 với các yếu tố trên lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh.

3.2.7. Tương quan giữa đa hình gen *SLC17A1* với bệnh gút

Kết quả so sánh với dữ liệu 1000 hệ gen thế giới (1000 Genomes Project) cho thấy tần số phân bố allele G của đa hình rs1165196 của quần thể trong nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với tần số phân bố của các nước Châu Á, thấp hơn so với các Châu Âu, Mỹ và cũng như là của thế giới (Hình 3.38).



Hình 3.38. Tần số allele G của rs1165196 so sánh với các quốc gia trên thế giới

NC: Tần số allele G trong nghiên cứu của chúng tôi

Trong nghiên cứu của chúng tôi, các kết quả thống kê có thể thấy allele A xuất hiện phổ biến với tần số là 0,761. Sự phân bố kiểu gen đa hình này ở nhóm bệnh, chứng và trên toàn bộ quần thể nghiên cứu đều tuân theo định luật cân bằng Hardy-Weinberg. Tuy nhiên, tần số kiểu gen và allele của rs1165196 trong mẫu nghiên cứu người Việt mắc bệnh gút không có khác biệt với nhóm đối chứng. Kết quả này tương tự với ghi nhận của các tác giả khác về rs1165196 trên người Hán và người gốc Nam tại Đảo ở New Zealand [101]. Tuy nhiên ở quần thể người Nhật Bản, người da trắng ở New Zealand và người Tây Ban Nha lại tìm thấy mối liên quan chặt chẽ giữa đa hình rs1165196 và nguy cơ mắc bệnh gút. Như vậy, mối tương quan giữa rs1165196 với nguy cơ mắc gút cũng có khác biệt ở các nhóm quần thể thuộc các dân tộc khác nhau. Ngoài ra, chúng tôi cũng xác định được *SLC17A1* rs1165196 không liên quan đến các yếu tố lâm sàng khác ở quần thể người Việt Nam trong nghiên cứu.

3.2.8. Mối liên quan của các chỉ số cận lâm sàng với bệnh gút

Kết quả về mối tương quan giữa các chỉ số acid uric, BUN, creatinin máu và các chỉ số chuyển hóa cơ thể khác (HDL-c, LDL-c, triglyceride, glucose, AST, ALT) với bệnh gút giống với các nghiên cứu cắt ngang ở cộng đồng. Cụ thể, đối với CRP, mỗi đơn vị CRP tăng thêm nguy cơ bệnh gút 4% (OR=1,04; 95%CI: 1,00 - 1,07; p=0,030), tương đồng với các nghiên cứu trên thế giới như ở Hàn Quốc [140], đặc biệt trên nhóm bệnh nhân cao tuổi, khi có nồng độ CRP cao thì phản ứng viêm gút càng nặng. Thực chất theo một báo cáo mới đây trên tạp chí Nature [141], bệnh gút cũng đã được xác định là một tình trạng viêm vô khuẩn do tinh thể urat tại khớp bị các yếu tố viêm CRP nhận dạng và gắn chặt gây nên chuỗi phản ứng viêm tại chỗ. Vì vậy sớm phát hiện sự tăng cao của CRP có thể là một yếu tố giúp ích lớn cho chẩn đoán và điều trị bệnh gút.

Hai yếu tố LDL-c và triglyceride tăng cao cũng làm tăng nguy cơ bệnh gút, trong mô hình đơn biến, chúng tôi ghi nhận mỗi đơn vị LDL-c và triglyceride tăng cao làm tăng OR lần lượt là 1,005 (95%CI: 1,000 - 1,009; p=0,040) và 1,003 (95%CI: 1,001 - 1,004; p<0,001). Kết quả này thống nhất với các báo cáo từ nghiên cứu sự tương quan giữa LDL-c với acid uric ở cộng đồng người Bangladesh [23] và cả người Âu Mỹ. Kết quả tương quan dương giữa triglyceride và tăng bệnh gút cũng được tìm thấy theo nghiên cứu của Peng [142], cũng như theo một số nghiên cứu từ quần thể người Trung Quốc như của tác giả [139] trong nghiên cứu đoàn hệ ở người dân thành thị.

KẾT LUẬN

Trên cơ sở nghiên cứu bệnh - chứng bao gồm 170 mẫu bệnh và 351 mẫu chứng bằng kỹ thuật PCR, RFLP và giải trình tự Sanger đã rút ra được các kết luận sau:

1. Nghiên cứu đã xác định được tần số các allele và kiểu gen của 9 đa hình trên 6 gen *ABCG2*, *SLC22A12*, *SLC2A9*, *TNFA*, *TLR4* và *SLC17A1* ở bệnh nhân gút so với đối chứng, các kết quả thu được như sau:

+ Trên gen *ABCG2*, ghi nhận đa hình rs72552713 có tần số allele G/A lần lượt là 0,98/0,02 và tỷ lệ kiểu gen GG/GA tương ứng là 0,98/0,02; đa hình rs12505410 có tần số allele T/G lần lượt là 0,612/0,388 và tỷ lệ kiểu gen TT/TG/GG tương ứng là 0,38/0,46/0,16.

+ Trên gen *SLC22A12*, ghi nhận đa hình rs11231825 có tần số allele T/C lần lượt là 0,733/0,267 và tỷ lệ kiểu gen TT/TC/CC tương ứng là 0,54/0,38/0,08; đa hình rs7932775 có tần số allele C/T lần lượt là 0,536/0,464 và tỷ lệ kiểu gen CC/CT/TT tương ứng là 0,32/0,42/0,26.

+ Trên gen *SLC2A9*, ghi nhận đa hình rs12510549 có tần số allele T/C lần lượt 0,852/0,148 và tỷ lệ kiểu gen TT/TC/CC tương ứng là 0,73/0,25/0,02; đa hình rs16890979 có tần số allele C/T lần lượt là 0,985/0,015 và tỷ lệ kiểu gen CC/CT tương ứng là 0,97/0,03.

+ Đa hình rs1800629 trên gen *TNFA* có tần số allele G/A lần lượt là 0,827/0,173 và tỷ lệ kiểu gen GG/GA/AA tương ứng là 0,68/0,29/0,03.

+ Đa hình rs2149356 trên gen *TLR4* có tần số allele T/G lần lượt là 0,336/0,664 và tỷ lệ kiểu gen GG/TG/TT tương ứng là 0,44/0,45/0,11.

+ Đa hình rs1165196 trên gen *SLC17A1* có tần số allele allele A/G lần lượt là 0,761/0,239 và tỷ lệ kiểu gen AA/AG/GG tương ứng là 0,57/0,39/0,04.

2. Nghiên cứu đã xác định được mối liên quan giữa đa hình gen với nguy cơ mắc bệnh gút.

+ Đa hình gen *ABCG2* rs72552713 có mối liên quan khá mạnh với bệnh gút. Cụ thể, người có kiểu gen GA có nguy cơ mắc phải bệnh gút gấp gần 19 lần so với người mang kiểu gen GG.

+ Đa hình gen *SLC22A12* rs11231825 có mối liên quan với bệnh gút, làm tăng tương đối cao nguy cơ bệnh gút, cụ thể người mang kiểu gen CT và TT có nguy cơ mắc bệnh gút cao hơn kiểu gen CC lần lượt là 3,119 lần (95%CI: 1,122 - 8,669; p=0,029) và 3,195 lần (95%CI: 1,439 - 10,654; p=0,008).

KIẾN NGHỊ

Nghiên cứu đã xác định hai đa hình trên gen *ABCG2* rs72552713 và *SLC22A12* rs11231825 có liên quan đến bệnh gút trên nhóm bệnh nhân gút và người khỏe mạnh được sử dụng làm nhóm đối chứng thu thập tại Thành phố Hồ Chí Minh. Nhằm có thêm dữ kiện giúp đánh giá ảnh hưởng của hai đa hình này đối với bệnh gút trên quần thể người Việt nói chung, cần tiến hành thực hiện thêm các nghiên cứu mở rộng tại các địa phương khác với cỡ mẫu lớn hơn. Việc tiếp tục thực hiện các nghiên cứu mở rộng sẽ giúp có thêm thông tin về các gen và bệnh gút ở người Việt Nam, từ đó mở rộng thêm các phương pháp phòng ngừa hiệu quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. B. Ankli. *Current epidemiology of gout*, Ther Umsch, 2016, 73, 125-129.
2. L. Cea Soriano, D. Rothenbacher, H. K. Choi, et al., *Contemporary epidemiology of gout in the UK general population*, Arthritis Res Ther, 2011, 13, R39.
3. C. F. Kuo, M. J. Grainge, W. Zhang, et al., *Global epidemiology of gout: prevalence, incidence and risk factors*, Nat Rev Rheumatol, 2015, 11, 649-662.
4. Nguyễn Thu Hiền. *Nghiên cứu mô hình bệnh tật tại khoa cơ xương khớp bệnh viện Bạch Mai trong mười năm (1991-2000)*, Tạp Chí Nghiên cứu Y học, 2001, 8, 92-99.
5. A. J. Phipps-Green, M. E. Merriman, R. Topless, et al., *Twenty-eight loci that influence serum urate levels: analysis of association with gout*, Ann Rheum Dis, 2016, 75, 124-130.
6. Y. Okada, X. Sim, M. J. Go, et al., *Meta-analysis identifies multiple loci associated with kidney function-related traits in east Asian populations*, Nat Genet, 2012, 44, 904-909.
7. K. F. Oakeson, J. M. Wagner, M. Mendenhall, et al., *Bioinformatic analyses of whole-genome sequence data in a public health laboratory*, Emerging infectious diseases, 2017, 23, 1441.
8. T. Neogi, T. L. Jansen, N. Dalbeth, et al., *2015 Gout classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative*, Ann Rheum Dis, 2015, 74, 1789-1798.
9. J. Larry, F. Anthony, K. Dennis, et al., *Harrison's Principles of Internal Medicine 20e*, McGraw-Hill Education, 2018.
10. L. Annemans, E. Spaepen, M. Gaskin, et al., *Gout in the UK and Germany: prevalence, comorbidities and management in general practice 2000-2005*, Ann Rheum Dis, 2008, 67, 960-966.
11. M. Dehlin, L. Jacobsson, E. Roddy. *Global epidemiology of gout: prevalence, incidence, treatment patterns and risk factors*, Nat Rev Rheumatol, 2020, 16, 380-390.

12. E. Roddy, H. K. Choi. *Epidemiology of gout*, Rheum Dis Clin North Am, 2014, 40, 155-175.
13. Trần Thị Minh Hoa, J. Darmawan, Cao Thị Nhi, et al., *Tình hình bệnh cơ xương khớp ở hai quần thể dân cư Trung Liệt (Hà Nội) và Tân Trường (Hải Dương)*, Công Trình Nghiên Cứu Khoa Học 2001 - 2002, 2002, 1, 7.
14. J. Darmawan, S. K. Lutalo. *Gout and hyperuricaemia*, Baillieres Clin Rheumatol, 1995, 9, 83-94.
15. J. Darmawan, J. J. Rasker, H. Nuralim. *The effect of control and self-medication of chronic gout in a developing country. Outcome after 10 years*, J Rheumatol, 2003, 30, 2437-2443.
16. J. A. Singh, A. Gaffo. *Gout epidemiology and comorbidities*, Semin Arthritis Rheum, 2020, 50, S11-S16.
17. R. Victor, B. David, B. Kathleen, et al. *Metabolism of Proteins & Amino Acids*. Harper's Illustrated Biochemistry 31st: McGraw-Hill Education; 2018. p. 643-782.
18. N. David, C. Michael. *Bioenergetics and Metabolism*. Lehninger Principles of Biochemistry 7th: W. H. Freeman; 2017. p. 451-534.
19. R. L. Wortmann. *Gout and hyperuricemia*, Curr Opin Rheumatol, 2002, 14, 281-286.
20. P. P. Doghramji, R. L. Wortmann. *Hyperuricemia and gout: new concepts in diagnosis and management*, Postgrad Med, 2012, 124, 98-109.
21. N. V. Ngọc. *Triệu chứng học Cơ Xương Khớp*. Bài Giảng Bệnh Học Nội Khoa. 2012. p. 171-187.
22. O. Slot. *Gout in a rheumatology clinic: results of EULAR/ACR guidelines-compliant treatment*, Scand J Rheumatol, 2018, 47, 194-197.
23. N. Ali, S. Rahman, S. Islam, et al., *The relationship between serum uric acid and lipid profile in Bangladeshi adults*, BMC cardiovascular disorders, 2019, 19, 42-42.
24. T. N. Ân. *Các bệnh Xương do chuyển hóa*. Bệnh Thấp Khớp: Nhà Xuất Bản Y Học; 1992. p. 15-25.
25. T. Nicholas, O. C. Simon, F. Brad. *Rheumatology*. Essentials of Internal Medicine 4th: Elsevier; 2020. p. 285-345.

26. P. Maxine, M. Stephen, R. Michael. *Rheumatologic, Immunologic, & Allergic Disorders*. Current Medical Diagnosis and Treatment 2020: McGraw-Hill Education; 2019. p. 1967-2104.
27. T. Alusik, S. Alusik. *Gout and its manifestations, description and treatment in ancient times*, Cas Lek Cesk, 2015, 154, 194-195.
28. R. L. Wortmann. *Recent advances in the management of gout and hyperuricemia*, Curr Opin Rheumatol, 2005, 17, 319-324.
29. D. Patrick, S. David. *Rheumatoid arthritis*. Diagnosis and Treatment in Internal Medicine: OUP Oxford; 2018. p. 910-913.
30. M. Li, C. Yu, X. Zeng. *Comparative efficacy of traditional non-selective NSAIDs and selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors in patients with acute gout: a systematic review and meta-analysis*, BMJ Open, 2020, 10, e036748.
31. T. Winzenberg, R. Buchbinder. *Cochrane Musculoskeletal Group review: acute gout. Steroids or NSAIDs? Let this overview from the Cochrane Group help you decide what's best for your patient*, J Fam Pract, 2009, 58, E1-4.
32. V. Palabindala. *Guideline: In acute gout, steroids, NSAIDs, or low-dose colchicine recommended; lifestyle changes not supported*, Ann Intern Med, 2017, 166, JC14.
33. M. Gottlieb, W. Rabah, B. Long. *Colchicine for acute gout*, Acad Emerg Med, 2022, 29, 387-388.
34. C. A. Billy, R. T. Lim, M. Ruospo, et al., *Corticosteroid or Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs for the Treatment of Acute Gout: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials*, J Rheumatol, 2018, 45, 128-136.
35. T. Hunter, C. Nguyen, J. Birt, et al., *Pain Medication and Corticosteroid Use in Ankylosing Spondylitis, Psoriatic Arthritis, and Rheumatoid Arthritis in the United States: A Retrospective Observational Study*, Rheumatol Ther, 2021, 8, 1371-1382.
36. J. M. Kroese, S. Kopp, F. Lobbezoo, et al., *Corticosteroid injections in the temporomandibular joint temporarily alleviate pain and improve function in rheumatoid arthritis*, Clin Rheumatol, 2021, 40, 4853-4860.
37. J. D. FitzGerald, N. Dalbeth, T. Mikuls, et al., *2020 American College of Rheumatology Guideline for the Management of Gout*, Arthritis Care Res (Hoboken), 2020, 72, 744-760.

38. S. Onuora. *Hospitalization for infection on the rise in gout*, Nat Rev Rheumatol, 2020, 16, 296.
39. J. Sautner, G. Eichbauer-Sturm, J. Gruber, et al., *2022 update of the Austrian Society of Rheumatology and Rehabilitation nutrition and lifestyle recommendations for patients with gout and hyperuricemia*, Wien Klin Wochenschr, 2022, 134, 546-554.
40. L. Li, J. Tian, R. Wang, et al., *Trends in risk factor control in patients with gout: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2007-2018*, Rheumatology (Oxford), 2022, 62, 158-168.
41. T. J. Major, N. Dalbeth, E. A. Stahl, et al., *An update on the genetics of hyperuricaemia and gout*, Nat Rev Rheumatol, 2018, 14, 341-353.
42. R. Karki, D. Pandya, R. C. Elston, et al., *Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics*, BMC medical genomics, 2015, 8, 37-37.
43. W. M. Grosse, S. M. Kappes, W. W. Laegreid, et al., *Single nucleotide polymorphism (SNP) discovery and linkage mapping of bovine cytokine genes*, Mamm Genome, 1999, 10, 1062-1069.
44. R. R. Garafutdinov, A. R. Sakhabutdinova, P. A. Slominsky, et al., *A new digital approach to SNP encoding for DNA identification*, Forensic Sci Int, 2020, 317, 110520.
45. L. B. Barreiro, G. Laval, H. Quach, et al., *Natural selection has driven population differentiation in modern humans*, Nature genetics, 2008, 40, 340.
46. P. D. Stenson, E. V. Ball, K. Howells, et al. *The Human Gene Mutation Database: providing a comprehensive central mutation database for molecular diagnostics and personalised genomics*. Springer; 2009.
47. M. Olivier. *The Invader® assay for SNP genotyping*, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2005, 573, 103-110.
48. P. Goelet, M. R. Knapp, S. Anderson. *Method for determining nucleotide identity through primer extension*. Google Patents; 1999.
49. A.-C. Syvänen. *Assessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms*, Nature Reviews Genetics, 2001, 2, 930-942.

50. F. E. McGuigan, S. H. Ralston. *Single nucleotide polymorphism detection: allelic discrimination using TaqMan*, *Psychiatric genetics*, 2002, 12, 133-136.
51. W. M. Howell, M. Jobs, U. Gyllensten, et al., *Dynamic allele-specific hybridization. A new method for scoring single nucleotide polymorphisms*, *Nat Biotechnol*, 1999, 17, 87-88.
52. R. Rapley, S. Harbron. *Molecular analysis and genome discovery*, Wiley Online Library, 2004.
53. S. Behjati, P. S. Tarpey. *What is next generation sequencing?*, *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, 2013, 98, 236-238.
54. J. D. McPherson, M. Marra, L. D. Hillier, et al., *A physical map of the human genome*, *Nature*, 2001, 409, 934-941.
55. J. C. Venter, M. D. Adams, E. W. Myers, et al., *The sequence of the human genome*, *Science*, 2001, 291, 1304-1351.
56. National Cancer Institute. *Understanding Genetic Variation (SNPs)*, National Cancer Institute, 2015.
57. J. Kim, J. M. Basak, D. M. Holtzman. *The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease*, *Neuron*, 2009, 63, 287-303.
58. L. M. Bekris, S. P. Millard, N. M. Galloway, et al., *Multiple SNPs within and surrounding the apolipoprotein E gene influence cerebrospinal fluid apolipoprotein E protein levels*, *Journal of Alzheimer's disease*, 2008, 13, 255-266.
59. E. Krishnan. *Reduced glomerular function and prevalence of gout: NHANES 2009-10*, *PLoS One*, 2012, 7, e50046.
60. G. G. Teng, W. C. Tan-Koi, D. Dong, et al., *Is HLA-B*58:01 genotyping cost effective in guiding allopurinol use in gout patients with chronic kidney disease?*, *Pharmacogenomics*, 2020, 21, 279-291.
61. S. J. Chang, Y. C. Ko, T. N. Wang, et al., *High prevalence of gout and related risk factors in Taiwan's Aborigines*, *J Rheumatol*, 1997, 24, 1364-1369.
62. E. Roddy, W. Zhang, M. Doherty. *The changing epidemiology of gout*, *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007, 3, 443-449.
63. M. T. Maurano, R. Humbert, E. Rynes, et al., *Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA*, *Science*, 2012, 337, 1190-1195.

64. K.-H. Yu, P.-Y. Chang, S.-C. Chang, et al., *A comprehensive analysis of the association of common variants of ABCG2 with gout*, Scientific Reports, 2017, 7, 9988.
65. Y. Kawamura, H. Nakaoka, A. Nakayama, et al., *Genome-wide association study revealed novel loci which aggravate asymptomatic hyperuricaemia into gout*, Ann Rheum Dis, 2019, 78, 1430-1437.
66. Z. Li, Z. Zhou, X. Hou, et al., *Replication of Gout/Urate Concentrations GWAS Susceptibility Loci Associated with Gout in a Han Chinese Population*, Sci Rep, 2017, 7, 4094.
67. T. M. Bosch, L. M. Kjellberg, A. Bouwers, et al., *Detection of single nucleotide polymorphisms in the ABCG2 gene in a Dutch population*, Am J Pharmacogenomics, 2005, 5, 123-131.
68. L. Doron, G. G. Yaron, S. Marilyn, et al., *GeneCards: The Human Gene Database 2020* [www.genecards.org].
69. R. Li, L. Miao, L. Qin, et al., *A meta-analysis of the associations between the Q141K and Q126X ABCG2 gene variants and gout risk*, International journal of clinical and experimental pathology, 2015, 8, 9812-9823.
70. O. M. Woodward, A. Köttgen, J. Coresh, et al., *Identification of a urate transporter, ABCG2, with a common functional polymorphism causing gout*, Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106, 10338-10342.
71. H. Matsuo, T. Takada, K. Ichida, et al., *Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population*, Sci Transl Med, 2009, 1, 5ra11.
72. T. Takada, K. Ichida, H. Matsuo, et al., *ABCG2 dysfunction increases serum uric acid by decreased intestinal urate excretion*, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2014, 33, 275-281.
73. K. Yamagishi, T. Tanigawa, A. Kitamura, et al., *The rs2231142 variant of the ABCG2 gene is associated with uric acid levels and gout among Japanese people*, Rheumatology (Oxford), 2010, 49, 1461-1465.
74. A. Nakayama, H. Matsuo, H. Nakaoka, et al., *Common dysfunctional variants of ABCG2 have stronger impact on hyperuricemia progression than typical environmental risk factors*, Sci Rep, 2014, 4, 5227.

75. B. Stiburkova, K. Pavelcova, M. Pavlikova, et al., *The impact of dysfunctional variants of ABCG2 on hyperuricemia and gout in pediatric-onset patients*, *Arthritis Res Ther*, 2019, 21, 77.
76. N. Iwai, Y. Mino, M. Hosoyamada, et al., *A high prevalence of renal hypouricemia caused by inactive SLC22A12 in Japanese*, *Kidney Int*, 2004, 66, 935-944.
77. K. Ichida, M. Hosoyamada, I. Hisatome, et al., *Clinical and molecular analysis of patients with renal hypouricemia in Japan-influence of URAT1 gene on urinary urate excretion*, *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15, 164-173.
78. H. P. Tu, C. J. Chen, C. H. Lee, et al., *The SLC22A12 gene is associated with gout in Han Chinese and Solomon Islanders*, *Ann Rheum Dis*, 2010, 69, 1252-1254.
79. O. Hurba, A. Mancikova, V. Krylov, et al., *Complex analysis of urate transporters SLC2A9, SLC22A12 and functional characterization of non-synonymous allelic variants of GLUT9 in the Czech population: no evidence of effect on hyperuricemia and gout*, *PLoS One*, 2014, 9, e107902.
80. D. Gabrikova, J. Bernasovska, J. Sokolova, et al., *High frequency of SLC22A12 variants causing renal hypouricemia 1 in the Czech and Slovak Roma population; simple and rapid detection method by allele-specific polymerase chain reaction*, *Urolithiasis*, 2015, 43, 441-445.
81. Y. Zou, J. Du, Y. Zhu, et al., *Associations between the SLC22A12 gene and gout susceptibility: a meta-analysis*, *Clin Exp Rheumatol*, 2018, 36, 442-447.
82. M. Doblado, K. H. Moley. *Facilitative glucose transporter 9, a unique hexose and urate transporter*, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009, 297, E831-835.
83. P. F. McArdle, A. Parsa, Y. P. Chang, et al., *Association of a common nonsynonymous variant in GLUT9 with serum uric acid levels in old order amish*, *Arthritis Rheum*, 2008, 58, 2874-2881.
84. A. Brandstatter, S. Kiechl, B. Kollerits, et al., *Sex-specific association of the putative fructose transporter SLC2A9 variants with uric acid levels is modified by BMI*, *Diabetes Care*, 2008, 31, 1662-1667.
85. A. Doring, C. Gieger, D. Mehta, et al., *SLC2A9 influences uric acid concentrations with pronounced sex-specific effects*, *Nat Genet*, 2008, 40, 430-436.

86. Y. H. Lee, Y. H. Seo, J. H. Kim, et al., *Associations between SLC2A9 polymorphisms and gout susceptibility : A meta-analysis*, *Z Rheumatol*, 2017, 76, 64-70.
87. K. Stark, W. Reinhard, K. Neureuther, et al., *Association of common polymorphisms in GLUT9 gene with gout but not with coronary artery disease in a large case-control study*, *PLoS One*, 2008, 3, e1948.
88. J. E. Hollis-Moffatt, X. Xu, N. Dalbeth, et al., *Role of the urate transporter SLC2A9 gene in susceptibility to gout in New Zealand Maori, Pacific Island, and Caucasian case-control sample sets*, *Arthritis Rheum*, 2009, 60, 3485-3492.
89. Q. Meng, J. Yue, M. Shang, et al., *Correlation of GLUT9 Polymorphisms With Gout Risk*, *Medicine (Baltimore)*, 2015, 94, e1742.
90. V. Vitart, I. Rudan, C. Hayward, et al., *SLC2A9 is a newly identified urate transporter influencing serum urate concentration, urate excretion and gout*, *Nat Genet*, 2008, 40, 437-442.
91. T. Kimura, M. Takahashi, K. Yan, et al., *Expression of SLC2A9 isoforms in the kidney and their localization in polarized epithelial cells*, *PLoS One*, 2014, 9, e84996.
92. D. A. Schaer, D. Hirschhorn-Cymerman, J. D. Wolchok. *Targeting tumor-necrosis factor receptor pathways for tumor immunotherapy*, *J Immunother Cancer*, 2014, 2, 7.
93. R. R. El Tahan, A. M. Ghoneim, N. El Mashad. *TNF- α gene polymorphisms and expression*, *SpringerPlus*, 2016, 5, 1508.
94. K. Yokose, S. Sato, T. Asano, et al., *TNF-alpha potentiates uric acid-induced interleukin-1beta (IL-1beta) secretion in human neutrophils*, *Mod Rheumatol*, 2018, 28, 513-517.
95. A. K. Tausche, K. Richter, A. Grassler, et al., *Severe gouty arthritis refractory to anti-inflammatory drugs: treatment with anti-tumour necrosis factor alpha as a new therapeutic option*, *Ann Rheum Dis*, 2004, 63, 1351-1352.
96. Y.-F. Qing, J.-G. Zhou, Q.-B. Zhang, et al., *Association of TLR4 Gene rs2149356 polymorphism with primary gouty arthritis in a case-control study*, *PLoS One*, 2013, 8, e64845.

97. H. Rasheed, C. McKinney, L. K. Stamp, et al., *The Toll-Like Receptor 4 (TLR4) variant rs2149356 and risk of gout in European and Polynesian sample sets*, PLoS One, 2016, 11, e0147939.
98. R. J. Torres. *Toll-Like receptor 4 (TLR4) polymorphism rs2149356 and risk of gout in a Spanish cohort*, Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2020, 1-8.
99. T. Chiba, H. Matsuo, Y. Kawamura, et al., *NPT1/SLC17A1 is a renal urate exporter in humans and its common gain-of-function variant decreases the risk of renal underexcretion gout*, Arthritis Rheumatol, 2015, 67, 281-287.
100. Z. W. Zhou, L. L. Cui, L. Han, et al., *Polymorphisms in GCKR, SLC17A1 and SLC22A12 were associated with phenotype gout in Han Chinese males: a case-control study*, BMC Med Genet, 2015, 16, 66.
101. J. E. Hollis-Moffatt, A. J. Phipps-Green, B. Chapman, et al., *The renal urate transporter SLC17A1 locus: confirmation of association with gout*, Arthritis Res Ther, 2012, 14, R92.
102. Đào Hùng Hạnh, M. Harun-Or-Rashid, J. Sakamoto. *Body composition and metabolic syndrome in patients with primary gout in Vietnam*, Rheumatology (Oxford), 2010, 49, 2400-2407.
103. Nguyễn Thị Ái Thùy, Đinh Thanh Huệ, Võ Tam, et al., *Nghiên cứu các đặc điểm dịch tễ học, lâm sàng, cận lâm sàng bệnh gút tại một số bệnh viện thành phố Huế*, Y học Thực hành, 2012, 807, 4.
104. N. T. Á. Thùy. *Khảo sát các yếu tố liên quan đến bệnh Gút tại bệnh viện Thành phố Huế - tỉnh Thừa Thiên Huế*, Y học Thực hành, 2010, 717, 03.
105. P. Q. Cừ. *Nghiên cứu các biến chứng của bệnh gút*, Y học Thực hành, 2009, 675, 03.
106. H. T. T. Tâm, N. T. Hoàng, N. Đ. Công. *Đặc điểm của bệnh Gút ở người lớn tuổi tại Khoa Nội Cơ Xương Khớp Bệnh viện Thống Nhất*, Y học Thành phố Hồ Chí Minh, 2013, 17, 5.
107. Doãn Thị Tường Vi, Trần Văn Lộc, Q. H. Trung. *Nghiên cứu mối liên quan giữa tình trạng dinh dưỡng với tăng axit uric máu và bệnh gout ở người trưởng thành tại bệnh viện 19.8*, Tạp chí Y học thực hành, 2009, 671, 299-303.

108. N. T. Á. Thùy, Đ. T. Huê, V. Tam, et al., *Nghiên cứu các đặc điểm dịch tễ học, lâm sàng, cận lâm sàng bệnh gút tại một số bệnh viện thành phố Huế*, Y học Thực hành, 2012, 807, 4.
109. Trần Thị Minh Tâm, Vũ Đình Chính, Lê Thế Biểu, et al., *Nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng acid uric máu và nước tiểu ở người bình thường và ở bệnh nhân gút*, Y học Thực hành, 2002, 422, 154-155.
110. Đỗ Thị Quỳnh Nga, Trần Thị Hải Âu, Vũ Thị Kim Liên, et al., *Khảo sát liên quan giữa HLA B*5801 và nguy cơ mắc các phản ứng dị ứng nặng do điều trị Allopurinol tại Bệnh viện Bạch Mai, Hà Nội*, Tạp chí Y học dự phòng, 2015, 168, 396.
111. D. Zhou, Y. Liu, X. Zhang, et al., *Functional polymorphisms of the ABCG2 gene are associated with gout disease in the Chinese Han male population*, Int J Mol Sci, 2014, 15, 9149-9159.
112. E. W. Champion, R. J. Glynn, L. O. DeLabry. *Asymptomatic hyperuricemia. Risks and consequences in the Normative Aging Study*, Am J Med, 1987, 82, 421-426.
113. P. P. Khanna, D. Khanna. *Health-Related Quality of Life and Outcome Measures in Gout*, W.B. Saunders, Philadelphia, 2012.
114. L. K. Stamp, X. Zhu, N. Dalbeth, et al., *Serum urate as a soluble biomarker in chronic gout-evidence that serum urate fulfills the OMERACT validation criteria for soluble biomarkers*, Semin Arthritis Rheum, 2011, 40, 483-500.
115. H. K. Choi. *Epidemiology of gout*, Elsevier, Philadelphia, 2015.
116. T. Higashino, T. Takada, H. Nakaoka, et al., *Multiple common and rare variants of ABCG2 cause gout*, RMD Open, 2017, 3, e000464.
117. S.-J. Chang, P.-C. Tsai, C.-J. Chen, et al., *The polymorphism-863C/A in tumour necrosis factor- α gene contributes an independent association to gout*, Rheumatology, 2007, 46, 1662-1666.
118. R. Li, L. Miao, L. Qin, et al. *A meta-analysis of the associations between the Q141K and Q126X ABCG2 gene variants and gout risk*. International journal of clinical and experimental pathology [Internet]. 2015 2015; 8(9):[9812-9823 pp.].

119. S. K. Cho, S. Kim, J.-Y. Chung, et al., *Discovery of URAT1 SNPs and association between serum uric acid levels and URAT1*, *BMJ Open*, 2015, 5, e009360.
120. P. P. Khanna, D. Khanna. *Chapter 18 - Health-Related Quality of Life and Outcome Measures in Gout*. In: R. Terkeltaub, editor. *Gout & Other Crystal Arthropathies*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2012. p. 217-225.
121. N. Dalbeth, T. R. Merriman, L. K. Stamp. *Gout*, *Lancet*, 2016, 388, 2039-2052.
122. L. A. Doyle, W. Yang, L. V. Abruzzo, et al., *A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95, 15665-15670.
123. R. Padmanabhan, K. G. Chen, J. P. Gillet, et al., *Regulation and expression of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 in human embryonic stem cells*, *Stem Cells*, 2012, 30, 2175-2187.
124. Á. Szepesi, Z. Matula, A. Szigeti, et al., *ABCG2 is a selectable marker for enhanced multilineage differentiation potential in periodontal ligament stem cells*, *Stem Cells Dev*, 2015, 24, 244-252.
125. A. Dehghan, A. Köttgen, Q. Yang, et al., *Association of three genetic loci with uric acid concentration and risk of gout: a genome-wide association study*, *Lancet*, 2008, 372, 1953-1961.
126. M. C. Cleophas, L. A. Joosten, L. K. Stamp, et al., *ABCG2 polymorphisms in gout: insights into disease susceptibility and treatment approaches*, *Pharmacogenomics and personalized medicine*, 2017, 10, 129-142.
127. IGSR: The International Genome Sample Resource. *IGSR and the 1000 Genomes Project 2020* [<http://phase3browser.1000genomes.org>].
128. D. Campa, B. Pardini, A. Naccarati, et al., *A gene-wide investigation on polymorphisms in the ABCG2/BRCP transporter and susceptibility to colorectal cancer*, *Mutat Res*, 2008, 645, 56-60.
129. M. Delord, P. Rousselot, J. M. Cayuela, et al., *High imatinib dose overcomes insufficient response associated with ABCG2 haplotype in chronic myelogenous leukemia patients*, *Oncotarget*, 2013, 4, 1582-1591.

130. A. Enomoto, H. Kimura, A. Chairoungdua, et al., *Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels*, *Nature*, 2002, 417, 447-452.
131. M. Tanaka, K. Itoh, K. Matsushita, et al., *Two male siblings with hereditary renal hypouricemia and exercise-induced ARF*, *Am J Kidney Dis*, 2003, 42, 1287-1292.
132. K. Ichida, M. Hosoyamada, N. Kamatani, et al., *Age and origin of the G774A mutation in SLC22A12 causing renal hypouricemia in Japanese*, *Clin Genet*, 2008, 74, 243-251.
133. N. Wakida, Đỗ Gia Tuyền, M. Adachi, et al., *Mutations in human urate transporter 1 gene in presecretory reabsorption defect type of familial renal hypouricemia*, *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90, 2169-2174.
134. J. Graessler, S. Unger, A. K. Tausche, et al., *Gout--new insights into a forgotten disease*, *Horm Metab Res*, 2006, 38, 203-204.
135. M. J. Caulfield, P. B. Munroe, D. O'Neill, et al., *SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans*, *PLoS Med*, 2008, 5, e197.
136. V. S. Voruganti, S. Laston, K. Haack, et al., *Serum uric acid concentrations and SLC2A9 genetic variation in Hispanic children: the Viva La Familia Study*, *Am J Clin Nutr*, 2015, 101, 725-732.
137. W. Wan, X. Xu, D. B. Zhao, et al., *Polymorphisms of uric transporter proteins in the pathogenesis of gout in a Chinese Han population*, *Genet Mol Res*, 2015, 14, 2546-2550.
138. X. Zhang, X. Yang, M. Wang, et al., *Association between SLC2A9 (GLUT9) gene polymorphisms and gout susceptibility: an updated meta-analysis*, *Rheumatol Int*, 2016, 36, 1157-1165.
139. Y.-L. Hou, X.-L. Yang, C.-X. Wang, et al., *Hypertriglyceridemia and hyperuricemia: a retrospective study of urban residents*, *Lipids in health and disease*, 2019, 18, 81-81.
140. J. H. Lee, J. A. Yang, K. Shin, et al., *Elderly Patients Exhibit Stronger Inflammatory Responses during Gout Attacks*, *Journal of Korean medical science*, 2017, 32, 1967-1973.

141. A. Alberts, A. Klingberg, A. K. Wessig, et al., *C-reactive protein (CRP) recognizes uric acid crystals and recruits proteases C1 and MASP1*, Scientific Reports, 2020, 10, 6391.
142. T. C. Peng, C. C. Wang, T. W. Kao, et al., *Relationship between Hyperuricemia and Lipid Profiles in US Adults*, BioMed Research International, 2015, 2015, 127596.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU KHOA HỌC
CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Nguyễn Thùy Dương, Nguyễn Doãn Tình, **Nguyễn Trần Minh Thắng**, Nguyễn Hải Hà, Nông Văn Hải, *Khảo sát mối liên quan của SLC17A1 rs1165196 với bệnh Gút ở người Việt Nam*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2018, 16(3), 407–414.

2. Nguyễn Thùy Dương, Nguyễn Thy Ngọc, **Nguyễn Trần Minh Thắng**, Bạch Thị Hoài Phương, Nguyễn Thanh Ngà, Nguyễn Doãn Tình, Đỗ Hải Quỳnh, Nguyễn Đăng Tôn, Nông Văn Hải, *Polymorphisms of ABCG2 and SLC22A12 Genes Associated with Gout risk in Vietnamese population*, Medicina, 2019, 55, 11.

3. **Nguyễn Trần Minh Thắng**, Nguyễn Doãn Tình, Nông Văn Hải, Nguyễn Thùy Dương, *Khảo sát mối liên quan của SLC2A9 rs12510549 với nồng độ Acid Uric và bệnh Gút ở người Việt Nam*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2020, 18(1), 49-57.

4. **Nguyễn Trần Minh Thắng**, Nguyễn Thùy Dương, Nông Văn Hải, *Vai trò của các yếu tố nguy cơ đối với bệnh Gout*, Tạp chí Y học Việt Nam, 2020, 490(5), 252-255.

5. **Nguyễn Trần Minh Thắng**, Nguyễn Thy Ngọc, Nguyễn Thanh Ngà, Nông Văn Hải, Nguyễn Thùy Dương, *Study on the association of SLC2A9 rs16890979 with gout in 410 vietnamese individuals*, Tạp chí Công nghệ Sinh học, 2021, 43(1), 129-136.

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC I
DANH SÁCH MẪU NGHIÊN CỨU

PHỤ LỤC II
ĐIỀU KIỆN PHẢN ỨNG NHÂN GEN CHỨA ĐA
HÌNH

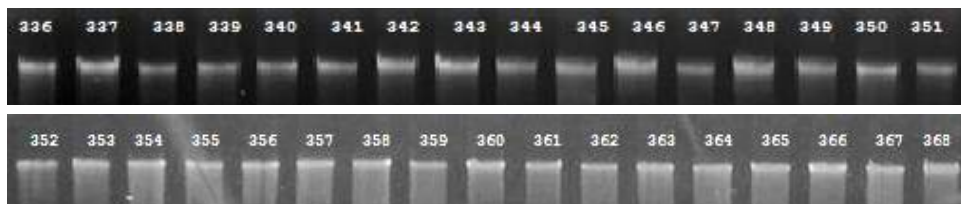
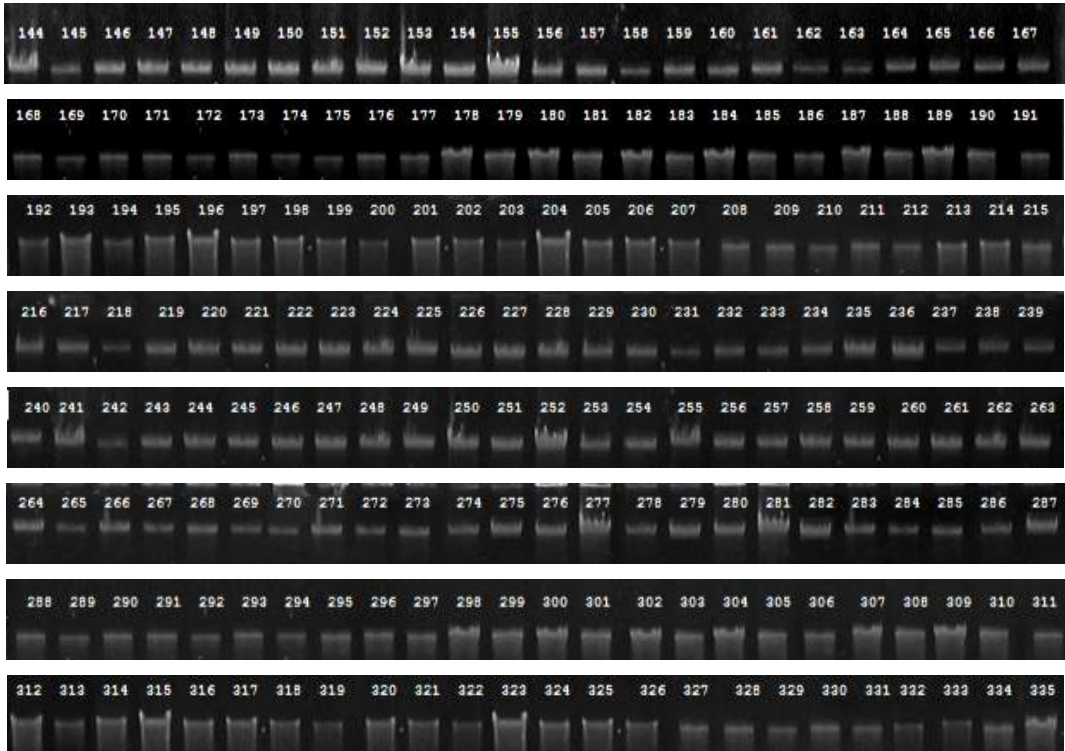
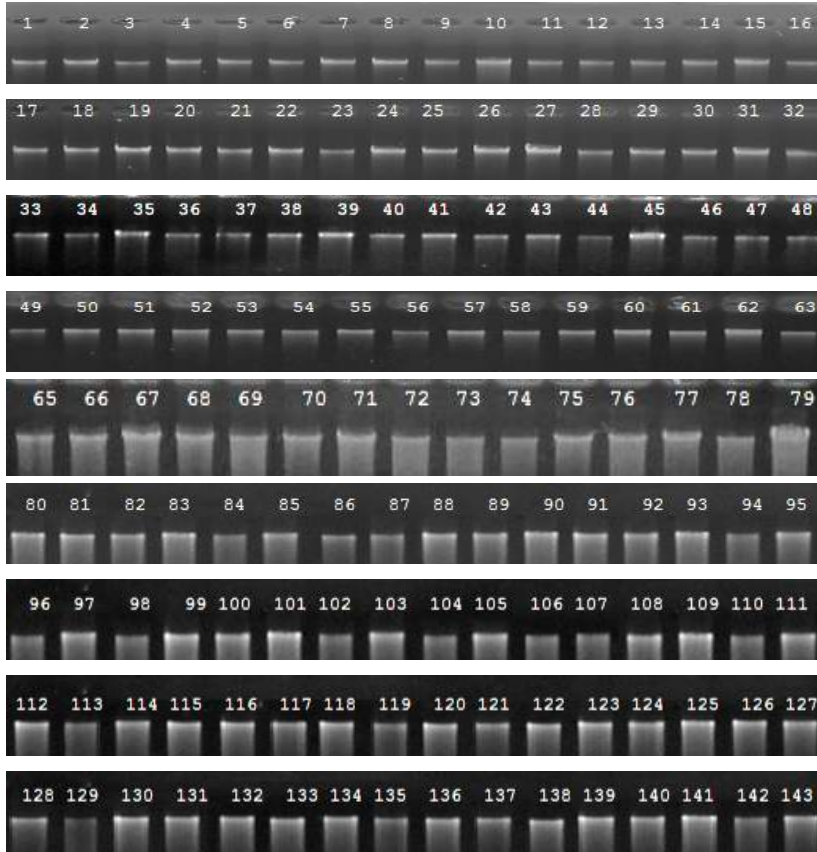
Bảng 2A. Trình tự các cặp mồi sử dụng cho phản ứng PCR

GEN	SNP	Primer	Trình tự	Kích thước (bp)
<i>ABCG2</i>	rs72552713	rs72552713-F	TGGATTCAAAGTAGCCATGAGA	~300
		rs72552713-R	ATCAGCCAAAGCACTTACCC	
	rs12505410	rs12505410-F	CCCTTGGCACCTTAAATGAA	~300
		rs12505410-R	ATAGGTGGCTGGCCCTATT	
<i>SLC22A12</i>	rs11231825	rs11231825-F	CCCTAGAGGTCACCAGACCA	~170
		rs11231825-R	ACTGGGCCATGGGCTTCTGATC	
	rs7932775	rs7932775-F	GCCTGAAAGTCAGGGACAAG	~300
		rs7932775-R	ACCACACAAGAGGGAGATGC	
<i>TNFA</i>	rs1800629	rs1800629-F	GGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT	~150
		rs1800629-R	GGGACACACAAGCATCAAG	
<i>SLC2A9</i>	rs12510549	rs12510549-F	ACTCGCAAGGCTGAAACAGTCA	~350
		rs12510549-R	CAGCAGTAGCACAGTCCATA	
	rs16890979	rs16890979-F	5'-TGAGCAAATCATGGCATCTC-3'	~259
		rs16890979-R	5'-ACCTCCTCTACCTCTTGTTAA-3'	
<i>TLR4</i>	rs2149356	rs2149356-F	ATCTGTGACACTTATGTGTAATTAT	~150
		rs2149356-R	CCTTGGATCAAGTTTAGCCATT	
<i>SLC17A1</i>	rs1165196	rs1165196-F	CCATATTGGCATCTCCAGA	~450
		rs1165196-R	ATGTGTGCTGTTGCTGGAGT	

Bảng 2B. Thành phần và chu trình nhiệt của các phản ứng PCR

SNP	Thành phần (µl)						Chu trình nhiệt
	tDNA 10 ng/µl	Taq 5U/µl	Buffer 10X	dNTP 2,5 mM	Primer F/R 10 pmol	H ₂ O	
rs72552713	2	0,1	2	1	0,4	14,1	95°C/5 phút, 95°C/30 giây, 55°C/30 giây, 72°C/15 giây, 72°C/5 phút (40 chu kì)
rs12505410	2	0,1	2	1	0,4	14,1	95°C/5 phút, 95°C/30 giây, 59°C/30 giây, 72°C/20 giây, 72°C/5 phút (40 chu kì)
rs11231825	2	0,1	2	1	0,2	14,5	95°C/5 phút, 95°C/30 giây, 62°C/30 giây, 72°C/15 giây, 72°C/5 phút (40 chu kì)
rs7932775	2	0,1	2	1	0,3	14,3	95°C/5 phút, 95°C/30 giây, 60°C/30 giây, 72°C/20 giây, 72°C/5 phút (40 chu kì)
rs12510549	2	0,1	2	1	0,3	14,1	95°C/5 phút, 95°C/30 giây, 60°C/30 giây, 72°C/20 giây, 72°C/5 phút (40 chu kì)
rs16890979	2	0,1	2	1	0,3	14,1	95°C/5 phút, 95°C/30 giây, 60°C/30 giây, 72°C/20 giây, 72°C/5 phút (40 chu kì)
rs1800629	2	0,1	2	1	0,3	14,3	95°C/5 phút, 95°C/30 giây, 60°C/30 giây, 72°C/10 giây, 72°C/5 phút (40 chu kì)
rs2149356	2	0,1	2	1	0,15	14,6	95°C/5 phút, 95°C/30 giây, 58°C/30 giây, 72°C/10 giây, 72°C/5 phút (40 chu kì)
rs1165196	4	0,1	2	1	0,3	12,3	95°C/5 phút, 95°C/30 giây, 58°C/30 giây, 72°C/30 giây, 72°C/5 phút (40 chu kì)

PHỤ LỤC III
KẾT QUẢ TÁCH CHIẾT DNA TỔNG SỐ





Hình 3. Điện di đồ sản phẩm DNA tổng số của các đối tượng trong nghiên cứu

1-351: Mẫu đối chứng HG-C-001 đến HG-C-351

352-521: Mẫu bệnh HG-P-001 đến HG-P-170

PHỤ LỤC IV
KẾT QUẢ PCR, CẮT ENZYME, GIẢI TRÌNH TỰ GEN
CỦA ĐA HÌNH *ABCG2* rs72552713

1. Kết quả PCR khuếch đại vùng trình tự đích chứa SNP *ABCG2* rs72552713



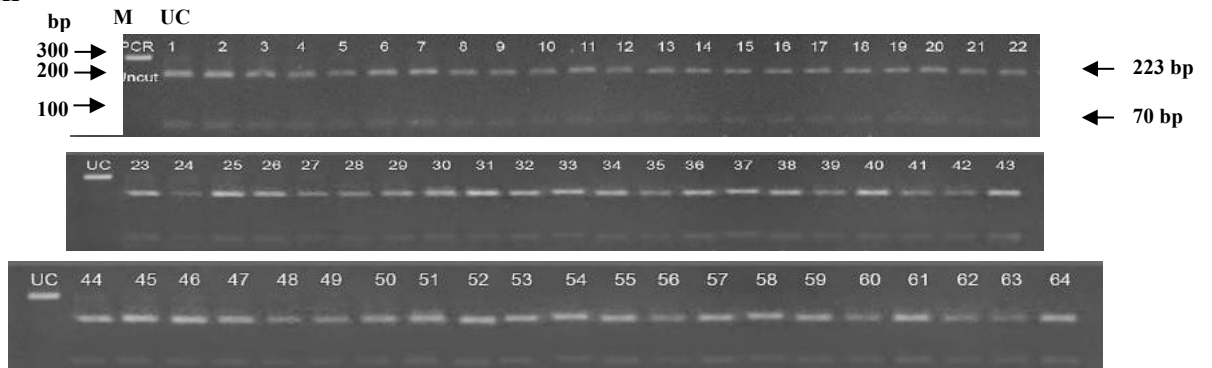


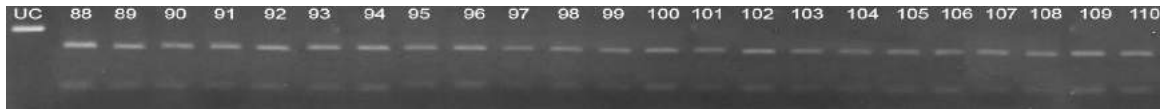
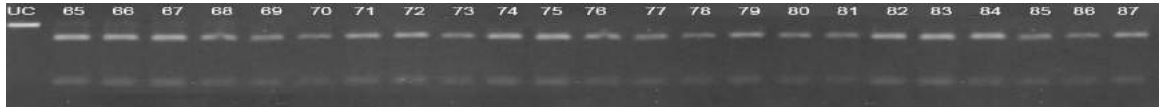
Hình 4A. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng trình tự đích đa hình *ABCG2* rs72552713

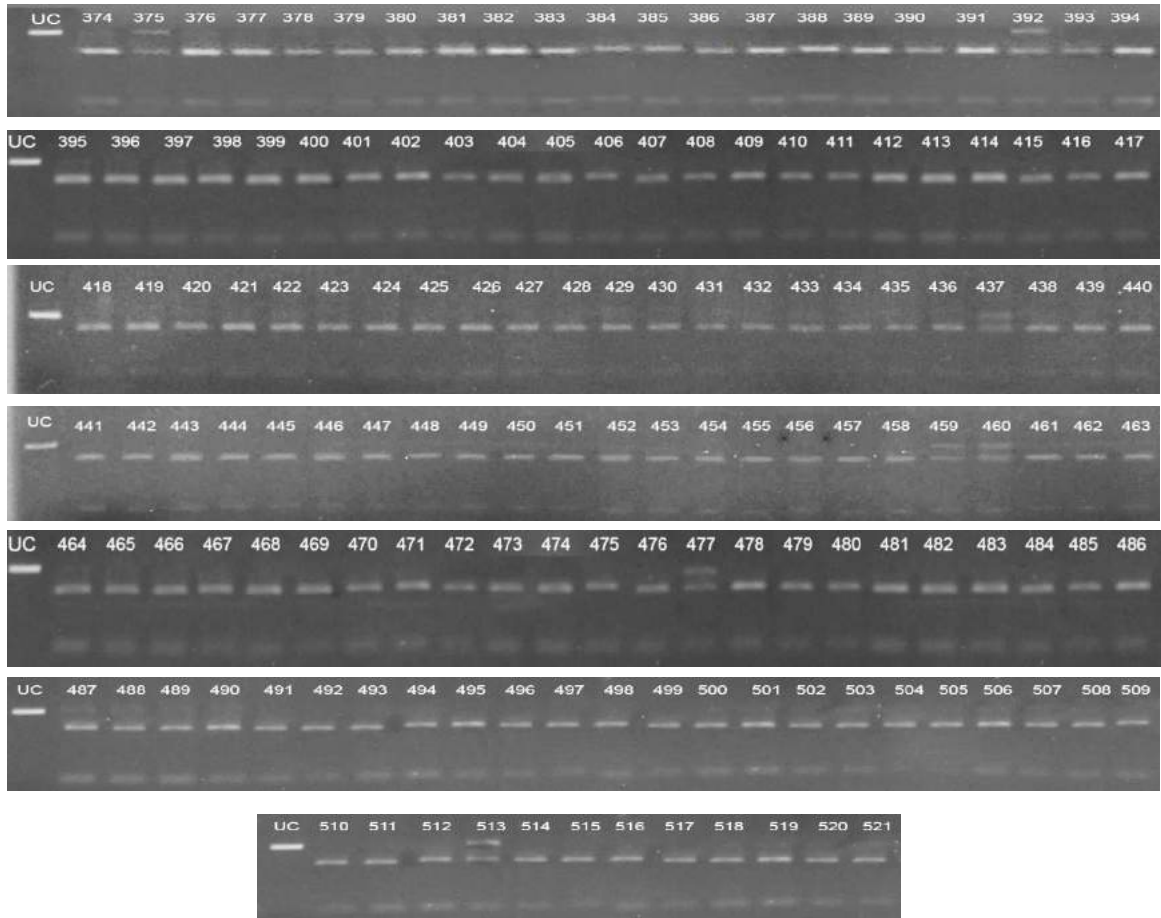
M: Marker 100bp; +: Đối chứng dương; -: Đối chứng âm

1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 352-521: HG-P-001 đến HG-P-170

2. Xác định kiểu gen *ABCG2* rs72552713 bằng phương pháp cắt enzyme giới hạn





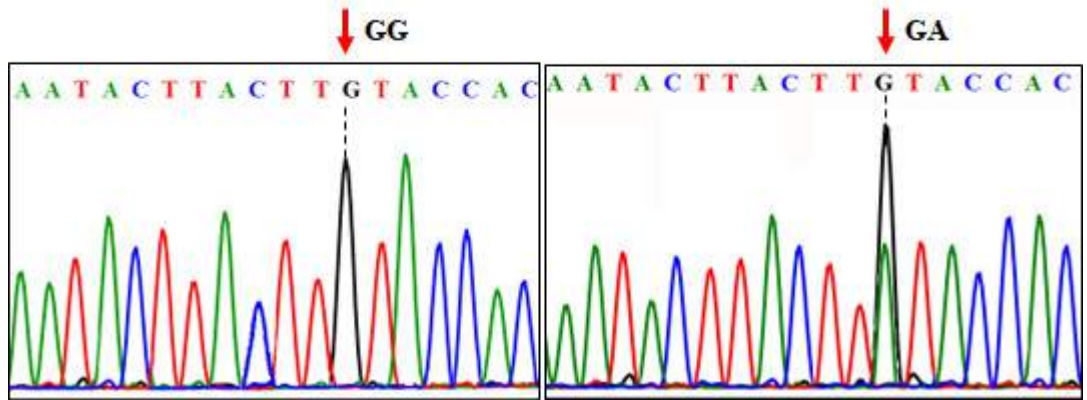


Hình 4B. Điện di sản phẩm cắt enzyme *RsaI* của các mẫu

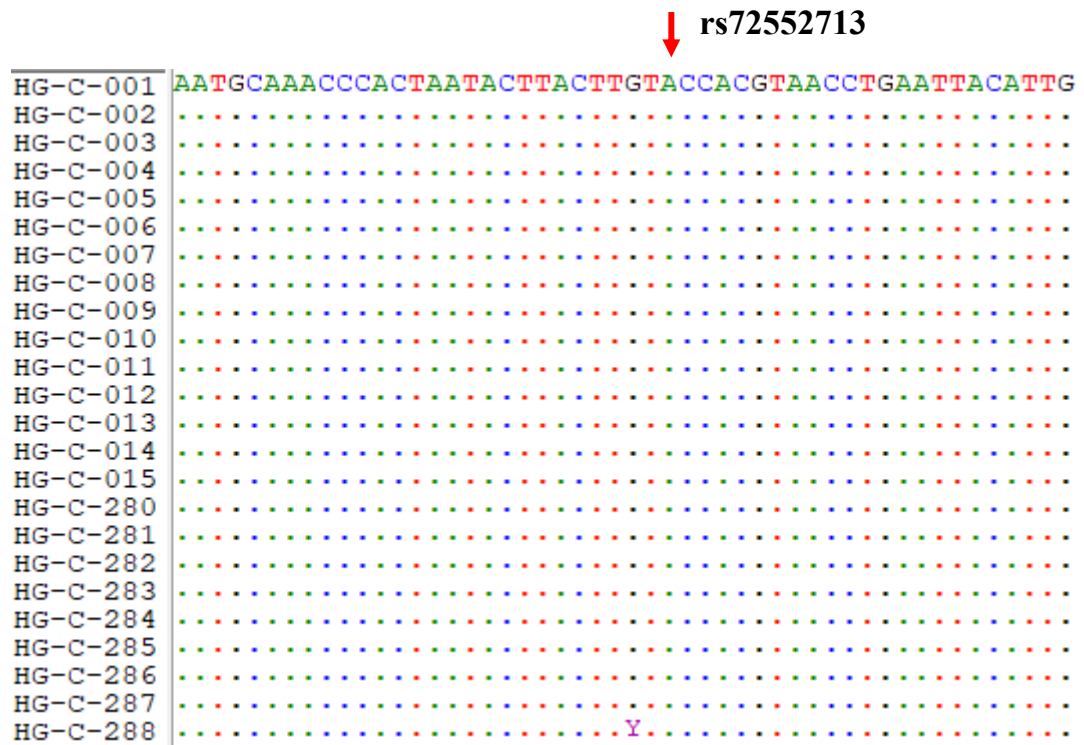
M: Marker 100bp; PCR – Uncut (UC): Mẫu PCR uncut;

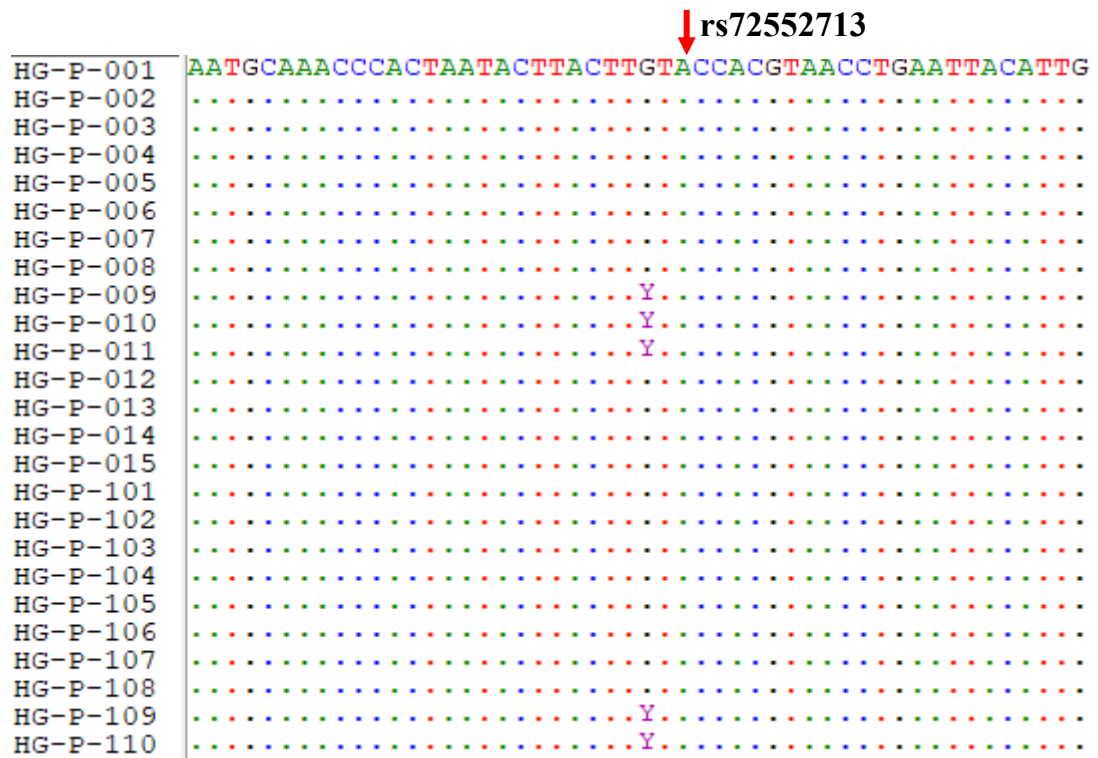
1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 352-521: HG-P-001 đến HG-P-170

3. Kết quả xác định kiểu gen *ABCG2* rs72552713 bằng phương pháp giải trình tự



Hình 4C. Trình tự nucleotide 2 mẫu đại diện có kiểu gen GA và GG của đa hình *ABCG2* rs72552713

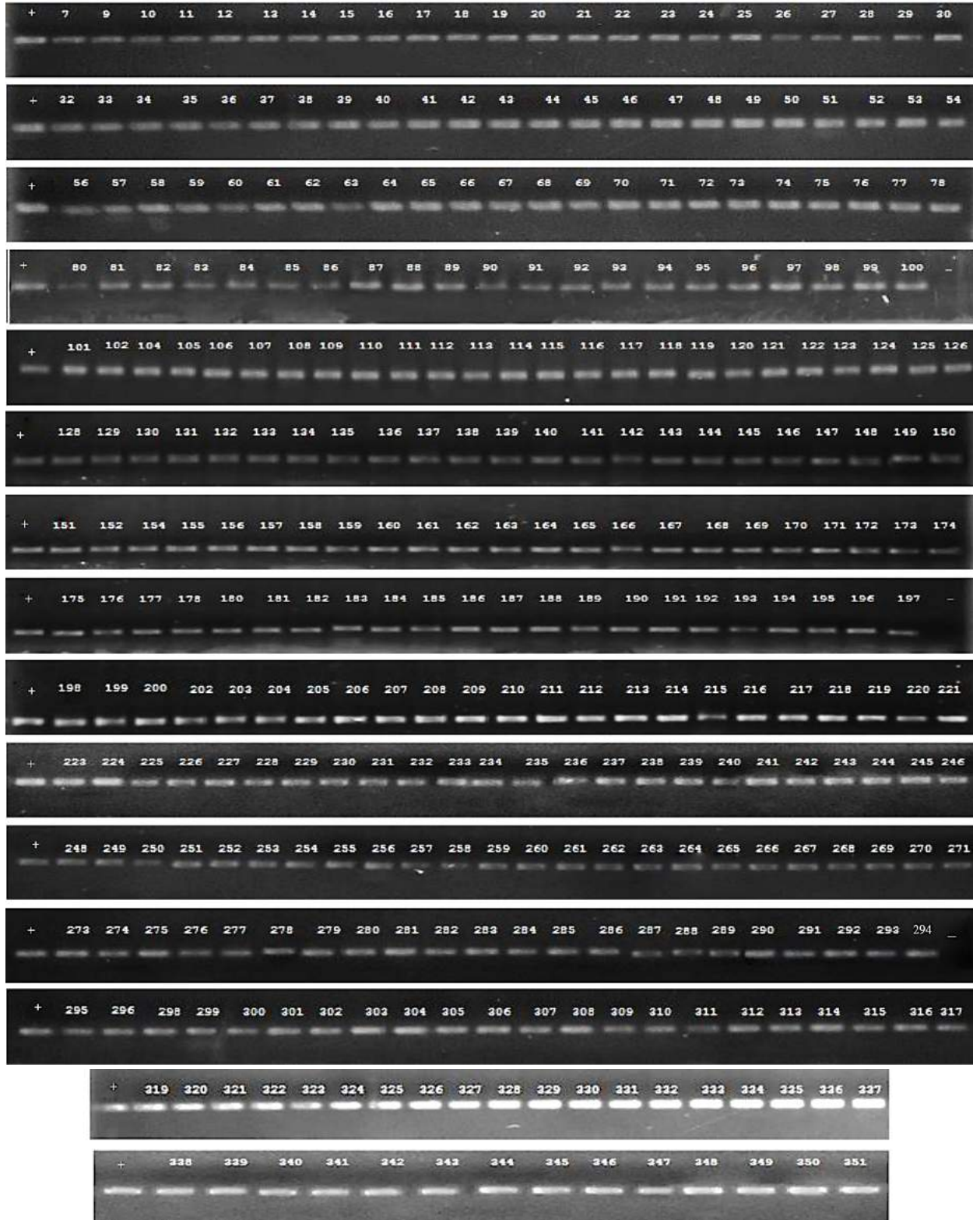
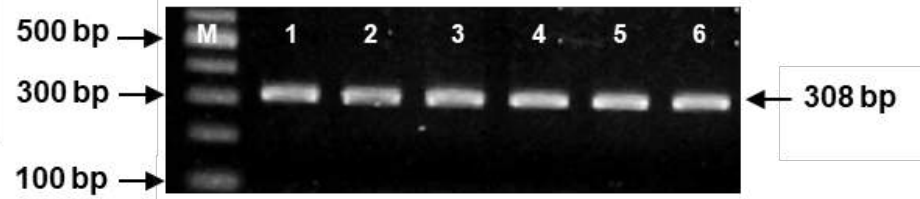


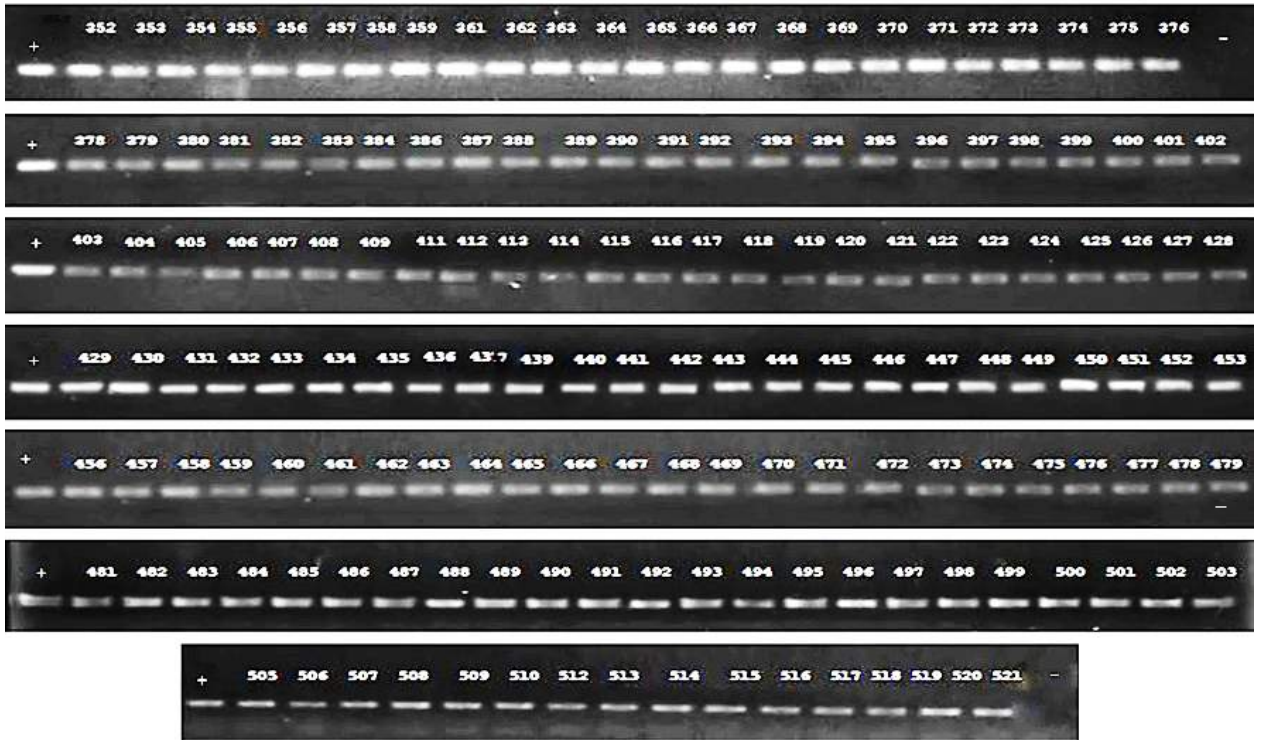


Hình 4D. Trình tự nucleotide có chứa đa hình *ABCG2* rs72552713 của 50 mẫu đối chứng và mẫu bệnh

PHỤ LỤC V
KẾT QUẢ PCR, CẮT ENZYME, GIẢI TRÌNH TỰ
GEN CỦA ĐA HÌNH *ABCG2* rs12505410

1. Kết quả PCR khuếch đại vùng trình tự đích chứa *ABCG2* rs12505410



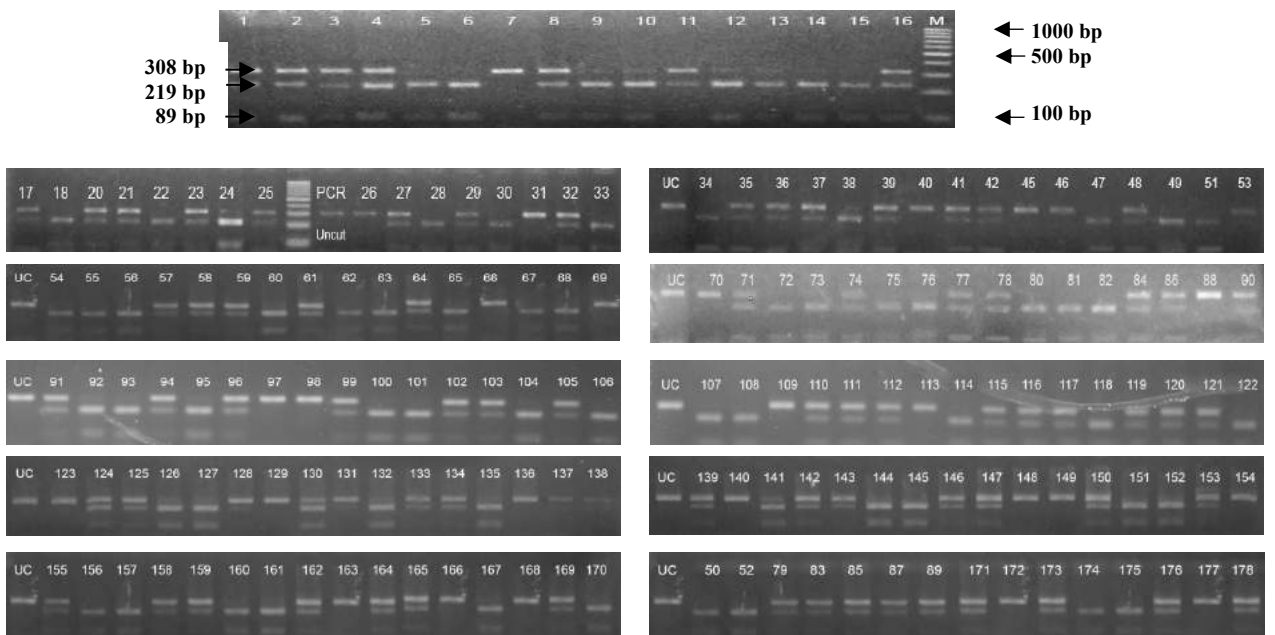


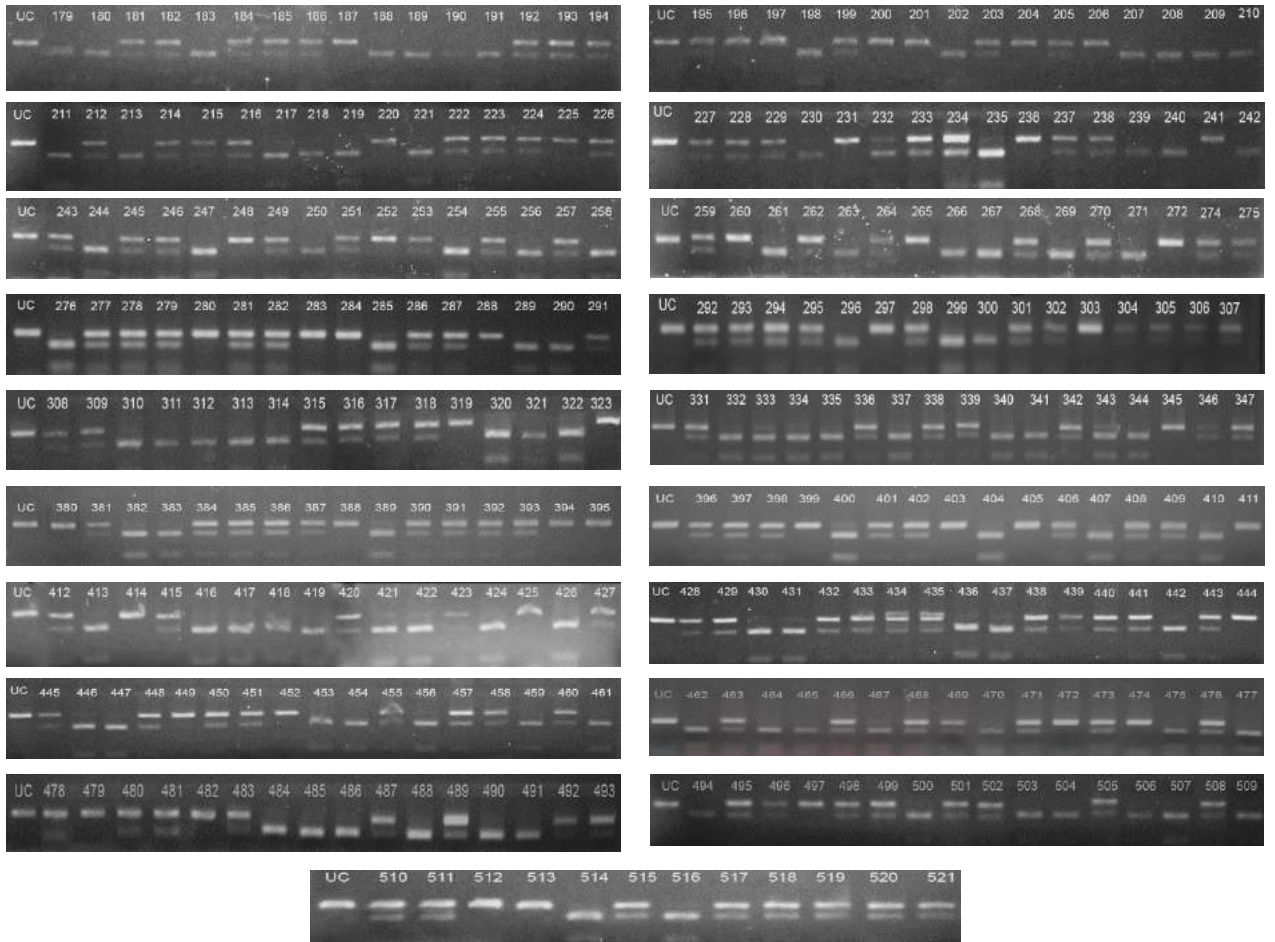
Hình 5A. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại vùng trình tự đích chứa đa hình *ABCG2* rs12505410 trên các mẫu nghiên cứu

M: Marker 100bp; +: Đối chứng dương; -: Đối chứng âm

1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 352-521: HG-P-001 đến HG-P-170

2. Xác định kiểu gen *ABCG2* rs12505410 bằng phương pháp cắt enzyme giới hạn



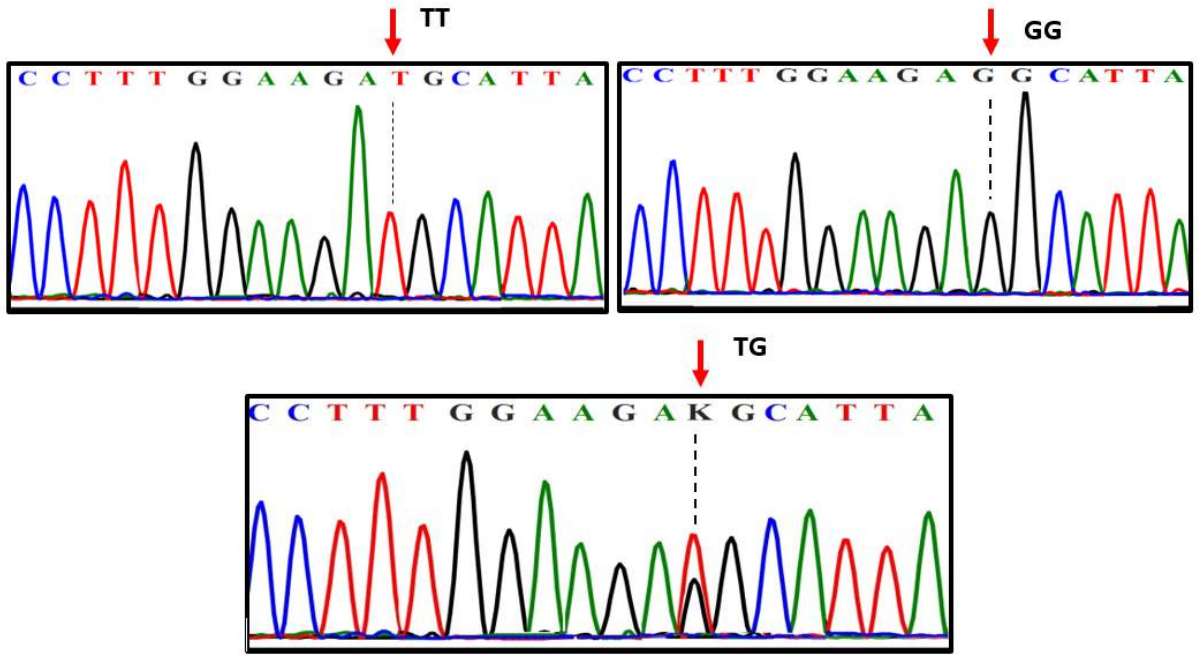


Hình 5B. Điện di đồ sản phẩm PCR sau khi được xử lý với enzyme *NsiI*

M:Marker 100bp; PCR – Uncut (UC): Mẫu PCR uncut;

1-170: HG-P-001 đến HG-P-170; 171-521: HG-C-001 đến HG-C-351

3. Kết quả xác định kiểu gen *ABCG2* rs12505410 bằng phương pháp giải trình tự



Hình 5C. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen TT, GG và TG của đa hình rs12505410

↓ rs12505410

HG-P-031	TTTTCCAAATACAACCTTTGGAAGAGGCATTTACAGAGGCCAAGTTTGAA
HG-P-032K.....
HG-P-033T.....
HG-P-034T.....
HG-P-035K.....
HG-P-036K.....
HG-P-037K.....
HG-P-038T.....
HG-P-039K.....
HG-P-040
HG-P-060T.....
HG-P-061K.....
HG-P-062T.....
HG-P-063T.....
HG-P-064K.....
HG-P-065T.....
HG-P-066
HG-P-067T.....
HG-P-068T.....
HG-P-069
HG-P-070
HG-P-071K.....
HG-P-072T.....
HG-P-073T.....
HG-P-074K.....

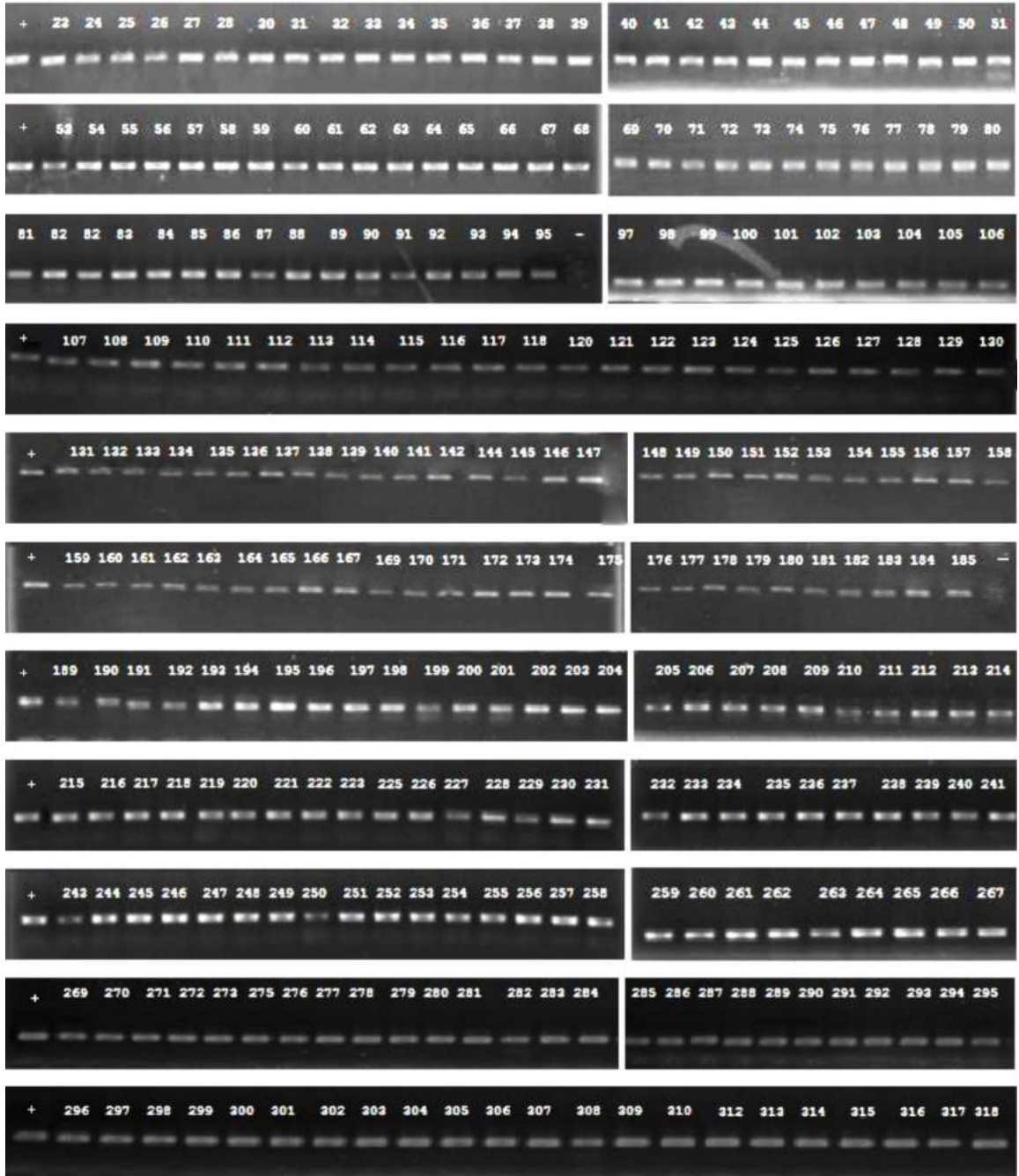
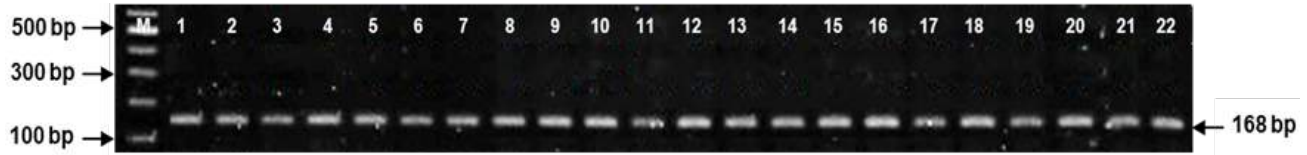
↓ rs12505410

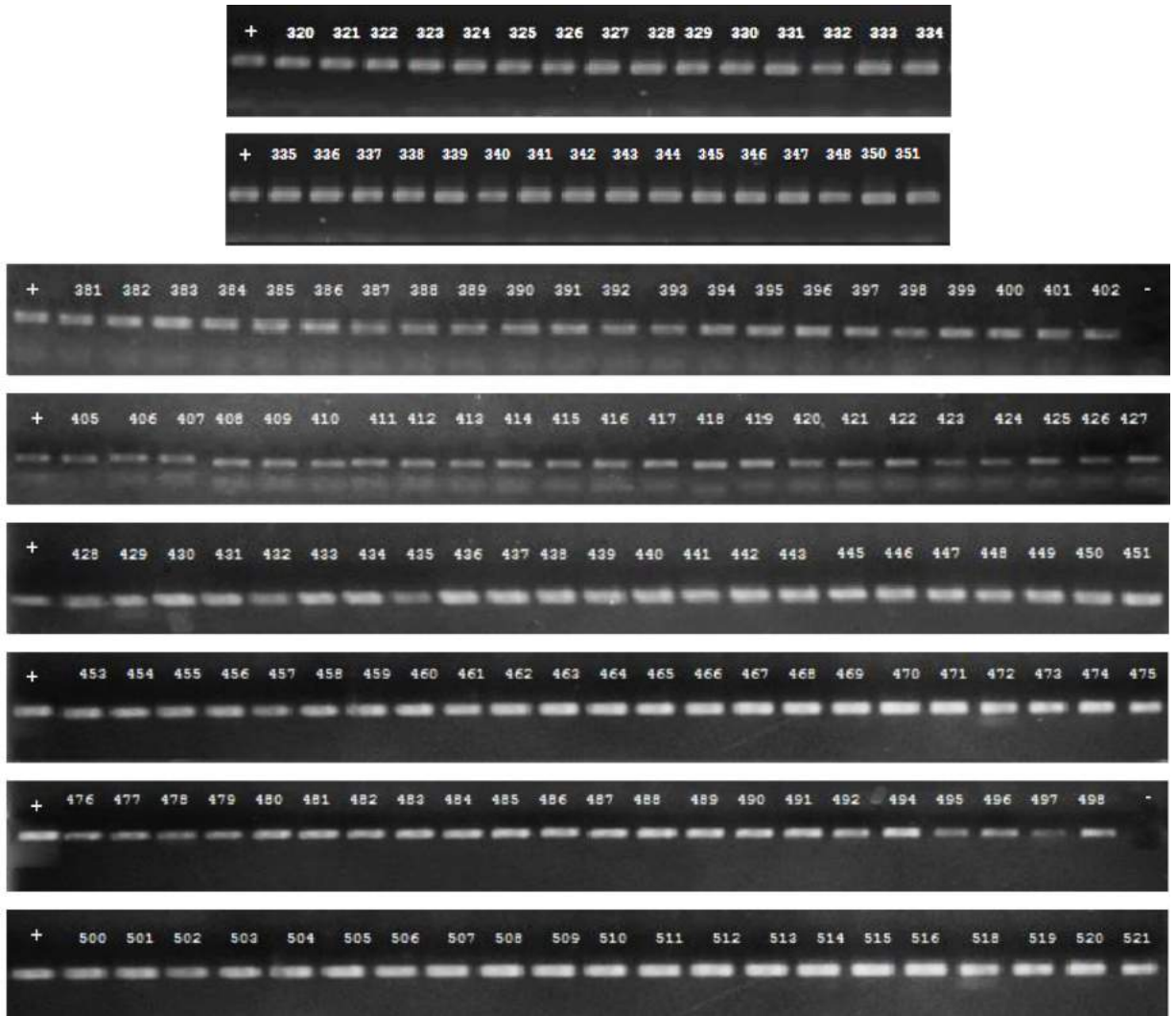
HG-C-002	TTTTCCAAATACAACCTTTGGAAGAGGCATTATACAGAGGCCAAGTTTGAA
HG-C-003 K
HG-C-004 T
HG-C-005 T
HG-C-006 K
HG-C-007
HG-C-008 K
HG-C-009 T
HG-C-010 T
HG-C-011 K
HG-C-012 K
HG-C-013 T
HG-C-014 K
HG-C-015 K
HG-C-016 K
HG-C-017
HG-C-018 T
HG-C-019 T
HG-C-020 T
HG-C-021 T
HG-C-022 K
HG-C-023 K
HG-C-024 K
HG-C-025 K

Hình 5D. Trình tự nucleotide có chứa đa hình *ABCG2* rs12505410 của 50 mẫu đối chứng và mẫu bệnh

PHỤ LỤC VI
KẾT QUẢ PCR, CẮT ENZYME, GIẢI TRÌNH TỰ
GEN CỦA ĐA HÌNH *SLC22A12* rs11231825

1. Kết quả PCR khuếch đại vùng trình tự đích chứa *SLC22A12* rs11231825

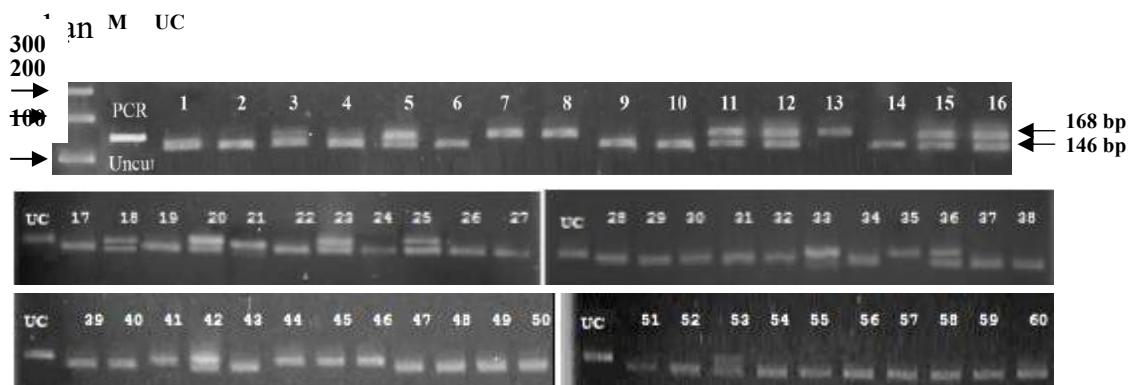


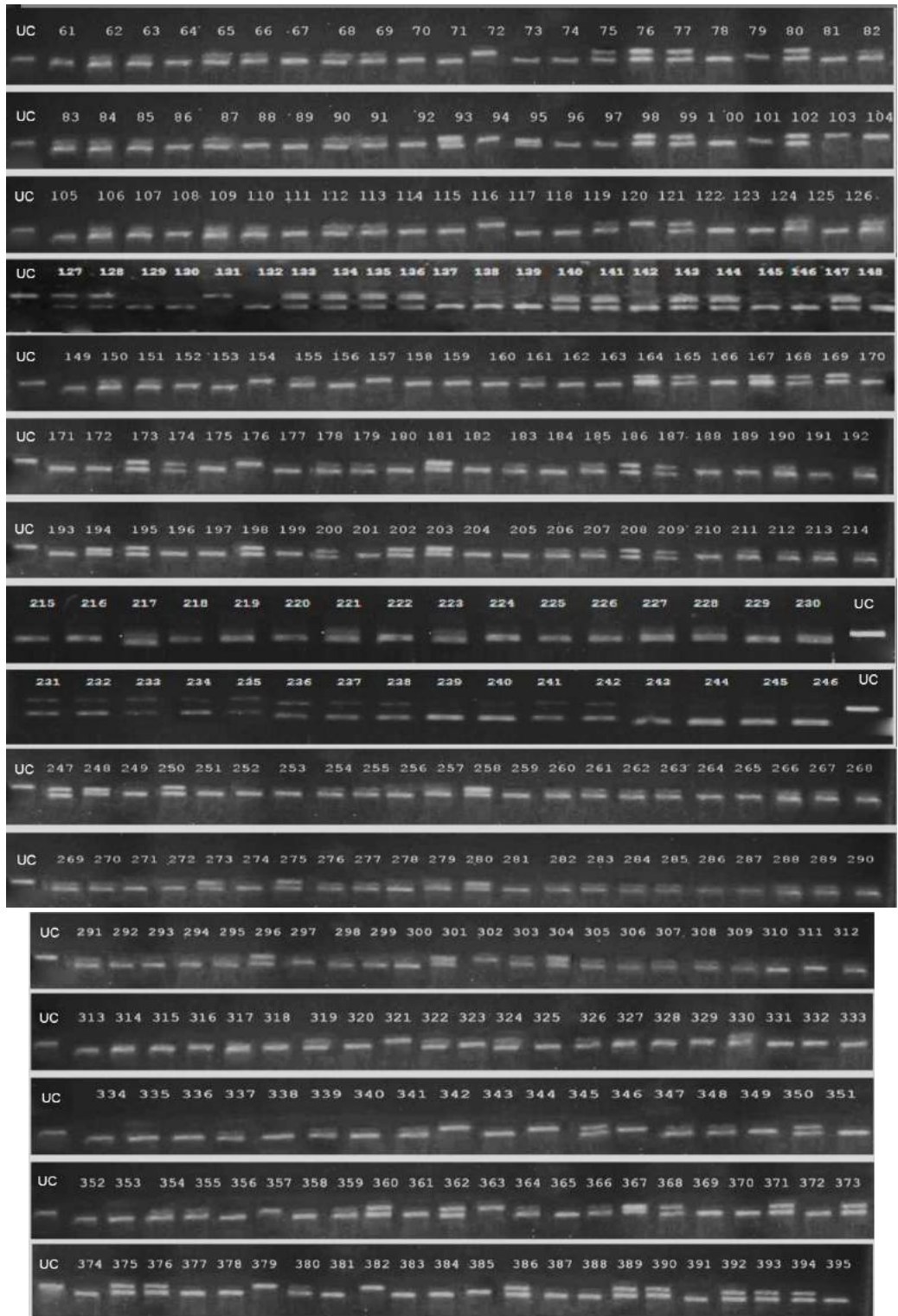


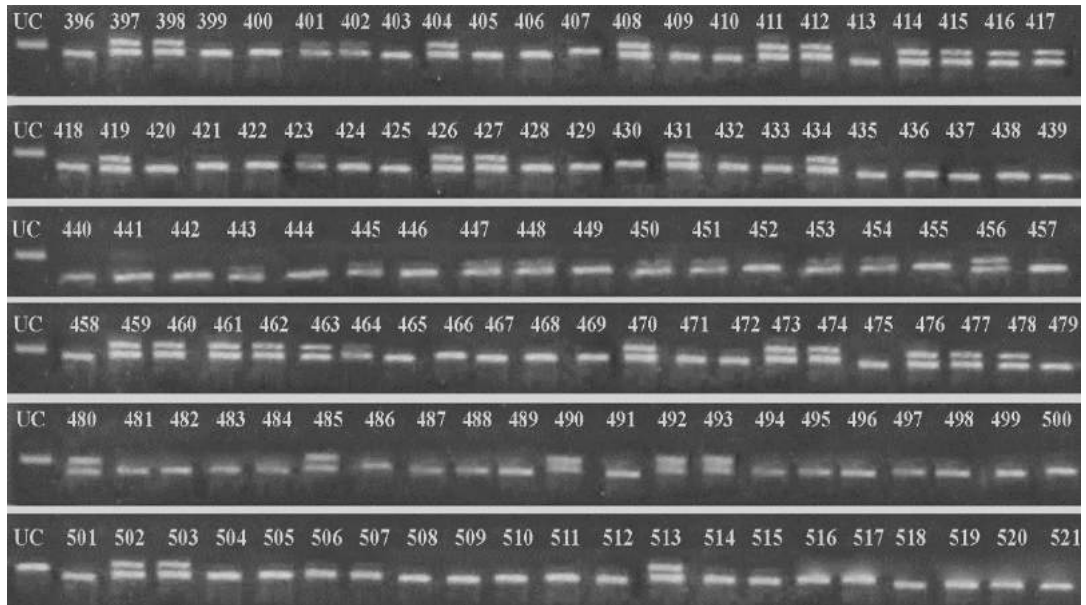
Hình 6A. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại vùng trình tự đích chứa *SLC22A12* rs11231825

M: Marker 100bp; +: Đối chứng dương; -: Đối chứng âm
 1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 352-521: HG-P-001 đến HG-P-170

2. Xác định kiểu gen *SLC22A12* rs11231825 bằng phương pháp cắt enzyme giới





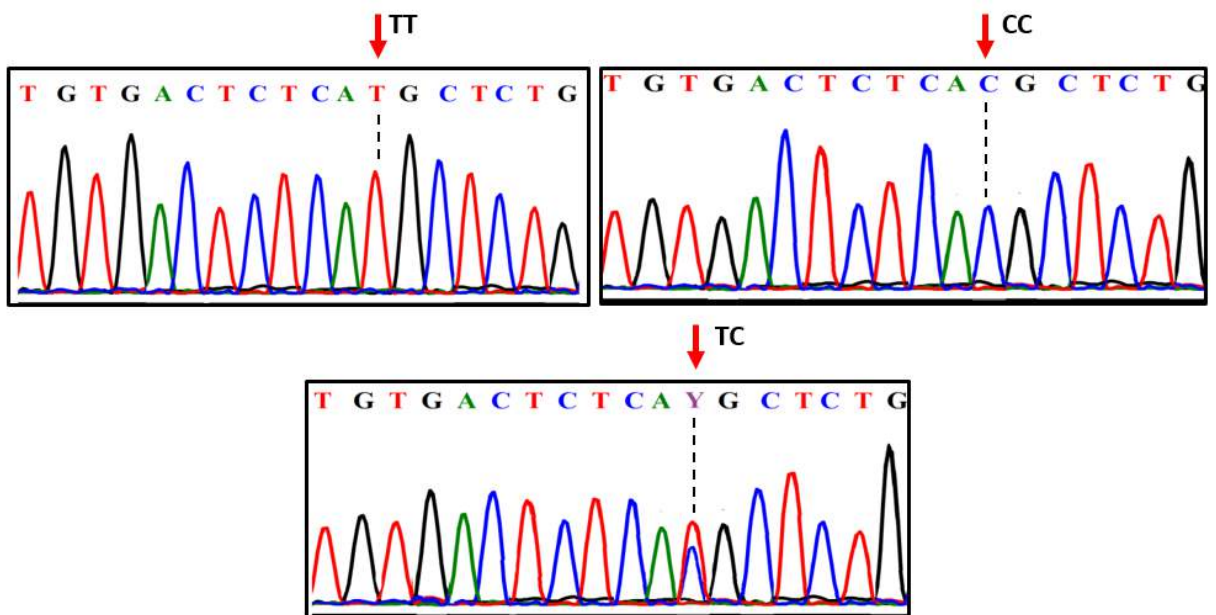


Hình 6B. Điện di đồ sản phẩm PCR sau khi được xử lý với enzyme *BclI*

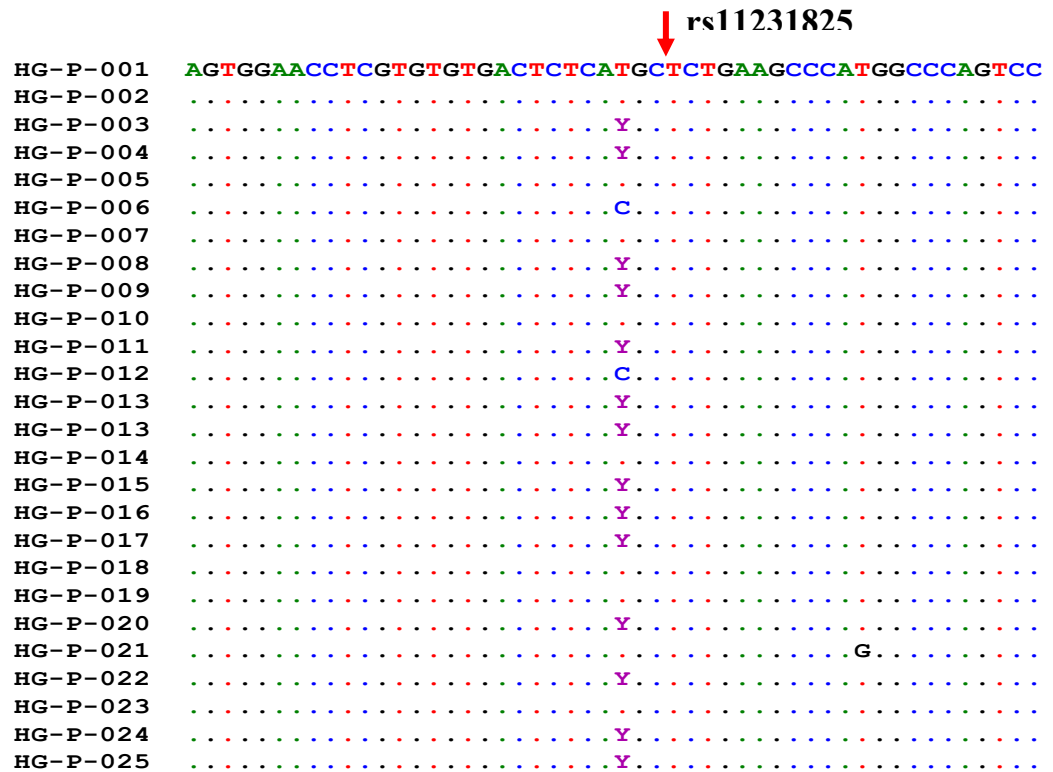
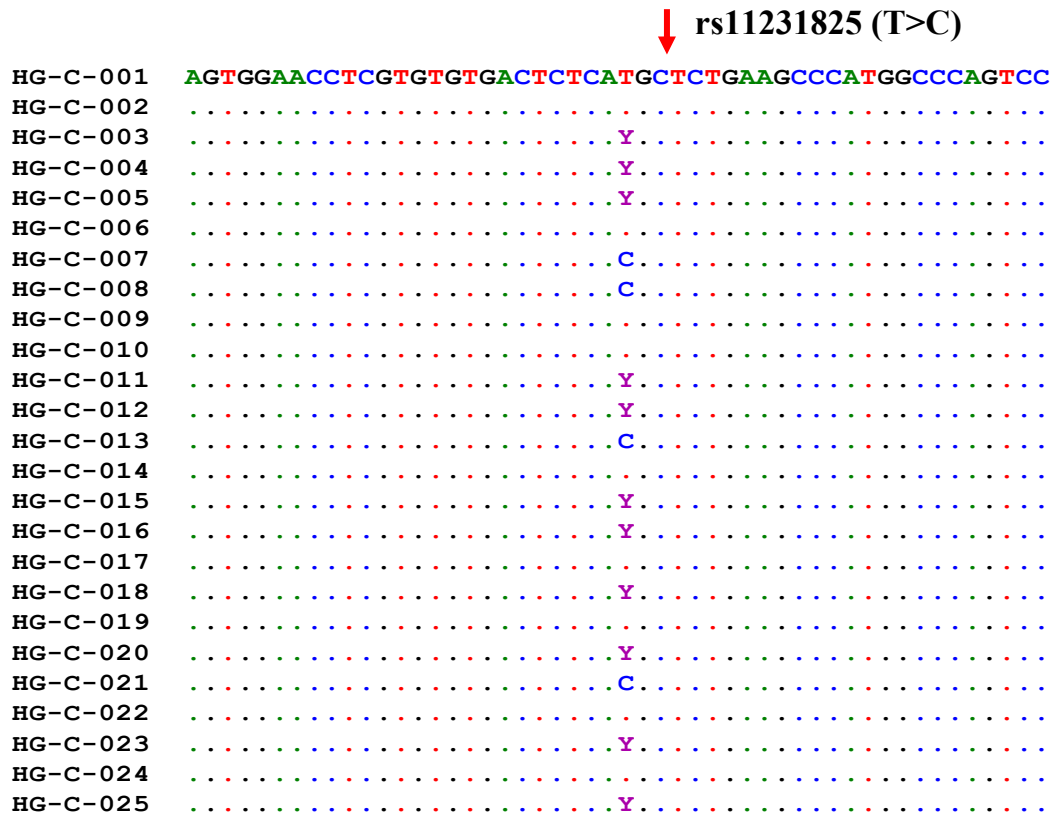
M: Marker 100bp; PCR – Uncut (UC): Mẫu PCR uncut;

1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 352-521: HG-P-001 đến HG-P-170

3. Kết quả xác định kiểu gen *SLC22A12* rs11231825 bằng phương pháp giải trình tự



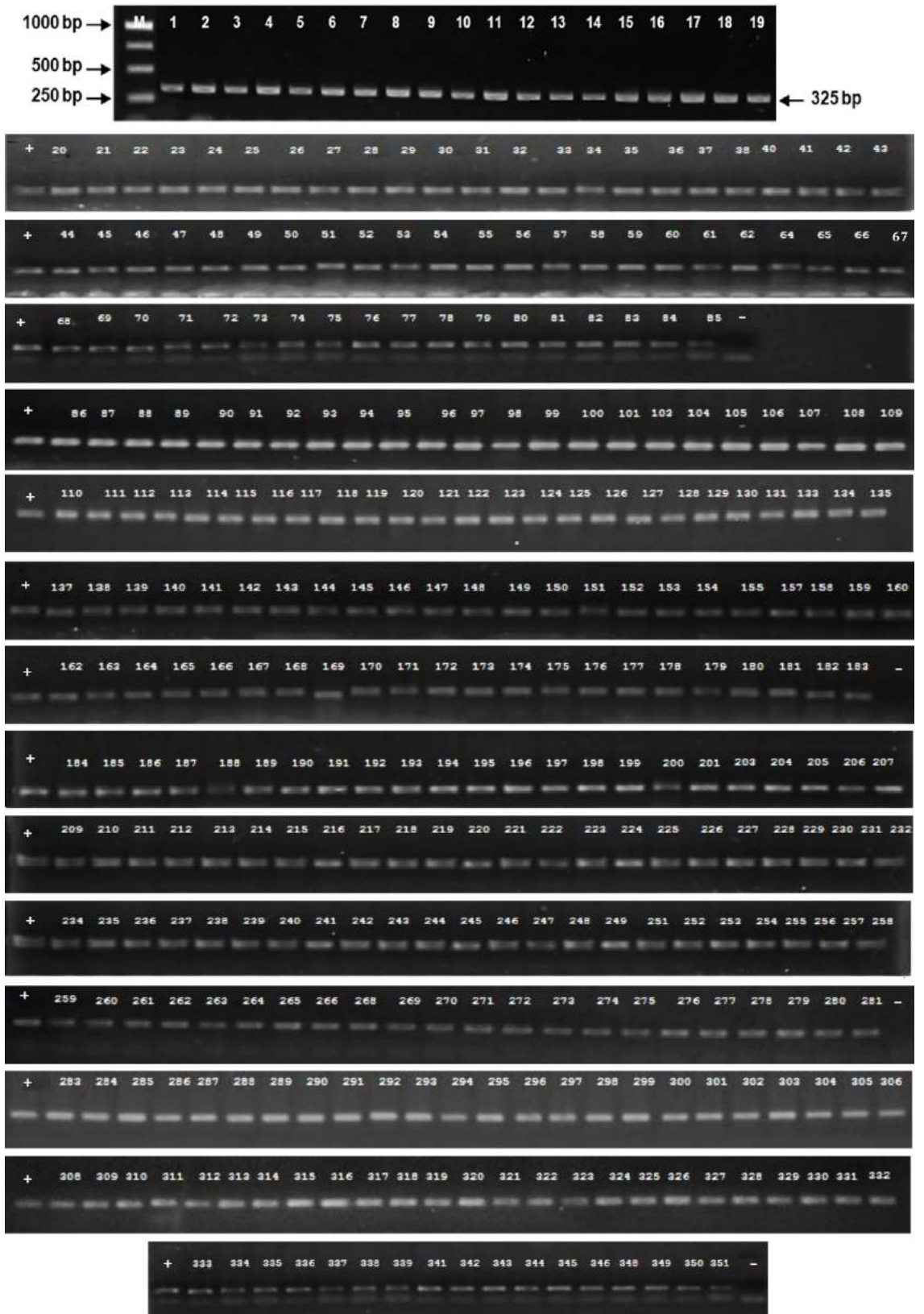
Hình 6C. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen TT, CC và TC của đa hình *SLC22A12* rs11231825



Hình 6D. Trình tự nucleotide có chứa đa hình rs11231825 của 50 mẫu đối chứng và mẫu bệnh

PHỤ LỤC VII
KẾT QUẢ PCR, CẮT ENZYME, GIẢI TRÌNH TỰ
GEN CỦA ĐA HÌNH *SLC22A12* rs7932775

1. Kết quả PCR khuếch đại vùng trình tự đích chứa SNP *SLC22A12* rs7932775



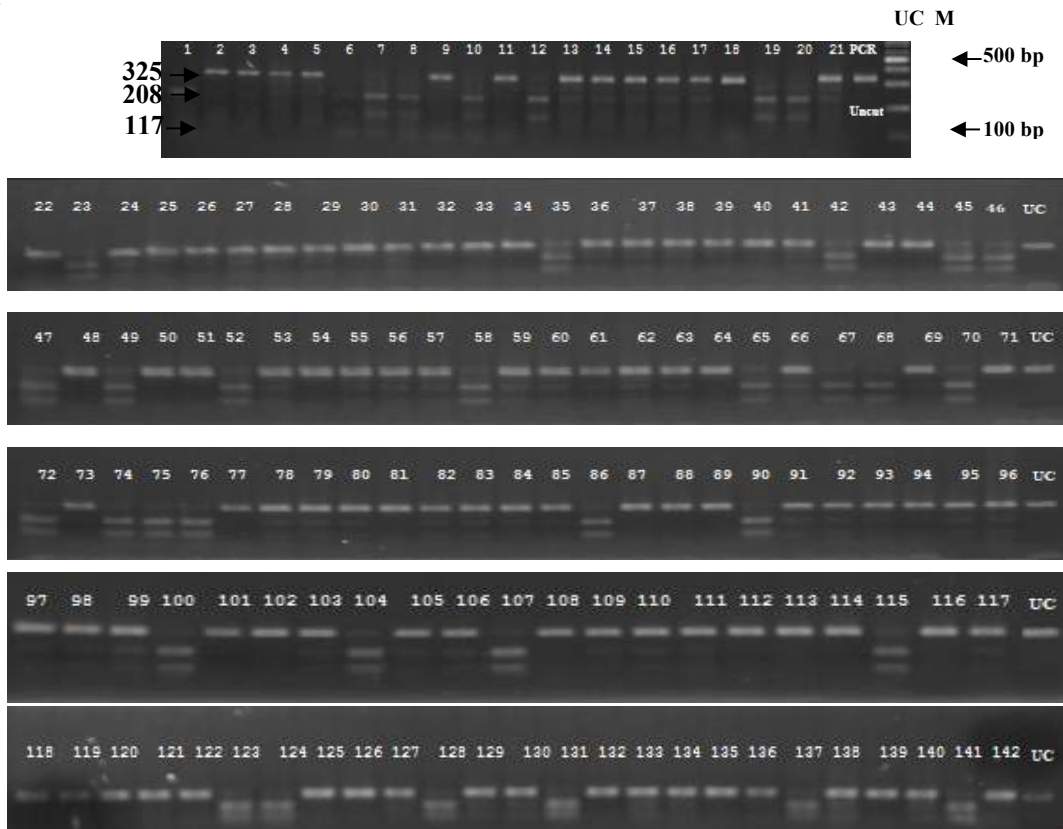


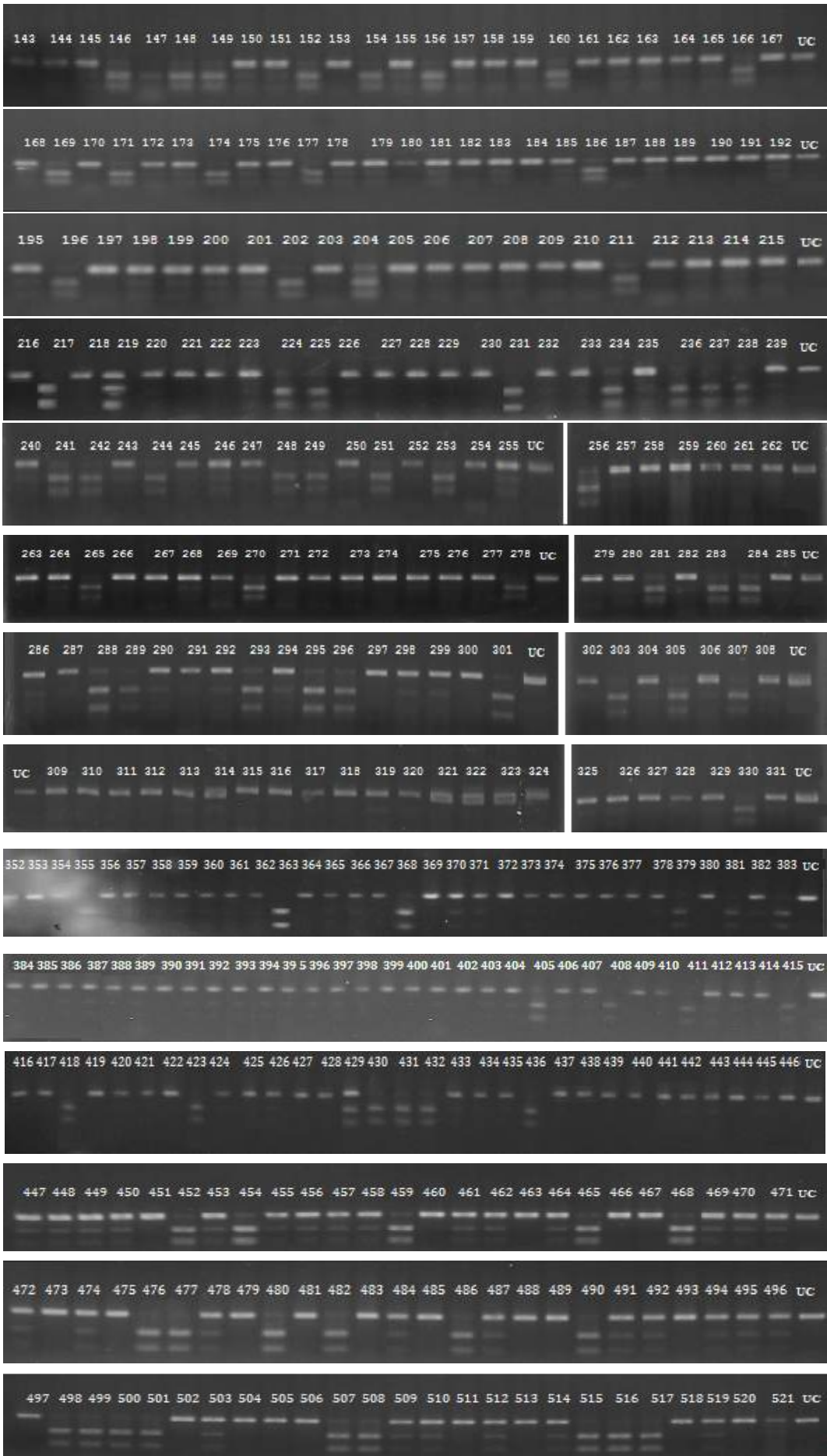
Hình 7A. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng trình tự đích *SLC22A12* rs7932775

M: Marker 1kb; +: Đối chứng dương; -: Đối chứng âm

1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 352-521: HG-P-001 đến HG-P-150;

2. Xác định kiểu gen *SLC22A12* rs7932775 bằng phương pháp cắt enzyme giới hạn



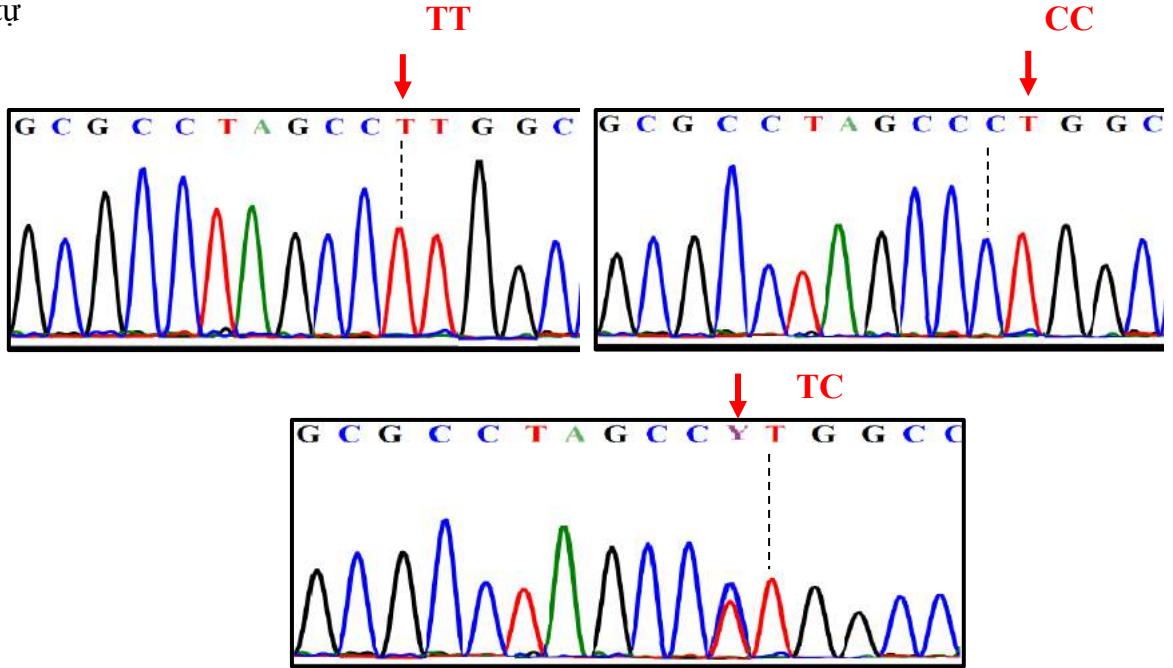


Hình 7B. Điện di đồ sản phẩm PCR sau khi được xử lý với enzyme *Eco130I*

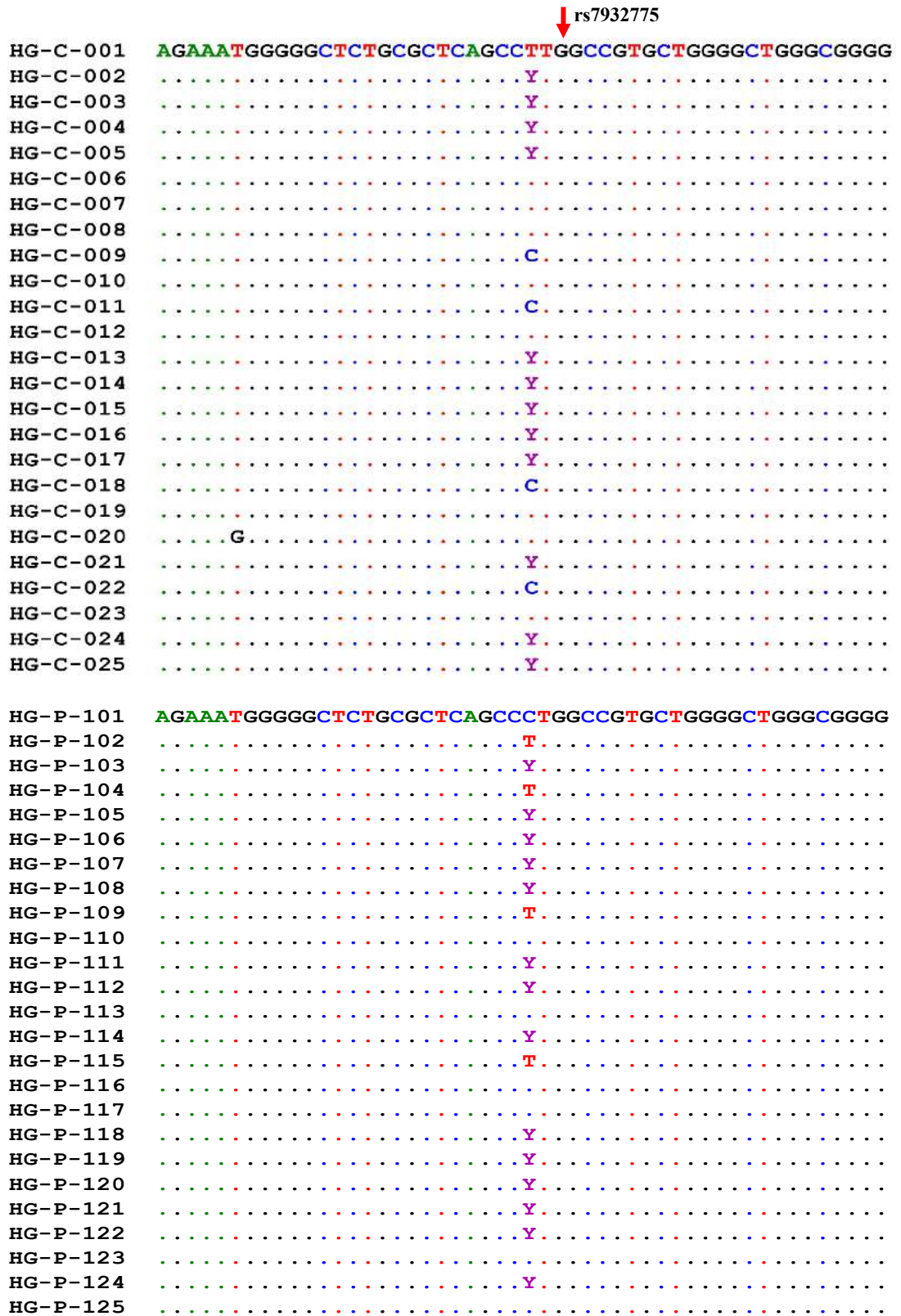
M: Marker 100bp; PCR – Uncut (UC): Mẫu PCR uncut;

1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 352-521: HG-P-001 đến HG-P-170

3. Kết quả xác định kiểu gen *SLC22A12* rs7932775 bằng phương pháp giải trình tự



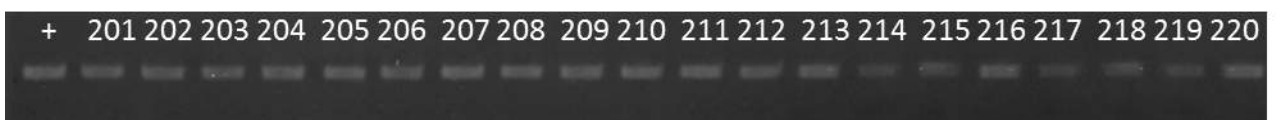
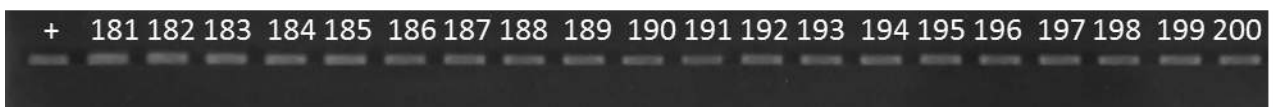
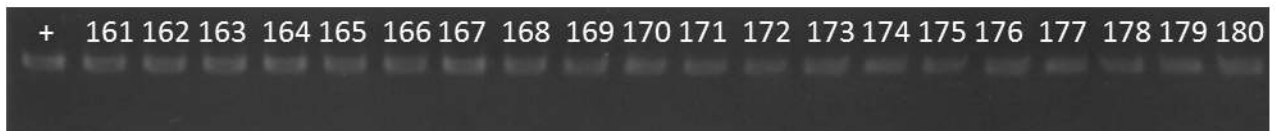
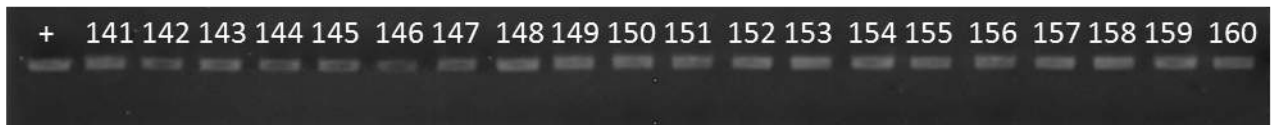
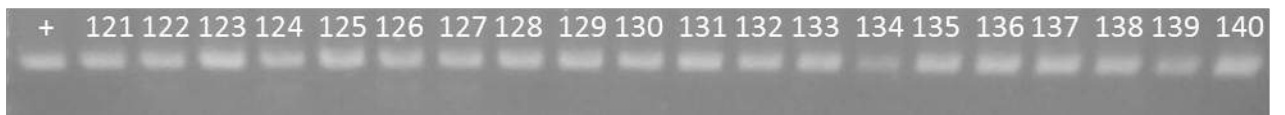
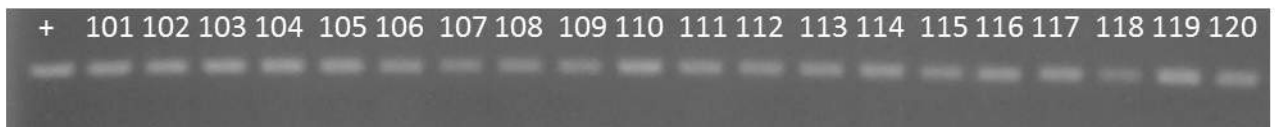
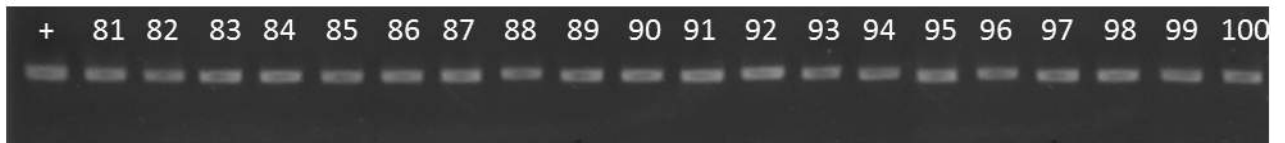
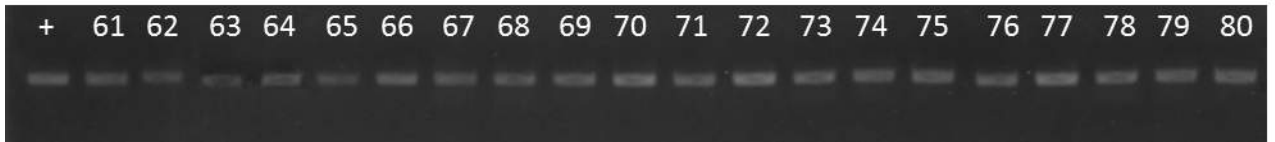
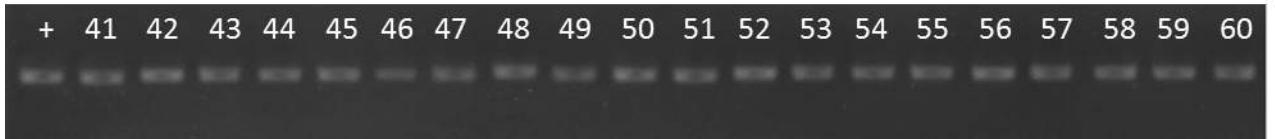
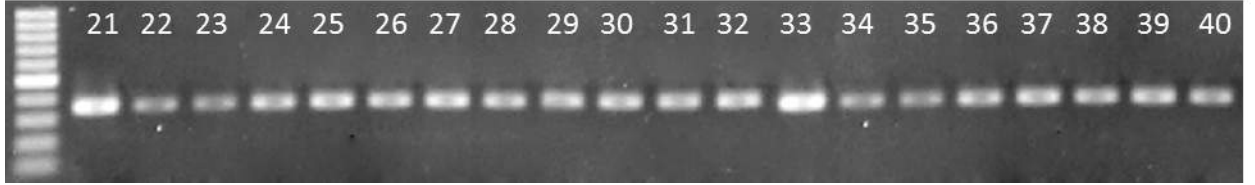
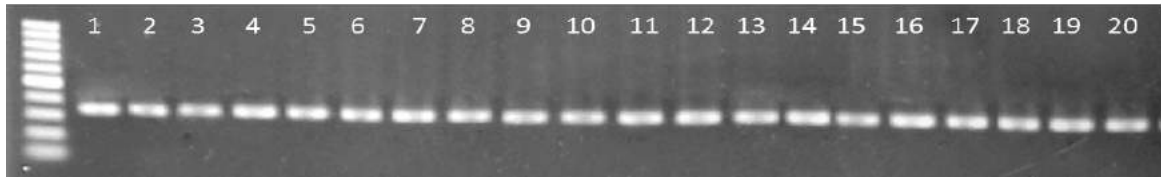
Hình 7C. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen TT, CC và TC của *SLC22A12* rs7932775



Hình 7D. Trình tự nucleotide có chứa đa hình *SLC22A12* rs7932775 của 50 mẫu đối chứng và mẫu bệnh

PHỤ LỤC VIII
KẾT QUẢ PCR, CẮT ENZYME, GIẢI TRÌNH TỰ
GEN CỦA ĐA HÌNH *SLC2A9* rs12510549

1. Kết quả PCR khuếch đại vùng trình tự đích chứa SNP *SLC2A9* rs12510549



+ 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240

+ 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260

+ 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280

+ 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300

+ 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320

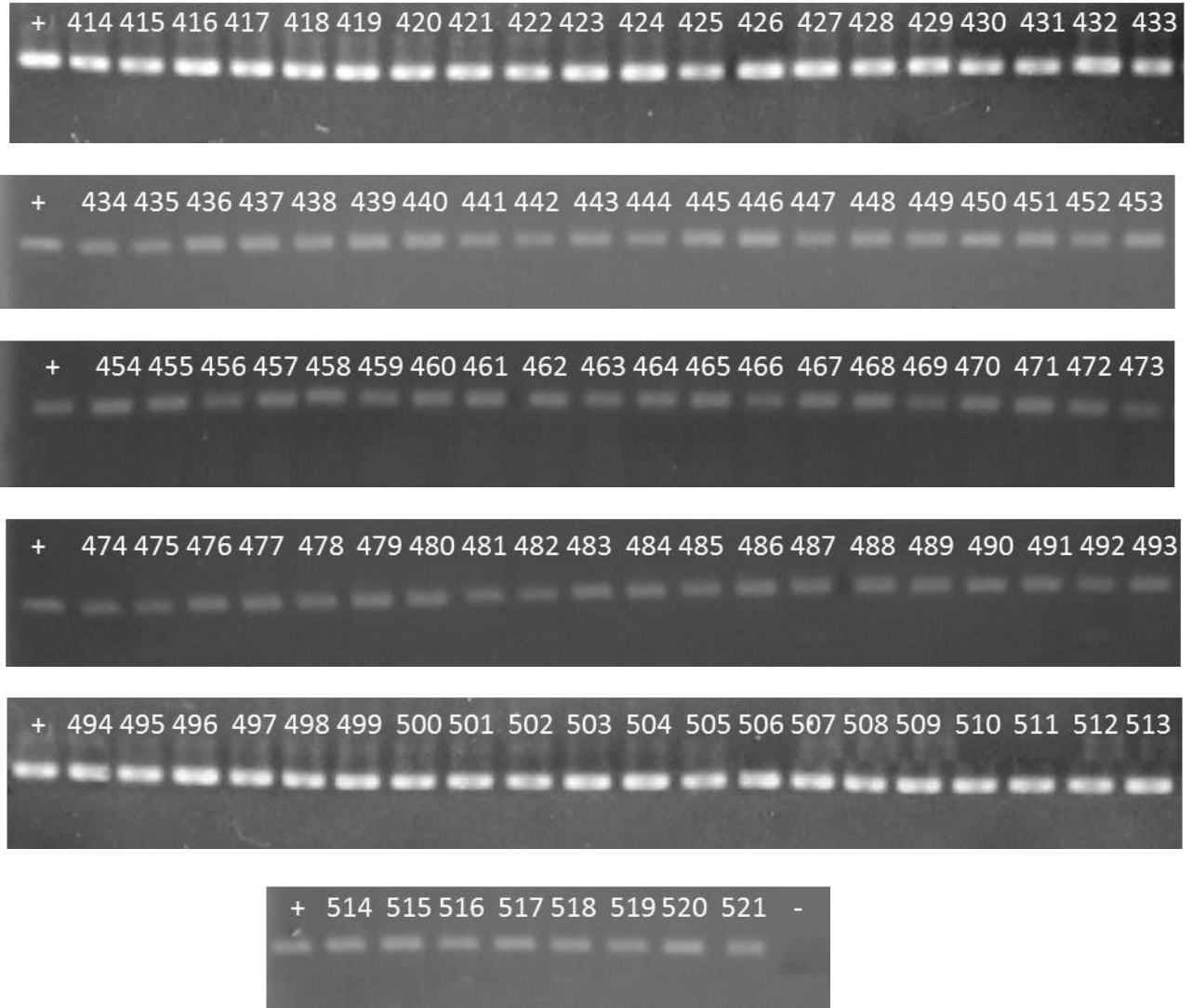
+ 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340

+ 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 -

354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373

374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393

+ 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413

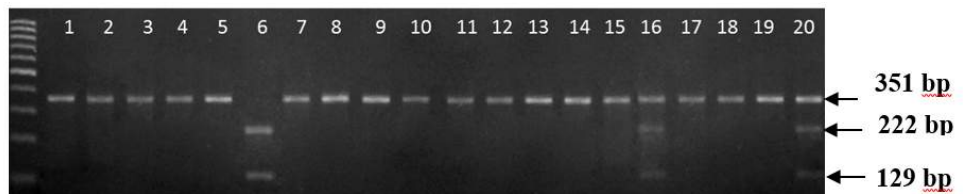


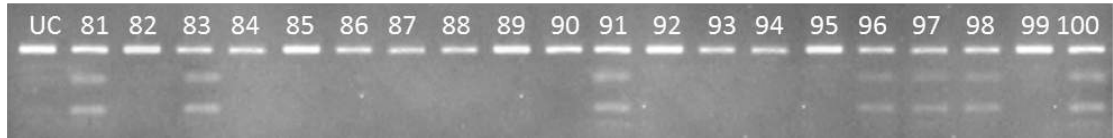
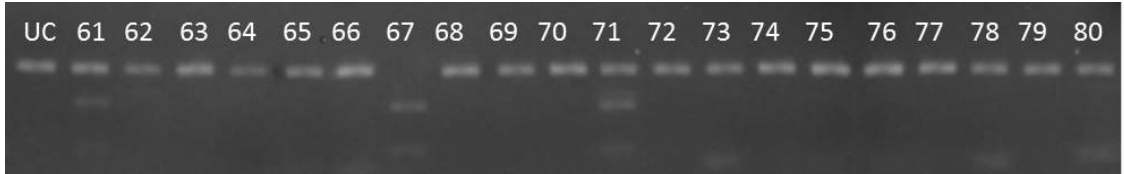
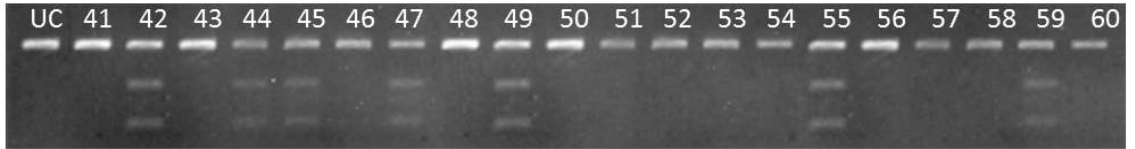
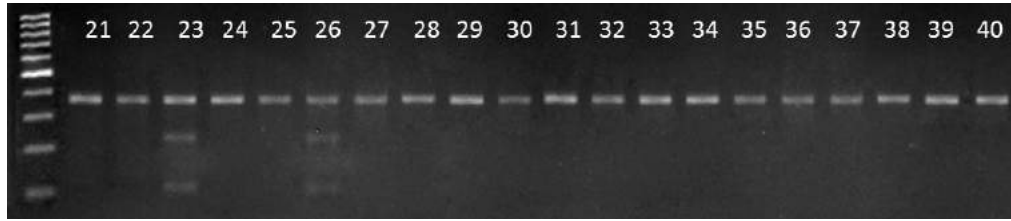
Hình 8A. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng trình tự đích *SLC2A9* rs12510549

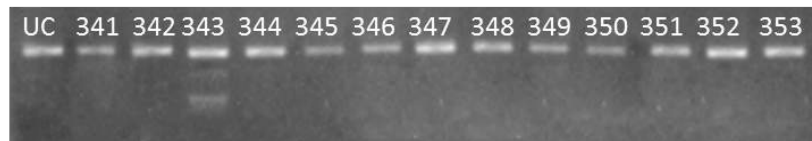
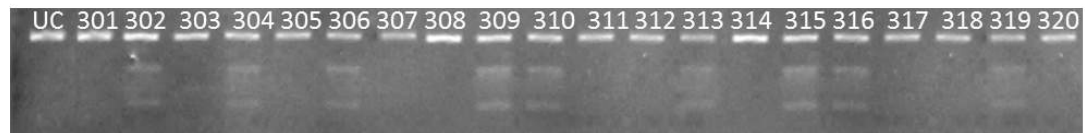
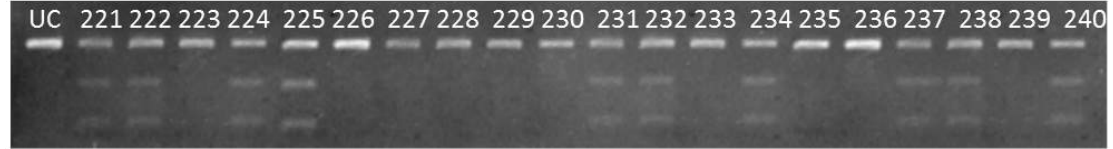
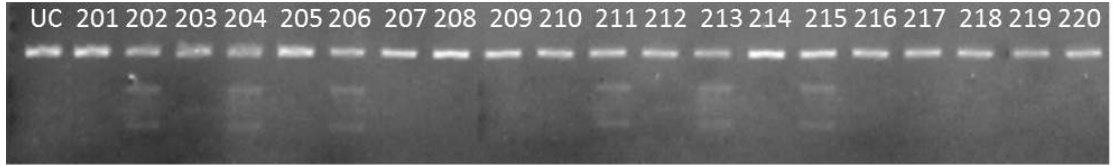
M: Marker 1kb; +: Đối chứng dương; -: Đối chứng âm

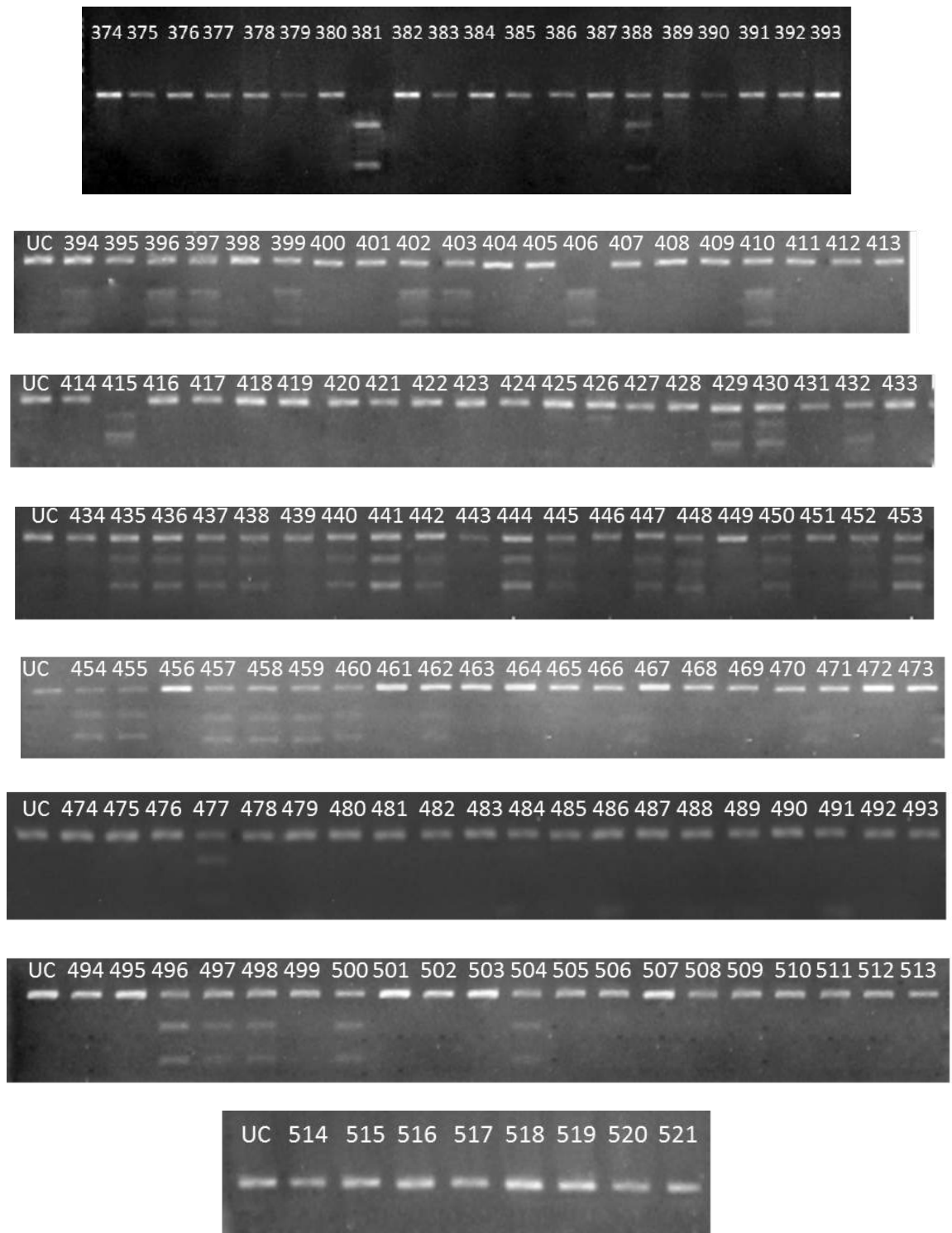
1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 352-521: HG-P-001 đến HG-P-150;

2. Xác định kiểu gen *SLC2A9* rs12510549 bằng phương pháp cắt enzyme giới hạn







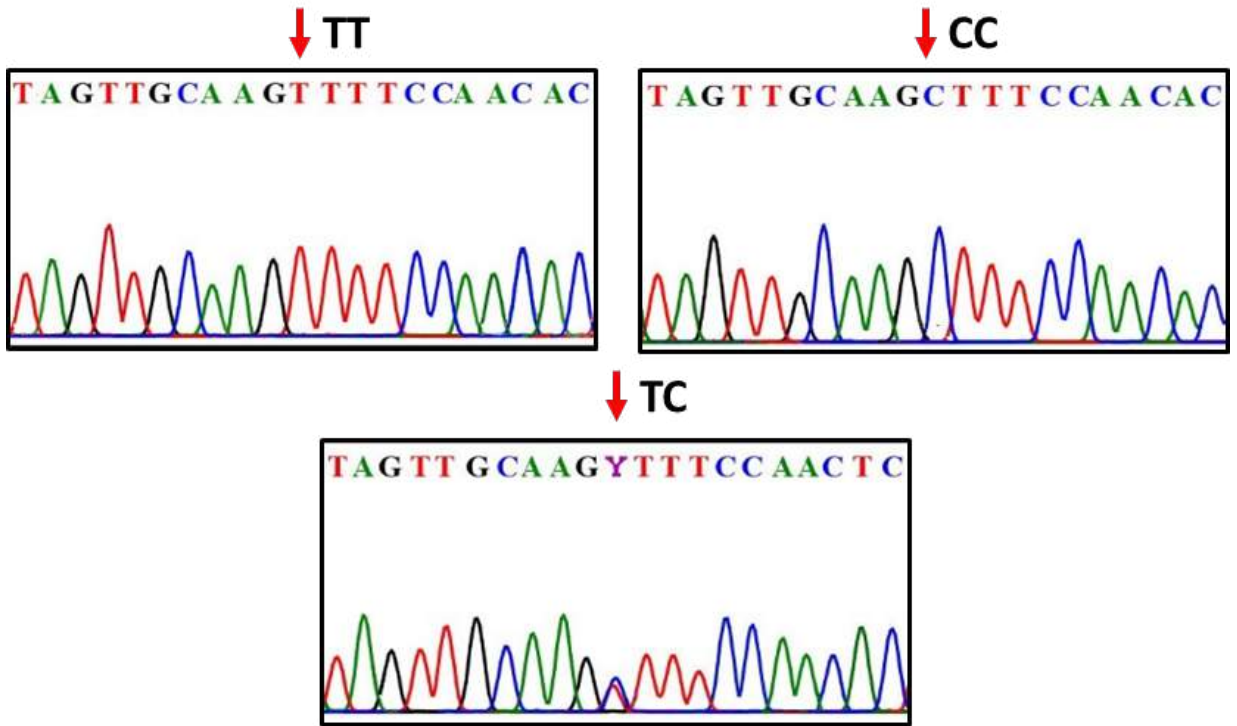


Hình 8B. Điện di đồ sản phẩm PCR sau khi được xử lý với enzyme *HindIII*

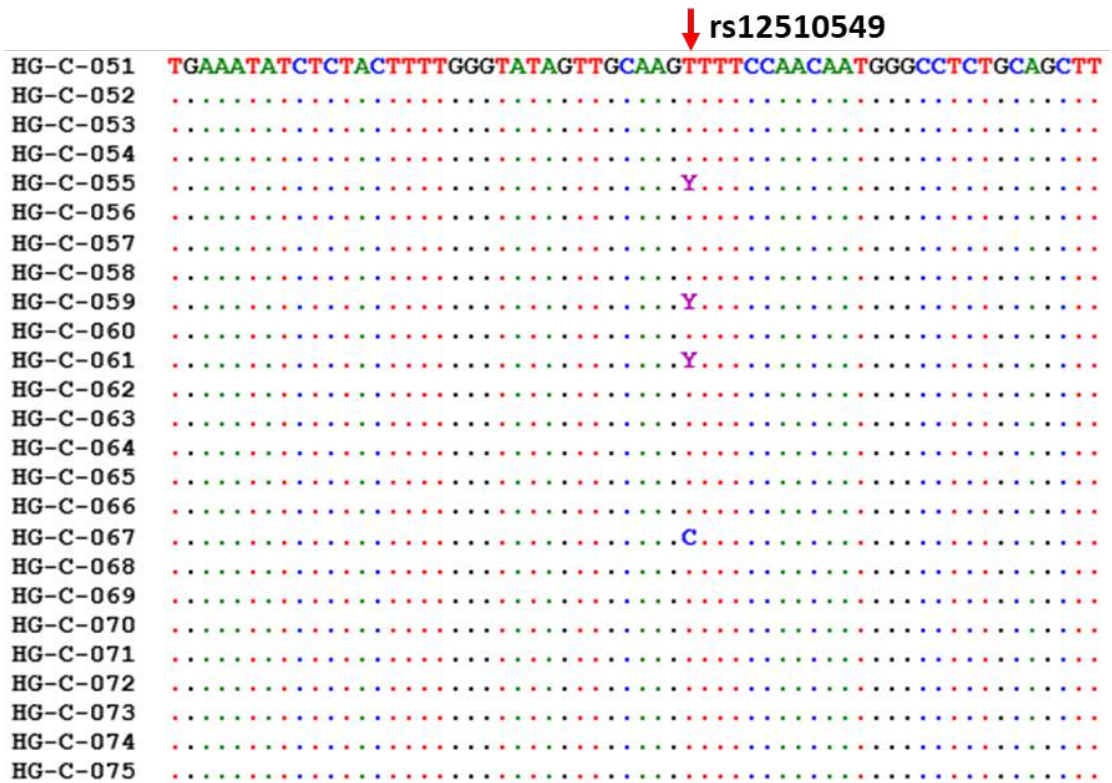
M: Marker 100bp; PCR – Uncut (UC): Mẫu PCR uncut;

1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 352-521: HG-P-001 đến HG-P-170

3. Kết quả xác định kiểu gen *SLC2A9* rs12510549 bằng phương pháp giải trình tự



Hình 8C. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen TT, CC và TC của *SLC2A9* rs12510549



```

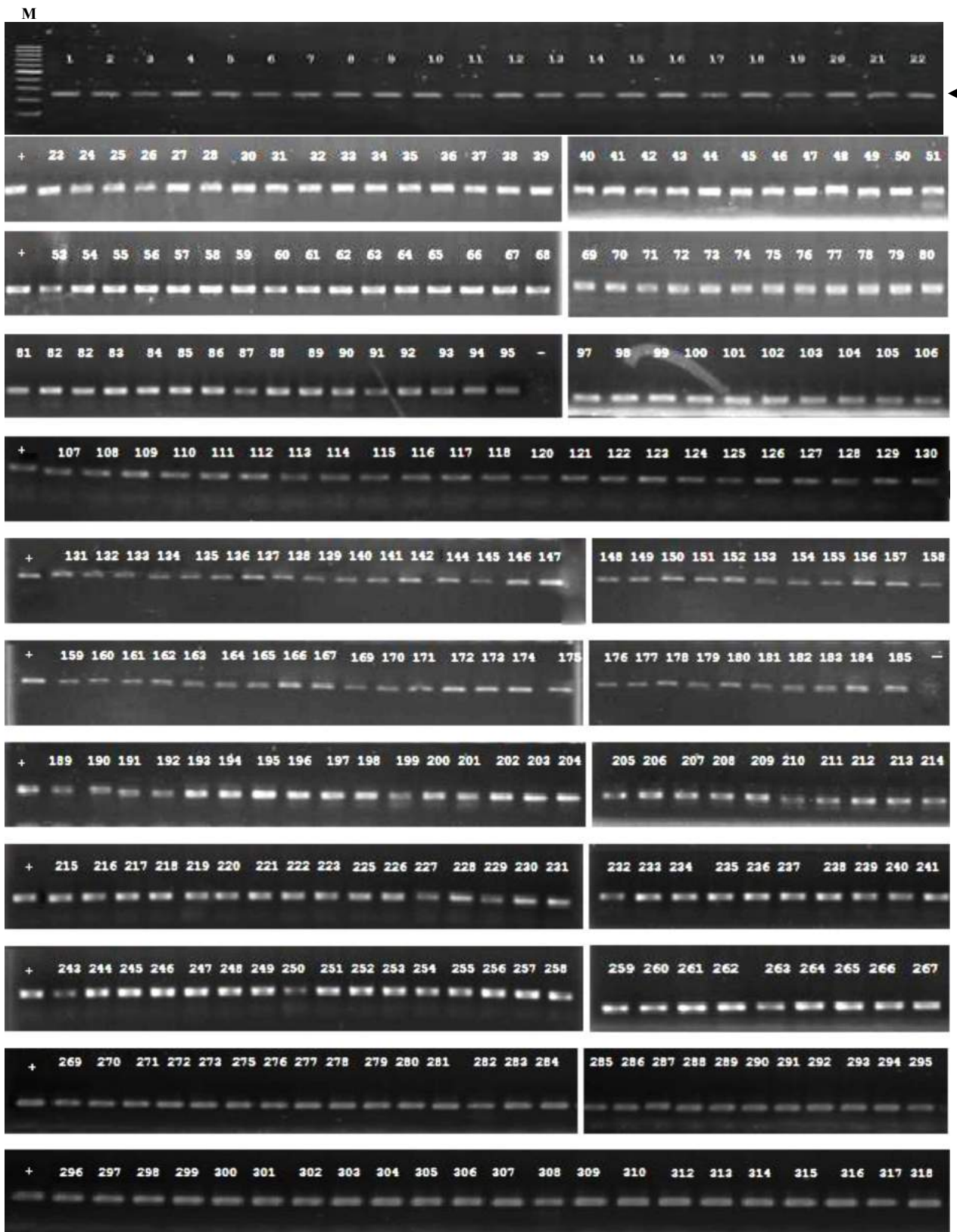
HG-P-051  TGAAATATCTCTACTTTTGGGTATAGTTGCAAGTTTTCCAACAATGGGCCTCTGCAGCTT
HG-P-052  .....
HG-P-053  .....C.....
HG-P-054  .....
HG-P-055  .....
HG-P-056  .....
HG-P-057  .....Y.....
HG-P-058  .....
HG-P-059  .....
HG-P-060  .....
HG-P-061  .....
HG-P-062  .....C.....
HG-P-063  .....
HG-P-064  .....
HG-P-065  .....
HG-P-066  .....
HG-P-067  .....
HG-P-068  .....
HG-P-069  .....
HG-P-070  .....
HG-P-071  .....
HG-P-072  .....
HG-P-073  .....
HG-P-074  .....
HG-P-075  .....

```

Hình 8D. Trình tự nucleotide có chứa đa hình *SLC2A9* rs12510549 của 50 mẫu đối chứng và mẫu bệnh

PHỤ LỤC IX
KẾT QUẢ PCR, CẮT ENZYME, GIẢI TRÌNH TỰ
GEN CỦA ĐA HÌNH *SLC2A9* rs16890979

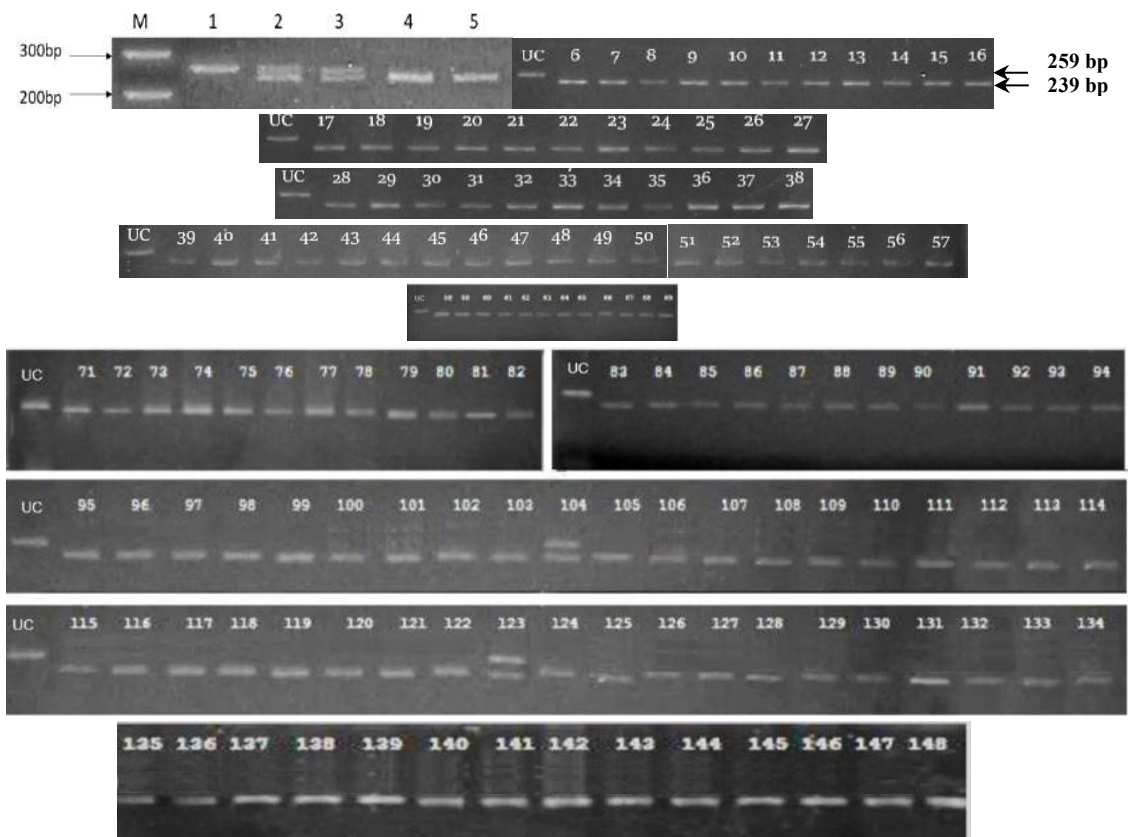
1. Kết quả PCR khuếch đại vùng trình tự đích chứa *SLC2A9* rs16890979



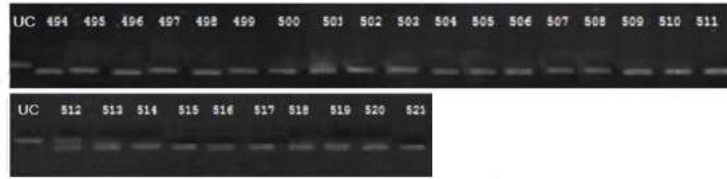


Hình 9A. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng trình tự đích đa hình rs16890979
 M: Marker 100bp; +: Đối chứng dương; -: Đối chứng âm
 1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 351-521: HG-P-001 đến HG-P-150;

2. Xác định kiểu gen *SLC2A9* rs16890979 bằng phương pháp cắt enzyme giới hạn





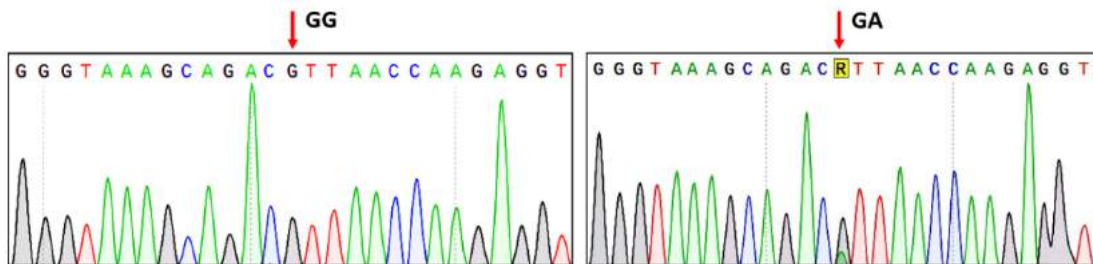


Hình 9B. Điện di đồ sản phẩm PCR sau khi được xử lý với enzyme *HpaI*

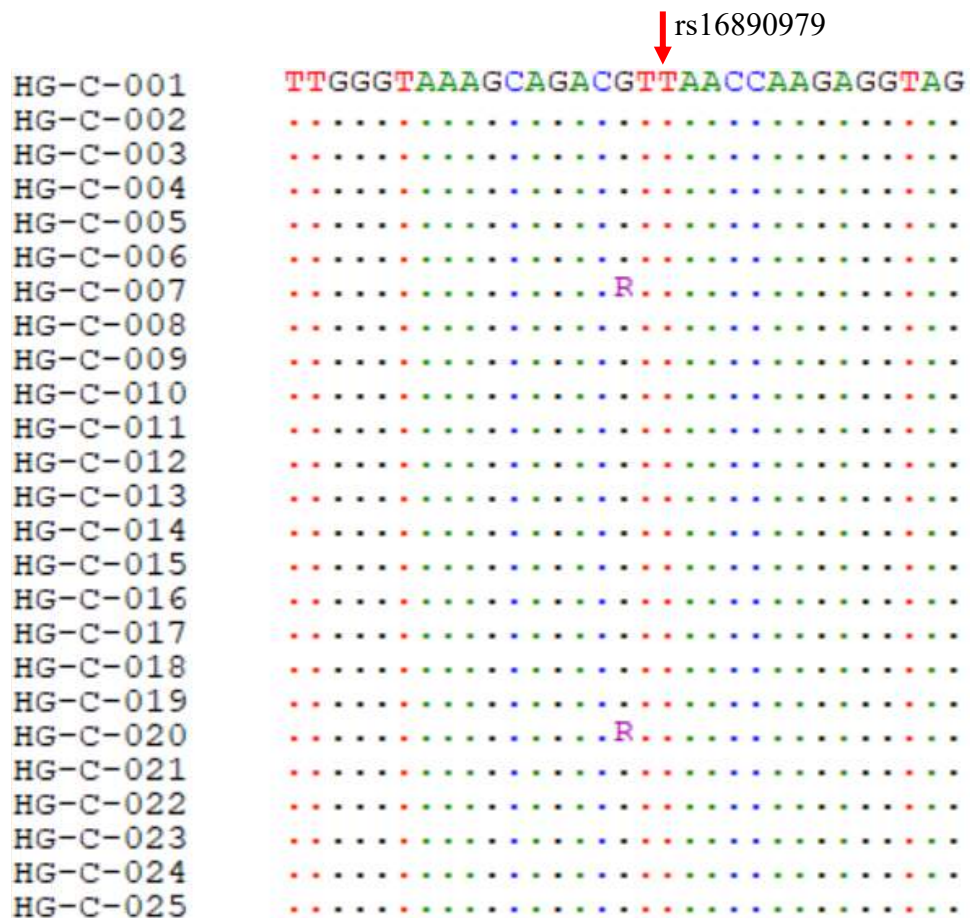
PCR – Uncut (UC): Mẫu PCR uncut;

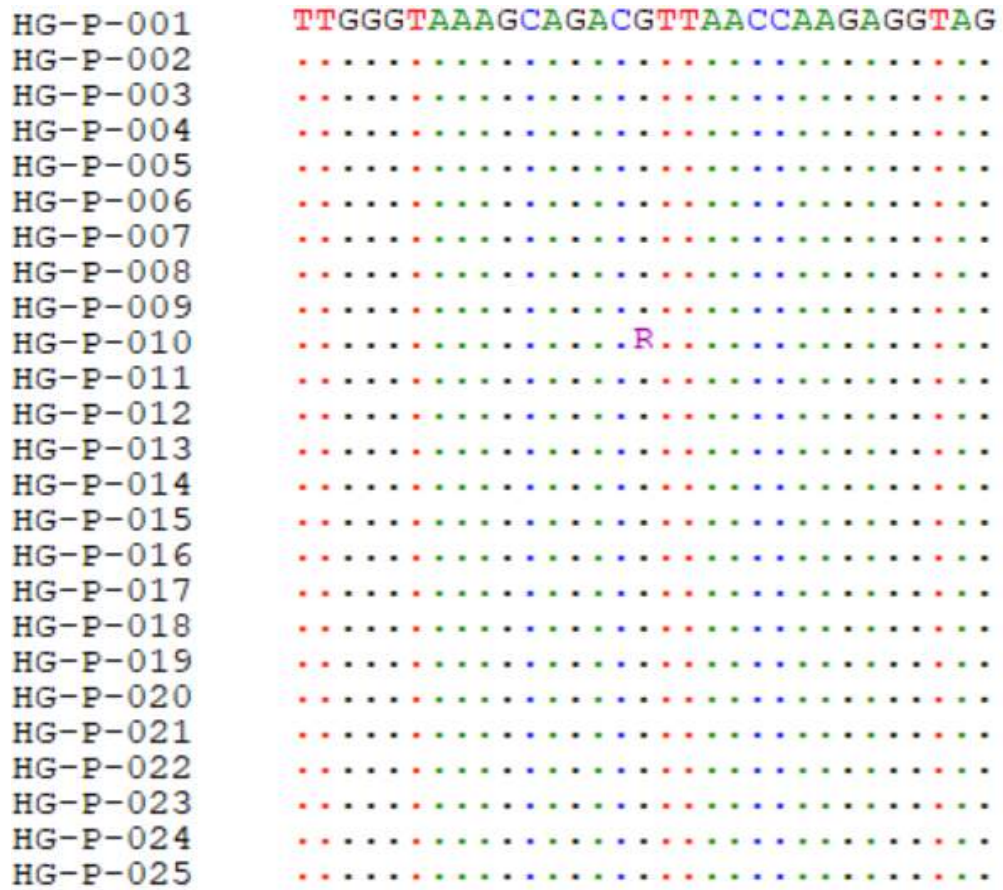
1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 352-521: HG-P-001 đến HG-P-170.

3. Kết quả xác định kiểu gen *SLC2A9* rs16890979 bằng phương pháp giải trình tự



Hình 9C. Trình tự nucleotide 2 mẫu đại diện có kiểu gen GG và GA của *SLC2A9* rs16890979





Hình 9D. Trình tự nucleotide có chứa *SLC2A9* rs16890979 của 50 mẫu đối chứng và mẫu bệnh

PHỤ LỤC X
KẾT QUẢ PCR, CẮT ENZYME, GIẢI TRÌNH TỰ
GEN CỦA ĐA HÌNH *TNF α* rs1800629

3. Kết quả PCR khuếch đại vùng trình tự đích chứa *TNF α* rs1800629

M

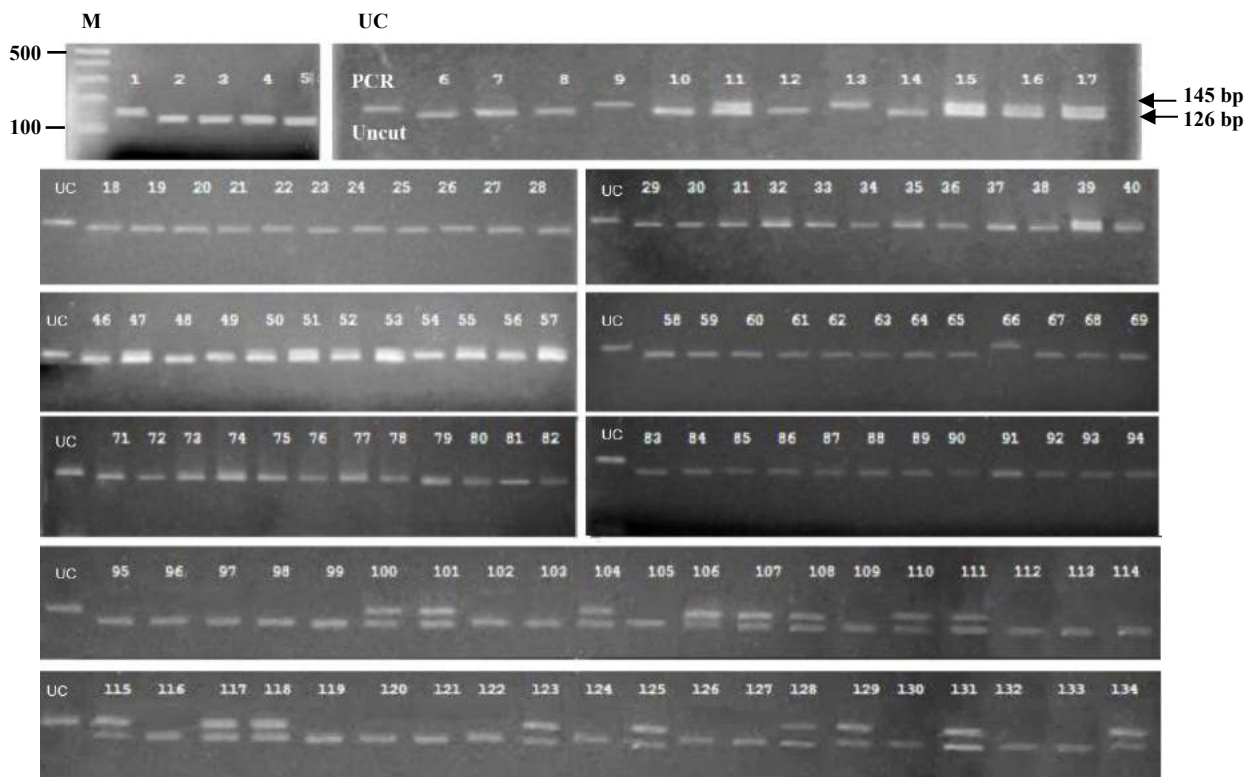
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19								
+	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	40	41	42	43				
+	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	64	65	66	67				
+	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	-								
+	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	104	105	106	107	108	109				
+	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	134	135		
+	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	157	158	159	160				
+	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	-				
+	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	203	204	205	206	207				
+	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232			
+	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	251	252	253	254	255	256	257	258			
+	259	260	261	262	263	264	265	266	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	-				
+	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306			
+	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332		
+	333	334	335	336	337	338	339	341	342	343	344	345	346	348	349	350	351	-									

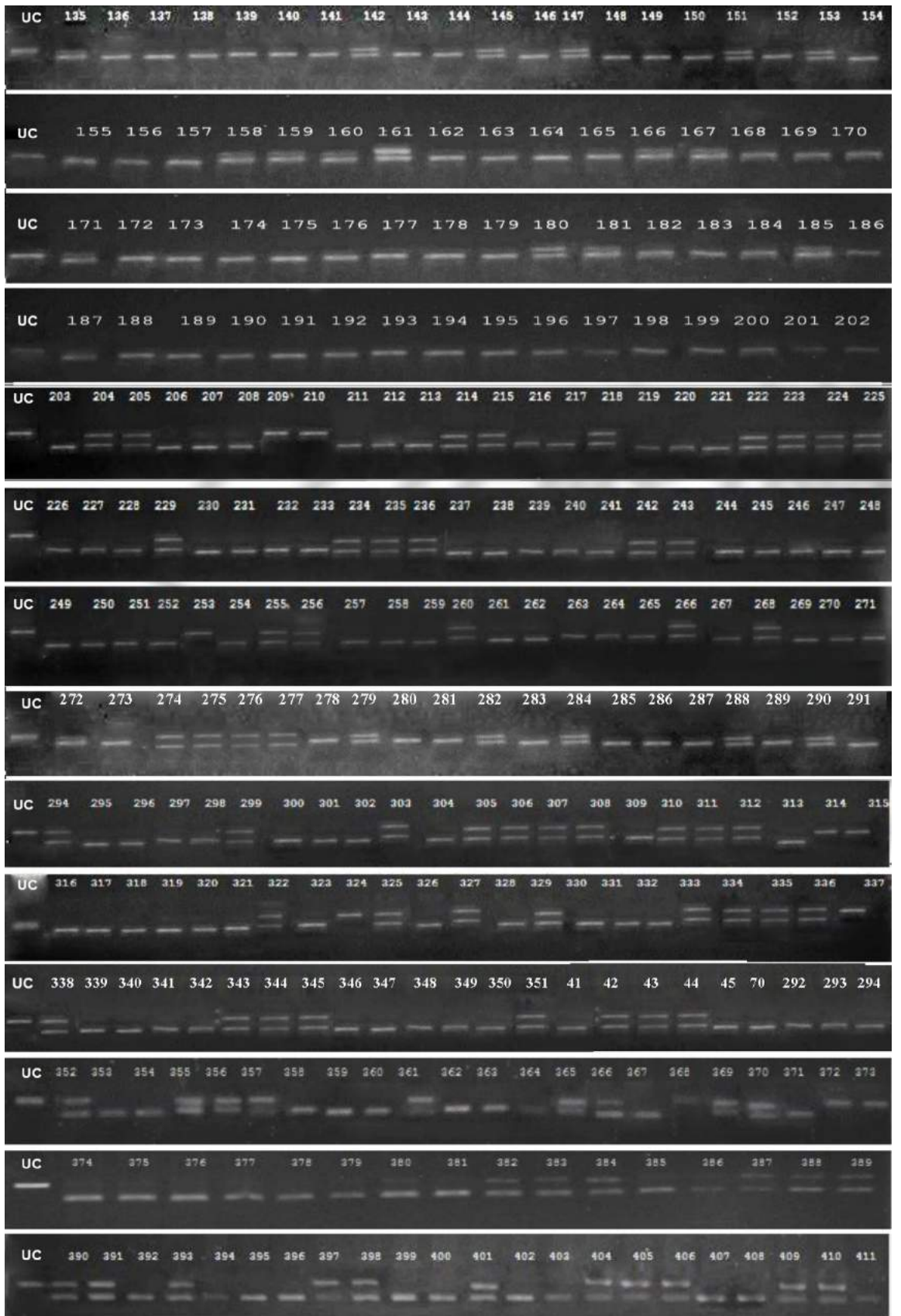
←~150



Hình 10A. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng trình tự đích đa hình rs1800629
 M: Marker 100bp; +: Đối chứng dương; -: Đối chứng âm
 1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 351-521: HG-P-001 đến HG-P-150;

4. Xác định kiểu gen *TNFα* rs1800629 bằng phương pháp cắt enzyme giới hạn





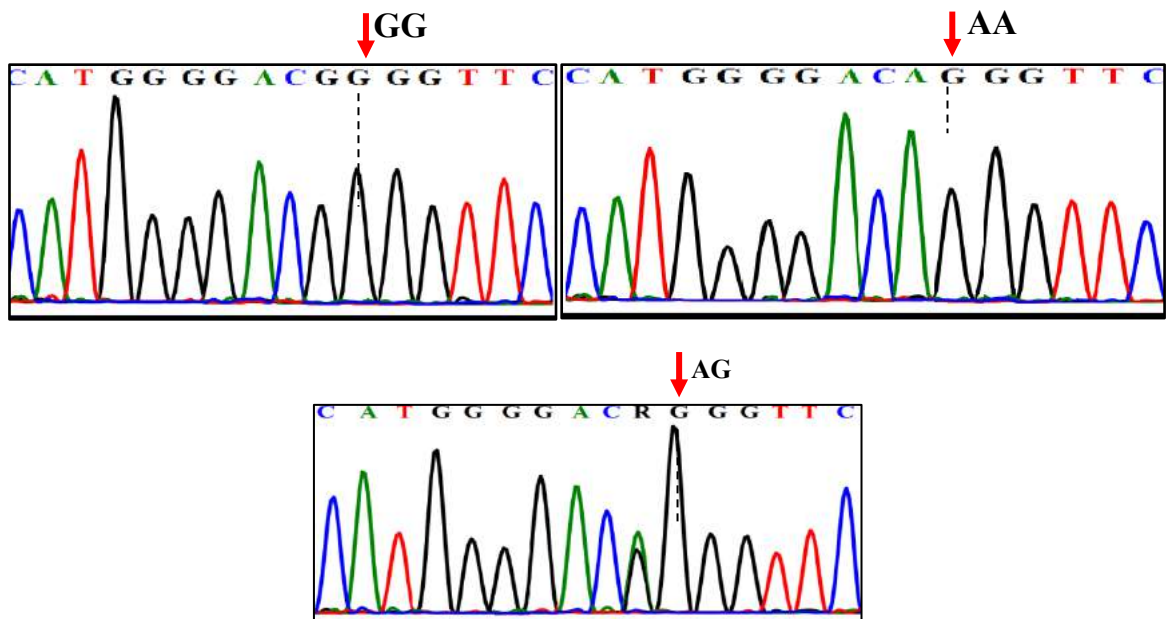


Hình 10B. Điện di đồ sản phẩm PCR sau khi được xử lý với enzyme *NcoI*

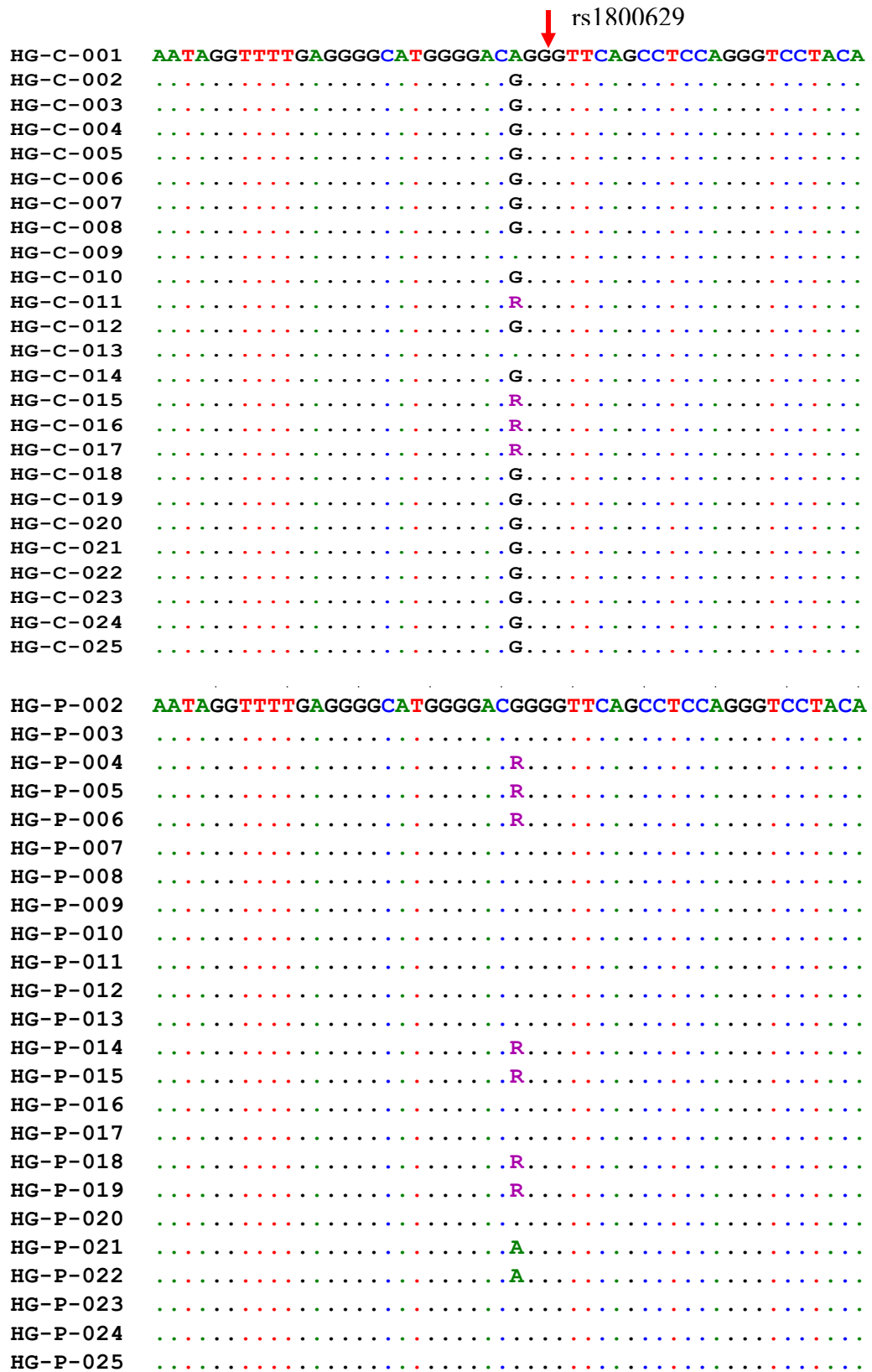
M: Marker 100bp; PCR – Uncut (UC): Mẫu PCR uncut;

1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 352-521: HG-P-001 đến HG-P-170.

5. Kết quả xác định kiểu gen *TNF α* rs1800629 bằng phương pháp giải trình tự



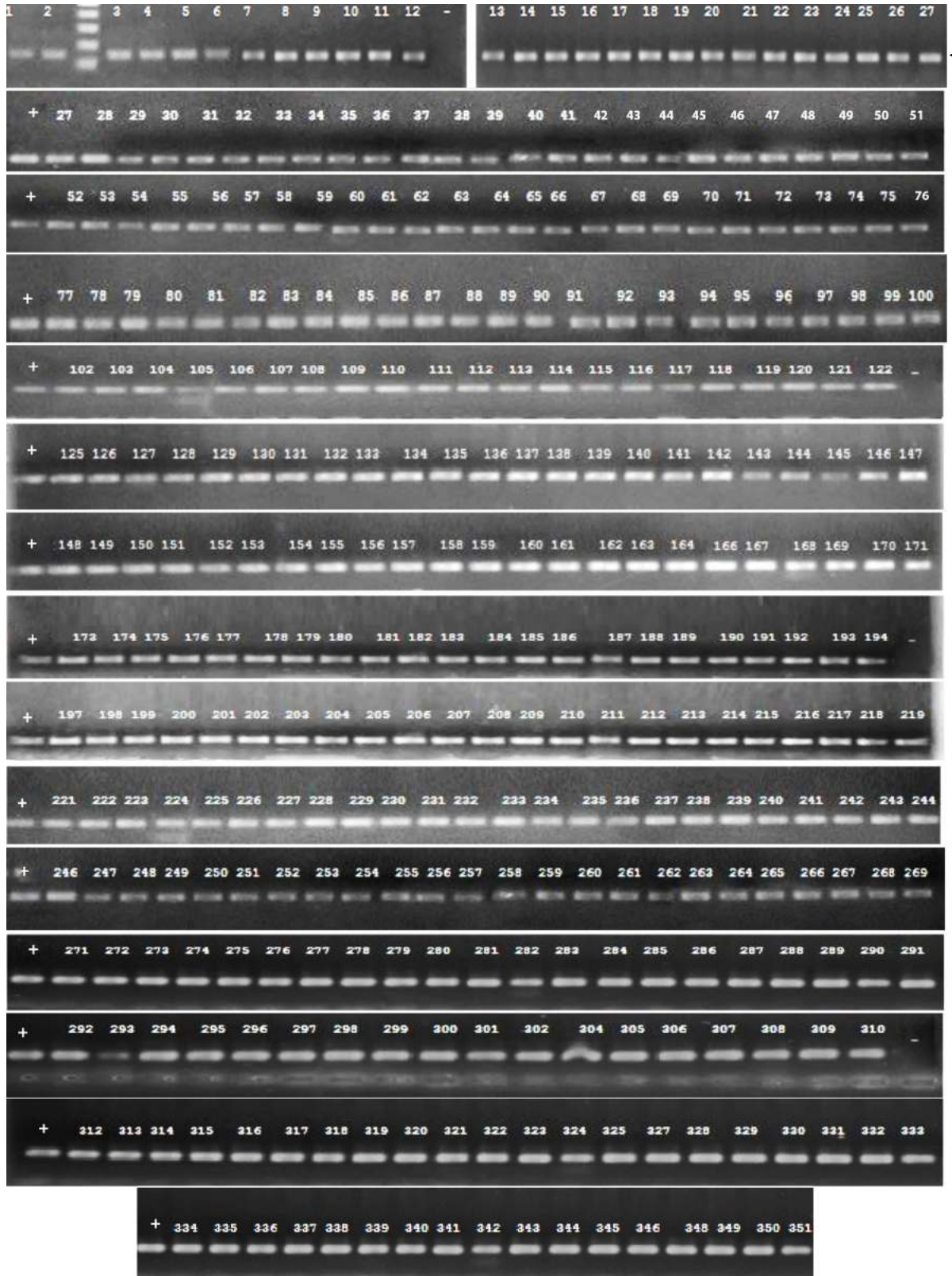
Hình 10C. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen GG, AA và AG của *TNF α* rs1800629



Hình 10D. Trình tự nucleotide có chứa *TNF α* rs1800629 của 50 mẫu đối chứng và mẫu bệnh

PHỤ LỤC XI
KẾT QUẢ PCR, CẮT ENZYME, GIẢI TRÌNH TỰ
GEN CỦA ĐA HÌNH *TLR4* rs2149356

1. Kết quả PCR khuếch đại vùng trình tự đích chứa *TLR4* rs2149356
M



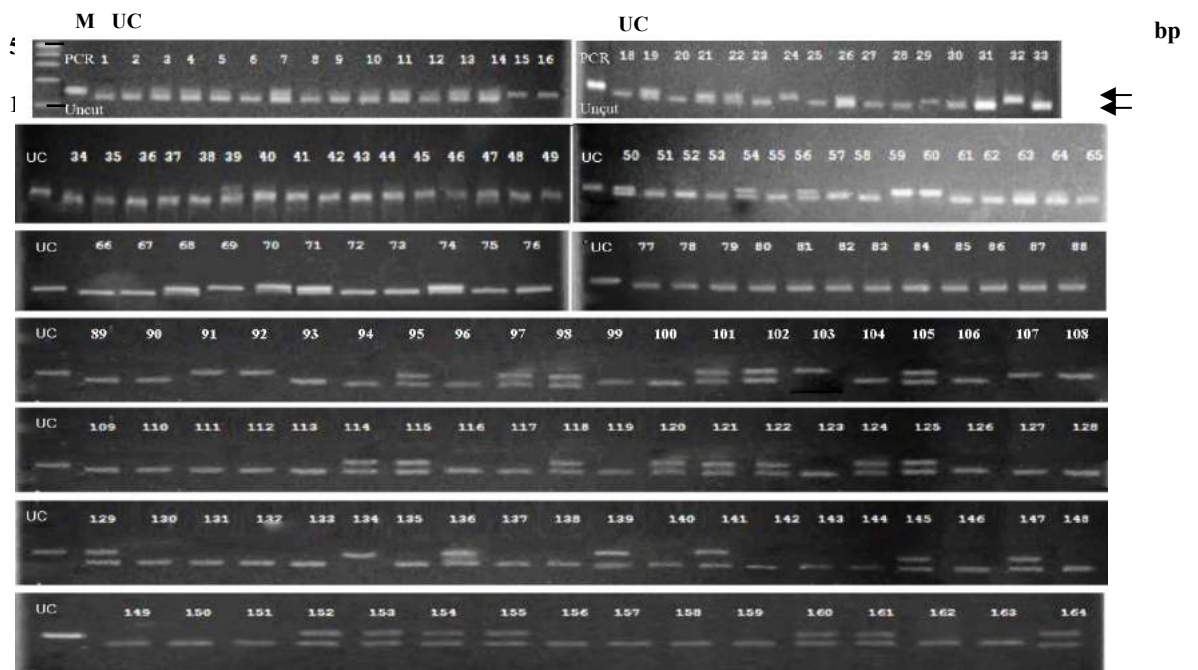


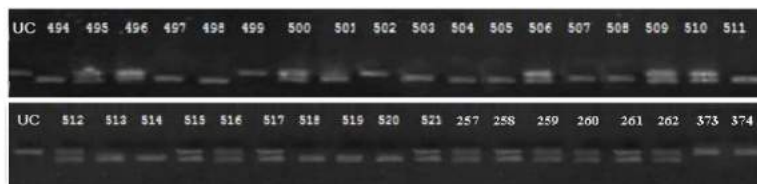
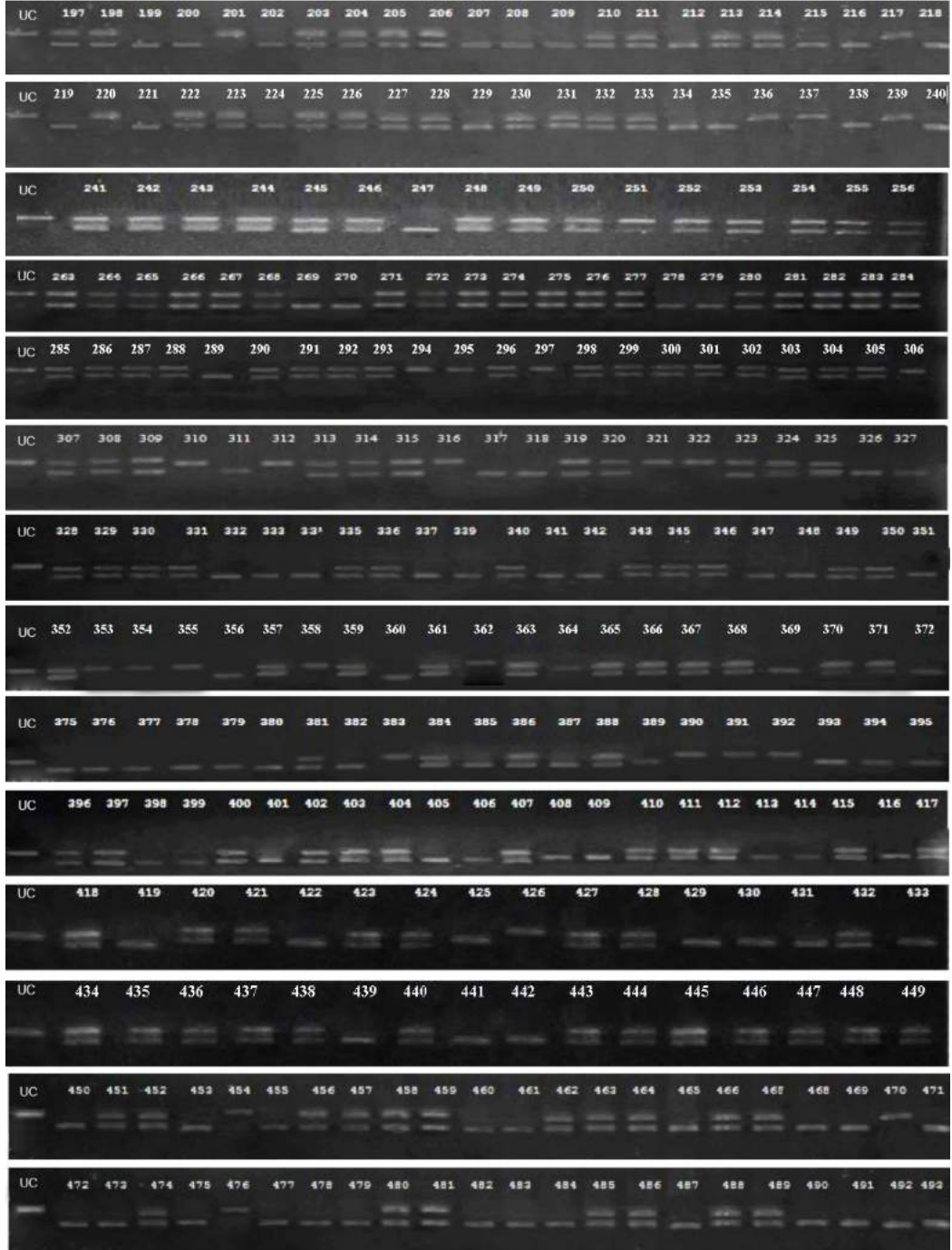
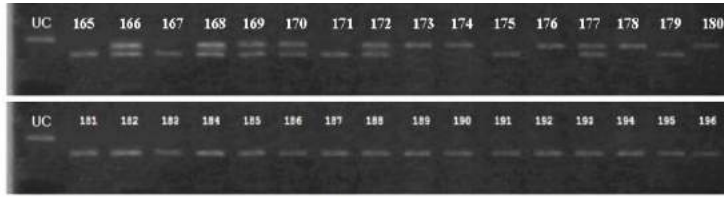
Hình 11A. Điện di đồ sản phẩm PCR khuếch đại vùng trình tự đích chứa *TLR4* rs2149356

M: Marker 100bp; +: Đối chứng dương; -: Đối chứng âm

1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 352-521: HG-P-001 đến HG-P-170;

2. Xác định kiểu gen *TLR4* rs2149356 bằng phương pháp cắt enzyme giới hạn



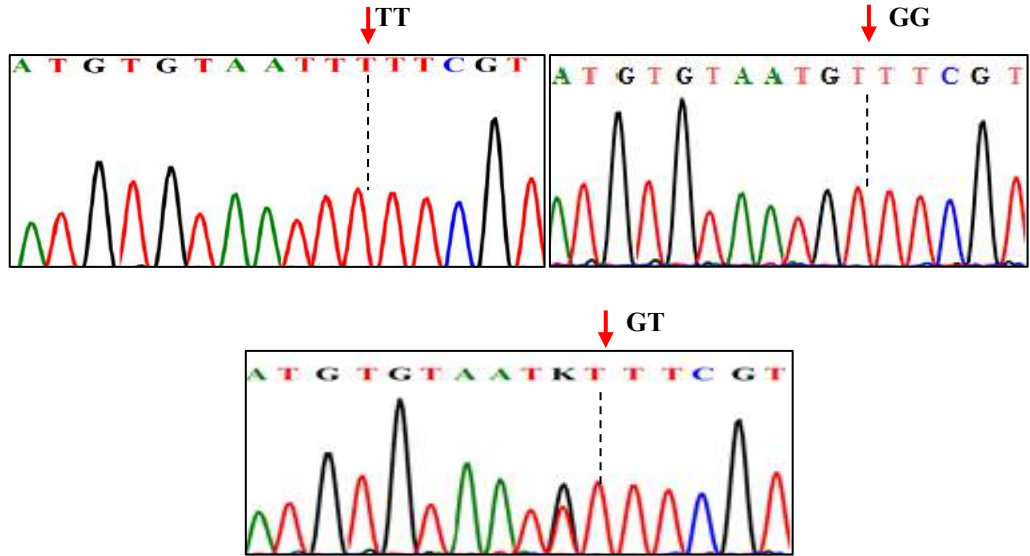


Hình 11B. Điện di sản phẩm cắt enzyme *HinfI*

M: Marker 100bp; PCR – Uncut (UC): Mẫu PCR uncut;

1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 352-521: HG-P-001 đến HG-P-170.

3. Kết quả xác định kiểu gen đa hình *TLR4* rs2149356 bằng phương pháp giải trình tự



Hình 11C. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen TT, GG và GT của *TLR4* rs2149356

	↓rs2149356
HG-C-100	AGTATCTGTGACACTTATGTTGTAATGTTTCGTATCTCTGAAATTGATATT
HG-C-101K.....
HG-C-102K.....
HG-C-103T.....
HG-C-104
HG-C-105K.....
HG-C-106
HG-C-107T.....
HG-C-107T.....
HG-C-109
HG-C-110
HG-C-111
HG-C-112
HG-C-113
HG-C-114K.....
HG-C-115K.....
HG-C-116
HG-C-117
HG-C-118K.....
HG-C-119
HG-C-120K.....
HG-C-121K.....
HG-C-122K.....
HG-C-123
HG-C-124K.....
HG-C-125K.....

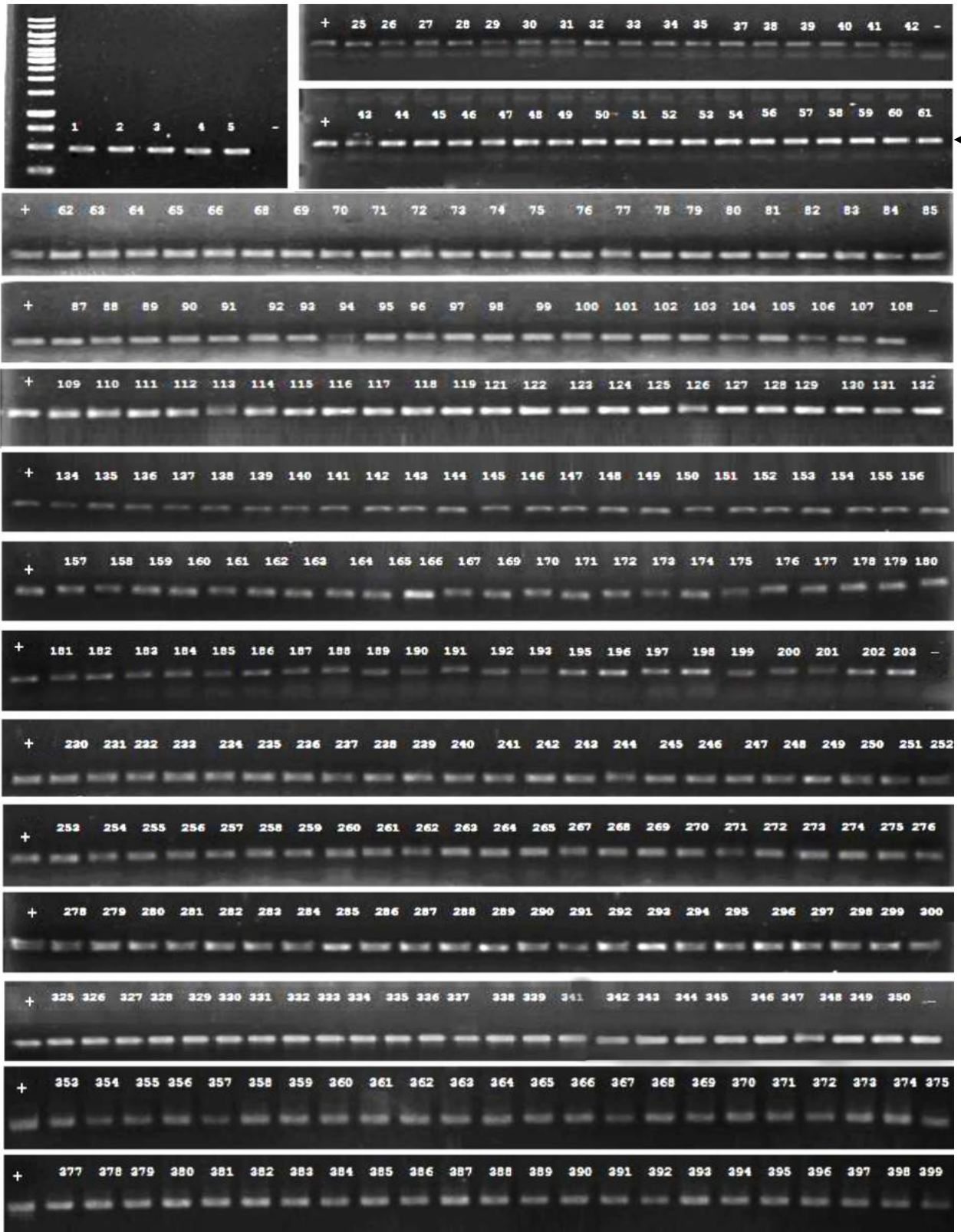
HG-P-002	AGTATCTGTGACACTTATGTGTAATTTTCGTATCTCTGAAATTGATATT
HG-P-003
HG-P-004
HG-P-005G.....
HG-P-006K.....
HG-P-007
HG-P-008K.....
HG-P-009
HG-P-010K.....
HG-P-011
HG-P-012K.....
HG-P-013
HG-P-014K.....
HG-P-015K.....
HG-P-016K.....
HG-P-017K.....
HG-P-018G.....
HG-P-019K.....
HG-P-020K.....
HG-P-021G.....
HG-P-022
HG-P-023
HG-P-024G.....
HG-P-025G.....

Hình 11D. Trình tự nucleotide có chứa *TLR4* rs2149356 của 50 mẫu đối chứng và mẫu bệnh

PHỤ LỤC XII
KẾT QUẢ PCR, CẮT ENZYME VÀ GIẢI TRÌNH TỰ
GEN CỦA ĐA HÌNH *SLC17A1* rs1165196

1. Kết quả PCR khuếch đại vùng trình tự đích chứa *SLC17A1* rs1165196

M





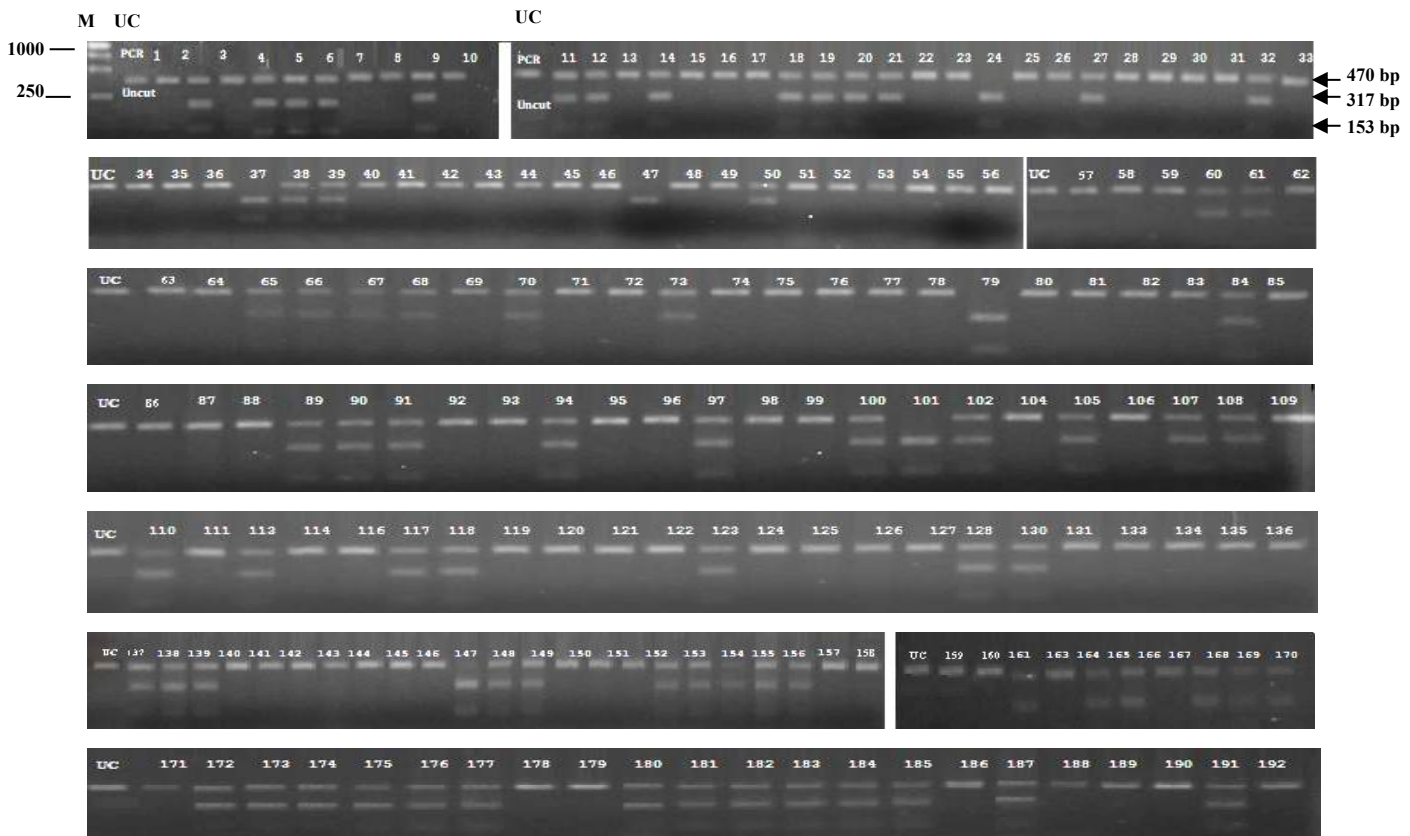
Hình 12A. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại vùng trình tự đích đa hình *SLC17A1*

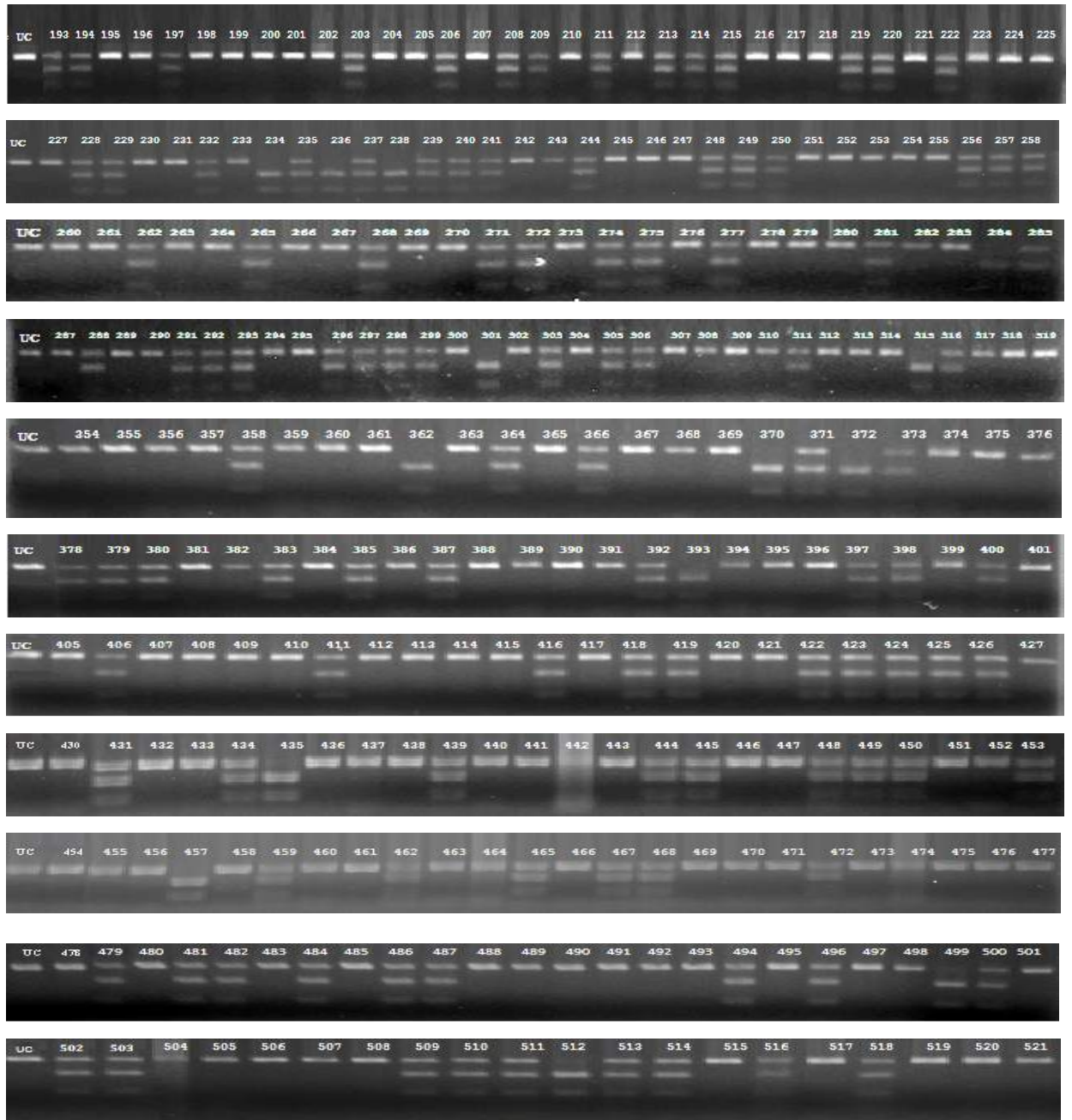
rs1165196

M: Marker 1kb; +: Đối chứng dương; -: Đối chứng âm

1-351: HG-C-001 đến HG-C-351; 352-521: HG-P-001 đến HG-C-170;

2. Xác định kiểu gen *SLC17A1* rs1165196 bằng phương pháp cắt enzyme giới hạn



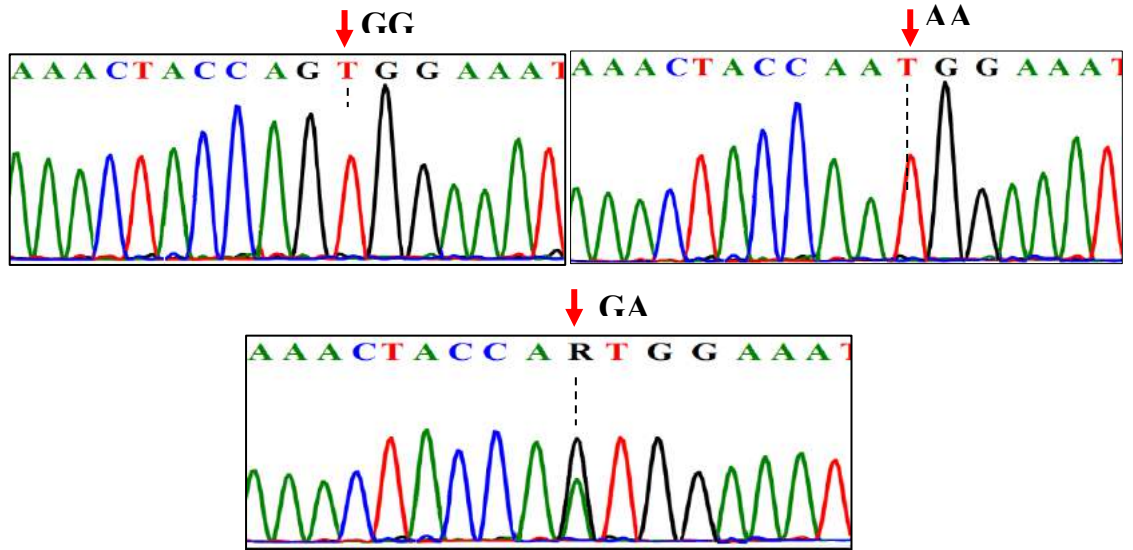


Hình 12B. Điện di sản phẩm cắt enzyme *TspRI*

M: Marker 1kb; PCR – Uncut (UC): Mẫu PCR uncut;

1-170: HG-P-001 đến HG-P-170; 171-521: HG-C-001 đến HG-C-351.

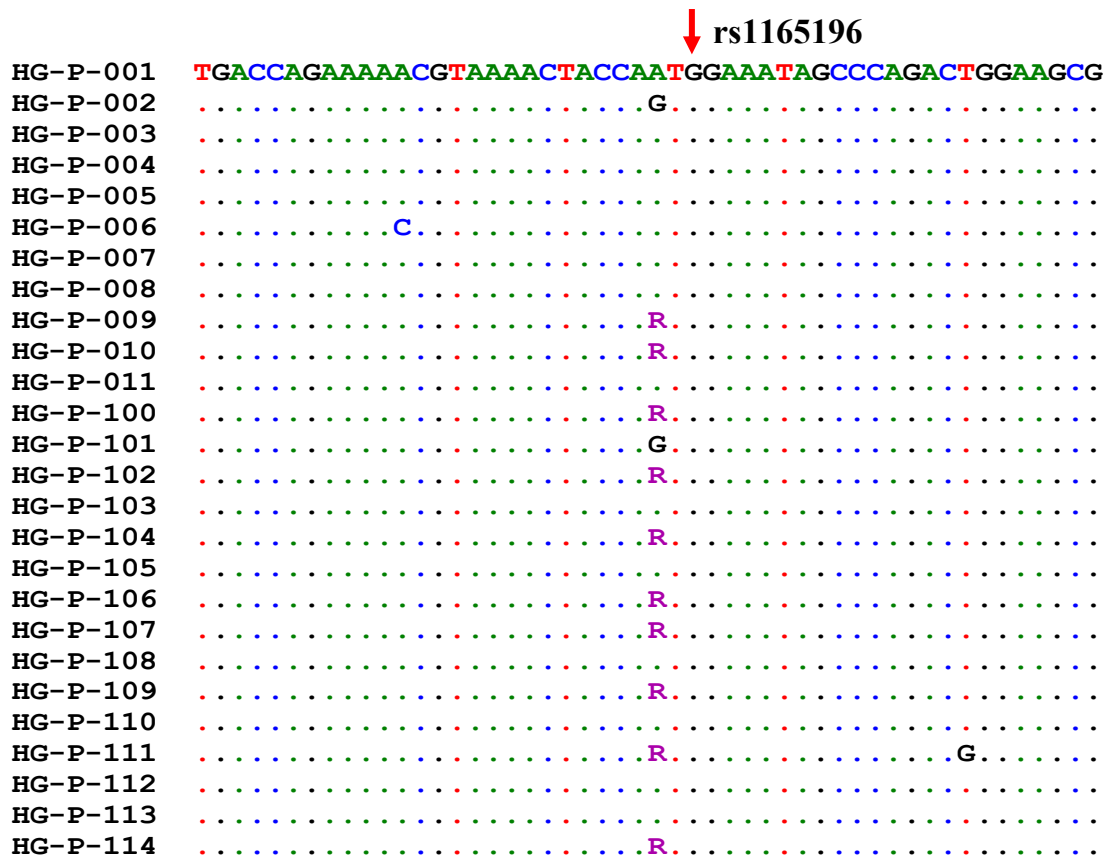
3. Kết quả xác định kiểu gen *SLC17A1* rs1165196 bằng phương pháp giải trình tự



Hình 12C. Trình tự nucleotide 3 mẫu đại diện có kiểu gen GG, AA và GA của *SLC17A1* rs1165196

rs1165196

HG-C-001	TGACCAGAAAAACGTAAACTACCAATGGAAATAGCCCAGACTGGAAG
HG-C-002R.....
HG-C-003R.....
HG-C-004R.....
HG-C-005R.....
HG-C-006R.....
HG-C-007R.....
HG-C-008R.....
HG-C-009R.....
HG-C-010R.....
HG-C-011R.....
HG-C-012R.....
HG-C-013R.....
HG-C-014R.....
HG-C-015R.....
HG-C-016R.....
HG-C-017R.....
HG-C-018R.....
HG-C-019R.....
HG-C-020R.....
HG-C-021R.....
HG-C-022R.....
HG-C-023R.....
HG-C-024G.....
HG-C-025R.....



Hình 12D. Trình tự nucleotide có chứa *SLC17A1* rs1165196 của 50 mẫu đối chứng và mẫu bệnh

PHỤ LỤC XIII
BẢNG THU THẬP SỐ LIỆU

BẢNG THU THẬP SỐ LIỆU
NGHIÊN CỨU TÍNH ĐA HÌNH CỦA
MỘT SỐ GEN TRÊN BỆNH NHÂN GÚT

A. HÀNH CHÁNH

Họ tên BN:..... Tuổi:.....

Nam Nữ

Ngày khám:.....Mã bệnh nhân:.....

B. PHẦN CHUYÊN MÔN

- Lâm sàng:
 - Chiều cao :(cm)
 - Cân nặng : (kg)
 - Huyết áp :/ (mmHg)
- Cận lâm sàng:
 - CRP :mg/l
 - Acid Uric : micromol/l
 - Cholesterol toàn phần :mmol/l
 - HDL-C :mmol/l
 - LDL-C :mmol/l
 - Triglycerid :mmol/l
 - Glucose máu :mmol/l
 - AST : U/l
 - ALT : U/l
 - BUN :mmol/l
 - Creatinine : micromol/l
 - WBC : / μ L