

và xuyên vòng van, thời gian THNCT >120 phút, và đặc biệt có biến chứng hậu phẫu. Các biến chứng sau phẫu thuật với 3 biến chứng xảy ra ở 4 bệnh nhân chiếm tỉ lệ 12,5%, trong đó có 1 trường hợp bị suy hô hấp do hẹp khí quản/ tạo hình khí quản slideplasty và viêm phổi với tỷ lệ 18,7% và nhiễm trùng vết mổ chiếm 6,3%. Trong nghiên cứu có 1 trường hợp người bệnh tử vong do bị suy tim, viêm phổi, thở máy kéo dài và tử vong trong bệnh cảnh suy đa cơ quan, chiếm tỉ lệ 3,1%. Tỉ lệ tử vong trong nghiên cứu của chúng tôi gần tương đương so với các nghiên cứu gộp dữ liệu đa trung tâm, tổng hợp các số liệu về phẫu thuật sửa chữa ToF trên thế giới [3], [4]. Theo các tác giả, có thể giảm thấp tỉ lệ tử vong nếu bảo vệ cơ tim tốt trong lúc phẫu thuật, hạn chế tối đa những tác động xấu của quá trình chạy tuần hoàn ngoài cơ thể và hoàn thiện kỹ thuật mổ và hồi sức sau mổ.

V. KẾT LUẬN

Tứ chứng Fallot là bệnh lý tim bẩm sinh nặng với các triệu chứng bao gồm khó thở và những cơn tím xảy ra đột ngột, có thể gây tử vong. Phẫu thuật sửa chữa toàn bộ tứ chứng Fallot cho trẻ dưới 12 tháng tuổi tiếp cận qua đường nhĩ phải và động mạch phổi với chiến lược bảo tồn van động mạch phổi với tỉ lệ tử vong thấp và ít biến chứng trong giai đoạn hồi sức và theo dõi ngắn hạn sau mổ đã khẳng định tính an toàn, hiệu quả của phẫu thuật.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Bacha E.A, Scheule A.M, Zurakowski D, Erickson L.S, Hung J, Lang P et al (2001).** Long-term results after early primary repair of tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 122; 154-161.
2. **Bialock A, Taussig HB (1945).** The surgical treatment of malformation of the heart in which there is pulmonary stenosis or pulmonary atresia. *JAMA*; 128:189.
3. **Bobae Jeon MD, Dong-Hee Kim MD et al (2020).** Surgical treatment of tetralogy of Fallot in symptomatic neonates and young infants. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, Volume 159, Issue 4, April, Pages 1477-1478
4. **Loomba R. S., Buelow M. W., Woods R. K. (2017).** Complete Repair of Tetralogy of Fallot in the Neonatal Versus Non-neonatal Period: A Meta-analysis. *Pediatr Cardiol*, 38, (5), pp. 893-901
5. **Kirklin JW, DuShane JW, Patrick RI, et al (1955).** Intracardiac surgery with the aid of a mechanical pump-oxygenator system (Gibbon type): report of eight cases. *Mayo Clin Proc*; 30:201.
6. **Seliem MA, Wu YT, Glenwright K. (1995).** Relation between age at surgery and regression of right ventricular hypertrophy in tetralogy of Fallot. *Pediatr Cardiol*; 16(2):53-55. Vol. 232
7. **Knott-Craig CJ, Elkins RC, Lane MM, et al (1998).** A 26-year experience with surgical management of tetralogy of Fallot: risk analysis for mortality or late reintervention. *Ann Thorac Surg*; 66:506-511
8. **Van Der Ven J. P. G., van den Bosch E., Bogers Ajcc, Helbing W. A. (2019).** Current outcomes and treatment of tetralogy of Fallot. *F1000Res*, doi: 10.12688/f1000research.17174.1. eCollection 2019

TÍNH ĐA HÌNH TRÌNH TỰ GEN MÃ HÓA ND5 VÀ ND6 Ở NGƯỜI DÂN TỘC GIARAI VÀ Ê ĐÊ SỐNG Ở TÂY NGUYÊN

Nguyễn Minh Tùng*, Nguyễn Văn Ba**, Nguyễn Đăng Tôn***

TÓM TẮT

Mục tiêu: Xác định tính đa hình trình tự gen mã hóa ND5 và ND6 ở người dân tộc Gia Rai và Ê đê sống ở Tây Nguyên. **Đôi tượng và phương pháp nghiên cứu:** 54 mẫu máu ngoại vi của người bình thường khỏe mạnh, thuộc các dân tộc Gia Rai và Ê đê được tách chiết DNA, khuếch đại gen ND5, ND6 bằng phương pháp PCR, tinh sạch DNA, giải trình tự tự động. Sau

đó, trình tự gen ND5 và ND6 được phân tích và so sánh với trình tự chuẩn bằng phần mềm chuyên dụng, so sánh tính đa hình ND5, ND6 với tính đa hình được công bố trên MITOMAP. **Kết quả:** Đã xác định được trình tự gen mã hóa ND5, ND6 và xác định được tính đa hình trình tự gen mã hóa ND5 và ND6 ở người dân tộc Gia Rai và Ê đê sống ở Tây Nguyên. **Kết luận:** Nghiên cứu đã cung cấp số liệu về tính đa hình trình tự gen mã hóa ND5 và ND6 ở người dân tộc Gia Rai và Ê đê sống ở Tây Nguyên.

Từ khóa: Tính đa hình, ND5, ND6, Gia Rai, Ê đê, Tây Nguyên.

SUMMARY

MITOCHONDRIAL NADH DEHYDROGENASE SUBUNIT 5 AND SUBUNIT 6 GENE POLYMORPHISMS IN GIARAI AND EDE ETHNIC PEOPLE LIVING IN THE CENTRAL HIGHLANDS

*Học viện Quân Y

**Bệnh viện Quân Y 103

***Viện nghiên cứu hệ gen

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Minh Tùng

Email: bsqytung@gmail.com

Ngày nhận bài: 5/5/2021

Ngày phản biện khoa học: 26/5/2021

Ngày duyệt bài: 18/6/2021

Objective: To determine the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5 and NADH dehydrogenase subunit 6 gene polymorphisms in Gia Rai and Ede ethnic people living in central highlands. **Subjects and methods:** 54 peripheral blood samples of healthy people from Gia Rai and Ede ethnic groups were extracted DNA, amplified ND5, ND6 genes by PCR, purified DNA, and sequenced automatically. Then, ND5 and ND6 gene sequences were analyzed and compared with standard sequences using specialized software, comparing ND5, ND6 polymorphisms with polymorphisms published on MITOMAP. **Results:** ND5, ND6 sequences and the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5 and NADH dehydrogenase subunit 6 gene polymorphisms in Gia Rai and Ede ethnic people living in central highlands were identified. **Conclusions:** This study provided data on ND5 and ND6 gene sequence and polymorphisms in Gia Rai and Ede ethnic groups living in the Central Highlands.

Keywords: Polymorphisms, ND5, ND6, Gia Rai, Ede, Central Highlands.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hệ gen người gồm có hai phần: hệ gen nhân (hệ gen nhiễm sắc thể) và hệ gen tế bào chất (hệ gen ty thể). Hệ gen nhân có kích thước khoảng 3,2 tỉ bp, trong khi đó, hệ gen ty thể đã được biết đến từ năm 1981 với kích thước 16569 bp, tức là nhỏ hơn hệ gen nhân rất nhiều. Gen ND5 ty thể (mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5) là một trong số 37 gen chức năng mã hoá cho 13 polypeptide của chuỗi hô hấp tế bào, có chiều dài 1812 bp, nằm giữa nucleotide 12337 và 14148 [1]. Đây là gen có trình tự mã hoá liên tục, được mã hoá bởi chuỗi nặng giàu guanine của DNA ty thể [1]. Sản phẩm của gen ND5 có khối lượng phân tử khoảng 66.6 kDa, nằm ở phần kỵ nước của phức hệ enzyme NADH - ubiquinone oxydoreductase (phức hệ I) (EC 1.6.5.3). Protein này là một trong 7 tiểu phần được mã hoá bởi DNA ty thể trong số 42 tiểu phần của phức hệ I của chuỗi hô hấp [2]. Các nghiên cứu trên thế giới về gen ND5 tập trung chủ yếu vào nghiên cứu các quan hệ di truyền theo mẫu hệ, phân loại các nhóm đơn bội (haplogroups) và các dòng phả hệ hoặc nghiên cứu về các bệnh di truyền liên quan đến ty thể như bệnh liệt thần kinh thị giác di truyền Leber (Leber hereditary optic neuropathy, LHON), Leigh, bệnh viêm não tủy nhiễm lactic acid với các tình tiết giống đột quỵ (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like episodes - MELAS)...

Gen ND6 ty thể (mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 6) nằm trên chuỗi nhẹ của phần tử DNA ty thể từ vị trí nucleotide 14149 đến 14673 [1], gồm 525 cặp base với

trình tự mã hoá liên tục, không có các đoạn intron. Gen ND6 là gen chức năng, tuy có kích thước không lớn, nhưng lại chứa tương đối nhiều điểm đột biến gây ra các bệnh ty thể, đặc biệt là LHON, Leigh và MELAS.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu. Đối tượng nghiên cứu là các mẫu máu ngoại vi của người bình thường, khỏe mạnh, thuộc các dân tộc Gia Rai và Êđê.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Tách chiết DNA tổng số từ máu:

DNA tổng số được tách chiết từ các mẫu máu toàn phần lưu giữ ở nhiệt độ -80°C theo phương pháp của Sambrook và Russell (2001).

- Khuếch đại và xác định trình tự gen ND5 và ND6 DNA ty thể:

+ Môi: Gen ND5 và gen ND6 được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR, sử dụng cặp mồi đặc hiệu ND5F/R và ND6F/R, tương ứng.

Bảng 2.1. Trình tự mồi khuếch đại gen ND5 và ND6

Tên mồi	Trình tự mồi
ND5F	5'- AGG ACT CAA CAT ACT AGT CAC AGC -3'
ND5R	5'- GAG GTC GAT GAA TGA GTG GTT -3'
ND5F	5' - GCACAATCCCCTATCTAGGC-3'
ND5R	5'-GAGGTCGATGAATGAGTGGTT- 3'

+ Hỗn hợp phản ứng: bao gồm 0,625 đơn vị Taq DNA polymerase, 1 × đệm PCR, 250 μM dNTP mỗi loại, 10 pM mỗi loại mồi và 500 ng DNA tổng số.

+ Chu trình nhiệt: Kỹ thuật PCR được tiến hành trên máy luân nhiệt (Eppendorf Master Cycler) với chu trình nhiệt như sau: 96°C, 3 phút; 35 chu kỳ (96°C, 20 giây; 58°C, 1 phút; 72°C, 1 phút 20 giây); 72°C, 10 phút, sau đó giữ ở 4°C. Sản phẩm PCR được đó tinh sạch bằng Kit SV Wizard của hãng Promega theo phương pháp của nhà sản xuất.

- Giải trình tự gen ND5 và ND6: sử dụng hệ thống máy giải trình tự tự động ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer sử dụng bộ kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

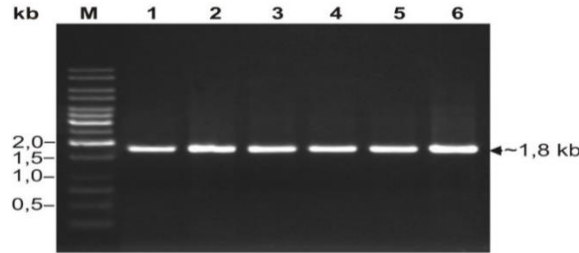
- Xử lý và phân tích trình tự: Trình tự gen ND5 và ND6 của DNA ty thể của 54 cá thể người Việt Nam đã được phân tích, so sánh với trình tự chuẩn Cambridge (rCRS) đã được công bố trên Ngân hàng dữ liệu về DNA ty thể [3] bằng các phần mềm sinh học chuyên dụng SeqScape v2.6, ClustalX v2.0... Đồng thời cũng so sánh các đặc điểm đa hình của các mẫu nghiên cứu với các đặc điểm đa hình đã được công bố trên

MITOMAP (Mitomap: A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả quá trình xác định trình tự gen ND5 và ND6

DNA tổng số đã được tách chiết, tinh sạch và kiểm tra nồng độ bằng quang phổ, dùng làm khuôn để nhân đoạn gen ND5. Kết quả điện di sản phẩm PCR thu được ở hình 3.1.



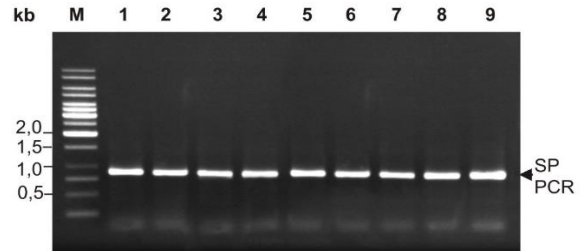
Hình 3.1. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân đoạn gen ND5 trên gel agarose 0,8%

M: Thang DNA chuẩn. Các đường chạy được đánh số tương ứng với một số mẫu thuộc dân tộc Ede và Giarai.

Kết quả cho thấy đều thu được sản phẩm PCR đặc hiệu, rõ nét ở các mẫu nghiên cứu. Kích thước của các sản phẩm PCR này đều phù hợp với các tính toán lý thuyết ở trên. Kết quả còn cho thấy cặp mồi sử dụng có tính đặc hiệu cao và chu trình nhiệt để nhân đoạn gen ND5 đã được tối ưu hóa. Các sản phẩm PCR này đủ tiêu chuẩn để dùng cho các bước thí nghiệm tiếp theo.

Tương tự, đối với gen ND6, kết quả điện di ở hình 3.2. cho thấy ở tất cả các đường chạy đều xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng 900bp theo tính toán lý thuyết. Các băng đều sáng

đậm, rõ nét, không có băng phụ chứng tỏ chu trình lựa chọn và nồng độ thành phần tham gia phản ứng là thích hợp.



Hình 3.2. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân đoạn gen ND6 trên gel agarose 0,8%

M: Thang DNA chuẩn. Các đường chạy được đánh số tương ứng với một số mẫu thuộc dân tộc Ede và Giarai.

Chúng tôi tiến hành phân tích và lắp ghép các trình tự nucleotide thu được và đã có trình tự hoàn chỉnh của gen ND5 và ND6. Trình tự của gen ND5 có kích thước 1812 bp, được xác định từ vị trí 12337 đến 14148. Gen ND6 là gen chức năng, sản phẩm của nó là chuỗi polypeptide bao gồm 174 amino acid. Amino acid đầu tiên trong chuỗi được mã hoá bởi mã bộ ba bắt đầu từ vị trí nucleotide 14673 đến 14671. Với trình tự gen ND5 và ND6 đã xác định được (bảng 3.1, bảng 3.2), chúng tôi xác định tính đa hình của trình tự gen ND5 và ND6 so với trình tự chuẩn Cambridge (rCRS), thu được các kết quả liệt kê ở mục 3.2. dưới đây.

3.2. Tính đa hình trình tự gen ND5 và ND6. Kết quả tính đa hình trình tự gen ND5 và ND6 so với trình tự chuẩn Cambridge chúng tôi thu được bảng sau:

Bảng 3.2. Các điểm thay đổi nucleotide trên gen ND5 và ND6 ở các mẫu nghiên cứu

	12367	12374	12418	12441	12462	12466	12478	12482	12511	12515	12521	12527	12528	12545	12551	12566	12577	12581	12582	12594	12604	12612	12617	12620	12623	12628	12631	12655
	ND5														ND6													
RCR S	T	A	C	G	A	G	G	T	G	G	C	A	G	T	T	T	G	C	T	G	T	T	T	A	A	C	T	G
Ed01_M68	A	.	.	.	A	.	C	C	.	T	G	.	.
Ed02_M68	A	.	.	.	A	.	C	C	.	T	C	.	G	.	.
Ed03_M68	A	.	.	.	A	.	C	C	.	T	C	.	G	.	.
Ed04_M21	G	.	.	.	A	.	T	.	A	.	C	C
Ed05_M73	A	.	.	.	A	.	C	C	C
Ed06_F1f	.	.	.	A	.	.	A	.	A	.	.	.	A	.	C	C	A

Silva và đồng tác giả (2003) đã sử dụng các điểm đa hình để phân loại các nhóm đơn bội và nghiên cứu di truyền tiến hoá của những người Mỹ bản xứ di cư từ Châu Á, trong đó đề cập đến điểm đa hình C12705T. Kết quả cho thấy, tỉ lệ tương đồng giữa các đa hình nucleotide cao chứng tỏ các nhóm đơn bội có chung một nguồn gốc và có thể có chung cả lịch sử phát triển[4].

Ngoài nghiên cứu về phân loại các nhóm đơn bội, các tác giả khác lại tập trung nghiên cứu đa hình/đột biến gen ND5 có liên quan đến bệnh tật. Sudoyo và cộng sự (2002) nghiên cứu 19 bệnh nhân mắc bệnh LHON có nguồn gốc dân tộc Đông Nam Á nhằm xác định mối liên quan giữa các kiểu đơn của DNA ty thể có liên quan đến đột biến này, đã công bố những điểm đột biến C12405T, G12406A C12882T và G13759A [5]. Young và cộng sự (2005) đề cập về các đột biến DNA ty thể có liên quan với bệnh khiếm thính và đã phát hiện thấy điểm A12358G xuất hiện trong một trong 4 phả hệ người Trung Quốc thuộc các nhóm đơn bội Đông Á khác nhau[6]. Divne (2003) nghiên cứu về quan hệ của hệ gen ty thể với triệu chứng đột tử ở trẻ em (SIDS - sudden infant death syndrome) ở 20 trẻ em mắc bệnh phát hiện các đột biến thay thế A11467G, A12308G và G12372A đều xuất hiện ở cả 4 trẻ mắc bệnh[7]. Như vậy, tính đa hình/đột biến của gen ND5 ty thể có thể liên quan tới nhiều bệnh tật khác nhau, vì vậy có thể được sử dụng làm chỉ thị di truyền. Các số liệu trình tự chúng tôi thu được cùng với các vị trí đa hình/đột biến đã phát hiện được cung cấp dữ liệu cho những nghiên cứu tiếp theo về bệnh di truyền liên quan đến ty thể ở người Việt Nam.

4.2. Trình tự và tính đa hình gen ND6.

Cho đến nay, có hơn 80 điểm đột biến/ đa hình ở gen ND6 ty thể đã công bố trên trang Web <http://www.mitomap.org>. Trong đó, khoảng 40 điểm đa hình là các thay thế đồng nghĩa, khoảng hơn 20 điểm đột biến/ đa hình gây ra các bệnh truyền ty thể với trên 10 điểm đột biến được xác định là nguyên nhân gây ra LHON.

Trong các thay thế đồng nghĩa đã công bố, hầu hết không biểu hiện tính trạng đặc biệt hay không gây ra triệu chứng bệnh nào. Tuy nhiên, có một số thay thế đồng nghĩa xuất hiện ở những bệnh nhân mắc LHON, u tuyến giáp, ung thư gan và MELAS, đó là các điểm thay thế: C14281A, C14284A, G14364A, A14386G, A14388G và T14470C.

Liệt thần kinh thị giác di truyền Leber là nguyên nhân gây ra bệnh mù di truyền ở người.

Khoảng 90% bệnh nhân mắc bệnh này mang ít nhất một trong ba đột biến: G3460A trên gen ND1, G11778A trên gen ND4, và T14484C trên gen ND6. Đột biến T14484C khác với 2 đột biến còn lại ở chỗ nó xuất hiện với tần số cao ở nhóm đơn bội J (khoảng 75% cá thể mang đột biến này thuộc nhóm đơn bội J).

Ugalde và đồng tác giả (2003) đã tìm thấy đột biến T14487C ở một bệnh nhân mắc hội chứng Leigh. Đây là trường hợp dị tế bào chất ở gen ND6 ty thể, làm thay đổi amino acid ở vị trí 63 từ Methionine thành Valine. Nhóm tác giả này đã nhận thấy ở người mẹ của bệnh nhân có 24% ty thể mang đột biến trong máu còn bệnh nhân có 65% ty thể mang đột biến ở cơ, gan và 86% trong nguyên bào sợi. Điều này được giải thích bởi lý do: các đột biến ty thể có thể gây ra bệnh hay không còn phụ thuộc vào tỷ lệ ty thể mang đột biến đó trong cơ thể, cũng như phụ thuộc vào cơ quan chứa ty thể mang đột biến[

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã cung cấp số liệu về tính đa hình trình tự gen mã hóa ND5 và ND6 ở người dân tộc Gia Rai và Ede sống ở Tây Nguyên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Anderson S., Bankier A., Barrell B. et al** (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457 - 465.
2. **Shoffner J.M., Wallace D.C.** (1995) Oxidative phosphorylation diseases. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. 1: 1535-1609.
3. **Andrew R.M., Kubacka I., Chinery P.E. et al** (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23 - 147.
4. **Silva W.A., Bonatto S.L., Holanda A.J. et al** (2002). Mitochondrial genome diversity of Native Americans supports a single early entry of founder populations into America. *Am J Hum Genet* 71(1):187-92.
5. **Sudoyo H, Suryadi H, Lertrit Pet al** (2002) Asian-specific mtDNA backgrounds associated with the primary G11778A mutation of Leber's hereditary optic neuropathy. *J Hum Genet* 47 (11): 594-604
6. **Young WY, Zhao L, Qian Yet al** (2005) Extremely low penetrance of hearing loss in four Chinese families with the mitochondrial 12S rRNA A1555G mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 328(4):1244-51
7. **Divne AM, Rasten-Almqvist P, Rajs Jet al** (2003) Analysis of the mitochondrial genome in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatr* 92(3):386-8
8. **Zhadanov SI, Atamanov VV, Zhadanov NI et al** (2005) A novel mtDNA ND6 gene mutation associated with LHON in a Caucasian family. *Biochem Biophys Res Commun* 332(4): 111511-21.