

có đường kính động mạch quá nhỏ ($\leq 1\text{mm}$) và bất thường mạch máu thì ứng dụng siêu âm đánh dấu không làm tăng tỷ lệ thành công khi thiết lập catheter động mạch quay.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tìm thấy sự ảnh hưởng của yếu tố kích thích, không hợp tác ở trẻ đối với kết quả thành công ở lần đặt đầu tiên. Qua đó có thể thấy tầm quan trọng của việc giữ tư thế cổ tay của trẻ và giảm đau, an thần trước khi thực hiện kỹ thuật.

Nghiên cứu của chúng tôi vẫn còn một số hạn chế: Nghiên cứu của chúng tôi phần lớn khảo sát trên nhóm dân số trẻ nhỏ, chỉ có 1 trường hợp là trẻ sơ sinh vì thế gặp phải hạn chế trong việc ứng dụng kết quả nghiên cứu này cho nhóm dân số sơ sinh. Cỡ mẫu của nghiên cứu nhỏ và phương pháp chọn mẫu thuận tiện vì thế thiếu tính khái quát cho toàn bộ dân số. Bên cạnh đó, do hạn chế nguồn lực nên nghiên cứu của chúng tôi chưa đánh giá đến yếu tố thời gian đặt động mạch, là một trong những yếu tố góp phần phản ánh tính khả thi của kỹ thuật này.

V. KẾT LUẬN

Áp dụng siêu âm đánh dấu vị trí động mạch ngay từ ban đầu khi thiết lập catheter động mạch quay đã cho thấy tỉ lệ thành công cao, giảm số lần đâm kim và tỉ lệ biến chứng thấp sau thủ thuật. Có thể xem xét việc thực hiện một nghiên cứu riêng biệt đối với nhóm dân số sơ sinh vì đó là nhóm dân số không được đề cập đến trong nghiên cứu này. Cần đào tạo kỹ thuật siêu âm cho điều dưỡng đủ kinh nghiệm để chủ động hơn trong thực hiện kỹ thuật, đặc biệt là đào tạo chuyên sâu hơn nữa để thực hiện ứng dụng siêu âm thời gian thực nhằm nâng cao tỷ lệ thành công ở

tất cả các bệnh nhi, bao gồm cả nhóm bệnh nhi khó thiết lập catheter động mạch quay. Các đơn vị chăm sóc tích cực nhi khoa nên nhân rộng kỹ thuật này khi được trang bị đầy đủ máy siêu âm và nhân lực được đào tạo về siêu âm tiếp cận mạch máu ngoại biên.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Anantasit, N., et al.**, Ultrasound Versus Traditional Palpation to Guide Radial Artery Cannulation in Critically Ill Children: A Randomized Trial. *J Ultrasound Med*, 2017. 36(12): p. 2495-2501.
2. **Bai, B., Y. Tian, and C.H. Yu**, [Ultrasound-guided Radial Artery Cannulation]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2022. 44(2): p. 332-337.
3. **Franco-Sadud, R., et al.**, Recommendations on the Use of Ultrasound Guidance for Central and Peripheral Vascular Access in Adults: A Position Statement of the Society of Hospital Medicine. *J Hosp Med*, 2019. 14(9): p. E1-e22.
4. **Raphael, C.K., et al.**, Ultrasound-guided arterial cannulation in the paediatric population. *Cochrane Database Syst Rev*, 2023. 3(3): p. Cd011364.
5. **Scheer, B., A. Perel, and U.J. Pfeiffer**, Clinical review: complications and risk factors of peripheral arterial catheters used for haemodynamic monitoring in anaesthesia and intensive care medicine. *Crit Care*, 2002. 6(3): p. 199-204.
6. **White, L., et al.**, Ultrasound-guided radial artery cannulation in adult and paediatric populations: a systematic review and meta-analysis. *Br J Anaesth*, 2016. 116(5): p. 610-7.
7. **Zhang, W., et al.**, Efficacy of ultrasound-guided technique for radial artery catheterization in pediatric populations: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Crit Care*, 2020. 24(1): p. 197.

KHẢO SÁT BIẾN THỂ SỐ LƯỢNG BẢN SAO BẰNG GIẢI TRÌNH TỰ THỂ HỆ MỚI Ở BỆNH NHÂN TỬ CHỨNG FALLOT

Lê Minh Khôi^{3,4}, Phan Ngân Tường Vy², Nguyễn Hoài Thanh³, Vũ Diễm My¹,

¹Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

²Trường Đại học khoa học Tự nhiên TP. Hồ Chí Minh

³Bệnh viện Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

⁴ Trường Y, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Tác giả chịu trách nhiệm chính: Lê Minh Khôi

Email: khoi.lm@umc.edu.vn

Mã bài: **ND1 - 35**

Ngày nhận bài: 29/3/2026

Ngày phản biện khoa học: 28/3/2026

Ngày duyệt bài: 29/5/2026

TÓM TẮT

Mục tiêu nghiên cứu: Khảo sát các biến thể số lượng bản sao (Copy Number Variation - CNV) bằng giải trình tự thể hệ mới ở bệnh nhân Tử chứng Fallot có và không có mất đoạn 22q11.2

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu: Nghiên cứu được thực hiện trên 44 bệnh nhân Tử chứng Fallot đến thăm khám tại Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh từ 01/2025 - 12/2025. Trong đó bao gồm

22 bệnh nhân Tứ chứng Fallot đã được xác định có mất đoạn 22q11.2, và 22 trường hợp không ghi nhận mất đoạn 22q11.2.

Kết quả: Ở nhóm Tứ chứng Fallot có mất đoạn 22q11.2 ghi nhận thêm một số CNV chưa rõ chức năng ngoài vùng 22q11.2 bao gồm 1 CNV lặp đoạn 12q21.3 và 1 CNV lặp đoạn 2p25.3. Ở nhóm bệnh nhân Fallot không mất đoạn 22q11.2, ghi nhận lần lượt 1 CNV lặp đoạn tại 9q34.1, 1 CNV lặp đoạn tại 11p15.1, và 1 CNV lặp đoạn 15q13.3.

Kết luận: Bệnh nhân Tứ chứng Fallot có thể mang một số các CNV khác nhau bên cạnh mất đoạn 22q11.2 là bất thường nhiễm sắc thể thường gặp.

Từ khoá: Tứ chứng Fallot, hội chứng Digeorge, bệnh tim bẩm sinh, biến thể số lượng bản sao

SUMMARY

IDENTIFICATION OF COPY NUMBER VARIATIONS BY NEXT GENERATION SEQUENCING IN PATIENTS WITH TETRALOGY OF FALLOT

Background: Our research aims to identify copy number variation (CNV) by next-generation sequencing method in Tetralogy of Fallot patients with or without 22q11.2 deletion.

Methods: This study was conducted at University Medical Center, Ho Chi Minh City from 01/2025 to 12/2025. During the research period, 44 patients with Tetralogy of Fallot were enrolled, of which 22 cases were confirmed with 22q11.2 deletion.

Results: CNV analyses of the 22q11.2 deletion group resulted in additional detection of one patient with a 2p25.3 duplication and another patient with a 12q21.3 duplication. In the non-deletion group, 9q34.1, 11p15.1 and 15q13.3 duplications were obtained separately in three patients.

Conclusion: Although their clinical relevance remains to be defined, our results indicate that Tetralogy of Fallot patients can carry different CNVs besides the common 22q11.2 deletion.

Keywords: Tetralogy of Fallot, Digeorge syndrome, congenital heart disease, copy number variation

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tứ chứng Fallot (Tetralogy of Fallot - TOF) là bệnh bẩm sinh có tim thường gặp nhất với tỷ lệ mắc phải trên nhóm trẻ sơ sinh mang bệnh tim bẩm sinh là khoảng 5% - 10%, tương ứng với tần suất 1:3600 trên tổng số trẻ em chào đời. Tại Việt Nam, một nghiên cứu thực hiện trên 14.335 trẻ sinh sống tại Bệnh viện Phụ sản - Nhi Đà Nẵng cho thấy tần suất mắc bệnh tim bẩm sinh là 14,71/1000 trường hợp, với tỷ lệ mắc phải TOF là 0,47%^[1]. Trong 30 năm qua, tiên lượng của bệnh nhân TOF đã được cải thiện đáng kể nhờ vào những tiến bộ trong chẩn đoán, can thiệp, phẫu thuật và hồi sức. Tuy nhiên, trên những bệnh nhân có đặc điểm giải phẫu học tương tự và quy trình phẫu thuật gần như giống hệt nhau, diễn tiến sau phẫu thuật vẫn có sự khác biệt

lớn, đòi hỏi cần có thêm hiểu biết về cơ chế bệnh sinh và tiến triển của TOF. Đã có những báo cáo cho thấy kết cục của bệnh nhân có thể chịu ảnh hưởng bởi các hội chứng di truyền đồng mắc. Ước tính có khoảng 20 - 25% các trường hợp TOF có mang bất thường nhiễm sắc thể hoặc đột biến gen. Các bất thường di truyền có thể làm tăng nguy cơ xuất hiện biến chứng và ảnh hưởng đến sự phát triển thể chất, tinh thần của bệnh nhân. Một nghiên cứu đoàn hệ trên 479 đối tượng TOF và hẹp phổi/thông liên thất từ 12 trung tâm tại Hà Lan cho thấy bệnh nhân có mất đoạn 22q11.2 có tỷ lệ sống sót sau 12 năm thấp hơn đáng kể so với nhóm không mang đột biến ($p = 0,008$). Nghiên cứu đoàn hệ hồi cứu thực hiện bởi Herington và cộng sự trên 4800 bệnh nhân TOF ghi nhận tần suất can thiệp dẫn lưu dịch màng ngoài tim và thông tim cao hơn ở nhóm có bất thường nhiễm sắc thể^[2]. Tương tự, tỉ lệ sử dụng thuốc điều trị ở nhóm TOF có bất thường cao gấp đôi so với nhóm không mang đột biến gen ($p < 0,0001$)^[3]. Các bất thường nhiễm sắc thể thường gặp ở bệnh nhân TOF bao gồm mất đoạn 22q11.2 (Hội chứng DiGeorge), Trisomy 21 (Hội chứng Down), hội chứng Alagille... Trong đó, hội chứng DiGeorge và hội chứng Down là hai dạng thường gặp nhất lần lượt chiếm tỷ lệ 15% và 7% trên tổng số các trường hợp. Ngoài ra, ngày càng có nhiều các báo cáo đề cập đến sự xuất hiện của biến thể số lượng bản sao (Copy Number Variation - CNV) khác và vai trò của chúng trong TOF. Nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới khảo sát sự hiện diện của CNV ở bệnh nhân TOF, bên cạnh mất đoạn 22q11.2.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Bệnh nhân được chẩn đoán Tứ chứng Fallot đến thăm khám tại Bệnh viện Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh trong thời gian từ tháng 01/2025 đến tháng 12/2025, đồng ý tham gia nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tách chiết DNA

Mỗi bệnh nhân sẽ được thu nhận 3 mL máu ngoại vi trong ống EDTA. Tiến hành ly trích DNA bằng bộ kit GeneJET Genomic DNA Purification Kit theo hướng dẫn nhà sản xuất. Mẫu sau tách chiết được đo nồng độ bằng máy Nanodrop, mẫu DNA đạt nồng độ >30 ng/ μ L sẽ được sử dụng cho quá trình chuẩn bị thư viện.

Chuẩn bị thư viện giải trình tự thế hệ mới

Mẫu DNA sau tách chiết được phân mảnh và chuẩn bị thư viện bằng bộ kit NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit theo hướng dẫn của nhà sản

xuất. Nồng độ thư viện được xác định bằng bộ kit QuantiFluor dsDNA. Thực hiện giải trình tự trên hệ thống NextSeq 550 với số đoạn đọc tối thiểu cho mỗi mẫu là 3 triệu phân đoạn.

2.3. Phân tích số liệu

Phân tích kết quả giải trình tự

Chất lượng giải trình tự sẽ được đánh giá bằng FastQC. Kết quả giải trình tự sẽ được sắp giống với trình tự tham chiếu bộ gen người (NCBI build GRCh37) bằng Burrows-Wheeler Aligner và SAMtools. Sử dụng QDNAseq để tiến hành gọi biến thể số lượng bản sao. Các biến thể sau đó được đối chiếu với cơ sở dữ liệu OMIM và DECIPHER để

phân loại thành dạng bệnh lý, có khả năng gây bệnh, lành tính, hoặc chưa rõ chức năng theo tiêu chuẩn của ACMG và ClinGen.

Phân tích thống kê

Các số liệu được nhập vào phần mềm Excel, sau đó được xử lý thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism 8.

2.4. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu đã được phê duyệt bởi Hội đồng Đạo đức trong nghiên cứu Y sinh học Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh (số: 504/HĐĐĐ-ĐHYD, ngày 04/05/2023).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Đặc điểm dân số nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 44 bệnh nhân TOF đã trải qua phẫu thuật sửa chữa, trong đó có 22 bệnh nhân đã được xác nhận có mang đột biến mất đoạn 22q11.2. Nhóm bệnh nhân không mất đoạn có tuổi trung bình: $1,27 \pm 1,20$ tuổi (0 - 6 tuổi), nhóm bệnh nhân có mất đoạn có tuổi trung bình: $1,86 \pm 1,61$ tuổi (1 - 6 tuổi). Phần lớn bệnh nhân có cân nặng nhẹ hơn so với độ tuổi, với BMI trung bình tại thời điểm tham gia nghiên cứu là $15,80 \pm 2,88$. Phân suất tổng máu thất trái của tất cả bệnh nhân tại thời điểm tham gia nghiên cứu nằm trong ngưỡng bình thường với giá trị trung bình là $63,78 \pm 6,43$, dao động từ 50% - 77%.

Bảng 1. Đặc điểm dân số nghiên cứu

Đặc điểm	Tứ chứng Fallot (n=22)	Tứ chứng Fallot + mất đoạn 22q11.2 (n=22)	Giá trị P
Tuổi (năm)	1,0 (0,0 - 2,0)	1,0 (1,0 - 3,0)	0,23 ^a
Giới nam (n, %)	8 (36,3%)	8 (36,3%)	1,00 ^b
Chỉ số khối cơ thể	$16,2 \pm 3,4$	$15,4 \pm 2,2$	0,31 ^c
Chẩn đoán - TOF (n, %) - PA-VSD (n,%)	14 (63,6%) 8 (36,4%)	16 (72,7%) 6 (27,3%)	0,75 ^b
Phân suất tổng máu thất trái (%)	$64,6 \pm 6,6$	$62,9 \pm 6,3$	0,38 ^c

Dữ liệu trong bảng được mô tả dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn hoặc trung vị (khoảng tứ phân vị).

^aKiểm định Mann-Whitney, ^bKiểm định Fisher, ^cKiểm định t-test

Kết quả khảo sát biến thể số lượng bản sao (CNV)

Trong 44 mẫu được khảo sát, ngoài đột biến mất đoạn 22q11.2 đã được ghi nhận trước đó trên 22 bệnh nhân, kết quả phân tích dựa trên giải trình tự thế hệ mới đã phát hiện thêm 5 CNV lặp đoạn chưa rõ chức năng trên 5 trường hợp tham gia nghiên cứu. Trong đó, 2 CNV được phát hiện trên nhóm bệnh nhân có mất đoạn 22q11.2. Cụ thể, 1 CNV 0,8 Mb trên nhiễm sắc thể 2p25.3 có chứa các gen bao gồm *COLEC11*, *TRAPPC12*, *RPS7*, *RNASEH1* liên quan đến bệnh đã biết ở một bệnh nhân nữ 2 tuổi; và 1 CNV 0,9Mb tại vị trí 12q21.3 được phát hiện ở một bệnh nhân nữ 17 tuổi. Ở nhóm bệnh nhân không

mất đoạn 22q11.2, ghi nhận 1 CNV 0,5Mb tại vùng 9q34.1 trên một bệnh nhân nam 5 tuổi, 1 CNV 1,0Mb tại vị trí 11p15.1 có chứa gen *RYS3* và 1 CNV 0,6Mb tại 15q13.3 có liên quan đến gen *SETX*, *MED27*, *NTNG2* lần lượt trên bệnh nhân nữ 14 và 4 tuổi.

IV. BÀN LUẬN

Nhiều nghiên cứu cho thấy sự thay đổi về di truyền, bao gồm các biến thể số lượng bản sao (CNV), tham gia vào quá trình khởi phát và diễn tiến một số bệnh lý ở người. Trong bệnh lý tim mạch, bất thường CNV đã được báo cáo ở bệnh nhân tim bẩm sinh, bệnh cơ tim, nhồi máu cơ tim, hay bệnh tim mạch chuyển hóa. Các CNV được xác định là

nguyên nhân gây bệnh trên 10 - 15% các trường hợp tim bẩm sinh, tương đương với tần suất của các đột biến gen đơn lẻ hoặc các khiếm khuyết nhiễm sắc thể lớn, thường gặp tại các vị trí 1q21.1, 2q13, 8p23.1, 11q24, 15q11.2, 16p11.2, và 22q11.2; thông qua việc tác động đến các yếu tố điều hòa phiên mã tế bào tim mạch^[4]. Trong đột tử do tim mạch, một số bệnh nhân có sự xuất hiện của CNV ảnh hưởng đến các gen mã hóa protein cấu trúc và kênh trao đổi ion như *ACTC1*, *KCNQ1*, *MYBPC3*... Tuy nhiên, hiện vẫn còn ít các nghiên cứu đề cập đến các CNV và vai trò của chúng ở bệnh nhân Tứ chứng Fallot.

Nghiên cứu này sử dụng kỹ thuật giải trình tự thế hệ mới nhằm phát hiện các CNV vì mất/lặp đoạn có kích thước ≥ 400 Kb, so với phương pháp karyotype truyền thống chủ yếu phát hiện các bất thường nhiễm sắc thể có kích thước lớn >5 Mb. Kết quả cho thấy, bên cạnh mất đoạn thường gặp 22q11.2, nghiên cứu ghi nhận thêm 5 CNV lặp đoạn với kích thước trung bình là $0,76 \pm 0,21$ Mb tại các vị trí 2p25.3, 9q34.1, 11p15.1, 12q21.3, và 15q13.3. Các CNV này đã được ghi nhận riêng lẻ trên bệnh nhân tim bẩm sinh hoặc phì đại cơ tim trong các báo cáo khác nhau. Cụ thể, một nghiên cứu về tim bẩm sinh đã ghi nhận CNV lặp đoạn kích thước lớn 85Mb tại vùng 2p25.3, cùng với 2 CNV khác tại vị trí 2q11.1 và 20q11.2 trên một bệnh nhân Trung Quốc^[5]. Các CNV lặp đoạn với kích thước khác nhau tại vùng 9q34.1 đã được ghi nhận riêng lẻ trên một số bệnh nhân TOF như một trường hợp thai nhi Trung Quốc, một trẻ sơ sinh với teo van động mạch phổi và phù thai; hay một bệnh nhân nam với bất thường nhiễm sắc thể số 12^[6]. Bất thường tại một số điểm thuộc vùng 11p15.1 cũng đã được đề cập trong nghiên cứu về bệnh tim trẻ em với các khiếm khuyết vùng thân nón, thông qua tác động đến gen *CSRP3* mã hóa protein MLP tham gia vào quá trình điều hòa cấu trúc tế bào cơ tim, đĩa Z, và sự co cơ^[7]. Bất thường tại 12q21.3 đã được phát hiện trên bệnh nhi với hội chứng tim mạch da. Đây là vùng có chứa một số gen quan trọng như *TBX5* là yếu tố phiên mã điều hòa các con đường tín hiệu thiết yếu trong quá trình hình thành và phát triển tim. Nhóm của Lou và cộng sự tiến hành đánh giá kiểu gen và kiểu hình thai nhi có mang biến thể mất/lặp đoạn 15q13.3 cho thấy bất thường xảy ra tại vùng 15q13.3 liên quan đến dị tật tim bẩm sinh và giãn não thất bên^[8]. Gần đây, một nghiên cứu thực hiện gần đây tại Đại học Y Hà Nội cũng đã ghi nhận CNV mất đoạn tại vùng 15q13.1q13.2 trên thai nhi với dị tật tim bẩm sinh nghiêm trọng.

Do bất thường cấu trúc nhiễm sắc thể có thể ảnh hưởng đến các gen/nhóm gen khác nhau tùy thuộc vào vị trí chuyển đổi. Trong nghiên cứu này, các vùng xuất hiện lặp đoạn ghi nhận một số gen như

COLEC11, *TRAPPC12*, *RPS7*, *RNASEH1*, *SETX*, *MED27*, và *NTNG2*. Đột biến xảy ra tại những gen này đã được biết là có liên quan đến hội chứng 3MC, bệnh não/thần kinh, thiếu máu, bệnh ty thể. Tuy nhiên, có ít nghiên cứu đề cập đến tác động của lặp đoạn làm tăng số lượng bản sao gen và chức năng của chúng trong cơ thể. Do đó, cần tiến hành thêm các nghiên cứu biểu hiện gen để xác định vai trò của chúng trong bệnh tim bẩm sinh.

V. KẾT LUẬN

Bệnh nhân Tứ chứng Fallot có thể mang một số các CNV khác nhau bên cạnh mất đoạn 22q11.2 là bất thường nhiễm sắc thể thường gặp.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được phê duyệt bởi Sở Khoa học và Công nghệ TP.HCM theo Quyết định số 652/QĐ-SKHCN ngày 16/08/2024 và sử dụng kinh phí ngân sách nhà nước do Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ TP.HCM cấp theo Hợp đồng số 39/2024/HĐ-QKHCN ngày 22/08/2024.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Hoang TNG., Hai T.T., Nguyen H., et al. Elevated congenital heart disease birth prevalence rates found in Central Vietnam and dioxin TCDD residuals from the use of 2, 4, 5-T herbicides (Agent Orange) in the Da Nang region. *PLOS Global Public Health*, 2022, 2(10), e0001050.
2. Herington D.M., Tang X., Spray B.J., et al. Gastrotomy and Tracheostomy After Complete Repair of Tetralogy of Fallot in Children With 22q11.2 Deletion Syndrome. *Pediatr Crit Care Med*, 2020, 21(9), e776–e781.
3. Mercer-Rosa L., Paridon S.M., Fogel M.A., et al. 22q11.2 Deletion Status and Disease Burden in Children and Adolescents With Tetralogy of Fallot. *Circulation: Cardiovascular Genetics*, 2015, 8(1), 74–81.
4. Ehrlich L. and Prakash S.K. Copy-number variation in congenital heart disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2022, 77, 101986.
5. Li P., Chen W., Li M., et al. Copy number variant analysis for syndromic congenital heart disease in the Chinese population. *Hum Genomics*, 2022, 16(1), 51.
6. Amarillo I.E., O'Connor S., Lee C.K., et al. De Novo 9q Gain in an Infant with Tetralogy of Fallot with Absent Pulmonary Valve: Patient Report and Review of Congenital Heart Disease in 9q Duplication Syndrome. *Am J Med Genet A*, 2015, 167A(12), 2966–2974.
7. Imai Y., Kusano K., Aiba T., et al. JCS/JCC/JSPCCS 2024 Guideline on Genetic Testing and Counseling in Cardiovascular Disease. *Circ J*, 2024, 88(12), 2022–2099.
8. Luo X., Liu H., Chen X., et al. Prenatal diagnosis of 15q13.3 deletion and duplication syndrome: what do we tell the prospective parents?. *Arch Gynecol Obstet*, 2025, 312(6), 1991–2000.