تحري طفرات التليف الكيسي في عينة من المرضى السوريين

محمد علي عجلوني*

الملخص

خلفية البحث وهدفه: التليف الكيسي مرض وراثي صبغي جسدي متنحٍ شائع في الشعوب القوقازية . ينتج عن طفرة في الجين المرمز لبروتين يدعى بروتين التليف الكيسي المنظم للعبور عبر الغشائي CFTR . يصيب عدداً من أجهزة الجسم على رأسها الجهازان التنفسي والهضمي. من المعايير التشخيصية المختبرية اختبار العرق وتحري الطفرات.

هَدَفَ البحث إلى تحري توزع الطفرات لدى مرضى سوريين، ومقارنتها بالتوزُّع في شعوب أخرى، وإلى معرفة مدى الجدوى الاقتصادية في استخدام العتيدة kit المصممة خارجياً لكشف طفرات الجين في مرضانا ومقارنتها باختبار العرق، وإلى دراسة إن كان هناك ترابط بين النمطين الجيني والظاهري.

مواد البحث وطرائقه: كان حجم العينة المدروسة 225 مريضاً ممن قبلوا في مستشفى الأطفال الجامعي بتشخيص التليف الكيسي؛ وذلك خلال 9 سنوات. وضع التشخيص من خلال الشكوى الرئيسة، وعلى رأسها الالتهابات الرئوية المتكررة، والإسهالات المزمنة وإيجابية اختبار، العرق و أو تحري الطفرات الذي استخدم فيه عتيدة جاهزة تعتمد طريقة قلائل النوكليوتيدات النوعية ASO، ويحوي كل شريط strip 36 طفرة .

النتائج: شكلت الطفرة f508del نسبة 35%، والطفرة w1282X نسبة 25%، والطفرة n1303k نسبة 9%، والطفرة R347P نسبة 7%، والطفرة G85E نسبة 6% وحالة واحدة لتسع طفرات أخرى، من بينها 6 حالات متخالفة الألائل مركبة. كان اختبار العرق مشخصاً في نحو 80% من الحالات، في حين كانت إيجابية كشف الطفرات بالعتيدة الجاهزة 30%.

الاستنتاجات: تبقى طفرة f508del على رأس طفرات التليف الكيسي دون سيطرة مطلقة، ويبقى اختبار العرق غير المكلف الاختبار الذهبي المشخص للتليف الكيسي في الأعمار كلّها بعد الانتباه للحالات السلبية الكاذبة والإيجابية الكاذبة نظراً إلى نسبة إيجابيته المرتفعة بالمقارنة بتحري طفرة جين CFTR بسبب استخدام العتيدة المصممة في دول أخرى ولم تكن هناك علاقة واضحة بين النمطين الجيني والظاهري لدى مرضى العينة. يبقى التشخيص الجزيئي للتليف الكيسي ضرورياً في حال الحاجة للتشخيص قبل الولادي.

الكلمات المفتاحية: اختبار العرق، تحري الطفرات، الجدوى الاقتصادية.

* أستاذ مساعد - قسم الأطفال – كلية الطب – جامعة دمشق.

The screening of cystic fibrosis mutations in Syrian patients

*Mohammed.Ali.Ajlouni

Abstract

Background: cystic fibrosis is an autosomal recessive disease, common in Caucasian peoples. It is produced from mutations in the gene that encods a protein called cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR). It affects multiple systems, especially the respiratory and gastrointestinal. In addition to clinical signs and symptoms, there is laboratory diagnostic criteria: sweating test and mutation identification.

Objective: mutation identification of the CF gene in Syrian patients, comparison with other Arab and non Arab populations in addition to identify the economic expense from the use of European kit in Syrian patients. We will, also, compare the percentage of positive sweating test to the percentage of molecular test. Finally, we will study if there is genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis.

Methodology: we studied 225 patients who had been accepted at children hospital with cystic fibrosis during nine years (2007-2015). The diagnosis was made after the clinical (recurrent lung infections, chronic wheezing, chronic diarrhea) and laboratory (abnormal sweating test and /or molecular test). The mutation screening was made through ready to use kit designed in Europe which can identify only 36 mutation (out of 1900 mutations). It apply the ASO method.

Results: the frequency of the mutations was as follows: F508 del:35%, W1282X: 25%, N1303K:9%, R347P: 7%, G85E:6%. One case for additional 9 mutations with 6 cases out of them were compound heterozygote. The positivity of the sweating test was about 80%, whereas the positivity of the molecular test was only 30%.

Conclusion: the f 508 del remains the predominating mutation without absolute predomination in Syrian cystic fibrosis patients. The sweating test remains the standard diagnostic test in this disease which is applicable in patients of all ages, after the exclusion the pseudo-positive and pseudo-negative conditions except in prenatal diagnosis conditions where we need the mutation identification. We could not infer a clear cut genotype-phenotype correlation in cystic fibrosis patients.

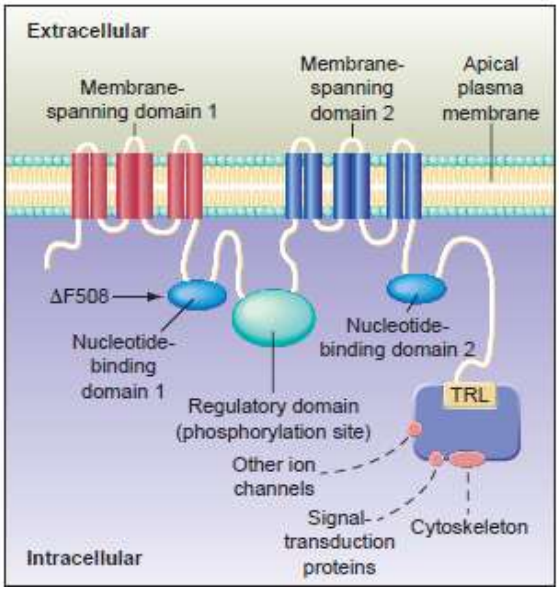
Key words: sweating test, mutation screening, economic benefit.

* Associat.Prof. Children Department - Faculty of Medicine - Damascus University

المقدمة:

التليف الكيسي مرض وراثي يصيب أجهزة متعددة من الجسم يشاهد عند الأطفال والبالغين، ويتسبب عن خلل في وظيفة بروتين يدعى بروتين التليف الكيسي المنظم للعبور والعابر للغشاء cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein (CFTR) وهذا البروتين عضو في طائفة من البروتينات تسمى العُلَيبة الرابطة للأدينوزين ثلاثي الفوسفات ATP–Binding Cassette superfamily.

يقوم بروتين CFTR بوظيفة قناة انتقائية للكلور منخفضة التصريف low conductance و بابها هو دورات من ارتباط و حلمهة ATP في مجالَيه الرابطين للنوكليوتيد (NBD`s)، وتنتظم هذه العملية من قبل قطعة بروتينية متحركة داخلية المنشأ من خلال مواضع فسفتة متوافقة متعددة تسمى المجال التنظيمي regulatory domain [2] (الشكل 1).



الشكل (1): يبيِّن البنية المفترضة لبروتين CFTR.(1)

يورث التليف الكيسي بطراز صبغي جسدي متنحٍ، يتوضع جينه في 7q31.2، ويبلغ حجمه 250 Kb، ويتكون من 27 إكسوناً تعطي بعد الانتساخ mRNA حجمه نحو 6.5Kb يشفر عديد ببتيد (CFTR) حجمه 1480 حمض أميني[3] سُجل أكثر من 1900 تعدد شكل polymorphisms في جين CFTR يترافق جميعها مع التليف الكيسي. تشكل الطفرة التي تسبِّب خبن deletion ثمالة الفينيل ألانين (F508del) الطفرة الأكثر شيوعاً؛ وهي المسؤولة عن الوقوع المرتفع للمرض في شعوب شمال أوروبا، وتكون هذه الطفرة أقل تواتراً بشكل واضح في الشعوب الأخرى كجنوب أوروبا وجنوب البحر المتوسط، فنحو 50% من مرضى التليف من أصل أوروبي شمالي يكونوا متماثلي الألائلhomozygote لهذه الطفرة، ويحمل أكثر من 80% على الأقل طفرة واحدة من نمط (F508del)، في حين يملك بقية المرضى تشكيلة واسعة من الطفرات، ولا أي منها يكون تواترها أكثر من بضع نقاط مئوية باستثناء بعض الشعوب كاليهود الأشكيناز؛ إذْ تشاهد طفرة W1282X عند 60% من مرضاهم. إن العلاقة بين النمط الجيني و النمط الظاهري علاقة شديدة التعقيد لا يمكن الاعتماد عليها عند المرضى الأفراد[1]. كما حددت دراسات الترابط المجيني الواسع genome wide association مناطق جينية تؤهب لاختطار الإصابة الكبدية، والداء السكري المرتبط بالتليف الكيسي، والعلوص العقوي meconium illeus عند مرضى التليف الكيسي. هناك اختبارات معتمدة لتشخيص التليف الكيسي مخبرياً، ويعدُّ اختبار العرق الاختبار المشخص المعياري standard، لكن يتطلب عناية، ودقة كما أنَّ التشخيص الجزيئي لطفرات تصيب جين الCFTR من الاختبارات المشخصة المعتَمَدة. فمن خلال استخدام مسابير probs لأكثر 40 طفرة شيوعاً، يمكن تحديد الأنماط الجينية عند 80–90% من المرضى الأمريكيين الذين يحملون طفرتين[1] مع أنَّ بعض الأطفال ذوي الأعراض النموذجية للتليف الكيسي يكون لديهم بهذه الطريقة أليلاً واحداً طافراً أو حتى دون أي أليل طافر. في الواقع يوفر تجميع مجموعة منتقاة بحكمة من الطفرات في عتيدة kit جاهزة ومتوافرة تجارياً طريقة سريعة وسهلة، وأقل تكلفة من طريقة السَلسَلة sequencing الأوسع للجين، وفي حالات خاصة يكون فيها تحديد النمط الجيني ضرورياً، يمكن تطبيق السلسلة الكاملة للجين، لكن يمكن من خلالها تحديد تعددات شكلية أو طفرات مجهولة العقابيل السريرية. هَدَفَ هذا البحث إلى

معرفة تواتر طفرات التليف الكيسي في عينة من المرضى السوريين من حيث الطفرة الأكثر شيوعاً، وطيف الطفرات المصادف في مرضانا، ومقارنتها ببعض الشعوب الأخرى، ودراسة إن كان هناك ترابط بين النمطين الجيني والظاهري في العينة المدروسة، كما هَدَفَ إلى معرفة الكلفة الاقتصادية لتطبيق العتيدة الجاهزة المصممة خارجياً، وما مدى إمكانية إفادة الأطباء في الاعتماد عليها في إثبات تشخيص التليف الكيسي، ومقارنتاها باختبار العرق.

الطرائق والمنهجيات:

في دراسة راجعة امتدت 9 سنوات (2007–2015) لمرضى التليف الكيسي المقبولين في مستشفى الأطفال بأعراض توحي بالتليف الكيسي (الالتهابات الرئوية المتكررة، الإسهالات المزمنة منفردين أو مجتمعين، الانسداد بالعقي) والذين أجري لهم اختبار العرق و تحديد الطفرات بالإضافة إلى شوارد وغازات الدم. كان عدد المرضى 225 مريضاً. استخدم في إجراء اختبار العرق عندهم جهاز ORION research skin chloride system بعد جعل الطفل يتعرق، وتنبيه الجلد بالبيلوكاربين. اعتمدت في مخبر مستشفى الأطفال قيم 40 أو أكثر ميكال مرضياً. ومن أجل التشخيص الجزيئي يُستَخلص .DNA المريض عبر عتيدة جاهزة من شركة promega الأمريكية. ثم يجرى عليه PCR باستخدام مشارع primers متوافرة في عتيدة جاهزة من شركة Viennalab النمساوية. تحوي هذه العتيدة 36 طفرة من طفرات التليف الكيسي، وتعتمد طريقة قلائل النوكليوتيدات النوعية للألائل Allele Specific Oligonucleotides(ASO).

النتائج:

راوحت أعمار المرضى في عينة الدراسة بين أسبوع و10 سنوات، وعمر وسطي 4.16±1.8 شهراً بعد استثناء أعمار المرضى المشخصين بأعمار مرتفعة، وهي حالات قليلة لم يتجاوز عددهم 5 مرضى، وقد صادفت مراجعتهم للمشفى وقت الدراسة، مع أنَّهم شخصوا بأعمار صغيرة. شكل المرضى دون السنة من العمر نسبة 83%، كان أكثر من نصفهم فوق الثلاث أشهر. كانت شكوى 57% من المرضى تنفسية بشكل رئيس (التهابات رئوية متكررة، والتهاب رئة معند، وأزيز مزمن)، وكانت الأعراض الهضمية (الإسهال المزمن، وفشل النمو، والتجفاف، وذمات، وعلوص عقوي، وتدلي شرج) مسيطرة عند 19% و شكى نحو 22% من أعراض تنفسية و هضمية معاً. عانى 83% من عينة الدراسة من قلاء ناقص الكلور، وفيما يتعلق بنتائج اختبار العرق فكانت مشخِصة لدى 78% من المرضى.

أمَّا نتائج التشخيص الجزيئي فقد أجري لأفراد العينة جميعهم الـ225. وكان إيجابياً لدى 69 مريضاً بنسبة 30%، وسلبياً عند 156 مريضاً أي بنسبة 70%. (الجدول 1).

الجدول 1: يبيِّن نتائج الدراسة المختبرية، وبيان نسب الإيجابية، والسلبية لكل منه.

	إيجابي	سلبي
القلاء الاستقلابي*	%83	%17
اختبار العرق&	78%	22%
التشخيص الجزيئي^	30%	70%

*: بيكربونات الدم الشعري فوق 20 ميكال.

&: عدَّ الحد الأدنى المشخص 40 ميكال.

^: سجلت الحالات المتماثلة الألائل فقط.

أمَّا توزُّع الطفرات لدى المرضى الإيجابيين فمعروض في الجدول 2.

الجدول (2): يبيِّن توزُّع الطفرات في عينة الدراسة.

الطفرة	النسبة المئوية
f508del	%35
w1282X	%25
n1303k	%9
R347P	%7
G85E	%6
r1162x/w1282x	%2
G551D/ cftr del2,3	%2
f508del/w1282x	%2
r334w/w1282x	%2
N1303K/2183AA	%2
G542X	%2
394delTT	%2
3199del6/1148t	%2
2183AA-g	%2

أمَّا فيما يتعلق بالترابط بين النمطين الجيني والظاهري فقد لاحظنا في حالات وجود طفرات F508del أو G85E وجود التهابات رئوية، وإسهال شديد مع فشل نمو. أمَّا عند المرضى ذوي النمط الجيني w1282x و G542X فقد كانت الأعراض التهابات رئوية متكررة، وفشل نمو، وشكى المرضى ذوو الطفرات من نمط N1303K من التهابات رئوية متكررة، وفشل نمو.أمَّا بقية الحالات فقد كانت حالات فرادية لا يمكن استنتاج الرابط بين النمطين الجيني والظاهري.

المناقشة:

وجدنا في تحليل طيف الطفرات لدى مرضى الدراسة أنَّ الطفرة F508del تسيطر من حيث التواتر (35%)، وفي دراسة سورية سابقة للدكتور جرجور وزملائه جاءت في المرتبة الأولى أيضاً بنسبة 18%[6]، وفي دراسة لبنانية[5] كانت النسبة 37.5%، وهذه السيطرة غير مطلقة كما هي الحال في شعوب شمال أوروبا(فهي75% في بلجيكا، وفي مرضى شمال أفريقية كانت النسبة 32%[3]. كما حلت في دراستنا الطفرة w1282x في المرتبة الثانية بنسبة 25%، وكانت 12% في دراسة جرجور ونلاحظ هنا اختلاف النسب الذي قد يأتي من اختلاف حجم العينة. وفي الدراسة اللبنانية تأتي الطفرة w1282x في المرتبة الثانية بنسبة 15.6%. كما تأتي طفرة n1303k في المرتبة الثالثة بنسبة 9%، وفي الدراسة اللبنانية كانت النسبة 9.6% وفي بلجيكا 3.1%.

بعد المراتب الثلاث الأولى تقل التواترات بوضوح بسبب الطيف الواسع لطفرات الجين المنتشرة لدى أفراد العينة، وتظهر الاختلافات بين الدراسات من حيث حجم العينة، وتنوع منشئها.

كما حُدِّدَت في دراستي 15 طفرة من الطفرات الـ36 المثبتة في العتيدة بعد إجراء تحري الطفرات لـ225 مريضاً. وقد ذكرنا سابقاً أن طيف الطفرات في جين التليف الكيسي كبير يصل إلى 1900 طفرة، أو تعدد شكلي، وهذا يعني أنَّ هناك كثيراً من الطفرات لدى مرضانا لا يمكن تحديدها بالعتائد الجاهزة والمصممة في دول أوروبا، ففي أحسن الأحوال لا يتجاوز احتمال تحديد الطفرة بهذه الطريقة 30%؛ وهذا يعني الهدر الاقتصادي، و زيادة الكلفة على المواطن والدولة..

أظهرت هذه الدراسة أن التشخيص الجزيئي للتليف الكيسي يأتي بالدرجة الثانية بعد اختبار العرق من حيث الحساسية في تأكيد تشخيص المرض. فإيجابية اختبار العرق كانت نحو 80% من مرضى الدراسة، في حين لم تتجاوز إيجابية تحري طفرات جين CFTR 30%. وكما ذكر في مقدمة البحث تصل إمكانية تحديد الطفرات في العتيدة الجاهزة في أمريكا 80 - 90%[1]، وقد لوحظ في هذه الدراسة أيضاً أنه كلما كان اختبار العرق مرضياً ازداد احتمال تحديد الطفرة بالعتيدة دون أن نتجاوز نسبة الـ30%.

أمَّا فيما يتعلق بالترابط بين النمطين الجيني والظاهري فلم تكن هذه العلاقة واضحة كون التنوع الجيني لا يقابله اختلاف واضح في الأعراض، كما شكلت حالات تخالف الألائل المركبة compound heterozygote 10% تقريباً من

المرضى الذين حُدِّدَت الطفرات لديهم ونعتقد أنَّ هذا يزيد التنبؤ بالنمط الظاهري، وإنذار المرض تعقيداً.

الاستنتاجات:

في تشخيص التليف الكيسي يجب التركيز بالدرجة الأولى على اختبار العرق لحساسيته المرتفعة مع اعتماد القيمة 30–40 ميك\ال لشاردة الكلور كقيمة مرتفعة و مشخصة عند الرضع و الأطفال[1] و حصر التشخيص الجزيئي في حالات الحاجة للتشخيص قبل الولادي وفي الأبحاث العلمية ريثما يتم انتقاء التجميعة المناسبة لمرضانا من الطفرات و جعلها في عتيدة جاهزة و متوفرة تجارياً فتقل التكلفة و يسهل تحديد الطفرة و حتى يتم ذللك يجب اعتماد طريقة السلسلة لجين الـCFTR بشكل واسع لمعرفة الطفرات الأكثر انتشاراً في مجتمعنا أو الطريقة المعتمدة على تحديد mRNA لتحديد الطفرات النادرة في جين CFTR[10].

References

1- Kliegman Stanton, St Geme, Schor ,Nelson Textbook of Pediatrics, cystic fibrosis,2098-2113, Elsevier, edition 20, 2016, Philadelphia

2-602421 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator; CFTR 2016.

3-Patrick Lebecque, Daniel Baran: genetique: donnees de base, aspects fondamentaux et perspectives.63-81, la mucovisidose,Bruylant-Academia Louvan-la-Neuve Belgique, 2011

4- Harlod Chen, atlas of genetic, diagnosis and counseling, Springer, sconde edition, 2012, New York, USA

5- Desgeorges M1, Mégarbané A, Guittard C, Carles S, Loiselet J, Demaille J, Claustres M. Cystic fibrosis in Lebanon: distribution of CFTR mutations among Arab communities Hum Genet. 1997 Aug;100(2):279-83.

6-Jarjour RA1, Al-Berrawi S, Ammar S, Majdalawi R: Spectrum of cystic fibrosis mutations in Syrian patients. Minerva Pediatr. 2015 Jun 4

7-Stepanova AA, Krasovsky SA, Polyakov AV. Reliability of the Search for 19 Common Mutations in the CFTR Gene in Russian Cystic Fibrosis Patients and the Calculated Frequency of the Disease in Russian Federation] Genetika. 2016 Feb;52(2):231-41.

8-Collaco JM, Blackman SM, Raraigh KS, Corvol H, Rommens JM, Pace RG, Boelle PY, McGready J, Sosnay PR, Strug LJ, Knowles MR, Cutting GR, Sources of Variation in Sweat Chloride Measurements in Cystic Fibrosis, Am J Respir Crit Care Med. 2016 Jun 3

9-Yadav H1, Lim KG, Chronic cough with normal sweat chloride: Phenotypic descriptions of two rare cystic fibrosis genotypes Respir Med Case Rep. 2015 Dec 18;17:17-9. doi: 10.1016/j.rmcr.2015.12.003. eCollection 2016.

10-Felício V, Ramalho AS, Igreja S, Amaral MD, mRNA-based Detection of Rare CFTR Mutations Improves Genetic Diagnosis of Cystic Fibrosis in Populations with High Genetic Heterogeneity Clin Genet. 2016 May 13. doi: 10.1111/cge

11-Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, et al: Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report, J Pediatr 153:S4–S14, 2008.

12-Groman JD, Karczeki B, Sheridan M, et al: Phenotypic and genetic characterization of patients with features of nonclassic forms of cystic fibrosis, J Pediatr 146:675–680, 2005.

13-Ramsey BW, Davies J, McElvaney G, et al: A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation, N Engl J Med 365:1663–1672, 2011.

14-Soultan ZN, Foster MM, Newman NB, et al: Sweat chloride testing in infants identified as heterozygote carriers by newborn screening, J Pediatr 13:857–859, 2008.

15-Sugarman EA, Rohlfs EM, Silverman LM, et al: CFTR mutation distribution among U.S. Hispanic and African American individuals: evaluation in cystic fibrosis patient and carrier screening populations, Genet Med 6:392–399, 2004.

16-Wagener JS, Zemanick ET, Sontag MK: Newborn screening for cystic fibrosis, Curr Opin Pediatr 24:329–335, 2012.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق 2016/03/08.

تاريخ قبوله للنشر 2016/07/04.