

تواتر وجود الطفرة النقطية R356W لدى مجموعة من المرضى السوريين المصابين بفرط تنسج قشر الكظر الخلقي

سحر الفاوم***

رامي جرجور**

ندى دهنة*

الملخص

خلفية البحث وهدفه: يشمل مرض فرط تنسج قشر الكظر الخلقي مجموعة من الاضطرابات الجسمية المتنحية والتي تسبب في 95% من الحالات عوزاً في أنزيم 21-هيدروكسيلاز. إن التحري عنه لدى حديثي الولادة أمر يحسن بشكل فعال إمكانية التشخيص والشروع بالمعالجة بشكل مبكر، كما يساعد في الكشف عن أحد أسباب التذكير لدى حديثات الولادة من الإناث. يهدف بحثنا إلى تحديد تواتر وجود الطفرة النقطية R356W لدى مجموعة من المرضى السوريين المصابين بالنمطين الكلاسيكي وغير الكلاسيكي والربط بين النمط الظاهري والجيني في عوز 21-هيدروكسيلاز. مواد البحث و طرائقه: أجريت الدراسة على 59 مريضاً من غير الأقرباء، إذ طبقت طريقة ARMS-PCR لتحري وجود الطفرة R356W .

النتائج: ظهرت هذه الطفرة لدى 34 مريضاً، بالشكل متخالف اللواقح لدى 31 مريضاً منهم (91.2%)، وبالشكل متماثل اللواقح لدى 3 مريضاً (8.8%). كما وصلت نسبة الزواج بين الأقارب إلى 50% من عائلات العينات المدروسة. بلغ عدد المصابين بنمط الرجولة البسيط 14 مريضاً (41.2%)، أما عدد المصابين بالنمط المضيع للملح فقد بلغ 19 مريضاً (55.8%)، في حين ظهرت الإصابة بالنمط المضيع للملح-الرجولة البسيط لدى مريض واحد فقط (2.9%). الاستنتاج: لقد اتفقت نتائجنا مع النتائج العالمية من جهة تنوع الارتباط بين النمطين الجيني والظاهري، ولكن النسبة المرتفعة لانتشار هذه الطفرة بنمطها متخالف اللواقح في المجموعة المدروسة قد تعود إلى انتشار ظاهرة زواج الأقارب، التي يجب الحد من انتشارها نظراً لمخاطرها الصحية. الكلمات المفتاحية: فرط تنسج قشر الكظر الخلقي - النمط المضيع للملح - نمط الرجولة البسيط - النمط غير الكلاسيكي - طفرة R356W - مرضى سوريين.

*طالبة دراسات عليا (دكتوراه) - قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة - كلية الصيدلة - جامعة دمشق.

**دكتور في قسم البيولوجية الجزيئية والتقانة الحيوية - هيئة الطاقة الذرية.

***أستاذة دكتوراه في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة - كلية الصيدلة - جامعة دمشق.

Frequency of the Point Mutation R356W in a Group of Syrian Patients With Congenital Adrenocortical Hyperplasia

Nada Dehneh*

Rami Jarjour**

Sahar Al Fahoum***

Abstract

Aim of the study: Congenital adrenal hyperplasia includes a group of autosomal recessive disorders that cause in 95% of cases a deficiency of the enzyme 21-hydroxylase. Screening in newborns effectively improves the possibility of early diagnosis and initiation of treatment, and helps revealing one of the causes of virilization in female newborns. Our research aims to determine the frequency of the R356W point mutation in a group of Syrian patients with classic and non-classic phenotypes, and the correlation between the phenotype and genotype in 21-hydroxylase deficiency.

Materials and Methods: The study was conducted on 59 non-relative patients. The ARMS-PCR method was used to detect the presence of the R356W mutation.

Results: The R356W mutation appeared in 34 patients, heterozygous in 31 of them (91.2%), and homozygous in three patients (8.8%). The percentage of consanguineous marriage reached 50% in the families studied samples. The number of patients with the simple virilization type was 14 patients (41.2%), the number of patients with the salt wasting type reached 19 patients (55.8%), while the SW-SV type appeared in one patient (2.9%).

Conclusion: Our results are consistent with the international results about the variability of correlation between the genotype and the phenotype, but the prevalence of this heterozygous mutation in the studied group is high, that may be due to the prevalence of consanguineous marriage, which must be limited due to its health risks.

Keywords : Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) - Salt Wasting type (SW) - Simple virilization type (SV) - Non Classical NC - Syrian patients – R356W mutation.

* Postgraduate student (PhD)-Dept. of biochemistry and microbiology- Faculty of pharmacy-Damascus university>

** MD PhD- Atomic Energy Commission (AECS)

*** Prof of Pharmacy- Dept. of biochemistry and microbiology- Faculty of pharmacy-Damascus university

المقدمة:

أو في حال عدم تشخيص المرض لديهم. (11,2013 Nermoen, في حين يتميز NC بعوز جزئي في فعالية أنزيم 21-هيدروكسيلاز يصل إلى 20 - 60 % من الفعالية الإجمالية، وتظهر أعراضه في مرحلة الطفولة أو المراهقة أو عند الشخص البالغ. وتكون مستويات الألدوستيرون طبيعية ولا تشاهد الخنثة في الأعضاء التناسلية عند الإناث. (New,2006,4205).

يظهر SW في أكثر من 75% من الحالات المصابة بالنمط الكلاسيكي من عوز 21-هيدروكسيلاز، ويتميز بظهور انخفاض شديد في مستوى الصوديوم البلازمي، وارتفاع في البوتاسيوم، وانخفاض في الجلوكوز، وفقدان الوزن، إضافة إلى الصدمة الكظرية وذلك خلال الأسابيع الأولى من الحياة. كما يلاحظ غموض في الأعضاء التناسلية الخارجية ambiguous genitalia عند حديثات الولادة مع أعضاء تناسلية داخلية طبيعية. في حين تتوسع الأعضاء التناسلية عند حديثي الولادة من الذكور. ويتقدم العمر قد تظهر الصفات الأنثوية والذكورية في عمر 2-3 سنوات وهي تشمل:

تسارعاً في النمو، وظهور شعر العانة والإبط، وثنانة في الصوت، والاضطراب أو الفشل في الطمث عند الإناث، ونمو العضلات، والقضيب الموسع عند الذكور، وزيادة في الطول عند الأطفال و قصر القامة عند البالغين. (Dessinioti,& Katsambas, 2009, 87)

يلحظ عند إصابة الذكور ب SV أن الأعضاء التناسلية الخارجية تكون طبيعية، مما يؤخر تشخيص الإصابة لديهم حتى عمر 3-7 سنوات، في حين يظهر لدى الإناث غموض في الأعضاء التناسلية الخارجية Sexual ambiguity عند الولادة ودرجات متنوعة من الرجولة، ويكون الرحم لديهن طبيعياً مع تطور غير طبيعي في المهبل. (Menassa, et al., 2008, 1901) ، ويؤدي تأخر تشخيص هذا النمط إلى ظهور بلوغ مركزي مبكر في مرحلة الطفولة المتأخرة وذلك بسبب وصول العمر العظمي إلى معدل عمر يتوافق مع بداية البلوغ. (Forest, 2004,

إن مرض فرط تنسج قشر الكظر الخلقى (CAH) Congenital Adrenal Hyperplasia، أو المتلازمة الكظرية التناسلية، هو مجموعة من الاضطرابات الجسمية المتنحية autosomal recessive disorder التي تسبب عوزاً في أحد الأنزيمات التي تتدخل في إحدى خطوات اصطناع الستيرويدات الكظرية، مما يسبب عوزاً في هرمونات نوعية من جهة، وتراكم هرمونات أخرى من جهة أخرى. (Baumgartner-Parzer et al., 2020, 1341) (Concolino et al., 2010,1057)

تنتج قشرة الغدة الكظرية الكورتيكويدات المعدنية mineralocorticoids (الألدوستيرون Aldosterone)، والسكرية glucocorticoids (الكورتيزول Cortisol)، والجنسية sex steroids (التستوستيرون Testosterone). ينجم أكثر من 95% من حالات CAH عن عوز في اصطناع الأنزيم 21 - هيدروكسيلاز (CYP21;P450c21 Oxygenase) E.C.1.14.99.10، الذي يرمز له الجين CYP21A2 (Pallan et al., 2015, 13128)، مما يؤدي إلى تناقص في اصطناع الكورتيكويدات السكرية و/أو المعدنية وتزايد كبير في اصطناع الأندروجينات الكظرية. (Menassa, 2009, 42)

يقسم المرض إلى نمطين، النمط الكلاسيكي الذي يشمل كل من الشكل المضيق للملح Salt Wasting (SW) وشكل الرجولة البسيط Simple Virilization (SV) ، والنمط غير الكلاسيكي Non Classical Congenital Adrenal Hyperplasia (NC). (Rabbani et al., 2011,139)

يتضمن SW عوزاً كاملاً في اصطناع الكورتيزول والaldوستيرون. في حين يتميز SV بفقدان جزئي لاصطناع الكورتيزول. كما يترافق النمطان بزيادة كبيرة في إفراز Adrenocorticotropic hormone (ACTH) الذي يسبب بدوره زيادة في إفراز الأندروجين الكظري. يعاني المرضى المصابون بهذا العوز من ارتفاع كبير في مستويات 17-هيدروكسي بروجستيرون (17-OHP) عند غياب المعالجة

حُدِّت في الجمهورية العربية السورية نسبة الإصابة بالمتلازمة الكظرية التناسلية بنمطها الكلاسيكي بإجراء دراسة راجعة للملفات retrospective study، وذلك على مجموعة الأطفال المعالجين في مشفى الأطفال الجامعي في مدينة دمشق بين عامي 2008 و2012. وكان عدد المصابين (89 طفلاً) نسبة إلى العدد الإجمالي للأطفال المعالجين في المشفى وهو 149158 طفلاً. ووصلت نسبة المصابين بالنمط الكلاسيكي 1:1785، ولا يعدُّ هذا الرقم معبراً عن انتشار الإصابة بالمرض لإجرائه في مركز واحد في القطر. (Sheikh Alshabab et al., 2015, 3)

يتوضع الجين المرزوم لأنزيم 21-هيدروكسيلاز، CYP21A2، في منطقة الذراع القصير من الصبغي 6 (6p21.3) ضمن الصف الثالث للمستند البشري للكريات Human Leucocyte Antigen. وقد تبين وجود pseudogene الكاذب CYP21A1 الجين الكاذب غير الفعال (Huynh et al., 2009, 75) ويحوي كل من الجينين 10 إكزونات exons ممتدة على 3.1 kb، وتصل نسبة التماثل في ترتيب النوكليوتيدات في الإكزونات إلى 98%، وإلى حوالي 96% في الإنترونات (Concolino et al., 2010, 1058). إن 75-80% من الإصابات المسؤولة عن عوز الأنزيم 21-هيدروكسيلاز هي طفرات نقطية point mutations قد كُشِفَ عن معظمها في الجين الكاذب، وتبين أنها تنتقل إلى الجين الفعال بعملية التحويل الجيني gene conversion.

(Concolino & Costella, 2018, 263) ، وقد تبين أن الطفرة المغلطة missense Arg-356W:Trp (p.(arg357Trp)) المتواجدة في الإكزون 8، تظهر عند المرضى المصابين بـ SW و SV. وتؤدي هذه الطفرة إلى إلغاء الفعالية الأنزيمية في الزجاج بسبب ترافقها مع disruption of H-bonding (White & Espinosa Reyes et al., 2021, 3) (Speiser, 2000, 260) كما تتوضع هذه الطفرة في المنطقة الجينية المرزمة للحزون K helix في 21 -

472). ولا يعاني المصابون بـ SV، خلافاً للمصابين بـ SW، من أعراض التجفاف، ولكنهم يعانون من عوز الكورتيكويدات السكرية الذي يتطلب معالجة معاوضة طويلة الأمد للحماية من الأزمة الكظرية، في حين يخضع مرضى SW لتعويض الكورتيكويدات المعدنية باستخدام الفلوروكورتيزون إضافة إلى تعويض الكورتيكويدات السكرية. (Dauber et al., 2010, 1245)

ينتشر النمط الكلاسيكي على المستوى العالمي بنسبة تقارب 1:16000 من الولادات الحية، (Auchus, 2015, 190)، أما النمط غير الكلاسيكي فيوجد بنسبة 1:1000. (Deneux et al., 2001, 208) وتتغير هذه النسب حسب المعطيات العرقية والجغرافية. وتشير المعلومات المنشورة حول نسبة حدوث CAH في بعض الدول العربية إلى نسب متباينة من الإصابات حسب ما يظهر في الجدول (1).

الجدول(1): نسبة انتشار النمط الكلاسيكي من CAH في بعض الدول العربية

اسم الدولة	نسبة الانتشار
الإمارات العربية المتحدة (Al Hosani et al., 2014, 18)	1:9030
المملكة العربية السعودية (Mohamed et al., 2015, 114)	1:6400
سلطنة عمان (Adrenal Hyperplasia, 2010)	1:10000
شمال فلسطين (Al-Obaidi et al., 2016, 2).	1:8000
مصر - الاسكندرية (Tayel et al., 2011, 233)	1:1290
قطر (Adrenal Hyperplasia, 2010)	1:25214
الكويت (Adrenal Hyperplasia, 2010)	1:9000

الجامعي في مدينة دمشق، والذين شخّصت لديهم الإصابة بفطر تنسج قشر الكظر الخلقي، ودراسة العلاقة بين النمطين الظاهري والجيني لدى هؤلاء الأفراد.

المرضى ومواد وطرائق البحث:

أ- المرضى وعينة الدنا: حُصلَ على موافقة لجنة الأخلاقيات في جامعة دمشق للقيام بهذه الدراسة، والتي أجريت على 58 مريضاً من غير الأقرباء، والمتابعين في مستشفى الأطفال الجامعي ومشفى الأسد الجامعي وفي العيادات الخاصة في دمشق، والذين شُخّصت إصابتهم بفطر تنسج الكظر الخلقي الناتج عن عوز 21- هيدروكسيلاز، ووافقوا كتابياً على إجراء الاختبار الجيني بعد الاطلاع على الموافقة المستنيرة.

وقد كان التشخيص بناءً على إبداء المعايير التالية: تذكير الأعضاء التناسلية الخارجية، وضعف شهية، وفشل في النمو، ونوم، وإقياء، وبلوغ مبكر، وتصبغات، وعمر عظمي متقدم، إضافة إلى الموجودات المخبرية التالية: ارتفاع 17-OHP، وانخفاض الصوديوم، وارتفاع البوتاسيوم، وانخفاض الكورتيزول، وارتفاع ACTH. وقد جُمعت المعلومات المتوفرة في سجل المريض والتي شملت بشكل رئيسي القيم المخبرية [17-OHP، والصوديوم، والبوتاسيوم. وملئت استمارة تحوي بيانات سريرية ومخبرية لكل مريض إضافة إلى المعلومات التالية: الشكوى الرئيسية، وعمر التشخيص، والجنس الظاهري، والجنس حسب النمط الصبغي karyotype، ودرجة القرابة بين الوالدين، وقصة عائلية لحالات CAH مؤكدة أو أعراض مشابهة أو لوفاة أقارب في مرحلة الطفولة المبكرة، ونتائج التصوير بالأشعة فوق الصوتية echography للمنطقة التناسلية، إضافة إلى إجراء صورة للمعصم لتقييم العمر العظمي.

سُحب الدم على أنبوب يحوي مضاد التخثر EDTA، ثم جمدت العينات في درجة الحرارة 20c°- حتى موعد استخلاص الدنا، والذي كان باستخدام كيت استخلاص الدنا (QIAamp DNA Mini Kit) من إنتاج شركة Qiagen.

هيدروكسيلاز مما قد يؤثر على تآزره مع أنزيم cytochrome P450 reductase الأمر الذي لم يُبَيَّن تجريبياً. (Pignatelli et al., 2019, 432).

وبين الجدول (2) النسب المئوية المتباينة لانتشار هذه الطفرة وفق الدراسات العالمية والتي تتراوح بين 0.0-28%.

الجدول (2): النسب المئوية لانتشار الطفرة R356W في العديد من الدراسات العالمية

الدولة	المرجع	عدد الأليلات المدروسة	% انتشار الطفرة
هولندا	(Stikkelbroeck et al., 2003, 3853)	370	3.5
كرواتيا	(Dumic et al., 2017, 52)	186	16.7
البرازيل	(Torres et al., 2003, 1312)	91	6.5
اليابان	(Asanuma et al., 1999, 312)	68	17.6
الصين	(Wang et al., 2016, 47)	460	5.9
الباكستان	(Khan et al., 2011, 52011)	58	19
العراق	(Al-Obaidi et al., 2016, 3)	124	0.0
الأردن	(Daggag et al., 2011)	92	3.5
تونس	(Kharrat et al., 2004, 371)	102	2.9
إيران	(Forouzanfar et al., 2015, 53)	42	28
تركيا	(Özyılmaz et al., 2019, 64)	56	7.1
تركيا	(Baş et al., 2009, 118)	91	8.8

الهدف من البحث:

تعد طفرة R356W من الطفرات الاثني عشرة المسببة لـ CAH الأكثر انتشاراً على المستوى العالمي، وبما أنه لم تحدد حتى الآن في الجمهورية العربية السورية الطفرات المسببة للمرض على الرغم من القيام بالتشخيص المبكر عند الولادة في حال وجود الأعراض، فإن الهدف من هذا البحث هو التحري عن نسبة انتشار الطفرة R356W لدى مجموعة من المرضى السوريين المراجعين لمشفى الأطفال

ب- المواد المستخدمة وطريقة العمل: أُجري تحليل الدنا باعتماد طريقة تفاعل البلمرة المتسلسل المعنّدة على التضاعف amplification-refractory mutation system-Polymerase Chain (ARMS-PCR) Reaction. وتتقصى هذه الطريقة وجود طفرة نقطية أو غيابها بالاعتماد على غياب أو وجود نواتج تفاعل الـ PCR بوجود المشرع المشترك (Cp) common primer والمشرع النوعي للأليل primers allele specific والذي قد يكون طبيعياً (N) normal arms primer و ينتهي بالنوكليوتيد G ، أو طافراً (M) mutant arms primer وينتهي بالنوكليوتيد A.

تستعمل هذه المشاريع فقط عند موضع الطفرة لتمييز الأساس الطافر mutant base من الأساس الطبيعي normal base عند النهاية 3' للمسبار probe .

يوضح الجدول (3) تسلسل المشرع المستخدمة لتحري وجود R356W والتي اصطنعت في هيئة الطاقة الذرية (AECS) Atomic Energy Commission، وهي منقاة بطريقة الترسيب الملحي.

الجدول (4): برنامج الـ PCR الذي طُبّق على العينات المدروسة

عدد الدورات	الزمن	درجة الحرارة C°	
1	3 min	94	التمسخ الأولي Initial denaturation
38	30 sec	94	التمسخ Denaturation
	30 sec	62	التلين Annealing
	60 sec	72	الاطالة Extension
1	7 min	72	الاطالة النهائية Final extension

الجدول (3): تسلسل المشاريع المستخدمة في تحري وجود الطفرة R356W

Cp : المشرع المشترك - Nap: المشرع الطبيعي - Map:

المشرع الطافر

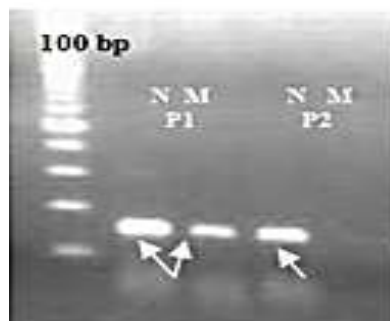
المشرع	تسلسل المشرع	المرجع
Cp	5'- CCAGATTCAGCAGCGACTG- 3'	(Asanuma et al., 1999, 313)
N	5'- CTAAGAGCACAACGGGCCG- 3'	(Kolahdouz et al., 2016, 3)
M	5'- CTAAGAGCACAACGGGCCA- 3'	

أجري الرحلان الكهربائي لنواتج الـ PCR على هلامة الأغاروز بتركيز 3%. إذ حُلَّ 3 غ من الأغاروز من إنتاج شركة Vivantis في 100 mL وقاء- 1x TBE (Basic) من الحمض النووي منقوص الاوكسجين (EDTA ، Boric acid ، TRIS) بوجود 10 µL من Ethidium bromide (10 mg/mL). كما استُخدم سلم VC 100bp DNA ladder من إنتاج شركة Vivantis. وكان المنتج النهائي عصابة بطول 150bp كما هو مبين في الشكل (1).

استُخدم Taq polymerase (5 u/µl) - محلول كلوريد المغنيزيوم (50 mM) MgCl₂ - الوقاء A x10 (100mM Tris-HCl pH9.1- 0.1% ، 500mM KCl) و طاقم dNTP Set (TritonTMX-100 10 mM)

النتائج والمناقشة:

أجريت الدراسة على 58 مريضاً شُخص لديهم أحد أنماط CAH ، إذ تحرينا طفرة R356W لديهم، وقد تبين أن عدد المرضى الذين ظهرت لديهم الطفرة بحالتي متماثل ومتخالف اللواقح هو 34 مريضاً (58.6%). ويبين الجدول (5) المعلومات المسجلة في سجل المرضى الطبي والذين ظهرت لديهم الطفرة R356W.



الشكل (1) : أنماط الرحلان الكهربائي لعصابة R356W وهي بطول 150 bp باستخدام مشرع طبيعي N ومشرع طافر M بوجود DNA Ladder 100 bp - P2 : مريض طبيعي - P1 : مريض متخالف اللواقح

الجدول (5): معلومات عن مرضى الدراسة من حيث: الجنس، وعمر التشخيص، وعلاقة القرابة بين الأم و الأب، والأصل الجغرافي، ونمط الإصابة سريريا. Homo : متماثل الزيغوت، Hetero: متخالف الزيغوت، SW: النمط المضيق للملح، SV: نمط الرجولة البسيط، NC : النمط غير الكلاسيكي، 2: الأب والأم أبناء عم(ة)/خال(ة) ، 1: القرابة بين الأم والأب بعيدة، 0: لاقرباية بين الأم والأب.

رقم العائلة	الجنس	العمر عند التشخيص (سنة)	النمط الظاهري	نمط الطفرة	المحافظة	درجة القرابة
1	M	10	SV	nor	طرطوس	1
2	F	4	SV	nor	دمشق	2
3	F	0	SW	hetero	ريف دمشق	0
4	F	3	SV	hetero	دمشق	1
5	M	4	SV	nor	دمشق	1
6	F	4	SV	hetero	ريف دمشق	2
7	F	عند الولادة	SW	hetero	إدلب	2
8	F	9	SV/NC	nor	ريف دمشق	0
9	F	13	NC	nor	دمشق	2
10	F	30	NC	nor	دمشق	0
11	M	3.5	SV	nor	ريف دمشق	2
12	M	عند الولادة	SW	hetero	ريف دمشق	0
13	F	عند الولادة	SW	nor	ريف دمشق	1
14	M	9	SV	hetero	دمشق	2
15	F	عند الولادة	SW	nor	ريف دمشق	2
16	F	عند الولادة	SW	nor	دمشق	2
17	F	عند الولادة	SW	hetero	ريف دمشق	2
18	F	عند الولادة	SW	hetero	دمشق	0
19	M	عند الولادة	SV	hetero	ريف دمشق	2
20	F	عند الولادة	SW	hetero	ريف دمشق	2
21	M	عند الولادة	SW	nor	ريف دمشق	2

2	دمشق	hetero	SW	عند الولادة	F	22
2	ريف دمشق	hetero	SW	عند الولادة	M	23
2	حماة	nor	SV	عند الولادة	F	24
2	حماة	nor	SW	عند الولادة	F	25
2	حماة	nor	SW	عند الولادة	F	26
2	حمص	nor	SV/NC	عند الولادة	F	27
2	حماة	hetero	SW	عند الولادة	F	28
2	ريف حلب	nor	SW/SV	عند الولادة	M	29
2	إدلب	nor	SV	عند الولادة	F	30
2	دمشق	nor	SV/NC	2	F	31
1	ريف دمشق	homo	SV	5	M	32
2	حماة	hetero	SV	عند الولادة	F	33
1	دمشق	hetero	SV	عند الولادة	F	34
2	حلب	hetero	SW	عند الولادة	F	35
2	ريف دمشق	nor	SV/NC	عند الولادة	F	36
0	دمشق	hetero	SW	عند الولادة	F	37
2	حلب	nor	SV	1	F	38
1	الرقية	hetero	SW	عند الولادة	F	39
2	حماة	hetero	SV	عند الولادة	F	40
2	دمشق	homo	SW	عند الولادة	M	41
1	حمص	nor	SW	عند الولادة	F	42
1	طرطوس	hetero	SW/SV	6 أشهر	F	43
2	ريف دمشق	nor	SW/SV	1	M	44
0	دير الزور	hetero	SW	عند الولادة	M	45
0	ريف دمشق	hetero	SW	عند الولادة	M	46
2	ريف دمشق	hetero	SV	6	M	47
2	ريف حمص	nor	SW	عند الولادة	F	48
1	دير الزور	nor	SW	عند الولادة	M	49
2	القامشلي	hetero	SV	شهرين	F	50
2	درعا	hetero	SV	4	M	51
1	حلب	hetero	SW	عند الولادة	F	52
0	ريف دمشق	hetero	SW	عند الولادة	F	53
0	ريف دمشق	hetero	SW	عند الولادة	M	54
0	حمص	hetero	SW	6 أشهر	F	55
1	دمشق	homo	SV	7	M	56
2	درعا	hetero	SV	2.5	M	57
0	ريف دمشق	hetero	SV	عند الولادة	F	58

كما يبين الجدول (6) نسبة انتشار الطفرة في المجموعة المدروسة حسب نمط الطفرة، والجنس، ونمط الإصابة. وقد تبين أن نسبة الزواج بين الأقارب تصل إلى 50% (17 من أصل 34 عائلة)، وبين الأقرباء البعيدين إلى 20.5% (7 من أصل 34 عائلة). ويظهر الجدول (7) العلاقة بين الأصل الجغرافي وعدد الإصابات بالطفرة في المجموعة المدروسة.

الجدول(6): النسب المئوية لانتشار الإصابة بالطفرة R356W في المجموعة المدروسة حسب نمط الطفرة، والجنس، ونمط الإصابة

عدد المرضى	نسبة الانتشار		
34	56.8%	انتشار الطفرة R356W لدى 58 مريض	
3	0.05%	نمط الطفرة: متماثلة للواقح	
31	53.4%	متخالفة للواقح	
مجموعة المصابين بطفرة R356W			
13	38.2%	ذكور	- الجنس:
21	61.7%	إناث	
19	55.8%	SW	- نمط الإصابة:
14	41.2%	SV	
1	3.4%	SW/SV	

الجدول (7): انتشار الإصابات بالطفرة I2G في محافظات الجمهورية العربية السورية

الأصل الجغرافي	ريف دمشق	دمشق	حماة	درعا	حلب	الرقّة	حمص	دير الزور	إدلب	القامشلي
عدد الإصابات	14	8	3	2	2	1	1	1	1	1

ينتمي CAH إلى مجموعة الأمراض الجسمية المتتحية، وبالتالي فإن جنس الوليد لا يؤثر في توزع الطفرات الشائعة، إلا أن التأخر في التشخيص قد يسبب الوفاة خاصة عند الذكور (Shetty et al., 2012, 1029). فتكرار النمط المضيع للملح متماثل في كلا الجنسين، وتظهر أزمة فقدان الملح بشكل مبكر بعد الولادة عند الذكور والإناث، ولكن تشخيص الإبهام في الأعضاء التناسلية عند الولادة يكون أكثر وضوحاً عند الإناث سواء كانت الإصابة بـ SW أو بـ SV (Hou et al., 2019, 2019). مما يزيد من فرصة خضوعهن للعلاج المبكر مقارنة بالذكور، ومما قد يفسر أيضاً النسبة الأكبر للمرضى الإناث (38 مريضة من أصل 58) في مجموعتنا المدروسة.

تصل نسبة العائلات التي لديها قصة مرضية مرتبطة بـ CAH على مستوى الأبناء والأقرباء إلى 22.4% (13 من أصل 58 عائلة). إن التحري عن وجود المرض عند حديثي الولادة، حتى في حال غياب القصة العائلية، يوجه نحو البدء بالعلاج المبكر، في حال كُشف عن الإصابة.

يساهم انتشار زواج الأقارب في زيادة انتشار حاملي الطفرات من جهة، والإصابة بالمرض بحد ذاته من جهة أخرى، وهذا ما أشارت له الدراسات التونسية (Kharrat et al., 2004, 368) واللبنانية (Delague et al., 2000, 81)، والعراقية (Al-Obaidi et al., 2016, 4)، والأردنية (Daggag et al., 2011). ولكن نسبة انتشار هذه الطفرة بنمطها متخالف ومتماثل للواقح في مجموعتنا المدروسة هي نسبة مرتفعة بالمقارنة مع نتائج الدراسات العالمية الموضحة في الجدول(2)، وقد يعود ذلك إلى ارتفاع نسبة حملة هذه الطفرة في القطر العربي السوري خاصة في محافظة دمشق وريفها. علماً أن المرضى، الذين تعود أصولهم إلى مختلف المحافظات، قد شُخصت حالتهم ومتابعتهم من قبل مركز وحيد في القطر. إن زيادة حجم العينة المدروسة، والاعتماد على مراكز عديدة في القطر يساهم في الكشف عن أنماط الطفرات المنتشرة في مختلف المحافظات.

الاستنتاج:

تشكل الإصابة بفرط تنسج الكظري الخلقي عبئاً نفسياً واجتماعياً وصحياً ومادياً يؤثر في المصاب وعائلته. إن التحري عن هذا المرض أمر أساسي لانطلاق المعالجة المبكرة، كما أن وجود القصة العائلية يدفع نحو معالجة الأم الحامل بالكورتيزون قبل الأسبوع الثامن من الحمل وفي أثناء الحمل لتفادي ظهور غموض الأعضاء التناسلية إذا كان الجنين أنثى مصابة.

وقد أظهرت هذه الدراسة، التي أجريت لدى مجموعة من المصابين بفرط تنسج الكظر الخلقي، انتشاراً كبيراً للطفرة النقطية R356W لدى المصابين الأمر الذي قد يكون مرتبطاً من جهة بزواج الأقارب، الذي يجب الحد منه، ومن جهة أخرى بانتماء الجزء الأكبر من المصابين إلى محافظتي دمشق وريفها. وإن انتشار هذه الطفرة، كغيرها من طفرات CAH، غير مرتبط بالجنس، كما أن وجودها قد يكون سبباً في تشوه الأعضاء التناسلية عند الإناث، وغالباً ما يترافق مع أحد نمطي الداء الكلاسيكيين المضيع للملح أو الرجولة البسيط.

الشكر: نتقدم بجزيل الشكر لكل من الدكتورة سحر الإدلبي، والدكتورة لمى حديد، والدكتور أسد ابراهيم، بسبب تأمينهم لعملية الاتصال بالمرضى، ولهيئة الطاقة الذرية لما قدمته من تسهيلات لإنجاز البحث وإنجاح العمل المخبري.

كما يحسن من فرص البقاء على قيد الحياة، خاصة عند الذكور. يجري التحري عن CAH لدى حديثي الولادة في 26 دولة أوروبية من أصل 50 دولة (Loeber *et al.*, 2021, 7-8). إضافة إلى اليابان (Tsuji-Hosokawa, 2021, 1) والولايات المتحدة، وأستراليا، والصين، وبعض دول أمريكا اللاتينية (Wiley, Webster, & Loeber, 2019, 2-4) كما أن ذلك قد يكون من أهم أسباب الابتعاد عن زواج الأقارب الذي يساعد على انتشار الإصابة ويزيد من نسبة الحمل في المجتمع.

لقد أشارت الدراسات العالمية إلى ترافق الطفرة R356W مع النمطين الظاهريين SW و SV، (Yau, Nimkarn, & New, 2016, 206). إضافة إلى بعض حالات NC. (Campos *et al.*, 2009, 40)⁴²، وقد بلغ عدد المصابين ب SV، في المجموعة المدروسة، 14 مريضاً (41.2%)، في حين وصل عدد المصابين ب SW إلى 19 مريضاً (55.8%).

References

1. Baumgartner-Parzer, S., Witsch-Baumgartner, M., & Hoepfner, W. (2020). EMQN best practice guidelines for molecular genetic testing and reporting of 21-hydroxylase deficiency. *European journal of human genetics : EJHG*, 28(10), 1341–1367. <https://doi.org/10.1038/s41431-020-0653-5>
2. Concolino P, Mello E, Zuppi C, Capoluongo E. Molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: an update of new CYP21A2 mutations. *Clin Chem Lab Med*. Aug;48(8):1057-62, 2010.
3. Pallan, P. S., Wang, C., Lei, L., Yoshimoto, F. K., Auchus, R. J., Waterman, M. R., Guengerich, F. P., & Egli, M. (2015). Human Cytochrome P450 21A2, the Major Steroid 21-Hydroxylase: Structure Of The Enzyme-Progesterone Substrate Complex And Rate-Limiting C-H Bond Cleavage. *The Journal of biological chemistry*, 290(21), 13128–13143. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.646307>
4. Menassa R. (2012).-**Études fonctionnelles et structurales des mutants du gène CYP21A2 dans l'hyperplasie congénitale des surrénales.** *Sciences agricoles*. University of Claude Bernard - Lyon I, 2009.
5. Rabbani, B., Mahdieh, N., Haghi Ashtiani, M. T., Akbari, M. T., & Rabbani, A. (2011). Molecular Diagnosis of Congenital Adrenal Hyperplasia in Iran: Focusing on CYP21A2 Gene. *Iranian journal of pediatrics*, 21(2), 139–150
6. Neramoen I., **Congenital Adrenal Hyperplasia in Adults: Epidemiological, Genetic, Clinical and Endocrine Features of CYP21A2 Deficiency in Norway.** Series of dissertations submitted to the Faculty of Medicine, University of Oslo No. 1553 ISBN 978-82-8264-424-2.
7. New M. I. (2006). Extensive clinical experience: Non-classical 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 91(11), 4205–4214. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1645>
8. Dessinioti, C., & Katsambas, A. (2009). Congenital adrenal hyperplasia. *Dermato-endocrinology*, 1(2), 87–91. <https://doi.org/10.4161/derm.1.2.7818>
9. Menassa, R., Tardy, V., Despert, F., Bouvattier-Morel, C., Brossier, J. P., Cartigny, M., & Morel, Y. (2008). p.H62L, a rare mutation of the CYP21 gene identified in two forms of 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93(5), 1901–1908. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2701>.
10. Forest M. G. (2004). Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Human reproduction update*, 10(6), 469–485. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmh047>
11. Dauber, A., Kellogg, M., & Majzoub, J. A. (2010). Monitoring of therapy in congenital adrenal hyperplasia. *Clinical chemistry*, 56(8), 1245–1251. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.146035>
12. Auchus R. J. (2015). Management considerations for the adult with congenital adrenal hyperplasia. *Molecular and cellular endocrinology*, 408, 190–197. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.039>
13. Deneuve, C., Tardy, V., Dib, A., Mornet, E., Billaud, L., Charron, D., Morel, Y., & Kuttann, F. (2001). Phenotype-genotype correlation in 56 women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 86(1), 207–213. <https://doi.org/10.1210/jcem.86.1.7131>
14. Al Hosani, H., Salah, M., Osman, H. M., Farag, H. M., El-Assiouty, L., Saade, D., & Hertecant, J. (2014). Expanding the comprehensive national neonatal screening programme in the United Arab Emirates from 1995 to 2011. *Eastern Mediterranean health journal = La revue de sante de la Mediterranee orientale = al-Majallah al-sihhiyah li-sharq al-mutawassit*, 20(1), 17–23.
15. Mohamed, S., El-Kholy, S., Al-Juryyan, N., Al-Nemri, A. M., & Abu-Amero, K. K. (2015). A CYP21A2 gene mutation in patients with congenital adrenal hyperplasia. *Molecular genetics report from Saudi Arabia. Saudi medical journal*, 36(1), 113–116. <https://doi.org/10.15537/smj.2015.1.9697>
16. **Adrenal Hyperplasia, Congenital, due to 21-Hydroxylase Deficiency.**, WHO-ICD-10 version : 2010 <https://www.cags.org.ae/en/ctga-details/404/adrenal-hyperplasia-congenital-due-to-21-hydroxylase-deficiency>
17. Al-Obaidi, R. G., Al-Musawi, B. M., Al-Zubaidi, M. A., Oberkanins, C., Németh, S., & Al-Obaidi, Y. G. (2016). Molecular Analysis of CYP21A2 Gene Mutations among Iraqi Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia. *Enzyme research*, 2016, 9040616. <https://doi.org/10.1155/2016/9040616>
18. Tayel, S. M., Ismael, H., Kandil, H., Abd Rabuh, A. R., & Sallam, H. (2011). Congenital adrenal hyperplasia in Alexandria, Egypt: a high prevalence justifying the need for a community-based newborn screening program. *Journal of tropical pediatrics*, 57(3), 232–234. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmq064>

19. Sheikh Alshabab, L. I., AlebrahIm, A., Kaddoura, A., & Al-Fahoum, S. (2015). Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: A five-year retrospective study in the Children's Hospital of Damascus, Syria. *Qatar medical journal*, 2015(1), 11. <https://doi.org/10.5339/qmj.2015.11>
20. Huynh, T., McGown, I., Cowley, D., Nyunt, O., Leong, G. M., Harris, M., & Cotterill, A. M. (2009). The clinical and biochemical spectrum of congenital adrenal hyperplasia secondary to 21-hydroxylase deficiency. *The Clinical biochemist. Reviews*, 30(2), 75–86.
21. Concolino, P., & Costella, A. (2018). Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to 21-Hydroxylase Deficiency: A Comprehensive Focus on 233 Pathogenic Variants of CYP21A2 Gene. *Molecular diagnosis & therapy*, 22(3), 261–280. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0319-y>
22. Espinosa Reyes, T. M., Collazo Mesa, T., Lantigua Cruz, P. A., Agramonte Machado, A., Domínguez Alonso, E., & Falhammar, H. (2021). Genotype-Phenotype Correlation in Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency in Cuba. *International journal of endocrinology*, 2021, 9316284. <https://doi.org/10.1155/2021/9316284>
23. White P C, Speiser P W, (2000) Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *Endocrine Reviews* 21(3): 245–291
24. 24-Pignatelli, D., Carvalho, B. L., Palmeiro, A., Barros, A., Guerreiro, S. G., & Macut, D. (2019). The Complexities in Genotyping of Congenital Adrenal Hyperplasia: 21-Hydroxylase Deficiency. *Frontiers in endocrinology*, 10, 432. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00432>
25. Stikkelbroeck, N. M., Hoefsloot, L. H., de Wijs, I. J., Otten, B. J., Hermus, A. R., & Sistermans, E. A. (2003). CYP21 gene mutation analysis in 198 patients with 21-hydroxylase deficiency in The Netherlands: six novel mutations and a specific cluster of four mutations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 88(8), 3852–3859. <https://doi.org/10.1210/jc.2002-021681>
26. Dumic, K. K., Grubic, Z., Yuen, T., Wilson, R. C., Kusec, V., Barisic, I., Stingl, K., Sansovic, I., Skrabic, V., Dumic, M., & New, M. I. (2017). Molecular genetic analysis in 93 patients and 193 family members with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Croatia. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 165(Pt A), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.035>
27. Torres, N., Mello, M. P., Germano, C. M., Elias, L. L., Moreira, A. C., & Castro, M. (2003). Phenotype and genotype correlation of the microconversion from the CYP21A1P to the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 36(10), 1311–1318. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2003001000006>
28. Asanuma, A., Ohura, T., Ogawa, E., Sato, S., Igarashi, Y., Matsubara, Y., & Inuma, K. (1999). Molecular analysis of Japanese patients with steroid 21-hydroxylase deficiency. *Journal of human genetics*, 44(5), 312–317. <https://doi.org/10.1007/s100380050167>
29. Wang, R., Yu, Y., Ye, J., Han, L., Qiu, W., Zhang, H., Liang, L., Gong, Z., Wang, L., & Gu, X. (2016). 21-hydroxylase deficiency-induced congenital adrenal hyperplasia in 230 Chinese patients: Genotype-phenotype correlation and identification of nine novel mutations. *Steroids*, 108, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.01.007>
30. Khan, A. H., Aban, M., Raza, J., Ul Haq, N., Jabbar, A., & Moatter, T. (2011). Ethnic disparity in 21-hydroxylase gene mutations identified in Pakistani congenital adrenal hyperplasia patients. *BMC endocrine disorders*, 11, 5. <https://doi.org/10.1186/1472-6823-11-5>
31. Daggag H., Batayneh A., Al-Khawaja N., Fathallah R., Al-Masri M., Abu-Khashabeh R., El-Khateeb Moh. , Ajlouni K. (2011). **Prevalence of Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency, in a Jordanian sample pool.** National Center for Diabetes, Endocrinology and Genetics (NCDEG), Amman, Jordan.
32. Kharrat, M., Tardy, V., M'Rad, R., Maazoul, F., Jemaa, L. B., Refaï, M., Morel, Y., & Chaabouni, H. (2004). Molecular genetic analysis of Tunisian patients with a classic form of 21-hydroxylase deficiency: identification of four novel mutations and high prevalence of Q318X mutation. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(1), 368–374. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-031056>
33. Forouzanfar, K., Seifi, M., Hashemi-Gorji, F., Karimi, N., Estiar, M. A., Karimoei, M., Sakhinia, E., Karimipour, M., & Ghergherehchi, R. (2015). Mutation analysis of the CYP21A2 gene in congenital adrenal hyperplasia. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 61(4), 51–55.
34. Özyılmaz, B. , Aydın, M. & Oğur, G. (2019). Correlation of phenotype with the CYP21 gene mutation analysis of classic type congenital adrenal hyperplasia due to 21-Hydroxylase deficiency . *Journal of Experimental and Clinical Medicine* , 35 (3) , 63-69 . Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/omujecm/issue/49559/547270>

35. Baş, F., Kayserili, H., Darendeliler, F., Uyguner, O., Günöz, H., Yüksel Apak, M., Atalar, F., Bundak, R., Wilson, R. C., New, M. I., Wollnik, B., & Saka, N. (2009). CYP21A2 gene mutations in congenital adrenal hyperplasia: genotype-phenotype correlation in Turkish children. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*, 1(3), 116–128. <https://doi.org/10.4008/jcrpe.v1i3.49>
36. Delague, V., Souraty, N., Khallouf, E., Tardy, V., Chouery, E., Halaby, G., Loiselet, J., Morel, Y., & Mégarbané, A. (2000). Mutational analysis in Lebanese patients with congenital adrenal hyperplasia due to a deficit in 21-hydroxylase. *Hormone research*, 53(2), 77–82. <https://doi.org/10.1159/000023518>
37. Shetty, V. B., Bower, C., Jones, T. W., Lewis, B. D., & Davis, E. A. (2012). Ethnic and gender differences in rates of congenital adrenal hyperplasia in Western Australia over a 21 year period. *Journal of paediatrics and child health*, 48(11), 1029–1032. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1754.2012.02584.x>
38. Hou, L., Liang, L., Lin, S., Ou, H., Liu, Z., Huang, S., Zhang, L., & Meng, Z. (2019). Analysis of phenotypes and genotypes in 84 patients with 21-Hydroxylase deficiency in southern China. *Steroids*, 151, 108474. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2019.108474>
39. Loeber, J. G., Platis, D., Zetterström, R. H., Almashanu, S., Boemer, F., Bonham, J. R., Borde, P., Brincat, I., Cheillan, D., Dekkers, E., Dimitrov, D., Fingerhut, R., Franzson, L., Groselj, U., Hougaard, D., Knapkova, M., Kocova, M., Kotori, V., Kozich, V., Kremezna, A., ... Schielen, P. (2021). Neonatal Screening in Europe Revisited: An ISNS Perspective on the Current State and Developments Since 2010. *International journal of neonatal screening*, 7(1), 15. <https://doi.org/10.3390/ijns7010015>
40. Tsuji-Hosokawa, A., & Kashimada, K. (2021). Thirty-Year Lessons from the Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) in Japan. *International journal of neonatal screening*, 7(3), 36. <https://doi.org/10.3390/ijns7030036>
41. Wiley, V., Webster, D., & Loeber, G. (2019). Screening Pathways through China, the Asia Pacific Region, the World. *International journal of neonatal screening*, 5(3), 26. <https://doi.org/10.3390/ijns5030026>
42. Yau Mabel., Nimkarn Saroj. & New Maria I. (2016). **in Genetic Diagnosis of Endocrine Disorders** (Second Edition), Pages 203-210
43. Campos, V. C., Pereira, R. M., Torres, N., Castro, M. d., & Aguiar-Oliveira, M. H. (2009). High frequency of Q318X mutation in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in northeast Brazil. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, 53(1), 40–46. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302009000100007>