تعيين بعض الطفرات المسؤولة عند داء غوشر الطفلي في سورية

علي عجلوني*

الملخص

هدف هذا البحث إلى تشخيص داء غوشر الطفلي عبر البيولوجيا الجزيئية، ومعرفة الطفرات الشائعة في عينة من الشعب السوري ومقارنتها بدراسات أخرى. يسلط هذا البحث الضوء على هذا المرض الاستقلابي الوراثي ويهدف إلى إدخال طريقة جديدة للتشخيص فضلاً عن الإجراءات المخبرية المتعارف عليها.

المواد والطرائق: أجري التشخيص الجزيئي عند عشرة أطفال كان وسطي عمر الأطفال في العينة المدروسة 2,2 سنة، وشكوا من كبر بطن وشحوب وحرارة وتأخر تطور نفسي حركي، في معظم الحالات ظهرت خلية غوشر في كل أفراد العينة، وكانوا يعانون من ضخامات حشوية وفقر دم وضمور دماغي وحرارة، وأُجْرِيَ التحليل في مخبر البحوث والاستشارات الوراثية.

* مدرس- قسم الأمراض الوراثية عند الأطفال- كلية الطب البشري- جامعة دمشق.

النتائج: **ظهرت الطفرة L444P بحالة متماثلة الألائل عند ستة أطفال، والطفرة N370S بحالة متخالفة الألائل. كما لم يتم كشف أي طفرة عند ثلاثة أطفال.**

الاستنتاج: **أظهرت الدراسة أنه يمكن تأكيد تشخيص داء غوشر الطفلي باستخدام عتيدة تحوي تسع طفرات شائعة في العالم بنسبة لا تقل عن 60 %، وأن الطفرة L444P هي الغالبة تليها الطفرة N370S، وإن سيطرة الأولى يتوافق مع ما هو منشور عالمياً من حيث شيوعها في داء غوشر الطفلي المترافق مع أعراض مبكرة وتأخر تطور نفسي حركي، وظهرت الطفرة N370S بحالة متخالفة الألائل عند طفل واحد. ومن المعروف أن هذه الطفرة شائعة عند اليهود ولاسيَّما في النمط الأول المصادف بكثرة عند البالغين وكذلك تترافق هذه الطفرة مع تغاير في الأعراض السريرية والمخبرية، وتزداد وخامتها إذا ترافقت مع طفرة أخرى (متخالفة الألائل مركبة).**

كلمات مفتاحية: **تشخيص جزيئي، متماثل الألائل، متخالف الألائل، داء غوشر**

Identification of Some Mutations Responsibles for Infantile Gaucher Disease in Syria

Ali Ajlouni[*]

Abstract

Background: This study aimed to introduce - in our labs - a new method which confirms Gaucher disease, as we don't have the enzyme assay. In addition, We aimed to know the different mutations found in Syrian population and to compare it with other studies. In fact. we think that this the first time that such a study is carried out in Syria.

Methodology :We analyzed ten patients accepted in Damascus university children's hospital. the entire patients were presented with symptoms and signs suggested Gaucher disease especially viewing Gaucher cell in BM and / or liver biopsy. The analyses were carried out in laboratory for researches and genetic consultations.

Results :We identified the mutation L444P / L444P in six patients and N370S in heterozygote state in one patient.

Conclusion : Using a kit contained nine mutations which are common in world , we found in Arab Syrian patients, two mutations which have been classified as very common mutations in non Ashkenazy Jewish populations. the L444P is the prototype of severe mutations found in type 2 and 3 and the N370S is the prototype of the mild ones found in type 1. Although we found the last in a heterozygote situation in infant patient who complained from hepatosplenomegaly and gaucher cells were seen in BM , we can not rule out another mutation on the other allele which is not found in the kit. In fact, we can invest this technique to confirm the diagnosis of Gaucher disease by molecular diagnosis in at least 60% of suspected cases. In addition , we can also apply the molecular biology in prenatal diagnosis.

Key words :mutation, homozygote, heterozygote , Gaucher disease

[*] service of pediatrics, faculty of medicine, Damascus University.

مقدمة :introduction

يصيب داء غوشر، وهو شُحام lipidosis، عدة أجهزة يشكو المصاب به من اضطرابات دموية كفقر الدم ونقص الصفيحات ومن ضخامات حشوية وإصابات هيكلية كالألم العظمي والكسور المرضية ومن إصابة رئوية في بعض الأحيان؛ ويعدُّ أكثر أمراض الاختزان شيوعاً والمتعلقة بالجسيمات الحالة lysosomes، كما يمثل العيب الجيني الأكثر انتشاراً بين اليهود الشرقيين.

يوجد منه ثلاثة أنماط سريرية: يصادف النمط الأول لدى البالغين ولا يترافق مع إصابة عصبية ويشكل 99% من حالات المرض عند اليهود الشرقيين بوقوع incidence 1/1000 وتواتر حملة نحو 1/18.أما النمط الثاني أو الشكل الطفلي infantile فيترافق مع اعتلال عصبي حاد. ويمثل النمط الثالث الشكل اليَفَعي juvenile أو ال Norbottonian وهو شائع في السويد [1]، و قد سجل نمطان ظاهريان إضافيان هما: النمط حول الولادي المميت (أو النمط الكولوديوني) وهو شكل وخيم للنمط الثاني. والنمط الظاهري IIIc الذي يؤدي إلى تكلسات وعائية قلبية [2].

تشكل هذه الأنماط جميعها مرضاً صبغياً جسدياً متنحياً ,autosomal recessive وينتج المرض عن عوز في أنزيم acid beta – glucosidase (GBA) وهو أنزيم تحليل مائي (هيدرولاز) موجود في الجسيم الحال [1] ويسبب هذا العوز تراكم مادة متوسطة intermediate تسمىglucosylceramide داخل الخلايا وخاصة البلعمية phagocytic وحيدة النواة، وتسمى هذه الخلايا المندخلة بالبروتين السكري خلية غوشر المميزة للمرض، التي يمكن مشاهدتها بالمجهر الضوئي مرتشحة في الجهاز الشبكي البطاني (الطحال و الكبد ونقي العظم).

ينجم هذا العوز في الأنزيم عن طفرة في جين وظيفي مرمز لبروتين مكون من 512 حمضاً أمينياً وكتلته الجزيئية 57k .

يتموضع جين GBA على الصبغي 1q21 ممتداً بطول نحو 7kb، ويحوي أحد عشر إكزوناً، وعلى مسافة نحو 16kb منه هبوطاً downstream، يتموضع جين GBA آخر كاذب (غير وظيفي) بطول 5kb ذو درجة عالية من التنادد homology مع الجين الوظيفي. أما طول c DNA فهو نحو 2kb.

حُدِّدَ عدد من الرنا المرسال m RNAs بأطوال مختلفة ، ومن المحتمل أن ينجم هذا الاختلاف عن اختلاف مواضع التذييل بعديد الأدينيلاتalternative polyadenylation أو عن الاختلاف في التضفير alternative splicing أو عن وجود رنا مرسال من الجين الكاذب [3].

حددت أكثر من 200 طفرة عند مرضى الأنماط الثلاثة I وII وIII معظمها طفرات مُغلِّطة missense ، فضلاً عن غروز insertions [3]. حدد Tsuji et al أول طفرة مغلطة في عام 1987 وهي L444P، عند مرضى من الأنماط الثلاثة، وظهر أنها تشيع في المتفاوتات variants المترافقة مع اعتلال عصبي [4].

تشكل أربع من هذه الطفرات وهيN370S, L444P, 84insG, IVS2+1 نحو 95% من الألائل الطافرة التي كشفت لدى اليهود الأشكيناز مما يسمح بتحري المرض عندهم، وتهبط هذه النسبة إلى نحو 75% عند اليهود غير الشرقيين[3]. كما لوحظ ترابط بين النمطين الظاهري والجيني مما يوفر الأساس الجزيئي لتفسير التغاير السريري clinical heterogeneity المشاهد في النمط الأول من داء غوشر ذي المجال الواسع من الوخامة ومن بدء ظهور المرض. فمثلاً، عندما تكون الطفرة N370S / N370S عند شخص، يتأخر ظهور الأعراض ويكون تطور المرض بطيئاً بعكس الحال عندما تترافق الطفرة N370S مع طفرة أخرى (متخالفة الألائل مركبة compound heterozygoute)[1].

وهكذا يمكن بشكل عام تقسيم الطفرات إلى ثلاثة أنماط: الطفرات الخفيفة وهي التي لا توجد قطٌّ عند مرضى غوشر المترافق مع اعتلال عصبي كما هو الحال في الطفرة

N370S؛ ونمط الطفرات الوخيمة وهي التي تترافق مع اعتلال عصبي ولكن تملك القدرة على بناء بعض الأنزيمات كما في الطفرة L444P؛ وطفرات العدم Null mutations وهي غير القادرة على تشكيل الأنزيم، وأكثرها شيوعاً طفرة انزياح إطار القراءة frame shiftb 84 GG، ولا تتوافق الطفرة المتماثلة الألائل من هذا الصنف مع الحياة كما أظهرت التجارب على الفأر المُعطل جين GBA (Knock out) الذي يحمل إحدى طفرات هذا الصنف بشكل متماثل الألائل [3].

هدف هذا البحث إلى استخدام التشخيص الجزيئي لإثبات داء غوشر عند المرضى المشتبه إصابتهم سريرياً ومخبرياً بالمرض، فضلاً عن تعرّف على الطفرات الشائعة في عينة، ولو كانت صغيرة من الشعب السوري، ومقارنتها بدراسات عالمية مشابهة أخرى في الواقع، وقد زداد الاهتمام في تحديد الطفرات بعد انتشار طرائق بيولوجية جزيئية سهلة التطبيق واقتصادية وموثقة بعد أن كان تشخيص المرض يعتمد سابقاً على المقايسة الأنزيمية، وهي غير متوافرة في مخابرنا، ومن سلبياتها عدم ثبات العينة، وتكون نتائجها كمية يمكن أن تعطي نتائج ملتبسة من حيث الفرق بين الحامل والمصاب، في حين تتميز طرائق التكنولوجيا المعتمدة على الدنا DNA بالثبات الشديد لعينة الدنا، وتكون النتيجة كيفية يمكن الاستفادة منها في ربط الطفرة مع تصنيف المرض وشدته.

المواد والطرائق matrial and methods:

أجري التشخيص الجزيئي في مخبر البحوث والاستشارات الوراثية في كلية الطب بجامعة دمشق. جمعت عينات الدم من المرضى المشتبه بإصابتهم سريرياً ومخبرياً من خلال الأعراض والعلامات السريرية ورؤية خلايا غوشر في نقي العظم، أو في خزعة الكبد من الأطفال المقبولين في مستشفى الأطفال الجامعي بدمشق. استخلص الـDNA بالطريقة الملحية (بروتوكول salting out)، ومن ثم أضيف إلى مزيج mix يحوي بادئات primers موسومة بالبيوتين نوعية للألائل الطافرة والبرية wild في

جين GBA لإجراء التضخيم باستخدام تقانة ال PCR حسب البروتوكول الآتي: تسخين 94 درجة مئوية دقيقتان، ثم35 دورة تتكون كل منها من تمسيخ denaturation مدة 15 ثانية، والتحام annealing بدرجة 58 مدة 30 ثانية، وتطويل elongation بدرجة 72 مدة 30 ثانية، بعد انتهاء الدورات الخمس وثلاثين نجري دورة واحدة من التطويل النهائي بدرجة 72 مدة 3 دقائق. في المرحلة الثالثة يتم تهجين ناتج التضخيم هذا مع شريط strip اختبار (kit) مثبت عليه تسعة مسابير probs قليلة نوكليوتيد نوعية للألائل الطافرة ومثلها من البرية wild مثبتة جميعها بشكل متوازٍ مكونة مصفوفة array (طريقة التهجين العكسيhybridization– reverse) تمكننا هذه الطريقة من الكشف عن الحالات المصابة المتماثلة الألائل affected homozygous والمتخالفة الألائل heterozygous أو الحملة (carrier) والمتماثلي الألائل الطبيعيين normal homozygous.تدعى هذه الطريقة طريقة قلائل النوكليوتيدات النوعية للألائل Alleles Specific Oligonucleotides (ASO).

وفرّت المواد الضرورية لإجراء هذا الاختبار الجزيئي عتيدة kit من شركة Vienna lab.

تحوي أشيع تسع طفرات تحدث في جين GBA الوظيفي وهي ,84GG, IVS2+1 N370S, V394L, D409H, L444P, R496H, R463C فضلاً عن طفرة مأشوبة مشتقة من التعابر cross over بين جيني GBA الوظيفي والكاذب(recNcil,recTL) والمسماة على الشريط rec reporter.

تعدُّ هذه الدراسة وصفية descriptive واستباقية Prospective تم من خلالها اختبار عينة من عشرة أطفال ممن راجعوا المستشفى في عام 2007 (ستة مرضى) حتى منتصف 2008 (سبعة مرضى) ولم نتمكن من إجراء اختبار التشخيص الجزيئي لثلاثة مرضى لسوء الحمض النووي المستخلص.

صممت استمارة خاصة بكل مريض أدخل في الدراسة تضمنت العمر والسكن والقربى والسوابق العائلية والشكوى الرئيسية والإجراءات المخبرية التي تعزز الشبهة بالمرض كاللطاخة المحيطية والفوسفاتاز الحامضة ورؤية خلية غوشر في الأنسجة خاصة نقي العظم والكبد بحيث لا ترسل عينة من الدم المحيطي إلى المخبر إلا عندما تتوافر الشبهة القوية السريرية والمخبرية ونخص بالذكر رؤية خلية غوشر في نقي العظم و/أو خزعة الكبد.

النتائج result:

أجري تحليل الطفرة لعشرة مرضى أطفال وكانت النتائج على الشكل الآتي: لم تكشف طفرة عند ثلاثة مرضى، وحددت الطفرة N370S بحالة متخالفة الألائل عند مريض واحد، وحددت الطفرة L444P بحالة متماثلة الألائل عند ستة مرضى.(الجدول 1)

عدد المرضى	نوع الطفرة
6	L444P/L444P
1	N370S/ -
3	- / -
3	لم تجر

الجدول(1) يلخص نتائج الدراسة الجزيئية

المناقشة discussion:

يظهر تحليل النتائج المبينة في الجدول السابق من فقرة النتائج الذي يتعلق بتحري طفرات داء غوشر عند عشرة أطفال (وسطي عمر العينة 2.2 سنة) سيطرة الطفرة L444P بحالتها المتماثلة الألائل، حيث وجدت عند ستة مرضى من أصل عشرة (60%)، ووجدت حالة واحدة حامل carrier لطفرة N370S، أما في الحالات الثلاث المتبقية فلم يظهر أي أليل طافر رغم توافر الشبهة السريرية والمخبرية.

يلاحظ من هذه النتائج أنه يمكن تشخيص داء غوشر عند الأطفال عبر تطبيق طريقة بيولوجية جزيئية وباستخدام عتيدة kit تحوي الطفرات الشائعة عالمياً عند مالا يقل عن

60% من الحالات المشتبهة سريرياً ومخبرياً، مع سيطرة للطفرتينL444P وN370S. وتتوافق هذه النتيجة مع ما ذكر في الأدب الطبي من أنه عند غير اليهود الأشكيناز تكون الطفرتان N370S وL444P مسؤولتين عن نحو70% من الألائل المسببة للمرض، وتصنف هاتان الطفرتان على أنهما شائعتان جداً [3] وتصنف الطفرة L444P ضمن الطفرات الوخيمة إذْ يعاني معظم المصابين بها في العينة المدروسة من ضخامة حشوية جسيمة وفقر دم وفشل نمو وتأخر تطور نفسي حركي موثق بصغر رأس الذي يعكس ضموراً دماغياً.

وفي مقارنة بدراسة مماثلة أجريت في مستشفى الملك فيصل في المملكة العربية السعودية عام2008 تم خلالها تشخيص 12 مريضاً بداء غوشر حيث تم فيها كشف الطفرة L444P/L444P عند سبعة مرضى (نحو 60 %) أربعة منهم سوريين، مع وجود صلة قربى بينهم [5].

ويجب التنويه إلى وجود العديد من الطفرات الفرادية sporadic غير الشائعة بين المرضى غير اليهود [3]، ففي الدراسة وجدت الطفرة F397S بحالة متخالفة الألائل مع L444P وهي غير موصوفة سابقاً حسب هذه الدراسة، كما ظهرت الطفرات F426V وD409H وS121 ولم تذكر ظهور الطفرة N370S رغم وجود حالة صنفت داء غوشر نمط أول. وقد أثبت Theophilus et al في عام 1989 سيطرة الطفرة L444P في النمطين الثاني والثالث، كما وجد Cormand et al في عام 1989 أن الطفرتين L444P وN370S مسؤولتان عن 66.1 %من ألائل داء غوشر في إسبانيا [2]. في دراسة أجراها koprivika et al في الولايات المتحدة عام 2000 شكلت الطفرات N370S, 84 ins G, IVS2+1 G-A, L444P 93% من الألائل الطافرة عند المرضى اليهود الأشكيناز المصابين بالنمط I و49% من المرضى غير اليهود الأشكيناز المصابين بالنمط I، كما أدت تخالفية اللواقح من أجل الطفرة N370S إلى داء غوشر من النمط الأول، في حين ترافق تماثلي الألائل من أجل الطفرة L444P مع داء غوشر نمط ثالث [6].

لم نتمكن من الحصول على عدد أكبر من المرضى، وتوجد ثلاث حالات لم نتمكن من إجراء الاختبار بسبب سوء الدنا المستخلص وقلته، وعدم القدرة على إعادة التحليل إما بسبب الوفاة أو لعدم تعاون الأهل بعد الخروج من المستشفى. اقتصرت الدراسة على مستشفى واحد كما لم نتمكن من تحديد طفرات موجودة مسبقاً في العتيدة باستثناء L444P وN370S ربما لصغر حجم العينة، أو لوجود طفرات غير مثبتة على شريط الاختبار، كما لم يتم استخدام استراتيجية أخرى مهمة في تحديد الطفرات التي لم تكتشف في الحالات الثلاث السلبية، والحالة الوحيدة المتخالفة الألائل ألا وهي سَلسَلة الحمض النووي DNA sequencing.

الاستنتاجات conclusions:

طبقت طريقة التشخيص الجزيئي على عشرة أطفال مشتبه بإصابتهم بداء غوشر تم من خلالها تأكيد التشخيص في ست حالات وكانت فيها الطفرة L444P متماثلة الألائل، ووجدت الطفرة N370S في حالة واحدة بحالة متغايرة الألائل ولم تظهر أي طفرة في ثلاث حالات، وهكذا نتوقع الحصول على نتائج بيولوجية جزيئية بنسبة لا تقل عن 60% مع شيوع طفرة L444P تليها طفرة N370S.

المقترحات و التوصيات suggestions and recommendations:

نقترح في ضوء هذه الدراسة زيادة حجم العينة، وذلك عن طريق تعميم الدراسة على أكثر من مستشفى لتأكيد نتائج هذه الدراسة والكشف عن جميع الطفرات الموجودة.

كما نوصي بتطوير طرائق التشخيص الجزيئي المطبقة في مخبر البحوث والاستشارات الوراثية الموجود في كلية الطب جامعة دمشق كسَلسلة الجينات، بهدف الكشف عن طفرات ربما تكون غير موصوفة في العالم، وريثما يتم ذلك يجب التعاون مع مراكز بحثية تطبق هذه الطرائق في تشخيص داء غوشر.

References

[1]- Margret M. McGovern Robert J. Desnick. LIPIDOSIS. Textebook of pediatrics, NELSON, KLIGMAN, BEHRMAN, JENSON, STANTON, edis. 18 the edition , W.B. saunders company 2008 , 595-597

[2]- Gaucher disease type 1 (2008)[website] available from:<[accessed: 2008/9/6] www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

[3]- Ernest Beutler , Gregory A. Grabowski. Gaucher Disease.
the metabolic and molecular bases of inherited diseases.Charles R. Scriver, Arthur L. Brandet, William S. Sly, David Valle edis Eighth edition. McGraw Hill. 2001, 3635 -3657

[4]-Glucosidase Beta, Acid ; GBA (2008),[website], available from < [accessed : 2008/9/6] www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

[5]-Kaya N, Al- ZAHRANI F, Al- Odaib A : Identification of Gaucher disease mutations found in Arabia Saudi , blood cells Mol Dis. 2008 Sep-Oct;41(2):200-1

[6]-Koprivica V, Stone DL, Park JK : Analysis and classification of 304 mutant alleles in patients with type 1 and type 3 Gaucher disease ,
Am J Hum Genet. 2000 Jun;66(6):1777-86.

تاريخ ورود البحث إلى مجلة جامعة دمشق: 2008/10/19.

تاريخ قبوله للنشر: 2009/2/24.