# بررسی مولکولی جهش مدیترانه ای در مبتلایان به کمبود آنزیم $G_6PD$ شهر تهران سال ۸۰ـ۱۳۸۱

دکتر یوسف مرتضوی *، مجید ترماحی اردستانی **، دکتر علی اکبر پورفتح الله ***


## خلاصه

***سابقه و هدف :*** *کمبود آنزیم گلوکز ـ ٦ ـ فسفات دهیدروژناز ($G_6PD$) از شایعترین نقص های آنزیمی شناخته شده درانسان می باشد. با استفاده از روشهای بیوشیمیایی انواع مختلف آنزیم از سراسر دنیا گزارش گردیده است . از آنجا که تفکیک واریته های مختلف با روشهای بیوشیمیایی امکان پذیر نیست، این مطالعه به منظور تعیین جهش مدیترانه ای به روش مولکولی بر روی مبتلایان به کمبود آنزیم $G_6PD$ مراجعه کننده به مراکز درمانی شهر تهران صورت پذیرفت.*

***مواد و روش ها:*** *تحقیق به روش توصیفی و بر روی ٦٤ نفر انجام گرفت. کمبود آنزیم $G_6PD$ توسط آزمون فلورسانس نقطه ای مشخص شد. DNA از نمونه خون محیطی استخراج و تخلیص گردید و سپس نمونه های DNA توسط PCR (Polymerase Chain Reaction) تکثیر شدند. محصولات PCR به وسیله آنزیم هضم گردیده و مبتلایان به جهش مدیترانه ای شناسایی شدند.*

***یافته ها:*** *٦٤ نفر شامل ٥٨ فرد مذکر و ٦ فرد مؤنث در سنین کمتر از ١٦ سال مورد بررسی قرار گرفتند. شیوع نقص مدیترانه ای در ٤٧ نفر (٧٣/٤ درصد) وجود داشت که در مردان به میزان ٧٤/١ درصد و در زنان ٦٦/٧ درصد بود. ١٧ نفر (٢٦/٦ درصد) دارای جهش های دیگری غیر از نوع مدیترانه ای بودند.*

***نتیجه گیری و توصیه ها:*** *شیوع نقص آنزیمی مدیترانه ای مشابه کشورهای همجوار بوده و انجام تحقیق برای مشخص نمودن نوع جهش سایر واریته ها را توصیه می نماید.*


***واژگان کلیدی : جهش مدیترانه ای، آنزیم $G_6PD$، Polymerase Chain Reaction***

## مقدمه

آنزیم $G_6PD$ (Glucose-6- phosphate dehydrogenase) از مهمترین آنزیم های موجود در بدن انسان می باشد که سلولهای مختلف بدن از جمله گلبولهای قرمز مقادیر متفاوتی از این آنزیم را دارا هستند (١). کمبود آنزیم $G_6PD$ از شایع ترین نقص های آنزیمی شناخته شده در انسان می باشد . براساس آمارهای موجود تخمین زده شده است که حدود ٤٠٠ میلیون نفر در سراسر جهان به این عارضه مبتلا هستند (٢). کمبود آنزیم $G_6PD$ از لحاظ تنوع و پراکندگی بسیار متغیر است . تقریباً ٧/٥ درصد مردم دنیا حامل یک یا دو ژن ناقص $G_6PD$ می باشند. بالاترین میزان شیوع آن در گروههای یهودی به حدود ٧٠ درصد می رسد و کمترین مقدار آن در حدود ١ درصد در ژاپنی ها گزارش شده است. براساس آمار سازمان بهداشت جهانی نقص آنزیم مذکور در کشور ایران بین ١٠ تا ١٤/٩ درصد پیش بینی گردیده است (٣،٤)، هر چند طبق


* استادیار هماتولوژی دانشگاه علوم پزشکی زنجان

** کارشناس ارشد هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس

*** دانشیار ایمنو هماتولوژی دانشگاه تربیت مدرس

برخی مطالعات دیگر میزان شیوع کمبود بین ۱ تا ۲٤/۵ درصد می باشد (۵،٦) .

ژن $G_6PD$ بر روی بازوی بلند کروموزوم X (xq28) قرار دارد. با توجه به قرار گیری ژن $G_6PD$ بر روی کروموزوم X، توارث $G_6PD$ یک الگوی وابسته به جنس دارد (۷) . از این رو، ژن معیوب در مردان به طور کامل بروز می کند. در خانمها به جهت دارابودن دو کروموزوم X اشکال مختلف هموزیگوت طبیعی (آلل های طبیعی )، هتروزیگوت ( یک آلل طبیعی و یک آلل غیرطبیعی ) و هموزیگوت غیر طبیعی (هردو آلل غیرطبیعی) قابل رؤیت می باشد (۸).

تا به حال بیش از ٤۰۰ نوع $G_6PD$ در افراد مبتلا از سراسر جهان گزارش شده است (۹). در اکثر موارد جابه جایی یک باز در سطح DNA باعث جابه جایی یک اسید آمینه با اسید آمینه دیگر می گردد .نوع طبیعی $G_6PD$ به نام نوع B معروف است . حدود ۲۰ درصد از سیاهپوستان آفریقایی دارای نوع ($G_6PD(A^+$) می باشند که از نظر فعالیت، طبیعی است اما در یک اسید آمینه با نوع B اختلاف دارد و توسط الکتروفورز، از نوع B قابل تشخیص می باشد. (۱۰)

برخی از افراد نژاد آفریقا دارای $G_6PD$ نوع $A^-$ هستند که $G_6PD$ در این افراد به خاطر جهش در DNA ناپایدار می باشد . $G_6PD$ نوع مدیترانه ای شایعترین نوع $G_6PD$ است که علایم آن از نوع $A^-$ شدیدتر بوده و افراد مبتلا اگر در برابر عوامل اکسیدان قرار بگیرند، منجر به آنمی همولیتیک غیر اسفروستیک می گردد. این واریانت در نواحی مدیترانه (ایتالیا ، یونان ، سادینیا)، در کردهای یهودی و عرب ها، در هندوستان و در جنوب شرقی آسیا یافت می شود (۱۰،۱۱).

در سطح مولکولی نشان داده شده که یک جابه جایی در نوکلئوتید شماره ۵٦۳ در اگزون ٦ از ژن $G_6PD$ باعث ایجاد واریانت نوع مدیترانه ای می گردد. در این واریانت بر اثر یک جهش در ژن $G_6PD$ باز سیتوزین به تیمین تبدیل می شود که در نتیجه باعث جایگزینی اسید آمینه سرین با فنیل آلانین در موقعیت ۱۸۸ می گردد. جهش نوع مدیترانه ای شایعترین نوع جهش در ژن $G_6PD$ می باشد که از کشورهای مختلف مدیترانه ای و غیر مدیترانه ای گزارش شده است. در اکثر کشورهای همسایه جهش های عامل نقص آنزیمی $G_6PD$ در سطح مولکولی مشخص و گزارش شده است اما در کشورما بجز مطالعه ای که در منطقه مازندران انجام گرفت، پژوهش دیگری در این زمینه صورت نپذیرفته است. از این رو، در این مطالعه میزان فراوانی جهش مدیترانه ای در تهران بررسی می گردد.

## مواد و روشها

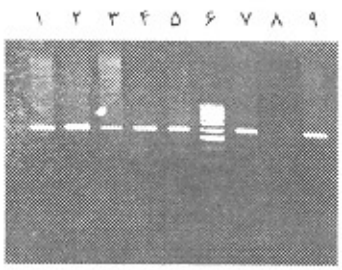
تحقیق به روش توصیفی در سال ۸۱ـ۱۳۸۰ انجام گرفت. ٦٤ نمونه خون از افراد دارای کمبود آنزیم $G_6PD$ ( مشخص شده توسط آزمون فلورسانس نقطه ای ) از افراد مراجعه کننده به مراکز درمانی و آزمایشگاهی شهر تهران از جمله مرکز طبی کودکان ، بیمارستان مفید و آزمایشگاه پاتوبیولوژی نور جمع آوری گردید. فعالیت آنزیم $G_6PD$ توسط کیت شرکت کیمیا پژوهان با روش فلورسنت نقطه ای و به صورت کیفی اندازه گیری شد. در این روش آنزیم $G_6PD$ در محیط تامپونی مناسب باعث احیای NADP (NicotinAmide-Adenine-Dinucleotide-Phosphate) و تبدیل آن به NADPH (فرم احیاء شده) می گردد که ماده حاصل زیر نور ماورای بنفش با طول موج ۳٦۵ نانومتر ایجادفلورسانس می نماید. شدت فلورسانس در خون افراد سالم زیاد و در خون بیماران مبتلا به نقص آنزیم $G_6PD$ کم و یا منفی می باشد. برای اطمینان از کیفیت کار از ۳ نمونه به عنوان شاهد استفاده گردید: ۱ـ نمونه خون افراد سالم که فعالیت آنزیمی طبیعی دارد . ۲ـ نمونه دارای کاهش شدید فعالیت آنزیم که برای تهیه آن خون طبیعی مدت ۲۰ دقیقه در حرارت ۵٦ درجه قرار گرفت. ۳ـ نمونه دارای کمبود نسبی که برای تهیه آن به نسبت مساوی شاهد ۱ و ۲ با یکدیگر مخلوط شدند. برای استخراج و تخلیص DNA ژنومی از روش فنل ـ کلروفرم استفاده گردید. در این روش

با استفاده از آنزیم پروتئیناز K و یک دترجنت، سلولها را لیز نموده و سپس، پروتئینهای سلولی با فنل و کلروفرم از DNA جدا گردیدند. در نهایت، DNA با اتانول مطلق رسوب داده شد. غلظت و خلوص DNA در این روش بالا می باشد . برای انجام PCR (Polymerase Chain Reaction) بر روی نمونه های DNA اگزون های ٦ و ٧ از ژن $G_6PD$ توسط پرایمرهای (5'-CCCCGAAGAGGAATTCAAGGGGGT - 3') ۹۱ و (5'-GAAGAGTAGCCCTCGAGGGTGACT-3') ۹۲ تکثیر گردیدند.

برای هر نمونه بیمار ، ۲ میکرو لیتر از هر یک از پرایمرهای مذکور، ۱/۵ میکرو لیتر، از $MgCl_2$ (50 mM) ، ۰/۵ میکرو لیتر از هر یک از dNTPs (10 mM) و ۱ واحد Taq DNA Polymerase ( سینا ژن ، ایران) به لوله PCR اضافه گردید. سپس مقدار ۵ میکرو لیتر از DNA به لوله افزوده و تا حجم نهایی ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. شرایط PCR عبارت بود از : دناتوره نمودن اولیه در ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و سپس ۳۳ سیکل که هر سیکل عبارت بود از ۹٤درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و بالاخره تکثیر نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و برای یک سیکل انجام گردید.

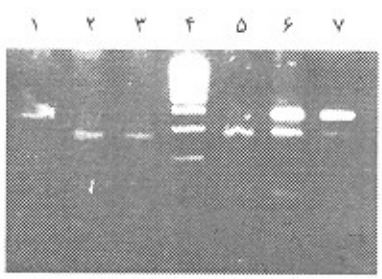
برای الکتروفورز نمونه های PCR ژن $G_6PD$، ۱۲ میکرو لیتر از محصولات PCR را با ۲ میکرو لیتر از بافر نمونه گذاری (Loading Buffer) مخلوط نموده و درون چاهکهای ژل آگاروز۱/۵ درصد قرار دادیم. نمونه ها برای مدت ۱/۵ ساعت در ۷۰ ولت الکتروفورز گردیده و ژل توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردید. باندهای DNA توسط دستگاه UV ترانس ایلومیناتور قابل رؤیت گردیده و از ژل عکس تهیه گردید. (شکل ۱)

برای هضم محصولات PCR مقدار ۳۱ میکرولیتر از محصولات PCR با ۳/۵ میکرولیتر از بافر ۱۰ بار غلیظ شده مربوط و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم MboII (شرکت Biolabs ، انگلستان ) را در یک لوله مخلوط نموده و برای مدت ١٤-١٢ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی گراد قرار دادیم. محصولات هضم شده را بر روی ژل آگارز ۲ تا ۳ درصد الکتروفورز نموده و از چگونگی برش DNA توسط آنزیم MboII عکس تهیه گردید (شکل ۲).




*شکل ۱ ـ تکثیر اگزونهای ٦ و ٧ با استفاده از پرایمرهای ۹۱ و ۹۲ توسط PCR*

*(ستونهای ۱ الی ۵ و ۷و۹ قطعه ۵۸۳ نوکلئوتیدی را نشان می دهد. ستون ٦ سایزمارکر bp ۱۰۰ می باشد . ستون ۸ نشان دهنده شاهد منفی ( نمونه بدون DNA) و ستون ۹ شاهد مثبت است ).*




*شکل ۲ ـ محصولات PCR هضم شده توسط آنزیم MboII*

*(ستون ۱ : DNA فرد مذکر که فاقد جهش مدیترانه ای می باشد و باند bp ۳۷۹ برش نخورده است. ستونهای ۳،۲ و ۵ مربوط به افراد مذکر دارای جهش مدیترانه ای می باشد که باند bp ۳۷۹ مربوط به قطعات ۲۷٦ و ۱۰۳ برش خورده است. ستونهای ٦و۷ مربوط به نمونه های DNA افراد مؤنث می باشد. به علت هتروزیگوت بودن نمونه های مذکور، قطعات ۳۷۹ و ۲۷٦ به همراه قطعات کوچکتر ۱۲۰ و ۱۰۳ نوکلوتیدی دیده می شوند. ستون ٤ : سایز مارکر bp ۱۰۰ را نشان می دهد).*

## یافته ها

تحقیق بر روی ٦٤ نفر انجام گرفت که سن آنها از یک ماه تا ١٦ سال متغیر بود . از این تعداد، ۵۸ نفر مذکر و ٦

نفر مؤنث بودند. ٤٧ نفر کمبود آنزیم $G_6PD$ از نوع مدیترانه ای داشتند که شیوع ٧٣/٤ درصد را نشان می دهد. ١٧ نفر (٢٦/٦ درصد) نیز مبتلا به جهش ایجادی از نوع مدیترانه ای نبوده اند. شیوع نقص مدیترانه ای در مردان به میزان ٧٤/١ درصد و در زنان ٦٦/٧ درصد بود. در بیماران کمتر از ١ ماه، میانگین هموگلوبین ١٤ تا ١٦ گرم در دسی لیتر و هماتوکریت ٤٠ تا ٤٨ درصد بود و در افراد با گروه سنی ٣ تا ٩ سال میانگین هموگلوبین و هماتوکریت به ترتیب ٧ گرم در دسی لیتر و ٢٣ درصد بود.

## بحث

این مطالعه نشان داد که نقص آنزیمی نوع مدیترانه ای در ٧٣/٤ درصد مبتلایان به کمبود $G_6PD$ وجود دارد. شیوع کمبود آنزیم $G_6PD$ به طور قابل ملاحظه ای در جمعیت های مختلف متغیر است . از موتاسیونهای متعدد شناخته شده آنزیم $G_6PD$، تعداد کمی شایع هستند . معمولامطالعات جمعیتی برای شناسایی کمبود آنزیم $G_6PD$ با به کار بردن یک آزمون غربالی امکان پذیر است که با استفاده از روش رنگ زدایی یا آزمون فلورسنت نقطه ای انجام می گیرد و سپس با آنالیز موتاسیون در افرادی که دارای کمبود آنزیم هستند، دنبال می گردد . این روش نمی تواند در نشان دادن زنان هتروزیگوت قابل اعتماد باشد و از این رو، همه گزارشات فراهم آمده درمورد شیوع ژنی $G_6PD$ تنها در ارتباط با جنس مذکر بوده است . روش دیگر در مطالعات جمعیتی برپایه ارزیابی مستقیم جهش های شایع آنزیم $G_6PD$ می باشد . چنین روشی نه تنها به ما قدرت شناسایی افراد همی زیگوت و هموزیگوت را می دهد بلکه شناسایی زنان هتروزیگوت را نیزممکن می سازد. در این صورت می توان ارزیابی دقیق تری از شیوع یک جهش شایع ژن $G_6PD$ در یک جمعیت داشت. روش دوم احتمالادرجمعیت هایی که شیوع کمبود آنزیم $G_6PD$ شایع است عملی تر می باشد (١٢).

تا به امروز مطالعات بسیاری در اکثر نقاط جهان بر روی شیوع و اساس ژنتیکی کمبود آنزیم $G_6PD$ در میان نژادهای مختلف صورت گرفته است . پس از هضم آنزیمی مشخص گردید، ٧٣/٤ درصد از افرادی که توسط آزمون کیفی فلورسنت نقطه ای کمبود آنزیم $G_6PD$ در آنها محرز گردیده بود، دارای جهش نوع مدیترانه (nt 563 C/T) می باشند. سن افراد مورد مطالعه از کمتر از یک ماه تا ١٦ سال متغیر بوده است . تمام کسانی که در گروه سنی کمتر از ١ ماه قرار داشتند، دارای میانگین هموگلوبین ١٦ـ١٤ گرم در دسی لیتر و هماتوکریت ٤٨ـ٤٠ درصد بوده اند . افراد در محدودهٔ سنی ٩ـ٣ سال دارای میانگین هموگلوبین و هماتوکریت به ترتیب ٧ و ٢٣ گرم در دسی لیتر درصد بوده و هیپربیلی روبینمی و رتیکولوسیتوز داشتند . بقیه افراد دارای شاخص های خونی طبیعی بوده و علایمی از یرقان نداشتند . اگزونهای ٦و٧ از ژن $G_6PD$ افراد فوق توسط پرایمرهای ٩١ و ٩٢ تکثیر گردیدند که محصول PCR یک باند ٥٨٣ نوکلئوتیدی می باشد . این قطعه PCR شده پس از الکتروفورز بر روی ژن آگارز قابل مشاهده می باشد ( شکل ١). جهت اطمینان از عدم آلودگی محصولات PCR از کنترلهای مناسب استفاده گردید. در باند DNA فوق در حالت طبیعی برای آنزیم MboII، ٤ محل برش وجود دارد و قطعات ایجاد شده دارای اندازه های ٣٧٩، ١٢٠،٦٠ و ٢٤ نوکلئوتید می باشند. در صورتی که جهش نوع مدیترانه اتفاق افتاده باشد، یک محل برش جدید برای آنزیم Mbo II در موقعیت نوکلئوتید ٥٨٣ ایجاد می گردد و باند ٣٧٩ به باندهای کوچکتر ١٠٣ و ٢٧٦ تقسیم می شود. باند ٢٤ نوکلئوتیدی بر روی ژل آگارز معمولی قابل مشاهده نیست و باند ٦٠ نوکلئوتیدی نیز به صورت منتشر و محو دیده می شود (شکل ٢).

پس از هضم محصولات PCR توسط آنزیم MboII مشخص گردید که ٤٧ نفر (٧٣/٤ درصد ) دچار نقص آنزیمی نوع مدیترانه ای می باشند که ٨/٥ درصد از افراد دارای جهش مدیترانه ای را افراد مؤنث و ٤٣/٤٧

(۹۱/۵ درصد ) را افراد مذکر تشکیل می دهند . از آنجا که نمونه گیری در این مطالعه به صورت تصادفی انجام نگرفته است از این رو، نمی توان شیوع آن را براساس تعداد کروموزوم ( شیوع ژنی ) بیان نمود و چون جمعیت تهران از مجموعهٔ نژادهای مختلف تشکیل گردیده بنابراین ردیابی ژنتیک و نژاد آنها امکان پذیر نمی باشد. در ۲۶/۶ درصد از نمونه های مورد مطالعه، جهش ایجاد شده از نوع مدیترانه ای نبوده است که این درصد در مقایسه با جهش های گزارش شده از کشورهای همسایه و برخی کشورهای حاشیه منطقه مدیترانه همخوانی دارد. از نظر شیوع جهش مدیترانه ای در کشورهای مختلف جهان مطالعات زیادی صورت پذیرفته است . فراوانی این جهش درکشورهای حاشیه مدیترانه بسیار بالا می باشد . مطالعاتی که در کشورهای ایتالیا (۱۳)، پرتقال (۱٤)، اسپانیا (۱۵)، یونان (۱٦)، مصر (۱۷) و الجزایر (۱۸) به عمل آمده، حاکی از شیوع بالای جهش مدیترانه می باشد. شیوع جهش نوع مدیترانه ای در کشور های همسایه نظیر عربستان (۱۹)، ترکیه (۲۰)، عمان (۲۱)، امارات متحده عربی (۲۲)، پاکستان (۲۳) و کویت (۲٤) نیز به ترتیب ۸۰٪، ۷۸/۲٪، ۵۵٪، ۷۸٪، ۸۸/۸٪ می باشد. تنها مطالعه گزارش شده مولکولی که در کشور ما صورت گرفته است مربوط به تحقیقی می باشد که در یکی از استانهای ساحلی دریای خزر (مازندران) انجام شد. این مطالعه توسط مصباح نمین و همکاران بر روی ۷٤ کودک فاویسمی ساکن شهرستانهای استان مازندران صورت پذیرفت و مشخص شد که ٤۹ نفر (٦٦/۲ درصد) از افراد دارای جهش مدیترانه ای می باشند، ۳۳/۸ درصد نیز جهش های غیر مدیترانه ای داشتند (۲۵).

یافته ما با نتایجی که از شمال کشور به دست آمده و نیز با نتایج برخی کشورهای همجوار همخوانی دارد. علت این همخوانی می تواند قدیمی بودن جهش نوع مدیترانه ای نسبت به سایر جهش هاباشد . یعنی این جهش هزاران سال قبل اتفاق افتاده است و ژن جهش یافته توسط مهاجرت ها و یا جابه جایی جمعیت ها به علت جنگ و غیره به سایر سرزمین ها جریان یافته است. ۱۷ نفر ( ۲٦/٦ درصد) افراد مورد مطالعه فاقد این جهش بودند که مشخص کردن نوع جهش در این افراد به مطالعات مولکولی بیشتر نیاز دارد و با استفاده از روشهای هترودوبلکس و در نهایت، توسط تعیین توالی ژن $G_6PD$ قابل انجام می باشد.

## تشکر و قدردانی

از مسئولان محترم آزمایشگاههای مرکز طبی کودکان، بیمارستان مفید و آزمایشگاه پاتوبیولوژی نور به خاطر در اختیار قرار دادن نمونه های خون و از مسئولان و کارکنان بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران به خصوص آقای دکتر زینلی به خاطر اجازه استفاده از وسایل و امکانات بخش تشکر و قدردانی می گردد.

## منابع

1- Vulliamy T, Mason P, Luzzatto L.The molecular basis of $G_6PD$ deficiency. ***Hematologica*** 1992; 8(4):138.

2-Beutler E. $G_6PD$ deficiency. ***Blood*** 1994; 84(11):3613 - 17

3-Cocco P, Todde P, Forensa S, Manca M. Mortality in a cohort of men expressing the $G_6PD$ deficiency. ***Blood*** 1998; 91: 706-9.

4-WHO Working group. $G_6PD$ deficiency. ***Bulletin of the world health organization***. 1989; 67: 601-11.

۵- حسن زاده الق بولاغی قاسم. تعیین میزان شیوع کمبود آنزیم $G_6PD$ در گلبولهای قرمز دانش آموزان پسر شهرستان ماکو. ***پایان نامه کارشناسی ارشد***، تهران : دانشگاه علوم پزشکی ایران، ۱۳۷۰، صفحات ٤۷ـ۳۸.

٦ ـ میری مقدم ابراهیم، پور فتح الله علی اکبر، معتبر منصور، کمبود آنزیم گلوکز ـ ٦ ـ فسفات دهیدروژناز و ارتباط آن با مالاریا. ***پژوهنده*** ۱۳۷۸، شماره ۱۳: صفحات ٤۳ـ۳۹.

7 - Beutler E. The genetic of $G_6PD$ deficiency. ***Semin Hematol*** 1990; 27:137.

8 – Kirkman HN, Hendrikson EM. Sex-linked electrophoretic difference in $G_6PD$. ***Am J Hum Genet*** 1963; 15:241.

9 - Betke K, Beutler E, Brewer G.Standardization of procedures for the study of $G_6PD$, Report of a WHO scientific group. ***WHO Tech Rep Ser*** 1967; 366: 1-53.

10 - Luzzatto L. Studies of polymorphic traits for the charactrization of populations, African populations south of the sahara. ***J Med Sci*** 1973; 9:1181-84.

11 - Oppenheim A, Jurycl R, Rund D. $G_6PD$ mediterranean accounts for the high prevalence of $G_6PD$ deficiency in kurdish jews. ***Hum Genet*** 1930; 91:203-6.

12 - Elena S, Brendan D. Population study of common $G_6PD$ mutations in Kuwait. ***Hum Hered*** 1999; 19: 41-44.

13 – Martibez DF, Dottic TD, Fiorelli G, Capellini MD. Molecular heterogenity of $G_6PD$ variants in Italy. ***Hematologica*** 1997; 82: 440-44

14 – Mason P, Vulliamy T. ***Genetic variation of human erythrocyte $G_6PD$ in human blood cells, consequences of genetic polymorphism and variations***. London: Imperial College Press; 2000: 251-7.

15 – Vives- Corrons JL. Molecular analysis of $G_6PD$ deficiency in Spain. ***Sangre*** 1997; 42(5): 391-8.

16 - Xu W, Westood B, Bartsocas CS. $G_6PD$ mutations and haplotypes in various ethnic groups. ***Blood*** 1995; 85:257-63.

17 – Rizk SH, Aziz MA. Frequency of the $G_6PD$ mediterranean mutation among a group of Egyptian Pediatric Patients. ***Lab hematol*** 2000; 6:127-131.

18 - Nafa K, Reghis A, Osmani N. At least five polymorphic mutants accounts for the prevalence of $G_6PD$ deficiency in Algeria. ***Am J Hum Genet*** 1994; 94:513-7.

19 - Niazi G, Adey O, Kunnu A. Neonatal jaundic in Saudi newborns with $G_6PD$ Aures. ***Am Trop Pediatr*** 1996; 16(1): 33-7.

20 – Oner R, Gumruk F, Acar C. Molecular characterization of $G_6PD$ deficiency in Turkey. ***Hematologica*** 2000; 85:3-7.

21 – Daar S, Vulliamy T. Molecular characterization of $G_6PD$ deficiency in Oman. ***Hum Hered*** 1996; 49:172-4.

22 – Bayoumi RA, Anur-Komals E. Molecular characterization of erythrocyte $G_6PD$ deficiency in Al-ain district, United Arab Emirats. ***Hum Hered*** 1996; 46:136-40.

23 – Saha N, Ramzan M. Molecular characterization of red cell $G_6PD$ deficiency in north west Pakistan. ***Hum Hered*** 1994; 44:85-9.

24 – Samilcuk E, Brendan D, Al-Acadi S. Population study of common $G_6PD$ multations in Kuwait. ***Hum Hered*** 1999; 19:41-45.

25 - Mesbah S, Sanati MH, Mowjoodi A. Spread of the $G_6PD$ variant ($G_6PD$ Mediterranean) in one of the coastal provineces of caspian sea in Iran. ***J Sci IR Iran*** 2000; 11(4): 285- 8.