تقصي الطفرة المتوسطية p.Ser188Phe في جين *G6PD* لدى مرضى فقر الدم الانحلالي

عبد الله حسن* **غالية أبو الشامات****

محمد علي عجلوني***

الملخص

تعدّ الطفرة المتوسطية p.Ser188Phe من أكثر الطفرات شيوعاً لدى مرضى عوز الأنزيم G6PD في منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط وجنوب أوربا، ويسبب وجودها انحلالاً شديداً وخطيراً في الدم، وتعرض حاملها إلى شكل شديد من النوب الانحلالية، إلاّ أن غالب المرضى لا يظهرون أعراضاً سريرية واضحة الى حين تعرضهم لمحفز انحلالي (تناول الفول أو بعض الأدوية كالأسبرين). ونظراً الى عدم وجود دراسات سابقة تحدد نسبة الطفرات الشائعة في جين *G6PD* بين المرضى السوريين؛ هَدفت هذه الدراسة إلى تقصي وجود الطفرة المتوسطية p.Ser188Phe في جين *G6PD* لدى عينة من المرضى الذكور الذين يعانون من فقر دم انحلالي، وتحديد نسبة تكرارها في المجتمع السوري، باستخدام تقانة PCR-RFLP. بلغ معدل تواتر هذه الطفرة في عينة الدراسة (54 مريضاً) 85.18% اذ وجدت لدى 46 مريضاً، ولم تكشف عند باقي المرضى (الثمانية)، ممّا يشير إلى أن الطفرة المتوسطية p.Ser188Phe شائعة بين مرضى فقر الدم انحلالي في المجتمع السوري.

الكلمات المفتاحية: جين *G6PD*، عوز الأنزيم *G6PD*، الطفرة المتوسطية، فقر دم انحلالي.

* طالب ماجستير – قسم علم الحياة، كلية العلوم ، جامعة دمشق.

** – قسم علم الحياة، كلية العلوم ، جامعة دمشق.

*** – قسم الأطفال – مخبر البحوث والاستشارات الوراثية، كلية الطب، جامعة دمشق.

Investigating Mediterranean (p.Ser188Phe) mutation in *G6PD* gene amongst hemolytic anemia patients

Abdulla Hasan[*] **Ghalia aboualchamat**[**]

Muhammad Ali ajlouny[***]

Abstract

Mediterranean (**p.Ser188Phe**) mutation is the most common mutation amongst G6PD deficiency patients in the Mediterranean region and South Europe. It causes a severe hemolysis and a massive occurrence of hemolytic crisis in blood. Most patients do not show clear clinical symptoms unless they are subjected to a causative agent (*fava bean* or aspirin). Since there were no previous studies verifying the frequency of common mutations in *G6PD* gene amongst Syrian patients. this study aimed to investigate the existence of Mediterranean mutation in the *G6PD* gene amongst male patients suffering from hemolytic anemia, and determine its frequency in Syrian population using PCR-RFLP technology .The frequency of Mediterranean mutation in the sample study (54 patient) was 85.18%; 46 patients were found to exhibit the mutation while the remaining 8 patients did not show the mutation studied. We conclude that the Mediterranean **p.Ser188Phe** mutation is common amongst hemolytic anemia in Syrian population.

Key words: *G6PD* gene, G6PD deficiency, Mediterranean mutation, hemolytic anemia.

[*]MSC., Student, Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

[**] Department of Animal Biology, Faculty of Sciences, Damascus University, Syria.

[***] Pediatric, Department, research and genetic counseling lab, Faculty of medicine.

المقدمة:

تعيش كريات الدم الحمراء عادة مدة 120 - 110 يوماً، وتتحطم بعد ذلك طبيعياً وتزال من قبل الطحال. إلا أن هناك بعض الأمراض التي تسبب تحطم كريات الدم الحمراء بشكل مبكر جداً، اذ يطلق اصطلاحاً على عملية تحطيم كريات الدم الحمراء بانحلال الدم (hemolysis)، ويحدث فقر الدم الانحلالي (Hemolytic anemia) عندما تنحل كريات الدم الحمراء مبكراً قبل أن يتمكن نخاع العظام من إنتاج الخلايا المحطمة [1] وتعويضها ويؤدي أنزيم غلوكوز6 فوسفات ديهيدروجيناز (Glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD) دوراً حاسماً في الحفاظ على سلامة كريات الدم الحمراء والمحافظة على عمرها الافتراضي، وذلك من خلال تحفيز مرحلة مهمة في استقلاب الكرية حيث يخفض من المُكافِئات التي تحافظ على التوازن في عوامل الأكسدة والإرجاع (redox) ضمن السيتوبلاسما، الأمر الذي يحمي الخلية من الجذور الحرة الناتجة عن الأكسجين وبعض المركبات العضوية كالعقاقير وبعض مستقلباتها [2]. يوجد أنزيم G6PD في خلايا الجسم جميعها، وهو ضروري بشكل خاص للحفاظ على الأداء الوظيفي السوي لكريات الدم الحمراء وسلامتها، اذ يعدّ الأنزيم الرئيسي في مسار البنتوز فوسفات، ويُحَول الغلوكوز 6- فوسفات إلى 6- فوسفو غلوكونولاكتون (6-phosphogluconolactone) وينتج عن هذا التفاعل العامل المرجع الأساسي NADPH، ولمّا كانت الكريات الحمراء لا تملك نواة ولا جسيمات كوندرية ولا حتى جسيمات ريبية، فإن هذا المسار يعدّ المصدر الرئيس لتأمين جزيئات الـ NADPH [3]. وتأتي أهمية العامل NADPH من كونه يحمي الخلايا من تراكم الجذور الأوكسجينية عالية التفاعلية (reactive oxygen species) إلى مستويات سامة. ومن ثمّ فإن أنزيم G6PD والـ NADPH يعدّان عاملين مفتاحيين لحماية الكريات الحمراء من الضرر الناتج عن العوامل المؤكسدة وفوق الأكاسيد [4-5].

يرمز لأنزيم G6PD جين (gene) تقع على الذراع الطويلة من الصبغي الجنسي X (6-7). تؤدي الطفرات في تلك الجين إلى عوز في أنزيم G6PD (Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency) وانخفاض في نشاطه الاستقلابي ،ويعدّ هذا العَوز من أكثر الاعتلالات الأنزيمية (enzymopathies) التي تصيب الكريات الحمراء في العالم وواحد من أكثر الاضطرابات الوراثية شيوعاً [4]، اذ يقدر وجود 400 مليون فرد مصابين بعوز في هذا الأنزيم حول العالم [8]، ويلاحظ انتشار هذا المرض بشكل رئيس في منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط وجنوب شرق آسية وكذلك في إفريقية، ويقدر معدل تكرار المرض في البلدان المستوطن فيها مرض الملاريا (الذي يسببه طفيلي البلاسموديوم) بحدود 8.0%، وهذا يكافئ قرابة 220 مليون رجل مصاب، و133 مليون امرأة، أمّا في البلدان الأخرى التي لا يشيع فيها انتشار مرض الملاريا فيقدر معدل تكرار المرض بحدود 5.3%، اذ قدر حسب إحصائية أجريت عام 2010 وجود قرابة 61 مليون رجل مصاب، و35 مليون امرأة [9]. يفسر هذا الأمر بأن وجود الطفرة في الأنزيم تقلل من فعاليته ومن ثمّ تقلل قابلية الطفيلي على الحياة ،نظراً الى تراكم فوق الأكاسيد ضمن الكرية الحمراء[10]. غالباً ما يترافق عوز الأنزيم مع حالة فقر دم انحلالي، اذ تظهر على المريض أعراض اليرقان كالشحوب واصفرار الجلد وبياض العينين، وتحول لون البول إلى اللون الداكن، وكذلك الشعور بالإرهاق وضيق التنفس وازدياد سرعة خفقان القلب[11]. ولكن لحسن الحظ فإن الغالبية العظمى من المرضى لا يظهرون أعراضاً سريرية الى حين تعرضهم إلى عامل محرض للإجهاد التأكسدي كتناول بعض العقاقير أو الاصابة بالانتانات أو تناول الفول [4].

وجد في الجين *G6PD* قرابة الـ 186 طفرة مختلفة على الأقل [12]. يتميّز كل مجتمع بتكرار مجموعة معينة من الطفرات يمكن أن تشكل سمة خاصة لهذا المجتمع [13]، فعلى سبيل المثال: تبيّن أن الطفرة G6PD A$^-$ تمثل تقريباً السبب الوحيد والحصري

لعوز أنزيم G6PD في المجتمع الأفريقي، وتظهر بنسبة 95% من الحالات، في حين تنتشر الطفرة المتوسطية p.Ser188Phe في حوض المتوسط ومنطقة الشرق الأوسط وأجزاء من الهند [14-15]. وقد بينت الدراسات أن 60.4% من حالات عوز الأنزيم في الهند تعود للطفرة المتوسطية [16]. كما أظهرت البحوث أن أكثر الطفرات شيوعاً في المملكة العربية السعودية تعود للطفرة المتوسطية [17-18]. وفي الإمارات العربية المتحدة شكلت الطفرة المتوسطية 55.5% من حالات عوز الأنزيم [19]، في حين بلغت نسبة هذه الطفرة 72.9% في الكويت [20] و65.2% في سلطنة عمان[21]، في حين بلغ معدل تكرار الطفرة المتوسطية في إيران 84.2% بين مرضى عوز الأنزيم[22].

يؤدي وجود الطفرة المتوسطية إلى فقر دم انحلالي حاد، وإلى انخفاض في فعالية الأنزيم إلى مستوى أقل من 10%، وقد تصل في بعض الحالات إلى أقل من 1% [23]. ومع هذا الانخفاض الواضح في الفعالية الأنزيمية فإن المرضى الحاملين لهذه الطفرة لا يظهرون في الغالب أعراضاً سريرية واضحة الى حين تعرضهم إلى محفز انحلالي كتناول الفول أو بعض أنواع العقاقير، مثل (sulfamethoxazole، Niridazole)[24]. فضلاً عن ذلك تبيّن أن الفعالية الأنزيمية قد تشكل معياراً تنبؤياً ضعيفاً في حالات انحلال الدم الحاد ولا تتماشى مع المعطيات السريرية [25]، لذا يلجأ معظم الباحثين في الوقت الحالي إلى اعتماد التشخيص الجزيئي تلافياً لمحدودية الاختبارات الكيميائية الحيوية، ولتقليل نسبة النتائج السلبية الخطأ أو الايجابية الخطأ، التي يمكن أن تنشأ من عدة عوامل كزيادة عدد الشبكيات reticulocytes وعمر الكريات الحمراء ودرجة الحرارة [26]، فضلاً عن ذلك، فإن الاختبارات على المستوى الجزيئي تهدف إلى تحديد الطفرات المسببة لعوز الأنزيم G6PD في كل مجتمع بسبب اختلاف وتيرة هذه الطفرات وتكرارها تكراراً كبيراً بين المجتمعات.

لا توجد حتى الآن، دراسات في سورية تشير الى نسبة تكرار الطفرة المتوسطية بين المرضى السوريين، لذا هدفنا من خلال هذه الدراسة إلى تقصي وجود الطفرة المتوسطية عند المرضى الذين يعانون من فقر دم انحلالي، وتحديد نسبة تكرارها لديهم.

عينة الدراسة وطرائق البحث:

تألفت عينة الدراسة من 54 مريضاً ذكراً من المرضى المراجعين لمشفى الأطفال الجامعي (جامعة دمشق) بين شهري آذار ونيسان 2014، والذين جاؤوا إلى المشفى بأعراض انحلال دم. اذ راوحت أعمارهم بين 2–10 سنوات. أُخِذت موافقة المريض ووليه من أجل مشاركته في الدراسة، وبناءَ عليه سحب وسطياً مقدار 2 مل من الدم من كل مريض في أنبوب يحوي مانع تخثر EDTA لإجراء الدراسة وعزل الـ DNA الجينومي.

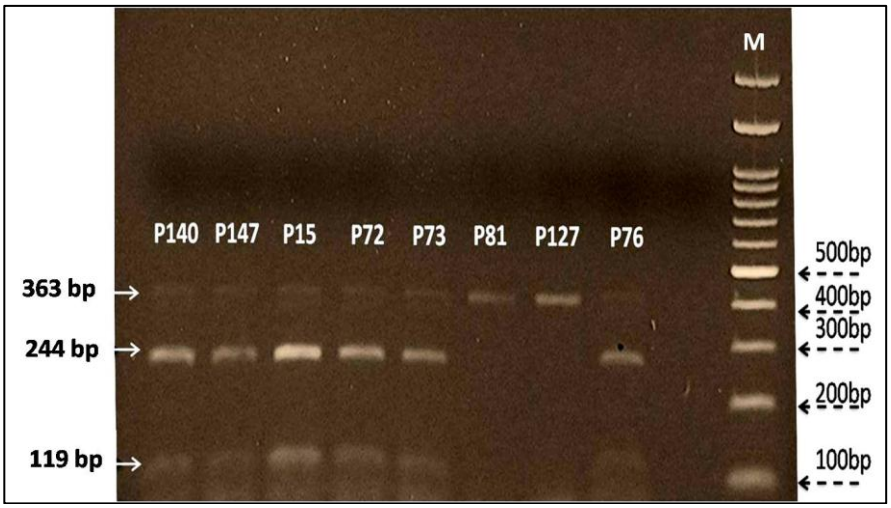
اتبِعَت طريقة الفينول– كلوروفورم في استخلاص الـDNA الجينومي [27]. تقع الطفرة المتوسطية (c.563C > T, p.Ser188Phe) في الاكسون السادس من الجين *G6PD*، استُخدِمَت لأجل تضخيم المنطقة المحيطة بموقع الطفرة بادئات (مشارع، primers) نوعية حسب [18]. احتوى تفاعل الـ PCR (حجم نهائي 20 µl) على قرابة 100 ng DNA جينومي، و200µM dNTPs (GeneDirex)، و5% DMSO (dimethylsulphoxide)، وبادئتين (300 nM) لكلٍ منهما، وأنزيم تاك بوليميراز (GoTaq 5 U/ µl, Promega)، فضلاً عن دارئه الأنزيم (1x). تضمنت كل تجربة شاهداً سلبياً استُبدِل فيه الـ DNA الجينومي الحجم نفسه من الماء المقطر (شاهد خال من الركيزة NTC, non-template control) لمراقبة التلوث. أُجرِي التفاعل في جهاز الـ PCR (Eppendorf Mastercycler). وفق ما يأتي: تسخين أولي بدرجة حرارة °94 مدة 5 دقائق. متبوعاً بـ 35 دورة تألفت من: (15 ثانية تسخين بدرجة حرارة °94، ثم بدرجة حرارة °61 مدة 30 ثانية التصاق البادئات يتلوها 30 ثانية بدرجة حرارة °72 من أجل استطالة البادئات). وكانت الاستطالة النهائية بدرجة

حرارة °72 مدة 7 دقائق. رُحلت نواتج التضخيم على هُلامة الأغاروز 2% وصُورت الهلامة للتوثيق. استُخْدِمَت طريقة تعدد أشكال أطوال الشدف المقيدة (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) لتقصي وجود الطفرة المتوسطية عند المرضى باستخدام أنزيم التقييد (الاقتطاع،restriction enzyme) *MboII* (NEW ENGLAND BioLabs© Inc) اذ أُجري هضم لمنتج تفاعل الـ PCR السابق مع أنزيم التقييد *MboII* وفق تعليمات الشركة المُصَنِعة. رحّلت نواتج الهضم (القطع) على هُلامة أغاروز 1.5% في دارئه 1 X TBE وتحديد الوزن الجزيئي لها، وذلك بمقارنة مكان رحلان شدف الـ DNA الناتجة بمكان رحلان شدف السُلّم الوزني الجزيئي (GeneDirex, 100bp ladder H3 RTU).

أجريت الدراسة في مخبر البحوث والدراسات العليا – قسم البيولوجيا – كلية العلوم – جامعة دمشق

النتائج والمناقشة:

أظهرت نتائج تقصي الطفرة المتوسطية (c.563C > T, p.Ser188Phe) في الجين *G6PD* لدى 54 مريضاً ذكراً ممن يعانون من أعراض انحلال دم نسبة تكرار بلغت 85.18%. اذ وجدت هذه الطفرة لدى 46 مريضاً أمّا المرضى الباقين فلم تشاهد لديهم هذه الطفرة (الشكل1). وقد أظهرت نتائج تحديد تركيز الأنزيم G6PD لدى معظم المرضى التي أُخِذت قيمها من مشفى الأطفال الجامعي (مكان جمع العينات)، انخفاضاً ملحوظاً في التركيز. اذ بلغ متوسط تركيز الأنزيم لدى المرضى (45.2± 2.6) وحدة/ل $*10^9$ كرية حمراء، في حين تعدّ القيم الطبيعية لتركيز الأنزيم (131±13) وحدة/ل $*10^9$ كرية حمراء وفق الكيت المستخدمة في مخبر مشفى الاطفال (Randox)، ممّا يؤكد أن هؤلاء المرضى لديهم حالة عوز في الأنزيم G6PD.



الشكل (1) صورة الرحلان الكهربائي على هُلامة الأغاروز 1.5% لنواتج هضم منتجات الـPCR لعينة مؤلفة من8 مرضى (تدل P على المريض ورقمه) باستخدام أنزيم التقييد MboII. يبدو بوضوح بالمقارنة بسلّم الأوزان الجزيئية (M) أن المريض رقم 81 والمريض رقم 127 لا يحملان الطفرة المتوسطية المدروسة في الجين *G6PD*، أمّا باقي المرضى فلديهم الطفرة. ففي الحالة السوية (عدم وجود طفرة) يوجد للأنزيم MboII موقع تقييد طبيعي في شدفة الـ PCR المدروسة (390bp)، ومن ثمّ يكون ناتج قطع الشدفة المذكورة شدفتين اثنتين (363 bp و27 bp). أمّا في حال وجود الطفرة فتنتج ثلاث شدف (,119 bp ,244 bp، 27 bp) (ترحل الشدفة 27bp بسرعة كبيرة ضمن الهلام ،لذا من الصعوبة تمييزها على هُلامة الأغاروز 1.5 %)

يُعدّ مرض عوز الأنزيم G6PD من الأمراض الوراثية المتنحية المرتبطة بالصبغي الجنسي X، لذلك فإنه يلاحظ أكثر بين المرضى من الذكور[11]. تتوافق نتيجة هذه الدراسة مع عدد من الدراسات العالمية، اذ تُعدّ الطفرة المتوسطية من أكثر أنماط الطفرات شيوعاً في جين *G6PD*، فالدراسات التي أجريت في بلدانٍ عدة حول البحر الأبيض المتوسط كاسبانيا، ومصر، واليونان وكذلك في السعودية، والبحرين، والعراق، والكويت، وتركيا، وباكستان وإيران تؤكد أن هذه الطفرة شائعة لدى مرضى

عوز الأنزيم *G6PD* [28]. غير أن نسب تكرار هذه الطفرة تختلف اختلافاً كبيراً بين المجتمعات، فعلى سبيل المثال بيّنت نتائج الدراسة التي أجريت في العراق وشملت 61 مريضاً ذكراً بأن 46 منهم يحملون الطفرة المتوسطية بنسبة تكرار (% 75.41)، وأن مريضاً واحداً منهم فقط يحمل الطفرة G6PD-Chatham أي بنسبة (% 1.64) وآخر يحمل الطفرة $G6PDA^-$ بنسبة (% 1.64) في حين لم تظهر أي من الطفرات السابقة عند المرضى الباقين (13 مريضاً) [29]. وفي السعودية تبيّن أن الطفرة المتوسطية هي الأكثر تكراراً اذ بلغت نسبة تكرارها (89.1%) مقارنة بباقي الطفرات المدروسة التي كانت نسب تكرارها أقل من 1% [18]. وكذلك في البحرين حيث أظهرت نتائج المؤمن وزملائه (2004) أن الغالبية العظمى (91%) من مرضى عوز الأنزيم G6PD لديهم الطفرة المتوسطية، وأن قرابة الـ 9% من المرضى لديهم طفرات متنوعة أخرى في الجين *G6PD* [29]. ممّا يدل على أن الطفرة المتوسطية تمثل الطفرة الأكثر تواتراً لدى مرضى عوز الأنزيم G6PD من بقية الطفرات المعروفة في الجين. أمّا في دراسة عثمان وزملائه (2014) التي أجريت في مصر، فقد بلغت نسبة تكرار الطفرة المتوسطية 94.7% مع وجود ارتباط معنوي واضح بين حالة عوز الأنزيم ووجود الطفرة [31]. وفي دراسة Molou في اليونان (2014) التي أجريت لأجل تقصي وجود الطفرة المتوسطية لدى الأطفال حديثي الولادة المصابين بعوز الأنزيم G6PD وربط وجود تلك الطفرة بفعالية الأنزيم تبيّن أن نسبة 50% من هؤلاء الأطفال يحملون الطفرة المتوسطية [32].

لم تُلاحظ الطفرة المتوسطية في دراستنا هذه لدى ثمانية مرضى فقط من أصل 54 مريضاً مدروساً، نظراً الى أن تركيز الأنزيم كان منخفضاً عند هؤلاء المرضى أيضاً فمن المحتمل أنهم يحملون طفرات في الجين *G6PD* غير الطفرة المتوسطية المدروسة سببت حالة عوز الأنزيم لديهم وأدّت إلى انحلال الدم.

تُعد هذه الدراسة الأولى في سورية التي تجرى على المستوى الجزيئي ،وتحدد نسبة تواتر الطفرة المتوسطية p.Ser188Phe في الجين *G6PD*، ومع أن عينة الدراسة صغيرة (إلى حد ما) إلا أن النتائج التي حصلنا عليها تعتبر مؤشراً أولياً يدل على مدى انتشار هذه الطفرة في المجتمع السوري، ومن ثمّ لا بدّ من إجراء المزيد من الدراسات والبحوث لمعرفة نسب انتشار باقي الطفرات في الجين *G6PD* وتحديدها، ولاسيّما أن نتائج مسح الطفرات ضمن المجتمع يعدّ أداة مهمة في التأسيس إلى قاعدة بيانات جزيئية تدلّ على نسب انتشار الطفرات وأنماطها.

المراجع References:

1. Gallagher PG. (2011) Hemolytic anemias: red cell membrane and metabolic defects In: Goldman L, Schafer AI, eds. Cecil Medicine. 24th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; chap 164.
2. Rosalind E. Howes,Katherine E. Battle, Ari W. Satyagraha, J. Kevin Baird, Simon I. Hay (2013) G6PD Deficiency: Global Distribution, Genetic Variants and Primaquine Therapy. Advances in Parasitology, Vol 81; chap 4.
3. Prchal JT, Gregg XT (2005) Red Cell Enzymes.Hematol, 1: 19-23
4. Beutler E (1994) G6PD deficiency. Blood, 84(11): 3613-36
5. Mason PJ. (1996) New Insights into G6PD Deficiency. Br J Haematol;94:585-91
6. Martini G., Toniolo D., Vulliamy T., Luzzatto L., Dono, R., Viglietto, G., Paonessa, G., D'Urso, M., Persico, M.G.(1986) Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. EMBO J. 5, 1849–1855.
7. Persico, M.G., Viglietto, G., Martini, G., Toniolo, D., Paonessa, G., Moscatelli, C., Dono, R., Vulliamy, T., Luzzatto, L., D'Urso, M. (1986). Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. Nucleic Acids Res. 14, 2511–2522
8. Bushra Moiz (2013) A review of G6PD deficiency in Pakistani perspective. J Pak Med Assoc Vol. 63, No.4
9. Howes, R.E., Piel, F.B., Patil, A.P., Nyangiri, O.A., Gething, P.W., Hogg, M.M., Battle, K.E., Padilla, C.D., Baird, J.K., Hay, S.I. (2012) G6PD deficiency prevalence and estimates of affected populations in malaria endemic countries: a geostatistical model-based map. PLoS Med.. 9, e1001339.
10. Verelli B., Tishkoff S., A. Stone, and J. Touchman, (2006) Contrasting histories of g6pd molecular evolution and malarial resistance in humans and chimpanzees," Mol. Biol. Evol., vol. 23, pp. 1592-1601
11. Cappellini, M.D., Fiorelli, G., 2008. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Lancet 371, 64–74.
12. Minucci, A., Moradkhani, K., Hwang, M.J., Zuppi, C., Giardina, B., Capoluongo, E.(2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase

(G6PD) mutations database: review of the "old" and update of the new mutations. Blood Cells Mol. Dis. 48, 154–165.
13. Beutler E, Vulliamy T, Luzzatto L. (1996) Hematologically Important Mutations: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase. Blood Cells, Molecules, and Diseases;22:49-56
14. Al-Ali AK, Al-Mustafa ZH, Al-Madan M, et al.(2002) Molecular Characterization of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency in the Eastern Province of Saudi Arabia. Clin Chem Lab Med;40:814-6
15. Mohammad Reza Mahdavi, Mehrnoush Kosaryan1, Payam Roshan,Hosein Karami and Hossein Jalali (2013) Prevalence of Three Common Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Gene Mutations in Neonates in Province of Mazandaran, North of Iran, 2012. Int J Hum Genet, 13(3): 139-143.
16. Sukumar S ,Mukherjee MB, Colah RB and Mohanty D. (2004) Molecular basis of G6PD deficiency in India. Blood Cells Mol Dis; 33(2): 141-5.
17. Gari MA, Chaudhary AG, Al-Qahtani MH, Abuzenadah AM, Waseem A,Banni H, Al-Sayes FM, Al-Harbi A, Lary S (2010) Frequency of Mediterranean mutation among a group of Saudi G6PD patients in Western region-Jeddah. Int J Lab Hematol, 32:17-21.
18. Al-Jaouni1 Soad, Jummanah Jarullah, Essam Azhar and Kamran Moradkhani. (2011) Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Jeddah, Kingdom of Saudi ArabiaBMC Research Notes, 4:436.
19. Bayoumi RA, Nur-E-Kamal MS, Tadayyon M, Mohamed KK, Mahboob BH,Qureshi MM, Lakhani MS, Awaad MO, Kaeda J, Vulliamy TJ, Luzzatto L. (1996) Molecular characterization of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Al-Ain District, United Arab Emirates. Hum Hered, 46(3):136-141.
20. Samilchuk E, Al-Suliman I, Usanga E, Al Awadi S.(2003) Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations and UDP-glucuronosyltransferase promoter polymorphism among G6PD deficient Kuwaitis. Blood Cells Mol Dis 31(2):201-205.

21. Vulliamy TJ S, Kaeda J, Mason PJ, Luzzatto L (1996) Molecular characterization of G6PD deficiency in Oman. Hum Hered, 46(3):172-176.
22. Alireza Nakhaee, Saeedeh Salimi, Azita Zadehvakili, Soroush Dabiri,Mehrangiz Noora,Mahnaz Rezaei,Ebrahim Miri-Moghaddam (2012) The Prevalence of Mediterranean Mutation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) in Zahedan Zahedan J Res Med Sci; 14(3): 39-43
23. Mason PJ, Bautista JM, Gilsanz F. (2007) G6PD deficiency: the genotype-phenotype association. Blood Rev;21(5): 267-283.
24. Beutler, E., (1991) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. N. Engl. J. Med. 324, 169–174.
25. Anna pietrapertosa, antonio palma, daniela campanale, grazia delios, angelantonio vitucci, nunzia tannoia (2001) Genotype and phenotype correlation in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency haematologica; 86:30-35.
26. Dehghanifard Ali, Yousef Mortazavi, Najmaldin Saki, Majid Farshdusti-Hagh (2012) Molecular Aspects of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Iran. Zahedan J Res Med Sci ; 14(7): 1-7.
27. Loparev V.N., M.A. Cartas, C.E. Monken, A. Velpandi, A. Srinivasan. (1991) An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. Journal of Virological Methods 34,: 1105–112
28. Kurdi-Haidar B, Mason PJ, Berrebi A, Ankra-Badu G, al-Ali A, Oppenheim A, Luzzatto L. (1990) Origin and spread of the glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD-Mediterranean) in the Middle East. Am J Hum Genet, 47(6):1013-1019.
29. Muna A. Kashmoola Adil A. Eissa Dahlia T. Al-Takay Nasir A. S. Al-Allawi . (2015) Molecular Characterization of G6PD Deficient Variants in Nineveh Province, Northwestern Iraq Indian J Hematol Blood Transfus 31(1):133–136.
30. Nabeel Al Momen Sheikha S Al Arrayed Ahmed Al Alawi A. (2004) Molecular Homogeneity of G6PD Deficiency Bahrain Medical Bulletin,. 26,. 4,

31. Osman H.G., F.m. zahran, a.m.a. El-sokkary, a. El-said, a.m. sabry. (2014) Identification of Mediterranean mutation in Egyptian favism patients. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 18: 2821-2827.
32. Molou Elina, Kleopatra H. Schulpis, Georgia Thodi, Vassiliki Georgiou, Yannis Dotsikas, Konstantinos Papadopoulos, Sofia Biti, and Yannis L. Loukas. (2014) Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) deficiency in Greek newborns: The Mediterranean C563T mutation screening. Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation. 74, 3 , 259-263