------مجلة علوم الرافدين، المجلد 24، العدد 3، ص28-38، 2013------

تحديد التباين الوراثي للجين GALT لدى الأطفال حديثي الولادة في محافظة نينوى

أويس موفق الحسني
قسم علوم الحياة
كلية العلوم
جامعة الموصل
E-mail:aowasyes@yahoo.com

عقيل حسين العاصي
قسم علوم الحياة
كلية العلوم
جامعة تكريت

سعد غانم صالح
قسم علوم الحياة
كلية العلوم
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 11/ 12 /2012 ؛ تاريخ القبول 28 /1 / 2013)

الملخص

ينتشر العراق العديد من الأمراض غير المشخصة والتي لم يتم إحصاؤها ومن هذه الأمراض ما هو مرتبط بالغذاء وخاصة ما هو في فئة الأطفال ومن هذه الأمراض هو الكلاكتوسيميا. تم جمع عينات الدم من الأطفال الراقدين في مستشفيات الأطفال (ابن الأثير والخنساء) في مدينة الموصل بالاعتماد على العلامات السريرية للمرض وتم فصل مصل الدم ومن ثم قياس مستوى الإنزيم galactose-1-phosphate uridyltransferase وقياس تركيز galactose-1-phosphate باستخدام تقنية الـ ELISA وتم تحليل الـ DNA للعينات باستخدام تقنية الـ PCR.

بينت نتائج الدراسة انخفاض مستوى الانزيم galactose-1-phoephate uridyl transferase في مصل دم الأطفال المرضى المصابين بالكلاكتوسيميا (0.45 ± 21.7) بيكوغرام/مل وكذلك في مصل دم الحاملين للإصابة (1.44 ± 79.8) بيكوغرام/مل مقارنة مع مستوى الانزيم GALT في الأصحاء (0.93 ± 160.33) بيكوغرام\مل. في حين كان مستوى الإنزيم لدى الأمهات (1.92 ± 20.5) بيكوغرام/مل. وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية انخفاضا معنويا في مستوى كل من البيتا كاروتين وحامض الاسكوربيك والسلينيوم مقارنة بمستوياتها لدى الأصحاء، اما بالنسبة للـ الفا-توكوفيرول فلم تختلف نسبته معنويا مع الأصحاء. ولم تظهر نتائج الدراسة أي تغاير وراثي للمنطقة الأولى للجين التي تتكون الاكسون الأول إلى الاكسون الخامس في الأطفال المصابين بالكلاكتوسيميا في حين بينت النتائج بان ثلاثة عشر عينة لها تغايرا وراثيا في المنطقة الثانية للجين التي تتكون من الاكسون السادس الى الاكسون التاسع، إضافة إلى ذلك لم تظهر النتائج وجود تغاير وراثي في المنطقة الثالثة

للجين التي تتكون من الاكسون العاشر والحادي عشر. ويقترح إجراء تحليل للمنطقة الثانية من الجين GALT وتحديد الطفرات المسؤولة عن الإصابة في العينات التي شملتها الدراسة.

الكلمات الدالة: الكلاكتوسيميا، الجين GALT، الأطفال حديثي الولادة، التغاير الوراثي.

Determination of the Genetic Variability of GALT Gene for Newborns with Galactosemia in Nineveh Province

Owayes M. Alhassani
Department of Biology
College of Science
University of Mosul

Akeel H. Alassie
Department of Biology
College of Science
University of Tikrit

Saad G. Saleh
Department of Biology
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

There are many diseases in Iraq that have never been counted or examined, including diseases related to food, which has deteriorated in recent years, and has rapid and direct impact especially on the children category, one of these diseases is galactosemia. Blood samples were collected from babies admitted to the children's hospitals in Mosul City (Ibn alatheer and Alkhansa´) depending on the clinical symptoms of disease and then serum was taken and DNA has been extracted. Measuring the concentration of Galactose-1-Phosphate uridyltransferase GALT enzyme activity, galactose -1- phosphate by ELISA technique was done and DNA samples were analyzed by the polymerase chain reaction (PCR).

The results showed decrease in the GALT enzyme level in babies with galactosemia (21.7 ± 0.45 pg\ml) and in non-diagnosed children (79.8 ± 1.44 pg\ml) as compared with its level in healthy babies (160.33 ± 0.93 pg\ml), and the level of enzyme in mother at (20.5 ± 1.92 pg\ml). The results also, showed decrease in β-carotene, ascorbic acid and selenium levels in babies with galactosemia compared with healthy babies and no change in α-tocopherol level in the cases studied.

The results, did not show any genetic variation in the first region that consists from the first to the fifth exon of GALT gene. While, the results showed that thirteen cases have genetic variation in the second region that consisting from sixth to ninth exon. In addition, the results did not show the presence of genetic variation in the third region, which consists of the tenth and eleventh of GALT gene.

Keywords: Galactosemia, GALT Gene, Newborn, Mutation.

المقدمة

تعتبر الكلاكتوسيميا من الاضطرابات الوراثية المتنحية المتعلقة بأيض الكلاكتوز، إذ يفقد الشخص المصاب القدرة على تحويل الكلاكتوز الى كلوكوز واستخدامه في تحرير الطاقة، وهذا المرض يتسبب عن غياب او نقص في أي أنزيم ضمن مسار Lelior pathway وبذلك لا يكتمل أيض الكلاكتوز ويحدث تراكم لعدد من النواتج الايضية المتكونة في أيض الكلاكتوز مثل الكلاكتيتول والكلاكتوز-1- فوسفات في خلايا الدم الحمر وبذلك فان جزيئة الفوسفات لاتتحرر من الكلاكتوز (Charlwood *et al*., 1998, Quimby *et al*., 1996 and Milánkovics 2010)، وتوجد ثلاثة أنواع من الكلاكتوسيميا بالاعتماد على النقص الأنزيمي:

النوع الأول GALK deficiency (galactosemia type 2)

النوع الثاني GALT deficiency (classic galactosemia)

النوع الثالث GALE deficiency galactosemia

الإصابة بالنوع الأول والثالث تكون عادة بدون أعراض سريرية أي ليس لها أي تأثير، أما النوع الثاني من الكلاكتوسيميا فله أعراض مميزة وواضحة وتهاجم بشكل مفاجئ، وان الإصابة بهذا النوع تكون ناتجة عن عدد من الطفرات التي تصيب الجين GALT مثل الطفرات N314D and Q188R (Elsas *et al*., 1994; Won *et al*., 1994 ; Quimby *et al*., 1996) وأشارت الدراسات ان هنالك ما يقارب 60 طفرة تصيب الجين GALT والمتسببة عن نقص في الأنزيم GALT وان نسبة الإصابة بالكلاكتوسيميا الكلاسيكي هي 1 لكل 10000 طفل (Cuthbert *et al*., 2008). ويولد الأطفال المصابين بالكلاكتوسيميا عادة بصورة طبيعية وان الأعراض السريرية للكلاكتوسيميا تظهر بعد تناول المصابين الغذاء الحاوي على الكلاكتوز ومن ثم يحدث تراكم للـ Gal-1-p والكلاكتيتول في خلايا الدم الحمر والأنسجة (Freer *et al*., 2010 ; Cuthbert *et al*., 2008)، وتتضمن الأعراض البدائية التي تظهر بعد الأسبوع الثاني من الولادة سوء التغذية والإسهال والتقيؤ واليرقان وإذا استمر الطفل بتناول الكلاكتوز يحدث ضعف النمو وبطء النطق وتضخم الكبد وفشل كلوي واعتلال العين والعوق العقلي ومن ثم الوفاة اذا استمر الطفل المصاب بدون علاج، وان الجين Galactose-1-phosphate uridyltransferase gene الذي يرمز له GALT gene يشفر المعلومات لتصنيع الانزيم Galactose-1-phosphate uridyltransferase الذي يساهم في اكمال المسار الايضي للكلاكتوز المتواجد بكميات قليلة في الأغذية. ويوجد الجين GALT في الكروموسوم التاسع في الذراع القصير ضمن الحزمة 13 وله 11 اكسون وبصورة ادق بين التسلسل 34,640,573 bp – 34,636,634 الذي يشفر 379 حامض اميني للبروتين (Leslie *et al*., 1992; Min *et al*., 2010 ; Milánkovics 2010).

تهدف الدراسة إلى إمكانية تشخيص الإصابة بالكلاكتوسيميا سريريا والتحري عن وجود التغاير الوراثي للجين GALT المسؤول عن المرض في المجتمع العراقي

المواد وطرائق العمل

شملت الدراسة (45) طفلاً من كلا الجنسين بأعمار تراوحت (2-10) أشهر من المراجعين الى مستشفيات الأطفال في مدينة الموصل (مستشفى الخنساء التعليمي ومستشفى ابن الأثير) في فترة زمنية تراوحت من شهر شباط الى شهر تشرين الثاني من عام 2011، وتم الاعتماد على الحالات السريرية للمرض في اختيار العينات، كما شملت الدراسة (25) طفلاً عدوا مجموعة سيطرة ضمن نفس الفئة العمرية، فضلا عن شمول (21) أماً ضمن فئة عمرية (20-35) سنة. وتم فصل مصل الدم وعزل DNA لإجراء الاختبارات.

تم قياس مستوى الانزيم المشفر من قبل الجين GALT بالاعتماد على تقنية الـ ELISA باستخدام عدة تحليل مجهزة من شركة ABO Swetzirland Co.. كما تم قياس مستوى البيتا كاروتين بالاعتماد على طريقة (Needl and Pearson, 1963) وقياس مستوى فيتامين E حسب (Varley, 1967) ومستوى فيتامين C حسب (Stanly *et al*., 1979) ومستوى السلينيوم بالاعتماد على طريقة (Snell, 1981).

كما تم الكشف عن وجود التغاير الوراثي للجين GALT من خلال تقسيم الجين GALT الى ثلاث مناطق بالاعتماد على طول الاكسونات للجين وحسب طريقة (Calderon *et al*., 2007) وكما مدون ادناه:

المنطقة الأولى: حجم ناتج تفاعل الـ PCR لهذه المنطقة هو 1539 bp وحسب تسلسلا البادئ:

GALT1-5F AGG GTT CAC AGC TGT TCT GAG
GALT1-5R TGA CCA CAC CCT GTG GAA ACA

المنطقة الثانية: حجم ناتج تفاعل الـ PCR لهذه المنطقة هو 1127 bp وحسب تسلسلا البادئ:

GALT6-9F TCT GTT TCC ACA GGG TGT GGT C
GALT6-9R TGA GGT TGC AGT TCA CTA GGC TG

المنطقة الثالثة : حجم ناتج تفاعل الـ PCR لهذه المنطقة هو 1524 bp وحسب تسلسلا البادئ:

GALT10-11F AGA TAC CTG GTT GGG TTT GGG AGT
GALT10-11R AGC CTC AGC CAC AAC CAA GAC

إذ تم إضافة 500 نانوغرام من الدنا القالب مع 0.2 mM من البادئ المجهز من شركة Biolaps ومزج الخليط مع محتويات الـ Pre mix and Mastermix ثم أدخلت أنابيب التفاعل الى جهاز المبلمر الحراري Thermocycler لإجراء التفاعل التضاعفي وباستخدام البرنامج الخاص للتفاعل وكما يأتي:

- دورة واحدة لمدة (10) دقائق على درجة حرارة (94) ° م للمسخ الأولي لشريط الدنا

- دورة التضاعف الأولى (15) دورة تتضمن:

(30) ثانية على درجة حرارة (95) °م لمسخ الشريط المزدوج و (30) ثانية بدرجة حرارة (62) °م لارتبـاط البادئ بالدنا القالب و (1.5) دقيقة بدرجة حرارة (72) °م لاستطالة البادئ.

- دورة التضاعف الثانية (25) دورة تتضمن:

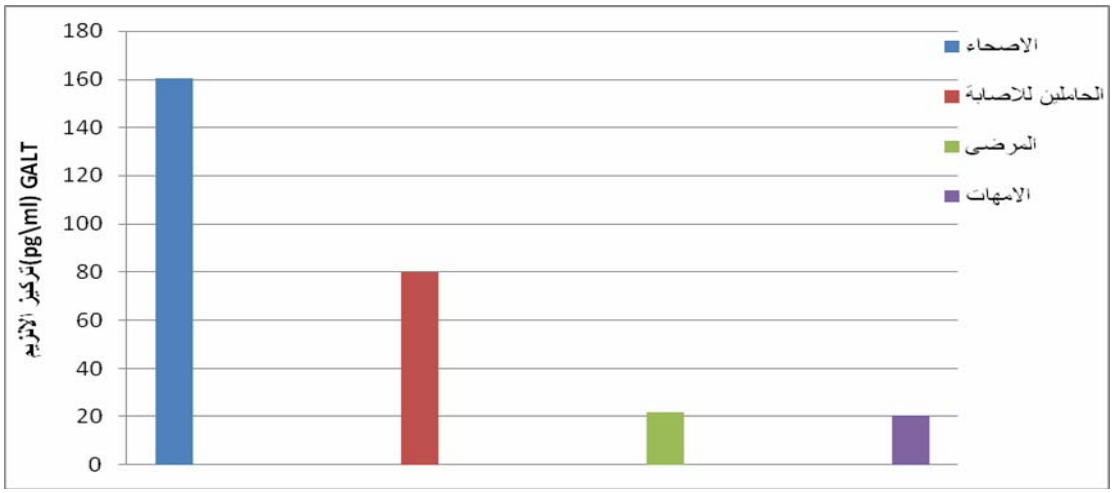
(30) ثانية على درجة حرارة (95) °م لمسخ الشريط المزدوج و (30) ثانية بدرجة حرارة (59.5) °م لارتباط البادئ بالدنا القالب و (1.5) دقيقة بدرجة حرارة (72) °م لاستطالة البادئ.

وكانت الدورة الأخيرة (7) دقائق وعلى درجة حرارة (72) °م لاستكمال مرحلة الاستطالة بعد ذلك تم ترحيـل ناتج تفاعل الـ PCR باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي (50 فولت ولمدة 75 دقيقة) بتركيـز الكـاروز 2% (Calderon *et al*., 2007).

النتائج و المناقشة

مستوى الانزيم GALT في مصل الدم.

يوضح الشكل (1) مستوى الانزيم GALT في مصل دم العينات التي شملتها الدراسة، اذ أظهرت النتائج وجود انخفاض معنوي ($p \leq 0.05$) في مستوى الأنزيم GALT في مصل دم الأطفال المرضى المصابين بالكلاكتوسيميا (0.45 ± 21.7) بيكوغرام/مل وكذلك في مصل دم الحاملين للإصابة (1.44 ± 79.8) بيكوغرام/مل مقارنة مع مستوى الأنزيم GALT في الأصحاء (0.93 ± 160.33) بيكوغرام/مل. في حين كان مستوى الأنزيم لدى الأمهات (1.92 ± 20.5) بيكوغرام/مل.



الشكل 1: مستوى الانزيم GALT (بيكوغرام / مل) في مصل دم العينات التي شملتها الدراسة

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة سابقة (Barbouth *et al*., 2006)، إذ أشارت إلى انخفاض مستوى الانزيم GALT في مرضى الكلاكتوسيميا مقارنة مع الأصحاء وان السبب الرئيس لانخفاض مستوى الانزيم هو الطفرات التي تصيب الجين GALT ومنها N314D and Q188R وبالتالي تؤثر على فعالية الأنزيم GALT (Elsas *et al*., 1995). وقد عزي سبب الانخفاض في مستوى الانزيم GALT في هذه الدراسة إلى إصابة الجين المسؤول بالطفرة N314D التي تعد المسؤولة عن الإصابة بالكلاكتوسيميا في محافظة نينوى، بالإضافة الى التغاير الوراثي للمنطقة الثانية من الجين التي تشمل اكسونات الجين GALT من الاكسون السادس الى الاكسون التاسع وكما سيتم توضيحها لاحقا. في حين أن الانخفاض في مستوى الأنزيم لدى الأمهات لم يصاحبه أعراض الإصابة بالكلاكتوسيميا ولم يترافق مع الإصابة بالطفرات في الجين GALT.

مستوى الفيتامينات المضادة للأكسدة في مصل الدم.

الجدول 1: يوضح مستوى الفيتامينات المضادة للأكسدة في مصل دم العينات التي شملتها الدراسة

المتغيرات	N	الأصحاء	N	المصابين
بيتا- كاروتين (مايكروغرام/ مل)	25	3.63 ± 1.21	17	1.811 ± 0.382
الفا- توكوفيرول (ملغم / لتر)	25	6.45 ± 2	17	6.12 ± 2.88
حامض الاسكوربيك (ملغم / 100 مل)	25	2.77 ± 1.05	17	1.487 ± 0.596
السلينيوم (µg/ml)	25	104.54 ± 2.6	17	94.3 ± 2.8

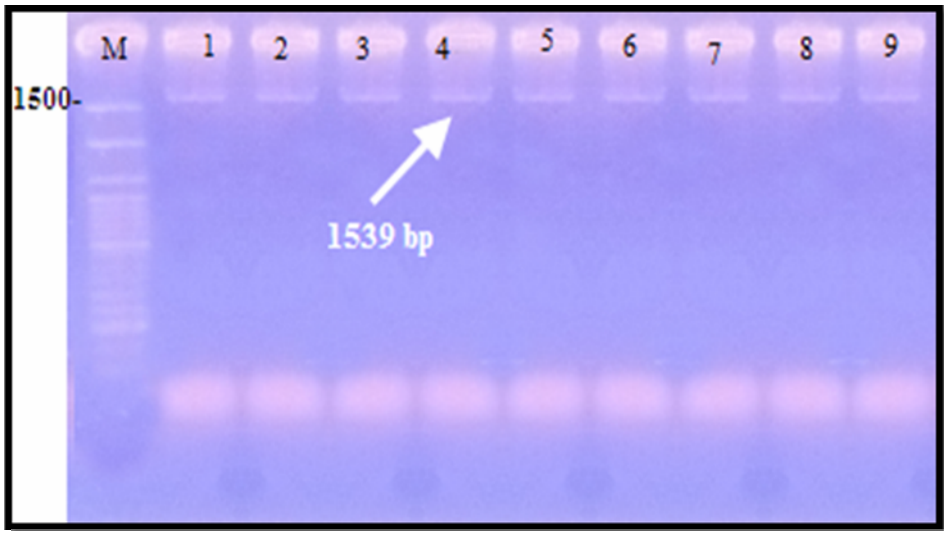
كما أظهرت نتائج الدراسة الحالية كما مبين في الجدول ذي الرقم (1) انخفاضا معنويا في مستوى كل من البيتا كاروتين وحامض الاسكوربيك والسلينيوم مقارنة بمستوياتها لدى الأصحاء. أما بالنسبة للـ الفا-توكوفيرول فلم تختلف نسبته معنويا مع الأصحاء، ويعزى سبب هذا الانخفاض في المتغيرات السابقة إلى تأثير الحمية الغذائية التي يعتمد عليها الأطفال المصابين بالكلاكتوسيميا مقارنة بما يتناوله الأطفال الأصحاء من حليب الرضاعة الطبيعي الذي يعد وجبة غذائية متكاملة بالنسبة للأطفال الرضع او الحليب الحاوي على اللاكتوز إذ تؤدي التغذية دورا مهما في النمو الطبيعي والنضج، غير ان هذا الغذاء الذي يتناوله مرضى الكلاكتوسيميا هو فقط لتمكينهم من تجاوز المرحلة التي يحتاج فيها الطفل للحليب في الغذاء لذلك فان بعض الأطفال يتعرضون لمشاكل في النمو وخصوصا في هذه المرحلة من العمر.

وتتفق هذه الدراسة مع دراسة سابقة (El-bassyouni *et al*., 2006)، بينت انخفاض مستوى البيتا كاروتين والكالسيوم والسيلينيوم لدى مرضى الكلاكتوسيميا المعتمدين في غذائهم على الحليب الطبي الخالي من اللاكتوز، وفي دراسة أخرى (Kowluru *et al*., 2000 ; Kamie *et al*., 1987)، أظهرت نتائجها انخفاضاً في مستوى الجهد التاكسدي عند اعطاء الاطفال البيتا كاروتين والسيلينيوم مع الغذاء وتقوم هذه المواد المضادة للأكسدة بدور مهم في التقليل من العمليات الايضية غير الطبيعية في جسم الطفل المريض.

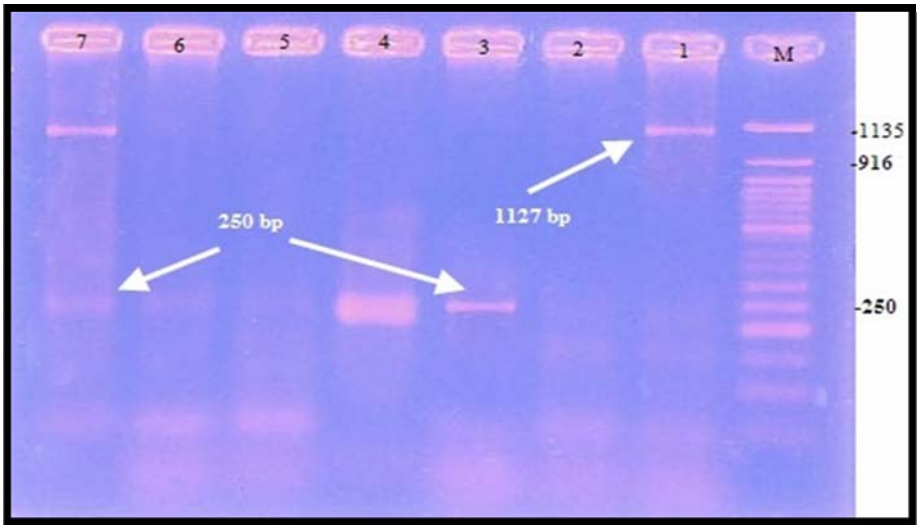
وقد ذكر (Kowluru *et al*., 2001) ان السلينيوم والبيتا كاروتين تمنع من زيادة الجهد التاكسدي في شبكية العين لدى مرضى الكلاكتوسيميا، لذلك فإن إضافة مضادات الأكسدة مثل الفا تيكوفيرول وحامض الاسكوربيك والبيتا كاروتين والسيلينيوم ضمن المدى المعقول تعد علاجا مساعدا لمنع اعتلال العين. ومما سبق يتضح أن المعالجة الاعتيادية لمرضى الكلاكتوسيميا تؤدى إلى عدم انتظام النمو بشكل طبيعي، بالإضافة إلى زيادة الجهد التاكسدي ويقترح إضافة بعض مضادات الأكسدة بالإضافة إلى عدد من المعادن لمساعدة المرضى على النمو بشكل طبيعي وتقليل الضرر الحاصل بالأنسجة والأعضاء.

التغاير الوراثي للجين GALT

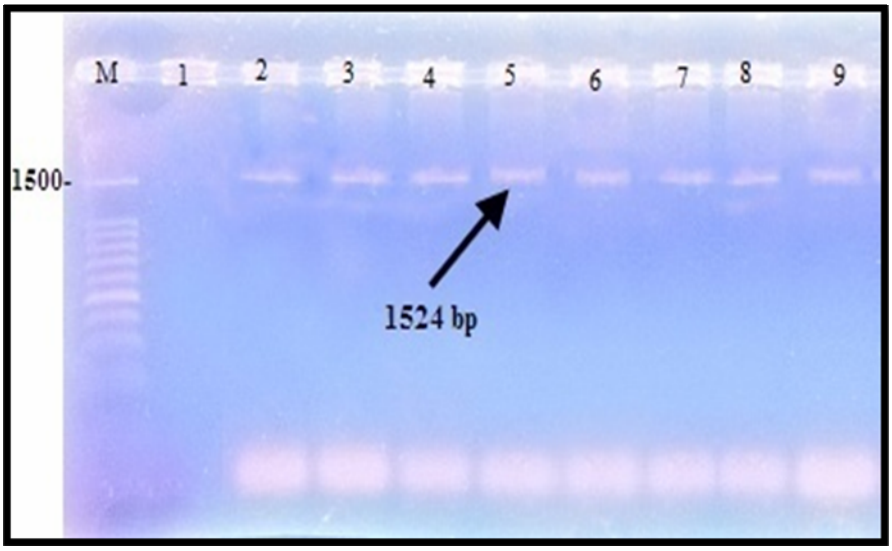
لم تظهر نتائج الدراسة أي تغاير وراثي في المنطقة الأولى للجين التي تتكون من 1539 bp بادئة من الاكسون الأول إلى الاكسون الخامس في الأطفال المصابين بالكلاكتوسيميا مقارنة بالأصحاء كما موضح في الصورة (1) في حين بينت النتائج بان ثلاثة عشر عينة لها تغاير وراثي في المنطقة الثانية للجين التي تتكون من 1127 bp التي تقع بين الاكسون السادس إلى الاكسون التاسع اذ أظهرت حزمتين الأولى بطول 1127 bp والثانية بطول 250 bp وكما مبين في الصورة (2)، إضافة إلى ذلك لم تظهر النتائج وجود تغاير وراثي في المنطقة الثالثة للجين المتكونة من 1524 bp التي تتكون من الاكسون العاشر والحادي عشر وكما موضح في الصورة (3).



الصورة 1: تمثل المنطقة الأولى للجين GALT ، M يمثل الدليل الحجمي والعينات (1-9) تمثل الأطفال المصابين والأصحاء اذ يظهر لديهم الحجم الطبيعي لهذه المنطقة حيث يكون ناتج تفاعل الـ PCR بحجم 1539 bp.



الصورة 2: تمثل المنطقة الثانية للجين GALT , M يمثل الدليل الحجمي (1) تمثل الحجم الطبيعي لهذه المنطقة بطول 1127 bp والعينات (3 و 4 و 7) تمثل التغاير الوراثي لهذه المنطقة بطول 250 bp .



الصورة 3: تمثل المنطقة الثالثة للجين GALT, M الدليل الحجمي والعينات (1-9) لديهم الحجم الطبيعي لهذه المنطقة اذ يكون ناتج تفاعل الـ PCR بحجم 1524 bp.

يتبين من النتائج السابقة بان المنطقة الأولى للجين التي تشمل الاكسون الأول إلى الخامس كانت سالمة ولم يحدث فيها أي تغاير وراثي وفقا للبادئات المستخدمة، اذ ان الحزم لجميع العينات سواء كانت عينات مصابة او أصحاء كانت ضمن الحجم الطبيعي (1539 bp)، بينما المنطقة الثانية من الجين والتي تتضمن الاكسونات السادس الى التاسع فيتبين من الصورة (2) هنالك تغاير وراثي في هذه المنطقة، فالحجم الطبيعي لها هو (1127 bp) مع وجود حزم أخرى وبحجم مختلف هو (250 bp)، عند تحديد مستوى الانزيم GALT بينت النتائج بان 25 عينة تمتلك مستوى انزيم منخفض ومن تحليل الطفرات فان 8 عينات فقط كانت مصابة بالطفرات التي أثرت على مستوى الانزيم، لكن بينت النتائج بان 3 عينات لها تغاير وراثي في المنطقة الثانية من الجين ولها مستوى انزيم (25±2.3 بيكوغرام /مل)، وعند الرجوع الى الصورة (3) والتي تمثل المنطقة الثالثة للجين والمتكونة من الاكسون العاشر والحادي عشر فلم تظهر أي تباين وراثي اذ ان الحزمة الناتجة لجميع العينات كان حجمها هو الحجم الطبيعي للقطعة (1524 bp).

وان الطفرات التي شملتها الدراسة كان لها مواقع مختلفة ولم تشمل كل الاكسونات التي يتكون منها الجين لذلك يتطلب تحديد تسلسلات الجين كاملة ليتم تحديد الطفرات الجديدة التي تصيب الجين GALT لمرضى الكلاكتوسيميا في المجتمع العراقي. وقد بين (Ko *et al.*, 2010) في دراسته التي أجراها على مرضى الكلاكتوسيميا في كوريا بان 18 مريضاً لهم تغاير وراثي في الجين GALT وبمواقع مختلفة أدت جميعها إلى خفض فعالية الأنزيم GALT.

المصادر

Barbouth, D.; Slepak, T.; Klapper, H.; Lai, K.; Elsas, L. (2006). Prevention of a molecular misdiagnosis in galactosemia. *Genetics in Medicine.* **8**(3),178-182.

Calderon, F.; Nelson, L.; Dobrowolski, P.; Sinitsyna, I.; Phansalkar, A.; Longo, N.; Pasquali, M. ; Mao, R. (2007). Combination of enzyme analysis, allele-specific PCR and sequencing to detect mutations in the GALT gene. *JIMD Short Report* 084 Online.

Charlwood, J.; Clayton, P.; Keir, G.; Mian, N. ; Winchester, B. (1998). Defective galactosylation of serum transferrin in galactosemia. *Glycobiology.* **8**(4), 351–357.

Cuthbert, C.; Klapper, H. ; Elsas, L. (2008). Diagnoses of Inherited Disorders of Galactose metabolism. *Current Protocols in Human Genetics.* Unit 17, 1-29.

El-bassyouni, H.; Ashour, A.; Ezzat, A.; Bassiouni, R. ; Fateen, E. (2006). The Effect of Diet on Antioxidant Status in Patients With Galactosemia. *J. Med. Sci.* **6**(3), 452-457.

Elsas, L.; Dembure, P.; Langley, S.; Paulk, E.; Hjelm, L. ; Fridovich-Keil, J. (1994). A Common Mutation Associated with the Duarte Galactosemia Allele. *Am. J. Hum. Genet.* **54**,1030-1036.

Elsas, L.; Langley, S.; Steele, E.; Evinger, J.; Fridovich-Keil, J.; Brown, A.; Singh, R.; Fernhoff, P.; Hjelm, L. ; Dembure, P. (1995). Galactosemia: a strategy to identify new biochemical phenotypes and molecular genotypes. *Am. J. Hum. Genet.* **56**, 630-639.

Freer, D.; Ficicioglu, C. ; Finegold, D. (2010). Newborn Screening for Galactosemia:A Review of 5 Years of Data and Audit of a Revised Reporting Approach. *Clini. Chem*. **56**(3), 437–444.

Kamei, A.; Hisada, T. ; Iwata, S. (1987). The Evolution of Therapeutic Efficacy of Hachimi-jio-gan (traditional Chinese medicine) to Rat Galactosemic Cataract. *J. Occul. Pharmacol*. **3**, 239-248.

Ko, D.; Chang, H.; Song, S.; Park, K.; Kim, J.; Kim, M.; Song, Y.; Hong, Y.; Lee, D. ; Song, J. (2010). Molecular and biochemical characterization of the GALT gene in Korean patients with galactose-1-phosphate uridyltransferase deficiency. *Clini. Chem. Acta.* **411** (2010) 1506–1510.

Kowluru, R.; Engerman, R.; Kern, T. (2000). Diabetes Induced Metabolic Abnormalities in Myocardium: Effect of Antioxidant Therapy. *Free Radical. Res*, **32**, 67-74.

Kowluru, R.; Tang, J.; Kern, T. (2001). Abnormalities of Retinal Metabolism in Diabetes and Experimental Galactosemia. Effect of Long term Administration of Antioxidant on the Development of Retinopathy. *Diabetes*, **50**, 1938-1942

Leslie, N.; Immerman, E.; Flach, J.; Florez, M.; Friedovich-Keil, J. ; Elsas, L. (1992). The human galactose-1-phosphate uridyltransferase gene. *Genomics,* **14**, 474-480.

Milánkovics, I. (2010). Molecular and clinical analysis of patients with classical galactosaemia, galactokinase deficiency and biotinidase deficiency. Ph.D. Thesis. Semmelweis University.

Min, L.; Zhenghong, S.; Kyoung-Ho, K.; Xuecheng, Z.; Ming, Z. ; Binlun, Y. (2010). Cloning and analysis of the galactose-1-phosphate uridylyltransferase (galt) gene of

Gracilariopsis lemaneiformis (Rhodophyta) and correlation between gene expression and agar synthesis. *J. Appl. Phycol*. **22**,157–164.

Neeld, J. ; Person, W. (1963). Methods of biochemical analysis. *J. Nut.* **15**, 18.

Quimby, B.; Wells, L.; Wilkinson, K.; Fridovich-Keil, J. (1996). Functional Requirements of the Active Site Position 185 in the Human Enzyme Galactose-1-phosphate Uridylyltransferase. *J. Biol. Chem*. **271**(43), 26835–26842.

Snell, F. (1981). "Photometric and Flurometric Methods Of Analysis Non-metas". John Willy and Sons, New York. pp.482-517.

Stanley, T.; David, T.; Howerds, S. (1979). Select method for the determination of ascorbic acid in Animal cells, tissues and fluids. *Method in Enzymology*, **62.** Vitamine and coenzyme part D.

Varly, H. (1967). "Practical clinical biochemistry". 4th ed. The White Friars Press Ltd. 82p.

Won, G.; Yan-Kang, X.; Francine, R.; Kaufman, N.; Donnell, J.; Wolff- Richard, J.; Allen, S.; Koritala – Juergen, K. ; Reichard, V. (1994). Biochemical and molecular studies of 132 patients with galactosemia. *Hum. Genet*. **94**, 359-363.