● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیستم، شمارهٔ ۶ ص ۵۵۴-۵۴۶، ۱۳۹۲

مقالهٔ پژوهشی

بررسی جهش‌های ژن VSX1 در مبتلایان به کراتوکونوس استان چهارمحال و بختیاری

فاطمه آزادگان دهکردی[۱]، احمد راشکی[۲]، نادر باقری[۳]، مینو هاشم‌زاده چالشتری[۴]، عزت‌الله معمارزاده[۵]، علی صالحی[۵]، هومن قطره[۵]، ثریا حیدری[۱]، نسرین یزدان‌پناهی[۶]، زهرا راشکی قلعه‌نو[۷]، امین میرزاییان[۸]، مرتضی هاشم‌زاده چالشتری[۹*]

خلاصه

مقدمه: کراتوکونوس (KC) اختلالی است که در آن قرنیه برآمده و نازک می‌شود و دچار تغییر شکل می‌شود. با وجود مطالعات گسترده، پروسه‌های پاتوفیزیولوژی و اتیولوژی ژنتیک کراتوکونوس ناشناخته می‌باشد. شیوع بیماری حدود ۱ در ۲۰۰۰ می‌باشد و شایع‌ترین علت پیوند قرنیه در آمریکا است. ژن‌های زیادی را در این بیماری دخیل می‌دانند اما شواهدی مبنی بر نقش بیشتر ژن VSX1 در اتیولوژی KC وجود دارد. این مطالعه با هدف تعیین فراوانی جهش‌های اگزون‌های ۲ و ۴ ژن VSX1 در استان چهار محال و بختیاری انجام شد.

روش: در این مطالعه توصیفی جهش‌های احتمالی در دو اگزون ۲ و ۴ ژن VSX1 در ۵۰ فرد مبتلا به کراتوکونوس بررسی شد. DNA با روش استاندارد فنل کلروفرم استخراج شد و با روش PCR-SSCP/HA (Polymerase chain reaction- single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis) و Sequencing جهش‌های این ژن غربالگری و تأیید گردید.

یافته‌ها: تنها در یک مورد از بیماران دارای جهش H244R در اگزون ۴، ژن VSX1 مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: مطالعه ما نشان داد که جهش‌های ژن سهم بسیار ناچیزی در بیماری کراتوکونوس در بیماران استان چهارمحال و بختیاری دارد و شاید اهمیت بالینی قابل توجهی در این ناحیه نداشته باشد. تحقیقات بیشتر نقش این ژن و رابطه آن را با کراتوکونوس روشن‌تر می‌کند و اطلاعات ضروری را برای پیشگیری و مدیریت اختلالات بینایی این ژن فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: کراتوکونوس، ژن VSX1، جهش

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی – مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد ۲- استادیار، گروه فیزیوپاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه زابل ۳- دانشجوی دکترای ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران ۴- دانشجوی پزشکی عمومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ۵- استادیار، گروه چشم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد ۶- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان ۷- استادیار، گروه میکروب‌شناسی و انگل‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل ۸- کارشناس علوم آزمایشگاهی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد ۹- استاد ژنتیک، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد

* **نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک:** Mchalesh@yahoo.com.

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۲/۵ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۹۲/۲/۲۹ **پذیرش مقاله:** ۱۳۹۲/۳/۸

مقدمه

کراتوکونوس اختلالی است که در آن قرنیه برآمده و نازک می شود و دچار تغییر شکل می‌گردد. بروز این بیماری اغلب در سنین نوجوانی همراه با میوپیای پیشرونده و آستیگماتیسم است و به طور معمول در دهه سوم یا چهارم زندگی رخ می‌دهد. در موارد پیشرفته بیماری، اسکار قرنیه سبب کاهش بیشتر وضوح بینایی می‌شود. علایم، بسته به مرحله بیماری متفاوت می‌باشند (۲،۱). شیوع بیماری ۱ در ۲۰۰۰ نفر می‌باشد و شایع‌ترین علت پیوند قرنیه در آمریکا است (۴، ۳). با وجود مطالعات گسترده، پاتوفیزیولوژی و اتیولوژی ژنتیکی کراتوکونوس ناشناخته می‌باشد. در ایران کراتوکونوس ۳۴/۵ درصد موارد پیوند قرنیه را شامل می‌شود (۵). شواهدی مبنی بر نقش ژن VSX1 (واقع بر 20p11.2، MIM 605020) در اتیولوژی کراتوکونوس وجود دارد. در ایران اطلاعات آماری دقیقی راجع به شیوع کراتوکونوس موجود نمی‌باشد اما استنباط می‌شود که به علت ارتباط آن با ورم ملتحمه بهاره، شیوع بالایی دارد. این بیماری در مردان شایع‌تر است (۶، ۵).

کراتوکونوس از این جنبه که در ابتدای جوانی فرد را مبتلا می‌سازد از دیگر بیماری‌های چشمی متمایز می‌باشد، در سنینی که زمان یادگیری و کار است و منجر به کاهش کیفیت زندگی فرد می‌شود (۴). الگوی توارثی کراتوکونوس به طور عمده به صورت وراثت اتوزومی غالب مشاهده شده است، هر چند الگوی اتوزومی مغلوب کراتوکونوس نیز گزارش شده است (۱). همچنین وراثت مولتی فاکتوریال آن نیز مشاهده شده است (۷). ژن VSX1 دارای ۵ اگزون است که همه آن‌ها کدکننده پروتئین هستند، اما جهش‌های گزارش‌شده در دو اگزون ۲ و ۴ بیشتر گزارش شده است (۴) و احتمال این که آن‌ها با بیماری کراتوکونوس همراهی داشته باشند بیشتر است (۸، ۴).

دو تغییر توالی (L159M و G160D) در ارتباط با کراتوکونوس و دیستروفی قرنیه PPCD (Posterior polymorphous corneal dystrophy) در ژن VSX1 شناخته شده است (۹). در مطالعه‌ای نقش ژن VSX1 را در ۸۰ فرد مبتلا به کراتوکونوس ایتالیایی بررسی نمودند. آن‌ها سه تغییر شناسایی‌شده در بررسی‌های قبلی را یافتند و یک جهش جدید در ۷ بیمار از ۸۰ بیمار مبتلا به کراتوکونوس پیدا کردند. بنابراین محققین بر این باور هستند که ژن VSX1 دارای نقش مهمی در بیماران مبتلا به کراتوکونوس با الگوی توارثی غالب می‌باشد (۱۰). در مطالعه‌ای دیگر نقش ژن VSX1 در ۲۴۹ بیمار بررسی شد و دو جهش جدید N151S (۵/۳ درصد) و G160V (۰/۴ درصد) در اگزون ۲ این ژن شناسایی. محققین این مطالعه اظهار کردند که جهش‌های این ژن می‌تواند در ایجاد کراتوکونوس نقش داشته باشد (۱۱). در مطالعه‌ای که در خانواده‌های یهودیان اشکنازی انجام گرفت، یک جهش Missense (D144E) در ژن VSX1 گزارش شد که این امر نقش بیماری‌زایی این ژن را حمایت می‌کند (۱۲). همچنین طی مطالعه‌ای که در ایران بر روی ژن VSX1 انجام گرفت دو Single SNPs (g. 24993423T > G nucleotide polymorphism و g.24993117 C> و دو Missense (R166W و H244R) که پیش از این در اگزون ۴ این ژن گزارش شده بود، یافته شد (۴).

در مطالعه‌ای که در کره انجام گرفت دو تغییر نوکلئوتیدی N151S و G160 V در اگزون ۲ و دو تغییر L176L و A182A در اگزون ۳ و تغییر G239G در اگزون ۴ در ژن VSX1 مشاهده شد (۸).

شناسایی لوکوس‌ها و ژن‌های درگیر منجر به شناخت مکانیسم‌های ایجاد بیماری و مدیریت بهتر آن، از نظر پیشگیری و درمان، می‌گردد. با توجه به شیوع بالای این بیماری در کشور و بر اساس تجارب بالینی متخصصین چشم‌پزشک (مذاکرات شفاهی با تعدادی از چشم پزشکان استان) به نظر می‌رسد این بیماری در استان چهار محال و

بختیاری از شیوع به نسبت بالایی برخوردار باشد. به همین دلیل بررسی ژنتیکی این بیماری و شناسایی لوکوس‌ها و ژن‌های دخیل در آن، اسباب پیشگیری مؤثرتری را فراهم می‌نماید و سبب شناخته شدن احتمالی اتیولوژی و مکانیسم‌های درگیر در بیماری کراتوکونوس خواهد شد.

روش بررسی

نمونه های خون از افراد مبتلا به کراتوکونوس با کمک پزشک معالج از کلینیک چشم‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد جمع‌آوری گردید. نمونه‌های خون از ۵۰ فرد مبتلا به کراتوکونوس، پس از کسب رضایت نامه از افراد مبتلا و یا والدین آن‌ها و تکمیل پرسشنامه مربوط به اطلاعات بالینی و دموگرافیک، گرفته شد. از هر فرد بیمار کراتوکونوسی به میزان ۵ میلی‌لیتر خون با روش نمونه‌گیری آسان جهت انجام آزمایشات ژنتیکی در لوله‌های حاوی EDTA ۰/۵ مولار جمع‌آوری شد. سپس DNA خون بیماران به روش معمول فنل و کلروفرم استخراج گردید (۱۳). پس از آن با استفاده از توالی ژن *VSX1* و نرم‌افزار Primer نسخه ۳ (۱۳) که به صورت online می‌باشد پرایمرهای Forward (F) و Reverse (R) برای اگزون‌های ۴ و ۲ این ژن طراحی گردید. این پرایمرها کل اگزون‌های ۲ و ۴ و حتی قسمتی از ناحیه اینترونی آن‌ها را شامل می‌شود. به دلیل این که محصول PCR (Polymerase chain reaction) مربوط به اگزون ۴ بزرگ می‌باشد و حداکثر بازدهی در روش PCR-SSCP (Polymerase chain reaction- single-strand conformation polymorphism) داشتن محصولاتی با اندازه ۱۵۰ تا ۳۵۰ جفت باز می‌باشد، برای این اگزون دو جفت پرایمر طراحی شد (۱۴).

از طرفی نمونه‌های شاهد مثبت برای اگزون‌های ۲ و ۴ با استفاده از روش Site-directed mutagenesis پرایمرهای دارای جهش خودساخته تهیه شد و محصول PCR مربوطه به عنوان شاهد مثبت در کنار نمونه بیماران در ژل پلی‌اکریل‌آمید استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱. *پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه*

توالی پرایمر (5´→3´)	نوع پرایمر	اندازه قطعه	نام جفت پرایمر
ATAGAGGGGATATGATCACC	F	۲۰۸	V2
ATAAACCTTGGGCTGTGTC	R		
ATAGAGGGGATATGAGCACC	FM*		
TACTGCGTTGAATGCCCGT	F	۲۴۱	V4/1
TGAAACCAGACCTGGTTGG	R		
TACTGCGTTGAATGACCGT	FM*		
TGTGTGCCTTCTGCTTCTCC	F	۲۶۳	V4/2
CACCTCCTACAACACCTCGA	R		
TGTGTGCCTTCTGCTCCTCC	FM*		

F: توالی پرایمر جلوبرنده، R: توالی پرایمر معکوس و *FM: توالی پرایمر جلوبرنده جهش‌دارشده

هر میکروتیوپ PCR حاوی ۱ میکرولیتر از هر یک از دو پرایمر F و R با غلظت ppm ۵۰، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم Taq پلی‌مراز (۵ واحد در میکرولیتر)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط دزوکسی نوکلئوتید تری فسفات با غلظت ۱۰ میلی‌مول، ۲ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی‌مول) و ۳ میکرولیتر از DNA (۱۰۰ نانوگرم) که با آب مقطر به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسید. تکثیر DNA طی ۳۰ تا ۳۵ سیکل، با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (ASTEC, PC818-Japan) انجام شد. در هر سیکل حرارتی از حرارت ۹۶ درجه سانتی‌گراد جهت

واسرشته شدن رشته های DNA، ۵۸-۵۲ درجه سانتی گراد جهت اتصال پرایمرها به DNA هدف و ۷۲ درجه سانتی گراد جهت ساخت رشته‌های مکمل استفاده شد

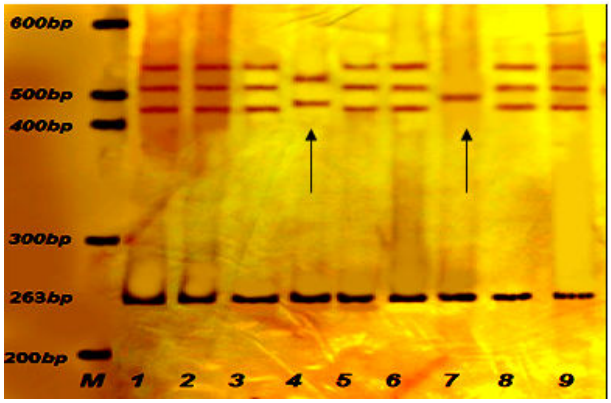
استفاده از تکنیک SSCP بر این اساس استوار است که DNA تک رشته ای با توجه به ترکیب بازی می تواند حالت ها و آرایش های فضایی متعددی بگیرد. بنابراین اگر در DNA طبیعی جهشی رخ داده باشد منجر به تغییر Conformation تک رشته‌ای آن می‌شود که بر اساس تفاوت حرکت آن روی ژل پلی‌اکریل آمید جدا می گردد (۱۶، ۱۵، ۱۳). سپس با استفاده از روش PCR-SSCP/HA که شامل SSCP محصولات PCR و HA (Hetero duplex analysis) به طور همزمان است، جهش های احتمالی مورد بررسی قرار گرفتند.

برای این منظور، بعد از تکثیر قطعات مورد نظر توسط روش PCR، نمونه های مورد نظر بر روی ژل پلی‌اکریل آمید ۸ درصد (Merk Germany)، با جریان ۵۰ میلی‌آمپر به مدت ۱ ساعت الکتروفورز شدند و سپس با نیترات نقره رنگ آمیزی و باندها رؤیت شدند. ابتدا جهت SSCP محصولات PCR از هر نمونه محصول PCR ۸ میکرولیتر برداشته شد و با ۶ میکرولیتر SSCP Dye مخلوط شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۶ درجه سانتی گراد حرارت داده شد تا دو رشته DNA به طور کامل از هم جدا شوند. سپس نمونه ها بلافاصله روی یخ قرار گرفتند تا از تشکیل مجدد DNA دو رشته‌ای ممانعت شود. از طرفی ۲/۲ میکرولیتر محصول PCR از هر نمونه با ۳/۲ میکرولیتر EDTA (۰/۵ مولار) مخلوط شد و در دستگاه ترموسایکلر به حرارت ۹۶ درجه سانتی گراد رسانده شد. سپس ۵ دقیقه در این حرارت نگهداری شد و طی ۶۰ سیکل ۳۰ ثانیه‌ایی حرارت به ۳۷ درجه سانتی گراد رسانده شد (۱۷، ۱۳).

محصولات PCR آماده‌شده برای SSCP هر نمونه با محصولات PCR آماده شد. برای هترودوپلکس همان نمونه مخلوط شد و در ژل پلی‌اکریل آمید بارگیری شد. بعد از پایان الکتروفورز، ژل پلی‌اکریل آمید با نیترات نقره رنگ‌آمیزی و باندهای DNA بر روی آن رؤیت شد و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در نهایت نمونه مشکوک به داشتن جهش VSX1 که دارای الگوی متفاوت بر روی ژل پلی‌اکریل آمید بود، توسط روش تعیین توالی DNA مورد تأیید قرار گرفت.

نتایج

بعد از تکثیر قطعات DNA مورد نظر با استفاده از PCR و انجام روش SSCP/HA بر روی این ۵۰ نمونه بیمار، ۱ مورد مشکوک در اگزون ۴ مشاهده شد. این مورد مشکوک مربوط به نمونه‌ایی بود که بر روی ژل، الگوی باندهای متفاوتی نسبت به بقیه نمونه‌ها داشت اما باندهای مربوط به بقیه اگزون‌ها هیچ گونه تغییری را نشان ندادند (شکل ۱).



شکل ۱. *واکنش SSCP و هترودوپلکس اگزون ۴/۲ ژن VSX1*

همان‌گونه که مشاهده می‌شود تغییری در SSCP نمونه ستون ۷ یافت شد و شاهد مثبت هم با باند متفاوت در ستون ۴ نشان داده شده است. بقیه نمونه‌ها در ستون‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۶، ۸، ۹ بدون تغییر بود. M هم مارکر است

تأیید نتایج با استفاده از روش تعیین توالی

نمونه‌هایی که در واکنش SSCP/HA دارای تغییر بودند در حجم ۵۰ میکرولیتر تکثیر نمودند و بعد از بردن بر روی ژل پلی‌آکریل آمید و اطمینان از قوی و بدون باند اضافی بودن برای تعیین توالی به کشور کره فرستاده شدند. شکل ۲ مربوط به واکنش تعیین توالی است که وجود یک جهش

Missense در کدون ۲۴۴ (اگزون ۴) ژن VSX1 و در حدود ۲ درصد از بیماران را نشان می‌دهد. در این شکل جایگزینی باز A با باز G تأیید شد.

شکل ۲. *شکل بالا توالی طبیعی و شکل پایین توالی دارای جهش H244R را نشان می‌دهد*

قسمتی از توالی مربوط به اگزون ۴/۲ است که هم A و هم G حضور دارد.

بحث

کراتوکونوس بیماری غیر التهابی و پیشرونده قرنیه با شیوع ۱ در ۲۰۰۰ و شایع‌ترین علت پیوند قرنیه می‌باشد (۱۸). در ایران نیز در دو بررسی کراتوکونوس به عنوان شایع‌ترین علت عمل پیوند قرنیه گزارش گردید (۵). این بیماری در سنین نوجوانی رخ می‌دهد و از علایم بارز آن آستیگماتیسم و میوپیای پیشرفته می‌باشد. این بیماری به‌طور معمول به صورت ایزوله و در برخی موارد همراه با بیماری‌هایی از جمله سندرم‌های Ehlers-Danlos، Marfan، Apert، Noonan و Down به‌صورت سندرمیک و در موارد نادر دیگر همراه دیستروفی‌های چشمی رخ می‌دهد. لازم به ذکر است که الگوی توارثی این بیماری متغیر است و در ۲۳/۵-۶ درصد موارد انتقال فامیلی با الگوی توارثی غالب (بیش از ۹۰ درصد موارد) (۱۹، ۹) و کاهش نفوذ مشاهده می‌گردد (۱۶). به علاوه الگوهای وراثتی نیز گزارش شده‌اند. الگوی توارثی مغلوب آن نیز در یک خانواده پاکستانی مشاهده شده است (۲۰).

مطالعه حاضر با هدف تعیین نوع و درصد جهش‌های احتمالی اگزون‌های۲ و ۴ ژن VSX1 در ۵۰ بیمار مبتلا به کراتوکونوس با استفاده از روش PCR-SSCP/HA انجام شد. این روش، روشی ساده، ارزان و حساس با دقت ۸۰ تا ۸۵ درصد می‌باشد (۱۶). در این تحقیق یک مورد جهش H244R (۲ درصد) در اگزون ۴ این ژن یافته شد. این یک جهش بدمعنی در منطقه کدکننده می‌باشد که اسید آمینه هیستدین را به آرژنین تبدیل می‌نماید و با تغییر پروتیئنی که ایجاد می‌کنند شاید در بیماری‌زایی نقش دارد. جهش‌های ژن VSX1 در ۴/۷ درصد (۹) و ۸/۷۵ درصد (۱۰) از بیماران مبتلا به کراتوکونوس غیر خویشاوند گزارش شده‌اند هر چندگروه‌های دیگر تغییرات بیماری‌زا را در توالی ژن VSX1 که باعث بیماری کراتوکونوس شوند، نیافته‌اند (۲۲، ۲۱، ۷). همان گونه که بر اساس دو مطالعه انجام‌شده (۱۰، ۹) بیان گردید، در توالی ژن VSX1 چندین جهش مشاهده شده است (p.L17P، p.D144Ep.L159M، p.G160D، p.R166W، p.H244R و p.P247R) که برخی از آن‌ها باعث تغییر پروتئین می‌شوند و ممکن است در بیماری‌زایی کراتوکونوس دخیل باشند. مطالعات بعدی نیز درگیری ژن VSX1 را در کراتوکونوس تک‌گیر و فامیلی و بیماری‌زایی PPCD را آشکار کردند (۷،۲۰،۲۲،۲۳). طی مطالعه‌ای دیگر واریانت‌هایی که در ۴ بیمار شناسایی شدند، دو جهش (Leu159Met و Arg166Trp) داشتند که در نمونه‌های شاهد شناسایی نشد. این جهش‌ها در بیماری‌زایی مطرح بودند، در حالی که دو جهش دیگر (Asp144Glu و His244Arg) در خویشاوندان سالم افراد مبتلا نیز مشاهده شده است. بنابراین بر اساس این مطالعه این جهش‌ها به تنهایی به عنوان عوامل بیماری‌زا

مطرح نمی‌شوند (۲۷-۲۴، ۱۷). نتایج یک مطالعه نشان داده است که جهش‌های VSX1 با بدشکلی‌های برآمدگی قرنیه همراهی دارد (۲۳). همچنین گزارش‌های دیگری بیان داشته‌اند که ژن VSX1 در بیماری‌زایی قرنیه درگیر است و جهش‌های بیان‌شده‌ای که در ایجاد کراتوکونوس یا PPCD نقش دارند p.D144E، p.H244R و p.P247R هستند، هر چند که در افراد غیر مبتلا نیز گزارش شده‌اند (۲۲، ۹).

اگر چه شواهد بحث‌برانگیزی برای برخی از جهش‌ها مانند p.D144E، p.L159M، p.G160D و p.H244R وجود دارد، اما نمی‌توان آن گونه که برخی نویسندگان بیان داشته‌اند نقش ژن VSX1 را در بیماری‌زایی کراتوکونوس نادیده گرفت (۲۵).

تاکنون جهش‌های گزارش‌شده در ژن VSX1 از قبیل p.H244R، p.G160D، p.D144E، P247R، p.L159M و p.R166W در گروه‌های نژادی مختلفی گزارش شده‌اند اما یک نقش بیماری‌زایی تعریف‌شده‌ای برای آن‌ها ثابت نشده است (۲۲).

علت این موارد را می‌توان با توجه به مطالعات انجام‌شده عوامل زیادی دانست؛ از جمله این که در اتیولوژی بیماری علاوه بر عوامل ژنتیکی، عوامل محیطی نیز دخیل هستند. این عوامل شامل استفاده از لنز تماسی، مالیدن چشم، آتوپی و ورم ملتهمه بهاره، شغل فرد و حتی فصول خاصی از سال می‌باشند که در نحوه انتقال بیماری و وفور آن در جمیعت‌های مختلف دخالت دارند. شاید به علت پیچیدگی این بیماری این جهش‌ها در ژن VSX1 در انواع مختلف کراتوکونوس دارای اثرات متفاوتی باشند. برخی اوقات این عوامل منجر به پدیده‌هایی مانند تجمع خانوادگی (Familial aggregation) می‌گردد. تجمع خانوادگی بیماری، حاکی از تأثیر ژنتیک است.

اگر چه شیوع کراتوکونوس در هر دو جنس یکسان گزارش شده است ولی در مطالعه‌ای که توسط جوادی و همکاران صورت گرفت، در ایران تعداد مردان مبتلا به کراتوکونوس بیشتر از زنان بود. در مطالعه‌ی ما نیز اینگونه بود و تعداد مردان مبتلا بیشتر از زنان بود که البته این اختلاف می‌تواند به علت: نیاز بیشتر به دید بهتر از لحاظ شغلی، بی‌میلی زنان برای اعمال جراحی به دلایل اجتماعی یا فرهنگی و یا ظهور زودتر بیماری و پیشرفت سریع‌تر آن در مردان باشد (۶،۲۷)

نتیجه‌گیری

با توجه به این که بیماری کراتوکونوس هتروژن است و ژن‌های زیادی در ایجاد این بیماری دخیل هستند پس به این ترتیب تحقیقات زیادی نیز در این رابطه صورت نگرفته است. با این وجود با توجه به نتایج مطالعه حاضر و مطالعاتی که در نقاط مختلف جهان صورت گرفته است، بیانگر آن است که جهش‌ها و تغییرات ژن VSX1 در قومیت‌ها و شدت‌های مختلف بیماری کراتوکونوس دارای اثرات متنوعی می‌باشد. حال ممکن است به همین دلیل تغییرات مزبور نقش بارزی در ایجاد کراتوکونوس در ایران و در این استان نداشته باشند و دارای نقش کم رنگی در ایجاد این بیماری باشند. با این حال لازم است مطالعات بیشتری بر روی اقوام و جمعیت‌های مختلف ایرانی از نظر میزان پراکندگی جهش‌های این ژن و ارتباط آن‌ها با کراتوکونوس و حتی شدت این بیماری انجام شوند تا اطلاعات مورد نیاز جهت پیشگیری و مدیریت کراتوکونوس وابسته به این ژن تأمین گردد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از پرسنل محترم آزمایشگاه‌های پاستور و مهر و کلیه بیماران و والدین آنها که صمیمانه ما را در اجرای این مطالعه یاری

رساندند و همچنین از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد جهت تأمین بودجه این طرح با شماره ۱۱۰۹ و از کلیه کارکنان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی شهرکرد کمال تشکر و قدردانی را داریم.

References

1. De BP, Laborante A, Pizzicoli C, Stallone R, Barbano R, Longo C, et al. Mutational screening of VSX1, SPARC, SOD1, LOX, and TIMP3 in keratoconus. *Mol Vis* 2011; 17: 2482-94.
2. Rabinowitz YS. Intacs for keratoconus. *Curr Opin Ophthalmol* 2007; 18(4): 279-83.
3. Dong L, Rabinowitz YS, Wistow GJ. Compositions and methods for detecting keratoconus [Patent No: US 11/689,998]. 2007.
4. Saee-Rad S, Hashemi H, Miraftab M, Noori-Daloii MR, Chaleshtori MH, Raoofian R, et al. Mutation analysis of VSX1 and SOD1 in Iranian patients with keratoconus. *Mol Vis* 2011; 17: 3128-36.
5. Dehkordi F.A, Rashki A, Bagheri N, Chaleshtori M.H, Memarzadeh E, Salehi A, et al. Study of VSX1 mutations in patients with Keratoconus in Southwest Iran using PCR-Single-Strand conformation polymorphism/heteroduplex analysis and sequencing method. *J Acta Cytologica* 2013; 57(6): 290-5.
6. Javadi MA, Feizi S, Yazdani S, Sharifi A, Sajjadi H. Outcomes of augmented relaxing incisions for postpenetrating keratoplasty astigmatism in keratoconus. *Cornea* 2009; 28(3): 280-4.
7. Liskova P, Ebenezer ND, Hysi PG, Gwilliam R, El-Ashry MF, Moodaley LC, et al. Molecular analysis of the VSX1 gene in familial keratoconus. *Mol Vis* 2007; 13: 1887-91.
8. Mok JW, Baek SJ, Joo CK. VSX1 gene variants are associated with keratoconus in unrelated Korean patients. *J Hum Genet* 2008; 53(9): 842-9.
9. Heon E, Greenberg A, Kopp KK, Rootman D ,Vincent AL, Billingsley G, et al. VSX1: a gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus. *Hum Mol Genet* 2002; 11(9): 1029-36.
10. Bisceglia L, Ciaschetti M, De BP, Campo PA, Pizzicoli C, Scala C, et al. VSX1 mutational analysis in a series of Italian patients affected by keratoconus: detection of a novel mutation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(1): 39-45.
11. Salabert D, Cochener B, Mage F, Colin J. Keratoconus and familial topographic corneal anomalies. *J Fr Ophtalmol* 1994; 17(11): 646-56. [In French].
12. Udar N, Atilano SR, Brown DJ, Holguin B, Small K, Nesburn AB, et al. SOD1: a candidate gene for keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(8): 3345-51.
13. Wang Y, Rabinowitz YS, Rotter JI, Yang H. Genetic epidemiological study of keratoconus: evidence for major gene determination. *Am J Med Genet* 2000; 93(5): 403-9.
14. Hayashi K, Yandell DW. How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 1993; 2(5): 338-46.

15. Humphries SE, Gudnason V, Whittall R, Day IN. Single-strand conformation polymorphism analysis with high throughput modifications, and its use in mutation detection in familial hypercholesterolemia. International Federation of Clinical Chemistry Scientific Division: Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin Chem* 1997; 43(3): 427-35.

16. Hughes AE, Dash DP, Jackson AJ, Frazer DG, Silvestri G. Familial keratoconus with cataract: linkage to the long arm of chromosome 15 and exclusion of candidate genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(12): 5063-6.

17. Bechara SJ ,Waring GO, III, Insler MS. Keratoconus in two pairs of identical twins. *Cornea* 1996; 15(1): 90-3.

18. Karimian F, Aramesh S, Rabei HM, Javadi MA, Rafati N. Topographic evaluation of relatives of patients with keratoconus. *Cornea* 2008; 27(8): 874-8.

19. Kaya V, Utine CA, Altunsoy M, Oral D, Yilmaz OF. Evaluation of corneal topography with Orbscan II in first-degree relatives of patients with keratoconus. *Cornea* 2008; 27(5): 531-4.

20. Weed KH, MacEwen CJ, McGhee CN. The variable expression of keratoconus within monozygotic twins: dundee University Scottish Keratoconus Study (DUSKS). *Cont Lens Anterior Eye* 2006; 29(3): 123-6.

21. Tang YG, Picornell Y, Su X, Li X, Yang H, Rabinowitz YS. Three VSX1 gene mutations, L159M, R166W, and H244R, are not associated with keratoconus. *Cornea* 2008; 27(2): 189-92.

22. Aldave AJ, Yellore VS, Salem AK, Yoo GL, Rayner SA, Yang H, et al. No VSX1 gene mutations associated with keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(7): 2820-2.

23. Aldave AJ, Yellore VS, Principe AH, Abedi G, Merrill K, Chalukya M, et al. Candidate gene screening for posterior polymorphous dystrophy. *Cornea* 2005; 24(2): 151-5.

24. Blair SD, Seabrooks D, Shields WJ, Pillai S, Cavanagh HD. Bilateral progressive essential iris atrophy and keratoconus with coincident features of posterior polymorphous dystrophy: a case report and proposed pathogenesis. *Cornea* 1992; 11(3): 255-61.

25. Bechara SJ, Grossniklaus HE, Waring GO, III, Wells JA, III. Keratoconus associated with posterior polymorphous dystrophy. *Am J Ophthalmol* 1991; 112(6): 729-31.

26. Parker J, Ko WW, Pavlopoulos G, Wolfe PJ, Rabinowitz YS, Feldman ST. Videokeratography of keratoconus in monozygotic twins. *J Refract Surg* 1996; 12(1): 180-3.

27. McMahon TT, Shin JA, Newlin A, Edrington TB, Sugar J, Zadnik K. Discordance for keratoconus in two pairs of monozygotic twins. *Cornea* 1999; 18(4): 444-51.

Studying VSX1 Gene Mutations in Patients with Keratoconus of Chaharmahal and Bakhtiari Province, Iran

Dehkordi F.A., M.Sc.[1], Rashki A., Ph.D.[2], Bagheri N., Ph.D.[3], Chaleshtori M.H., Ph.D.[4], Memarzadeh E., Ph.D.[5], Salehi A., Ph.D.[5], Ghatreh H., Ph.D.[5], Hydari S., M.Sc.[1], Yazdanpanahi N., Ph.D.[6], Ghalehnoo Z.A., Ph.D.[7], Merzaeyan A., B.Sc.[8], Ghalehstori M.H., Ph.D.[9*]

1. Postgraduate Student of Genetics, Cellular & Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrkord, Iran
2. Assistant Professor, Physiopathology Dep., Faculty of Veterinary Medicine, Zabol University, Zabol, Iran
3. Ph.D. Student of Immunology, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Student of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Tehran, Iran
5. Assistant Professor of Ophthalmology, Shahrekord University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
6. Assistant Professor, Department of Biochemistry, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran
7. Assistant Professor, Department of Microbiology & Parasitology, Faculty of Medicine, University of Zabol, Zabol, Iran
8. B.Sc. of Laboratory Sciences, Cellular & Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Sharhrekord, Iran
9. Professor of Genetics, Cellular & Molecular Research Center, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

* Corresponding author; e-mail: Mchalesh@yahoo.com

(Received: 24 Feb. 2013 Accepted: 29 May 2013)

Abstract

Background & Aims: Keratoconus (KC) is an eye disorder in which the cornea is swollen, thinned and deformed. Despite extensive studies, the pathophysiological processes and genetic etiology of KC is unknown. The disease incidence is approximately 1 in 2000 and is the most common cause of corneal transplantation in the US. Many genes are involved in the disease, but evidence suggests a major role for VSX1 in the etiology of KC. This study aimed to determine the frequency of mutations in exons 2, 4 of the VSX1 gene in Chaharmahal and Bakhtiari province, Iran.

Methods: In this experimental study, mutations in two exons including exons 2 and 4 of VSX1 were investigated in 50 patients with KC. DNA was extracted using a standard phenol-chloroform method. PCR-SSCP/HA was performed, followed by DNA sequencing to confirm the identified motility shift.

Results: H244R mutation was identified in exon 4 of only one patient.

Conclusion: Our investigation showed that the KC-related VSX1 mutations are found in very small samples in the study subjects from Iran. Further investigations on other genes are needed to clarify their roles in KC pathogenesis.

Keywords: Keratoconus, Gene VSX1, Mutation

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2013; 20(6): 546-554