

Historia badań genetycznych nad stożkiem rogówki (keratoconus)

History of genetic research on keratoconus

Karolina Kulińska¹

Poznań

Streszczenie: Stożek rogówki (Keratoconus, KC) – obustronna niezapalna choroba oczu charakteryzująca się ścięciem, zniekształceniem i uwypukleniem przedniej części rogówki, co prowadzi do pogorszenia ostrości widzenia, astygmatyzmu, w najcięższych przypadkach – do utraty wzroku. KC to choroba o złożonej etiologii, z silnym udziałem czynników genetycznych. Badania mające na celu scharakteryzowanie podłoża genetycznego stożka rogówki trwają już ponad 100 lat. Jak do tej pory naukowcom nie udało się zidentyfikować markerów genetycznych choroby – przydatnych we wczesnej diagnostyce i leczeniu. Niniejsza praca ukazuje historyczny aspekt badań genetycznych nad stożkiem rogówki.

Summary: Keratoconus (KC) is a bilateral non-inflammatory eye disease characterized by thinning, distortion and protrusion of anterior cornea that leads to deterioration of visual acuity, astigmatism, and in the most extreme cases – loss of vision. KC is a complex condition with strong evidence of genetic factors associated with the disease. Genetic aetiology of keratoconus has been investigated for more than 100 years. So far, scientists have failed to identify genetic markers of keratoconus – useful in the early diagnosis and treatment. This article focuses on the history of genetic research on keratoconus.

Słowa kluczowe: historia okulistyki, genetyka, markery genetyczne, stożek rogówki

Key words: history of ophthalmology, genetics, genetic markers, keratoconus

Wprowadzenie

Choroby oczu mają często złożoną etiologię ze znaczącym udziałem czynników genetycznych [Bechara 1996]. Znalezienie markerów genetycznych oraz określenie modelu dziedziczenia ma kluczowe znaczenie dla wczesnej diagnostyki i doboru

¹ Zakład Anestezjologii Doświadczalnej, Katedra Anestezjologii i Intensywnej Terapii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

optymalnego leczenia [Bechara 1996]. Stożek rogówki (keratoconus, KC, OMIM 14830) jest chorobą stosunkowo rzadką, jednak jego leczenie jest długotrwałe i często kończy się operacyjnie. Przyczyny zachorowania na KC obejmują czynniki genetyczne oraz wpływ środowiska. Zainteresowanie genetycznym podłożem choroby rozpoczęło się około sto lat temu. Wraz z rozwojem technik biologii molekularnej oraz uzyskaniem w 2003 r. informacji na temat sekwencji ludzkiego genomu stało się możliwe szczegółowe określenie genotypu mogącego predysponować do zachorowania na KC. Niniejsza praca ukazuje historyczny aspekt badań nad dziedzicznością stożka rogówki oraz próbuje wskazać najnowsze techniki biologii molekularnej, zastosowane w celu identyfikacji genetycznego podłoża choroby.

Opis choroby i etiologia

Stożek rogówki (keratoconus, z gr. *kerato* – rogówka, *conus* – stożek) jest niezapalną chorobą rogówki charakteryzującą się obustronnym, asymetrycznym uwypukleniem i pogrubieniem przedniej części rogówki przy jednoczesnym ścieńczeniu jej brzegów [Bisceglia 2009, Burdon 2013]. Efektem tych zmian jest pogorszenie ostrości widzenia, astygmatyzm, w najcięższych przypadkach – utrata wzroku [Brancati 2004, Burdon 2008]. Choroba ma progresywny charakter, jest jedną z najczęstszych dystrofii rogówki oraz najczęstszą przyczyną transplantacji rogówki [Burdon 2013, Czugała 2012, Dash 2010]. W równym stopniu dotyka kobiety i mężczyzn [Brancati 2004]. Ilość odnotowanych przypadków zachorowań w ciągu roku waha się pomiędzy 1,3-25 na 100,000 w zależności od pochodzenia etnicznego [Brancati 2004, Burdon 2008]. Stożek rogówki występuje częściej u Azjatów niż u reprezentantów rasy kaukaskiej [Brancati 2004]. Choroba ta często współistnieje z innymi chorobami i z zespołami genetycznymi: z zespołem Downa, Turnera, Bardeta-Biedla, Ehlersa-Danlosa, zespołem paznokiec-rzepka, nerwiakowłókniakowatością, *Xeroderma Pigmentosa*, wrodzoną ślepotą Lebera, retinopatią barwnikową, kolagenozą [Falls, Allen 1969].

Stożek rogówki jest chorobą wieloczynnikową, o złożonej etiologii. Do zachorowania na keratoconus predysponują zarówno czynniki genetyczne, jak i środowiskowe: noszenie gazoszczelnych soczewek kontaktowych, nawykowe tarcie oczu, alergie [Brancati 2004]. Przypadki rodzinnego keratoconus stanowią 6-8% zachorowań [Brancati 2004]. W większości przypadków rodzinnego stożka rogówki obowiązuje autosomalny dominujący model dziedziczenia z ograniczoną penetracją [Fullerton 2000].

Za podłożem genetycznym rozwoju stożka rogówki przemawiają następujące czynniki: współistnienie z zespołami genetycznymi, wysoka zgodność fenotypu wśród bliźniąt monozygotycznych w porównaniu z bliźniętami dwuzygotycznymi oraz występowanie rodzinnych przypadków choroby [Brancati 2004, Burdon 2008]. Pomimo dowodów na istnienie genetycznych przyczyn stożka rogówki, jak do tej pory nie udało się znaleźć markerów genetycznych, przydatnych w diagnostyce i leczeniu tego schorzenia [Brancati 2004].

Historia badań nad stożkiem rogówki. Poszukiwanie genetycznego podłoża choroby

Stożek rogówki został po raz pierwszy opisany i scharakteryzowany jako odrębna jednostka chorobowa w r. 1854 przez brytyjskiego lekarza Johna Nottinghama [Gajecka 2009]. Jednakże już 150 lat wcześniej, w 1736 r., angielski lekarz, chirurg i pionier okulistyki – Benedykt Dudell, w załączniku do jednej ze swoich naukowych rozpraw opisał przypadek 14-letniego chłopca z „uwydatnioną rogówką w obu oczach, przypominającą wyraźnie widoczny tępy stożek” [Gajecka 2009]. 30 lat później kolejny brytyjski okulista, chirurg John Taylor (1703-1772), na podstawie własnych obserwacji dokonał pierwszej precyzyjnej charakterystyki stożka rogówki, który nazwał „ochlodes”. Określił keratoconus jako chorobę, w której „rogówka choć utrzymuje swoją przejrzystość, ulega uwypukleniu w postać stożka ze ściętym, tępym wierzchołkiem, którego podstawa obejmuje cały obwód rogówki” [Gajecka 2009]. W 1801 r. Scarpa opisał przypadek 36-letniej kobiety, u której występowało pogorszenie widzenia, natomiast rogówka, choć zachowywała swoją przejrzystość, miała postać stożka, którego „czubek z taką siłą odbijał przypadkowe światło, że wyglądał jak świecący punkt” [Gajecka 2009]. W 1817 r. opisano po raz pierwszy zakończone sukcesem dwa przypadki chirurgicznego usunięcia stożka rogówki [Gajecka 2009]. W 1830 r. MacKenzie jako przyczynę zachorowania na keratoconus podał: „zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu naczyń krwionośnych odżywiających samą rogówkę” [Gajecka 2009].

Historia badań nad dziedzicznością stożka sięga lat dwudziestych ubiegłego wieku. Pierwsze obserwacje dotyczące genetycznego podłoża choroby dotyczyły rodzinnego stożka rogówki [Gasset, Houde 1977, Gasset, Hinson, Grias 1978]. Na początku XX w. Stihli, Hoeve, Woltz opisali przypadki keratoconus w 2-3 pokoleniach jednej rodziny. W opinii Woltz stożek rogówki rozwijał się wskutek występowania rodzinnych predyspozycji. [Gasset, Houde 1977]. W 1925 r. Clausen jako przyczynę genetycznego keratoconus wskazał czynnik recesywny lub kilka czynników występujących na różnych chromosomach [Gasset, Hinson, Grias 1978]. Zachęcano do wstrzymywania się od reprodukcji te osoby, u których podejrzewano postać genetyczną stożka (choroba pojawiła się w wywiadzie rodzinnym) [Gasset, Hinson, Grias 1978].

W celu wyjaśnienia mechanizmu dziedziczności KC, w 1977 r. Gasset podjął próbę znalezienia korelacji pomiędzy jednogenowym, mendlowskim dziedziczeniem gorzkiego smaku wywołanego przez fenylotiomocznik (PTC), a stożkiem rogówki. W grupie 50 chorych na KC, którym podano PTC nie znaleziono różnic w odczuwaniu smaku gorzkiego w porównaniu z populacją zdrowych ochotników [Grzybowski, McGhee 2013]. Rok później, Gasset i inni zbadali grupy krwi u 69 chorych, jednak nie znaleziono przewagi żadnej z grup krwi w porównaniu z 1465 zdrowymi ochotnikami [Guan 2012]. W tym samym czasie Hallermann, Wilson przeanalizowali 304 kliniczne przypadki KC. U osób, u których choroba mogła mieć charakter dziedziczny (stożek pojawił się w wywiadzie rodzinnym w kilku pokoleniach wstecz) zaobserwowano współistnienie KC z syndromami genetycznymi oraz występowanie różnych odmian choroby: od łagodnych po ekstremalne [Hallermann, Wilson 1977]. Postawiono

hipotezę o wieloczynnikowym modelu dziedziczenia KC [Hallermann, Wilson 1977]. W latach osiemdziesiątych i dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku przeprowadzono badania bliźniąt monozygotycznych (MZ), u których występował keratoconus [Heon 2002].

Kohortowe badania porównawcze bliźniąt monozygotycznych oraz dwuzygotycznych dają możliwość oceny udziału czynników genetycznych oraz środowiskowych w rozwoju choroby.

W badaniach nad keratoconus wykazano niższy poziom zgodności fenotypu zmienionego u bliźniąt dwuzygotycznych w porównaniu z monozygotycznym [Brancati 2004, Burdon 2008, Hughes 2003]. Ponadto u bliźniąt monozygotycznych choroba rozpoczynała się wcześniej i miała cięższy przebieg [Burdon 2008]. Badania nad bliźniętami potwierdziły silny udział czynnika genetycznego w rozwoju stożka rogówki.

Rodzinna postać stożka rogówki w 90% jest dziedziczona w modelu autosomalnym dominującym ze zredukowaną penetracją [Brancati 2004, Hutchings 2005, Ihala-inen 1986, Jeyabalan 2013]. W r. 2000 Wang i Rabinowitz przeprowadzili analizę segregacyjną u 95 rodzin, w których stwierdzono występowanie keratoconus. Okazało się, że czynnik genetyczny odgrywał główną rolę w rozwoju KC. Zaproponowali autosomalny recesywny model dziedziczenia [Karolak, Kulińska, Nowak 2011].

W latach dziewięćdziesiątych oraz na początku XXI w. rozpoczęto poszukiwania genu – markera odpowiedzialnego za rozwój choroby [Dash 2010]. Z zastosowaniem metod genotypowania oraz analizy sprzężeń naukowcy zlokalizowali sześć *loci* na różnych chromosomach, które miały związek z chorobą [Dash 2010]: 16q22.3-q23.1 (KTCN2; MIM 608932), 3p14-q13 (KTCN3; MIM 608586), 2p24 (KTCN4; MIM 609271), 5q14.3-q21.1, 15q23-q24 oraz 20q12 [Fullerton 2000, Kulińska 2009, Lin 2012, Macklin 1927, Nielsen 2003, Nowak 2011, Rabinowitz 1992, Stabuc-Silih 2010]. W 2008 r. polscy naukowcy (Gajęcka i in.) z Instytutu Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu scharakteryzowali nowe *locus* – 13q32 – sprzężone z KC w populacji rodzin z Ekwadoru [Tang 2005]. W obrębie każdego *locus* (o długości czasem kilku milionów par zasad) poszukiwano zmian w sekwencji pojedynczych genów. W tym celu, z zastosowaniem standardowej metody sekwencjonowania DNA Sangera, u osób chorych na KC oraz zdrowych członków ich rodzin określano sekwencję genów mogących warunkować rozwój choroby [Dash 2010]. Następnie próbowano określić częstość zmian sekwencji DNA u chorych w porównaniu ze zdrowymi członkami ich rodzin. Tylko zmiana sekwencji DNA występująca u osób chorych, natomiast nieobecna u zdrowych członków rodziny mogła być uznana za zmianę wywołującą chorobę. W 2002 roku wskazano na gen VSX1 (Visual system homeobox gene 1) zlokalizowany w *locus* 20q12, mogący być przyczyną KC [Török, Redway 1927]. Jednak badania prowadzone w innych ośrodkach na chorych z różnych grup etnicznych nie potwierdziły tych doniesień [Tuft 2012, Tyynismaa, Sistonen, Tuupanen 2002]. Z kolei w 2008 r. wskazywano na gen SOD1 (Superoxide Dismutase 1) jako kandydata w etiologii KC [Udar, Atilano, Brown 2006]. Podobnie jak w przypadku VSX1 – badania na większej grupie chorych nie potwierdziły związku SOD1 (21q22.11) z rozwojem stożka rogówki [Tang 2005]. Kolejne geny – kandydaci, w których zidentyfikowano polimorfizmy zmieniające sekwencję białka lub mutacje genetyczne segregujące z fenotypem zmienionym choro-

bowo to: DOCK 9 (locus 13q32) oraz TGF β [Vazarini, Basu 2013, Verma, Das, Srinivasan 2013]. Jednak udział jak i rola w/w genów w etiologii stożka jest niepoznana i wymaga dalszych wyjaśnień.

W 2003 r. dzięki zastosowaniu techniki mikromacierzy (Gene-Chip) firmy Affymetrix, możliwe stało się porównanie profilu ekspresji 5600 genów w rogówce zdrowej i chorobowo zmienionej. U 11 osób z keratoconus 47 genów ulegało zwiększonej ekspresji, zaś 9 wykazywało ekspresję obniżoną w porównaniu ze zdrową tkanką. Wyniki badań mikromacierzy zwalidowano przy użyciu metody Real – Time PCR; w przypadku niektórych genów obserwowano również wzrost produkcji białka (keratyna 6 i 13, met. immunohistochemiczna) [Wang 2000].

Poszukiwania pojedynczego genu-markera stożka rogówki nie przyniosły zamierzonego rezultatu. W żadnym z genów kandydatów nie znaleziono mutacji mogących być bezpośrednią przyczyną zachorowania na KC [Dash 2010, 37]. W 2009 r. po raz kolejny postawiono hipotezę o wielogenowym dziedziczeniu stożka rogówki. Z powodu braku danych na temat mutacji mogących być przyczyną choroby zaproponowano inny mechanizm dziedziczenia KC. Prawdopodobnie, fenotyp zmieniony rozwija się na skutek nagromadzenia polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) lub dłuższych odcinków DNA w genach w obrębie *loci* sprzężonych z chorobą [Dash 2010]. Trudności w znalezieniu markerów genetycznych choroby wiążą się również z faktem silnego wpływu czynników środowiskowych na rozwój choroby [Dash 2010]. Jak wspomniano, keratoconus to choroba o złożonej etiologii, w której oprócz czynników genetycznych bardzo duże znaczenie mają czynniki środowiskowe. Pomimo ujawnienia mutacji w niektórych genach, nie udało się potwierdzić związku z keratoconus na większej grupie chorych, co wskazuje na genetyczną niejednorodność stożka [Bechara 1996, Brancati 2004]. Różne mutacje w obrębie jednego *locus* mogą powodować rozwój choroby, jak również różne zmiany w obrębie wielu *loci* mogą dawać fenotyp zmieniony [Brancati 2004]. Model dziedziczenia autosomalny dominujący ze zredukowaną penetracją zakłada występowanie genotypu zmienionego, przy jednoczesnym braku rozwoju fenotypu zmienionego [Brancati 2004]. Efekt ten jest spowodowany oddziaływaniem dodatkowych czynników środowiskowych lub genetycznych [Brancati 2004]. Zdarza się, że rozwój choroby następuje wyłącznie w wyniku oddziaływania czynników środowiskowych, a osoba chora nie ma żadnych predyspozycji genetycznych [Brancati 2004]. Na podstawie aktualnie dostępnych danych sugeruje się, że keratoconus jest chorobą wywoływaną przez zmiany w wielu różnych regionach chromosomów, przy jednoczesnym współudziale czynników środowiskowych.

W latach 2010-2013, dzięki rozwojowi technik: Genome-Wide Association Study (GWAS) oraz Next Generation Sequencing (NGS) możliwe stało się poszukiwanie polimorfizmów oraz mutacji w całym genomie (whole genome sequencing) osób chorych na keratoconus, bez wskazywania na konkretne *loci* chromosomowe sprzężone z KC. Znalezienie asocjacji pomiędzy zmianą w sekwencji DNA, a fenotypem chorobowym daje możliwość profilaktyki, wczesnej diagnozy oraz doboru właściwego leczenia. Kolejnym krokiem są badania funkcjonalne w tym: sekwencjonowanie egzomu (wyłącznie fragmentów kodujących genów) oraz transkryptomu rogówki osób chorych. Dzięki badaniom funkcjonalnym możliwe jest poznanie mechanizmu

rozwoju choroby, poznanie białek uczestniczących w patogenezie keratoconus, a także oznaczenie komórkowych szlaków sygnalizacyjnych kluczowych dla progresji KC.

Podsumowanie

Jak do tej pory znalezienie przyczyn genetycznych rozwoju stożka rogówki, pomimo zastosowania najnowocześniejszych technik sekwencjonowania genomu, nie przyniosło zamierzonych efektów. Stożek rogówki jest chorobą złożoną, o wieloczynnikowej etiologii i wielogenowym, niemendrowskim modelu dziedziczenia. Nie udaje się znaleźć jednego, uniwersalnego markera genetycznego keratoconus przydatnego w diagnostyce choroby. Współczesna medycyna, idąca w kierunku spersonalizowanego leczenia, zakłada indywidualistyczne podejście do chorego. Dzięki najnowszym technikom sekwencjonowania genomu, możliwe jest określenie genotypu u każdego chorego – przydatne w diagnostyce oraz podjęciu najoptymalniejszego leczenia. Nieodzowne wydaje się, obok badań genetycznych, włączenie badań funkcjonalnych bazujących na najnowszych osiągnięciach transkryptomiki i proteomiki w celu lepszego poznania molekularnych mechanizmów choroby. Dzięki kompleksowemu podejściu, w przyszłości będzie możliwa wczesna diagnostyka oraz niechirurgiczne leczenie stożka rogówki.

Bibliografia:

1. Bechara S. J. et al., *Keratoconus in two pairs of identical twins*, "Cornea" 1996; 15(1): 90-93.
2. Bisceglia L. et al., *Linkage analysis in keratoconus: replication of locus 5q21.2 and identification of other suggestive loci*, "Invest Ophthalmol Vis Sci" 2009; 50: 1081-1086.
3. Burdon K. P., Vincent A. L., *Insights into keratoconus from a genetic perspective*, "Clin Exp Optom" 2013; 96: 146-154.
4. Brancati F., Valente E. M., Sarkozy A., et al., *A locus for autosomal dominant keratoconus maps to human chromosome 3p14 – q13*, "J Med Genet" 2004; 41: 188-192.
5. Burdon K. P. et al., *Apparent autosomal dominant keratoconus in a large Australian pedigree accounted for by digenic inheritance of two novel loci*, "Hum Genet" 2008; 124: 379-386.
6. Czugała M. et al., *Novel mutation and three other sequence variants segregating with phenotype at keratoconus 13q32 susceptibility locus*, "Europ J Hum Genet" 2012; 20: 389-397.
7. Dash D. P. et al., *Mutational screening of VSX1 in keratoconus patients from the European population*, "Eye" (Lond) 2010; 24(6): 1085-1092.
8. Falls A. F., Allen A. W., *Dominantly inherited keratoconus*, "J Genet Hum" 1969; 17(3): 317-324.
9. Fullerton J. et al., *Identity-by-descent approach to gene localisation in eight individuals affected by keratoconus from north-west Tasmania, Australia*, "Hum Genet" 2000; 110: 462-470.
10. Gajecka M. et al., *Localization of a gene for keratoconus to a 5.6-Mb interval on 13q32*, "Invest Ophthalmol Vis Sci" 2009; 50: 1531-1539.
11. Gasset A. R., Houde W. L., *Pharmacogenetics in keratoconus*, "Ann Ophthalmol" 1977; 9 (1): 57-58.
12. Gasset A. R., Hinson W. A., Grias J. L., *Genetics in keratoconus A, B, O blood groups*, "Ann Ophthalmol" 1978; 10 (5): 601-602.

13. Grzybowski A., McGhee C. N., *The early history of keratoconus prior to Nottingham's landmark 1854 treatise on conical cornea: a review*, "Clin Exp Opt" 2013; 96(2): 140-145.
14. Guan T. et al., *The point mutation and polymorphism in keratoconus candidate gene TGFB1 in Chinese population*, "Gene" 2012; 1: 137-139.
15. Hallermann W., Wilson E. J., *Genetic aspects of keratoconus*, "Klin Monbl Augenheilkd" 1977; 170 (6): 906-908.
16. Heon E. et al., *VSX1: a gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus*, "Hum Mol Genet" 2002; 11: 1029-1036.
17. Hughes A. E. et al., *Familial keratoconus with cataract: linkage to the long arm of chromosome 15 and exclusion of candidate genes*, "Invest Ophthalmol Vis Sci" 2003; 44: 5063-5066.
18. Hutchings H. et al., *Identification of a new locus for isolated familial keratoconus at 2p24*, "J Med Genet" 2005; 42: 88-94.
19. Ihalainen A., *Clinical and epidemiological features of keratoconus genetic and external factors in the pathogenesis of the disease*, "Acta Ophthalmol Suppl" 1986; 178: 1-64.
20. Jeyabalan N. et al., *Genetic and genomic perspective to understand the molecular pathogenesis of keratoconus*, "Indian J Ophthalmol" 2013; 61 (8): 384-388.
21. Karolak J. A., Kulińska K., Nowak D. M. et al., *Sequence variants in COL4A1 and COL4A2 genes in Ecuadorian families with keratoconus*, "Mol Vis" 2011; 17: 827-843.
22. Kulińska K. et al., *W poszukiwaniu genu warunkującego stożek rogówki*, „Okulistyka” 2009; 2: 57-60.
23. Lin X. et al., *A genome-wide association study identifies a potential novel gene locus for keratoconus, one of the commonest causes for corneal transplantation in developed countries*, "Hum Mol Genet" 2012; 21(2): 421-429.
24. Macklin M. T., *Hereditary abnormalities of the eye. IV. Inheritable diseases affecting the conjunctiva*, "Can Med Assoc J" 1927; 17(6): 697-702.
25. Nielsen K. et al., *Identification of differentially expressed genes in keratoconus epithelium analyzed on microarrays*, "Invest Ophthalmol Vis Sci" 2003; 44(6): 2466-76.
26. Nowak D., Gajecka M., *The genetics of keratoconus*, "Middle East Afr J Ophthalmol" 2011; 18(1): 2-6.
27. Rabinowitz Y.S. et al., *Molecular genetic analysis in autosomal dominant keratoconus*, "Cornea" 1992; 11(4): 302-308.
28. Stabuc-Silih M. et al., *Genetics and clinical characteristics of keratoconus*, "Acta Dermatovenerol Alp Paenonica Adriat" 2010; 19(2): 3-10.
29. Tang Y. G. et al., *Genomewide linkage scan in a multigeneration Caucasian pedigree identifies a novel locus for keratoconus on chromosome 5q14.3-q21.1*, "Genet Med" 2005; 7: 397-405.
30. Török E., Redway D., *A preliminary Report of Three Cases of Keratoconus*, "Trans Am Ophthalmol Soc" 1927; 25: 123-142.
31. Tuft S. et al., *Keratoconus in 18 pairs of twins*, "Acta Ophthalmol" 2012; 90: 482-486.
32. Tyynismaa H., Sistonen P., Tuupainen S., *A locus for autosomal dominant keratoconus: linkage to 16q22.3-q23.1 in Finnish families*, "Invest Ophthalmol Vis Sci". 2002; 43(10): 3160-3164.
33. Udar N., Atilano S. R., Brown D. J. et al., *SOD1: a candidate gene for keratoconus*, "Invest Ophthalmol Vis Sci" 2006; 47: 3345-3351.
34. Vazirani J., Basu S., *Keratoconus: current perspectives*, "Clin Ophthalmol" 2013; 7: 2019-2030.
35. Verma A., Das M., Srinivasan M., *Investigation of VSX1 sequence variants in South Indian patients with sporadic cases of keratoconus*, "BMC Res Notes" 2013; 6: 103.
36. Wang Y. et al., *Genetic epidemiological study of keratoconus: evidence for major gene determination*, "Am J Med Genet" 2000; 93(5): 403-409.
37. Wheeler J. et al., *The Genetics of Keratoconus: A Review*, "Reprod Syst Sex Disord" 2012; Suppl 6: 1-19.