

تردد الطفرة C677T في جين MTHFR لدى مرضى داء الزرق في محافظة ذي قار
وتأثير داء السكري والتاريخ العائلي عليه

ظفر محمد الموسوي*

حسن ريسان الركابي*

thafar_love @yhoo.com

Hassanalrkaby @yhoo.com

*قسم علوم الحياة – كلية التربية – جامعة ذي قار

الخلاصة:

يعتبر داء الزرق Gluacoma من الامراض الشائعة عالميا وغير المعدية يحدث لاسباب عديدة اهمها ارتفاع ضغط العين الذي يؤدي الى تلف العصب البصري يصيب الجنسين اغلب الاحيان يصيب الاشخاص فوق سن الاربعين. تهدف الدراسة الحالية لمعرفة العلاقة بين الطفرة C677T ونشوء داء الزرق في محافظة ذي قار. جمعت 100 عينة دم من الاشخاص المصابين بهذا المرض بأعمار تتراوح من 35 فأكثر و 100 عينة دم من غير المصابين كمجموعه مقارنه، تم حفظ العينات بأنابيب حاويه على ماده مانعه للتخثر EDTA بدرجه حراره (20- م). تم استخلاص ال DNA وتضخيم الجين بتقنيه polymerase chain Reaction (PCR). بعد ذلك تم قطع الجين بالانزيم القاطع Hind I. وجد من هذه الدراسة ان اعلى فئه عمريه مصابه بالمرض هي (59-50) بنسبه بلغت 40%. ووجدت الدراسة ان نسبه الخطر تزداد بمقدار ثلاث مرات في المرضى الذين يملكون تاريخ عائلي (OR = 3.73 , 95% CI = 1.27 – 1098). بينما تزداد خطوره بمعدل (OR = 2,95 % CI = 0.45 – 5.10) في مرضى الزرق المصابين بداء السكري.

الكلمات المفتاحية: الزرق جين MTHFR، الطفرة PCR، C677T

The mutation frequency C677T for gene MTHFR in Glucom a patient in the province of Thi Qar and effect the diabetes and family history for it

Hassan Resan Rikabi – Thafar mohammad Al mosawe

Department of life sciences-collage of Education- University of Thi Qar

Abstract

Glaucoma is a common and non-infection disease that occurs for certain reasons Hypertension in eye is the most important reason for the occurrence of Glaucoma which leads to admage the optic nerve. It affects the both sexes and in most often cases its affects people over the age of forty . The present study

aims to examine the relationship between the mutation C677T and the occurrence of Glaucoma in Thi Qar province . A sample was collected and also a sample of 100 blood tests was considered as a control group. The samples were saved in tubes contains material to prevent coagulation EDTA temperature of (20-) Celsius. DNA was extracted and gene was amplified using Polymerase chain Reaction(PCR) technology and then the gen was cut it using cutter restriction enzyme Hind I. from this study we found that the highest age group infected by the disease was (50-59) with percentage 40% and we also concluded that the hazard ratio increased three time in the patients who have a family history (OR= 3.73, 95% CI =1.27-10.89) while hazard ratio increased by (OR= 2, 95% CI 0.45-10) for the diabetics patients.

المقدمه

يعرف داء الزرق على انه التهاب العصب البصري [1] بسبب ارتفاع ضغط العين فيؤدي الى العمى وهو ثاني سبب للعمى في العالم بعد الماء الابيض [2] يعتبر ارتفاع ضغط العين هو السبب الرئيس للاصابة بداء الزرق حيث يكون ضغط العين الطبيعي من (10-20) ملم زئبق.[3] ان اكثر انواع الزرق انتشارا هو الزرق الابتدائي مفتوح الزاوية Primary Open Angle Gluacoma وهو الاكثر انتشارا ويكون غير مصحوب بأعراض مباشره لذلك يصعب الكشف عنه بوقت مبكر [4]والزرق الابتدائي مغلق الزاوية Primary Open Angle Gluacoma يكون اقل انتشارا ومصحوب بألم وغثيان واذا لم يعالج بسرعة يؤدي الى العمى [5] يرتبط داء السكري مع ارتفاع ضغط العين والزرق [6] وقد بينت العديد من الدراسات ان انتشار الزرق يكون مرتفعاً في الاشخاص الذين يعانون من السكر بمعدل 4.7-6.1 % [7] التاريخ العائلي للمرض هو على الأرجح من اسباب الزرق بسبب الوراثة الجينية [8]. واشارت دراسات الى أنه من (13-25)% من مرضى الزرق لديهم تاريخ عائلي ايجابي للمرض [9] ويكون انتشار المرض بين الاقارب من الدرجة الاولى ب 3-5 اضعاف من انتشاره في المجتمع [10] لا يوجد علاج شافي لحد الان لكن ممكن ان ينطوي العلاج على خفض ضغط العين باستخدام الادويه او الجراحه وجد ان تركيز Homocystine يوجد بتركيز عاليه في بلازما الاشخاص المصابون بداء الزرق. جين Methelentetrahydrofolat redactasea (*MTHFR*) يقع على الذراع القصير للكروموسوم رقم 1 (1p36.3) [11] يكون مسؤول عن انتاج انزيم 5-methelentetrahydrofolat redactasea الذي يحول 5-10-methelentetrahydrofolat redactasea الى 5-methelentetrahydrofolat redactasea [12] الذي هو الشكل الفعال للفولات حيث يلعب دور رئيسي في عمليه ميثلة DNA وضروري لتحويل الحامض الاميني الهوموسستين Homocystine الى الحامض الاميني الميثونين [13] methionin اكثر الطفرات الشائعه في هذا الجين هي C677T تتحول فيها القاعده النتروجينية Cytocine الى قاعده Thymine في النيكلوتايد رقم 677 في الاكسون الرابع بسبب تحول الحامض الاميني الألنئين Alnine الى حامض الاميني الفالين Valine في الموقع 222 يرتبط حدوث هذه الطفره مع زياده في مستويات الهوموسستين [14][15].

المواد وطرائق العمل

١_ جمع العينات Samples Collection

جمعت ٢٠٠ عينه دم بحجم ٢,٥ مل من الاشخاص المتطوعين تتراوح اعمارهم بين (٨٧-٣٥) سنه لكلا الجنسين من مستشفى الحبوبي وتتضمن هذه العينات ١٠٠ شخص مصاب بمرض الزرق وبقية العينات كانت لاشخاص اصحاء من هذا المرض جمعت من مختلف الشرائح الاجتماعيه وجمعت بفترة من ٢٠١٣/١٠ لغايه ٢٠١٤/٣ حفظت العينات بأنابيب حاوية على مادة مانعة للتخثر EDTA بدرجة حرارة (-٢٠ م) لحين استخلاص DNA . تم اعتماد استمارة معلومات عن المرضى تضمنت (العمر، الجنس، المهنة، تاريخ الاصابة، التعليم، التاريخ العائلي للمرض، الامراض المرافقة، منطقة السكن، التدخين).

٢- استخلاص الحامض النووي DNA DNA Extraction

تم استخلاص DNA من عينات الدراسة وعينات المقارنة [١٦]

٣ - الترحيل الكهربائي Electrophoresis

تم الكشف عن وجود DNA عن طريق الترحيل الكهربائي على هلام الأكاروز بتركيز (٠,٨%) [١٦]

جدول (1) يوضح البادئات المستخدمة

Gene	Primer sequences	Length	Tm	TA
<i>MTHFR</i>	F TGAAGGAGAAGGTGTCTGCG	20	57.8	53.8
	R AGGACGGTGCGGTGAGAGTG	20	57.8	53.8

Tm: melting temperature, T a: Annealing Temperature, R: reverse, F: forward

أجريت طريقة العمل بخليط تفاعل بحجم 20 مايكرو لتر كما ما موضح في الجدول رقم (2)

جدول (2) يمثل المواد الكيميائية لخليط التفاعل و حجوما

Chemicals	Volume
Master Mix	5 µl
Primer Forward	لكل جين 1 µl
Primer Reverse	لكل جين 1 µl
DNA	5 µl
D.W.	4 µl
Total volume	20 µl

بعد اتمام جميع الإضافات مزجت العينات بجهاز Vortex لمدة نصف دقيقة لضمان تجانس جميع المواد ثم وضعت العينات بجهاز

(Thermal Cycler) وشغل الجهاز حسب البرنامج كالاتي^[17]

جدول (3) برنامج تقنية تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction

No. of Stages	Steps	Temperature	Time	No. of Cycle
1	Denaturation 1	94 °C	5 min	1 Cycle
2	Denaturation 2	94 °C	30 Sec.	35 Cycles

3	Annealing	67°C	30 Sec.	
4	Extension 1	72°C	30 Sec.	
5	Extension 2	72°C	10 min	1 Cycle

بعد انتهاء عمل الجهاز رُحلت العينات كهربائياً باستخدام هلام الاكاروز بتركيز 2% واعتماد DNA Ladder، وتم الكشف عن الحزم بجهاز الأشعة فوق البنفسجية اذ مثل ظهور الحزمة بحجم (189bp) وجود الجين *MTHFR* بعد مقارنته مع DNA marker (100_1000).

قطع الجين *MTHFR* باستعمال انزيم القطع Hind I وحسب النشره المرفقه مع الانزيم من الشركه Biocorp

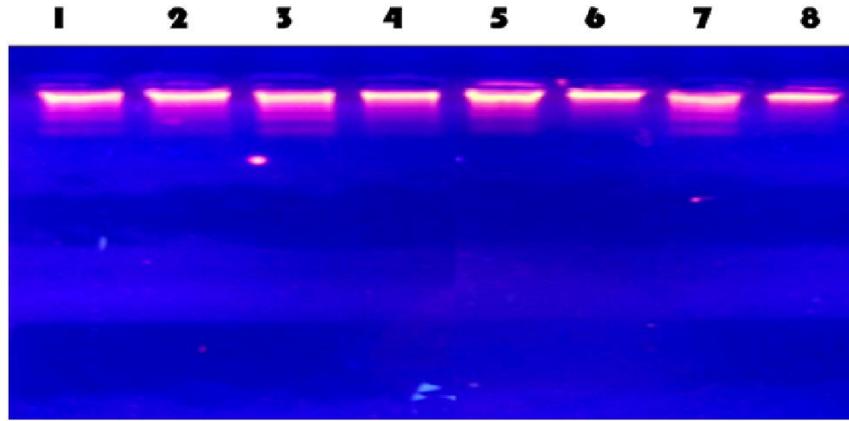
الجدول (4): مواد التفاعل لقطع الجين *MTHFR*

المادة	الحجم
PCR reaction mixture	10 µL
Nuclease-free water	17 µL
10x buffer tango	2 µL
Hind I	1 µL
Total	30 µL

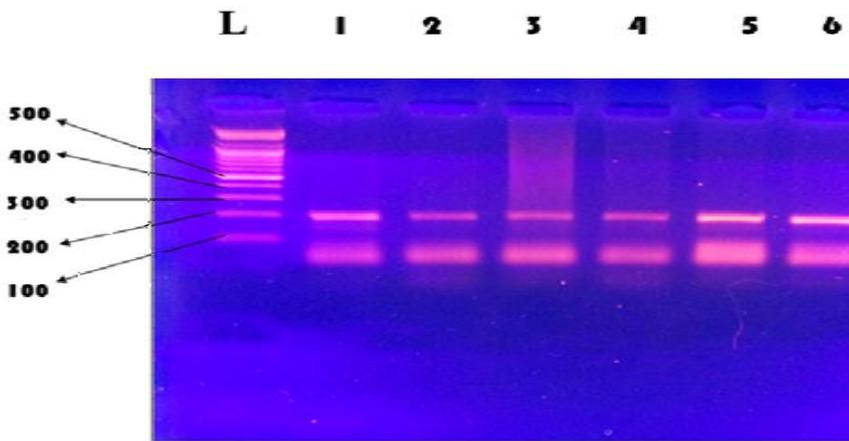
وبعد ذلك حضنت المكونات بدرجه حراره 37 م ولمده ساعتين ثم رحلت بواسطه جهاز الترحيل الكهربائي وكانت النتائج كالاتي:
ظهور الحزمه عند الزوج القاعدي 198bp يدل على الطراز البري Wild typ (Ala /Ala) الالنين /الالنين وظهور الحزم عند القواعد 175bp 198bp 23bp يدل على الطراز الطافر المتباين Heterozygot (Ala\val) الالنين/الفالين في حين ظهور الحزمه عند القواعد 175bp يدل على الطراز الطافر المتجانس Homozygous (Val/ Val) فالين/فالين

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

اجري التحليل الاحصائي لجميع العينات المدروسه باستخدام اختبار مربع كاي chi squer تحت مستوى معنويه $P < 0.05$ كما استخدم اختيار (OR) لدراسه تردد الطرز الوراثيه للجين *MTHFR* باستخدام برنامج SPSS [18].



صورة(1) الترحيل الكهربائي DNA Electrophoresis على هلام الاكاروز بتركيز 0.8%
lane 6-1 عينات المرضى.

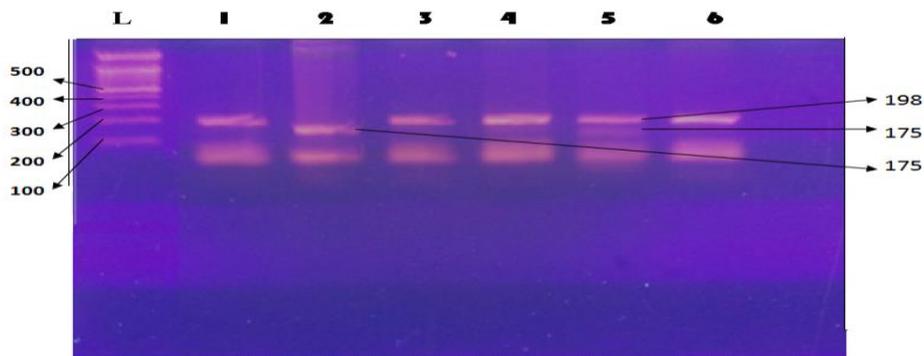


صوره(2) الترحيل الكهربائي Electrophoresis لنواتج تقنيه ال PCR على هلام الاكاروز بتركيز 2%

lane 8-7 عينات الاصحاء

L DNA- القياسي (100 bp)

lane 6 -1 نواتج PCR للجين *MTHFR*



صورة (3-4) تحليل نواتج PCR لجين *MTHFR* باستخدام انزيم القطع *HindI*

DNA L القياسي (100 bp).

Ala / Ala الطراز المتجانس البري lane 1,3,4,6

Ala / Val الطراز الطافر المتباين lane 2

Val /Val الطراز الطافر المتجانس lane 5

جدول (5) توزيع مجموعتي المقارنه والمرضى حسب التاريخ العائلي

المرضى		المقارنة		العينة
%	N	%	N	
22%	22	2%	2	لديه تاريخ عائلي
78%	78*	98%	98	ليس لديه تاريخ عائلي
100%	100	100%	100	المجموع

$$X^2 = 18.99 \quad , \quad df = 1 \quad ., P = 0.00$$

الجدول (5) يبين توزيع مجموعتي الاصحاء والمرضى حسب التاريخ العائلي حيث ان 2% من الاصحاء لديهم تاريخ عائلي ايجابي للمرض بينما 22% من المرضى لديهم تاريخ عائلي في حين ان 98% من الاصحاء ليس لديهم تاريخ عائلي ايجابي مقابل 78% من المرضى

جدول (6) تردد الطرز الجينية لمجموعتي المقارنه والمرضى

الطرز الجينية	مجموعة المقارنة (%)n= 100	مجموعة المرضى (%)n= 100	OR	95% CI
Ala/Ala	(93%) 93	(%46) 46	1.0	_____
Ala/Val	(1%) 1	(%15) 15	30.32	3.88-236
Val/Val	(%6) 6	(%39) 39	13.14	5.19-33.28

OR = Odds Ratio

95% CI Confidence Interv al

اظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود علاقة بين الطراز الطافر المتجانس Val/Val والطراز الطافر المتباين Ala/Val وخطر الاصابه بداء الزرق حيث يزداد الخطر بمقدار $OR = 30.32$ عند وجود الطراز Ala/Val بينما يكون الخطر $OR =$ (13.13) عند وجود الطراز Val/Val وهذا ما بينه الجدول (6)

جدول (7) تردد الطرز الجينية لعينات المرضى حسب الاصابه بالسكر

الطرز الجينية	غير مصاب (%)n= 66	مصاب (%)n= 34	OR	95% CI
Ala/Ala	32 (48.48%)	14 (41.17%)	1.0	_____
Ala/Val	9 (13.63)	6 (17.64%)	2	0.45-5.10
Val/Val	25 (37.87%)	14 (41.17%)	1.28	0.51-3.17

OR = Odds Ratio

95% CI Confidence Interval

اظهرت نتائج الدراسة الحالية وجود علاقة بين الزرق وداء السكري حيث يكون نسبة الخطر في مرضى السكري الذين يحملون الطراز الطافر المتباين Ala/Val ($OR = 2$) اما الذين يملكون الطراز الطافر المتجانس (Val/Val) فتكون نسبة الخطر 1.28 $OR =$ كما هو موضح في جدول (7)

يوضح الجدول (8) ان هناك ارتباط بين الاصابه بداء الزرق والتايخ العائلي حيث تبين ان الطراز الطافر المتجانس تكون نسبة خطورته $OR = 3.73$ وبذلك تكون نسبة الخطوره مرتين اكثر من الذين يملكون طراز طافر متباين Ala/Val $OR = 1.02$

جدول (8) تردد الطرز الجينية لعينات المرضى حسب التاريخ العائلي

الطرز الجيني	ليس لديهم تاريخ (%)n= 78	لديهم تاريخ عائلي (%)n= 22	OR	95% CI
Ala/Ala	40 (51.28%)	6 (27.27%)	1.0	_____
Ala/Val	13 (16.66%)	14 (9%)	1.02	0.18-5.71
Val/Val	25 (32%)	14 (63.63%)	3.73	1.27-10.98

OR = Odds Ratio

95% CI Confidence Interval

المناقشة

اوضحت نتائج هذه الدراسة ان 22% من المرضى لديهم تاريخ عائلي ايجابي وهذه النسبة تقترب من دراسته اجريت في ايران تشير الى ان التاريخ العائلي يعتبر عامل خطر ووجدت ان 25% من المرضى لديهم تاريخ عائلي ايجابي^[19] كانت النسبة مرتفعه في دراسته اجريت في ولايه تسمانيا حيث وجدت ان 60% من المرضى لديهم تاريخ عائلي^[20] رغم اختلاف نسب وجود التاريخ العائلي لدى المرضى لكن وجود المرض في احد افراد العائله يعتبر اشاره خطر لوجود المرض عند اقاربه من الدرجه الاولى (16)

تبين من الدراسة الحالية ان تردد الطرز الوراثي الطافر المتباين في عينات الاصحاء والمرضى هو 1% و 15% على التوالي والطرز الطافر المتجانس 6% و 39% وقد اظهر التحليل الاحصائي للنتائج وجود علاقة بين للطرز الطافر المتباين وخطر الاصابة بداء الزرق OR= 30.32 والطرز الطافر المتجانس OR=13.14 وهذه النتائج تقترب من دراسة اوضحت ان تردد الطراز الطافر المتباين 42% والطرز الطافر المتجانس 49%^[21] ودراسة اخرى بينت ان الطراز الطافر المتباين 41.80% والطرز الطافر المتجانس 10.4%^[22]

اوضحت هذه الدراسة العلاقة بين مرض السكر وخطر الاصابة بداء الزرق حيث وجدت ان هناك فرق معنوي بينهم وكان الطراز الطافر المتباين Ala/Val نسبة خطورته OR= 2 وهو اكثر خطورة من الطراز الطافر المتجانس Val/Val OR=1.28 ونتائج هذه الدراسة تتوافق مع دراسة اجريت في استراليا كانت نسبة الخطوره فيها OR=2.12^[23] وايضا تقترب هذه الدراسة من دراسة اجريت روتندام كانت نسبة الخطورة (OR=3.1)^[24]

داء السكري هو احد عوامل الخطر للاصابة بالزرق^[25] السكري يؤثر على الاوعية الدموية في العين حيث يسبب تمدد واحتقان الاوعية الدموية الشعرية وارتشاح البلازما والنزف^[26]

وقد اشارت دراسات بان مرضى السكر اكثر عرضة للاصابة بارتفاع ضغط العين وهذا يؤدي الى حدوث الزرق حيث ان مرضى السكري يكون ضغط العين لديهم اعلى ب(2/3) ملم زئبق من الاشخاص غير المصابين بالسكري لكن دراسته في المملكة المتحدة بينت انه لا يوجد ارتباط بين السكري وداء الزرق^[27]

بينت هذه الدراسة انه هناك ارتباط بين داء الزرق والتاريخ العائلي حيث ان نسبه خطر الطراز الطافر المتجانس Val/Val OR = 3.73 اما الطراز الطافر المتباين Ala/Val OR = 1.02 وهذه النتيجة تتفق مع نتيجته دراسته بينت ان نسبه الخطر المرضى الذين يملكون تاريخ عائلي (95% CI 1.8-5.6) OR= 3.2 بينما دراسته اخرى بينت ان نسبه الخطوره OR = (4.2)^{[28][29]} دراسته اخرى شملت على 332 شخص مصابون بالزرق الابتدائي مفتوح الزاوية و228 شخص مصابون بالزرق الابتدائي مفتوح الزاوية فكانت نسبه مرضى الزرق مغلق الزاوية الذين لديهم تاريخ عائلي (25.00%) فكانت نسبه الخطوره OR = 4.82 اما الزرق مفتوح الزاوية فنسبه المرضى الذين لديهم تاريخ عائلي 7 OR = 8.38^{[30][31]}

الاستنتاجات

- 1- وجود ارتباط بين تعدد الشكل الوراثي لجين *MTHFR* وحدث داء الزرق.
- 2- اظهرت الدراسة الجزيئية ان الاصابه بداء السكري ووجود التاريخ العائلي للاصابه بالمرض عوامل مشاركته في حدوث داء الزرق

التوصيات

- 1- الفحص الدوري للاشخاص الذين يملكون تاريخ عائلي للمرض والمصابين بداء السكري
- 2- فتح مراكز متخصصه للعيون والتقنيات الحديثه.

References

- 1-Quigley, H.A. (1996). Number of people with glaucoma worldwide. *Br J Ophthalmol*; 80: 389–93.
- 2- Sommer, A. ; Tielsch, J.M. ; Katz, J. et al.(1991). Racial differences in the cause-specific prevalence of blindness in East Baltimore 325:1412–1417.
- 3-Leske, M.C. (1983). The epidemiology of open-angle glaucoma: a review . *Am J Epidemiol* 118:166–191.
- 4-Junemann, A.G. ; von Ahsen , N. ; Reulbach, U.; Roedl ,J. ;Bönsch, D. ;Kornhuber, J.; Kruse, F.E.; Bleich, S. (2005).C677T variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol*139:721-3.
- 5- Tielsch, J.M.; Katz ,J.; Singh, K.; Quigley, H.A.; Gottsch, J.D. ; Javitt ,J.et al. (1991). A population-based evaluation of glaucoma screening: the Baltimore Eye Survey. *Am J Epidemiol*;134:1102–1110.
- 6- Tielsch, J.M.(1996) .The epidemiology and control of open angle glaucoma: a population-based perspective. *Annu Rev PublicHealth*; 17:121-36.
- 7- Becker ,B. (1971). Diabetes mellitus and primary open-angle glaucoma:The XXVII Edward Jackson Memorial Lecture. *Am J Ophthalmol*; 71:1-16.
- 8- Kang, S.S.; Zhou, J.; Wong, P.W.; Kowalisyn, J. ;Strokosch, G.(1988).Intermediate homocysteinemia: a thermolabile variant of methylenetetrahydrofolate reductase. *Am J Hum Genet*; 43:414-21.
- 9-Netland, P.A.; Wiggs, J.L. ; Dreyer, E.B. (1993).Inheritance of glaucoma andgenetic counseling of glaucoma patients. *Int Ophthalmol Clin*; 33:101-20.
- 10-Becker ,B. ; Kolker, A.E.; Roth, F.D. (1969). Glaucoma family study. *Am J Ophthalmol*; 50:557-67.
- 11-Tielsch, J.M. ; Katz, J.; Sommer, A. et al.(1994). Family history and the riskof primary open angle glaucoma. The Baltimore Eye Study. *ArchOphthalmol*; 112:69-73.
- 12-Brattstrom, L. ; Wilcken, D.E.; Ohrvik, J. ;Budin, L.(1998). Common methylenetetrahydrofolate reductase gene mutation leads to hyperhomocysteinaemia but not to vascular disease: the resultof a meta-analysis. *Circulation*; 98:2520-6.
- 13-Yamada, K. ;Chen, Z. ; Rozen, R. ; Matthews; R.G. (2001).Effects of commonpolymorphisms on the properties of recombinant humanmethylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98:14853-8.

- 14-van der Put , N.M. ; Gabreëls, F.; Stevens, E.M.; Smeitink,J.A.; Trijbels, F.J.; Eskes, T.K. et al.(1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene:an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* ; 62 (5):1044-1051.
- 15-Weisberg, I. ; Tran, P. ; Christensen, B. ; Sibani, S. ;Rozen, R. (1998).A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab.*; 64, 169-72.
- 16-Sambrook,k.J.;Fritsh,E.F. and maniatitis,T.(1989). *molecular cloning laboratory manual* ,2nd ed., cold spring Harbor laboratory prees .U.S.A.
- 17-Navid Nilforoushan; Sevil Aghapour; Reza Raoofian; Samira Saeed Rad;Wayne ,K.; Greene; Ghasem Fakhraie; and Mansour Heidari.(2011) Lack of Association between the C677T Single Nucleotide Polymorphism of the MTHFR Gene and Glaucoma in Iranian Patients *Vol. 50, No. 3.*
- 18-Scheffler,W.C.(1980). *statstic for the biology science*.Addison,Wesley publication company California.
- 19-Anselm, G.M. ; Jünemann, M.D. ; Nico von Ahsen, M.D.d ;Udo Reulbach, M.D. ; Johannes Roedl, M.D. ; Dominikus Bönsch, M.D.b. ; Johannes Kornhuber, Friedrich, E. Kruse, M.D.a.; Stefan Bleich, M.D.(2005) . C677T variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for primary open-angle glaucoma *Volume 139, Issue 4, April, Pages 721–723.*
- 20-Xiao-Jin Gao; Sheng-Ping Hou; and Ping-Hua Li .(2014) .The association between matrix metalloprotease-9 gene polymorphisms and primary angle-closure glaucoma in a Chinese Han population.*int J ophthalmol*.3:397-407.
- 21-Pambianco, G.; Costacou, T.; Ellis, D.; Becker, D.J. ;Klein, R.; Orchard, T.J. (2006).The 30-year natural historyof type 1 diabetes complications: the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study experience.*Diabetes* ; 55: 1463–1469.
- 22-Dielemans, I.; de Jong, P.T.V.M.; Stolk R,et al. (1996).Primary open-angle glaucoma, intraocular pressure, and diabetes mellitusin the general elderly population. The Rotterdam study. *Ophthalmology*.103:1271–5.
- 23-Sommer, A. (1989). Intraocular pressure and glaucoma. *Am J Ophthalmol*; 107: 186–188.
- 24-Liew ,G. ; Wang, J.J. (2007). Retinal vascular signs in diabetes and hypertension–review. *Arq Bras Endocrinol Metabol*; 51: 352–362.

- 25-Wong, T.Y. ; Klein; R. Couper, D.J.; Cooper, L.S. Shahar, E.; Hubbard, L.D. ; Wofford ,M.R. etal.(2001).Retinal microvascular abnormalities and incident stroke: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Lancet* ; 358: 1134–1140.
- 26-Armstrong, J.R. ; Daily, R.K.; Dobson, H.L.;Girard, L.J.(1960).The incidence of glaucoma in diabetes mellitus.
A comparison with the incidence of glaucoma in the general population.*Am J Ophthalmol*; 50:55–63.
- 27- Becker, B. (1971). Diabetes mellitus and primary open-angle glaucoma. The XXVII Edward Jackson Memorial Lecture.*Am J Ophthalmol*; 1: 1–16.
- 28- Kawase, K. ; Tomidokoro, A. ; Araie, M.; Iwase, A. ;Yamamoto, T. (2008). Ocular and systemic factors related to intraocular pressure in Japanese adults: the Tajimi study. *Br J Ophthalmol*; 92: 1175–1179.
- 29- Ozcura, F.; Aydin, S. (2007). Is diabetes mellitus a riskfactor or a protector for primary open angle glaucoma?*Med Hypotheses* 69: 233–234.
- 30-Mitchell, P. ; Rochtchina, E.; Lee, A.J. ; Wang, J.J. (2002). Bias in self-reported family history and relationship to glaucoma: the Blue Mountains Eye Study. *Dec*;9(5):333-45.
- 31-Kong, X.; Chen, Y.; Chen, X. ;Sun, X. (2011). Influence of family history as a risk factor on primary angle closure and primary open angle glaucoma in a Chinese population *Oct*;18(5):226-32.