



INSTYTUT  
GENETYKI CZŁOWIEKA  
POLSKIEJ AKADEMII NAUK

## Joanna Świerkowska

Charakterystyka wybranych  
aspektów (epi)-genetycznych  
w wysokiej krótkowzroczności  
u polskich pacjentów

M O N O G R A F I A

Poznań, 2019

Copyright © Joanna Świerkowska  
Copyright © Instytut Genetyki Człowieka PAN  
Poznań 2019

Recenzenci naukowi: Prof. dr hab. n. med. Marzena Gajęcka  
dr inż. n. farm. Justyna A. Karolak  
Projekt okładki: Mirka Korbańska  
Zdjęcia i ilustracje pochodzą ze zbiorów autora

ISBN: 978-83-950393-4-8

Wydawca  
Instytut Genetyki Człowieka PAN  
ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań  
[www.igcz.poznan.pl](http://www.igcz.poznan.pl)

**Joanna Świerkowska**

Charakterystyka wybranych  
aspektów (epi)-genetycznych  
w wysokiej krótkowzroczności  
u polskich pacjentów



## SPIS TREŚCI

1. WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY .....	7
2. STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU POLSKIM .....	8
3. STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU ANGIELSKIM .....	9
4. WSTĘP .....	10
4.1. Zasada tworzenia obrazu widzianych przedmiotów .....	10
4.2. Charakterystyka kliniczna wysokiej krótkowzroczności .....	11
4.3. Epidemiologia krótkowzroczności i wysokiej krótkowzroczności .....	11
4.4. Czynniki środowiskowe warunkujące powstawanie krótkowzroczności .....	12
4.5. Czynniki genetyczne w krótkowzroczności .....	13
4.5.1. <i>Loci</i> krótkowzroczności i wysokiej krótkowzroczności .....	13
4.5.2. Geny kandydaci powiązane z wysoką krótkowzrocznością .....	14
4.5.3. Czynniki genetyczne warunkujące długość osiową gałki ocznej, ciśnienie wewnątrzgałkowe i krzywiznę rogówki .....	16
4.6. Czynniki epigenetyczne w krótkowzroczności .....	17
4.7. Uzasadnienie podjęcia tematu rozprawy doktorskiej .....	19
5. CEL NAUKOWY PROWADZONYCH BADAŃ .....	21
6. MATERIAŁY .....	22
6.1. Pacjenci i materiał biologiczny .....	22
6.2. Charakterystyka badanych grup .....	23
6.3. Rodowody rodzin polskich wybranych do analizy fenotypowej i genotypowej .....	23
6.4. Odczynniki .....	27
6.5. Aparatura i oprogramowanie .....	28
6.6. Bazy danych i narzędzia bioinformatyczne .....	28
7. METODY .....	29
7.1. Badania podmiotowe i okulistyczne .....	29
7.2. Analiza statystyczna danych klinicznych członków polskich rodzin .....	29
7.3. Weryfikacja wyników sekwencjonowania eksomowego .....	31
7.3.1. Analiza wyników sekwencjonowań eksomowych i wybór wariantów do weryfikacji .....	32
7.3.2. Projektowanie starterów .....	33
7.3.3. Łącuchowa reakcja polimerazy .....	33
7.3.4. Rozdział elektroforetyczny .....	33
7.3.5. Sekwencjonowanie metodą Sangera .....	34
7.4. Analiza znanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu powiązanych z długością osiową gałki ocznej, ciśnieniem wewnątrzgałkowym i krzywizną rogówki u pacjentów z HM .....	34
7.5. Analiza całogenomowej metylacji .....	36

8. WYNIKI .....	39
8.1. Wyniki badań okulistycznych i podmiotowych u członków polskich rodzin .....	39
8.1.1. Fenotypy występujące wśród badanych członków rodzin z HM .....	39
8.1.2. Struktura wieku osób badanych .....	39
8.1.3. Charakterystyka pacjentów pod względem współistniejących lub przebytych chorób i operacji narządu wzroku oraz chorób ogólnych .....	40
8.1.4. Charakterystyka przedniego odcinka i dna oka .....	43
8.1.5. Dodatkowe informacje .....	44
8.1.6. Dane kliniczne pacjentów oraz członków wybranych rodzin .....	45
8.1.7. Dane kliniczne dzieci zakwalifikowanych do badania całogenomowej metylacji .....	55
8.2. Wyniki analiz statystycznych danych klinicznych .....	56
8.2.1. Wyniki statystyki opisowej .....	56
8.2.2. Wyniki statystyki testowej .....	59
8.2.3. Zależności pomiędzy badanymi parametrami okulistycznymi .....	63
8.3. Weryfikacja wyników sekwencjonowania eksomowego .....	73
8.3.1. Analiza bioinformatyczna wyników sekwencjonowania eksomowego .....	73
8.3.2. Weryfikacja wyników sekwencjonowania eksomowego .....	73
8.3.3. Dodatkowa analiza bioinformatyczna wyników sekwencjonowania eksomowego .....	80
8.3.4. Weryfikacja wybranych wyników sekwencjonowania eksomowego .....	81
8.4. Wyniki analizy wariantów sekwencji powiązanych z długością osiową gałki ocznej, ciśnieniem wewnątrzgałkowym i krzywizną rogówki u pacjentów z HM .....	86
8.4.1. Analizy polimorfizmów związanych z długością osiową gałki ocznej .....	86
8.4.2. Analizy polimorfizmów związanych z ciśnieniem wewnątrzgałkowym .....	87
8.4.3. Analizy polimorfizmów związanych z krzywizną rogówki .....	87
8.5. Wyniki analiz całogenomowej metylacji DNA .....	88
8.5.1. Wyniki analiz hipermetylacji DNA .....	88
8.5.2. Wyniki analiz hipometylacji DNA .....	93
9. DYSKUSJA .....	100
10. WNIOSKI .....	116
11. PIŚMIENNICTWO .....	117
12. SPIS RYCIN .....	135
13. SPIS TABEL .....	136
14. ZAŁĄCZNIKI .....	139

## 1. WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

Skrót	Rozwinięcie w języku angielskim	Rozwinięcie w języku polskim
AL	<i>axial length</i>	długość osiowa gałki ocznej
AUC	<i>area under the curve</i>	pole powierzchni pod krzywą ROC
CC	<i>corneal curvature</i>	krzywizna rogówki
CCR	<i>corneal curvature radius</i>	promień krzywizny rogówki
cGMP	<i>cyclic guanosine monophosphate</i>	cykliczny guanozynomonofosforan
CP	<i>corneal power</i>	moc łamiąca rogówki
D	<i>dioptre</i>	dioptria
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	kwas deoksyrybonukleinowy
dNTP	<i>deoxynucleoside triphosphate</i>	trifosforan deoksyrybonukleotydu
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>	dimetylosulfotlenek
ECM	<i>extracellular matrix</i>	macierz zewnątrzkomórkowa
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	kwas etylenodiaminotetraoctowy
ES	<i>exome sequencing</i>	sekwencjonowanie eksomowe
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>	kinaza ogniskowo-adhezyjna
FDR	<i>false discovery rate</i>	spodziewany odsetek wyników fałszywie dodatnich
GWAS	<i>genome-wide association study</i>	badania asocjacyjne całego genomu
HM	<i>high myopia</i>	wysoka krótkowzroczność
IOP	<i>intraocular pressure</i>	ciśnienie wewnątrzgałkowe
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>	-
MAF	<i>minor allele frequency</i>	częstość rzadszego allelu
ORF	<i>open reading frame</i>	otwarta ramka odczytu
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	łańcuchowa reakcja polimerazy
PKG	<i>GMP-dependent protein kinase</i>	kinaza białkowa zależna od GMP
RGC	<i>retinal ganglion cells</i>	komórki zwojowe siatkówki
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>	krzywa charakterystyczno-operacyjna odbiornika
SE	<i>spherical equivalent</i>	ekwiwalent sferyczny
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>	polimorfizm pojedynczego nukleotydu
TRIS	<i>tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>	tris(hydroksymetylo)aminometan

## 2. STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU POLSKIM

Wysoka krótkowzroczność (ang. *high myopia*, HM) to niezdolność oka do tworzenia prawidłowo zogniskowanego obrazu na siatkówce, charakteryzująca się wielkością wady przekraczającą -6,0 dioptrii oraz wydłużeniem gałki ocznej powyżej 26 mm. Etiologia HM warunkowana jest przez czynniki środowiskowe jak i genetyczne. Dotychczas zidentyfikowano liczne *loci*, geny i warianty sekwencji powiązane z HM w poszczególnych populacjach i rodzinach, jednak niewiele wiadomo o genetycznych i epigenetycznych przyczynach powstawania HM w populacji polskiej.

Celem pracy doktorskiej była identyfikacja nowych czynników genetycznych i epigenetycznych w etiologii HM u polskich pacjentów. Materiałem do badań z wykorzystaniem technik biologii molekularnej było DNA z krwi obwodowej członków polskich rodzin z HM oraz polskich dzieci z HM i bez HM jako grupy kontrolnej.

W ramach pracy doktorskiej opracowano dane kliniczne członków polskich rodzin z HM. Poprzez weryfikację sekwencjonowaniem metodą Sangera oraz analizą segregacji wybranych wyników sekwencjonowania eksomowego DNA członków siedmiu rodzin z HM zidentyfikowano warianty sekwencji w genie *ABCC6* oraz *FLRT3* i *SLC35E2B*, jako segregujące z fenotypem HM w poszczególnych rodzinach. Analiza wybranych wariantów sekwencji nie wykazała segregacji z długością osiową gałki ocznej, ciśnieniem wewnątrzgałkowym i krzywizną rogówki oraz HM w badanych czterech rodzinach. Na podstawie wyników analizy całogenomowej metylacji DNA polskich dzieci z HM i dzieci bez HM zidentyfikowano hiper- i hipometylowane dinukleotydy CpG w regionach okołopromotorowych genów *GSTMI*, *LCE3C*, *FARP2* oraz *SORBS2*, *TANCI*, *ATXN1*, *ADAM20* oraz kilka wzbogaconych ścieżek sygnałowych i procesów biochemicznych.

Analizy statystyczne danych klinicznych potwierdziły słuszność przyjętego kryterium podziału badanych osób na grupy według wielkości wady sferycznej i długości osiowej gałki ocznej. Warianty w genach *ABCC6*, *FLRT3* i *SLC35E2B* mogą warunkować HM w badanych rodzinach, podczas gdy wielkość parametrów okulistycznych może zależeć od innych niż analizowane czynniki genetycznych. Hiper- i hipometylacja DNA może powodować wyciszenie/nadekspresję genów i wraz ze wzbogaconymi ścieżkami sygnałowymi/procesami odgrywać rolę w etiologii HM u badanych dzieci. Przedstawione wyniki potwierdzają złożoność podłoża genetycznego i epigenetycznego HM w rodzinach i u dzieci z populacji polskiej.



### 3. STRESZCZENIE PRACY W JĘZYKU ANGIELSKIM

High myopia (HM) is a disorder in which the light entering the eye is not focused correctly on a retina. It is characterized by a refractive error greater than -6.0 dioptres and axial length exceeding 26.0 mm. HM etiology is caused by environmental and genetic factors. Numerous loci, candidate genes and sequence variants related to HM have been identified in specific populations and families, however, little is known about genetic and epigenetic causes of HM in Polish population.

The aim of the PhD thesis was identification of novel genetic and epigenetic factors in HM etiology in Polish patients. Experimental procedures with the use of molecular biology techniques were conducted on DNA extracted from peripheral blood samples from members of Polish HM families, Polish children with HM, and children without HM as control group.

As a part of PhD thesis the statistical assessment of clinical data of Polish HM families' members was performed. Sequence variants in *ABCC6* and *FLRT3*, *SLC35E2B* genes segregating with HM phenotype in specific families were identified by Sanger sequencing and segregation analyses verification of chosen exome sequencing results conducted on DNA from HM families. The analyses of selected sequence variants did not reveal the segregation with axial length, intraocular pressure, corneal curvature, and HM in studied four families. Based on the genome-wide methylation results on DNA of Polish HM children and children without HM hyper- and hypomethylated CpG dinucleotides in promoter regions of *GSTM1*, *LCE3C*, *FARP2*, and *SORBS2*, *TANCI*, *ATXN1*, *ADAM20* genes and several enriched molecular pathways/processes were identified.

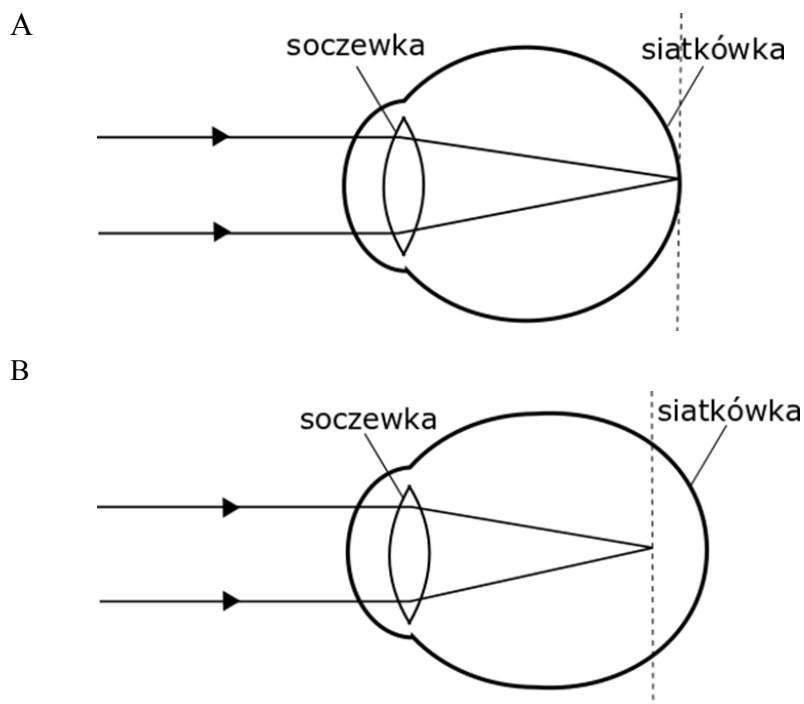
Statistical analyses of clinical data confirmed the correctness of dividing the families' members into subgroups according to refractive error and axial length criteria. Variants in *ABCC6*, *FLRT3*, and *SLC35E2B* genes could cause HM in the assessed families, but other than chosen for evaluation sequence variants could contribute to the ophthalmological parameters values. DNA hyper- and hypomethylation could contribute to gene silencing/overexpression and together with the enriched molecular pathways/processes impact the HM etiology in Polish children. Presented results confirm the complexity of genetic and epigenetic background of HM in families and children from Polish population.

## 4. WSTĘP

### 4.1. Zasada tworzenia obrazu widzianych przedmiotów

Oko jest narządem zmysłu, którego funkcją jest rejestrowanie i przekształcanie bodźców świetlnych we wrażenia wzrokowe. Za powstawanie obrazu odpowiada kilka części składowych oka: rogówka, ciecz wodnista, soczewka i ciało szkliste, stanowiące układ optyczny oka. Wiązka promieni świetlnych, po przejściu przez układ optyczny oka, powinna ogniskować się w płaszczyźnie siatkówki, dając wyraźny, pomniejszony i obrocony o  $180^{\circ}$  obraz (Rycina 1A) [1]. Nieprawidłowa budowa któregośkolwiek z elementów układu optycznego oka powoduje zaburzenie jakości widzenia.

Krótkowzroczność jest wadą charakteryzującą się niezdolnością oka do tworzenia prawidłowego obrazu na skutek ogniskowania załamanej wiązki promieni świetlnych przed siatkówką (Rycina 1B) [1]. Przyczynami nieprawidłowego skupiania się promieni świetlnych może być wydłużenie gałki ocznej lub zbyt duży współczynnik załamania światła przez układ optyczny oka [1].



**Rycina 1.** Schemat tworzenia się obrazu oddalonych obiektów w oku prawidłowym (A) i w oku z krótkowzrocznością (B).

Istnieje kilka typów klasyfikacji krótkowzroczności, które przedstawiono w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Typy klasyfikacji krótkowzroczności [2]

Typ klasyfikacji	Kategorie krótkowzroczności
stopień	niska (< -3,00 D)
	średnia (-3,0 – -6,0 D)
	wysoka (> 6,0 D)
początek choroby	wrodzona (od urodzenia)
	młodzieńcza (< 20 roku życia)
	dorosłych wczesna (2 – 40 roku życia)
	dorosłych późna (> 40 roku życia)
przebieg kliniczny	prosta (< -6 D, bez zmian patologicznych)
	zmierzchowa (występuje o zmierzchu)
	zwyrodnieniowa (tzw. patologiczna, ze zmianami na dnie oka)
	wywołana (farmakologicznie, zmianami poziomu cukru we krwi, zaćmą) pseudokrótkowzroczność (spowodowana nadmierną akomodacją oka)

#### **4.2. Charakterystyka kliniczna wysokiej krótkowzroczności**

Wysoka krótkowzroczność (ang. *high myopia*, HM), oprócz wielkości wady równej lub przekraczającej -6,0 dioptrii (D), charakteryzuje się wydłużeniem gałki ocznej powyżej 26 mm [2]. Wydłużanie gałki ocznej może prowadzić do mechanicznego rozciągania i ścieńczenia siatkówki, naczyniówki oraz twardówki [3,4]. Rozciąganie siatkówki może powodować charakterystyczne dla jaskry uszkodzenia włókien nerwowych, a tym samym, nawet przy niskim ciśnieniu wewnątrzgałkowym (ang. *intraocular pressure*, IOP), rozwój samej jaskry [4]. Inne patologiczne zmiany w przednim odcinku i na dnie oka powiązane z występowaniem HM i znacząco pogarszające widzenie to spłaszczenie rogówki, zaćma, zmiany w ciele szklistym, zwyrodnienia siatkówki obwodowej, odwarstwienie siatkówki, zwyrodnienia plamki żółtej, zaniki siatkówkowo-naczyniówkowe, krótkowzroczne zaniki okołotarczowe, zwężenie naczyń włosowatych prowadzące do ich niedrożności bądź zaniku oraz garbiak tylny twardówki [4–6].

#### **4.3. Epidemiologia krótkowzroczności i wysokiej krótkowzroczności**

Dane epidemiologiczne na temat krótkowzroczności i HM są zróżnicowane i zależą w dużym stopniu od pochodzenia etnicznego pacjentów. Na podstawie badań

epidemiologicznych z 2000 roku oszacowano, że 22,9% (~ 1,4 mld) populacji ludzkiej jest obciążona krótkowzrocznością, a u ok. 2,7% (163 mln) ludzi stwierdzono HM [7]. Przewiduje się, że do 2050 roku prawie połowa populacji ludzkiej (49,8%) będzie miała krótkowzroczność, a 9,8% HM [7].

Wśród osób pochodzenia europejskiego, w przedziale wiekowym pomiędzy 44 a 81 rokiem życia, 30,6% badanych było obciążonych krótkowzrocznością, a 2,7% HM [8]. W populacji polskiej krótkowzroczność stwierdzono aż u 24,1% z 998 badanych osób w wieku powyżej 35 roku życia [9]. W literaturze brakuje dokładnych danych epidemiologicznych dotyczących częstości występowania HM wśród dorosłych Polaków. HM wykryto natomiast wśród 0,06–0,42% dzieci uczących się w szkołach podstawowych i średnich; w Poznaniu odsetek uczniów z HM stanowił 0,06% [10,11]. Ponadto, HM uznano za główną przyczynę utraty wzroku aż u 11,84% dzieci zarejestrowanych w Stowarzyszeniu Niewidomych i Słabowidzących w latach 1979–1999 [12].

#### **4.4. Czynniki środowiskowe warunkujące powstawanie krótkowzroczności**

Do czynników środowiskowych zwiększających ryzyko powstawania krótkowzroczności zaliczane są czynności wymagające długotrwałej akomodacji oka, takie jak praca z bliska, czytanie, pisanie czy praca przy komputerze [13–15]. Wykazano, że wraz ze wzrostem ilości czasu poświęconego na wyżej wymienione czynności wzrasta wielkość krótkowzrocznej wady refrakcji u dzieci w wieku szkolnym [14,15]. Wyższy poziom wykształcenia związany z większą ilością czasu poświęconego na naukę z książek czy pracę przy komputerze [16] oraz zwiększony stopień urbanizacji [17] także podwyższają ryzyko wystąpienia krótkowzroczności. Ludzie posiadający wyższe wykształcenie są częściej obciążeni krótkowzrocznością niż osoby z wykształceniem podstawowym [16,18]. U dzieci mieszkających w dużych miastach krótkowzroczność występuje częściej niż u tych mieszkających na przedmieściach miast czy na wsiach [17,19,20].

Ze zdobywaniem wyższego wykształcenia oraz urbanizacją wiąże się także zwiększona ekspozycja na sztuczne oświetlenie, będąca kolejnym czynnikiem podwyższającym ryzyko wystąpienia HM [21]. Dzieci przebywające głównie w domu przy sztucznym świetle, miały dłuższe gałki oczne i wyższe ryzyko pojawienia się krótkowzroczności niż dzieci, które spędzały więcej czasu na aktywności fizycznej na świeżym powietrzu w naturalnym oświetleniu [13,22,23].

Innym czynnikiem środowiskowym warunkującym rozwój krótkowzroczności jest dieta z nadmiernym spożyciem węglowodanów [24].

#### 4.5. Czynniki genetyczne w krótkowzroczności

Wyniki badań naukowych potwierdzają udział czynników genetycznych w warunkowaniu krótkowzroczności oraz HM. Wśród bliźniąt mono- i dizygotycznych odziedziczalność krótkowzroczności szacowana była na poziomie 0,08 – 0,14 [25], a nawet 0,98 [26], natomiast w populacji ogólnej wynosi pomiędzy 0,60 a 0,80 [27]. Różnice w wielkościach odziedziczalności mogą wynikać ze stosowania odmiennych technik i metod analizy danych oraz zróżnicowania pochodzenia etnicznego badanej populacji. Na odziedziczalność mogą znacząco wpływać czynniki środowiskowe, gdyż różnorodność fenotypów zależna od czynników genetycznych może być wysoka w miejscach, gdzie czynniki środowiskowe są ograniczone, a niska w tych, gdzie wpływ środowiska odgrywa główną rolę [27].

Guggenheim i wsp. na podstawie danych pochodzących od 31 duńskich rodzin oszacowali odziedziczalność HM na 0,65 dla prawego i 0,68 dla lewego oka [28,29]. Z tych samych danych obliczono współczynnik ryzyka wystąpienia HM u rodzeństwa probantów jako równy 20,0 [28,29]. Natomiast wśród angielskich pacjentów z HM oszacowano ten współczynnik na 4,9 [30]. Ryzyko wystąpienia HM u rodzeństwa pacjentów z HM, których rodzice nie byli obarczeni HM było niższe (ok. 6%) niż u rodzeństwa pacjentów z przynajmniej jednym rodzicem z HM (ok. 14%) [30].

##### 4.5.1. *Loci* krótkowzroczności i wysokiej krótkowzroczności

Poprzez analizy sprzężeń i badania genów kandydatów zidentyfikowano wiele *loci* powiązanych z HM w pojedynczych rodzinach i/lub populacjach. W bazie Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) jak dotąd zamieszczono 25 *loci* (Tabela 2) [31–43]. W ostatnich latach wykazano i potwierdzono także asocjację krótkowzroczności i HM z *locus* w 15q14, zarówno w populacjach rasy kaukaskiej jak i azjatyckiej, które nie zostało wymienione w bazie danych OMIM [44–48]. W wyniku przeprowadzenia analizy sprzężeń w rodzinach polskich, w jednej z badanych rodzin zidentyfikowano trzy nowe regiony chromosomowe dla HM: 7p22.1–7p21.1, 7p12.3–7p11.2 i 12p12.3–12p12.1, w których znajdowało się wiele genów, które mogłyby potencjalnie warunkować HM w tej rodzinie [49].

**Tabela 2.** *Loci* krótkowzroczności i wysokiej krótkowzroczności (pogrubione) ujęte w bazie Online Mendelian Inheritance in Man

Nazwa <i>locus</i>	Lokalizacja	Numer OMIM	Geny kandydaci
MYP1	Xq28	310460	
<b>MYP2</b>	18p11.31	160700	<i>TGIF (TGIF1)</i>
<b>MYP3</b>	12q21-q23	603221	<i>IGF1, LUM</i>
<b>MYP5</b>	17q21-q22	608474	<i>COL1A1</i>
MYP6	22q13	608908	<i>SCO2</i>
MYP7	11p13	609256	<i>PAX6</i>
MYP8	3q26	609257	<i>MFN1</i>
MYP9	4q12	609258	
MYP10	8p23	609259	
<b>MYP11</b>	4q22-q27	609994	
<b>MYP12</b>	2q37.1	609995	
<b>MYP13</b>	Xq23-q27	300613	
MYP14	1p36	610320	
<b>MYP15</b>	10q21.1	612717	
<b>MYP16</b>	5p15.33-p15.2	612554	
<b>MYP17*</b>	7p15	608367	
<b>MYP18</b>	14q22.1-q24.2	255500	
<b>MYP19</b>	5p15.1-p13.3	613969	<i>CTNND2</i>
<b>MYP20</b>	13q12.12	614166	
MYP21	1p22	614167	<i>ZNF644</i>
MYP22	4q35	615420	<i>CCDC111</i>
MYP23	4p16	615431	<i>LRPAP1</i>
MYP24	12q13	615946	<i>SLC39A5, COL2A1</i>
MYP25	5q31	617238	<i>P4HA2</i>
MYP26	Xq13	301010	<i>ARR3</i>

\*pierwotnie opisany jako MYP4

#### 4.5.2. Geny kandydaci powiązane z wysoką krótkowzrocznością

Rozpoznano liczne *loci*, geny i warianty sekwencji powiązane z HM, jednak były one charakterystyczne tylko dla badanych populacji, a nawet opisane jako warunkujące lub możliwie warunkujące HM w poszczególnych rodzinach. Geny asocjowane w badaniach asocjacyjnych całego genomu (ang. *genome-wide association study*, GWAS) lub powiązane z HM w innych analizach zebrano w Tabeli 3, jednakże zależności te nie zostały potwierdzone w innych badaniach prowadzonych w różnych

populacjach [50–56]. Z powodu braku jednoznacznych dowodów nie można uznać tych genów kandydatów za warunkujące krótkowzroczność lub HM w populacji ogólnej.

**Tabela 3.** Geny kandydaci powiązane z wysoką krótkowzrocznością, ze wskazaniem kodowanych białek, lokalizacji chromosomowej oraz odniesień literaturowych

<b>Gen</b>	<b>Nazwa kodowanego białka*</b>	<b>Lokalizacja</b>	<b>Referencja</b>
<i>ARR3</i>	arrestin 3	Xq13.1	[57]
<i>COL1A1</i>	collagen type I alpha 1 chain	17q21.33	[58]
<i>COL2A1</i>	collagen type II alpha 1 chain	12q13.11	[59]
<i>CRYBA4</i>	crystallin beta A4	22q12.1	[60]
<i>CTNND2</i>	catenin delta 2	5p15.2	[61–63]
<i>FGF2</i>	fibroblast growth factor 2	4q28.1	[64]
<i>HGF</i>	hepatocyte growth factor	7q21.11	[65–67]
<i>IGF1</i>	insulin like growth factor 1	12q23.2	[68–70]
<i>LRPAP1</i>	LDL receptor related protein associated protein 1	4p16.3	[71–73]
<i>LUM</i>	lumican	12q21.33	[74–76]
<i>MYOC</i>	myocilin	1q24.3	[77]
<i>P3H2</i>	prolyl 3-hydroxylase 2	3q28	[78–80]
<i>P4HA2</i>	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2	5q31.1	[81,82]
<i>PAX6</i>	paired box 6	11p13	[83–86]
<i>PRIMPOL</i>	primase and DNA directed polymerase	4q35.1	[87,88]
<i>RASGRF1</i>	Ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 1	15q25.1	[89,90]
<i>RPGR</i>	retinitis pigmentosa GTPase regulator	Xp11.4	[78,91,92]
<i>SCO2</i>	SCO cytochrome c oxidase assembly protein 2	22q13.33	[72,93,94]
<i>SLC39A5</i>	solute carrier family 39 member 5	12q13.3	[72,73,78,95]
<i>TGFB1</i>	transforming growth factor beta 1	19q13.2	[96]
<i>TGFB2</i>	transforming growth factor beta 2	1q41	[97–99]
<i>TGIF</i>	TGFB induced factor homeobox 1	18p11.31	[100]
<i>UMODL1</i>	uromodulin like 1	21q22.3	[101]
<i>ZNF644</i>	zinc finger protein 644	1p22.2	[102,103]

\*nazwy białek zgodne z nomenklaturą z bazy HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute (HGMC)

Metlapally i wsp. wykazali związek pomiędzy fenotypem HM a trzema polimorfizmami pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphisms*,

SNPs) rs6214, rs10860860 i rs2946834 w obrębie genu *IGF1* (OMIM:147440) [69]. Rydzanicz i wsp. nie potwierdzili związku tych trzech SNPs z fenotypem HM i innymi fenotypami krótkowzroczności w rodzinach polskich [104]. Ponadto w badaniach prowadzonych w innych rodzinach polskich nie potwierdzono, że heterozygotyczność wariantów genu *SCO2* jest powiązana z HM w tych rodzinach [55].

#### 4.5.3. Czynniki genetyczne warunkujące długość osiową gałki ocznej, ciśnienie wewnątrzgałkowe i krzywiznę rogówki

Dane literaturowe wskazują na uwarunkowanie genetyczne wartości długości osiowej gałki ocznej (ang. *axial length*, AL), IOP i krzywizny rogówki (ang. *corneal curvature*, CC) u osób pochodzenia europejskiego oraz azjatyckiego. SNPs rozpoznane w analizach GWAS, jako powiązane z AL, IOP i CC u osób pochodzenia europejskiego i azjatyckiego w innych analizach zaprezentowano w Tabelach 4 – 6. Dotychczas nie prowadzono badań genetycznych nad AL, IOP i CC w rodzinach polskich z HM.

**Tabela 4.** Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu powiązane z wartościami długości osiowej gałki ocznej w analizach GWAS i genotypowaniach

SNP	Gen (odległość powyżej miejsca inicjacji transkrypcji/ lokalizacja)	Kodowane białko*	Lokalizacja chromosomowa	Referencje
<b>Meta-analiza analiz GWAS</b>				
rs12193446	<i>LAMA2</i> (intron)	laminin subunit alpha 2	6q22.33	[105]
rs4074961	<i>RSPO1</i> (intron)	R-spondin 1	1p34.3	[105]
<b>Sekwencjonowanie SNaPshot</b>				
rs4074961	<i>RSPO1</i> (intron)	R-spondin 1	1p34.3	[106]
rs994767	<i>ZC3H11B</i> (5,8 kpz)	zinc finger CCCH-type containing 11B pseudogene	1q41	[106]
rs11073058	<i>GJD2</i> (55 kpz)	gap junction protein delta 2	15q14	[106]
<b>Genotypowanie SNP przy użyciu sond TaqMan lub mikromacierzy</b>				
rs9811920	<i>CMSS1</i> (intron)	Cms1 ribosomal small subunit homolog (yeast)	3q12.1	[45]
rs12321	<i>ZNRF3</i> (ekson)	zinc and ring finger 3	22q12.1	[45]
rs634990	<i>GJD2</i> (38,6 kpz)	gap junction protein delta 2	15q14	[45,46]
rs8032019	<i>GJD2</i> (53 kpz)	gap junction protein delta 2	15q14	[45,46]
rs560766	<i>GJD2</i> (43,7 kpz)	gap junction protein delta 2	15q14	[46]

\*nazwy białek zgodne z nomenklaturą z bazy HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute (HGMC)



**Tabela 5.** Warianty sekwencji powiązane z wartościami ciśnienia wewnątrzgałkowego, rozpoznane w analizach GWAS lub mikromacierzach eksonowych

SNP	Gen (lokalizacja)	Kodowane białko*	Lokalizacja chromosomowa	Referencje
<b>Analizy GWAS</b>				
rs7555523	<i>TMCO1</i> (intron)	transmembrane and coiled-coil domains 1	1q24.1	[107,108]
rs58073046	<i>ARHGEF12</i> (intron)	Rho guanine nucleotide exchange factor 12	11q23.3	[109]
<b>Mikromacierze eksonowe</b>				
rs52809447	<i>GGA3</i> (ekson)	golgi associated, gamma adaptin ear containing, ARF binding protein 3	17q25.1	[110]
rs7291444	<i>PKDREJ</i> (ekson)	polycystin family receptor for egg jelly	22q13.31	[110]

\*nazwy białek zgodne z nomenklaturą z bazy HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute (HGMC)

**Tabela 6.** Warianty sekwencji powiązane z wartościami krzywizny rogówki, rozpoznane w analizach GWAS

SNP	Gen (odległość poniżej miejsca inicjacji transkrypcji/lokalizacja)	Kodowane białko*	Lokalizacja chromosomowa	Referencje
rs2114039	<i>PDGFRA</i> (2,6 kpz)	platelet derived growth factor receptor alpha	4q12	[111,112]
rs6554163	<i>PDGFRA</i> (intron)		4q12	[113]

\*nazwy białek zgodne z nomenklaturą z bazy HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute (HGMC)

#### 4.6. Czynniki epigenetyczne w krótkowzroczności

Metylacja DNA jest procesem epigenetycznym, który reguluje ekspresję genów bez zmiany sekwencji DNA. Polega na kowalencyjnym przyłączeniu grupy metylowej do zasad azotowych nukleotydów, głównie cytozyny w dinukleotydach CpG (dinukleotyd cytydyna–fosforan–ganozyna), przez metylotransferazy [114,115]. Metylacja cytozyny w wyspach CpG, regionach DNA bogatych w dinukleotydy CpG zlokalizowanych zazwyczaj w regionach promotorowych genów, bierze udział w regulacji ekspresji genów [114–116]. Znaczne podwyższenie poziomu metylacji (hipermetylacja), głównie promotora, powoduje wyciszenie genu [115,117]. Hipermetylacja może prowadzić także do inhibicji ekspresji niektórych czynników regulatorowych lub genów supresorowych czy zahamowania aktywności polimerazy

[117]. Natomiast, znaczne obniżenie poziomu metylacji (hipometylacja) może prowadzić do nadekspresji genów. Metylacja odgrywa kluczową rolę w wielu procesach zachodzących w komórce jak inaktywacja chromosomu X czy genomowy odcisk (tzw. imprinting rodzicielski) [114,117]. Jak dotąd ukazało się niewiele prac dotyczących roli metylacji w krótkowzroczności. Zhou i wsp. wykazali, że sześć dinukleotydów CpG w promotorze i eksonie 1 (regionie okołopromotorowym) genu *Coll1a1* było hipermetylowanych i poziom mRNA był znacznie obniżony w twardówce oka myszy z krótkowzrocznością, wywołaną za pomocą soczewki dyfuzyjnej, w stosunku do oka kontrolnego [118]. Autorzy sugerują, że hipermetylacja dinukleotydów CpG w regionie okołopromotorowym genu *Coll1a1* obniża syntezę kolagenu w twardówkach, co może prowadzić do krótkowzroczności [118].

W badaniach Hsi i wsp. zmierzono poziom metylacji elementu LINE-1 (ang. *long interspersed nucleotide element 1*), aby określić poziom całogenomowej metylacji DNA pacjentów z HM [119]. LINE-1 jest długą rozproszoną sekwencją DNA o długości ok. 6,1 kpz i występującą w genomie w liczbie 3500 kopii pełnej długości. Poziom metylacji elementu LINE-1 był znacząco wyższy w krwi 220 chińskich pacjentów z HM niż u 220 osób bez HM [119]. Prowadzono także badania na myszach z krótkowzrocznością, wywołaną przez założenie gogli dyfuzyjnych, w celu sprawdzenia czy poziom metylacji LINE-1 w leukocytach krwi obwodowej oddaje poziom metylacji LINE-1 w tkankach oka. Wykryto wysoki poziom metylacji zarówno w krwi obwodowej jak i siatkówce i twardówce [119].

W kolejnych badaniach Seow i wsp. zidentyfikowali pięć dinukleotydów CpG (cg21880079, cg14066632, cg03155767, cg17154092, cg26299044) hipometylowanych u dzieci z krótkowzrocznością w porównaniu do dzieci bez krótkowzroczności, które mogą być powiązane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju krótkowzroczności wczesnej [120]. Materiał genetyczny pozyskano z pępowiny 29 dzieci z krótkowzrocznością i 490 dzieci bez krótkowzroczności pochodzących z Chin, Malezji i Indii. Badania okulistyczne w celu stwierdzenia krótkowzroczności wykonano, gdy dzieci te ukończyły trzeci rok życia. Dwa dinukleotydy CpG zostały zidentyfikowane w regionach międzygenowych 8p23 oraz 12q23.2, a pozostałe trzy w genach *FGB*, *PQLC1* i *KRT12*. Wykazano ekspresję *PQLC1* i *KRT12* w rogówkach, twardówkach, a także w embrionalnych tkankach ocznych ludzi i myszy [120].

#### 4.7. Uzasadnienie podjęcia tematu rozprawy doktorskiej

Obecnie niewiele wiadomo na temat uwarunkowań genetycznych i epigenetycznych HM w populacji polskiej jak i na świecie, co utrudnia wytłumaczenie mechanizmów powstawania HM. We wcześniejszych badaniach zespołu zidentyfikowano trzy nowe *loci* HM: 7p22.1–7p21.1, 7p12.3–7p11.2 i 12p12.3–12p12.1, w obrębie których znajdowało się wiele genów [49]. Badano także związek trzech SNP rs6214, rs10860860 i rs2946834 w obrębie genu *IGF1* z fenotypem HM w 42 rodzinach polskich, jednak nie wykazano żadnej istotnej zależności [104].

Z tych 42 rodzin polskich 20 było przedmiotem badań niniejszej rozprawy doktorskiej. W pracy doktorskiej założono opracowanie oraz analizę statystyczną danych klinicznych członków badanych rodzin. Brak opracowania stanowił podstawę do oszacowania zależności między parametrami okulistycznymi a HM wśród pacjentów.

Następnie przeprowadzono sekwencjonowanie eksomowe (ang. *exome sequencing*, ES) w celu identyfikacji wariantów sekwencji warunkujących HM, co było pierwszą taką analizą w rodzinach polskich w zakresie krótkowzroczności. Jak dotąd na świecie prowadzono podobne badania rodzin rasy azjatyckiej i kaukaskiej [72,121,122]. Technika ES pozwala na poznanie eksomu, czyli sekwencji kodujących ludzkiego genomu. Walidacja wyników ES sekwencjonowaniem metodą Sangera oraz analizą segregacji była przedmiotem pracy doktorskiej.

Dane literaturowe wskazują na uwarunkowanie genetyczne wartości AL, IOP i CC u osób pochodzenia europejskiego oraz azjatyckiego, jednak dotychczas nie prowadzono badań genetycznych nad tymi parametrami okulistycznymi w rodzinach populacji polskiej z HM. Dlatego w niniejszej pracy podjęto się próby identyfikacji wariantów sekwencji warunkujących dane parametry okulistyczne i HM w rodzinach polskich.

Wykonano także analizę całogenomowej metylacji DNA u polskich dzieci by poszerzyć wiedzę dotyczącą genetycznego podłoża HM o aspekty epigenetyczne [123]. Badanie to również było pierwszą taką analizą wykonaną w rodzinach populacji polskiej. W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono analizę wyników całogenomowej metylacji DNA w celu identyfikacji genów, ścieżek sygnałowych czy procesów zaangażowanych w patogenezę HM.

Nieznaczna ilość badań prowadzonych w populacji polskiej oraz ograniczona wiedza dotycząca HM w Polsce i na świecie były podstawą do podjęcia próby poznania kolejnych genetycznych i epigenetycznych przyczyn HM u polskich pacjentów z HM. Identyfikacja nieznanymi jak dotąd uwarunkowań HM, może przynieść korzyści dla pacjentów, lekarzy, a także naukowców pracujących nad krótkowzrocznością.

## **5. CEL NAUKOWY PROWADZONYCH BADAŃ**

Celem pracy doktorskiej była identyfikacja nowych czynników genetycznych i epigenetycznych zaangażowanych w etiologię wysokiej krótkowzroczności u polskich pacjentów.

### **CELE SZCZEGÓŁOWE**

1. Opracowanie danych klinicznych pozyskanych od członków polskich rodzin z dziedziczną wysoką krótkowzrocznością, z uwzględnieniem statystyki opisowej, testowej i analizy korelacji parametrów okulistycznych.

2. Weryfikacja wybranych wyników sekwencjonowania eksomowego, przeprowadzonego na DNA członków rodzin z wysoką krótkowzrocznością, poprzez sekwencjonowanie metodą Sanger'a oraz analizy segregacji.

3. Analiza segregacji wybranych wariantów sekwencji DNA z fenotypem wysokiej krótkowzroczności, a w szczególności z wartościami długości osiowej gałki ocznej, ciśnienia wewnątrzgałkowego oraz krzywizny rogówki.

4. Identyfikacja genów, ścieżek sygnałowych i procesów mogących mieć znaczenie w etiologii wysokiej krótkowzroczności na podstawie wyników analizy całogenomowej metylacji DNA u polskich dzieci z wysoką krótkowzrocznością.

## **6. MATERIAŁY**

### **6.1. Pacjenci i materiał biologiczny**

W badaniach wzięły udział rodziny z populacji polskiej, w których u przynajmniej dwóch osób zdiagnozowano wysoką krótkowzroczność. Do analizy fenotypowej (cel szczegółowy 1) z dostępnych 42 rodzin polskich wybrano 20 (HM-30, HM-31, HM-32, HM-33, HM-34, HM-37, HM-39, HM-44, HM-49, HM-70, HM-71, HM-72, HM-73, HM-74, HM-75, HM-76, HM-77, HM-78, HM-80, HM-81), które uprzednio nie stanowiły elementu analizy fenotypowej. Natomiast do ES wyselekcjonowano sześć z wymienionych rodzin (HM-33, HM-76, HM-77, HM-78, HM-80, HM-81) oraz rodzinę HM-14. Rodzina HM-14 została uprzednio przedstawiona w rozprawie doktorskiej lek. med. Agaty Frajdenberg zrealizowanej w Katedrze Okulistyki i Klinice Okulistycznej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w 2008 roku [124] i w związku z tym, wykorzystano jedynie materiał genetyczny w postaci DNA, pozyskany od członków tej rodziny, natomiast dane kliniczne nie stanowiły elementu analizy fenotypowej. Do analiz genetycznych powiązanych z AL, IOP i CC (cel szczegółowy 3) wybrano rodziny HM-32, HM-76, HM-78 i HM-80. Natomiast do badań epigenetycznych (cel szczegółowy 4) wykorzystano materiał biologiczny pozyskany od 27 polskich dzieci z HM oraz 24 dzieci bez HM stanowiących grupę kontrolną, które nie były członkami wyżej wymienionych rodzin polskich. Nie dysponowano materiałem biologicznym pochodzącym od rodziców tych dzieci.

Materiał do badań genetycznych i epigenetycznych, zarówno w przypadku rodzin jak i dzieci, stanowił DNA uprzednio wyizolowany z leukocytów krwi obwodowej.

Pacjentów rekrutowano do badań w trzech polskich instytucjach: Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (dr n. med. Agata Frajdenberg), Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku (prof. dr hab. n. med. Małgorzata Mrugacz) oraz w Wojewódzkim Szpitalu w Lesznie (dr n. med. Monika Podfigurna-Musielak). Badania zostały zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu oraz Baylor College of Medicine w Houston w Stanach Zjednoczonych. Uczestnicy zostali poinformowani o celu i przebiegu badań oraz dostarczyli pisemną zgodę na udział w badaniach, zgodnie z Deklaracją Helsińską. Zgody na udział w badaniu osób niepełnoletnich zostały

uzyskane od ich rodziców lub prawnych opiekunów. Z każdym z dostępnych członków rodzin przeprowadzono wywiady, badania okulistyczne oraz sporządzono rodowody rodzin.

## **6.2. Charakterystyka badanych grup**

Badani członkowie polskich rodzin zostali przypisani przez lekarzy okulistów do trzech grup badanych. Kryteria włączenia pacjenta do grupy pacjentów z HM (HM) obejmowały: obustronną osiową krótkowzroczność z wadą przynajmniej w jednym oku wynoszącą  $\leq -6,0$  dioptrii (D), a w drugim oku  $\leq -5,0$  D, krótkowzroczność rozpoznaną w wieku poniżej 15 roku życia oraz obecność HM u dwóch lub więcej pokoleń w rodzinie.

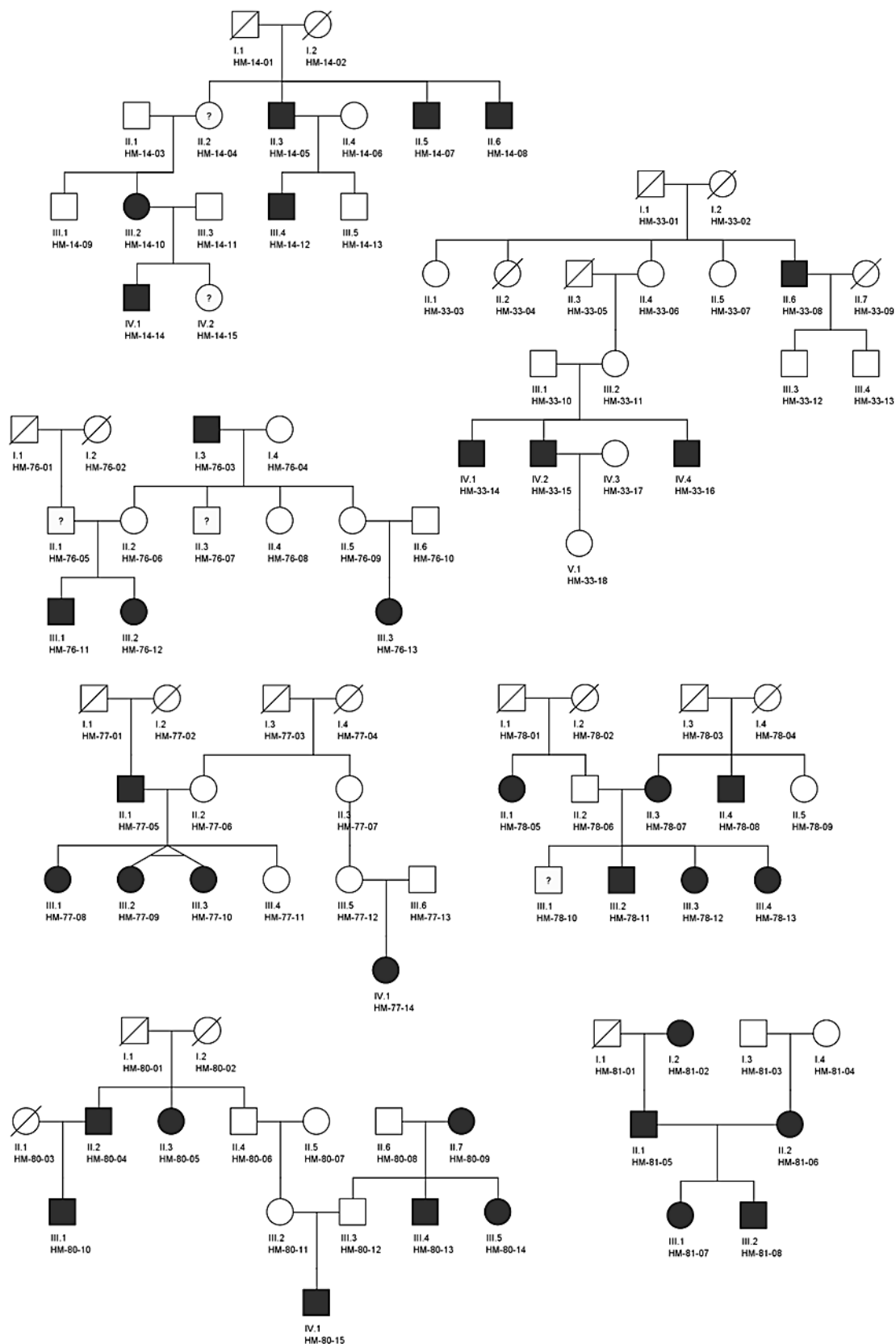
Do grupy członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (NA) kwalifikowano osoby o nieoznaczonym statusie fenotypowym oraz z krótkowzrocznością z przedziału  $-6,0 \text{ D} < X \leq -4,0 \text{ D}$ . Do wspomnianej grupy zaliczano także dzieci w wieku poniżej 15 roku życia, które nie spełniały kryteriów grupy osób z HM oraz osoby, u których krótkowzroczność została rozpoznana w wieku powyżej 15 roku życia.

Grupa członków rodzin bez HM (N) obejmowała osoby z niezdiagnozowaną HM i równocześnie niespełniające kryteriów pozostałych grup.

Kryterium włączenia dzieci z HM do analiz epigenetycznych była wielkość wady sferycznej równa lub wyższa  $-6,0 \text{ D}$  przynajmniej w jednym oku. Grupę kontrolną stanowiły dzieci bez HM.

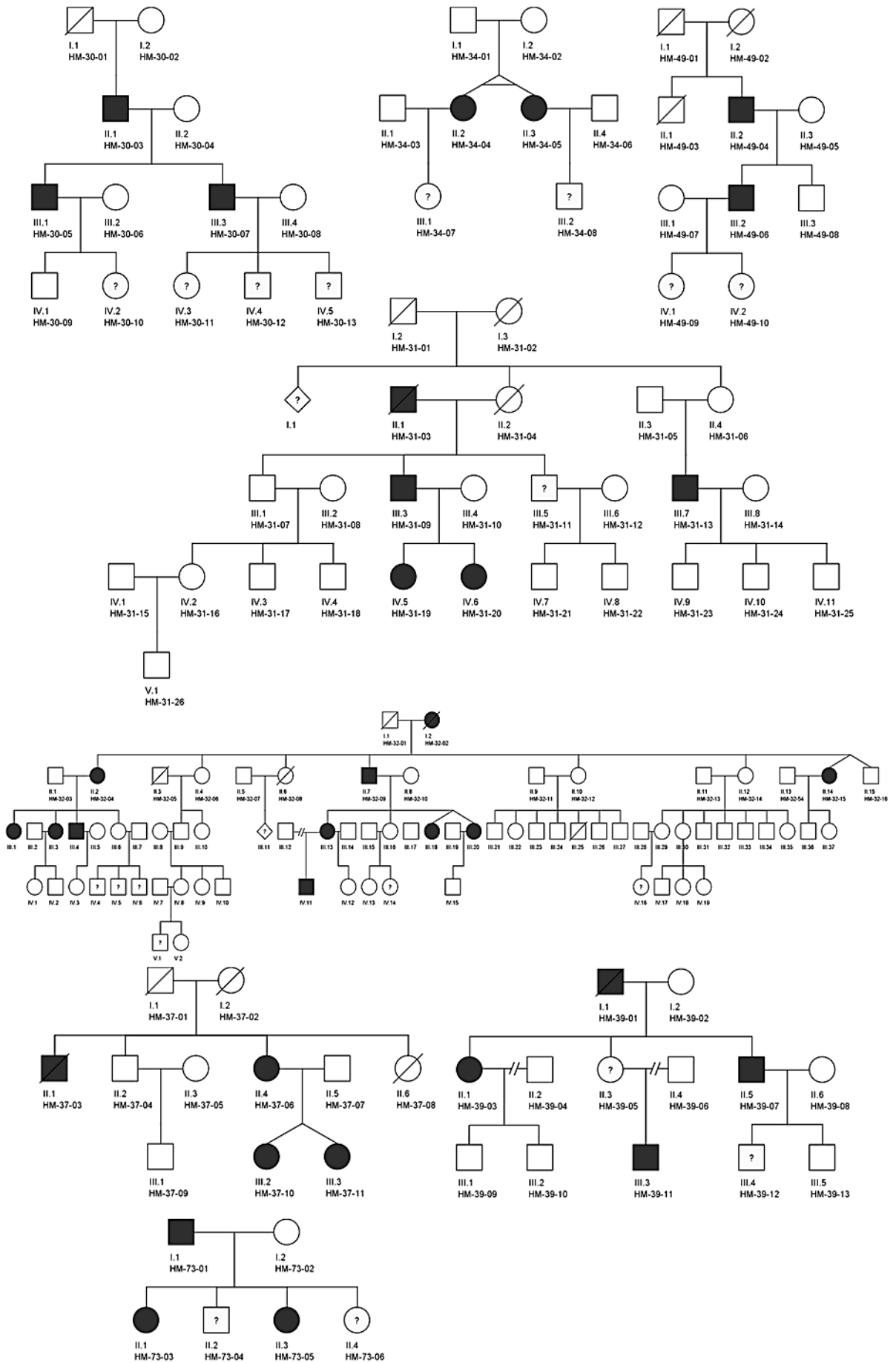
## **6.3. Rodowody rodzin polskich wybranych do analizy fenotypowej i genotypowej**

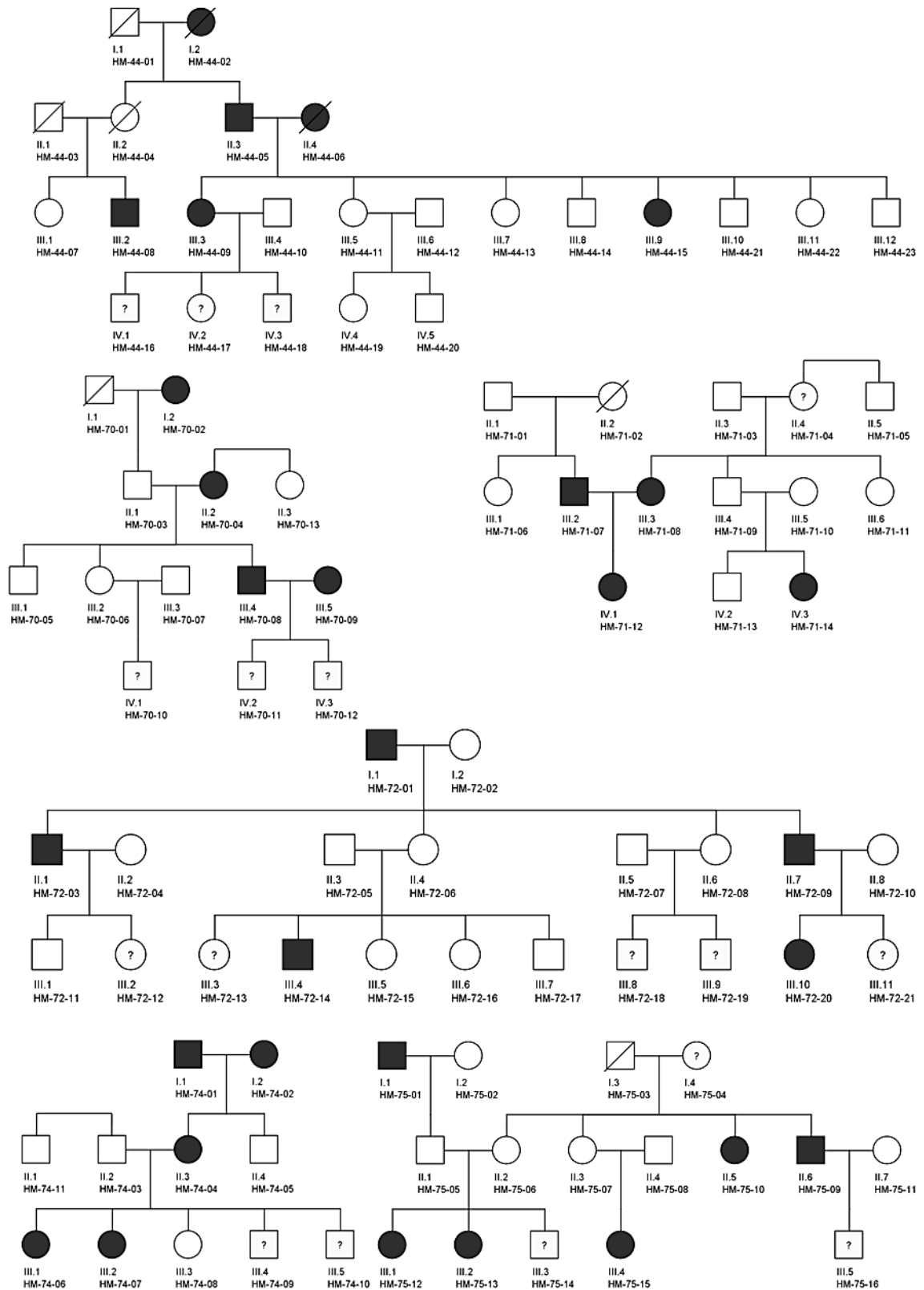
Poniżej zaprezentowano rodowody rodzin polskich HM-14, HM-33, HM-76, HM-77, HM-78, HM-80 i HM-81 zakwalifikowanych do ES (Rycina 2) oraz rodowody pozostałych rodzin, których dane kliniczne członków oraz ich materiał genetyczny został poddany analizie fenotypowej i genotypowej (Rycina 3).



**Rycina 2.** Rodowody rodzin HM-14, HM-33, HM-76, HM-77, HM-78, HM-80 i HM-81 zakwalifikowanych do analizy ES [49]. Czarne symbole oznaczają osoby z HM; białe symbolizują osoby bez HM, a członkowie z nieoznaczonym statusem choroby oznaczeni są znakiem zapytania.







**Rycina 3.** Rodowody pozostałych rodzin, których członkowie zostali poddani analizie fenotypowej i genotypowej [49]. Czarne symbole oznaczają osoby z HM; białe symbolizują osoby bez HM, a członkowie z nieoznaczonym statusem choroby oznaczeni są znakiem zapytania.

## 6.4. Odczynniki

Podczas analiz laboratoryjnych prowadzonych w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej stosowano odczynniki zestawione w Tabeli 7.

**Tabela 7.** Zestawienie odczynników stosowanych w analizach laboratoryjnych prowadzonych w ramach realizacji pracy doktorskiej

Odczynniki	Producent
<b>PCR</b>	
Polimeraza DNA <i>Taq</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Taq</i> bufor z $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<i>Taq</i> bufor z KCl	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Trifosforan deoksyrybonukleotydu (dNTP Mix)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Startery	Genomed S.A., Warszawa, Polska
Woda dejonizowana	
<b>Elektroforeza</b>	
Marker wielkości (GeneRuler DNA Ladder Mix)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Bufor obciążający (6x Loading Dye)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Agaroza	BioShop Canada Inc., Burlington, ON, Canada
Bromek etydyny	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Tris(hydroksymetylo)aminometan (TRIS)	BioShop Canada Inc., Burlington, ON, Canada
Kwas borowy	POCH, Gliwice, Polska
Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA)	BioShop Canada Inc., Burlington, ON, Canada
<b>Oczyszczanie produktów PCR</b>	
Egzonukleaza I ( <i>Exo</i> I)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Alkaliczna fosfataza ( <i>FastAP</i> <sup>TM</sup> )	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Sekwencjonowanie metodą Sangera</b>	
Zestaw BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
BigDye Terminator v3.1 5X bufor sekwencyjny	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Etanol 96%	POCH, Gliwice, Polska
Kwas etylenodiaminotetraoctowy (EDTA)	BioShop Canada Inc., Burlington, ON, Canada
Formamid Hi-Di	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

## 6.5. Aparatura i oprogramowanie

Podczas analiz laboratoryjnych wykonywanych w ramach realizacji niniejszej pracy stosowano sprzęt laboratoryjny oraz oprogramowanie zestawione w Tabeli 8.

**Tabela 8.** Zestawienie ważniejszego sprzętu laboratoryjnego i oprogramowania

Urządzenie/oprogramowanie	Producent
termocykler C1000Touch Thermal Cycler	Bio-Rad
aparat do elektroforezy PowerPac Basic	Bio-Rad
BioDoc-It Imaging System	Ultra-Violet Products
wirówka 5810 R	Eppendorf
Sequencher 5.0	GeneCodes Corporation, Ann Arbor, MI, USA

## 6.6. Bazy danych i narzędzia bioinformatyczne

W ramach realizacji pracy doktorskiej korzystano z następujących baz danych:

Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>),

HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute (HGMC) (<https://www.genenames.org/>)

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) (<https://omim.org/>)

NHLBI Exome Sequencing Project (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)

1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org>)

GeneCards: The Human Gene Database (<https://www.genecards.org/>)

UniProt (<https://www.uniprot.org/>)

ConsensusPathDB (<http://cpdb.molgen.mpg.de/>)

Wykorzystywano również poniższe narzędzia bioinformatyczne:

phyloP (<http://compgen.cshl.edu/phast/>)

SIFT (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>)

Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>)

LRT ([http://www.genetics.wustl.edu/jflab/lrt\\_query.html](http://www.genetics.wustl.edu/jflab/lrt_query.html))

PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)

Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>)

UCSC In-Silico PCR (<http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>)

OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator

(<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>)

## 7. METODY

### 7.1. Badania podmiotowe i okulistyczne

Rodziny polskie zostały poddane badaniom podmiotowym przeprowadzonym przez lekarzy okulistów. Badania obejmowały wiek rozpoznania wady, stosowaną korekcję wzroku, współistniejące i przebyte choroby narządu wzroku i choroby ogólne. Wykonano następujące badania okulistyczne:

- a. badanie ostrości wzroku do dali i bliży, za pomocą tablic Snellena, pozwalające na ocenę zdolności rozdzielczej siatkówki,
- b. obiektywną ocenę refrakcji oka z wykorzystaniem autorefraktometru,
- c. pomiar długości gałki ocznej w wymiarze przednio-tylnym,
- d. keratometrię [pomiar CCR i mocy łamiącej rogówki (ang. *corneal power*, CP)],
- e. pomiar IOP,
- f. ocenę widzenia barw za pomocą tablic Ishihary, a dla osób o znacznie obniżonej ostrości wzroku poprzez prezentację barw podstawowych: czerwonej, zielonej i niebieskiej,
- g. ocenę ustawienia gałek ocznych,
- h. ocenę przedniego odcinka i dna oka.

Z uzyskanych wyników obiektywnej oceny refrakcji oka, tj. wielkości wady sferycznej, wady cylindrycznej oraz osi, liczone ekwiwalent sferyczny (ang. *spherical equivalent*, SE).

### 7.2. Analiza statystyczna danych klinicznych członków polskich rodzin

W ramach pracy doktorskiej wykonano analizę statystyczną danych klinicznych zebranych przez lekarzy okulistów. W analizie brano pod uwagę takie parametry jak wiek pacjenta, wada sferyczna, SE, AL, CCR, CP i IOP. Porównywano między sobą trzy badane grupy, pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby. Analizowano dane kliniczne członków 20 polskich rodzin z dziedziczną HM (HM-30, HM-31, HM-32, HM-33, HM-34, HM-37, HM-39, HM-44, HM-49, HM-70, HM-71, HM-72, HM-73, HM-74, HM-75, HM-76, HM-77, HM-78, HM-80, HM-81). Badano 78 osób z grupy pacjentów z HM, 102 osoby z grupy członków rodzin bez HM i 34 osoby z grupy członków rodzin o nieoznaczonym statusie

choroby. Pacjent HM-72-07 został wykluczony z analizy ze względu na niewystarczającą ilość danych uzyskanych w trakcie badań okulistycznych. Jedynymi dostępnymi danymi u pacjenta HM-72-07 były IOP, ustawienie oczu i widzenie barw. Natomiast pacjenta HM-39-05 przypisanego początkowo przez lekarzy do grupy członków rodzin bez HM przeniesiono do grupy członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby ze względu na niespełnienie kryteriów osoby bez HM.

Testy statystyczne danych klinicznych wykonywano dla oka prawego i lewego, co dało łączną liczbę 156 obserwacji dla grupy pacjentów z HM, 204 obserwacje dla grupy członków rodzin bez HM i 68 obserwacji dla grupy członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby. Liczba obserwacji różni się w poszczególnych badaniach ze względu na brak wyników dla niektórych członków rodziny.

W celu doboru odpowiedniego testu statystycznego przeprowadzono test Shapiro-Wilka oraz test Levene'a. Test Shapiro-Wilka służy do testowania podobieństwa rozkładu zmiennych do rozkładu normalnego [125]. W pracy testowano hipotezę zerową mówiącą o tym, że rozkład zmiennej, tutaj wady sferycznej, SE, AL, CCR, CP i IOP dla oka prawego i lewego łącznie w grupach pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby, jest zbliżony do rozkładu normalnego.

Test Levene'a weryfikuje hipotezę zerową o równości wariancji w populacjach [125]. Zastosowano go w celu sprawdzenia równości wariancji pomiędzy grupami pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby pod względem wady sferycznej, SE, AL, CCR, CP i IOP dla oka prawego i lewego łącznie. Spełnienie założeń o normalności rozkładów we wszystkich k zbiorowościach oraz homogeniczność wariancji są wymagane do zastosowania parametrycznego testu jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), który służy do porównywania grup niezależnych, gdy porównywane są więcej niż dwie grupy [125]. Analizowane w ramach pracy doktorskiej dane nie spełniły kryteriów o normalności rozkładów oraz homogeniczności wariancji, dlatego stosowano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa, będący odpowiednikiem testu ANOVA niewymagającym spełnienia tych kryteriów. Test Kruskala-Wallisa, podobnie jak test ANOVA, pozwala na porównanie ze sobą dowolnej liczby grup niezależnych i jest rozszerzeniem testu U Manna-Whitneya stosowanego do porównywania tylko dwóch grup niezależnych między sobą [125]. Wynik testu wskazuje czy przynajmniej jedna z grup różni się od pozostałych, natomiast zastosowanie porównań wielokrotnych (tzw. testów post hoc)

stanowiących dodatkowe testy dla analizy wariancji określa, które grupy różnią się między sobą [125]. Dodatkowo zastosowano test Wilcoxon dla par obserwacji z korekcją Holma, który jest nieparametrycznym testem do porównywania ze sobą dwóch równolicznych próbek dających się połączyć w pary [125].

W ramach analizy statystycznej liczone także współczynnik korelacji Pearsona dla danych dotyczących poszczególnych parametrów: wady sferycznej, SE, AL, CCR, CP i IOP dla oka prawego i lewego łącznie pomiędzy grupami pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby. Współczynnik korelacji liniowej Pearsona pozwala na ocenę siły związku prostoliniowego między cechami X i Y, w którym zwiększenie wartości jednej z nich powoduje proporcjonalne zmiany średnich wartości drugiej cechy [125]. Poniżej przedstawiono zasady interpretacji wyników współczynnika korelacji Pearsona.

$r_{xy} = 0$  zmienne nie są skorelowane

$0 < r_{xy} < 0,1$  korelacja nikła

$0,1 \leq r_{xy} < 0,3$  korelacja słaba

$0,3 \leq r_{xy} < 0,5$  korelacja przeciętna

$0,5 \leq r_{xy} < 0,7$  korelacja wysoka

$0,7 \leq r_{xy} < 0,9$  korelacja bardzo wysoka

$0,9 \leq r_{xy} < 1$  korelacja prawie pełna

$r > 0$  korelacja dodatnia – gdy wartość X rośnie to Y też

$r = 0$  brak korelacji – gdy X rośnie to Y czasem rośnie a czasem maleje

$r < 0$  korelacja ujemna – gdy X rośnie to Y maleje

Wszystkie testy oraz wykresy zależności pomiędzy parametrami wykonano w środowisku R [125].

### **7.3. Weryfikacja wyników sekwencjonowania eksomowego**

Sekwencjonowanie eksomowe zostało uprzednio przeprowadzone w Human Genome Sequencing Center w Baylor College of Medicine (BCM-HGSC) z wykorzystaniem DNA pozyskanego od 17 członków wybranych z siedmiu polskich rodzin z HM (rodziny HM-14, HM-33, HM-76, HM-77, HM-78, HM-80 i HM-81) (Tabela 9) i platformy Illumina HiSeq 2000 (Illumina, Inc.) z  $\sim 90\times$  głębokością

pokrycia [126]. Uzyskane dane były dopasowywane i mapowane do sekwencji referencyjnej ludzkiego genomu (GRCh37/hg19) [127–129].

**Tabela 9.** Członkowie polskich rodzin, którzy zostali zakwalifikowani do badania sekwencjonowaniem eksomowym

<b>Rodzina</b>	<b>Pacjent</b>	<b>Fenotyp</b>
HM-14	HM-14-08	HM
	HM-14-12	HM
HM-33	HM-33-15	HM
	HM-33-16	HM
HM-76	HM-76-11	HM
	HM-76-12	HM
HM-77	HM-77-05	HM
	HM-77-09	HM
HM-78	HM-78-06	N
	HM-78-08	HM
	HM-78-12	HM
HM-80	HM-80-04	HM
	HM-80-10	HM
	HM-80-15	HM
HM-81	HM-81-05	HM
	HM-81-06	HM
	HM-81-08	HM

### 7.3.1. Analiza wyników sekwencjonowań eksomowych i wybór wariantów do weryfikacji

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzona została analiza wyników uzyskanych z ES i wybór wariantów sekwencji do weryfikacji za pomocą sekwencjonowania metodą Sangera i analiz segregacji. Warianty były filtrowane z zastosowaniem następujących kryteriów: obecność wariantu u osoby z HM i jego brak u osoby bez HM (w przypadku rodziny HM-78); wysoki stopień zakonserwowania aminokwasu według algorytmu PhyloP; częstość rzadszego allelu (ang. *minor allele frequency*, MAF) niższa niż 0,001 w NHLBI Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project i w wewnętrznej bazie danych Baylor-Hopkins Center for Mendelian Genomics (BHCMG); patogenność wariantu według minimum jednego z trzech algorytmów SIFT, Mutation Taster i PolyPhen-2 [130–133], funkcja genu powiązana z



funkcjonowaniem narządu wzroku lub stwierdzona ekspresja w oku.

### 7.3.2. Projektowanie starterów

Startery do łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) projektowano przy pomocy narzędzia Primer3Plus, a ich specyficzność i parametry weryfikowano z użyciem narzędzi UCSC In-Silico PCR oraz OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator. Synteza oligonukleotydów była przeprowadzona w firmie Genomed S.A. Dla każdego wybranego wariantu z wyników analiz ES zaprojektowano po jednej parze starterów, których sekwencje przedstawiono w Załączniku 1.

### 7.3.3. Łańcuchowa reakcja polimerazy

DNA amplifikowano w reakcjach PCR z zastosowaniem polimerazy DNA *Taq*. Reakcje PCR prowadzono w objętości 10  $\mu$ l w mieszaninie zawierającej: 1  $\mu$ l genomowego DNA (25-50 ng/ $\mu$ l), po 0,3  $\mu$ l każdego ze starterów oligonukleotydowych specyficznych dla analizowanych fragmentów (10 pM/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l *Taq* buforu z  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,8  $\mu$ l  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 0,2  $\mu$ l dNTP Mix (2,5 mM każdy), 0,15  $\mu$ l polimerazy DNA *Taq* i 6,25  $\mu$ l wody dejonizowanej. Reakcje PCR wykonywano w następujących warunkach: denaturacja wstępna 94<sup>0</sup>C, 4 min; denaturacja 94<sup>0</sup>C, 30 s; wiązanie starterów 59 - 61<sup>0</sup>C, 30 s; synteza 72<sup>0</sup>C, 30 s; 29 cykli; synteza końcowa 72<sup>0</sup>C, 4 min. Optymalizację warunków reakcji PCR prowadzono w gradiencie temperatur przy zmiennych stężeniach  $\text{MgCl}_2$  i/lub DMSO.

### 7.3.4. Rozdział elektroforetyczny

Wizualizację produktów PCR prowadzono poprzez rozdział elektroforetyczny w 1,2% żelu agarozowym. Produkty PCR mieszano z 1  $\mu$ l buforu obciążającego 6x Loading Dye i 5  $\mu$ l nakładano na żel. Jako marker wielkości posłużył GeneRuler DNA Ladder Mix. Elektroforezę prowadzono przez 35 min w temperaturze pokojowej przy stałym napięciu 120 V w obecności jednokrotnie stężonego buforu elektroforetycznego TBE w aparacie do elektroforezy PowerPac Basic. Wyniki wizualizowano przy użyciu systemu BioDoc-It Imaging System.

### 7.3.5. Sekwencjonowanie metodą Sanger

Produkty PCR inkubowano z enzymami alkaliczną fosfatazą (*FastAP<sup>TM</sup>*) i egzonukleazą I (*ExoI*) według protokołu producenta w celu usunięcia nadmiaru nieprzyłączonych starterów i trifosforanów dinukleotydów.

Produkty PCR pozyskane z amplifikacji genomowego DNA osób wcześniej poddanych analizie ES oraz pozostałych członków rodzin sekwencjonowano metodą Sanger w celu potwierdzenia wyników ES oraz analizy segregacji wybranych wariantów. PCR sekwencyjny prowadzono z użyciem zestawu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit według protokołu producenta oraz z wykorzystaniem tych samych starterów, które zaprojektowano do reakcji PCR.

DNA wytrącano za pomocą 2,5 µl 125 mM EDTA i 30 µl 96% etanolu. Reakcje inkubowano 15 min w temperaturze pokojowej, następnie wirowano 30 min w 4°C z prędkością 3000g z wykorzystaniem wirówki 5810 R. Po wirowaniu usuwano supernatant, a osad przemywano 30 µl 70% etanolu wirując 15 min w 4°C z prędkością 1600g. Etanol usuwano, osad osuszano i denaturowano 12 µl formamidu Hi-Di.

Rozdział elektroforetyczny oczyszczonych produktów reakcji PCR sekwencyjny przeprowadzany był w firmie Genomed S.A. oraz w Wydziałowej Pracowni Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu. Wyniki sekwencjonowania analizowano w programie Sequencher 5.0.

### **7.4. Analiza znanych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu powiązanych z długością osiową gałki ocznej, ciśnieniem wewnątrzgałkowym i krzywizną rogówki u pacjentów z HM**

Na podstawie analizy danych literaturowych wybrano SNPs mające potencjalne znaczenie w warunkowaniu AL, IOP i CC, które zestawiono w Tabeli 10. Dodatkowe informacje na temat wybranych SNP są zawarte w Tabelach 4 – 6 we Wstępie niniejszej rozprawy doktorskiej.

**Tabela 10.** Wybrane do analiz polimorfizmy pojedynczego nukleotydu powiązane z wartościami długości osiowej gałki ocznej, ciśnienia wewnątrzgałkowego i krzywizną rogówki

SNP	Lokalizacja genomowa (GRCh37/hg19)*	Lokalizacja chromosomowa
<b>Analiza długości osiowej gałki ocznej</b>		
rs4074961	intron <i>RSPO1</i> g.38092723G>A	1p34.3
rs994767	5,8 kpz od <i>ZC3H11B</i> g.219775432T>C	1q41
rs12193446	intron <i>LAMA2</i> g.129820038A>G	6q22.33
rs11073058	55 kpz od <i>GJD2</i> g.34989626C>A	15q14
rs634990	38,6 kpz od <i>GJD2</i> g.35006073A>G	15q14
rs9811920	intron <i>CMSS1</i> g.99844293G>A	3q12.1
rs12321	ekson <i>ZNRF3</i> g.29453193G>C	22q12.1
rs8032019	53 kpz od <i>GJD2</i> g.34991490T>C	15q14
rs560766	43,7 kpz od <i>GJD2</i> g.35000942C>T	15q14
<b>Analiza ciśnienia wewnątrzgałkowego</b>		
rs7555523	intron <i>TMCO1</i> g.165718979G>T	1q24.1
rs52809447	ekson <i>GGA3</i> g.73238508A>G	17q25.1
rs7291444	ekson <i>PKDREJ</i> g.46656246A>C g.46656246A>T	22q13.31
rs58073046	intron <i>ARHGEF12</i> g.120248493A>G	11q23.3
<b>Analiza krzywizny rogówki</b>		
rs2114039	2,6 kpz od <i>PDGFRA</i> g.55092626T>C	4q12
rs6554163	intron <i>PDGFRA</i> g.55102559T>A	4q12

\*Lokalizację polimorfizmów pojedynczego nukleotydu podano w stosunku do miejsca inicjacji transkrypcji genu

Większość wybranych SNPs umiejscowiona jest w sekwencjach intronowych lub w obrębie sekwencji niekodującej w pewnej odległości od genów, dlatego nie mogły one zostać pokryte przez ES, które pozwala na identyfikację wariantów tylko w sekwencjach kodujących. Z tego względu analizy SNPs powiązanych z AL, IOP i CC prowadzono niezależnie od uzyskanych wyników ES. Do badań nad zależnością między AL, IOP i CC a HM wybrano członków rodzin HM-32, HM-76, HM-78, HM-80 z HM, u których stwierdzono wysokie wartości odpowiednio AL, IOP i CC oraz członków bez HM i niskimi wartościami odpowiednio AL, IOP i CC.

Sekwencje starterów zaprojektowanych dla wybranych SNPs zestawiono w Załączniku 2. Projektowanie starterów, reakcje PCR z oczyszczaniem produktów oraz sekwencjonowanie metodą Sangera prowadzono według protokołów przedstawionych w poprzednich podrozdziałach.

### **7.5. Analiza całogenomowej metylacji**

Analizę całogenomowej metylacji przeprowadzono z wykorzystaniem DNA pozyskanego od 18 dzieci z HM i 18 dzieci bez HM jako grupy kontrolnej. Badanie wykonano w Department of Obstetrics and Gynecology, Oakland University William Beaumont School of Medicine, Royal Oak, MI, USA w celu próby wyjaśnienia mechanizmów epigenetycznych odgrywających rolę w patofizjologii HM. Szczegółowy opis procedur został przedstawiony w pracy Vishweswaraiah i wsp. [123], a poszczególne etapy zaprezentowano na Rycinie 4. DNA uprzednio wyizolowany w Instytucie Genetyki Człowieka PAN (Gentra Puregene Blood Kit, Qiagen, Hilden, Germany) został poddany konwersji z wykorzystaniem zestawu EZ DNA Methylation-Direct Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) według protokołu producenta. Metoda ta obejmuje traktowanie zmetylowanego DNA wodorosiarczanem IV sodu, który konwertuje niezmetrylowane cytozyny w uracyl przy czym zmetylowane cytozyny pozostają niezmienione. Analizę całogenomowej metylacji prowadzono z zastosowaniem macierzy Infinium MethylationEPIC BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) umożliwiającej analizę poziomu metylacji w 850,000 CpG, a obrazowanie BeadChips oznakowanych fluorescencyjnie z użyciem iScan (Illumina, Inc.). Poprzez kontrolę jakości i korekcję sygnału tła uzyskano stosunek intensywności sygnałów metyloowanych i niemetyloowanych dinukleotydów CpG. Wszystkie dane zostały poddane szczegółowej analizie bioinformatycznej i statystycznej. Konwersję, analizę całogenomowej metylacji, analizę bioinformatyczną i statystyczną wykonano w Oakland University William Beaumont School of Medicine.



**Rycina 4.** Etapy postępowania eksperymentalnego podczas analizy całogenomowej metylacji DNA. Izolacja DNA z krwi została przeprowadzona w Instytucie Genetyki Człowieka PAN. Etapy zaznaczone kolorem szarym wykonano we współpracy z zespołem prof. Uppala, natomiast pozostałe etapy oznaczone kolorem białym zostały zrealizowane w ramach pracy doktorskiej. TSS200 oznacza lokalizację 0–200 pz powyżej miejsca inicjacji transkrypcji, a TSS1500 lokalizację 200 - 1500 pz powyżej miejsca inicjacji transkrypcji.

Całogenomową metylację DNA określano ilościowo poprzez zastosowanie pakietu GenomeStudio methylation (Illumina Software). Różnice w metylacji identyfikowano poprzez porównywanie poziomu metylacji nukleotydów w DNA u dzieci z HM w odniesieniu do kontroli.

Walidację wyników w celu potwierdzenia zmian w poziomie metylacji przeprowadzono poprzez pirosekwencjonowanie. Do walidacji wybrano 48 dinukleotydów CpG z najbardziej istotnymi zmianami hipermetylacji ( $p < 0,00001$ ). Genomowy DNA został poddany konwersji oraz pirosekwencjonowaniu z zastosowaniem PyroMark Q24 System i advanced CpG reagents (Qiagen, Hilden, Germany).

W ramach pracy doktorskiej prowadzono analizę wyników otrzymanych w analizie całogenomowej metylacji DNA. Pośród otrzymanych dinukleotydów CpG wybierano spełniające następujące kryteria: znaczna różnica w poziomie metylacji DNA między dziećmi z HM a kontrolami (hipermetylacja i hipometylacja), spodziewany odsetek wyników fałszywie dodatnich (ang. *false discovery rate*, współczynnik FDR)  $p \leq 0,00001$ , lokalizacja CpG w genie oraz brak SNP w dinukleotydzie CpG. Z wyselekcjonowanych dinukleotydów CpG wskazano te, których metylacja może potencjalnie wpływać na poziom ekspresji genów. Były to dinukleotydy CpG o wysokiej różnicy w poziomie metylacji oraz zlokalizowane w TSS200 (0–200 pz powyżej miejsca inicjacji transkrypcji), 5'UTR, eksonie 1 genu lub TSS1500 (200 - 1500 pz powyżej miejsca inicjacji transkrypcji).

Geny, w których zlokalizowane były dinukleotydy CpG o najwyższej różnicy w poziomie metylacji DNA między dziećmi z HM a kontrolami, wybrano do analizy nadreprezentacji ścieżek molekularnych w bazie danych ConsensusPathDB-human server. Wykluczono dinukleotydy CpG bez identyfikatorów mapujących w ConsensusPathDB-human server. Z otrzymanych ścieżek sygnałowych i procesów metabolicznych, poprzez przegląd dostępnej literatury oraz baz danych OMIM, GeneCards i UniProt, wybrano te, które są powiązane z krótkowzrocznością i/lub wcześniej wskazywane w literaturze jako związane z funkcjonowaniem narządu wzroku.

## 8. WYNIKI

### 8.1. Wyniki badań okulistycznych i podmiotowych u członków polskich rodzin

W niniejszym rozdziale przedstawiono wyniki badań okulistycznych oraz badań podmiotowych przeprowadzonych przez lekarzy okulistów z badanymi osobami z 20 polskich rodzin. Przyjęto oznaczenie „n” jako liczba osób badanych, a „o” jako liczba obserwacji (dla oka prawego i lewego łącznie). W poszczególnych badaniach liczba badanych osób z różnych przyczyn może się różnić np. ze względu na brak lub nieprawidłowy odczyt danego parametru czy stan po operacji, uniemożliwiający wykonanie danego badania lub dokonanie odczytu.

#### 8.1.1. Fenotypy występujące wśród badanych członków rodzin z HM

Występowanie fenotypów HM, brak HM oraz nieoznaczony status choroby u badanych osób, z podziałem na płeć, został przedstawiony w Tabeli 11.

**Tabela 11.** Podział badanych osób na grupy z uwzględnieniem płci

Płeć	Pacjenci z HM (n = 78)	Członkowie rodzin bez HM (n=102)	Członkowie rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (n=34)	Razem (n=214)	Udział procentowy
Mężczyźni	34	44	20	98	46%
Kobiety	44	58	14	116	54%

#### 8.1.2. Struktura wieku osób badanych

Strukturę wieku osób badanych z podziałem na grupy pacjentów z HM, członków rodzin bez HM oraz członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby ukazuje Tabela 12.

**Tabela 12.** Struktura wieku badanych osób

	<b>Pacjenci z HM (n = 77)</b>	<b>Członkowie rodzin bez HM (n=98)</b>	<b>Członkowie rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (n=34)</b>	<b>Razem (n=209)</b>
Zakres wiekowy (lata)	11 - 85	7 - 86	3 - 74	3 - 86
Średnia (lata)	38,49	42,04	18,38	36,89
Mediana (lata)	35	42,5	10	35

### 8.1.3. Charakterystyka pacjentów pod względem współistniejących lub przebytych chorób i operacji narządu wzroku oraz chorób ogólnych

Przebyte przez pacjentów choroby i operacje narządu wzroku oraz choroby ogólne zestawiono w Tabelach 13-15. Nie uwzględniono w tabelach pacjentów, którzy nie przebyli żadnej choroby lub operacji.



**Tabela 13.** Współistniejące lub przebyte choroby i operacje narządu wzroku oraz choroby ogólne rozpoznane w grupie pacjentów z wysoką krótkowzrocznością

<b>Pacjent</b>	<b>Wiek</b>	<b>Choroby i operacje oczu (przyjmowane leki)</b>	<b>Choroby ogólne</b>
HM-30-03	64	operacja usunięcia zaćmy w prawym oku	-
HM-31-09	53	retinopatia barwnikowa, makulopatia, zaćma	-
HM-31-19	21	skleroplastyka oka	-
HM-31-20	19	niedowidzenie w dzieciństwie	-
HM-32-04	72	-	nadciśnienie, choroba niedokrwienna serca
HM-32-09	59	-	choroba niedokrwienna serca, astma, padaczka
HM-32-45	17	skleroplastyka oka prawego	-
HM-32-15	48	-	przewlekła obturacyjna choroba płuc
HM-34-04	30	operacja podwiązania torebki skroniowej po stronie prawej i lewej	-
HM-34-05	30	podwiązanie torebki skroniowej po stronie prawej i lewej	-
HM-39-07	55	-	nadciśnienie
HM-44-05	66	-	nadciśnienie
HM-49-04	65	-	nadciśnienie
HM-70-02	85	-	nadciśnienie
HM-70-04	62	jaskra (Xalatan)	-
HM-72-01	80	-	nadciśnienie
HM-73-01	60	-	nadciśnienie
HM-74-02	59	-	nadciśnienie
HM-75-01	69	-	nadciśnienie
HM-75-10	29	jaskra (Arteopic)	-
HM-76-03	80	-	nadciśnienie, choroba niedokrwienna serca
HM-77-05	56	-	choroba niedokrwienna serca
HM-80-04	76	-	choroba niedokrwienna serca
HM-80-05	82	jaskra (Arteoptic)	choroba niedokrwienna serca
HM-80-09	63	jaskra (Betoptic)	nadciśnienie, choroba niedokrwienna serca
HM-81-02	74	jaskra (Betoptic S)	-

**Tabela 14.** Współistniejące lub przebyte choroby narządu wzroku oraz choroby ogólne w grupie członków rodzin bez wysokiej krótkowzroczności

<b>Osoba badana</b>	<b>Wiek</b>	<b>Choroby i operacje oczu (przyjmowane leki)</b>	<b>Choroby ogólne</b>
HM-31-17	27	-	nadciśnienie
HM-32-10	57	-	nadciśnienie, choroba niedokrwienna serca
HM-32-22	34	-	choroba tarczycy
HM-32-47	17	-	rdzeniowy zanik mięśni
HM-32-24	53	-	zwyrodnienie kręgosłupa
HM-32-71	10	-	alergia
HM-32-13	56	-	nadciśnienie, choroba niedokrwienna serca
HM-32-65	32	-	nadciśnienie
HM-32-11	57	-	astma
HM-32-12	59	-	nadciśnienie
HM-32-06	71	-	nadciśnienie, astma
HM-33-10	45	-	choroba niedokrwienna serca; 3x zawał serca; częstoskurcz, niewydolność zastawki mitralnej
HM-33-11	44	-	nadciśnienie
HM-70-03	59	-	choroba niedokrwienna serca
HM-70-13	61	-	nadciśnienie
HM-71-01	62	-	nadciśnienie, zwyrodnienie stawów barkowych
HM-71-03	76	-	nadciśnienie, nadciśnienie tętnicze, choroba niedokrwienna serca
HM-72-02	72	-	choroba niedokrwienna serca
HM-75-02	70	-	choroba niedokrwienna serca
HM-76-04	86	-	nadciśnienie, choroba niedokrwienna serca
HM-76-08	54	-	choroba niedokrwienna serca
HM-77-06	56	jaskra (Xalatan)	
HM-80-06	69	-	choroba niedokrwienna serca
HM-80-07	69	-	nadciśnienie, choroba niedokrwienna serca
HM-80-08	69	-	choroba niedokrwienna serca
HM-81-04	70	-	choroba niedokrwienna serca

**Tabela 15.** Współistniejące lub przebyte choroby narządu wzroku oraz choroby ogólne u członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby

Osoba badana	Wiek	Choroby i operacje oczu	Choroby ogólne
HM-31-11	51	retinopatia barwnikowa, zaćma podtorebkowa	-
HM-39-05	55	-	nadciśnienie
HM-71-04	74	-	osteoporoza

#### 8.1.4. Charakterystyka przedniego odcinka i dna oka

Występujące zaburzenia w przednim odcinku i dnie oka rozpoznane w badanych grupach przedstawiono w Tabeli 16 i 17.

**Tabela 16.** Charakterystyka przedniego odcinka oka u członków polskich rodzin z podziałem na badane grupy

Część oka	Zmiana	Pacjenci z HM (n = 78)		Członkowie rodzin bez HM (n=102)		Członkowie rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (n=34)	
		Oko prawe	Oko lewe	Oko prawe	Oko lewe	Oko prawe	Oko lewe
ocznodół		0	0	0	0	0	0
powieki	kępki żółte	0	0	1	1	0	0
	obrzęk	1	1	0	0	0	0
rogówka	keratopatia wirowata	0	0	1	1	0	0
	obwódka starcza	1	1	0	0	0	0
	przymglenie w zrębie	1	1	0	0	0	0
komora przednia		0	0	0	0	0	0
tęczówka		0	0	0	0	0	0
soczewka	początkowa zaćma	1	1	1	1	0	0
	zaćma korowa	1	0	1	0	0	0
	zaćma jądrowa	1	1	0	0	0	0
	zaćma podtorebkowa tylna	2	2	0	0	0	0
	zaćma biegunowa tylna	0	0	0	0	1	1
	zmętnienie korowe	3	2	2	2	0	0
	zmętnienie początkowe kory	0	0	1	2	0	0
	zmętnienie jądrowe	0	0	1	1	0	0
	zmętnienie pod torebką tylną	1	2	1	1	0	0
	zmętnienie punktowe	2	2	0	0	0	0
	soczewka opalizująca	0	0	1	1	1	1

**Tabela 17.** Charakterystyka dna oka u członków polskich rodzin z podziałem na badane grupy

Zmiana	Pacjenci z HM (n = 78)		Członkowie rodzin bez HM (n=102)		Członkowie rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (n=34)	
	Oko prawe	Oko lewe	Oko prawe	Oko lewe	Oko prawe	Oko lewe
tarcza						
skośnie nachylona	2	1	5	5	0	0
nerwu II						
peczęk naczyń przesunięty do nosa w poziomie dna	5	5	7	7	1	1
	3	2	8	8	2	2
krótkowzroczne zaniki okołotarczowe	68	68	1	1	3	3
zmiany w plamce						
neowaskularyzacja naczyńwłókowa	0	0	0	0	0	0
otwór plamki	0	0	0	0	0	0
plama Fuchsa	5	5	0	0	0	0
pęknięcia błony Brucha	3	3	0	0	0	0
plamka matowa	3	3	14	14	0	0
przegrupowania barwnika	4	3	0	0	1	1
zaniki siatkówkowo-naczyniówkowe	51	50	0	0	0	0
garbiak tylny	19	18	0	0	1	1
zwyrodnienia siatkówki obwodowej	16	15	1	1	1	1
zmiany w ciele szklistym	32	32	2	2	1	1
zwężenie naczyń tętniczych lub żylnych	14	14	15	15	2	2

#### 8.1.5. Dodatkowe informacje

Informacje dodatkowe dotyczące ustawienia oczu i zaburzenia widzenia barw zostały zestawione w Tabeli 18. Jedna z badanych osób prawidłowo widziała barwy na tablicach Ishihary prawym okiem, natomiast lewym rozróżniała tylko barwy podstawowe ze względu na zaćmę utrudniającą widzenie tablic.

**Tabela 18.** Informacje dodatkowe - ustawienie oczu, zaburzenie widzenia barw

<b>Cecha</b>		<b>Pacjenci z HM</b>	<b>Członkowie rodzin bez HM</b>	<b>Członkowie rodzin o nieoznaczonym statusie choroby</b>	<b>Razem</b>
Ustawienie oczu	Równoległe	73	100	33	206
	Zbieżne	3	1	0	4
	Rozbieżne naprzemiennie	1	0	0	1
Widzenie barw	Prawidłowe	67	96	30	193
	Tablice Ishihary: nieprawidłowe, barwy podstawowe: prawidłowe	4	1	1	6
	Zaburzenie	2	2	1	5

#### 8.1.6. Dane kliniczne pacjentów oraz członków wybranych rodzin

Poniżej zaprezentowano dane kliniczne rodzin polskich, których materiał genetyczny był wykorzystany w analizie laboratoryjnej w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej (Tabele 19 - 26).

**Tabela 19.** Dane kliniczne członków rodziny HM-14

Osoba badana	Fenotyp	Wiek	Oko prawe								Oko lewe							
			Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]	Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]
HM-14-04	NA	65	-4,50	-0,75	bd	-5,00	25,35	bd	bd	bd	-5,25	-0,50	bd	-5,50	25,47	bd	bd	bd
HM-14-05	HM	52	-13,50	-1,50	bd	-14,25	27,98	bd	bd	bd	-12,50	-0,75	bd	-13,00	28,56	bd	bd	bd
HM-14-06	N	52	-0,50	-0,50	100	-0,75	22,83	24	7,67	44,00	-0,50	-0,50	8	-0,75	22,70	25	7,63	44,25
HM-14-07	HM	58	-5,50	-0,25	137	-5,50	26,38	13	7,55	44,75	-6,50	-0,50	121	-6,75	26,26	16	7,49	45,00
HM-14-10	HM	44	-6,75	-0,75	160	-7,00	26,41	18	7,47	45,12	-8,00	-0,50	67	-8,25	26,05	15	7,54	44,75
HM-14-11	N	46	-1,00	-0,75	95	-1,50	24,19	17	7,61	44,37	-1,25	-1,25	93	-2,00	24,42	16	7,61	44,37
HM-14-12	HM	25	-7,00	-0,25	109	-7,00	27,18	10	7,73	43,62	-7,50	-0,25	32	-7,50	27,21	10	7,71	43,75
HM-14-13	N	20	-2,00	-0,25	119	-2,00	24,03	12	8,02	42,12	-0,75	-0,50	92	-1,00	23,90	13	7,97	42,37
HM-14-14	HM	16	-6,00	-0,75	92	-6,50	26,64	17	7,29	46,25	-5,75	-0,75	100	-6,25	26,71	17	7,37	45,75
HM-14-15	NA	14	-2,50	-1,00	86	-3,00	25,72	12	7,86	43,00	-4,75	-0,25	111	-4,75	25,61	12	7,77	43,37
HM-14-08	HM	58	-6,50	-1,50	100	-7,25	26,60	16	bd	43,05	bd	bd	bd	bd	26,99	23	bd	42,89

SE - ekwiwalent sferyczny, AL - długość osiowa gałki ocznej [mm], IOP - ciśnienie wewnątrzgałkowe [mmHg], CCR - promień krzywizny rogówki [mm], CP - moc rogówki [D], HM – wysoka krótkowzroczność, N – brak HM, NA - nieoznaczony status choroby

**Tabela 20.** Dane kliniczne członków rodziny HM-32

Osoba badana	Fenotyp	Wiek	Oko prawe							Oko lewe								
			Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]	Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]
HM-32-04	M	72	bd	bd	bd	bd	27,06	20	bd	bd	-11,00	-2,50	9	-12,25	27,16	20	bd	bd
HM-32-09	M	59	-6,25	-1,00	143	-6,75	25,33	18	7,70	44,00	-4,25	-1,50	109	-5,00	24,86	18	7,68	44,00
HM-32-10	N	57	3,50	-0,75	44	3,25	22,34	15	7,95	42,50	3,50	-0,75	112	3,25	22,39	16	8,01	42,25
HM-32-19	M	41	-8,50	-1,25	54	-9,25	27,37	17	bd	bd	-11,25	-1,25	119	-12,00	28,39	16	bd	bd
HM-32-20	M	38	-7,25	-3,75	148	-9,25	27,14	17	bd	bd	-8,25	-0,75	50	-8,75	28,39	18	bd	bd
HM-32-21	N	34	-0,25	-0,50	121	-0,50	22,46	16	bd	bd	-0,25	-1,00	111	-0,75	22,46	16	bd	bd
HM-32-22	N	34	-1,25	-0,25	131	-1,50	23,64	15	bd	bd	-0,25	-0,50	76	-0,50	23,52	14	bd	bd
HM-32-26	M	37	-15,25	-2,25	82	-16,50	29,04	16	7,66	44,25	-14,75	-1,50	108	-15,50	28,83	15	7,67	44,00
HM-32-29	N	37	-0,75	-1,00	80	-1,25	23,23	16	bd	44,00	-0,75	-0,25	117	-1,00	23,25	14	bd	44,00
HM-32-31	M	34	-20,75	-0,75	10	-21,25	29,33	18	7,54	44,75	-18,00	-0,75	145	-18,50	28,55	18	7,57	44,75
HM-32-32	N	31	0,75	-0,50	148	0,50	21,63	15	7,21	47,00	1,25	-2,00	160	0,25	21,66	15	7,19	47,00
HM-32-33	M	33	-9,25	-1,50	86	-10,00	26,60	15	7,56	44,75	-6,50	-2,00	108	-7,50	25,58	14	7,58	44,75
HM-32-44	N	13	-1,50	-0,50	8	-1,75	23,89	16	bd	bd	-0,50	-0,75	159	-1,00	23,79	16	bd	bd
HM-32-45	M	17	-6,75	0	0	-6,75	25,58	bd	7,74	43,75	-6,75	-0,25	179	-7,00	25,59	bd	7,78	43,50
HM-32-46	N	7	3,25	-1,75	16	2,50	21,68	13	7,54	44,75	3,00	-1,25	165	2,50	21,33	13	7,53	45,00
HM-32-47	N	17	bd	bd	bd	bd	23,23	12	bd	bd	bd	bd	bd	bd	23,37	12	bd	bd
HM-32-48	NA	10	-0,25	-0,50	34	-0,50	22,31	14	bd	45,25	0,75	1,50	41	1,50	21,53	14	bd	45,75
HM-32-49	N		0,75	-1,75	21	-0,25	22,71	12	7,39	45,75	0,75	-1,50	157	0	22,73	12	7,38	45,75
HM-32-50	N	39	0,50	-0,25	114	0,50	22,86	16	bd	bd	0,50	-0,25	104	0,50	22,87	15	bd	bd
HM-32-51	NA	9	0,25	-0,25	87	0,25	23,28	12	bd	bd	0,25	0	0	0,25	23,43	12	bd	bd
HM-32-52	NA	13	0,50	0	0	0,50	23,56	12	bd	bd	0,50	-0,25	153	0,50	23,49	12	bd	bd
HM-32-53	NA	16	0	-0,50	98	-0,25	23,55	16	bd	bd	0	-0,50	60	-0,25	23,49	15	bd	bd
HM-32-15	M	48	-7,75	-1,00	109	-8,25	25,53	17	bd	bd	-4,50	-0,50	17	-4,75	23,89	15	bd	bd

Osoba badana	Fenotyp	Wiek	Oko prawe							Oko lewe								
			Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]	Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]
HM-32-54	N	50	-0,50	-0,50	179	-0,75	22,87	15	bd	bd	-0,25	-0,25	150	-0,50	22,87	18	bd	bd
HM-32-55	N	17	-0,50	0	0	-0,50	24,10	12	bd	bd	-0,75	0	0	-0,75	23,89	12	bd	bd
HM-32-56	N	8	1,25	-0,75	15	1,00	22,85	13	bd	bd	0,25	-0,25	bd	0,25	22,94	12	bd	bd
HM-32-23	N	52	-0,25	0	0	-0,25	23,02	bd	7,75	43,50	0	-0,50	9	-0,25	22,99	bd	7,78	43,50
HM-32-24	N	53	1,00	0,25	1	1,25	22,46	14	7,72	43,75	1,00	0	0	1,00	22,44	16	7,74	43,75
HM-32-57	N	48	0,75	-0,75	89	0,50	22,89	17	7,90	42,75	0	-0,50	100	-0,25	22,92	18	7,76	43,50
HM-32-58	N	29	0	0,50	89	0,25	22,83	14	7,69	44,00	0,50	0	0	0,50	22,73	15	7,74	43,75
HM-32-59	N	27	-1,75	0	0	-1,75	23,59	17	7,79	43,25	-1,50	0,25	114	-1,50	23,43	15	7,78	43,50
HM-32-60	N	26	0,75	0	0	0,75	22,54	14	7,36	45,75	0,25	0,50	26	0,50	22,68	14	7,42	45,50
HM-32-61	N	18	0,50	-0,50	132	0,25	22,95	12	7,70	43,75	0,50	0,50	49	0,75	22,85	13	7,76	43,50
HM-32-62	NA	4	0	0	0	0	bd	bd	7,91	42,75	0	0	0	0	bd	bd	7,92	42,75
HM-32-68	N	26	-0,75	-6,00	2	-3,75	23,96	bd	7,48	45,25	-0,75	-6,00	170	-3,75	23,51	bd	7,20	47,00
HM-32-70	N	19	2,00	-4,00	171	0	22,89	bd	8,01	42,25	2,50	-5,00	177	0	23,58	bd	8,07	42,00
HM-32-14	N	55	1,00	0	0	1,00	21,98	bd	7,48	45,25	0,50	0,25	69	0,75	22,27	bd	7,53	44,75
HM-32-71	N	10	0,75	2,00	102	1,75	22,54	bd	7,65	44,00	0,50	1,50	73	1,25	22,75	bd	7,39	45,75
HM-32-13	N	56	0	0	0	0	23,24	bd	7,57	44,75	0,25	-0,50	130	0	23,23	bd	7,60	44,50
HM-32-72	NA	10	0,25	0,50	88	0,50	23,16	bd	7,87	43,00	0,25	0,50	86	0,50	23,35	bd	7,84	43,00
HM-32-65	N	32	0,25	-0,50	155	0	22,61	bd	7,38	45,75	0,25	-0,75	23	-0,25	21,97	bd	7,29	46,25
HM-32-67	N	27	-1,00	-2,75	174	-2,50	23,52	bd	7,77	43,50	-1,00	-2,50	171	-2,25	23,37	bd	7,63	44,25
HM-32-11	N	57	1,00	0	0	1,00	21,15	bd	8,39	40,25	1,50	-4,00	3	-0,50	25,43	bd	8,79	38,50
HM-32-12	N	59	1,75	0	0	1,75	21,78	bd	7,66	44,00	1,50	0,75	165	2,00	22,49	bd	7,74	43,50
HM-32-06	N	71	0,25	1,50	3	1,00	22,89	bd	7,60	44,50	1,00	1,75	169	2,00	22,80	bd	7,66	44,00

SE - ekwiwalent sferyczny, AL - długość osiowa gałki ocznej [mm], IOP - ciśnienie wewnątrzgałkowe [mmHg], CCR - promień krzywizny rogówki [mm], CP - moc rogówki [D], HM – wysoka krótkowzroczność, N – brak HM, NA - nieznaczony status choroby, bd – brak danych



**Tabela 21.** Dane kliniczne członków rodziny HM-33

Osoba badana	Fenotyp	Wiek	Oko prawe							Oko lewe								
			Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]	Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]
HM-33-06	N	65	4,25	-0,50	94	4,00	22,32	16	7,65	44,25	4,25	-2,00	141	3,25	22,26	16	7,49	45,25
HM-33-07	N	59	1,00	-0,50	83	0,75	22,34	15	7,52	45,00	1,50	-0,50	148	1,25	22,06	15	7,49	45,25
HM-33-10	N	45	-0,25	-0,50	66	-0,50	24,21	16	7,73	43,75	0,00	-0,75	137	-0,50	24,12	16	7,75	43,75
HM-33-11	N	44	0	-1,50	26	-0,75	22,66	15	bd	bd	-1,00	-1,00	167	-1,50	23,14	15	bd	bd
HM-33-12	N	46	0,50	0	0	0,50	22,36	18	bd	bd	bd	bd	bd	bd	24,16	18	bd	bd
HM-33-14	M	24	-7,75	-1,00	59	-8,25	27,85	14	7,72	43,75	-6,75	-1,25	129	-7,50	26,80	15	7,72	43,75
HM-33-15	M	22	-9,50	-0,25	93	-9,75	27,23	16	7,61	44,50	-8,75	-2,00	125	-9,75	27,21	16	7,64	44,25
HM-33-16	M		-20,50	-0,50	31	-20,75	29,86	16	7,83	43,25	-18,00	-1,25	151	-18,75	29,24	16	7,79	43,25
HM-33-17	N	20	-0,25	-1,00	0	-0,75	23,74	16	bd	bd	-0,50	-1,00	178	-1,00	23,61	16	bd	bd

SE - ekwiwalent sferyczny, AL - długość osiowa gałki ocznej [mm], IOP - ciśnienie wewnątrzgałkowe [mmHg], CCR - promień krzywizny rogówki [mm], CP - moc rogówki [D], HM – wysoka krótkowzroczność, N – brak HM, NA - nieoznaczony status choroby, bd – brak danych

**Tabela 22.** Dane kliniczne członków rodziny HM-76

Osoba badana	Fenotyp	Wiek	Oko prawe								Oko lewe							
			Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]	Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]
HM-76-03	M	80	-6,50	0	0	-6,50	26,01	17	7,88	42,81	-6,50	0	0	-6,50	25,95	18	7,95	42,15
HM-76-04	N	86	-0,50	0	0	-0,50	23,55	18	7,59	42,71	-0,50	0	0	-0,50	24,01	17	7,88	42,87
HM-76-05	NA	44	-5,00	0	0	-5,00	24,61	17	7,80	43,87	-4,50	0	0	-4,50	25,11	16	7,97	44,55
HM-76-06	N	44	-2,50	0	0	-2,50	23,89	16	7,88	44,12	-3,50	0	0	-3,50	24,01	16	7,94	43,15
HM-76-07	NA	51	-4,00	0	0	-4,00	24,11	16	7,89	42,75	-4,50	0	0	-4,50	23,99	17	7,87	42,87
HM-76-08	N	54	-2,00	0	0	-2,00	23,15	16	7,32	42,12	-2,00	0	0	-2,00	24,01	18	7,11	40,15
HM-76-09	N	47	0,50	0	0	0,50	23,56	16	7,89	41,11	0,50	0	0	0,50	24,12	15	7,87	42,12
HM-76-10	N	46	-0,50	0	0	-0,50	23,91	16	7,71	44,12	-0,50	0	0	-0,50	23,95	17	7,59	43,18
HM-76-11	M	18	-9,00	0,50	105	-8,75	26,11	17	7,97	42,87	-9,00	0,75	90	-8,50	26,21	18	7,69	43,85
HM-76-12	M	20	-6,50	0,25	15	-6,50	27,11	16	7,28	42,18	-7,00	0,25	170	-7,00	26,55	14	7,44	43,15
HM-76-13	M	20	-6,25	0	0	-6,25	26,01	16	7,42	42,22	-6,50	0	0	-6,50	25,99	18	7,38	43,18

SE - ekwiwalent sferyczny, AL - długość osiowa gałki ocznej [mm], IOP - ciśnienie wewnątrzgałkowe [mmHg], CCR - promień krzywizny rogówki [mm],

CP - moc rogówki [D], HM – wysoka krótkowzroczność, N – brak HM, NA - nieoznaczony status choroby

**Tabela 23.** Dane kliniczne członków rodziny HM-77

Osoba badana	Fenotyp	Wiek	Oko prawe								Oko lewe							
			Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]	Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]
HM-77-05	M	56	-6,50	0	0	-6,50	25,55	17	7,66	44,12	-5,00	0	0	-5,00	26,01	16	7,74	44,18
HM-77-06	N	56	-4,00	0	0	-4,00	23,85	16	7,63	44,25	-3,00	0	0	-3,00	23,92	15	7,51	44,87
HM-77-08	M	28	-6,00	0	0	-6,00	25,95	15	7,68	43,87	-7,00	0	0	-7,00	26,12	16	7,48	45,12
HM-77-09	M	22	-12,00	0	0	-12,00	27,01	16	8,40	40,12	-12,00	0	0	-12,00	27,22	16	8,13	42,85
HM-77-10	M	22	-12,00	-1,00	85	-12,50	27,12	16	8,33	40,50	-12,00	-1,00	95	-12,50	26,52	17	8,06	41,87
HM-77-11	N	23	-3,00	0,25	15	-3,00	23,95	16	8,42	40,13	-3,00	0,25	155	-3,00	23,82	18	7,86	42,87

SE - ekwiwalent sferyczny, AL - długość osiowa gałki ocznej [mm], IOP - ciśnienie wewnątrzgałkowe [mmHg], CCR - promień krzywizny rogówki [mm],

CP - moc rogówki [D], HM – wysoka krótkowzroczność, N – brak HM, NA - nieoznaczony status choroby, bd – brak danych

**Tabela 24.** Dane kliniczne członków rodziny HM-78

Osoba badana	Fenotyp	Wiek	Oko prawe								Oko lewe							
			Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]	Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]
HM-78-06	N	54	0,25	0	0	0,25	24,11	16	7,51	44,75	0,25	0	0	0,25	24,18	16	7,57	44,62
HM-78-07	M	52	-14,00	-0,25	95	-14,00	28,12	17	7,55	43,28	-16,00	-0,5	100	-16,25	27,55	17	7,57	43,21
HM-78-08	M	57	-13,50	0	0	-13,50	26,95	16	7,70	44,55	-14,00	0	0	-14,00	27,18	16	7,70	45,11
HM-78-09	N	50	0,75	0	0	0,75	23,85	16	8,03	43,11	0,75	0	0	0,75	24,01	16	7,95	43,28
HM-78-10	NA	21	-4,00	0	0	-4,00	24,11	16	7,47	44,25	-4,50	0	0	-4,50	24,82	16	7,57	44,62
HM-78-11	M	15	-6,50	0	0	-6,50	24,99	15	7,47	45,12	-7,00	0	0	-7,00	25,11	15	7,57	44,62
HM-78-12	M	26	-10,00	0	0	-10,00	28,05	16	bd	bd	-11,00	0	0	-11,00	27,57	16	bd	bd

SE - ekwiwalent sferyczny, AL - długość osiowa gałki ocznej [mm], IOP - ciśnienie wewnątrzgałkowe [mmHg], CCR - promień krzywizny rogówki [mm], CP - moc rogówki [D], HM – wysoka krótkowzroczność, N – brak HM, NA - nieznaczony status choroby, bd – brak danych

**Tabela 25.** Dane kliniczne członków rodziny HM-80

Osoba badana	Fenotyp	Wiek	Oko prawe								Oko lewe							
			Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]	Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [°]	SE [D]	AL [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]
HM-80-04	M	76	-18,00	0	0	-18,00	28,11	16	7,68	43,87	-15,00	0	0	-15,00	28,35	17	7,48	44,12
HM-80-05	M	82	-20,00	0	0	-20,00	28,55	19	7,68	43,87	-16,50	0	0	-16,50	29,01	19	7,48	45,12
HM-80-06	N	69	0,50	0	0	0,50	24,11	15	8,07	41,75	0,50	0	0	0,50	23,85	16	7,99	42,25
HM-80-07	N	69	0,25	0	0	0,25	23,55	16	7,52	44,87	0,50	0	0	0,50	23,11	18	7,42	45,50
HM-80-08	N	69	-0,50	0	0	-0,50	23,41	17	8,49	39,75	-0,50	0	0	-0,50	23,82	17	8,31	40,62
HM-80-09	M	63	-8,00	0	0	-8,00	26,82	21	8,45	40,00	-8,50	0	0	-8,50	26,95	22	8,29	40,75
HM-80-10	M	38	-14,00	0	0	-14,00	27,01	16	8,45	41,95	-10,00	0	0	-10,00	26,95	17	8,37	42,85
HM-80-11	N	39	-0,25	0	0	-0,25	23,28	15	7,71	44,12	-0,25	0	0	-0,25	23,49	16	7,73	43,82
HM-80-12	N	42	0,25	0	0	0,25	24,11	16	bd	44,12	0,25	0	0	0,25	23,95	17	bd	43,95
HM-80-13	M	21	-6,25	0	0	-6,25	25,12	15	7,68	42,12	-6,50	0	0	-6,50	25,72	16	7,48	43,10
HM-80-14	M	39	-6,50	0	0	-6,50	25,85	17	8,40	44,11	-6,50	0	0	-6,50	26,01	17	7,86	43,15
HM-80-15	M	12	-7,50	0	0	-7,50	26,18	16	8,45	40,00	-6,50	0	0	-6,50	26,10	17	8,29	40,75

SE - ekwiwalent sferyczny, AL - długość osiowa gałki ocznej [mm], IOP - ciśnienie wewnątrzgałkowe [mmHg], CCR - promień krzywizny rogówki [mm], CP - moc rogówki [D], HM – wysoka krótkowzroczność, N – brak HM, NA - nieoznaczony status choroby, bd – brak danych

**Tabela 26.** Dane kliniczne członków rodziny HM-81

Osoba badana	Fenotyp	Wiek	Oko prawe								Oko lewe							
			Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [ <sup>0</sup> ]SE [D]	AL. [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]	Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [ <sup>0</sup> ]SE [D]	AL. [mm]	IOP [mmHg]	CCR [mm]	CP [D]		
HM-81-02	M	74	-8,25	0	0	-8,25	26,01	17	7,13	47,37	-7,00	0	0	-7,00	26,11	16	7,20	46,87
HM-81-04	N	70	0,50	0	0	0,50	24,02	17	7,67	44,00	2,75	0	0	2,75	23,95	17	7,61	44,37
HM-81-05	M	48	-7,00	0	0	-7,00	25,95	16	7,79	43,37	-7,50	0	0	-7,50	26,01	15	7,80	43,25
HM-81-06	M	47	-7,00	0,25	155	-7,00	26,11	17	7,98	42,25	-6,50	0,25	165	-6,50	26,28	17	7,64	44,12
HM-81-07	M	13	-6,00	0	0	-6,00	25,89	17	7,71	43,75	-6,25	0	0	-6,25	25,95	16	7,62	44,25
HM-81-08	M	22	-13,00	0,50	125	-12,75	27,11	15	7,13	47,37	-12,50	-0,75	78	-13,00	27,48	16	7,20	46,87

SE - ekwiwalent sferyczny, AL - długość osiowa gałki ocznej [mm], IOP - ciśnienie wewnątrzgałkowe [mmHg], CCR - promień krzywizny rogówki [mm],

CP - moc rogówki [D], HM – wysoka krótkowzroczność, N – brak HM, NA - nieoznaczony status choroby

### 8.1.7. Dane kliniczne dzieci zakwalifikowanych do badania całogenomowej metylacji

Poniżej prezentowane są dane kliniczne dzieci z HM włączonych do badania całogenomowej metylacji (Tabela 27).

**Tabela 27.** Dane kliniczne polskich dzieci z wysoką krótkowzrocznością zakwalifikowanych do analizy całogenomowej metylacji

Pacjent	Wiek [lata]	Oko prawe				Oko lewe				Inne choroby oka
		Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [ <sup>0</sup> ]	Ekwiwalent sferyczny [D]	Wada sferyczna [D]	Wada cylindryczna [D]	Oś [ <sup>0</sup> ]	Ekwiwalent sferyczny [D]	
HMC-01	4	-11,50	1,50	132	-10,75	-13,0	+2,0	118	-12,00	stan po operacji zeza
HMC-11	10	-6,75	1,00	90	-6,25	-7,50	1,50	80	-6,75	
HMC-16	11	-6,25	-	-	-6,25	-5,5	-	-	-5,50	
HMC-17	11	-9,5	0,75	5	-9,25	-9,25	-	-	-9,25	
HMC-19	10	-5,50	-	-	-5,50	-6,25	-	-	-6,25	
HMC-20	11	-7,00	4,00	90	-5,00	-5,75	4,50	90	-3,50	rozwarstwienie siatkówki
HMC-23	13	-10,25	1,50	90	-9,50	-10,50	1,50	90	-9,75	
HMC-24	13	-7,5	-	-	-7,50	-7	-	-	-7,00	
HMC-26	5	-7,00	1,50	5	-6,25	-10,00	1,50	175	-9,25	
HMC-27	12	-7,00	-	-	-7,00	-7	-	-	-7,00	
HMC-28	13	-6,00	-	-	-6,00	-6,5	-	-	-6,50	
HMC-29	13	-2,75	-	-	-2,75	-6,50	0,75	110	-6,25	
HMC-30	9	-15,00	4,25	175	-13,00	-14,00	2,50	5	-12,75	
HMC-32	12	-9,25	-	-	-9,25	-8,5	-	-	-8,50	
HMC-33	9	-6,50	-	-	-6,50	-6,5	-	-	-6,50	
HMC-41	9	-10,00	1,00	170	-9,50	-8,25	2,25	30	-7,25	retinopatia wcześniaków obu oczu
HMC-43	9	-10,0	3,0	170	-8,50	-7,75	2,75	10	-6,50	
HMC-44	13	-6,50	-	-	-6,50	-8,5	-	-	-8,50	

U dzieci stwierdzono wadę refrakcji z HM w przedziale -6,0 D – -15,0 D (średnia -8,25 D), a AL w przedziale 26,22 – 27,85 mm (średnia 26,22 mm) (Tabela 27). U dzieci bez HM stanowiących grupę kontrolną AL mieściło się w przedziale 22,42 – 24,11 mm (średnia 22,55 mm). Badania okulistyczne u dzieci nie wykazały zmian w przednim odcinku oka, w tym w rogówce i soczewce. Do analizy całogenomowej metylacji wybranych zostało 18 dzieci z HM i 18 kontroli.

## 8.2. Wyniki analiz statystycznych danych klinicznych

### 8.2.1. Wyniki statystyki opisowej

W ramach realizacji pracy doktorskiej wykonano statystykę opisową dla parametrów okulistycznych: ostrości wzroku, wielkości wady sferycznej, SE, AL, IOP, CCR i CP w poszczególnych badanych grupach pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby dla oka prawego i lewego oraz dla obojga oczu łącznie (Tabele 28 - 34). Oko prawe jednego z pacjentów z HM zostało poddane operacji usunięcia zaćmy i cechuje się pooperacyjnym brakiem soczewki, stąd wynik -0,25 przy wartości maksymalnej wady sferycznej i SE (Tabela 29 i 30).

**Tabela 28.** Wyniki statystyki opisowej dla ostrości wzroku do dali z korekcją członków polskich rodzin

Grupa badana	OKO PRAWY			OKO LEWE			OKO PRAWY I LEWE		
	HM (n=76)	N (n=101)	NA (n=32)	HM (n=78)	N (n=100)	NA (n=31)	HM (n=78)	N (n=101)	NA (n=32)
Minimum	0,02	0,20	0,50	0,02	0,20	0,83	0,02	0,20	0,50
Maksimum	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Mediana	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Średnia [SD]	0,83 [±0,26]	0,96 [±0,11]	0,98 [±0,09]	0,81 [±0,29]	0,96 [±0,12]	0,99 [±0,03]	0,82 [±0,27]	0,96 [±0,12]	0,98 [±0,07]

HM – grupa pacjentów z HM, N – grupa członków rodzin bez HM, NA – grupa członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby



**Tabela 29.** Wyniki statystyki opisowej dla wartości wady sferycznej członków polskich rodzin

Grupa badana	OKO PRAWE			OKO LEWE			OKO PRAWE I LEWE		
	HM (n=77)	N (n=101)	NA (n=34)	HM (n=78)	N (n=100)	NA (n=34)	HM (n=78)	N (n=101)	NA (n=34)
Minimum	-20,75	-4,00	-5,00	-21,00	-3,50	-6,00	-21,00	-4,00	-6,00
Maksimum	-0,25*	4,25	0,75	-4,25**	4,25	0,75	-0,25*	4,25	0,75
Mediana	-7,50	0	-0,25	-7,38	0	-0,25	-7,50	0	-0,25
Średnia [SD]	-9,06 [±4,25]	-0,13 [±1,43]	-1,26 [±2,03]	-9,12 [±3,94]	-0,11 [±1,45]	-1,31 [±2,15]	-9,09 [±4,09]	-0,12 [±1,43]	-1,28 [±2,07]

HM – grupa pacjentów z HM, N – grupa członków rodzin bez HM, NA – grupa członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby

\*wartość wady sferycznej oka pacjenta z HM poddanego operacji usunięcia zaćmy

\*\*wartość wady sferycznej osoby zakwalifikowanej przez lekarza do pacjentów z HM

**Tabela 30.** Wyniki statystyki opisowej dla wartości ekwiwalentu sferycznego członków polskich rodzin

Grupa badana	OKO PRAWE			OKO LEWE			OKO PRAWE I LEWE		
	HM (n=76)	N (n=101)	NA (n=34)	HM (n=77)	N (n=100)	NA (n=34)	HM (n=77)	N (n=101)	NA (n=34)
Minimum	-21,25	-4,00	-5,00	-21,00	-3,75	-6,00	-21,25	-4,00	-6,00
Maksimum	-2,25*	4,00	0,50	-4,75**	3,25	1,50	-2,25*	4,00	1,50
Mediana	-7,50	0	-0,25	-7,50	-0,25	-0,25	-7,50	-0,25	-0,25
Średnia [SD]	-9,22 [±4,20]	-0,27 [±1,46]	-1,35 [±2,00]	-9,25 [±3,94]	-0,28 [±1,46]	-1,38 [±2,22]	-9,24 [±4,06]	-0,27 [±1,45]	-1,36 [±2,09]

HM – grupa pacjentów z HM, N – grupa członków rodzin bez HM, NA – grupa członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby

\*wartość ekwiwalentu sferycznego oka pacjenta z HM poddanego operacji usunięcia zaćmy

\*\*wartość ekwiwalentu sferycznego osoby zakwalifikowanej przez lekarza do pacjentów z HM

**Tabela 31.** Wyniki statystyki opisowej dla wartości długości osiowej gałki ocznej członków polskich rodzin

Grupa badana	OKO PRAWE			OKO LEWE			OKO PRAWE I LEWE		
	HM (n=78)	N (n=102)	NA (n=30)	HM (n=78)	N (n=102)	NA (n=30)	HM (n=78)	N (n=102)	NA (n=30)
Minimum	23,39	21,15	21,90	23,42	21,33	21,53	23,39	21,15	21,53
Maksimum	31,02	25,58	24,92	31,58	25,56	25,12	31,58	25,58	25,12
Mediana	26,15	23,41	23,54	26,30	23,50	23,45	26,27	23,47	23,48
Średnia [SD]	26,62 [±1,50]	23,31 [±0,76]	23,58 [±0,70]	26,61 [±1,48]	23,40 [±0,76]	23,57 [±0,86]	26,62 [±1,48]	23,35 [±0,76]	23,57 [±0,78]

HM – grupa pacjentów z HM, N – grupa członków rodzin bez HM, NA – grupa członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby

**Tabela 32.** Wyniki statystyki opisowej dla ciśnienia wewnątrzgałkowego członków polskich rodzin

Grupa badana	OKO PRAWE			OKO LEWE			OKO PRAWE I LEWE		
	HM (n=77)	N (n=91)	NA (n=28)	HM (n=77)	N (n=91)	NA (n=28)	HM (n=77)	N (n=91)	NA (n=28)
Minimum	11,00	12,00	12,00	10,00	12,00	12,00	10,00	12,00	12,00
Maksimum	21,00	18,00	22,00	22,00	18,00	22,00	22,00	18,00	22,00
Mediana	16,00	16,00	16,00	16,00	16,00	16,00	16,00	16,00	16,00
Średnia [SD]	16,23 [±1,69]	15,49 [±1,38]	15,37 [±2,05]	16,29 [±1,85]	15,72 [±1,53]	15,78 [±2,24]	16,26 [±1,77]	15,6 [±1,46]	15,57 [±2,14]

HM – grupa pacjentów z HM, N – grupa członków rodzin bez HM, NA – grupa członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby

**Tabela 33.** Wyniki statystyki opisowej dla promienia krzywizny rogówki członków polskich rodzin

Grupa badana	OKO PRAWE			OKO LEWE			OKO PRAWE I LEWE		
	HM (n=65)	N (n=82)	NA (n=24)	HM (n=65)	N (n=82)	NA (n=24)	HM (n=65)	N (n=82)	NA (n=24)
Minimum	7,08	7,12	7,07	7,20	7,07	7,38	7,08	7,07	7,07
Maksimum	8,45	8,49	8,77	8,41	8,79	8,41	8,45	8,79	8,77
Mediana	7,67	7,70	7,68	7,64	7,72	7,63	7,67	7,71	7,67
Średnia [SD]	7,72 [±0,31]	7,75 [±0,28]	7,66 [±0,34]	7,68 [±0,27]	7,71 [±0,29]	7,68 [±0,24]	7,70 [±0,29]	7,73 [±0,29]	7,67 [±0,29]

HM – grupa pacjentów z HM, N – grupa członków rodzin bez HM, NA – grupa członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby

**Tabela 34.** Wyniki statystyki opisowej dla mocy łamiącej rogówki członków polskich rodzin

Grupa badana	OKO PRAWE			OKO LEWE			OKO PRAWE I LEWE		
	HM (n=64)	N (n=84)	NA (n=25)	HM (n=64)	N (n=84)	NA (n=25)	HM (n=64)	N (n=84)	NA (n=25)
Minimum	40,00	39,75	38,50	40,12	38,50	40,12	40,00	38,50	38,50
Maksimum	47,75	47,00	45,62	47,00	47,00	45,75	47,75	47,00	45,75
Mediana	43,94	43,84	44,00	44,05	43,69	43,75	44,00	43,75	43,84
Średnia [SD]	43,68 [±1,58]	43,51 [±1,44]	43,54 [±1,51]	43,88 [±1,40]	43,62 [±1,48]	43,64 [±1,25]	43,78 [±1,49]	43,57 [±1,46]	43,59 [±1,38]

HM – grupa pacjentów z HM, N – grupa członków rodzin bez HM, NA – grupa członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby

### 8.2.2. Wyniki statystyki testowej

Wykonano statystykę testową dla wady sferycznej, SE, AL, IOP, CCR i CP. W kolejnych podrozdziałach przedstawiono wyniki testów statystycznych dla poszczególnych parametrów okulistycznych.

#### 8.2.2.1. Ostrość wzroku

Z powodu otrzymania istotnych wyników testu Shapiro-Wilka i testu Levene'a odrzucono hipotezę zerową o podobieństwie rozkładu ostrości wzroku oka prawego i

lewego do rozkładu normalnego oraz o jednakowości wariancji w badanych grupach pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby. Na podstawie wyników testów przyjęto, że rozkład ostrości wzroku nie jest zbliżony do rozkładu normalnego oraz że wariancje pomiędzy badanymi grupami różnią się, czyli nie są homogeniczne. Niespełnienie kryteriów niezbędnych do zastosowania testu ANOVA było podstawą do zastosowania testu Kruskala-Wallisa. Dla pozostałym badanych parametrów okulistycznych również nie zostały spełnione wyżej wymienione kryteria lub tylko jedno z nich, dlatego zdecydowano o stosowaniu testu Kruskala-Wallisa dla wszystkich parametrów. Wynik testu Kruskala-Wallisa dla ostrości wzroku wykazał, że przynajmniej jedna z grup różni się od pozostałych (Kruskal-Wallis chi-squared = 60,363, df = 2, p = 7,804x10<sup>-14</sup>). Test post hoc wskazał, że ostrość wzroku grupy pacjentów z HM różni się istotnie od pozostałych grup, natomiast wartości parametru dla grupy członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby nie różnią się między sobą (wartość krytyczna = 60,36315, Df = 2, P Chisq = 7,804x10<sup>-14</sup>, t-Student = 1,965697, Alfa = 0,05). Test Wilcoxon dla par obserwacji z korekcją Holma także potwierdził istotność tych różnic (Tabela 35).

#### 8.2.2.2. Wada sferyczna [D]

Istotne wyniki testu Shapiro-Wilka i testu Levene'a wskazały, że rozkład wielkości wady sferycznej nie jest zbliżony do rozkładu normalnego oraz że wariancje między badanymi grupami nie są homogeniczne. Wynik testu Kruskala-Wallisa dla wady sferycznej potwierdził, że przynajmniej jedna z grup różni się od pozostałych (Kruskal-Wallis chi-squared = 294,44, df = 2, p < 2,2x10<sup>-16</sup>). Test post hoc wykazał istotne różnice pomiędzy grupami pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (wartość krytyczna = 294,4429, Df = 2, P Chisq = 0, t-Student = 1,965615, Alfa = 0,05), a test Wilcoxon dla par obserwacji z korekcją Holma także potwierdził istotność tych różnic (Tabela 35).

#### 8.2.2.3. Ekwiwalent sferyczny [D]

Otrzymano istotne wyniki testu Shapiro-Wilka oraz testu Levene'a co pozwoliło na odrzucenie hipotezy zerowej o podobieństwie rozkładu SE oka prawego i lewego do rozkładu normalnego oraz o jednakowości wariancji w badanych grupach pacjentów z

HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby. Test Kruskala-Wallisa wykazał, że przynajmniej jedna z grup różni się od pozostałych (Kruskal-Wallis chi-squared = 293,35, df = 2,  $p < 2,2 \times 10^{-16}$ ). Test post hoc wskazał na istotne różnice pomiędzy grupami pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (wartość krytyczna = 293,3508, Df = 2, P Chisq = 0, t-Student = 1,965642, Alfa = 0,05), a test Wilcoxon dla par obserwacji z korekcją Holma potwierdził istotność tych różnic (Tabela 35).

#### 8.2.2.4. Długość osiowa gałki ocznej [mm]

Ze względu na istotne wyniki testu Shapiro-Wilka i testu Levene'a odrzucono hipotezę zerową o podobieństwie rozkładu AL oka prawego i lewego do rozkładu normalnego oraz o jednakowości wariancji w badanych grupach pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby. Test Kruskala-Wallisa potwierdził, że przynajmniej jedna z grup różni się od pozostałych (Kruskal-Wallis chi-squared = 274,52, df = 2,  $p < 2,2 \times 10^{-16}$ ), a test post hoc wykazał istotne różnice pomiędzy badanymi grupami (wartość krytyczna = 274,5194, Df = 2, P Chisq = 0, t-Student = 1,965669, Alfa = 0,05). Test Wilcoxon dla par obserwacji z korekcją Holma potwierdził istotność tych różnic (Tabela 35).

#### 8.2.2.5. Ciśnienie wewnątrzgałkowe [mmHg]

Dla IOP otrzymano istotny wynik testu Shapiro-Wilka co wskazuje na to, że rozkład wielkości IOP nie jest zbliżony do rozkładu normalnego. Natomiast wynik testu Levene'a wykazał, że nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej mówiącej o jednakowości wariancji w badanych grupach. Przyjmuje się, że wariancja zmiennej zależnej w grupach pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby jest jednakowa, czyli wariancje są homogeniczne. Wynik testu Kruskala-Wallisa potwierdził, że przynajmniej jedna z grup różni się od pozostałych (Kruskal-Wallis chi-squared = 18,877, df = 2,  $p = 7,96 \times 10^{-05}$ ). Test post hoc wykazał, że grupa pacjentów z HM różni się istotnie od pozostałych grup, a grupy członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby nie różnią się istotnie między sobą (wartość krytyczna = 18,87688, Df = 2, P Chisq =  $7,960455 \times 10^{-05}$ , t-Student = 1,966113, Alfa = 0,05). Test Wilcoxon dla par obserwacji z korekcją Holma potwierdził istotność różnic pomiędzy grupą pacjentów z HM a

pozostałymi grupami (Tabela 35).

#### 8.2.2.6. Promień krzywizny rogówki (CCR)[mm]

Dla CCR, podobnie jak w przypadku IOP, otrzymano istotny wynik testu Shapiro-Wilka oraz nieistotny wynik testu Levene'a wskazujący na jednakowość wariancji w grupach pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby. Nieistotny wynik testu Kruskala-Wallisa dowiódł równości średnich danych grup, czyli tego, że grupy nie różnią się między sobą (Kruskal-Wallis chi-squared = 2,7268, df = 2, p = 0,2558). Test post hoc (wartość krytyczna = 2,726783, Df = 2, P Chisq = 0,2557917, t-Student = 1,966986, Alpha = 0,05) oraz test Wilcoxon potwierdziły brak istotnych różnic pomiędzy grupami (Tabela 35).

#### 8.2.2.7. Moc łamiąca rogówki (CP)[D]

Dla CP również otrzymano istotny wynik testu Shapiro-Wilka oraz nieistotny wynik testu Levene'a mówiący o jednakowości wariancji w grupach pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członkowie rodzin o nieoznaczonym statusie choroby. Nieistotny wynik testu Kruskala-Wallisa dowiódł braku różnic pomiędzy grupami (Kruskal-Wallis chi-squared = 1,538, df = 2, p = 0,4635). Test post hoc (wartość krytyczna = 1,53797, Df = 2, P Chisq = 0,4634832, t-Student = 1,966904, Alpha = 0,05) oraz test Wilcoxon potwierdziły brak istotnych różnic pomiędzy grupami (Tabela 35).

#### **8.2.2.8. Podsumowanie różnic pomiędzy badanymi grupami pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby**

W Tabeli 35 przedstawiono uzyskaną istotność różnic w analizach porównawczych pomiędzy grupami pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby pod względem wady sferycznej, SE, AL, IOP, CCR i CP. Różnice istotne statystycznie między grupą pacjentów z HM a grupą członków rodzin bez HM oraz między pacjentami z HM a członkami rodzin o nieoznaczonym statusie choroby uzyskano dla wady sferycznej, SE, AL i IOP. Natomiast istotne różnice między grupą członków rodzin bez HM a członkami rodzin o nieoznaczonym statusie choroby wykazano tylko dla wady sferycznej i SE.

**Tabela 35.** Podsumowanie różnic pomiędzy grupami pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby pod względem WS, SE, AL, IOP, CCR i CP

Porównywane grupy	WS	SE	AL	IOP	CCR	CP
HM - N	<2x10 <sup>-16</sup>	<2x10 <sup>-16</sup>	<2x10 <sup>-16</sup>	0,00012	0,53	0,71
HM - NA	<2x10 <sup>-16</sup>	<2x10 <sup>-16</sup>	<2x10 <sup>-16</sup>	0,00973	0,56	0,93
N - NA	0,0018	0,0046	0,084	0,77136	0,36	0,93

HM – grupa pacjentów z HM, N – grupa członków rodzin bez HM, NA – grupa członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby, WS – wada sferyczna, SE - ekwiwalent sferyczny, AL - długość osiowa gałki ocznej, IOP - ciśnienie wewnątrzgałkowe, CCR - promień krzywizny rogówki, CP - moc łamiąca rogówki. Różnice istotne statystycznie oznaczono wypełniając pola szarym kolorem.

### 8.2.3. Zależności pomiędzy badanymi parametrami okulistycznymi

W ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej korelowano ze sobą wartości wady sferycznej, SE, AL, IOP, CCR i CP pomiędzy grupami pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby. Wyniki korelacji przedstawiono w Tabeli 36 oraz na Rycinach 5 - 8.

Korelacja bardzo wysoka pomiędzy CP a CCR w grupach pacjentów z HM i członków rodzin bez HM wynika z liniowej zależności tych dwóch parametrów. We wszystkich grupach stwierdzono korelację wysoką pomiędzy AL a wadą sferyczną, gdzie wraz ze wzrostem wady sferycznej rośnie AL (Rycina 5). Natomiast wartości wady sferycznej są słabo skorelowane ze wzrostem IOP w grupie członków rodzin bez HM, wysoko w grupie członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby, a w grupie pacjentów z HM badana zależność nie osiągnęła istotności statystycznej mimo widocznej zależności (Rycina 6). Zależność między wadą sferyczną a CCR nie osiągnęła istotności statystycznej w żadnej z grup (Rycina 7).

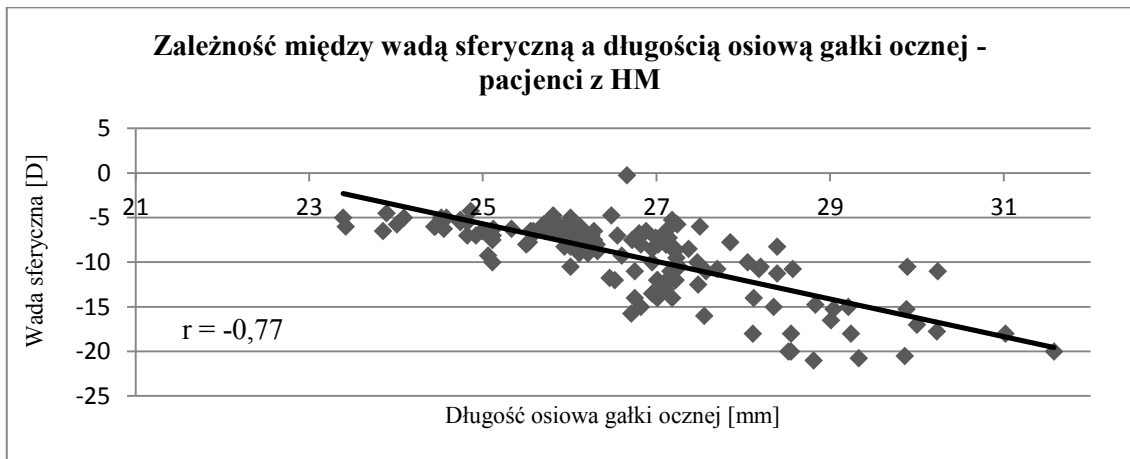
**Tabela 36.** Wyniki korelacji pomiędzy wagą sferyczną, ekwiwalentem sferycznym, długością osiową gałki ocznej, ciśnieniem wewnątrzgałkowym, promieniem krzywizny rogówki i mocą łamiącą rogówki

	Pacjenci z HM (N = 156)				Członkowie rodzin bez HM (N = 204)				Członkowie rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (N = 68)			
	AL	IOP	CCR	CP	AL	IOP	CCR	CP	AL	IOP	CCR	CP
<b>WS</b>	-0,77 p < 2,2x10 <sup>-16</sup>	-0,14 p= 0,08242	-0,12 p=0,159	0,04 p=0,6153	-0,52 p=1,74 x10 <sup>-15</sup>	-0,19 p=0,009203	-0,14 p=0,0665	0,21 p=0,006442	-0,64 p=4,59 x10 <sup>-08</sup>	-0,51 p=8,34 x10 <sup>-05</sup>	0,01 p=0,972	-0,27 p=0,05332
<b>SE</b>	-0,77 p < 2,2x10 <sup>-16</sup>	-0,11 p=0,196	-0,11 p=0,2007	0,03 p=0,7313	-0,50 p=3,63 x10 <sup>-14</sup>	-0,15 p=0,04676	-0,15 p=0,06202	0,18 p=0,01656	-0,64 p=3,75 x10 <sup>-08</sup>	-0,51 p=7,30 x10 <sup>-05</sup>	0,01 p=0,9219	-0,29 p=0,04367
<b>AL</b>	-	0,01 p=0,9128	0,15 p= 0,07938	-0,15 p=0,08791	-	0,29 p=6,30 x10 <sup>-05</sup>	0,34 p=1,05 x10 <sup>-05</sup>	-0,43 p=5,27 x10 <sup>-09</sup>	-	0,24 p=0,0864	0,22 p=0,1403	-0,07 p=0,6301
<b>IOP</b>	-	-	0,18 p=0,04292	-0,2 p=0,02465	-	-	0,07 p=0,3814	-0,19 p=0,0186	-	-	-0,30 p=0,06407	0,17 p=0,2908
<b>CCR</b>	-	-	-	-0,79 p < 2,2x10 <sup>-16</sup>	-	-	-	-0,79 p < 2,2x10 <sup>-16</sup>	-	-	-	-0,44 p=0,001723

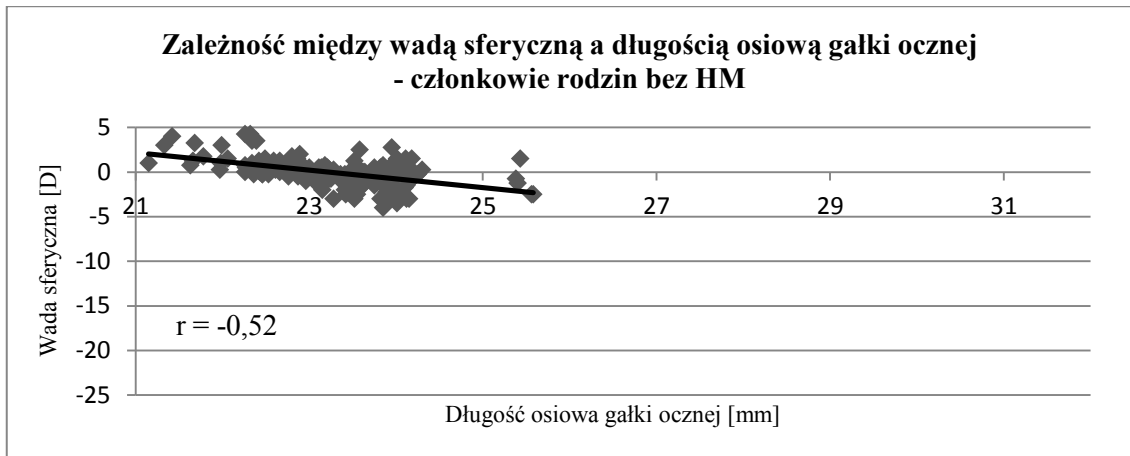
WS – waga sferyczna, SE - ekwiwalent sferyczny, AL - długość osiowa gałki ocznej, IOP - ciśnienie wewnątrzgałkowe, CCR - promień krzywizny rogówki, CP - moc łamiąca rogówki. Różnice istotne statystycznie oznaczono wypełniając pola szarym kolorem.



A



B

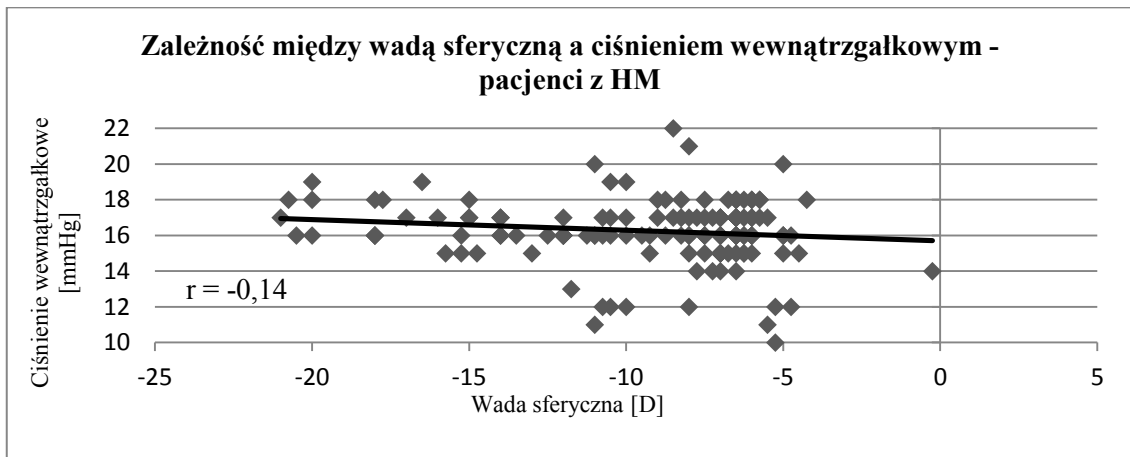


C

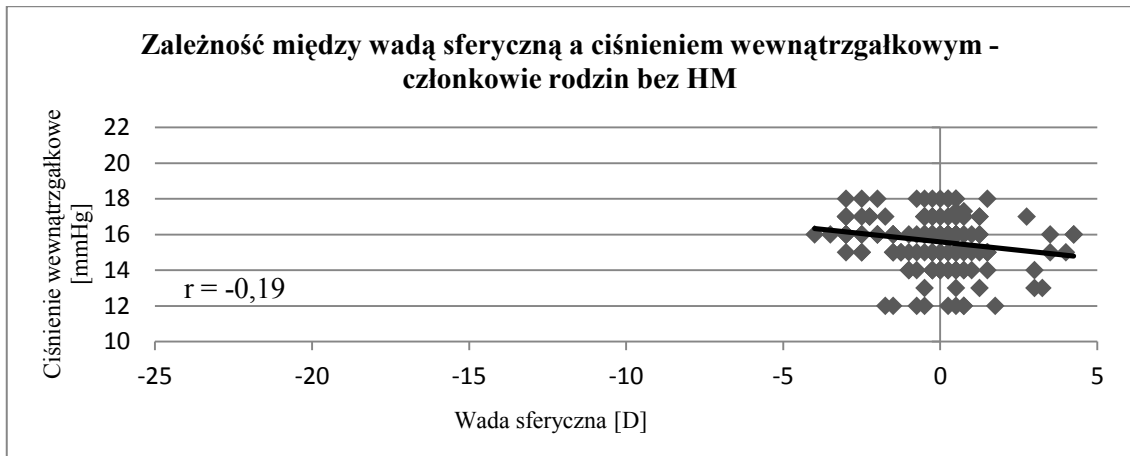


**Rycina 5.** Wykresy zależności między wielkością wady sferycznej a długością osiową gałki ocznej w grupach pacjentów z HM (A), członków rodzin bez HM (B) i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (C).

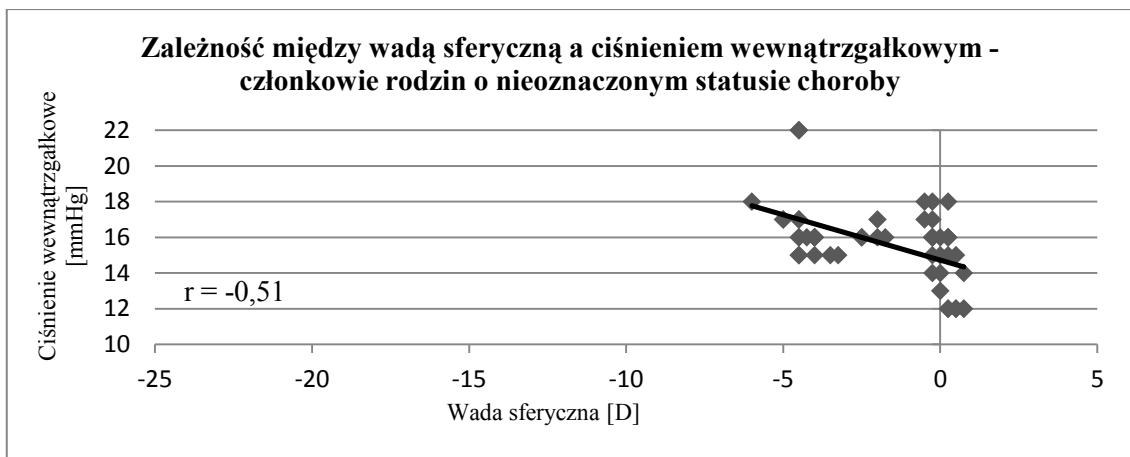
A



B

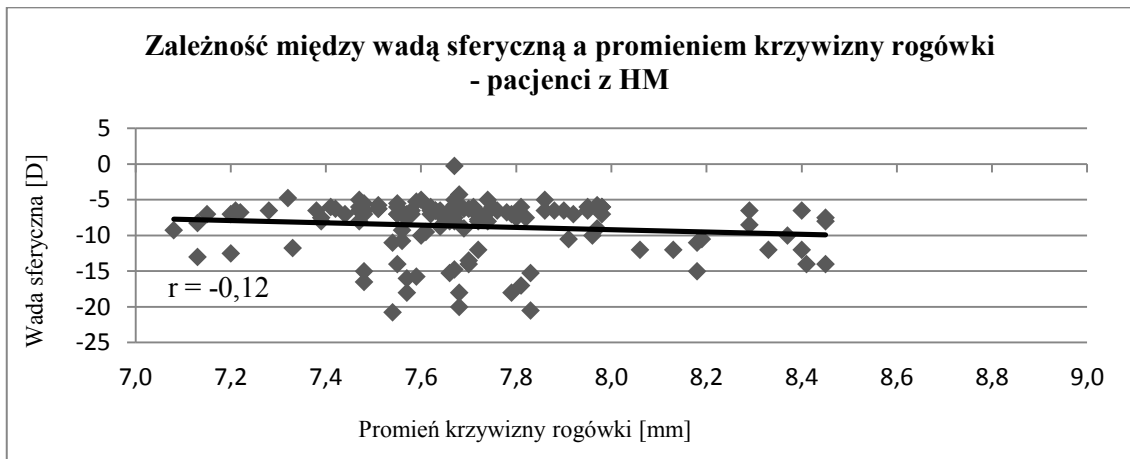


C

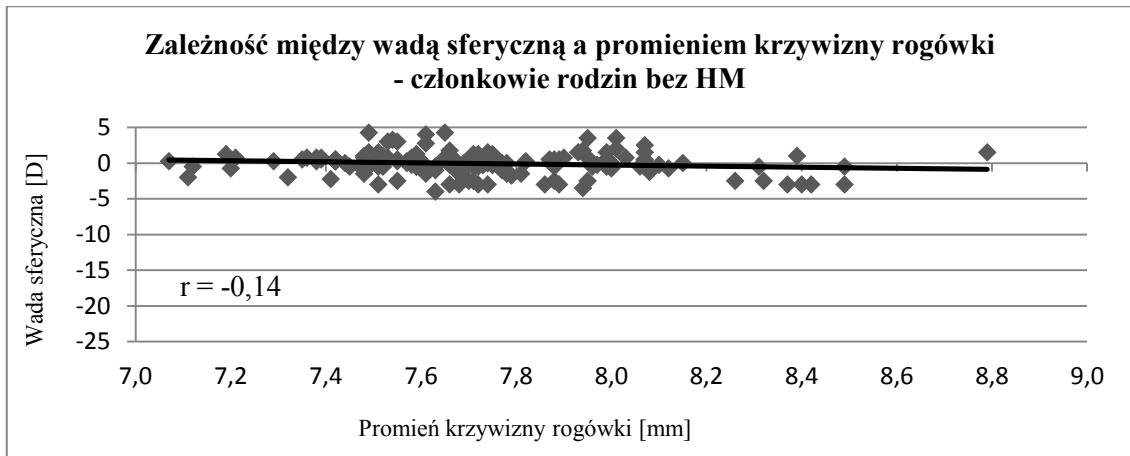


**Rycina 6.** Wykresy zależności między wielkością wady sferycznej a ciśnieniem wewnątrzgałkowym w grupach pacjentów z HM (A), członków rodzin bez HM (B) i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (C).

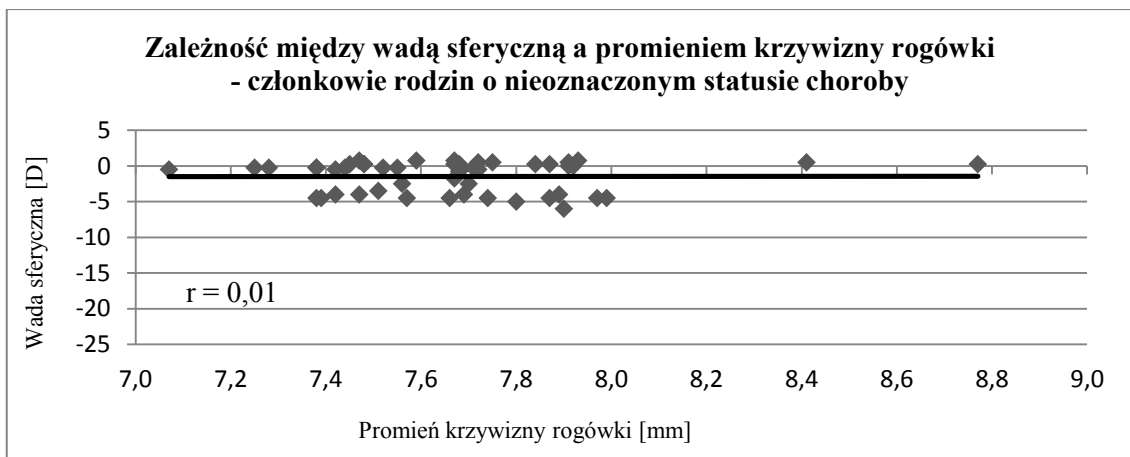
A



B

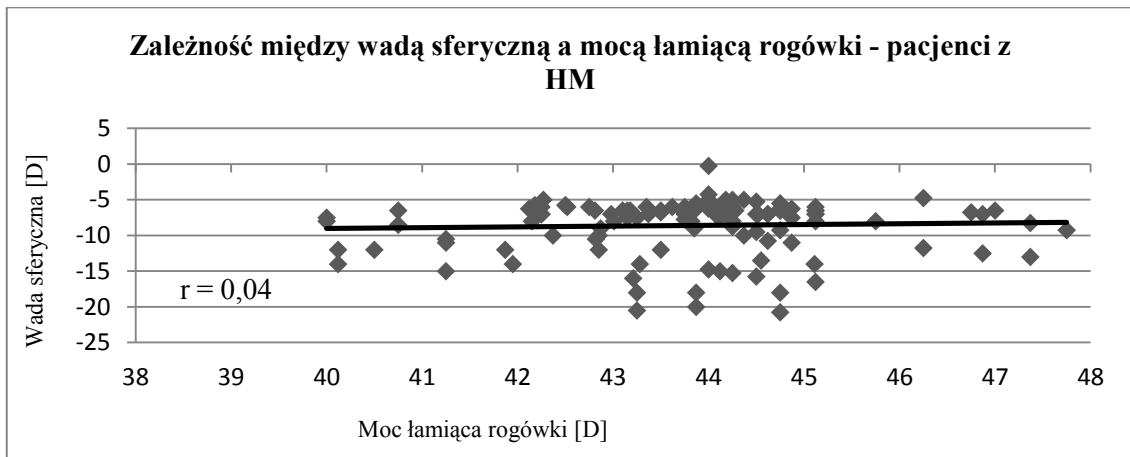


C

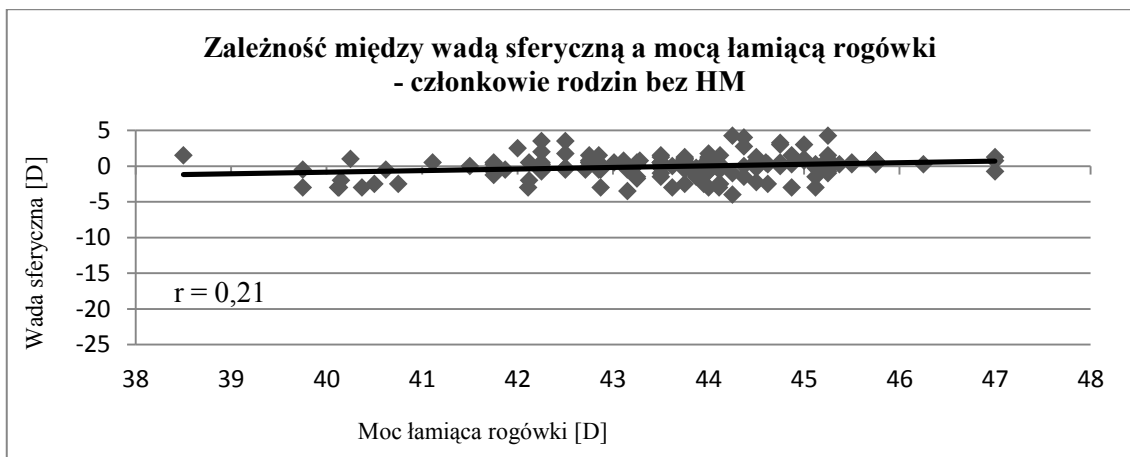


**Rycina 7.** Wykresy zależności między wielkością wady sferycznej a promieniem krzywizny rogówki w grupach pacjentów z HM (A), członków rodzin bez HM (B) i członków rodziny nieoznaczonym statusie choroby (C).

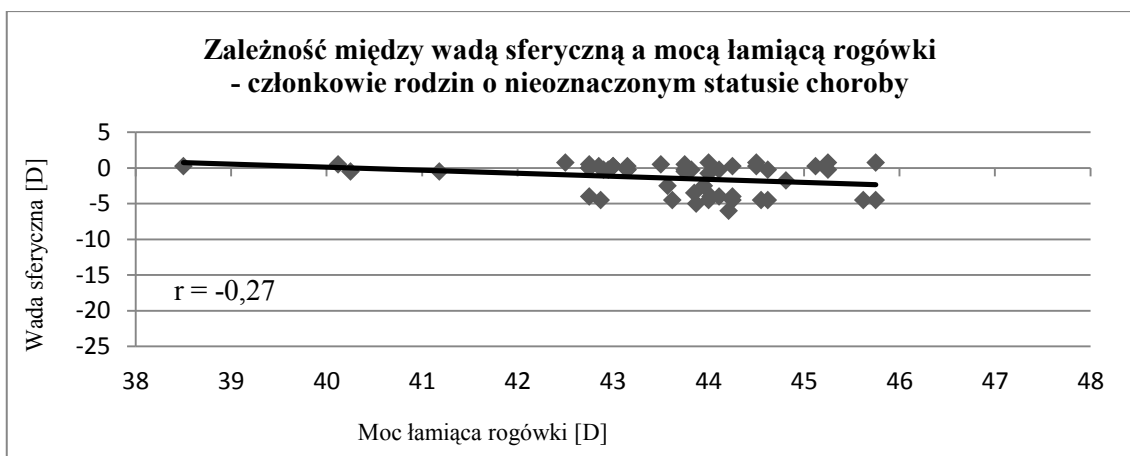
A



B



C



**Rycina 8.** Wykresy zależności między wielkością wady sferycznej a mocą łamiącą rogówki w grupach pacjentów z HM (A), członków rodzin bez HM (B) i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (C).

### 8.2.3.1. Korelacje parametrów okulistycznych przeprowadzone łącznie dla pacjentów ze wszystkich grup badanych

Korelacje pomiędzy poszczególnymi parametrami okulistycznymi bez podziału pacjentów na grupy prezentowane są w Tabeli 37.

Wyniki korelacji dla wszystkich pacjentów łącznie wskazują na bardzo wysoką zależność między wadą sferyczną i SE a AL oraz słabą zależność tych trzech parametrów z IOP. CCR i CP są bardzo wysoko skorelowane ze względu na wspomnianą wcześniej wzajemną zależność.

**Tabela 37.** Korelacje pomiędzy parametrami okulistycznymi bez podziału pacjentów na grupy

	AL	IOP	CCR	CP
WS	-0,91 $p < 2,2 \times 10^{-16}$	-0,25 $p = 5,417 \times 10^{-7}$	-0,03 $p = 0,5772$	-0,03 $p = 0,5901$
SE	-0,91 $p < 2,2 \times 10^{-16}$	-0,23 $p = 3,724 \times 10^{-6}$	-0,03 $p = 0,6154$	-0,04 $p = 0,485$
AL	-	0,22 $p = 1,392 \times 10^{-5}$	0,11 $p = 0,04842$	-0,09 $p = 0,1036$
IOP	-	-	0,05 $p = 0,4075$	-0,12 $p = 0,03464$
CCR	-	-	-	-0,74 $p < 2,2 \times 10^{-16}$

WS – wada sferyczna, SE - ekwiwalent sferyczny, AL - długość osiowa gałki ocznej, IOP - ciśnienie wewnątrzgałkowe, CCR - promień krzywizny rogówki, CP - moc łamiąca rogówki. Różnice istotne statystycznie oznaczono wypełniając pola szarym kolorem.

### 8.2.3.2. Korelacje parametrów okulistycznych z wiekiem

W Tabeli 38 zaprezentowano wartości korelacji parametrów okulistycznych (dla obu oczu łącznie) z wiekiem. Widoczna jest słaba zależność pomiędzy wadą sferyczną, SE, AL, IOP a wiekiem w grupie pacjentów z HM, natomiast w grupie członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby te korelacje są znacznie wyższe. W grupie członków rodzin bez HM tylko SE i IOP są skorelowane z wiekiem. Wszystkie wyniki dotyczące

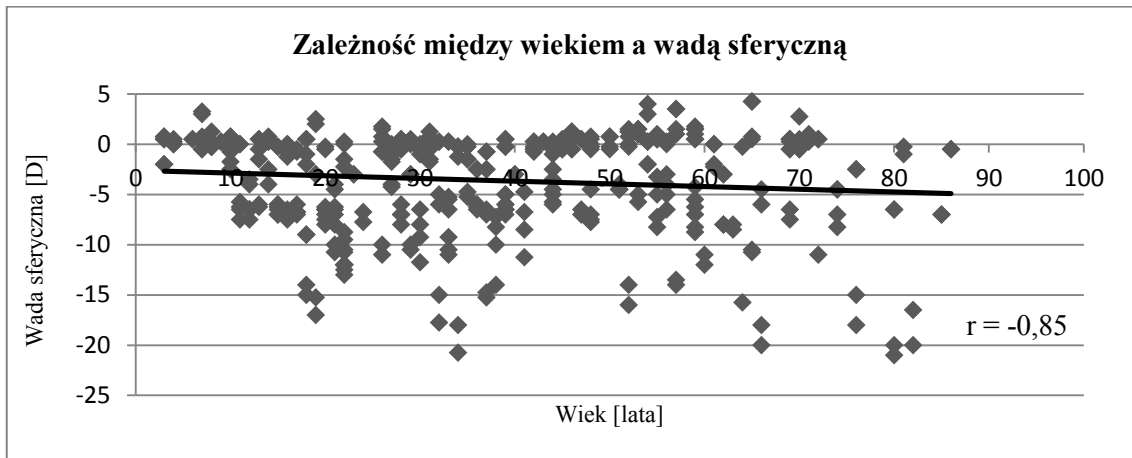
korelacji z wiekiem osiągnęły istotność statystyczną, gdy pod uwagę brano ogół badanych osób bez podziału na grupy. Najwyższe wartości korelacji zauważalne są między wadą sferyczną, SE, AL, CCR a wiekiem (Rycina 9).

**Tabela 38.** Zależności wady sferycznej, ekwiwalentu sferycznego, długości osiowej gałki ocznej, ciśnienia wewnątrzgałkowego, promienia krzywizny rogówki, mocy łamiącej rogówki z wiekiem

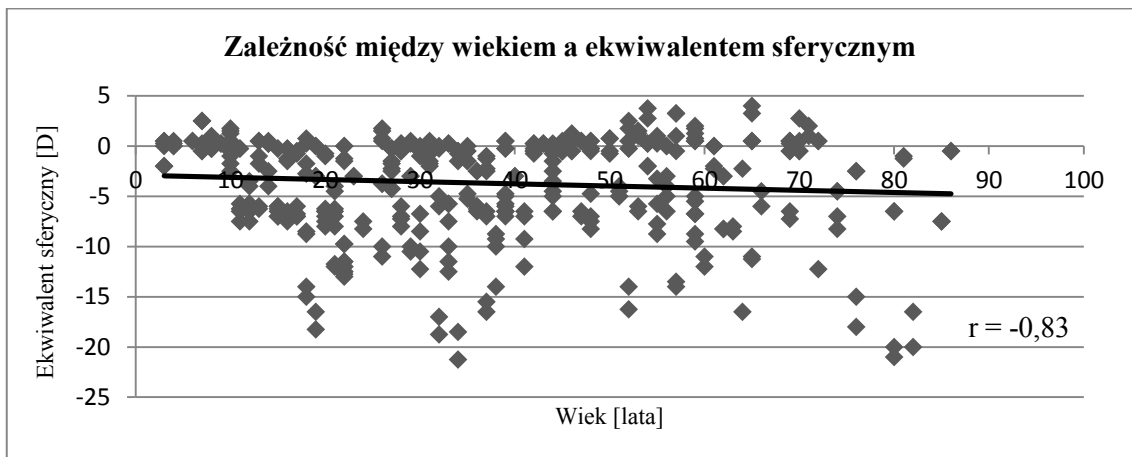
Parametr	Wiek			
	Pacjenci z HM (n=154)	Członkowie rodzin bez HM (n=196)	Członkowie rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (n=68)	Razem (wszyscy badani) (n=418)
WS	-0,23 p=0,004315	0,13 p=0,06685	-0,80 p=4,60x10 <sup>-16</sup>	-0,85 p< 2,2 x10 <sup>-16</sup>
SE	-0,20 p=0,01508	0,19 p=0,007136	-0,80 p=3,53 x10 <sup>-16</sup>	-0,83 p< 2,2 x10 <sup>-16</sup>
AL	0,16 p=0,04207	0,02 p=0,8153	0,60 p=3,90x10 <sup>-7</sup>	0,83 p< 2,2 x10 <sup>-16</sup>
IOP	0,29 p=0,000238	0,38 p=1,90 x10 <sup>-7</sup>	0,37 p=0,006413	0,47 p< 2,2 x10 <sup>-16</sup>
CCR	-0,06 p= 0,499	0,03 p=0,706	0,10 p=0,4974	-0,82 p< 2,2 x10 <sup>-16</sup>
CP	0,12 p=0,1739	-0,09 p=0,239	0,23 p=0,1101	0,18 p=0,0004617

WS – wada sferyczna, SE - ekwiwalent sferyczny, AL - długość osiowa gałki ocznej, IOP - ciśnienie wewnątrzgałkowe, CCR - promień krzywizny rogówki, CP - moc łamiąca rogówki. Kolorem zaznaczono korelacje istotne statystycznie.

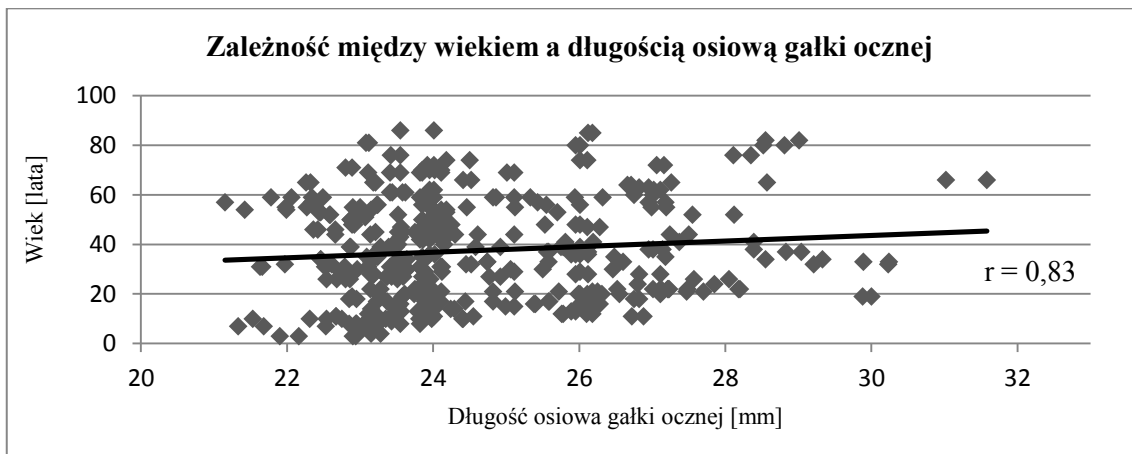
A



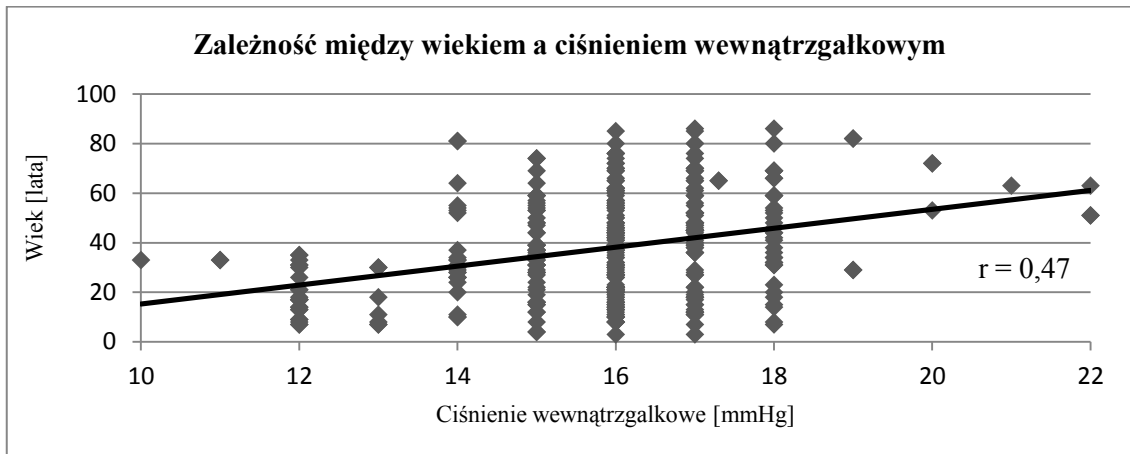
B



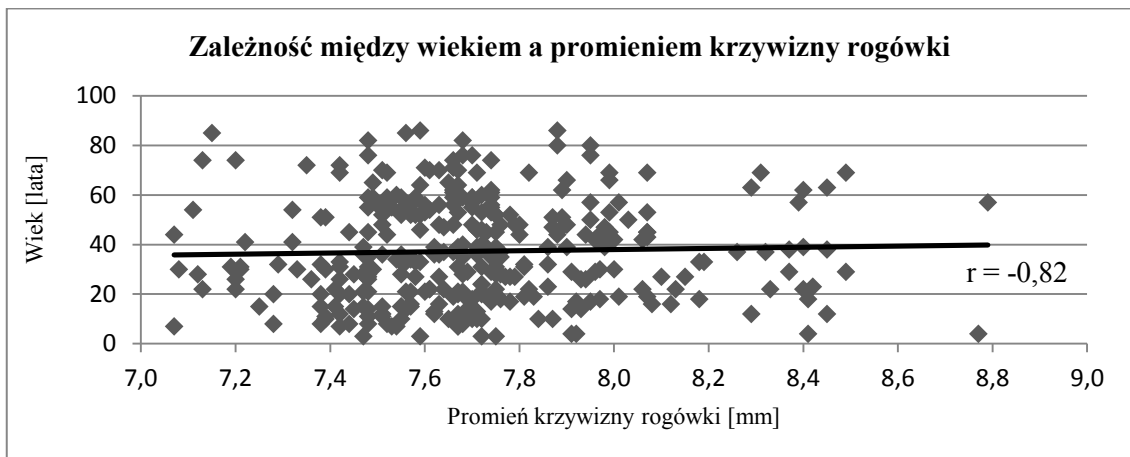
C



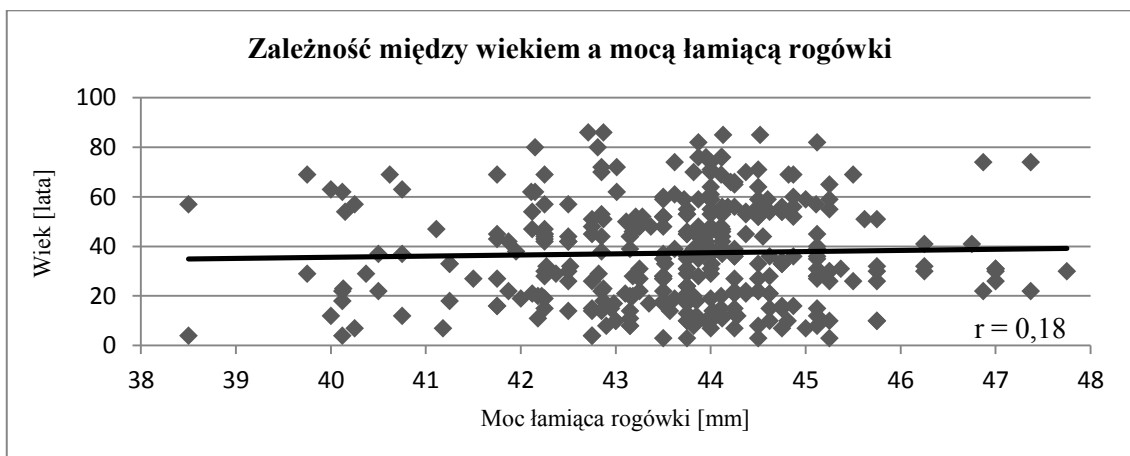
D



E



F



**Rycina 9.** Wykresy ilustrujące korelacje pomiędzy wiekiem a poszczególnymi parametrami dla obu oczu łącznie bez podziału badanych na grupy.



### 8.3. Weryfikacja wyników sekwencjonowania eksomowego

ES zostało przeprowadzone z wykorzystaniem DNA pochodzącego od 17 członków z siedmiu polskich rodzin z HM (rodziny HM-14, HM-33, HM-76, HM-77, HM-78, HM-80 i HM-81).

#### 8.3.1. Analiza bioinformatyczna wyników sekwencjonowania eksomowego

Zidentyfikowano 110 wariantów sekwencji obecnych u dwóch członków z HM (HM-78-08 and HM-78-12) i jednocześnie nieobecnych u członka bez HM (HM-78-06) w rodzinie HM-78. Analizy bioinformatyczne wyników ES dla rodziny HM-78 zawężyły listę wariantów do ośmiu, c.592G>A w *AEBPI* (OMIM:602981), c.2518C>T w *BCAN* (OMIM:600347), c.1642G>C w *FLRT3* (OMIM:604808), c.783G>T w *MCL1* (OMIM:159552), c.482G>A w *PDE6B* (OMIM:180072), c.1553-4A>G w *PGAP1* (OMIM:611655), c.938C>T w *SLC35E2B* (Entrez Gene:728661), c.97G>C w *ZNF692* (OMIM:617758), które następnie poddano dalszej analizie eksperymentalnej (Tabela 39).

#### 8.3.2. Weryfikacja wyników sekwencjonowania eksomowego

Analizy sekwencjonowania metodą Sanger'a potwierdziły obecność wybranych wariantów u członków HM-78-08 i HM-78-12, a analiza segregacji przeprowadzona u pozostałych członków rodziny HM-78 wykazała segregację wariantów c.1642G>C w genie *FLRT3* (GRCh37/hg19, RefSeq NM\_198391) i c.938C>T w genie *SLC35E2B* (GRCh37/hg19, RefSeq NM\_001110781) z fenotypem HM (Tabela 39, Rycina 10). Warianty były także obecne u członka HM-78-10, u którego stwierdzono krótkowzroczność średnią z -4,00 D dla oka prawego i -4,50 D dla oka lewego.

**Tabela 39.** Warianty wybrane do analizy segregacji w rodzinie HM-78 i ich możliwy wpływ na strukturę i funkcje białek

Gen	Numer dostępu	Pozycja*	CMG** (x10-04)	esp5400 <sup>†</sup> (x10-04)	1000 <sup>§</sup> genomes	Zmiana nukleotydu	Zmiana aminokwasu	phyloPDB	Mutation Taster	SIFT	PolyPhen- 2	SNP	Segregacja
<i>AEBP1</i>	NM_001129	chr7:g.44146483G>A	2,68	0	0	c.592G>A	p.Gly198Arg	0,461	D	B	B	rs777560888	nie
<i>BCAN</i>	NM_021948	chr1:g.156628415C>T	6,71	1,54	0	c.2518C>T	p.Leu840Phe	2,705	D	D	D	rs200282065	nie
<b><i>FLRT3</i></b>	<b>NM_198391</b>	<b>chr20:g.14306511C&gt;G</b>	<b>2,68</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>c.1642G&gt;C</b>	<b>p.Val548Leu</b>	<b>2,718</b>	<b>D</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>n/a</b>	<b>tak</b>
<i>MCL1</i>	NM_182763	chr1:g.150549873C>A	2,68	0	0	c.783G>T	p.Trp261Cys	2,537	D	D	D	n/a	nie
<i>PDE6B</i>	NM_000283	chr4:g.628479G>A	2,68	0	0	c.482G>A	p.Ser161Asn	1,944	D	B	P	rs574098823	nie
<i>PGAP1</i>	NM_024989	chr2:g.197737754T>C	2,68	0	0	c.1553-4A>G		0	n/a	D	n/a	rs747122565	nie
<b><i>SLC35E2B</i></b>	<b>NM_001110781</b>	<b>chr1:g.1599808G&gt;A</b>	<b>4,03</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>c.938C&gt;T</b>	<b>p.Thr313Met</b>	<b>2,518</b>	<b>D</b>	<b>B</b>	<b>D</b>	<b>rs778277949</b>	<b>tak</b>
<i>ZNF692</i>	NM_001193328	chr1:g.249152412C>G	2,68	0,79	0	c.97G>C	p.Gly33Arg	1,233	D	D	D	rs144108516	nie

D = patogenny; P = prawdopodobnie patogenny; B = łagodny

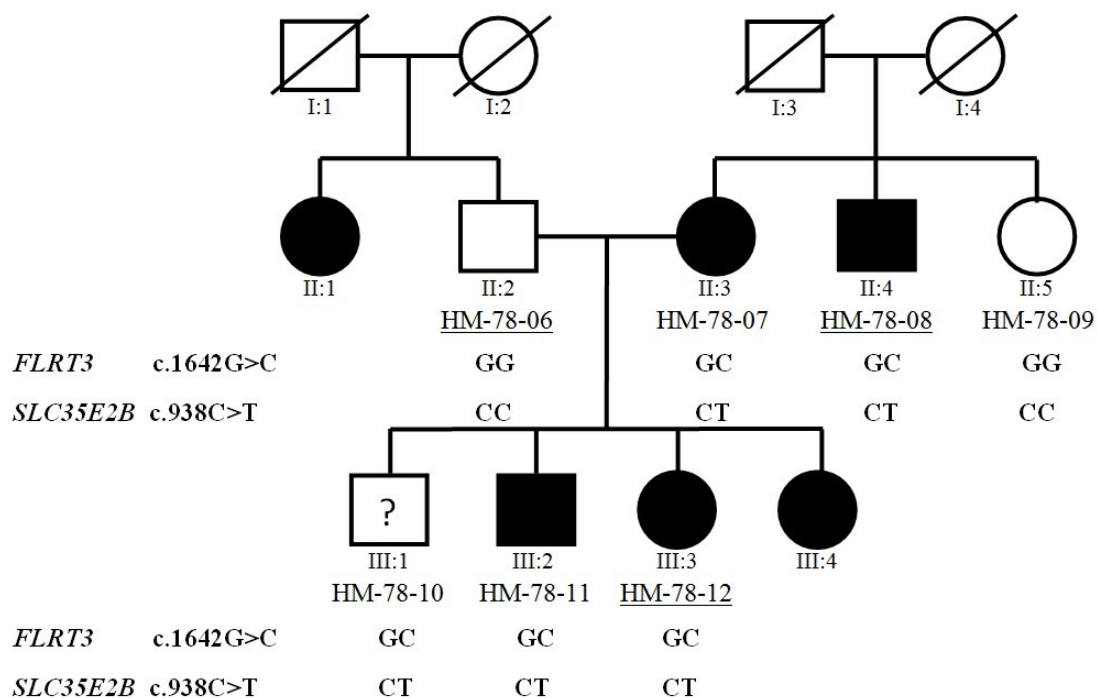
Pogrubioną czcionką zaznaczono warianty segregujące z fenotypem HM w badanej rodzinie.

\*Human Genome Browser – hg19 assembly (GRCh37).

\*\*Centers for Mendelian Genomics, Baylor College of Medicine (MAF na podstawie ~5000 eksomów).

<sup>†</sup>Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP). Seattle. WA; opublikowane ESP6500SI-V2.

<sup>§</sup>1000 Genome phase 1, dane genotypowania 1094 osób, opublikowane w maju 2011.



**Rycina 10.** Rodowód rodziny HM-78 i wynik analizy segregacji wariantów w genach *FLRT3* (c.1642G>C) i *SLC35E2B* (c.938C>T). Czarne symbole oznaczają status HM; białe symbolizują fenotyp bez HM, a członek rodziny z nieoznaczonym statusem choroby oznaczony jest znakiem zapytania. Podkreślone numery prób DNA wskazują na członków rodziny, którzy byli zakwalifikowani do analiz ES.

W ramach realizacji pracy doktorskiej wykazano, że warianty w genach c.1642G>C w *FLRT3* i c.938C>T w *SLC35E2B* są specyficzne tylko dla rodziny 78 i nie segregują z fenotypem HM w pozostałych 35 analizowanych rodzinach polskich (Załącznik 3). Z 35 rodzin 14 było przedmiotem analizy fenotypowej niniejszej rozprawy doktorskiej. Analiza fenotypowa pozostałych 21 rodzin została przedstawiona w doktoracie lek. med. Agaty Frajdenberg [124].

Celem dalszej weryfikacji wyników ES dokonano selekcji wariantów sekwencji dla rodzin HM-33 i HM-81 według kryteriów wymienionych w rozdziale Metody. W ramach pracy doktorskiej przeprowadzona została analiza segregacji wariantów znajdujących się w genach, które mogłyby być powiązane z krótkowzrocznością, innymi zaburzeniami wzroku lub narządem wzroku na podstawie funkcji genu, jego ekspresji i doniesień literaturowych (Tabela 40). Warianty sekwencji wybrane dla rodziny HM-33 były uprzednio weryfikowane w pracy magisterskiej mgr E. Ślęzak (Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, 2016 rok), jednak obecne analizy prowadzono niezależnie od wyników pracy magisterskiej.

**Tabela 40.** Warianty sekwencji DNA wybrane po analizie ES do weryfikacji i analiz segregacji w rodzinach HM-33 i HM-81

Rodzina	Gen	Kodowane białko*	Lokalizacja chromosomowa	Wariant sekwencji
HM-33	<i>ABLIM2</i>	actin binding LIM protein family member 2	4p16.1	ekson 19 c.1682G>A p.R561H
	<i>ANAPC1</i>	anaphase promoting complex subunit 1	2q13	ekson 8 c.794T>G p.V265G
	<i>ANKMY2</i>	ankyrin repeat and MYND domain containing 2	7p21.1	ekson 3 c.203A>T p.H68L
	<i>FAM160A1</i>	family with sequence similarity 160 member A1	4q31.3	ekson 11 c.2417A>G p.D806G
	<i>IFIT1B</i>	interferon induced protein with tetratricopeptide repeats 1B	10q23.31	ekson 1 c.1153G>A p.G385S
	<i>INA</i>	internexin neuronal intermediate filament protein alpha	10q24.33	ekson 1 c.799G>A p.E267K
	<i>LRP1B</i>	LDL receptor related protein 1B	2q22.1-q22.2	ekson 43 c.7035G>A p.M2345I
	<i>PRPF38B</i>	pre-mRNA processing factor 38B	1p13.3	ekson 6 c.1322G>A p.S441N
	<i>RALGAPB</i>	ral GTPase activating protein non-catalytic beta subunit	20q11.23	ekson 9 c.1258T>C p.S420P
	<i>ST14</i>	suppression of tumorigenicity 14	11q24.3	ekson 5 c.557G>A p.R186H
	<i>ZC3H13</i>	zinc finger CCCH-type containing 13	13q14.13	ekson 9 c.1049G>T p.R350L
<i>ZNF446</i>	zinc finger protein 446	19q13.43	ekson 2 c.221T>G p.F74C	
HM-81	<i>ATAT1</i>	alpha tubulin acetyltransferase 1	6p21.33	ekson 7 c.566T>G p.F189C
	<i>CFHR2</i>	complement factor H related 2	1q31.3	ekson 3 c.430+1G>A
	<i>DUT</i>	deoxyuridine triphosphatase	15q21.1	ekson 2 c.298C>T p.P100S
	<i>ELAVL4</i>	ELAV like RNA binding protein 4	1p33	ekson 2 c.148G>A p.V50I
	<i>IL1RAP</i>	interleukin 1 receptor accessory protein	3q28	ekson 11 c.1607G>C p.G536A
	<i>IL36B</i>	interleukin 36, beta	2q14.1	ekson 5 c.391+2T>C
	<i>PGS1</i>	phosphatidylglycerophosphate synthase 1	17q25.3	ekson 8 c.1513G>A p.V505M
	<i>PSAT1</i>	phosphoserine aminotransferase 1	9q21.2	ekson 4 c.328A>C p.K110Q
	<i>RABEPK</i>	Rab9 effector protein with Kelch motifs	9q33.3	ekson 4 c.256C>T p.R86W
	<i>SEMA3C</i>	semaphorin 3C	7q21.11	ekson 9 c.908A>G p.D303G
	<i>SIPAIL2</i>	signal induced proliferation associated 1 like 2	1q42.2	ekson 1 c.205C>T p.P69S
<i>SLC6A19</i>	solute carrier family 6 member 19	5p15.33	ekson 11 c.1701+1G>A	

\*nazwy białek zgodne z nomenklaturą z bazy HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute (HGMC)

#### 8.3.2.1. Wyniki analiz segregacji w rodzinie HM-33

Występowanie wybranych wariantów sekwencji zostało potwierdzone u pacjentów zakwalifikowanych do analizy ES, HM-33-15 i HM-33-16. Jednakże jeden z uzyskanych wyników sekwencjonowania metodą Sangera nie zgadzał się z wynikiem ES. Wariant c.1049G>T w genie *ZC3H13* u HM-33-16 według wyników ES miał charakter heterozygotyczny, natomiast sekwencjonowanie Sangera wskazało na homozygotyczną zmianę c.1049G>T (Tabela 41). Jest to niezgodne z dziedziczeniem, ponieważ tylko u jednego z rodziców, HM-33-10, wykryto zmianę heterozygotyczną c.1049G>T. Podejrzewa się wystąpienie u dziecka delecji w tym regionie co tłumaczyłoby obecność sygnału wyłącznie dla tyminy na chromatogramie.

Wykazano, że wybrane warianty nie segregują zgodnie z fenotypem HM u pozostałych członków rodzin (Tabela 41).

#### 8.3.2.2. Wyniki analiz segregacji w rodzinie HM-81

Występowanie wariantów sekwencji zostało potwierdzone u pacjentów zakwalifikowanych do ES – HM-81-06 i HM-81-08 (Tabela 42). Zgodnie z wynikami ES u badanego pacjenta HM-81-05 nie wykryto analizowanych wariantów sekwencji. Warianty c.430+1G>A w *CFHR2* oraz c.298C>T w *DUT* segregowały zgodnie z fenotypem HM tylko u członków rodziny od strony matki HM-81-06. U pacjentów HM-81-02 i HM-81-05 nie wykryto zmian w tych pozycjach w genach. Pozostałe warianty nie segregują zgodnie z fenotypem HM.

**Tabela 41.** Wyniki analizy segregacji w rodzinie HM-33

Numer pacjenta	Fenotyp	<i>PRPF38B</i>	<i>ANAPC1</i>	<i>LRP1B</i>	<i>ABLIM2</i>	<i>FAM160A</i>	<i>ANKMY2</i>	<i>IFIT1B</i>	<i>INA</i>	<i>ST14</i>	<i>ZC3H13</i>	<i>ZNF446</i>	<i>RALGAPB</i>
		c.1322G>A	c.794T>G	c.7035G>A	c.1682G>A	c.2417A>G	c.203A>T	c.1153G>A	c.799G>A	c.557G>A	c.1049G>T	c.221T>G	c.1258T>C
		1p13.3	2q13	2q22.1-q22.2	4p16.1	4q31.3	7p21.1	10q23.31	10q24.33	11q24.3	13q14.13	19q13.43	20q11.23
HM-33-10	N	GG	TG	GG	GA	AA	AA	GA	GA	GG	GT	TT	TC
HM-33-11	N	AA	TT	GA	GG	AG	AT	GG	GG	GA	GG	TG	TT
HM-33-15	HM	GA	TG	GA	GA	AG	AT	GA	GA	GA	GT	TG	TC
HM-33-16	HM	GA	TG	GA	GA	AG	AT	GA	GA	GA	TT*	TG	TC
HM-33-06	N	GA	bd	GA	bd	bd	bd	bd	bd	bd	GG	bd	bd
HM-33-07	N	GA	bd	GA	bd	bd	bd	bd	bd	bd	GG	bd	bd
HM-33-14	HM	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd	bd	GG	bd	bd

\*wynik sekwencjonowania metodą Sangera (TT) niezgodny z wynikiem sekwencjonowania eksomowego (GT)

**Tabela 42.** Wyniki analizy segregacji w rodzinie HM-81

Numer pacjenta	Fenotyp	<i>ATAT1</i> c.566T>G	<i>CFHR2</i> c.430+1G>A	<i>DUT</i> c.298C>T	<i>ELAVL4</i> c.148G>A	<i>IL1RAP</i> c.1607G>C	<i>PGSI</i> c.1513G>A	<i>PSAT1</i> c.328A>C	<i>RABEPK</i> c.256C>T	<i>SEMA3C</i> c.908A>G	<i>SIPA1L2</i> c.205C>T	<i>SLC6A19</i> c.1701+1G>A	<i>IL36B</i> c.391+2T>C
HM-81-02	HM	TT	GG	CC	GG	GG	GG	AA	CC	AA	CC	GG	TC
HM-81-04	N	TG	GG	CC	GG	GC	GA	AC	CT	AG	CT	GA	TT
HM-81-05	HM	TT	GG	CC	GG	GG	GG	AA	CC	AA	CC	GG	TC
HM-81-06	HM	TG	GA	CT	GA	GC	GA	AC	CT	AG	CT	GA	TT
HM-81-07	HM	TT	GA	CT	GG	GG	GG	AC	CT	AA	CC	GG	TC
HM-81-08	HM	TG	GA	CT	GA	GC	GA	AC	CT	AG	CT	GA	TC

### 8.3.3. Dodatkowa analiza bioinformatyczna wyników sekwencjonowania eksomowego

W ramach pracy doktorskiej przeprowadzono dodatkową analizę bioinformatyczną wyników ES w celu wyszukania innych wariantów sekwencji potencjalnie powiązanych z występowaniem HM w badanych rodzinach, zgodnie z dodatkowym protokołem analizy bioinformatycznej. Analizowano wyniki dla wszystkich siedmiu rodzin zakwalifikowanych do ES z zastosowaniem kryteriów filtrowania wymienionych w rozdziale Metodyka z tą zmianą, że selekcjonowano warianty określone jako patogenne według minimum trzech z czterech algorytmów SIFT, Mutation Taster, LRT i PolyPhen-2 zamiast jednego z trzech. Analizowano wyniki ES dla wszystkich siedmiu rodzin, które były zakwalifikowane do ES - HM-14, HM-33, HM-76, HM-77, HM-78, HM-80 i HM-81. Do analizy segregacji wybrano warianty sekwencji prezentowane w Tabeli 43.



**Tabela 43.** Warianty sekwencji wybrane z nowej analizy bioinformatycznej odczytów sekwencjonowania eksomowego do weryfikacji i analizy segregacji w rodzinach HM-14, HM-33, HM-76, HM-77, HM-78, HM-80 i HM-81

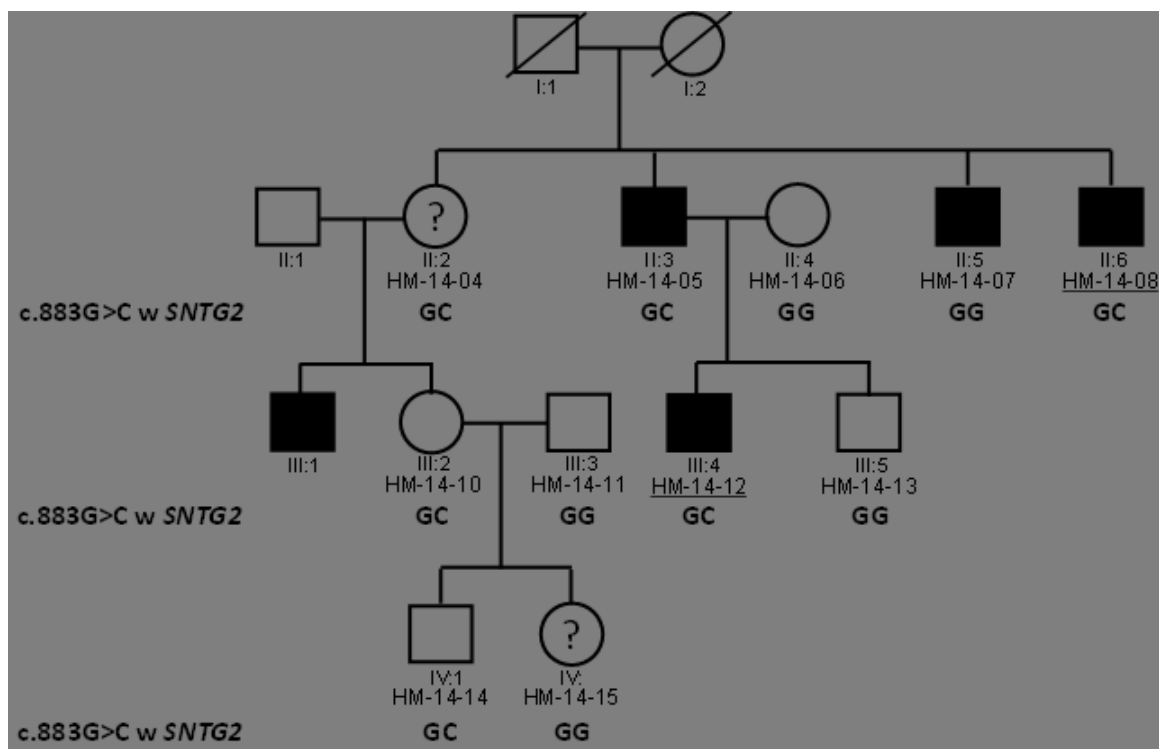
Rodzina	Gen	Kodowane bialko*	Lokalizacja	Wariant sekwencji
HM-14	<i>SNTG2</i>	syntrophin gamma 2	2p25.3	ekson 11 c.883G>C p.D295H
	<i>CPT1B</i>	carnitine palmitoyltransferase 1B	22q13.33	ekson 7 c.754G>A p.V252M
HM-33	<i>KDR</i>	kinase insert domain receptor	4q11-q12	ekson 16 c.2312C>T p.T771M
	<i>PRKAA2</i>	protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2	1p31	ekson 4 c.352C>T p.R118W
	<i>SLC28A1</i>	solute carrier family 28 member 1	15q25.3	ekson 12 c.1013T>C p.V338A
	<i>WDR36</i>	WD repeat domain 36	5q22.1	ekson 1 c.279G>T p.K93N
HM-76	<i>MACF1</i>	microtubule-actin crosslinking factor 1	1p32-p31	ekson 63 c.11383A>G p.K3795E
	<i>ABCC6</i>	ATP binding cassette subfamily C member 6	16p13.1	ekson 26 c.3704G>A p.R1235Q
HM-77	<i>PANX1</i>	pannexin 1	11q21	ekson 4 c.928G>A p.E310K
	<i>PRDMI</i>	PR/SET domain 1	6q21	ekson 4 c.562A>G p.K188E
HM-78	<i>MYO7A</i>	myosin VIIA	11q13.5	ekson 7 c.725T>G p.V242G
HM-80	<i>ILK</i>	integrin linked kinase	11p15.4	ekson 3 c.157T>A p.L53M
	<i>LAMB2</i>	laminin subunit beta 2	3p21	ekson 14 c.1750C>A p.R584S
HM-81	<i>ABCA1</i>	ATP binding cassette subfamily A member 1	9q31.1	ekson 43 c.5773C>T p.R1925W
	<i>CRYGD</i>	crystallin gamma D	2q33.3	ekson 2 c.181G>T p.G61C
	<i>GRB7</i>	growth factor receptor-bound protein 7	17q12	ekson 7 c.728G>A p.R243Q
	<i>HSD17B14</i>	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 14	19q13.33	ekson 9 c.700G>A p.E234K
	<i>CIAO3</i>	nuclear prelamin A recognition factor like	16p13.3	ekson 10 c.1112G>A p.R371H
	<i>NEIL2</i>	nei like DNA glycosylase 2	8p23.1	ekson 3 c.77G>C p.G26A

\*nazwy białek zgodne z nomenklaturą z bazy HUGO Gene Nomenclature Committee at the European Bioinformatics Institute (HGMC)

#### 8.3.4. Weryfikacja wybranych wyników sekwencjonowania eksomowego

##### 8.3.4.1. Wyniki analiz segregacji w rodzinie HM-14

Wykonano analizę segregacji wariantu c.883G>C w genie *SNTG2* w rodzinie HM-14, jednak wariant nie segregował zgodnie z fenotypem HM u pozostałych członków badanej rodziny (Rycina 11).



**Rycina 11.** Rodowód rodziny HM-14 i wynik analizy segregacji wariantu w genie *SNTG2* (c.883G>C). Czarne symbole oznaczają status HM; białe symbolizują osoby bez HM, a członkowie z nieoznaczonym statusem choroby oznaczeni są znakiem zapytania. Podkreślone numery prób DNA wskazują na członków rodziny, którzy byli zakwalifikowani do analiz ES.

#### 8.3.4.2. Wyniki analiz segregacji w rodzinie HM-33

Nie wykazano segregacji wariantów w genach *PRKAA2* (c.352C>T), *SLC28A1* (c.1013T>C), *CPT1B* (c.754G>A), *WDR36* (c.279G>T) i *KDR* (c.2312C>T) z fenotypem HM w rodzinie HM-33 (Tabela 44), natomiast potwierdzono wyniki ES u pacjentów HM-33-15 i HM-33-16.

**Tabela 44.** Wyniki sekwencjonowań dla członków rodziny HM-33

Numer pacjenta	Fenotyp	<i>PRKAA2</i> c.352C>T	<i>SLC28A1</i> c.1013T>C	<i>CPT1B</i> c.754G>A	<i>WDR36</i> c.279G>T	<i>KDR</i> c.2312C>T
HM-33-10	N	CC	TC	GA	GT	CC
HM-33-11	N	CT	TT	GG	GG	CT
HM-33-15	HM	CT	TC	GA	GT	CT
HM-33-16	HM	CT	TC	GA	GT	CT

#### 8.3.4.3. Wyniki analiz segregacji w rodzinie HM-76

Wariant sekwencji w genie *MACF1* (c.11383A>G) wybrany dla rodziny HM-76 nie segregował z fenotypem HM u pozostałych członków rodzin (Tabela 45).

**Tabela 45.** Wyniki sekwencjonowań dla członków rodziny HM-76

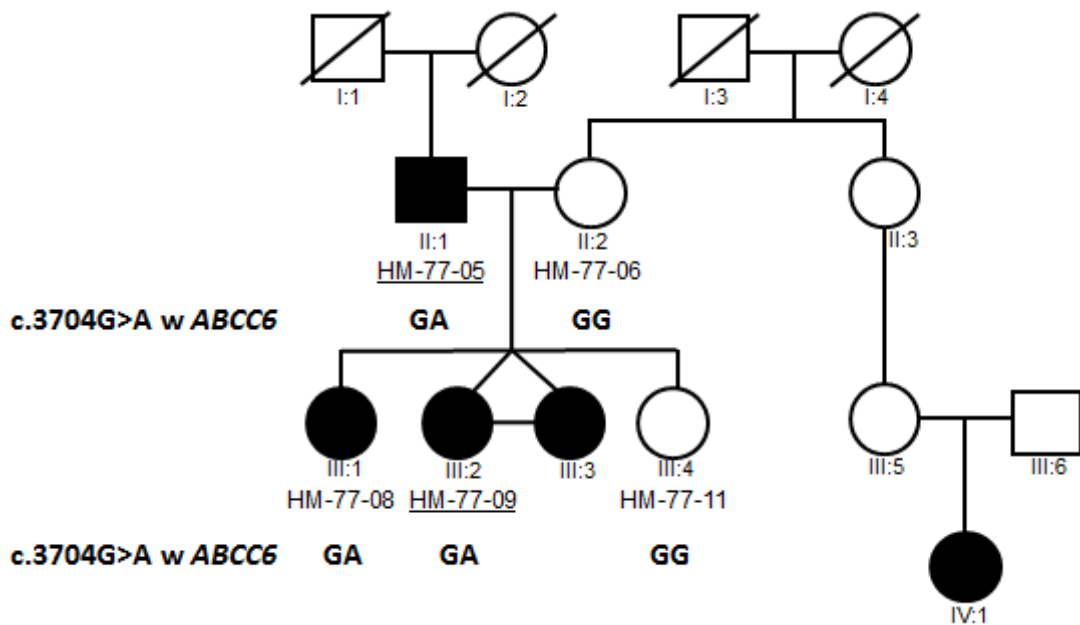
Numer pacjenta	Fenotyp	<i>MACF1</i> c.11383A>G
HM-76-11	HM	AG
HM-76-12	HM	AG
HM-76-05	NA	AG
HM-76-06	N	AA
HM-76-03	HM	AA
HM-76-04	N	AA
HM-76-07	NA	AA
HM-76-08	N	AA
HM-76-09	N	AA
HM-76-10	N	AA
HM-76-13	HM	AA

#### 8.3.4.4. Analiza segregacji w rodzinie HM-77

Z trzech wariantów sekwencji wybranych dla rodziny HM-77 wariant c.3704G>A w genie *ABCC6* segregował z fenotypem HM (Rycina 12, Tabela 46). Warianty w genach *PANX1* (c.928G>A) i *PRDMI* (c.562A>G) nie segregowały z HM w tej rodzinie (Tabela 46).

**Tabela 46.** Wyniki sekwencjonowań dla członków rodziny HM-77

Numer pacjenta	Fenotyp	<i>ABCC6</i> c.3704G>A	<i>PANX1</i> c.928G>A	<i>PRDMI</i> c.562A>G
HM-77-05	HM	GA	GA	AG
HM-77-09	HM	GA	GA	AG
HM-77-06	N	GG	GG	AA
HM-77-11	N	GG	GG	AG
HM-77-08	HM	GA	GG	AA



**Rycina 12.** Rodowód rodziny HM-77 i wynik analizy segregacji wariantu w genie *ABCC6* (c.3704G>A). Czarne symbole oznaczają status HM; a białe symbolizują osoby bez HM. Podkreślone numery prób DNA wskazują na członków rodziny, którzy byli zakwalifikowani do analizy ES.

Wariant c.3704G>A w genie *ABCC6* segregujący zgodnie z fenotypem HM w rodzinie HM-77 weryfikowano za pomocą sekwencjonowania metodą Sangera w pozostałych 35 rodzinach polskich jakimi dysponowano. Obecność wariantu sprawdzano u tych samych pacjentów, u których uprzednio weryfikowano warianty c.1642G>C w genie *FLRT3* i c.938C>T w genie *SLC35E2B*. Nie wykryto analizowanego wariantu u żadnego z badanych członków (Załącznik 3).

#### 8.3.4.5. Analiza segregacji w rodzinie HM-78

Wariant c.725T>G w genie *MYO7A* nie segregował z fenotypem HM u pozostałych członków rodziny HM-78 (Tabela 47).

**Tabela 47.** Wyniki sekwencjonowań dla członków rodziny HM-78

Numer pacjenta	Fenotyp	<i>MYO7A</i> c.725T>G
HM-78-08	HM	TG
HM-78-12	HM	TG
HM-78-11	HM	TT
HM-78-06	N	TT
HM-78-10	NA	TG
HM-78-07	HM	TG

#### 8.3.4.6. Analiza segregacji w rodzinie HM-80

Warianty sekwencji w genach *ILK* (c.157T>A) i *LAMB2* (c.1750C>A) nie segregowały z fenotypem HM u pozostałych członków rodziny HM-80 (Tabela 48).

**Tabela 48.** Wyniki sekwencjonowań dla członków rodziny HM-80

Numer pacjenta	Fenotyp	<i>ILK</i> c.157T>A	<i>LAMB2</i> c.1750C>A
HM-80-04	HM	TA	CA
HM-80-10	HM	TA	CA
HM-80-06	N	TA	CA
HM-80-15	HM	TT	CC
HM-80-05	HM	TT	CC

#### 8.3.4.7. Analiza segregacji w rodzinie HM-81

Potwierdzono wyniki analiz ES u pacjentów HM-81-06 i HM-81-08. Nie wykryto analizowanych wariantów sekwencji u pacjenta HM-81-05 co było zgodne z wynikami ES (Tabela 49).

**Tabela 49.** Wyniki sekwencjonowań dla członków rodziny HM-81

Numer pacjenta	Fenotyp	<i>CRYGD</i> c.181G>T	<i>NEIL2</i> c.77G>C	<i>CIAO3</i> c.1112G>A	<i>ABCA1</i> c.5773C>T	<i>HSD17B14</i> c.700G>A	<i>GRB7</i> c.728G>A
HM-81-06	HM	GT	GC	GA	CT	GA	GA
HM-81-04	N	GT	GC	GG	CT	GG	GG
HM-81-05	HM	GG	GG	GG	CC	GG	GG
HM-81-08	HM	GT	GC	GA	CT	GA	GA

#### 8.4. Wyniki analizy wariantów sekwencji powiązanych z długością osiową gałki ocznej, ciśnieniem wewnątrzgałkowym i krzywizną rogówki u pacjentów z HM

##### 8.4.1. Analizy polimorfizmów związanych z długością osiową gałki ocznej

Do analizy wybrano cztery osoby z grupy pacjentów z HM z gałkami ocznymi o długości w zakresie 25,95 – 29,33 mm oraz cztery osoby z grupy członków rodzin bez HM z gałkami ocznymi o długości w zakresie 21,78 – 24,82 mm jako kontrole z rodzin HM-32, HM-76, HM-78 i HM-80. W rodzinie HM-78 jeden pacjent z gałkami ocznymi o długości 24,99 mm i 25,11 mm został zakwalifikowany przez lekarza do pacjentów z HM i z powodu ograniczonego dostępu do materiału innych członków rodziny został wybrany do opisywanej analizy. Podobnie wybrano tylko dwie osoby bez HM i jedną z nieoznaczonym statusem choroby, ponieważ nie dysponowano materiałem od większej ilości członków z danym fenotypem. W celu analizy segregacji wybranych SNPs z fenotypem HM i wysokimi wartościami AL w badanych rodzinach prowadzono sekwencjonowanie metodą Sanger. Wyniki sekwencjonowań przedstawiono w Załączniku 4. Warianty znajdujące się w sąsiedztwie badanych SNPs również poddano analizie.

Ze względu na wykrycie SNP rs12193446 w genie *LAMA2* tylko u jednej z 16 badanych osób z rodzin HM-32 i HM-80 i tym samym brak segregacji tego SNP z fenotypem HM zdecydowano, że wariant rs12193446 nie będzie analizowany w pozostałych rodzinach. U wszystkich badanych, zarówno osób z HM jak i bez HM, wykryto zmiany heterozygotyczne lub homozygotyczne g.219775432T>C (rs994767) w pobliżu genu *ZC3H11B*. W lokalizacjach SNP rs4074961 g.38092723G>A (c.94+2517G>A) w *RSPO1* oraz g.29453193G>C (c.\*3583G>C, rs12321) w *ZNRF3* zidentyfikowano zmiany heterozygotyczne i homozygotyczne, ale bez zauważalnego

trendu segregacji z fenotypem HM i wysokimi wartościami AL. W genie *CMSS1* tylko u trzech osób, dwóch z HM i jednej bez HM, wykryto zmianę heterozygotyczną g.99844293G>A (c.10+10451G>A, rs9811920). U badanych HM-80-04, HM-80-10 i HM-76-10 nie zidentyfikowano zmian w lokalizacjach wariantów rs11073058, rs634990, rs8032019, rs560766 w pobliżu genu *GJD2* i w sekwencjach flankujących te warianty, natomiast wykryto je u wszystkich pozostałych badanych osób z HM jak i bez HM.

#### 8.4.2. Analiza polimorfizmów związanych z ciśnieniem wewnątrzgałkowym

Do analizy SNP asocjowanych z IOP wybrano po czterech pacjentów z HM, u których stwierdzono IOP w zakresie 17 – 22 mmHg oraz po cztery osoby z grupy bez HM z IOP w zakresie 12 – 17 mmHg z rodzin HM-32 i HM-80. Wyniki sekwencjonowań zaprezentowano w Załączniku 5. U wszystkich 16 badanych osób (osiem z HM/wysokim IOP oraz osiem bez HM/niskim IOP) z rodziny HM-32 i HM-80 zidentyfikowano zmianę homozygotyczną c.476+2360G>T (rs7555523) w genie *TMCO1*. Pozostałe SNPs, rs58073046, rs52809447 i rs7291444, również nie segregowały z fenotypem HM i wysokim IOP. W regionach okalających badane SNPs nie wykryto żadnych innych wariantów.

#### 8.4.3. Analizy polimorfizmów związanych z krzywizną rogówki

Do analizy SNP asocjowanych z CC włączono po trzech/czterech pacjentów z HM z CCR w zakresie 7,66 – 8,45 mm oraz członków rodzin bez HM z CCR w zakresie 7,38 – 7,73 mm z rodzin HM-32 i HM-80. W rodzinie HM-80 wszyscy pacjenci z HM mają CCR powyżej 8,0, natomiast w rodzinie HM-32 poniżej 8,0, stąd otrzymano taką rozpiętość wartości CCR u pacjentów z HM. W pobliżu genu *PDGFRA* w jednej próbie DNA pochodzącej od pacjenta z HM i jednej próbie DNA członka rodziny bez HM wykryto zmianę heterozygotyczną g.55092626T>C (rs2114039) oraz u innego pacjenta z HM zmianę homozygotyczną (Załącznik 6). Badane SNPs nie segregowały z fenotypem HM i wysokimi wartościami CC.

Analizy segregacji nie wykazały istotnych relacji pomiędzy SNPs a badanymi cechami fenotypowymi, AL, IOP i CC.

## 8.5. Wyniki analiz całogenomowej metylacji DNA

### 8.5.1. Wyniki analiz hipermetylacji DNA

W ramach pracy doktorskiej prowadzono analizy hipermetylacji DNA u dzieci z HM w porównaniu do dzieci bez HM na podstawie uzyskanych odczytów analizy całogenomowej metylacji DNA. Dokonano selekcji dinukleotydów CpG, których poziom metylacji był znacznie wyższy u dzieci z HM niż u dzieci bez HM z istotnością statystyczną równą lub wyższą 0,00001. Wybierano tylko dinukleotydy zlokalizowane w regionie okołopromotorowym lub w obrębie sekwencji kodującej genu. W celu uniknięcia potencjalnych czynników, które mogłyby zafałszować odczyt poziomu metylacji, odrzucano dinukleotydy CpG, w których znajdowały się SNP (według bazy danych dbSNP) [134]. Zidentyfikowano 182 hipermetylowanych dinukleotydów CpG z ponad 15% różnicą w poziomie metylacji, w tym 35 z ponad 20%, między dziećmi z HM a dziećmi bez HM. W Tabeli 50 przedstawiono 35 dinukleotydów CpG z ponad 20% różnicą w poziomie metylacji.

Z dinukleotydów CpG zestawionych w Tabeli 50 wybrano te, które są zlokalizowane w 5'UTR, eksonie 1, TSS200 lub TSS1500 i zebrano je w Tabeli 51. Jako, że są to regiony okołopromotorowe hipermetylacja dinukleotydów CpG może wpływać na wyciszenie genów. Dinukleotydy CpG zlokalizowane w regionach okołopromotorowych *PPP1R18*, *TRAPPC11*, *XRCC2*, *OXAIL* i *FARP2* są także powiązane z promotorami tych genów. Dodatkowo dinukleotydy CpG w regionach okołopromotorowych genów *GSTM1*, *XRCC2*, *GLI3*, *FARP2* są zlokalizowane w wyspach CpG.

Zidentyfikowano także inne dinukleotydy CpG w obrębie regionu okołopromotorowego genów *GSTM1*, *LCE3C*, *FARP2* o podwyższonym poziomie metylacji o 10,34 - 18,68% (*GSTM1*), 11 - 14,21% (*LCE3C*) i 7,07 - 11,35% (*FARP2*) u dzieci z HM w porównaniu do dzieci bez HM. W regionie okołopromotorowym genu *MICAL3* oraz *FARP2*, zidentyfikowano także po jednym hipometylowanym dinukleotydem CpG z poziomem metylacji wyższym o 11,86% (*MICAL3*) i 19,10% (*FARP2*) u dzieci bez HM w porównaniu do dzieci z HM.



**Tabela 50.** Dinukleotydy CpG z najwyższą różnicą w poziomie hipermetylacji (min. 20% różnicy) u dzieci z HM w porównaniu do kontroli

TargetID	Chromosom	Gen	FDR p	Krotność zmian	Poziom metylacji DNA u dzieci z HM [%]*	Poziom metylacji DNA u dzieci bez HM [%]*	Różnica w poziomie metylacji	Lokalizacja w genie
cg02907150	14	<i>PCNX1</i>	6,13x10 <sup>-52</sup>	2,06	63,13	30,66	<b>32,47</b>	3'UTR
cg11552078	19	<i>TIMM50</i>	4,76 x10 <sup>-48</sup>	2,31	47,45	20,52	<b>26,92</b>	Sekwencja kodująca
cg17174466	2	<i>SPATS2L</i>	8,55 x10 <sup>-48</sup>	1,46	84,01	57,49	<b>26,53</b>	Sekwencja kodująca
cg24506221	1	<i>GSTM1</i>	7,37 x10 <sup>-47</sup>	2,37	43,30	18,26	<b>25,04</b>	TSS200
cg06139856	14	<i>PCNX1</i>	8,9 x10 <sup>-47</sup>	1,91	52,14	27,23	<b>24,91</b>	Sekwencja kodująca
cg08522473	3	<i>TAGLN3</i>	1,56 x10 <sup>-46</sup>	1,67	61,28	36,78	<b>24,51</b>	Sekwencja kodująca
cg12633154	6	<i>RNF39</i>	1,72 x10 <sup>-46</sup>	2,24	44,18	19,74	<b>24,44</b>	Sekwencja kodująca
cg00084271	1	<i>ATPIA4</i>	3,53 x10 <sup>-46</sup>	1,44	78,41	54,50	<b>23,92</b>	5'UTR
cg20904336	14	<i>DEGS2</i>	5,34 x10 <sup>-46</sup>	1,50	70,73	47,12	<b>23,61</b>	Sekwencja kodująca
cg10487770	5	<i>RAB3C</i>	9,25 x10 <sup>-46</sup>	2,81	36,07	12,86	<b>23,21</b>	Sekwencja kodująca
cg14351440	X	<i>MCF2</i>	9,28 x10 <sup>-46</sup>	1,79	52,57	29,36	<b>23,21</b>	TSS1500
cg13401893	6	<i>RNF39</i>	9,95 x10 <sup>-46</sup>	2,19	42,66	19,50	<b>23,16</b>	Sekwencja kodująca
cg05367846	22	<i>MICAL3</i>	1,64 x10 <sup>-45</sup>	2,16	42,42	19,63	<b>22,79</b>	TSS200
cg10978274	1	<i>LCE3C</i>	2,07 x10 <sup>-45</sup>	1,45	72,75	50,14	<b>22,61</b>	TSS1500
cg09148704	6	<i>TULP4</i>	2,46 x10 <sup>-45</sup>	1,72	53,55	31,07	<b>22,48</b>	Sekwencja kodująca
cg15825171	3	<i>ADAMTS9</i>	2,75 x10 <sup>-45</sup>	1,58	61,09	38,69	<b>22,39</b>	Sekwencja kodująca
cg06249604	6	<i>RNF39</i>	3,56 x10 <sup>-45</sup>	2,57	36,35	14,15	<b>22,20</b>	Sekwencja kodująca
cg23903723	6	<i>PPP1R18</i>	6,21 x10 <sup>-45</sup>	1,68	54,01	32,24	<b>21,77</b>	5'UTR
cg05364170	7	<i>DENND2A</i>	8,8 x10 <sup>-45</sup>	1,47	67,13	45,62	<b>21,51</b>	Sekwencja kodująca
cg21127184	4	<i>TRAPPC11</i>	1,07 x10 <sup>-44</sup>	2,07	41,24	19,88	<b>21,35</b>	5'UTR
cg14868764	11	<i>ARHGAP20</i>	1,07 x10 <sup>-44</sup>	1,61	56,48	35,13	<b>21,35</b>	TSS200
cg18330031	5	<i>KCNN2</i>	1,95 x10 <sup>-44</sup>	1,55	58,78	37,90	<b>20,88</b>	Sekwencja kodująca
cg05898482	7	<i>XRCC2</i>	2,75 x10 <sup>-44</sup>	2,41	35,28	14,67	<b>20,61</b>	5'UTR
cg15613905	5	<i>MCC</i>	3,41 x10 <sup>-44</sup>	1,40	71,24	50,80	<b>20,44</b>	Sekwencja kodująca
cg16140565	3	<i>FHIT</i>	3,44 x10 <sup>-44</sup>	1,68	50,67	30,23	<b>20,44</b>	Sekwencja kodująca
cg07761822	4	<i>RBPJ</i>	3,46 x10 <sup>-44</sup>	3,39	28,99	8,56	<b>20,43</b>	5'UTR

TargetID	Chromosom	Gen	FDR p	Krotność zmian	Poziom metylacji DNA u dzieci z HM [%]*	Poziom metylacji DNA u dzieci bez HM [%]*	Różnica w poziomie metylacji	Lokalizacja w genie
cg25726664	7	<i>GLI3</i>	3,5 x10 <sup>-44</sup>	3,67	28,08	7,66	<b>20,42</b>	TSS1500
cg06498495	4	<i>GPR78</i>	3,67 x10 <sup>-44</sup>	1,47	63,93	43,54	<b>20,38</b>	Sekwencja kodująca
cg02154924	15	<i>LOXL1</i>	3,88 x10 <sup>-44</sup>	1,33	82,14	61,80	<b>20,34</b>	Sekwencja kodująca
cg00956039	6	<i>ANKRD6</i>	4,51 x10 <sup>-44</sup>	1,50	61,03	40,81	<b>20,22</b>	Sekwencja kodująca
cg05146416	14	<i>OXA1L</i>	4,63 x10 <sup>-44</sup>	6,74	23,72	3,52	<b>20,20</b>	TSS200
cg15378253	2	<i>FARP2</i>	5,3 x10 <sup>-44</sup>	4,53	25,79	5,70	<b>20,09</b>	TSS200
cg26278987	4	<i>C4orf50</i>	5,31 x10 <sup>-44</sup>	1,43	67,16	47,07	<b>20,09</b>	3'UTR
cg11821302	22	<i>CELSR1</i>	5,58 x10 <sup>-44</sup>	1,27	93,40	73,35	<b>20,05</b>	Sekwencja kodująca
cg08919780	7	<i>CDK13</i>	5,71 x10 <sup>-44</sup>	1,34	79,19	59,16	<b>20,03</b>	Sekwencja kodująca

FDR - false discovery rate, TSS200 – 0–200 pz powyżej miejsca inicjacji transkrypcji, TSS1500 – 200 - 1500 pz powyżej miejsca inicjacji transkrypcji

\*procentowe poziomy metylacji DNA u dzieci z HM i dzieci bez HM są wartościami średnimi

**Tabela 51.** Dinukleotydy CpG, których hipermetylacja może wpływać na wyciszenie genów u dzieci z HM

TargetID	Chromosom	Gen	FDR p	Krotność zmian	Poziom metylacji DNA u dzieci z HM [%]*	Poziom metylacji DNA u dzieci bez HM [%]*	Różnica w poziomie metylacji	Lokalizacja w genie	Lokalizacja w stosunku do wyspy CpG	Funkcje regulatorowe
cg24506221	1	<i>GSTMI</i>	7,37x10 <sup>-47</sup>	2,37	43,30	18,26	25,04	TSS200	Wyspa	Niesklasyfikowany rodzaj komórki
cg00084271	1	<i>ATPIA4</i>	3,53 x10 <sup>-46</sup>	1,44	78,41	54,50	23,92	5'UTR		
cg05367846	22	<i>MICAL3</i>	1,64 x10 <sup>-45</sup>	2,16	42,42	19,63	22,79	TSS200	S Shore	Niesklasyfikowany
cg10978274	1	<i>LCE3C</i>	2,07 x10 <sup>-45</sup>	1,45	72,75	50,14	22,61	TSS1500		
cg23903723	6	<i>PPP1R18</i>	6,21 x10 <sup>-45</sup>	1,68	54,01	32,24	21,77	5'UTR	S Shore	Związany z promotorem
cg21127184	4	<i>TRAPPC11</i>	1,07 x10 <sup>-44</sup>	2,07	41,24	19,88	21,35	5'UTR	S Shore	Związany z promotorem
cg14868764	11	<i>ARHGAP20</i>	1,07 x10 <sup>-44</sup>	1,61	56,48	35,13	21,35	TSS200	S Shore	Niesklasyfikowany
cg05898482	7	<i>XRCC2</i>	2,75 x10 <sup>-44</sup>	2,41	35,28	14,67	20,61	5'UTR	Wyspa CpG	Związany z promotorem
cg25726664	7	<i>GLI3</i>	3,5 x10 <sup>-44</sup>	3,67	28,08	7,66	20,42	TSS1500	Wyspa CpG	
cg05146416	14	<i>OXAIL</i>	4,63 x10 <sup>-44</sup>	6,74	23,72	3,52	20,20	TSS200	N Shore	Związany z promotorem
cg15378253	2	<i>FARP2</i>	5,3 x10 <sup>-44</sup>	4,53	25,79	5,70	20,09	TSS200	Wyspa CpG	Związany z promotorem

FDR - false discovery rate, TSS200 – 0–200 pz powyżej miejsca inicjacji transkrypcji, TSS1500 – 200 - 1500 pz powyżej miejsca inicjacji transkrypcji, Shore

– region do 2 kpz od wyspy CpG, S i N Shore - region do 2 kpz powyżej i poniżej wyspy CpG

\*procentowe poziomy metylacji DNA u dzieci z HM i dzieci bez HM są wartościami średnimi

Pozostałe dinukleotydy CpG w regionach okolopromotorowych genów *ATP1A4*, *PPP1R18*, *TRAPPC11*, *ARHGAP20*, *XRCC2*, *GLI3*, *OXA1L* zostały zidentyfikowane jako izolowane CpG ze zmienionym poziomem metylacji. Dinukleotydy znajdujące się w pobliżu były zmetylowane u dzieci z HM na poziomie zbliżonym do wyników uzyskanych u dzieci bez HM lub nie spełniały przyjętych kryteriów selekcji (współczynnik FDR  $p \leq 0,00001$ , brak SNP w dinukleotydzie CpG).

Do analizy nadreprezentacji ścieżek molekularnych/procesów, wykonanej w bazie danych ConsensusPathDB-human server wybrano geny, w których zlokalizowane były hipermetylowane dinukleotydy CpG o różnicy w poziomie metylacji DNA wyższej niż 12% u dzieci z HM w porównaniu do dzieci bez HM. Wybrano wartość 12 %, gdyż przy wyższej wartości progu i tym samym mniejszej ilości badanych genów nie otrzymano istotnych wyników. Analizie poddano 441 genów, z których 386 posiadało identyfikatory mapujące. Jako punkt odcięcia na liście wzbogaconych ścieżek sygnałowych ustalono wartość  $p = 0,01$ , przy udziale w danym szlaku przynajmniej pięciu z analizowanych genów. Dzięki analizie nadreprezentacji hipermetylowanych genów wskazano wzbogacone ścieżki/procesy, które są potencjalnie powiązane z krótkowzrocznością i/lub okiem (Tabela 52).

**Tabela 52.** Wzbogacone ścieżki sygnałowe/procesy biochemiczne związane z krótkowzrocznością i/lub okiem, będące wynikiem analizy nadreprezentacji hipermetylowanych genów w ścieżkach molekularnych w bazie danych ConsensusPathDB-human server (punkt odcięcia  $p = 0,01$  przy udziale przynajmniej pięciu genów z zadanej listy)

Proces	Liczba genów	p	Geny	Źródło
Meta-ścieżka receptorów jądrowych	16 (5,1%)	0,000413	<i>ABHD2, SLC2A4, SLC26A2, CCND1, TGFBR3, ALOX5AP, DNAJC7, TXNRD1, JUN, IRS2, NCOA2, GSTM5, GSTM1, SLC39A9, SLC6A15, SLC2A14</i>	Wikipathways
Ścieżka sygnałowa integryny	9 (7,3%)	0,000649	<i>MCF2, COL4A6, COL4A2, GPC4, COL2A1, RAPIA, COL4A5, RAF1, ACAN</i>	INOH
Choroby związane z transdukcją sygnału	13 (5,2%)	0,00104	<i>FOXO4, CUX1, RAF1, IQGAP1, CCNC, FGF2, RAPIA, TNKS, UBA52, RBPJ, IRS2, NCOR2, SHH</i>	Reactome
Ścieżka sygnałowa cGMP-PKG	10 (6,1%)	0,00122	<i>ITPRI, ADRA1B, NFATC3, PRKCE, RAF1, NPPB, EDNRB, PPP3CC, IRS2, ATP1A4</i>	KEGG

Proces	Liczba genów	p	Geny	Źródło
Ścieżka sygnałowa NOTCH	8 (6,7%)	0,0021	<i>CCND1, CCNC, RBPJ, UBA52, SKP1, E2F3, MIR34C, NCOR2</i>	Reactome
Ścieżka sygnałowa Wnt	9 (6,1%)	0,00225	<i>NFATC3, CCND1, JUN, GPC4, WNT5A, SKP1, TCF7L2, PPP3CC, LRP5</i>	KEGG
Ścieżka sygnałowa oksytocyny	9 (5,9%)	0,0027	<i>CCND1, ITPRI, JUN, NFATC3, RAF1, OXT, PPP3CC, CD38, MAP2K5</i>	KEGG
Szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA (DDR) (zależny od kinazy ATM)	7 (6,4%)	0,00533	<i>CCND1, HMGB1, TCF7L2, JUN, TP73, BCL6, WNT5A</i>	Wikipathways
Przekazywanie sygnału przez kinazę ogniskowo-adhezyjną	5 (8,1%)	0,00672	<i>JUN, CCND1, ASAP1, RAF1, RAPIA</i>	PID
Naprowadzanie aksonów	9 (5,1%)	0,00679	<i>RAF1, TRPC1, DPYSL5, SEMA4C, NFATC3, SHH, WNT5A, PPP3CC, ROBO1</i>	KEGG
Sieć jądrowego receptora estrogenowego alfa	5 (7,8%)	0,00768	<i>CCND1, GREB1, NCOA2, JUN, NCOR2</i>	PID
Regulacja białka retinoblastoma	5 (7,8%)	0,00768	<i>JUN, CCND1, RAF1, ELF1, E2F3</i>	PID
Ścieżka sygnałowa wapnia	9 (4,9%)	0,00961	<i>ITPRI, ADRA1B, HRHI, EDNRB, CCKBR, P2RX7, PPP3CC, CD38, TNNC2</i>	KEGG

### 8.5.2. Wyniki analiz hipometylacji DNA

Na podstawie odczytów analizy całogenomowej metylacji DNA uzyskanych dla dzieci z HM i dzieci bez HM, dokonano selekcji dinukleotydów CpG zlokalizowanych w rejonie promotorowym lub w obrębie sekwencji kodującej genu, których poziom metylacji był znacznie niższy u dzieci z HM w porównaniu do dzieci bez HM ( $p \geq 0,00001$ ). W wyniku selekcji otrzymano 275 hipometylowanych dinukleotydów CpG z ponad 15% różnicą w poziomie metylacji między dziećmi z HM a dziećmi bez HM, wliczając 53 dinukleotydy z ponad 20% różnicą. W Tabeli 53 przedstawiono dinukleotydy CpG z ponad 20% różnicą między dziećmi z HM a dziećmi bez HM.

**Tabela 53.** Dinukleotydy CpG z najwyższą różnicą w poziomie hipometylacji (min. 20% różnicy) u dzieci z HM w odniesieniu do kontroli

TargetID	Chromosom	Gen	FDR p	Krotność zmian	Poziom metylacji DNA u dzieci z HM [%]*	Poziom metylacji DNA u dzieci bez HM [%]*	Różnica w poziomie metylacji	Lokalizacja w genie
cg02054572	4	<i>LINC01088</i>	2,21x10 <sup>-27</sup>	0,64	52,41	81,48	-29,08	Sekwencja kodująca
cg17651890	8	<i>RIMS2</i>	1,02 x10 <sup>-27</sup>	0,63	46,37	73,83	-27,46	Sekwencja kodująca
cg15349655	5	<i>EPB41L4A</i>	9,95 x10 <sup>-28</sup>	0,68	58,98	86,40	-27,42	Sekwencja kodująca
cg09701422	14	<i>ADAM20</i>	7,47 x10 <sup>-28</sup>	0,70	62,63	89,47	-26,83	TSS1500
cg27494055	5	<i>PCDHA10</i>	5,26 x10 <sup>-28</sup>	0,54	30,58	56,71	-26,13	TSS1500
cg10162971	2	<i>GRHL1</i>	5,19 x10 <sup>-28</sup>	0,64	46,36	72,46	-26,10	Sekwencja kodująca
cg18093771	10	<i>ADARB2</i>	4,82 x10 <sup>-28</sup>	0,69	57,92	83,87	-25,95	Sekwencja kodująca
cg06281409	5	<i>FBXO38</i>	4,58 x10 <sup>-28</sup>	0,71	62,61	88,46	-25,85	Sekwencja kodująca
cg13953630	4	<i>OCIAD1</i>	4,47 x10 <sup>-28</sup>	0,67	52,96	78,76	-25,80	Sekwencja kodująca
cg26700469	16	<i>WWOX</i>	4,21 x10 <sup>-28</sup>	0,69	56,06	81,74	-25,68	Sekwencja kodująca
cg26069044	11	<i>NRGN</i>	3,97 x10 <sup>-28</sup>	0,67	50,90	76,46	-25,56	Sekwencja kodująca
cg25543264	7	<i>COBL</i>	3,57 x10 <sup>-28</sup>	0,60	37,26	62,61	-25,35	Sekwencja kodująca
cg19976037	17	<i>CCDC57</i>	3,30 x10 <sup>-28</sup>	0,65	47,61	72,81	-25,20	Sekwencja kodująca
cg15049439	19	<i>INSR</i>	2,94 x10 <sup>-28</sup>	0,68	54,14	79,10	-24,97	Sekwencja kodująca
cg02766704	7	<i>CTTNBP2</i>	2,57 x10 <sup>-28</sup>	0,67	49,71	74,41	-24,70	Sekwencja kodująca
cg25010006	8	<i>PAG1</i>	2,42 x10 <sup>-28</sup>	0,72	61,72	86,30	-24,58	TSS1500
cg18731202	2	<i>TGFA</i>	2,21 x10 <sup>-28</sup>	0,66	48,32	72,72	-24,41	Sekwencja kodująca
cg14197110	4	<i>CEP44</i>	1,94 x10 <sup>-28</sup>	0,72	62,06	86,21	-24,15	3'UTR
cg24017056	15	<i>ZFAND6</i>	1,72 x10 <sup>-28</sup>	0,71	58,97	82,89	-23,92	5'UTR
cg13432799	5	<i>SNX2</i>	1,69 x10 <sup>-28</sup>	0,73	65,32	89,20	-23,88	Sekwencja kodująca
cg23836814	11	<i>AGBL2</i>	1,33 x10 <sup>-28</sup>	0,66	44,71	68,12	-23,42	3'UTR
cg02137496	11	<i>DLG2</i>	1,30 x10 <sup>-28</sup>	0,72	60,92	84,30	-23,37	Sekwencja kodująca
cg07736012	3	<i>MED12L</i>	1,27 x10 <sup>-28</sup>	0,74	67,67	90,99	-23,33	Sekwencja kodująca
cg08913233	10	<i>VTG1A</i>	1,10 x10 <sup>-28</sup>	0,75	67,63	90,68	-23,05	Sekwencja kodująca
cg27078890	11	<i>ETSI</i>	1,06 x10 <sup>-28</sup>	0,74	64,87	87,87	-22,99	TSS200
cg10025778	7	<i>CCDC146</i>	9,61 x10 <sup>-29</sup>	0,73	62,85	85,65	-22,80	Sekwencja kodująca
cg15039162	13	<i>ABHD13</i>	9,49 x10 <sup>-29</sup>	0,73	61,76	84,54	-22,78	5'UTR

TargetID	Chromosom	Gen	FDR p	Krotność zmian	Poziom metylacji DNA u dzieci z HM [%]*	Poziom metylacji DNA u dzieci bez HM [%]*	Różnica w poziomie metylacji	Lokalizacja w genie
cg19518093	8	<i>SBSPON</i>	8,99 x10 <sup>-29</sup>	0,75	67,27	89,95	-22,67	TSS1500
cg21494160	18	<i>PTPRM</i>	7,78 x10 <sup>-29</sup>	0,75	66,17	88,57	-22,40	Sekwencja kodująca
cg21610839	3	<i>UBE2E1</i>	6,90 x10 <sup>-29</sup>	0,66	43,05	65,23	-22,17	Sekwencja kodująca
cg27374674	17	<i>GAS7</i>	6,84 x10 <sup>-29</sup>	0,72	55,99	78,15	-22,16	Sekwencja kodująca
cg27262015	4	<i>SORBS2</i>	6,53 x10 <sup>-29</sup>	0,74	63,95	86,02	-22,07	TSS200
cg12836825	3	<i>LMOD3</i>	4,92 x10 <sup>-29</sup>	0,75	65,25	86,79	-21,54	TSS1500
cg24562221	1	<i>CACYBP</i>	4,78 x10 <sup>-29</sup>	0,73	59,08	80,57	-21,48	Sekwencja kodująca
cg15357273	3	<i>CCDC50</i>	4,73 x10 <sup>-29</sup>	0,74	62,26	83,73	-21,47	Sekwencja kodująca
cg25885356	21	<i>RUNX1</i>	4,47 x10 <sup>-29</sup>	0,71	51,60	72,96	-21,36	Sekwencja kodująca
cg11683966	1	<i>SLC25A3P1</i>	4,41 x10 <sup>-29</sup>	0,70	49,48	70,81	-21,34	TSS200
cg18556587	2	<i>TANC1</i>	4,05 x10 <sup>-29</sup>	0,72	53,38	74,55	-21,18	5'UTR
cg21047322	6	<i>AKAP12</i>	3,86 x10 <sup>-29</sup>	0,70	49,04	70,13	-21,09	Sekwencja kodująca
cg26393261	6	<i>ATXN1</i>	3,82 x10 <sup>-29</sup>	0,67	43,26	64,33	-21,07	5'UTR
cg15144397	3	<i>SPATA16</i>	3,76 x10 <sup>-29</sup>	0,74	59,73	80,77	-21,04	Sekwencja kodująca
cg11755269	21	<i>CRYZL1</i>	3,74 x10 <sup>-29</sup>	0,75	64,54	85,57	-21,03	Sekwencja kodująca
cg00571519	7	<i>SRPK2</i>	3,65 x10 <sup>-29</sup>	0,75	63,91	84,90	-20,99	Sekwencja kodująca
cg06965941	X	<i>SH3KBP1</i>	3,25 x10 <sup>-29</sup>	0,72	54,19	74,96	-20,77	Sekwencja kodująca
cg21685655	7	<i>PON2</i>	3,14 x10 <sup>-29</sup>	0,77	68,36	89,06	-20,71	3'UTR
cg09925682	19	<i>NFIC</i>	3,07 x10 <sup>-29</sup>	0,74	58,31	78,98	-20,67	Sekwencja kodująca
cg19032370	1	<i>EVI5</i>	3,05 x10 <sup>-29</sup>	0,76	64,63	85,28	-20,65	Sekwencja kodująca
cg21537492	8	<i>SNTB1</i>	3,00 x10 <sup>-29</sup>	0,77	70,39	91,02	-20,63	Sekwencja kodująca
cg14540736	18	<i>ZNF516</i>	2,71 x10 <sup>-29</sup>	0,71	50,78	71,21	-20,44	Sekwencja kodująca
cg07418777	10	<i>CCDC3</i>	2,61 x10 <sup>-29</sup>	0,73	54,25	74,62	-20,37	Sekwencja kodująca
cg05939089	14	<i>ARMH4</i>	2,32 x10 <sup>-29</sup>	0,73	55,23	75,39	-20,16	Sekwencja kodująca
cg05740739	2	<i>OR6B3</i>	2,25 x10 <sup>-29</sup>	0,74	55,92	76,02	-20,10	TSS1500
cg17721001	8	<i>UBR5</i>	2,14 x10 <sup>-29</sup>	0,73	54,66	74,67	-20,01	Sekwencja kodująca

FDR - false discovery rate, TSS200 – 0–200 pz powyżej miejsca inicjacji transkrypcji, TSS1500 – 200 - 1500 pz powyżej miejsca inicjacji transkrypcji

\*procentowe poziomy metylacji u dzieci z HM i dzieci bez HM są wartościami średnimi

Z dinukleotydów CpG z najwyższą różnicą w poziomie hipometylacji (min. 20% różnicy) wybrano dinukleotydy zlokalizowane w regionach okołopromotorowych genów (5'UTR, TSS200 lub TSS1500), których hipometylacja może wpływać na nadekspresję tych genów (Tabela 54). Dinukleotyd CpG zlokalizowany w rejonie 5'UTR *ABHD13* jest także powiązany z promotorem tego genu. Żaden z przedstawionych w tabeli dinukleotydów CpG nie jest zlokalizowany w wyspie CpG, natomiast kilka z nich jest usytuowanych w S Shore lub N Shore, czyli regionach do 2 kbpz powyżej lub poniżej wyspy CpG.

W obrębie regionu okołopromotorowego genu *SORBS2*, *TANCI*, *ATXN1* i *ADAM20* zidentyfikowano także inne dinukleotydy CpG o obniżonym poziomie metylacji o 6,09 – 7,29% (*PAG1*), 5,74 – 13,02% (*SORBS2*), 5,84 – 8,84% (*TANCI*) i 5,00 – 10,79% (*ATXN1*), 5,07% (*ADAM20*), 5,24% (*SLC25A3P1*) u dzieci z HM w porównaniu do dzieci bez HM.

W regionie okołopromotorowym genu *PCDHA10*, *PAG1*, *ABHD13* i *SBSPON* poza dinukleotydami CpG o obniżonym poziomie metylacji wykryto także dinukleotydy CpG o podwyższonym poziomie metylacji o 7,17% (*PCDHA10*), 7,07% (*PAG1*) i 13,63% (*SBSPON*) u dzieci z HM w odniesieniu do dzieci bez HM. Pozostałe dinukleotydy CpG w regionach okołopromotorowych genów *ZFAND6*, *ETSI*, *LMOD3*, *OR6B3* zostały zidentyfikowane jako izolowane CpG ze zmienionym poziomem metylacji. Poziom metylacji dinukleotydów CpG znajdujących się w pobliżu był na zbliżonym poziomie u dzieci z HM i dzieci bez HM (<5% zmiany poziomu metylacji, brak istotności) lub dinukleotydy nie spełniały przyjętych kryteriów selekcji.

Geny, w których zlokalizowane były hipometylowane dinukleotydy CpG z różnicą w poziomie metylacji DNA między dziećmi z HM a kontrolami wyższą niż 14%, włączono do analizy nadreprezentacji ścieżek w bazie danych ConsensusPathDB-human server. Wybrano wartość 14 %, gdyż przy wyższej wartości prognozu badano zbyt niewiele genów do otrzymania istotnych wyników analizy. Tym samym liczba analizowanych hipometylowanych genów była zbliżona do ilości hipermetylowanych genów poddanych analizie. Analizowano 406 genów, z których to 370 posiadało identyfikatory mapujące. Jako punkt odcięcia dla listy wzbogaconych ścieżek ustalono wartość  $p = 0,01$  przy udziale w danym szlaku przynajmniej pięciu z analizowanych genów. Dzięki analizie wskazano nadreprezentację genów w kilku ścieżkach/procesach, które są potencjalnie powiązane z krótkowzrocznością i/lub okiem (Tabela 55).



**Tabela 54.** Hipometylowane dinukleotydy CpG potencjalnie wpływające na nadekspresję genów u dzieci z HM

TargetID	Chromosom	Gen	FDR p	Krotność zmian	Poziom metylacji DNA u dzieci z HM [%]	Poziom metylacji DNA u dzieci bez HM [%]	Różnica w poziomie metylacji	Lokalizacja w genie	Lokalizacja w stosunku do wyspy CpG	Funkcje regulatorowe
cg09701422	14	<i>ADAM20</i>	7,47x10 <sup>-28</sup>	0,70	62,63	89,47	-26,83	TSS1500		
cg27494055	5	<i>PCDHA10</i>	5,26 x10 <sup>-28</sup>	0,54	30,58	56,71	-26,13	TSS1500	N Shore	
cg25010006	8	<i>PAG1</i>	2,42 x10 <sup>-28</sup>	0,72	61,72	86,30	-24,58	TSS1500	S Shore	
cg24017056	15	<i>ZFAND6</i>	1,72 x10 <sup>-28</sup>	0,71	58,97	82,89	-23,92	5'UTR		
cg27078890	11	<i>ETSI</i>	1,06 x10 <sup>-28</sup>	0,74	64,87	87,87	-22,99	TSS200		
cg15039162	13	<i>ABHD13</i>	9,49 x10 <sup>-29</sup>	0,73	61,76	84,54	-22,78	5'UTR	S Shore	Związany z promotorem
cg19518093	8	<i>SBSPON</i>	8,99 x10 <sup>-29</sup>	0,75	67,27	89,95	-22,67	TSS1500	S Shore	
cg27262015	4	<i>SORBS2</i>	6,53 x10 <sup>-29</sup>	0,74	63,95	86,02	-22,07	TSS200		
cg12836825	3	<i>LMOD3</i>	4,92 x10 <sup>-29</sup>	0,75	65,25	86,79	-21,54	TSS1500		
cg11683966	1	<i>SLC25A3P1</i>	4,41 x10 <sup>-29</sup>	0,70	49,48	70,81	-21,34	TSS200	S Shore	
cg18556587	2	<i>TANCI</i>	4,05 x10 <sup>-29</sup>	0,72	53,38	74,55	-21,18	5'UTR		
cg26393261	6	<i>ATXN1</i>	3,82 x10 <sup>-29</sup>	0,67	43,26	64,33	-21,07	5'UTR		
cg05740739	2	<i>OR6B3</i>	2,25 x10 <sup>-29</sup>	0,74	55,92	76,02	-20,10	TSS1500		

FDR - false discovery rate, HM – wysoka krótkowzroczność, TSS200 – 0–200 pz powyżej miejsca inicjacji transkrypcji, TSS1500 – 200 - 1500 pz powyżej miejsca inicjacji transkrypcji, Shore – region do 2 kpz od wyspy CpG, S i N Shore - region do 2 kpz powyżej i poniżej wyspy CpG

\*procentowe poziomy metylacji DNA u dzieci z HM i dzieci bez HM są wartościami średnimi

**Tabela 55.** Wzbogacone ścieżki sygnałowe/procesy biochemiczne związane z krótkowzrocznością i/lub okiem otrzymane w analizie nadreprezentacji hipometylowanych genów w ścieżkach molekularnych w bazie danych ConsensusPathDB-human server (p = 0,01 przy udziale przynajmniej pięciu genów z zadanej w analizie listy)

Proces	Liczba genów	p	Geny	Źródło
Metabolizm askorbinianu i kwasu aldarowego	8 (29,6%)	1,47x10 <sup>-08</sup>	<i>UGT1A4, UGT1A3, UGT1A1, UGT1A8, UGT1A7, UGT1A6, UGT1A5, UGT1A9</i>	KEGG
Metabolizm retinolu	10 (14,9%)	2,65 x10 <sup>-07</sup>	<i>UGT1A4, CYP27C1, UGT1A10, UGT1A8, UGT1A7, UGT1A6, UGT1A5, DHRS4L2, UGT1A9, UGT1A3</i>	KEGG
Biosynteza hormonów steroidowych	9 (15,0%)	1,02 x10 <sup>-06</sup>	<i>UGT1A4, UGT1A3, UGT1A6, UGT1A10, UGT1A9, UGT1A8, UGT1A7, UGT1A5, COMT</i>	KEGG
Ścieżka kwasu walproinowego	6 (28,6%)	1,28 x10 <sup>-06</sup>	<i>UGT1A4, UGT1A3, UGT1A10, UGT1A8, UGT1A6, UGT1A9</i>	PharmGKB
Ścieżka metabolizmu estrogenów	5 (33,3%)	4,42 x10 <sup>-06</sup>	<i>UGT1A4, UGT1A3, UGT1A9, UGT1A8, COMT</i>	PharmGKB
Metabolizm leków – inne enzymy	9 (11,4%)	1,06x10 <sup>-05</sup>	<i>UGT1A4, UGT1A10, UGT1A8, UGT1A7, UGT1A6, UGT1A5, UGT1A9, UGT1A3, DPYD</i>	KEGG
Faza II – koniugacja związków chemicznych	10 (8,9%)	3,01 x10 <sup>-05</sup>	<i>UGT1A4, UGT1A10, UGT1A8, UGT1A7, UGT1A6, UGT1A5, UGT1A9, UGT1A3, COMT, N6AMT1</i>	Reactome
Metabolizm leków przy udziale cytochromu P450	8 (11,4%)	3,23x10 <sup>-05</sup>	<i>UGT1A4, UGT1A10, UGT1A8, UGT1A7, UGT1A6, UGT1A5, UGT1A9, UGT1A3</i>	KEGG
Metabolizm ksenobiotyków – przy udziale cytochromu P450	8 (10,8%)	4,85x10 <sup>-05</sup>	<i>UGT1A4, UGT1A10, UGT1A8, UGT1A7, UGT1A6, UGT1A5, UGT1A9, UGT1A3</i>	KEGG
Utlenianie biologiczne	12 (5,3%)	0,000728	<i>UGT1A4, UGT1A10, UGT1A8, UGT1A7, UGT1A6, UGT1A5, UGT1A9, UGT1A3, COMT, N6AMT1, CYP27C1, PAOX</i>	Reactome
Biosynteza i metabolizm estrogenów i androgenów	7 (8,0%)	0,000896	<i>UGT1A4, UGT1A10, UGT1A7, UGT1A6, UGT1A5, UGT1A9, UGT1A3</i>	EHMN
Metaścieżka biotransformacji faza I i II	10 (5,4%)	0,00182	<i>UGT1A4, UGT1A10, UGT1A7, UGT1A6, UGT1A5, UGT1A9, UGT1A3, COMT, CYP27C1, CYP27A1</i>	Wikipathways
Ścieżka sygnałowa insuliny	6 (7,7%)	0,00262	<i>INSR, PPP2R2B, AKT3, PRKAG2, EIF4G3, FKBPIA</i>	INOH
Metabolizm tyrozyny	7 (6,5%)	0,00313	<i>UGT1A4, UGT1A10, UGT1A7, UGT1A6, UGT1A5, UGT1A9, UGT1A3</i>	EHMN
Ścieżka NRF2	8 (5,6%)	0,00386	<i>UGT1A4, UGT1A7, UGT1A6, UGT1A9, UGT1A3, ABCC5, TGFA, SLC39A14</i>	Wikipathways
Regulacja transportu i absorpcji IGF przez białka wiążące IGF (IGFBPs)	7 (5,6%)	0,00725	<i>TNC, PCSK9, CP, FBN1, STC2, IGFBP1, ALB</i>	Reactome

Powyższe analizy hiper- i hipometylowanych dinukleotydów CpG wykonywano niezależnie od analiz Vishweswaraiah i wsp. Wyniki całogenomowej metylacji DNA analizowano z zastosowaniem kilku kryteriów selekcji dinukleotydów CpG pokrywających się z kryteriami stosowanymi przez Vishweswaraiah i wsp. (współczynnik FDR  $p \leq 0,00001$ , brak SNP w dinukleotydzie CpG oraz obecność dinukleotydu w rejonie promotorowym lub sekwencji kodującej genu) [123], jednak pozostałe kryteria różniły się między sobą. Vishweswaraiah i wsp. analizowali wyłącznie dinukleotydy CpG z przynajmniej dwukrotnie większą zmianą poziomu metylacji u dzieci z HM w porównaniu do kontroli, tym samym ograniczono się wyłącznie do analizy hipermetylacji. Jednocześnie nie uwzględniano wielkości różnicy w poziomie metylacji. Wykluczano także dinukleotydy CpG, w sąsiedztwie których w odległości do 10 pb występowały SNP. Punktem odcięcia była również wartość pola powierzchni (ang. *area under the curve*, AUC) pod krzywą charakterystyczno-operacyjną odbiornika (ang. *receiver operating characteristic*, ROC) równa bądź wyższa niż 0,75. Krzywe ROC ilustrują jakość klasyfikacji poprzez zależność wskaźników TPR (ang. *true positive rate*) i FPR (ang. *false positive rate*). Natomiast, wartość AUC odnosi się do analogicznego pola dla modelu idealnego. Parametr AUC pozwala ocenić jakie jest prawdopodobieństwo, że badany model predykcyjny, losowy element klasy pozytywnej oceni wyżej od losowego elementu klasy negatywnej. Pożądane jest uzyskanie jak najwyższej wartości tego wskaźnika, gdyż wartość 1,0 wskazuje na klasyfikator idealny, wartość 0,5 na klasyfikator losowy, a wartość poniżej 0,5 na klasyfikator nieprawidłowy [135].

## 9. DYSKUSJA

Badanie przyczyn powstawania wysokiej krótkowzroczności jest utrudnione z powodu wieloczynnikowej etiologii tej choroby tj. równoczesnego udziału czynników środowiskowych i złożonego podłoża genetycznego. Dotychczas zidentyfikowano wiele *loci*, genów kandydatów i wariantów sekwencji u pacjentów z HM, jednak były one charakterystyczne tylko dla poszczególnych populacji i/lub konkretnych rodzin. Wcześniejsze badania, w których zidentyfikowano trzy nowe *loci* HM: 7p22.1–7p21.1, 7p12.3–7p11.2 i 12p12.3–12p12.1 [49] oraz wykazano brak zależności pomiędzy SNPs rs6214, rs10860860 i rs2946834 w obrębie genu *IGF1* powiązanych z HM w populacji kaukaskiej [69], a fenotypem HM w 42 rodzinach polskich [104], dostarczyły zaledwie kilku informacji na temat uwarunkowań genetycznych HM w Polsce.

Celem niniejszej pracy doktorskiej, prowadzonej w ramach kontynuacji badań nad HM, była identyfikacja kolejnych czynników genetycznych i epigenetycznych zaangażowanych w etiologię HM u polskich pacjentów. Niekompletna wiedza na temat genetycznych i epigenetycznych przyczyn powstawania HM w populacji polskiej, jak i na świecie były uzasadnieniem podjęcia powyższego tematu.

### ***Zależności między parametrami okulistycznymi a wysoką krótkowzrocznością u polskich pacjentów***

Aby odpowiedzieć na pytanie jakie dane kliniczne okulistyczne pacjentów z wysoką krótkowzrocznością korelują ze sobą, badania wykonywane w ramach realizacji rozprawy doktorskiej rozpoczęto od opracowania danych klinicznych pozyskanych od członków polskich rodzin z dziedziczną HM.

W grupie pacjentów z HM, współistniejące choroby oczu, takie jak przymglenie w zębce rogówki, zaćma, zmętnienie soczewki, zmiany w ciebie szklistym, zwyrodnienia siatkówki, retinopatia barwnikowa, makulopatia, zaniki siatkówkowo-naczyniówkowe, krótkowzroczne zaniki okołotarczowe, jaskra i garbiak tylny występowały znacząco częściej niż w podgrupach członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby. Uzyskane wyniki zgodne są z danymi literaturowymi, w których wskazuje się na podwyższone ryzyko występowania chorób współtowarzyszących u pacjentów z HM [4,6,136].

Średnia wielkość wady sferycznej u pacjentów z HM wynosiła -9,06 D (-0,25 – -20,75 D) dla oka prawego i -9,12 D (-4,25 – -21,00 D) dla oka lewego. Wartość -0,25 D

została zmierzona u pacjenta po operacji zaćmy w jednym oku, przed którą miał znacznie większą wadę wzroku. Przyjętym kryterium włączenia pacjentów do grupy z HM była wielkość wady większa niż -6,0 D w jednym i -5,0 D w drugim oku. Obecnie w badaniach na całym świecie przyjmowane są różne kryteria diagnozowania HM. W niektórych przypadkach za HM uznawano wadę większą niż -5,0 D, natomiast w innych dopiero wielkość wady przekraczająca -8,0 D klasyfikowana była jako HM [13]. Brak ogólnej przyjętej definicji HM może prowadzić do rozbieżności wyników pomiędzy badaniami, ale nadal dyskutuje się, która definicja jest prawidłowa [137,138]. Organizacje takie jak *American Academy of Ophthalmology*, *American Optometric Association* lub *American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus* definiują wysoką krótkowzroczność jako wadę powyżej  $-6.0$  D [2].

Wartości długości osiowej gałki ocznej u pacjentów z HM mieściły się w przedziale 23,39 – 31,58 mm, co wskazuje na wydłużenie gałek ocznych w tej grupie w porównaniu do osób zakwalifikowanych do grupy bez HM (długość osiowa gałki ocznej w przedziale 21,15 – 25,58 mm) i grupy członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (długość osiowa gałki ocznej w przedziale 21,53 – 25,12 mm). Stwierdzono wysoką korelację pomiędzy długością osiową gałki ocznej a wielkością wady sferycznej, co potwierdza związek między wadą refrakcji a wydłużaniem gałki ocznej.

Średnie ciśnienie wewnątrzgałkowe dla oka prawego i lewego oszacowano na 16,26 mmHg u pacjentów z HM, 15,60 mmHg u członków rodzin bez HM i 15,57 mmHg u członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby. Analiza statystyczna wykazała, że ciśnienie wewnątrzgałkowe jest wyższe u osób z HM niż u osób bez HM w badanych 20 rodzinach polskich, jednak wielkość wady sferycznej była słabo skorelowana z ciśnieniem wewnątrzgałkowym. Joseph i wsp. wykazali korelację między ciśnieniem wewnątrzgałkowym a HM oraz krótkowzrocznością średnią [139]. Natomiast Lee i wsp. zaprzeczają asocjacji ciśnienia wewnątrzgałkowego i wady refrakcji, krótkowzroczności czy HM [140]. Ponadto HM i wysokie ciśnienie wewnątrzgałkowe stanowią ryzyko wystąpienia jaskry u badanych pacjentów [141].

W przypadku promienia krzywizny rogówki i mocy łamiącej rogówki nie wykazano istotnych różnic między badanymi grupami, a zależność między wadą sferyczną a promieniem krzywizny rogówki nie osiągnęła istotności statystycznej. Część danych literaturowych wskazuje na brak zależności między promieniem krzywizny rogówki a krótkowzrocznością [142,143]. Natomiast w innych wykazano

zależność między dłuższym promieniem krzywizny rogówki a rzadszym występowaniem HM oraz dłuższymi gałkami ocznymi [144].

Średnia wieku w grupie pacjentów z HM (38 lat) była zbliżona do średniej wieku w grupie członków rodzin bez HM (42 lata). Korelacja parametrów okulistycznych wraz z rosnącym wiekiem u łącznie wszystkich osób badanych, bez podziału na grupy, osiągnęła istotność statystyczną. Najwyższe wartości współczynnika korelacji z wiekiem zaobserwowano dla wady sferycznej, ekwiwalentu sferycznego, długości osiowej gałki ocznej i promienia krzywizny rogówki. Nie wszystkie zależności parametrów okulistycznych z wiekiem z uwzględnieniem podziału badanych na grupy osiągnęły istotność statystyczną, co może być spowodowane zbyt małą liczebnością porównywanych grup. Wyniki uzyskane dla wszystkich badanych osób łącznie, bez podziału na grupy, są bardziej wiarygodne oraz lepiej obrazują zależność parametrów okulistycznych z wiekiem. Według danych literaturowych wraz z wiekiem rośnie wielkość wady sferycznej [145,146]. Według Hyman i wsp. wiek jest asocjowany z wydłużaniem gałek ocznych [145], natomiast Richdale i wsp. wnioskują o braku tego powiązania [147].

Podsumowując podrozdział, potwierdzono związek wady sferycznej i długości osiowej gałki ocznej, wyższe ciśnienie wewnątrzgałkowe u pacjentów z HM niż u osób bez HM oraz słabą korelację między ciśnieniem wewnątrzgałkowym a wielkością wady sferycznej. Wykazano silną zależność między wiekiem a wadą sferyczną, ekwiwalentem sferycznym, długością osiową gałki ocznej i promieniem krzywizny rogówki.

### ***Warianty sekwencji segregujące z wysoką krótkowzrocznością w badanych rodzinach polskich***

W celu sprawdzenia czy w rodzinach polskich dziedziczenie wysokiej krótkowzroczności jest powiązane z występowaniem wariantów sekwencji w części kodującej genomu wykonano ES DNA członków polskich rodzin, które było pierwszą taką analizą przeprowadzoną w rodzinach polskich z dziedziczną HM. Z wyników ES wybrano warianty sekwencji do weryfikacji sekwencjonowaniem metodą Sangera i analizą segregacji. Wśród tych wariantów jedynie warianty c.1642G>C w *FLRT3* i c.938C>T w *SLC35E2B* segregowały z fenotypem HM w rodzinie HM-78, co sugeruje, że dane warianty mogą potencjalnie warunkować fenotyp HM w rodzinie HM-78. W

ramach realizacji pracy doktorskiej sprawdzono segregację obu wariantów z fenotypem HM w innych 35 polskich rodzinach. Nie zidentyfikowano wariantów w genach *SLC39A5* i *FLRT3* w poddanych badaniu rodzinach, co wskazuje na warunkowanie HM w tych rodzinach przez inne warianty i złożoność podłoża genetycznego tego schorzenia.

Gen *SLC35E2B* (ang. *solute carrier family 35 member E2B*) koduje białko E3B z 35 rodziny białek transportowych substancji rozpuszczonych. Gen zlokalizowany jest w chromosomie 1 w lokalizacji 1p36.33 w bardzo bliskiej odległości od *locus* krótkowzroczności MYP14 [148]. Według baz danych GeneCards i The Human Protein Atlas *SLC35E2B* ulega ekspresji w siatkówce, sercu, skórze, jądrach i nerkach. Substytucja c.938C>T w eksonie 8 genu *SLC35E2B* prowadzi do zmiany aminokwasu w pozycji 313 z wysoko zakonserwowanej treoniny na metioninę. Wariant jest rzadki, potencjalnie patogenny i raportowany w bazie dbSNP jako rs778277949. Na podstawie danych można sugerować powiązanie identyfikowanego wariantu sekwencji z HM w rodzinie HM-78. Warto nadmienić, że warianty innego genu kodującego białko A5 z 39 rodziny białek transportowych substancji rozpuszczonych, *SLC39A5*, były asocjowane z autosomalną dominującą HM w populacji chińskiej [72,73,95]. *SLC39A5* jest zlokalizowany w *locus* krótkowzroczności MYP24.

Gen *FLRT3* (ang. *fibronectin leucine rich transmembrane protein*) jest zlokalizowany w chromosomie 20 w pozycji 20p12.1. i koduje bogate w fibronektynę i leucynę białko transbłonowe. Warianty genu warunkują wystąpienie hipogonadyzmu hipogonadotropowego 21 (OMIM:615271), ale u żadnego z członków rodziny HM-78 nie zdiagnozowano tej choroby. *FLRT3* ulega ekspresji w wielu tkankach, m. in. w płucach, nerkach, kościach, wątrobie, sercu i łożysku [149]. *Flrt3* ulega także ekspresji u myszy w embrionalnych tkankach, z których rozwija się warstwa nerwowa siatkówki oraz nabłonek powieki [150]. Funkcja białka nie jest znana, jednak na podstawie jego struktury sugeruje się, że FLRT3 może działać niezależnie od komórki jako komórkowa cząsteczka adhezyjna lub jako receptor sygnałowy [149,151–154]. Prawdopodobne jest, że jako receptor membranowy, znajdujący się na powierzchni komórki, FLRT3 bierze udział w rozwoju układu nerwowego i regeneracji obwodowego układu nerwowego po uszkodzeniach nerwów [155]. Badania wykazały, że inhibicja ekspresji *FLRT3* może hamować ścieżkę sygnałową FGF [151,156]. Substytucja c.1642G>C prowadzi do zmiany aminokwasu w pozycji 548 z wysoko zakonserwowanej waliny na leucynę. Zidentyfikowana zmiana jest rzadka, potencjalnie patogenna i nie jest raportowana w

bazie dbSNP. Wariant c.1642G>C może mieć potencjalne znaczenie w warunkowaniu HM w rodzinie HM-78.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej przeprowadzono ponowną analizę wyników ES z zastosowaniem zmodyfikowanych kryteriów filtrowania, co umożliwiło wybranie dodatkowych wariantów sekwencji do weryfikacji. Zastosowanie kombinacji metod ES, sekwencjonowania Sangera i analizy segregacji pozwoliło na zawężenie listy wariantów potencjalnie powiązanych z HM. Segregację wariantu z fenotypem HM wykazano tylko w rodzinie HM-77 dla wariantu c.3704G>A w genie *ABCC6*. Gen *ABCC6* (ang. *ATP binding cassette subfamily C member 6*) koduje białko 6 z podrodziny C białek wiążących ATP, czyli rodziny transporterów ABC. Gen jest zlokalizowany w chromosomie 16 w pozycji 16p13.1 i ulega ekspresji głównie w nerkach i wątrobie. Mutacje *ABCC6* warunkują chorobę pseudoxanthoma elasticum (PXE) charakteryzującą się zwapnieniem elastycznych tkanek w organizmie i ich fragmentacją [157]. Hesse i wsp. wykazali zależność między mutacjami tego genu a objawami PXE w oku, tj. smugami naczyńopodobnymi w błonie Bruscha oraz peau d'orange, czyli dołkami w błonie Bruscha [158]. Substytucja w eksonie 26 c.3704G>A prowadzi do zmiany z wysoko zakonserwowanej argininy na glutaminę i jest potencjalnie patogenna. Wariant sekwencji jest raportowany w dbSNP jako rs138700741. Wariantu w genie *ABCC6* nie zidentyfikowano w pozostałych 35 polskich rodzinach. Udział omawianych wariantów sekwencji w warunkowaniu HM w rodzinach HM-78 i HM-77 wymaga poparcia badaniami funkcjonalnymi.

Za pomocą techniki ES identyfikowanych jest wiele wariantów sekwencji dla krótkowzroczności i HM, jednak uzyskane wyniki bardzo rzadko są replikowane w niezależnych badaniach eksperymentalnych, prowadzonych w innych niż oryginalne grupach pacjentów czy populacjach. W badaniach prowadzonych wśród pacjentów i rodzin chińskich z HM identyfikowano warianty sekwencji w genach *SLC39A5*, *LEPREL1 (P3H2)*, *P4HA2*, *ARR3*, *PRIMPOL (CCDC111)*, *ADAMTS18*, *CSMD1*, *RPGR*, *SLC39A5*, *ABCA4*, *CEP290*, *HSPG2*, *PCDH15*, *SAG*, *SEMA4A*, *USH2A*, *LRPAP1*, *ZNF644*, *SCO2* i *LOXL3*, *TNFRSF21* jako powiązane z fenotypem HM [57,72,78,79,82,88,95,159–161]. U pacjentów z HM identyfikowano także warianty w genach: *COL2A1*, *COL11A1*, *PRPH2*, *FBNI*, *GNAT1*, *OPA1*, *PAX2*, *GUCY2D*, *TSPAN12*, *CACNA1F*, *RPGR*, *GRM6*, *CACNA1F*, *FAM161A*, według bazy danych *Retinal Information Network* odpowiedzialnych za dystrofię siatkówki i zespoły ogólnoustrojowe, których jednym z objawów jest HM [91,92,122]. W kaukaskiej



rodzinie z HM wykryto także inny wariant w *P4HA2*, a warianty w *RBP3* w dwóch rodzinach z HM o nieznanym pochodzeniu etnicznym [81,162].

Wyniki ES analizowane w rozprawie doktorskiej zostały porównane z wynikami ES dostępnymi w danych literaturowych. W genach *RBP3*, *OPNILW*, *ARR3*, *FBNI*, *GNAT1*, *CACNAIF*, *CSMD1*, *ADAMTS18*, *ABCA4*, *HSPG2* i *USH2A* [57,78,92,122,162], zidentyfikowano warianty, jednak z powodu niespełnienia ustalonych kryteriów (obecność wariantu u osoby z HM i jego brak u osoby bez HM; wysoki stopień zakonserwowania aminokwasu; częstość rzadszego allelu niższa niż 0,001 w bazach danych; patogenność wariantu) nie zostały wybrane do weryfikacji. Pozostałe warianty sekwencji w genach identyfikowanych przez ES w doniesieniach literaturowych (*LEPREL1*, *PRIMPOL*, *LRPAP1*, *ZNF644*, *SLC39A5*, *SCO2*, *P4HA2*, *LOXL3*, *COL2A1*, *COL11A1*, *PRPH2*, *OPAI*, *PAX2*, *GUCY2D*, *TSPAN12*, *RPGR*, *CEP290*, *PCDH15*, *SAG*, *SEMA4A*, and *TNFRSF21*) [72,78,79,81,82,88,92,95,159,161] nie zostały wykryte przez ES.

Nie wykryto także wariantów w pozostałych znanych genach kandydatach dla krótkowzroczności i HM przedstawionych w Tabeli 3, w tym w *IGF1*, co potwierdza wyniki Rydzanicz i wsp. [104]. Z tych genów wykryto jedynie warianty w *TGFBI*, ale ich częstość występowania w populacji była zbyt wysoka, by zostały poddane analizie. Nie zidentyfikowano także wariantów w żadnym z genów powiązanych z centralną grubością rogówki i chorobami oka, w tym *COL1A1* [163], *COL1A2* [163], *COL8A2* [164], *FNDC3B* [165], *ZNF469* [166–171], *FOXO1* [168], *PRDM5* [165], *COL5A1* [166,167,169,172,173], *COL5A2* [172], które były przedmiotem dyskusji w pracy przeglądowej autora niniejszej rozprawy doktorskiej [174].

Podsumowując dyskusję wyników weryfikacji sekwencjonowania eksomowego, wariant c.3704G>A w genie *ABCC6*, oraz warianty c.1642G>C w *FLRT3* i c.938C>T w *SLC35E2B*, rozpoznane odpowiednio w rodzinie HM-77 oraz w rodzinie HM-78, potencjalnie warunkują fenotyp HM w tych rodzinach.

### ***Warianty sekwencji a długość osiowa gałki ocznej, ciśnienie wewnątrzgałkowe oraz krzywizna rogówki w HM***

Badania nad AL, IOP i CC w polskich rodzinach były rozszerzeniem tematu identyfikacji czynników genetycznych zaangażowanych w HM. Sprawdzone czy występowanie wariantów sekwencji może mieć związek z wielkością wybranych

parametrów okulistycznych w HM.

AL jest wysoce dziedziczna, a jej odziedziczalność mieści się w granicach 0,67 – 0,94 [175–177]. Stwierdzona wysoka korelacja pomiędzy AL a wadą sferyczną może wskazywać na wspólne elementy podłoża genetycznego pomiędzy tymi parametrami. W doniesieniach literaturowych warianty rs4074961 (*RSPO1*), rs994767 (w pobliżu *ZC3H11B*), rs12193446 (*LAMA2*), rs11073058 (w pobliżu *GJD2*), rs634990 (w pobliżu *GJD2*), rs9811920 (*CMSS1 (C3orf26)*), rs12321 (*ZNRF3*), rs8032019 (w pobliżu *GJD2*) i rs560766 (w pobliżu *GJD2*) były asocjowane z AL i/lub HM [45,46,105,106]. Analizowane SNPs oraz rs524952 znajdujące się w pobliżu genu *GJD2* są zlokalizowane w *locus* 15q14 asocjowanym z HM [45,48,178]. W badaniach w pracy doktorskiej nie wykazano segregacji wymienionych SNPs z HM i/lub długością gałki ocznej w rodzinach polskich.

Nie wykazano także związku pomiędzy występowaniem SNPs rs7555523 (*TMCO1*), rs52809447 (*GGA3*), rs7291444 (*PKDREJ*) i rs58073046 (*ARHGGEF12*), asocjowanych w literaturze z IOP [107,109,110] oraz rs2114039 (w pobliżu *PDGFRA*) i rs6554163 (*PDGFRA*), asocjowanych z CC [111–113], a wielkością IOP i CC u badanych polskich pacjentów z HM.

Podsumowując, analizowane warianty sekwencji nie warunkują AL, IOP i CC oraz HM w badanych polskich rodzinach. Wartości tych parametrów mogą zależeć od innych czynników genetycznych. Były to pierwsze analizy genetyczne AL, IOP i CC w rodzinach polskich z HM.

### ***Identyfikacja genów i ścieżek sygnałowych mających znaczenie w etiologii wysokiej krótkowzroczności***

Aby ocenić czy różnice w poziomie metylacji genów mogą odgrywać rolę w patogenezie wysokiej krótkowzroczności przeprowadzono analizę całogenomowej metylacji DNA u 18 polskich dzieci z HM i 18 dzieci nieobarczonych HM. W ramach realizacji rozprawy doktorskiej analizowano wyniki z podziałem na analizy hipermetylacji i hipometylacji genów u dzieci z HM, w porównaniu do grupy kontrolnej.

#### ***Hipermetylacja w wysokiej krótkowzroczności***

Zidentyfikowano 182 hipermetylowanych dinukleotydów CpG z ponad 15%

różnicą, w tym 35 z ponad 20% różnicą, w poziomie metylacji uzyskany dla dzieci z HM oraz dzieci bez HM. Wśród 35 dinukleotydów CpG z ponad 20% różnicą, hipermetylowane dinukleotydy CpG zlokalizowane w 5'UTR, TSS200, TSS1500 i/lub w wyspie CpG *GSTM1*, *ATPIA4*, *MICAL3*, *LCE3C*, *PPP1R18*, *TRAPPC11*, *ARHGAP20*, *XRCC2*, *GLI3*, *OXAIL*, *FARP2* mogą mieć potencjalny wpływ na wyciszenie tych genów. W obrębie regionu okołopromotorowego genów *GSTM1*, *LCE3C*, *FARP2* zidentyfikowano również inne dinukleotydy CpG o podwyższonym poziomie metylacji u dzieci z HM w porównaniu do dzieci bez HM. Jednakże, pozostałe dinukleotydy CpG w regionach okołopromotorowych genów *ATPIA4*, *PPP1R18*, *TRAPPC11*, *ARHGAP20*, *XRCC2*, *GLI3*, *OXAIL* są tylko izolowanymi CpG ze zmienionym poziomem metylacji co podważa hipotezę o ich potencjalnym wpływie na zmiany ekspresji genu.

Według danych literaturowych funkcje *GSTM1* (glutathione S-transferase mu 1, OMIM:138350) są związane z prawidłowym funkcjonowaniem oka [179]. *GSTM1* należy do nadrodziny S-transferaz glutationowych (glutathione-S-transferases), do których zalicza się osiem klas/izoforn. Wszystkie biorą udział w detoksykacji reaktywnych form elektrofilowych różnych związków, ale różnią się specyficznością substratową. *GSTM1* łącznie z izoformą *GSTP1* jest zaangażowana przede wszystkim w deaktywację wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych i akrylamidu. Hunter i wsp. wykazali, że poziom mRNA i białka genu *GSTM1* był obniżony w liniach komórkowych RPE/naczyniówki wyprowadzonych z siatkówki pacjentów z zwyrodnieniem plamki żółtej w porównaniu do linii kontrolnych [179]. Jednocześnie wykryto znaczną hipermetylację promotora genu w komórkach pacjentów z zwyrodnieniem w odniesieniu do linii kontrolnych [179]. Obecnie brak jakichkolwiek doniesień o roli tego genu w krótkowzroczności. cg24506221 zlokalizowany w TSS200 genu *GSTM1* i w wyspie CpG jest hipermetylowany u dzieci z HM z 25% różnicą w poziomie metylacji w porównaniu do kontroli. Na podstawie wyników i informacji z literatury można sugerować, że hipermetylacja promotora *GSTM1* może mieć wpływ na zmianę ekspresji, jednak brak wystarczających dowodów na wnioskowanie o roli tego genu w HM u badanych polskich dzieci.

Porównano wyniki całogenomowej analizy metylacji z wynikami opublikowanych artykułów naukowych poruszających zagadnienie metylacji w krótkowzroczności. Zhou i wsp. sugerują, że hipermetylacja promotora/eksonu 1 genu *Coll1a1* może hamować syntezę kolagenu w twardówce i tym samym prowadzić do

rozwoju krótkowzroczności u myszy. Przypuszczenie zostało oparte na badaniach, w których wykazano, że promotor i ekson 1 genu *Coll1a1* były hipermetylowane oraz poziom mRNA w twardówce był obniżony w oczach myszy ze sztucznie wywołaną krótkowzrocznością w porównaniu do oka zdrowego. W wynikach pracy doktorskiej tylko jeden dinukleotyd CpG w tym genie był zmetylowany na poziomie o 10,5% wyższym u kontroli niż u dzieci z HM, jednakże zlokalizowany jest w obrębie sekwencji kodującej genu, a nie w rejonie okołopromotorowym, także na tej podstawie nie można wnioskować o jego zaangażowaniu w HM u polskich dzieci. Pozostałe identyfikowane dinukleotydy CpG osiągnęły zbyt niską różnicę w poziomie metylacji. Gen *COL1A1* był wielokrotnie analizowany pod kątem zaangażowania w patogenezę krótkowzroczności, jednak publikowane wyniki nie są spójne, a przeważają artykuły zaprzeczające powiązaniu z krótkowzrocznością [50,58,59,180–182].

Podczas analizy 386 hipermetylowanych genów w bazie danych ConsensusPathDB-human server wykryto wzbogacenie w kilku ścieżkach molekularnych/procesach metabolicznych, które według doniesień literaturowych mogą być powiązane z krótkowzrocznością i/lub okiem. Są to meta-ścieżka receptorów jądrowych, ścieżka sygnałowa integryny, choroby związane z transdukcją sygnału, ścieżki sygnałowe cGMP-PKG, NOTCH, Wnt i oksytocyny, szlak odpowiedzi na uszkodzenia DNA (zależny od kinazy ATM), przekazywanie sygnału przez kinazę ogniskowo-adhezyjną, naprowadzanie aksonów, sieć jądrowego receptora estrogenowego alfa, regulacja białka retinoblastoma oraz ścieżka sygnałowa wapnia. Poniżej opisano wymienione ścieżki molekularne.

Według analizy nadreprezentacji ścieżek molekularnych *GSTMI* jest zaangażowany w meta-ścieżce receptorów jądrowych, które mają zdolność do bezpośredniego przyłączania do DNA i tym samym regulacji ekspresji różnych genów. Receptory te biorą także udział w rozwoju oraz prawidłowym funkcjonowaniu poszczególnych warstw siatkówki i fotoreceptorów [183–186]. Warto nadmienić, że w HM występują zmiany w strukturze siatkówki związane z rozciąganiem gałki ocznej, co może sugerować powiązanie meta-ścieżki receptorów jądrowych z HM.

Kolageny i integryny wiążące kolagen są najważniejszymi składnikami macierzy zewnątrzkomórkowej (ang. *extracellular matrix*, ECM). Integryny jako receptory komórkowe są odpowiedzialne za przytwierdzenie komórek do ECM w miejscach zwanych ogniskami adhezji oraz biorą udział w remodelowaniu twardówki [187–190]. Zaburzenia ścieżki sygnałowej integryny mogłyby być przyczyną HM u

badanych polskich dzieci, ponieważ ze względu na swoją funkcję proponuje się je jako potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu krótkowzroczności [187]. Vecino i wsp. analizowali aktywność integrzyn w ECM w komórkach zwojowych siatkówki (ang. *retinal ganglion cells*, RGC) poprzez fosforylację kinazy ogniskowo-adhezyjnej (ang. *focal adhesion kinase*, FAK), która pośredniczy w ścieżkach sygnałowych integrzyn [191], reguluje stymulację transformacji i migracji komórek RPE oraz angiogenezę i neowaskularyzację siatkówki [192,193]. Podczas rozwoju komórki RGC są naprowadzane przez specjalne cząsteczki [194], a Mei i wsp. wykryli wzbogacenie miRNA w ścieżce związanej z naprowadzaniem aksonów u myszy z wywołaną krótkowzrocznością [195]. Warto nadmienić, że Flitcroft i wsp. również zidentyfikowali ścieżkę molekularną związaną z naprowadzaniem aksonów oraz ogniskami adhezji jako potencjalnie zaangażowane w rozwój krótkowzroczności [196]. Powyższe doniesienia potwierdzają potencjalny udział ścieżki sygnałowej integrzyn oraz związanych z przekazywaniem sygnału przez kinazę ogniskowo-adhezyjną i naprowadzaniem aksonów w patogenezie HM u polskich dzieci.

Receptor oksytocyny ulega ekspresji w komórkach RPE, a oksytocyna może indukować wzrost stężenia jonów wapniowych co można powiązać z komunikacją między czopkami a komórkami RPE [197]. Natomiast ścieżka sygnałowa wapnia bierze udział w utrzymaniu homeostazy i uruchamianiu ścieżki apoptozy w zdrowych i uszkodzonych komórkach. Zaburzona ścieżka sygnałowa wapnia może być czynnikiem ryzyka degeneracji komórek RGC w neuropatii nerwu wzrokowego [198].

Zaburzenia ścieżki sygnałowej cyklicznego guanozynomonofosforanu (ang. *cyclic guanosine monophosphate*, cGMP) mogą przyczyniać się do rozwoju krótkowzroczności [199–201]. Natomiast ścieżka sygnałowa cGMP-PKG, kinazy białkowej zależnej od GMP (ang. *GMP-dependent protein kinase*, PKG), zachodzi w siatkówce co może wskazywać na jej udział w prawidłowym rozwoju lub funkcjonowaniu tej tkanki [202,203]. Na podstawie powyższych doniesień literaturowych można wnioskować o roli ścieżki sygnałowej cGMP-PKG w patogenezie HM w badanej grupie polskich dzieci.

Ścieżka sygnałowa Notch reguluje proliferację, różnicowanie i śmierć komórek [204], także rozwój każdego typu komórek siatkówki, różnicowanie komórek nabłonkowych rogówki i spojówki, tempo retinogenezy i może wpływać na utrzymanie prawidłowego fenotypu śluzu na powierzchni oka [205–209]. Ścieżka sygnałowa Wnt/ $\beta$ -kateniny bierze udział w regulacji ekspresji kolagenu typu I poprzez TGF- $\beta$ 1 w

fibroblastach twardówki świnek morskich ze sztucznie wywołaną krótkowzrocznością co sugeruje zaangażowanie ścieżki w remodelowanie twardówki podczas rozwoju krótkowzroczności [210]. Ma i wsp. również sugerują udział ścieżki sygnałowej Wnt2b w patogenezie sztucznie wywołanej krótkowzroczności u myszy [211]. Obie ścieżki, Notch i Wnt/ $\beta$ -kateniny, są zaangażowane w wiele procesów dotyczących prawidłowego funkcjonowania oka, więc mogłyby wpływać na patologię HM u polskich dzieci.

Odpowiedź na uszkodzenia DNA jest niezbędna dla rozwoju, utrzymania i prawidłowego funkcjonowania centralnego układu nerwowego, a białko ATM (ataxia telangiectasia mutated) jest odpowiedzialne za szybką indukcję odpowiedzi komórkowej na uszkodzenia obu nici DNA [212]. Określono profil ekspresji genu *ATM* i białka w oku człowieka z różnicą w lokalizacji formy aktywnej i nieaktywnej ATM w komórkach fotoreceptorów co może wskazywać na jego zaangażowanie w ochronie przed stresem oksydacyjnym oraz utrzymaniu prawidłowej struktury i funkcji komórek oka [212,213].

Podsumowując, hipermetylacja dinukleotydów CpG w rejonach okolopromotorowych genów *GSTM1*, *LCE3C*, *FARP2* może powodować ich wyciszenie u dzieci z HM. Z tych genów *GSTM1* jest powiązany z prawidłowym funkcjonowaniem oka, więc mógłby wpływać na patologię HM w badanej grupie dzieci. Każda z opisanych ścieżek molekularnych jest również związana z prawidłowym funkcjonowaniem oka, a jakiegokolwiek zaburzenia mogą prowadzić do jego dysfunkcji lub rozwoju chorób. Na podstawie otrzymanych wyników oraz pojawiających się doniesień można sugerować udział zidentyfikowanych wzbogaconych ścieżek w patogenezie krótkowzroczności u badanych polskich dzieci. Niemniej jednak, dla potwierdzenia roli identyfikowanych genów i ścieżek w HM, wymagane jest przeprowadzenie badań funkcjonalnych.

#### *Hipometylacja DNA w wysokiej krótkowzroczności*

W analizie otrzymano 275 hipometylowanych dinukleotydów CpG z ponad 15% różnicą, w tym 53 z ponad 20% różnicą, w poziomie metylacji między dziećmi z HM a dziećmi bez HM. Wśród dinukleotydów CpG z ponad 20% różnicą w poziomie metylacji 13 było zlokalizowanych w 5'UTR, TSS200 lub TSS1500 genów *ADAM20*, *PCDHA10*, *PAG1*, *ZFAND6*, *ETS1*, *ABHD13*, *SBSPON*, *SORBS2*, *LMOD3*,

*SLC25A3P1*, *TANCI*, *ATXN1*, *OR6B3*. Ze względu na lokalizację hipometylacja dinukleotydów CpG mogłaby powodować nadekspresję tych genów u badanych dzieci. W obrębie regionu okołopromotorowego genu *SORBS2*, *TANCI*, *ATXN1* i *ADAM20* zidentyfikowano także inne dinukleotydy CpG o obniżonym poziomie metylacji u dzieci z HM w porównaniu do dzieci bez HM. Pozostałe dinukleotydy CpG w regionach okołopromotorowych genów *ZFAND6*, *ETS1*, *LMOD3*, *OR6B3* są tylko izolowanymi CpG ze zmienionym poziomem metylacji co raczej zaprzecza ich potencjalnemu wpływowi na zmiany ekspresji genu.

Seow i wsp. zidentyfikowali pięć dinukleotydów CpG (cg21880079, cg14066632, cg03155767, cg17154092, cg26299044), których hipometylacja może zwiększać ryzyko rozwoju krótkowzroczności wczesnej u singapurskich dzieci [120]. Wyniki z publikacji zostały porównane z wynikami pracy doktorskiej. Wszystkie dinukleotydy identyfikowane przez Seow i wsp. były zmetylowane z nieistotną statystycznie różnicą (0,2 – 2,5%) w porównaniu do grupy kontrolnej dzieci bez HM i tym samym nie podlegały dalszym analizom w ramach pracy doktorskiej. Ponadto dinukleotydy te nie są zlokalizowane w rejonie okołopromotorowym i stąd trudno sugerować o wpływie ich metylacji na ekspresję genów.

Następnie, w bazie danych ConsensusPathDB-human server analizowano 370 hipometylowanych genów i wykryto wzbogacenie w kilku ścieżkach molekularnych, które według danych literaturowych mogą być powiązane z krótkowzrocznością i/lub okiem. Do wspomnianych ścieżek należą metabolizm askorbinianu i kwasu aldarowego oraz retinolu, biosynteza hormonów steroidowych, ścieżka kwasu walproinowego, ścieżka metabolizmu estrogenów, faza II – koniugacja związków chemicznych, metaścieżka biotransformacji fazy I i II, metabolizm leków przy udziale cytochromu P450 oraz innych enzymów, metabolizm ksenobiotyków przy udziale cytochromu P450, utlenianie biologiczne, biosynteza i metabolizm estrogenów i androgenów, ścieżka sygnałowa insuliny, ścieżka sygnałowa NRF2, regulacja transportu i absorpcji IGF przez białka wiążące IGF (IGFBPs). W większość ścieżek zaangażowane są geny z rodziny UGT1, kodujące UDP-glukuronylotransferazy (ang. *uridine 5'-diphosphoglucuronosyltransferase*). UDP-glukuronylotransferazy są głównymi katalizatorami reakcji przemiany substancji endo- i egzogennych do form rozpuszczalnych w wodzie w fazie II biotransformacji [214]. W analizie nadreprezentacji ścieżek zidentyfikowano ścieżki dotyczące biotransformacji, fazę II – koniugację związków chemicznych i metaścieżkę biotransformacji fazy I i II, oraz ścieżki dotyczące metabolizmu leków oraz

ksenobiotyków (z udziałem cytochromu P450 lub innych enzymów). Obie fazy biotransformacji przebiegają również w różnych strukturach oka i odgrywają istotną rolę w metabolizmie ksenobiotyków i leków okulistycznych [215,216]. Aktywność metaboliczna fazy I, fazy przygotowującej związku do fazy II, podczas której głównymi enzymami są białka z rodziny cytochromów P-450 [214], jest najwyższa w strukturach ocznych graniczących z naczyniami krwionośnymi błony naczyniowej oka [217]. Białka cytochromu P450 są zlokalizowane np. w siatkówce, by neutralizować toksyny, które przedostają się przez barierę krew-siatkówka [215]. Enzymy cytochromu P450 są odpowiedzialne także za reakcje szlaku biosyntezy i metabolizmu hormonów steroidowych [218]. W analizie nadreprezentacji ścieżek molekularnych zidentyfikowano kilka ścieżek dotyczących właśnie tych procesów. Pojawiają się doniesienia sugerujące udział hormonów steroidowych, a w szczególności estrogenów, w rozwoju chorób oka takich jak schorzenia siatkówki [219,220]. Gong i wsp. wykazali związek między zmianami poziomu estrogenu podczas cyklu menstruacyjnego a parametrami oka i jakością widzenia u kobiet w wieku nastoletnim [221]. Receptor estrogenu ulega ekspresji w błonie naczyniowej w oczach z HM [222], a Zoe i wsp. sugerują, że poziom testosteronu koreluje z HM [223]. Na podstawie doniesień literaturowych można wnioskować, że geny kodujące UDP-glukuronylotransferazy oraz ścieżki sygnałowe dotyczące biotransformacji fazy I i II, biosyntezy i metabolizmu hormonów steroidowych, w których biorą udział, mogłyby odgrywać rolę w patogenezie HM u badanych polskich dzieci.

W analizie zidentyfikowano także szlak metabolizmu retinolu, pochodnej witaminy A, który wchodzi w skład rodopsyny utrzymującej wrażliwość pręcików siatkówki oka na przyćmione światło [224]. Niedobór witaminy A może prowadzić do pojawienia się takich objawów ocznych jak ślepotę zmierzchowa (tzw. „kurza ślepotę”), spowodowana zahamowaniem regeneracji rodopsyny, oraz kseroftalmia, czyli nadmierne wysychanie rogówki i spojówki oka mogące przy dużych niedoborach prowadzić do ślepoty [224]. Zaburzenia tego szlaku mogą wpływać na pogorszenie jakości widzenia po zmierzchu u badanych polskich dzieci, ale raczej nie są związane z patogenezą HM.

Ścieżka sygnałowa związana z insuliną odgrywa rolę w metabolizmie węglowodanów, lipidów i białek, kontroli cyklu komórkowego oraz proliferacji i różnicowaniu komórek, transporcie cząsteczek, syntezie tlenu azotu oraz transkrypcji genów [225]. Receptor insuliny w większości tkanek aktywuje dwie główne ścieżki



sygnałowe, ścieżkę PI3K-Akt, która odgrywa kluczową rolę m. in. w metabolizmie, wzroście i proliferacji komórek oraz kaskadę MAPK [226]. Penha i wsp. sugerują, że insulina stymuluje ścieżkę PI3K-Akt podczas rozwoju wad wzroku – zarówno krótkowzroczności jak i dalekowzroczności, natomiast podczas rozwoju krótkowzroczności nie stymuluje ścieżki MAPK [226]. W innych badaniach wskazano, że zmiany w ścieżce MAPK mogą być powiązane z mechanizmami zachodzącymi podczas rozciągania pod wpływem siły mechanicznej komórek Müllera siatkówki [227]. Wykryto także wysoki poziom ekspresji MAPK, PI3K i TGF- $\beta$  w tkankach twardówki eksponowanych na światło czerwone [228]. Ponadto, insulina wstrzykiwana do ciała szklistego powoduje rozwój krótkowzroczności u drobiu [226]. Liu i wsp. wykazali asocjację SNPs w genach ścieżki sygnałowej insuliny (gen receptora insuliny *INSR* i region *INS-IGF2*) z HM u 1244 pacjentów populacji chińskiej oraz brak asocjacji między SNPs genów *IGFBP1* i *IGF2R* a HM [229]. Białka wiążące IGF (IGFBPs) regulują transport i absorpcję IGF1 i IGF2 (insulin like growth factors I and II). Białko IGFBP-3 może być regulatorem ścieżki sygnałowej insuliny/TNF- $\alpha$  [230]. mRNA genów *IGF1*, *IGF1R* i *IGFBP* od 2 do 6 ulega ekspresji w różnych tkankach oka [231,232]. Jak już było to wspomniane wykazano związek między krótkowzrocznością a SNPs genu *IGF1* [69,70,233], który jednak nie został potwierdzony w innych pracach [104,234,235]. Sztucznie wywołana krótkowzroczność u świnek morskich prowadziła do wzrostu poziomu ekspresji *IGF1* i *IGF2* w twardówce/siatkówce [236,237]. Pacjenci z retinopatią cukrzycową, czyli powikłaniem cukrzycy powodującym uszkodzenie naczyń krwionośnych siatkówki, mają podwyższony poziom IGF1 i IGF2 oraz IGFBPs [238]. IGFBP-3 hamuje a TNF- $\alpha$  indukuje apoptozę komórek siatkówki, a brak ścieżki sygnałowej IGFBP-3 prowadzi do zmian w neuronach obserwowanych w retinopatii cukrzycowej [239]. Natomiast, czynnik transkrypcyjny NRF2 (nuclear factor, erythroid 2 like 2, NFE2L2) bierze udział w ścieżkach sygnałowych, których zaburzone funkcjonowanie w siatkówkach pacjentów z cukrzycą prowadzi do rozwoju retinopatii cukrzycowej [240]. Terapie polegające na aktywacji NRF2, która chroni przed stresem oksydacyjnym, mogą być potencjalnym środkiem prewencyjnym dla retinopatii cukrzycowej, innych schorzeń siatkówki, a także odgrywać ważną rolę w patogenezie krótkowzroczności [240–244] u badanych polskich dzieci.

Przedstawione ścieżki molekularne są zaangażowane w warunkowanie prawidłowego funkcjonowania oka, a ich zaburzenia mogą prowadzić do jego dysfunkcji lub rozwoju chorób. Można sugerować o potencjalnym udziale tych ścieżek

oraz hiper- i hipometylowanych genów w patogenezie krótkowzroczności u badanych polskich dzieci, jednak wymagane jest uzyskanie dalszych dowodów za pomocą badań funkcjonalnych. Zmiana poziomu metylacji DNA może być wynikiem działania czynników środowiskowych [245] i z tego względu rozpoznana już i potwierdzona w badaniach rola elementów środowiskowych w etiologii HM wskazuje na wpływ metylacji DNA na patogenezę HM [246]. W związku z powyższym, analiza poziomu metylacji wybranych genów może być jednym z narzędzi do badania interakcji między genami a środowiskiem w HM.

## **Podsumowanie**

Opracowanie danych klinicznych członków polskich rodzin pozwoliło na sprawdzenie zależności między wartościami poszczególnych parametrów okulistycznych a fenotypem badanych grup pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby. Wielkość wady sferycznej u członków polskich rodzin zwiększała się wraz z długością osiową gałki ocznej, co wskazuje na nadmierną długość gałki ocznej jako przyczynę krótkowzroczności i tym samym potwierdza słuszność przyjętego kryterium podziału badanych osób na grupy według wielkości wady sferycznej i długości osiowej gałki ocznej.

Warianty sekwencji w genach *ABCC6*, *FLRT3* oraz *SLC35E2B* mogą warunkować fenotyp HM w rodzinach z HM, w których zostały rozpoznane, jednak by potwierdzić patogenność wariantów wymagane są dalsze analizy funkcjonalne. Wyniki wskazują, że HM w pozostałych badanych rodzinach polskich zależy od innych czynników genetycznych niż analizowane warianty.

Podobnie, w kwestii długości osiowej gałki ocznej, ciśnienia wewnątrzgałkowego oraz krzywizny rogówki inne niż analizowane warianty sekwencji mogą warunkować wielkości tych parametrów wśród badanych pacjentów z HM.

Podsumowując kwestie metylacji DNA, hipermetylowane dinukleotydy CpG zlokalizowane w regionie okołopromotorowych genów *GSTM1*, *LCE3C*, *FARP2* oraz hipometylowane w *SORBS2*, *TANCI*, *ATXN1* i *ADAM20* mogą powodować wyciszenie/nadekspresję tych genów i tym samym potencjalnie wpływać na patogenezę HM u polskich dzieci. Nadreprezentacja hipermetylowanych i hipometylowanych genów w identyfikowanych ścieżkach molekularnych związanych z krótkowzrocznością lub okiem wskazuje na możliwe spowodowane zmianami metylacji

DNA zaburzenia tych ścieżek w HM u badanych dzieci.

Wiadome jest, że w przypadku zaburzeń wielogenowych i wieloczynnikowych uzyskanie silnego dowodu na zaangażowanie genu czy wariantu sekwencji jest bardzo trudne [247]. Jednocześnie doniesień na temat udziału genów, wariantów sekwencji lub ścieżek molekularnych, które nie są poparte silnymi dowodami, nie należy ignorować, gdyż mogą się okazać przydatne w przyszłych badaniach [247]. Ponadto, wyniki uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej odnoszą się tylko do populacji polskiej i w związku z różnicami etnicznymi mogą występować rozbieżności pomiędzy różnymi populacjami, dlatego otrzymanych wyników nie można generalizować. Jednocześnie identyfikacja w pracy różnych wariantów sekwencji (jako czynników genetycznych), oraz hiper- i hipometylacja dinukleotydów CpG w promotorach genów (jako elementów epigenetycznych), a także brak powiązania między nimi, potwierdza złożoność podłoża genetycznego i epigenetycznego wysokiej krótkowzroczności u polskich pacjentów.

## 10. WNIOSKI

1. Wyniki opracowania danych klinicznych potwierdziły słuszność przyjętego kryterium podziału badanych osób na grupy według wielkości wady sferycznej i długości osiowej gałki ocznej.

2. Rozpoznane warianty sekwencji: c.3704G>A w *ABCC6*, 1642G>C w *FLRT3* i c.938C>T w *SLC35E2B* mogą warunkować fenotyp wysokiej krótkowzroczności w rodzinach, w których zostały zidentyfikowane. Otrzymane wyniki potwierdzają, że rodzinie występująca wysoka krótkowzroczność może mieć zróżnicowane podłoże genetyczne w poszczególnych rodzinach.

3. Brak segregacji analizowanych wariantów sekwencji z fenotypem wysokiej krótkowzroczności oraz długością gałek ocznych, wysokim ciśnieniem wewnątrzgałkowym lub dużym promieniem krzywizny rogówki może wskazywać na powiązanie innych wariantów niż te zbadane z danymi parametrami okulistycznymi u pacjentów z wysoką krótkowzrocznością.

4. Hipermetylowane lub hipometylowane dinukleotydy CpG, zlokalizowane w regionach okołopromotorowych genów *GSTM1*, *LCE3C*, *FARP2* oraz *SORBS2*, *TANCI*, *ATXN1* i *ADAM20* mogą mieć wpływ na wyciszenie/nadekspresję tych genów i brać udział w patogenezie wysokiej krótkowzroczności u polskich dzieci. Zidentyfikowane wzbogacone ścieżki sygnałowe/procesy biochemiczne mogą również odgrywać rolę w etiologii wysokiej krótkowzroczności.

Otrzymane wyniki potwierdzają złożoność podłoża genetycznego wysokiej krótkowzroczności. W ramach realizacji celów szczegółowych zidentyfikowano nowe czynniki genetyczne i epigenetyczne potencjalnie zaangażowane w etiologię wysokiej krótkowzroczności u polskich pacjentów i tym samym zrealizowano założenia celu głównego pracy doktorskiej. Należy jednak pamiętać, że dane otrzymane dla polskich rodzin i polskich dzieci mogą się różnić w innych populacjach i/lub populacji ogólnej.

## 11. PIŚMIENICTWO

1. Morgan IG, Ohno-Matsui K, Saw S-M. Myopia. *Lancet*. 2012;379:1739–48.
2. Goss DA, Grosvenor TP, Keller JT, Marsh-Tootle W, Norton TT, Zadnik Z. Optometric clinical practice guide. Care of the patient with myopia. Am Optom Assoc St Louis MO. 1997;1–71.
3. Shen M, Fan F, Xue A, Wang J, Zhou X, Lu F. Biomechanical properties of the cornea in high myopia. *Vision Res*. 2008;48:2167–71.
4. Zejmo M, Formińska-Kapuścik M, Pieczara E, Filipek E, Mrukwa-Kominek E, Samochowiec-Donocik E, et al. Etiopathogenesis and management of high-degree myopia. Part I. *Med Sci Monit*. 2009;15:RA199-202.
5. Chen S-J, Lu P, Zhang W-F, Lu J-H. High myopia as a risk factor in primary open angle glaucoma. *Int J Ophthalmol*. 2012;5:750–3.
6. Szumiński M, Bakunowicz-Łazarczyk A. Współczesne poglądy na etiopatogenezę, diagnostykę i postępowanie w krótkowzroczności. *Kontaktologia Opt Okulistyczna*. 2010;2:18–23.
7. Holden BA, Fricke TR, Wilson DA, Jong M, Naidoo KS, Sankaridurg P, et al. Global Prevalence of Myopia and High Myopia and Temporal Trends from 2000 through 2050. *Ophthalmology*. 2016;123:1036–42.
8. Williams KM, Verhoeven VJM, Cumberland P, Bertelsen G, Wolfram C, Buitendijk GHS, et al. Prevalence of refractive error in Europe: the European Eye Epidemiology (E(3)) Consortium. *Eur J Epidemiol*. 2015;30:305–15.
9. Nowak MS, Jurowski P, Grzybowski A, Smigielski J. Characteristics of Refractive Errors in a Population of Adults in the Central Region of Poland. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15.
10. Dalz M, Krzyżaniak A. Wady refrakcji w aspekcie badań przesiewowych w szkole. *Now Lek*. 2004;73:366–9.
11. Pechmann A, Czepita D. [Epidemiology of myopia]. *Klin Oczna*. 2000;102:297–300.
12. Seroczyńska M, Prost ME, Medruń J, Łukasiak E, Oleksiak E. [The causes of childhood blindness and visual impairment in Poland]. *Klin Oczna*. 2001;103:117–20.
13. Pärssinen O, Kauppinen M. Risk factors for high myopia: a 22-year follow-up study from childhood to adulthood. *Acta Ophthalmol*. 2019;97:510–8.
14. Czepita M, Kuprjanowicz L, Safranow K, Mojsa A, Majdanik E, Ustianowska M, et al. The role of reading, writing, using a computer, or watching television in the development of myopia. *Ophthalmol J*. 2016;1:53–7.

15. Czepita M, Czepita D, Lubiński W. The Influence of Environmental Factors on the Prevalence of Myopia in Poland. *J Ophthalmol*. 2017;2017:5983406.
16. Verhoeven VJM, Buitendijk GHS, Consortium for Refractive Error and Myopia (CREAM), Rivadeneira F, Uitterlinden AG, Vingerling JR, et al. Education influences the role of genetics in myopia. *Eur J Epidemiol*. 2013;28:973–80.
17. Czepita D, Mojsa A, Zejmo M. Prevalence of myopia and hyperopia among urban and rural schoolchildren in Poland. *Ann Acad Med Stetin*. 2008;54:17–21.
18. Nickels S, Hopf S, Pfeiffer N, Schuster AK. Myopia is associated with education: Results from NHANES 1999-2008. *PloS One*. 2019;14:e0211196.
19. Ip JM, Rose KA, Morgan IG, Burlutsky G, Mitchell P. Myopia and the urban environment: findings in a sample of 12-year-old Australian school children. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:3858–63.
20. Uzma N, Kumar BS, Khaja Mohinuddin Salar BM, Zafar MA, Reddy VD. A comparative clinical survey of the prevalence of refractive errors and eye diseases in urban and rural school children. *Can J Ophthalmol*. 2009;44:328–33.
21. Czepita D, Gosławski W, Mojsa A, Muszyńska-Lachota I. Role of light emitted by incandescent or fluorescent lamps in the development of myopia and astigmatism. *Med Sci Monit*. 2004;10:CR168-171.
22. Xiong S, Sankaridurg P, Naduvilath T, Zang J, Zou H, Zhu J, et al. Time spent in outdoor activities in relation to myopia prevention and control: a meta-analysis and systematic review. *Acta Ophthalmol*. 2017;95:551–66.
23. Read SA, Collins MJ, Vincent SJ. Light Exposure and Eye Growth in Childhood. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015;56:6779–87.
24. Galvis V, Tello A, Camacho PA, Parra MM, Merayo-Llodes J. Bio-environmental factors associated with myopia: An updated review. *Arch Soc Espanola Oftalmol*. 2017;92:307–25.
25. Angi MR, Clementi M, Sardei C, Piattelli E, Bisantis C. Heritability of myopic refractive errors in identical and fraternal twins. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 1993;231:580–5.
26. Teikari JM, Kaprio J, Koskenvuo MK, Vannas A. Heritability estimate for refractive errors--a population-based sample of adult twins. *Genet Epidemiol*. 1988;5:171–81.
27. Tedja MS, Haarman AEG, Meester-Smoor MA, Kaprio J, Mackey DA, Guggenheim JA, et al. IMI - Myopia Genetics Report. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019;60:M89–105.
28. Goldschmidt E. [On the etiology of myopia. An epidemiological study]. *Acta Ophthalmol*. 1968;Suppl 98:1+.
29. Guggenheim JA, Kirov G, Hodson SA. The heritability of high myopia: a reanalysis of Goldschmidt's data. *J Med Genet*. 2000;37:227–31.

30. Farbrother JE, Kirov G, Owen MJ, Guggenheim JA. Family aggregation of high myopia: estimation of the sibling recurrence risk ratio. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45:2873–8.
31. Shi Y, Qu J, Zhang D, Zhao P, Zhang Q, Tam POS, et al. Genetic variants at 13q12.12 are associated with high myopia in the Han Chinese population. *Am J Hum Genet.* 2011;88:805–13.
32. Young TL, Ronan SM, Drahozal LA, Wildenberg SC, Alvear AB, Oetting WS, et al. Evidence that a locus for familial high myopia maps to chromosome 18p. *Am J Hum Genet.* 1998;63:109–19.
33. Young TL, Ronan SM, Alvear AB, Wildenberg SC, Oetting WS, Atwood LD, et al. A second locus for familial high myopia maps to chromosome 12q. *Am J Hum Genet.* 1998;63:1419–24.
34. Paluru PC, Nallasamy S, Devoto M, Rappaport EF, Young TL. Identification of a novel locus on 2q for autosomal dominant high-grade myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:2300–7.
35. Nallasamy S, Paluru PC, Devoto M, Wasserman NF, Zhou J, Young TL. Genetic linkage study of high-grade myopia in a Hutterite population from South Dakota. *Mol Vis.* 2007;13:229–36.
36. Paluru P, Ronan SM, Heon E, Devoto M, Wildenberg SC, Scavello G, et al. New locus for autosomal dominant high myopia maps to the long arm of chromosome 17. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44:1830–6.
37. Lam CY, Tam POS, Fan DSP, Fan BJ, Wang DY, Lee CWS, et al. A genome-wide scan maps a novel high myopia locus to 5p15. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;49:3768–78.
38. Paget S, Julia S, Vitezica ZG, Soler V, Malecaze F, Calvas P. Linkage analysis of high myopia susceptibility locus in 26 families. *Mol Vis.* 2008;14:2566–74.
39. Ma J-H, Shen S-H, Zhang G-W, Zhao D-S, Xu C, Pan C-M, et al. Identification of a locus for autosomal dominant high myopia on chromosome 5p13.3-p15.1 in a Chinese family. *Mol Vis.* 2010;16:2043–54.
40. Zhang Q, Guo X, Xiao X, Jia X, Li S, Hejtmancik JF. A new locus for autosomal dominant high myopia maps to 4q22-q27 between D4S1578 and D4S1612. *Mol Vis.* 2005;11:554–60.
41. Zhang Q, Guo X, Xiao X, Jia X, Li S, Hejtmancik JF. Novel locus for X linked recessive high myopia maps to Xq23-q25 but outside MYP1. *J Med Genet.* 2006;43:e20.
42. Zhang Q, Li S, Xiao X, Jia X, Guo X. Confirmation of a genetic locus for X-linked recessive high myopia outside MYP1. *J Hum Genet.* 2007;52:469–72.
43. Yang Z, Xiao X, Li S, Zhang Q. Clinical and linkage study on a consanguineous Chinese family with autosomal recessive high myopia. *Mol Vis.* 2009;15:312–8.

44. Solouki AM, Verhoeven VJM, van Duijn CM, Verkerk AJMH, Ikram MK, Hysi PG, et al. A genome-wide association study identifies a susceptibility locus for refractive errors and myopia at 15q14. *Nat Genet.* 2010;42:897–901.
45. Hayashi H, Yamashiro K, Nakanishi H, Nakata I, Kurashige Y, Tsujikawa A, et al. Association of 15q14 and 15q25 with high myopia in Japanese. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52:4853–8.
46. Schache M, Richardson AJ, Mitchell P, Wang JJ, Rochtchina E, Viswanathan AC, et al. Genetic association of refractive error and axial length with 15q14 but not 15q25 in the Blue Mountains Eye Study cohort. *Ophthalmology.* 2013;120:292–7.
47. Verhoeven VJM, Hysi PG, Saw S-M, Vitart V, Mirshahi A, Guggenheim JA, et al. Large scale international replication and meta-analysis study confirms association of the 15q14 locus with myopia. The CREAM consortium. *Hum Genet.* 2012;131:1467–80.
48. Jiao X, Wang P, Li S, Li A, Guo X, Zhang Q, et al. Association of markers at chromosome 15q14 in Chinese patients with moderate to high myopia. *Mol Vis.* 2012;18:2633–46.
49. Rydzanicz M, Nath SK, Sun C, Podfigurna-Musiak M, Frajdenberg A, Mrugacz M, et al. Identification of novel suggestive loci for high-grade myopia in Polish families. *Mol Vis.* 2011;17:2028–39.
50. Nakanishi H, Yamada R, Gotoh N, Hayashi H, Otani A, Tsujikawa A, et al. Absence of association between COL1A1 polymorphisms and high myopia in the Japanese population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:544–50.
51. Wang P, Li S, Xiao X, Jia X, Jiao X, Guo X, et al. High myopia is not associated with the SNPs in the TGIF, lumican, TGFB1, and HGF genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:1546–51.
52. Kawagoe T, Ota M, Meguro A, Takeuchi M, Yamane T, Shimazaki H, et al. Associations between CRYBA4 gene variants and high myopia in a Japanese population. *Clin Ophthalmol.* 2017;11:2151–6.
53. Wang J, Wang P, Gao Y, Li S, Xiao X, Zhang Q. High myopia is not associated with single nucleotide polymorphisms in the COL2A1 gene in the Chinese population. *Mol Med Rep.* 2012;5:133–7.
54. Dai L, Li Y, Du CY, Gong LM, Han CC, Li XG, et al. Ten SNPs of PAX6, Lumican, and MYOC genes are not associated with high myopia in Han Chinese. *Ophthalmic Genet.* 2012;33:171–8.
55. Piekutowska-Abramczuk D, Kocyła-Karczmarewicz B, Małkowska M, Łuczak S, Iwanicka-Pronicka K, Siegmund S, et al. No Evidence for Association of SCO2 Heterozygosity with High-Grade Myopia or Other Diseases with Possible Mitochondrial Dysfunction. *JIMD Rep.* 2016;27:63–8.
56. Zhu M, Yap MKH, Ho DWH, Fung WY, Ng PW, Gu Y, et al. Investigating the relationship between UMODL1 gene polymorphisms and high myopia: a case-control study in Chinese. *BMC Med Genet.* 2012;13:64.



57. Xiao X, Li S, Jia X, Guo X, Zhang Q. X-linked heterozygous mutations in *ARR3* cause female-limited early onset high myopia. *Mol Vis*. 2016;22:1257–66.
58. Inamori Y, Ota M, Inoko H, Okada E, Nishizaki R, Shiota T, et al. The *COL1A1* gene and high myopia susceptibility in Japanese. *Hum Genet*. 2007;122:151–7.
59. Metlapally R, Li Y-J, Tran-Viet K-N, Abbott D, Czaja GR, Malecaze F, et al. *COL1A1* and *COL2A1* genes and myopia susceptibility: evidence of association and suggestive linkage to the *COL2A1* locus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50:4080–6.
60. Ho DWH, Yap MKH, Ng PW, Fung WY, Yip SP. Association of high myopia with crystallin beta A4 (*CRYBA4*) gene polymorphisms in the linkage-identified *MYP6* locus. *PloS One*. 2012;7:e40238.
61. Yu Z, Zhou J, Chen X, Zhou X, Sun X, Chu R. Polymorphisms in the *CTNND2* gene and 11q24.1 genomic region are associated with pathological myopia in a Chinese population. *Ophthalmologica*. 2012;228:123–9.
62. Lu B, Jiang D, Wang P, Gao Y, Sun W, Xiao X, et al. Replication study supports *CTNND2* as a susceptibility gene for high myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:8258–61.
63. Li Y-J, Goh L, Khor C-C, Fan Q, Yu M, Han S, et al. Genome-wide association studies reveal genetic variants in *CTNND2* for high myopia in Singapore Chinese. *Ophthalmology*. 2011;118:368–75.
64. Ritchey ER, Zelinka CP, Tang J, Liu J, Fischer AJ. The combination of *IGF1* and *FGF2* and the induction of excessive ocular growth and extreme myopia. *Exp Eye Res*. 2012;99:1–16.
65. Veerappan S, Pertile KK, Islam AFM, Schäche M, Chen CY, Mitchell P, et al. Role of the hepatocyte growth factor gene in refractive error. *Ophthalmology*. 2010;117:239-245.e1-2.
66. Yanovitch T, Li Y-J, Metlapally R, Abbott D, Viet K-NT, Young TL. Hepatocyte growth factor and myopia: genetic association analyses in a Caucasian population. *Mol Vis*. 2009;15:1028–35.
67. Han W, Yap MKH, Wang J, Yip SP. Family-based association analysis of hepatocyte growth factor (*HGF*) gene polymorphisms in high myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:2291–9.
68. Mak JYY, Yap MKH, Fung WY, Ng PW, Yip SP. Association of *IGF1* gene haplotypes with high myopia in Chinese adults. *Arch Ophthalmol*. 2012;130:209–16.
69. Metlapally R, Ki C-S, Li Y-J, Tran-Viet K-N, Abbott D, Malecaze F, et al. Genetic association of insulin-like growth factor-1 polymorphisms with high-grade myopia in an international family cohort. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2010;51:4476–9.
70. Zidan HE, Rezk NA, Fouda SM, Mattout HK. Association of Insulin-Like Growth Factor-1 Gene Polymorphisms with Different Types of Myopia in Egyptian Patients. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2016;20:291–6.

71. Aldahmesh MA, Khan AO, Alkuraya H, Adly N, Anazi S, Al-Saleh AA, et al. Mutations in LRPAP1 are associated with severe myopia in humans. *Am J Hum Genet.* 2013;93:313–20.
72. Jiang D, Li J, Xiao X, Li S, Jia X, Sun W, et al. Detection of mutations in LRPAP1, CTSH, LEPREL1, ZNF644, SLC39A5, and SCO2 in 298 families with early-onset high myopia by exome sequencing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;56:339–45.
73. Feng C-Y, Huang X-Q, Cheng X-W, Wu R-H, Lu F, Jin Z-B. Mutational screening of SLC39A5, LEPREL1 and LRPAP1 in a cohort of 187 high myopia patients. *Sci Rep.* 2017;7:1120.
74. Lin H-J, Kung Y-J, Lin Y-J, Sheu JJC, Chen B-H, Lan Y-C, et al. Association of the lumican gene functional 3'-UTR polymorphism with high myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:96–102.
75. Chen ZT-Y, Wang I-J, Shih Y-F, Lin LL-K. The association of haplotype at the lumican gene with high myopia susceptibility in Taiwanese patients. *Ophthalmology.* 2009;116:1920–7.
76. Wang G-F, Ji Q-S, Qi B, Yu G-C, Liu L, Zhong J-X. The association of lumican polymorphisms and high myopia in a Southern Chinese population. *Int J Ophthalmol.* 2017;10:1516–20.
77. Tang WC, Yip SP, Lo KK, Ng PW, Choi PS, Lee SY, et al. Linkage and association of myocilin (MYOC) polymorphisms with high myopia in a Chinese population. *Mol Vis.* 2007;13:534–44.
78. Wan L, Deng B, Wu Z, Chen X. Exome sequencing study of 20 patients with high myopia. *PeerJ.* 2018;6:e5552.
79. Guo H, Tong P, Peng Y, Wang T, Liu Y, Chen J, et al. Homozygous loss-of-function mutation of the LEPREL1 gene causes severe non-syndromic high myopia with early-onset cataract. *Clin Genet.* 2014;86:575–9.
80. Mordechai S, Gradstein L, Pasanen A, Ofir R, El Amour K, Levy J, et al. High myopia caused by a mutation in LEPREL1, encoding prolyl 3-hydroxylase 2. *Am J Hum Genet.* 2011;89:438–45.
81. Napolitano F, Di Iorio V, Testa F, Tirozzi A, Reccia MG, Lombardi L, et al. Autosomal-dominant myopia associated to a novel P4HA2 missense variant and defective collagen hydroxylation. *Clin Genet.* 2018;93:982–91.
82. Guo H, Tong P, Liu Y, Xia L, Wang T, Tian Q, et al. Mutations of P4HA2 encoding prolyl 4-hydroxylase 2 are associated with nonsyndromic high myopia. *Genet Med.* 2015;17:300–6.
83. Han W, Leung KH, Fung WY, Mak JYY, Li YM, Yap MKH, et al. Association of PAX6 polymorphisms with high myopia in Han Chinese nuclear families. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:47–56.

84. Ng TK, Lam CY, Lam DSC, Chiang SWY, Tam POS, Wang DY, et al. AC and AG dinucleotide repeats in the PAX6 P1 promoter are associated with high myopia. *Mol Vis.* 2009;15:2239–48.
85. Miyake M, Yamashiro K, Nakanishi H, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Tsujikawa A, et al. Association of paired box 6 with high myopia in Japanese. *Mol Vis.* 2012;18:2726–35.
86. Jiang B, Yap MKH, Leung KH, Ng PW, Fung WY, Lam WW, et al. PAX6 haplotypes are associated with high myopia in Han chinese. *PloS One.* 2011;6:e19587.
87. Keen BA, Bailey LJ, Jozwiakowski SK, Doherty AJ. Human PrimPol mutation associated with high myopia has a DNA replication defect. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:12102–11.
88. Zhao F, Wu J, Xue A, Su Y, Wang X, Lu X, et al. Exome sequencing reveals CCDC111 mutation associated with high myopia. *Hum Genet.* 2013;132:913–21.
89. Oishi M, Yamashiro K, Miyake M, Akagi-Kurashige Y, Kumagai K, Nakata I, et al. Association between ZIC2, RASGRF1, and SHISA6 genes and high myopia in Japanese subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:7492–7.
90. Hepei L, Mingkun X, Li W, Jin W. Assessment of BicC family RNA binding protein 1 and Ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 1 as candidate genes for high myopia: A case-control study. *Indian J Ophthalmol.* 2017;65:926–30.
91. Zhou L, Xiao X, Li S, Jia X, Zhang Q. Frequent mutations of RetNet genes in eoHM: Further confirmation in 325 probands and comparison with late-onset high myopia based on exome sequencing. *Exp Eye Res.* 2018;171:76–91.
92. Sun W, Huang L, Xu Y, Xiao X, Li S, Jia X, et al. Exome Sequencing on 298 Probands With Early-Onset High Myopia: Approximately One-Fourth Show Potential Pathogenic Mutations in RetNet Genes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:8365–72.
93. Wakazono T, Miyake M, Yamashiro K, Yoshikawa M, Yoshimura N. Association between SCO2 mutation and extreme myopia in Japanese patients. *Jpn J Ophthalmol.* 2016;60:319–25.
94. Tran-Viet K-N, Powell C, Barathi VA, Klemm T, Maurer-Stroh S, Limviphuvadh V, et al. Mutations in SCO2 are associated with autosomal-dominant high-grade myopia. *Am J Hum Genet.* 2013;92:820–6.
95. Guo H, Jin X, Zhu T, Wang T, Tong P, Tian L, et al. SLC39A5 mutations interfering with the BMP/TGF- $\beta$  pathway in non-syndromic high myopia. *J Med Genet.* 2014;51:518–25.
96. Zha Y, Leung KH, Lo KK, Fung WY, Ng PW, Shi M, et al. TGFB1 as a susceptibility gene for high myopia: a replication study with new findings. *Arch Ophthalmol.* 2009;127:541–8.
97. Jia Y, Hu D-N, Zhou J. Human aqueous humor levels of TGF-  $\beta$ 2: relationship with axial length. *BioMed Res Int.* 2014;2014:258591.

98. Lin H-J, Wan L, Tsai Y, Liu S-C, Chen W-C, Tsai S-W, et al. Sclera-related gene polymorphisms in high myopia. *Mol Vis*. 2009;15:1655–63.
99. Zhuang H, Zhang R, Shu Q, Jiang R, Chang Q, Huang X, et al. Changes of TGF- $\beta$ 2, MMP-2, and TIMP-2 levels in the vitreous of patients with high myopia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2014;252:1763–7.
100. Lam DSC, Lee WS, Leung YF, Tam POS, Fan DSP, Fan BJ, et al. TGFbeta-induced factor: a candidate gene for high myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:1012–5.
101. Nishizaki R, Ota M, Inoko H, Meguro A, Shiota T, Okada E, et al. New susceptibility locus for high myopia is linked to the uromodulin-like 1 (UMODL1) gene region on chromosome 21q22.3. *Eye (Lond)*. 2009;23:222–9.
102. Shi Y, Li Y, Zhang D, Zhang H, Li Y, Lu F, et al. Exome sequencing identifies ZNF644 mutations in high myopia. *PLoS Genet*. 2011;7:e1002084.
103. Tran-Viet K-N, St Germain E, Soler V, Powell C, Lim S-H, Klemm T, et al. Study of a US cohort supports the role of ZNF644 and high-grade myopia susceptibility. *Mol Vis*. 2012;18:937–44.
104. Rydzanicz M, Nowak DM, Karolak JA, Frajdenberg A, Podfigurna-Musiela M, Mrugacz M, et al. IGF-1 gene polymorphisms in Polish families with high-grade myopia. *Mol Vis*. 2011;17:2428–39.
105. Cheng C-Y, Schache M, Ikram MK, Young TL, Guggenheim JA, Vitart V, et al. Nine loci for ocular axial length identified through genome-wide association studies, including shared loci with refractive error. *Am J Hum Genet*. 2013;93:264–77.
106. Li Y-T, Xie M-K, Wu J. Association between Ocular Axial Length-Related Genes and High Myopia in a Han Chinese Population. *Ophthalmologica*. 2016;235:57–60.
107. van Koolwijk LME, Ramdas WD, Ikram MK, Jansonius NM, Pasutto F, Hysi PG, et al. Common genetic determinants of intraocular pressure and primary open-angle glaucoma. *PLoS Genet*. 2012;8:e1002611.
108. Hysi PG, Cheng C-Y, Springelkamp H, Macgregor S, Bailey JNC, Wojciechowski R, et al. Genome-wide analysis of multiethnic cohorts identifies new loci influencing intraocular pressure and susceptibility to glaucoma. *Nat Genet*. 2014;46:1126–30.
109. Springelkamp H, Iglesias AI, Cuellar-Partida G, Amin N, Burdon KP, van Leeuwen EM, et al. ARHGEF12 influences the risk of glaucoma by increasing intraocular pressure. *Hum Mol Genet*. 2015;24:2689–99.
110. Chen F, Klein AP, Klein BEK, Lee KE, Truitt B, Klein R, et al. Exome array analysis identifies CAV1/CAV2 as a susceptibility locus for intraocular pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;56:544–51.
111. Mishra A, Yazar S, Hewitt AW, Mountain JA, Ang W, Pennell CE, et al. Genetic variants near PDGFRA are associated with corneal curvature in Australians. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53:7131–6.

112. Han S, Chen P, Fan Q, Khor C-C, Sim X, Tay W-T, et al. Association of variants in FRAP1 and PDGFRA with corneal curvature in Asian populations from Singapore. *Hum Mol Genet.* 2011;20:3693–8.
113. Guggenheim JA, McMahon G, Kemp JP, Akhtar S, St Pourcain B, Northstone K, et al. A genome-wide association study for corneal curvature identifies the platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$  gene as a quantitative trait locus for eye size in white Europeans. *Mol Vis.* 2013;19:243–53.
114. Łukasik M, Karmalska J, Szutowski MM, Łukaszkiwicz J. Wpływ metylacji DNA na funkcjonowanie genomu. *Biul Wydz Farm WUM.* 2009;2:13–8.
115. Guz J, Foksiński M, Oliński R. [Mechanism of DNA methylation and demethylation-its role in control of genes expression]. *Postepy Biochemii.* 2010;56:7–15.
116. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011;25:1010–22.
117. Byzia E, Giefing M. Metoda pirosekwencjonowania w badaniu nowotworów. *Na Pogran Chem Biol. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu;* 2014. p. 205–23.
118. Zhou X, Ji F, An J, Zhao F, Shi F, Huang F, et al. Experimental murine myopia induces collagen type I $\alpha$ 1 (COL1A1) DNA methylation and altered COL1A1 messenger RNA expression in sclera. *Mol Vis.* 2012;18:1312–24.
119. Hsi E, Wang Y-S, Huang C-W, Yu M-L, Juo S-HH, Liang C-L. Genome-wide DNA hypermethylation and homocysteine increase a risk for myopia. *Int J Ophthalmol.* 2019;12:38–45.
120. Seow WJ, Ngo CS, Pan H, Barathi VA, Tompson SW, Whisenhunt KN, et al. In-utero epigenetic factors are associated with early-onset myopia in young children. *PLoS One.* 2019;14:e0214791.
121. Kloss BA, Tompson SW, Whisenhunt KN, Quow KL, Huang SJ, Pavelec DM, et al. Exome Sequence Analysis of 14 Families With High Myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58:1982–90.
122. Jin Z-B, Wu J, Huang X-F, Feng C-Y, Cai X-B, Mao J-Y, et al. Trio-based exome sequencing arrests de novo mutations in early-onset high myopia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:4219–24.
123. Vishweswaraiah S, Swierkowska J, Ratnamala U, Mishra NK, Guda C, Chettiar SS, et al. Epigenetically dysregulated genes and pathways implicated in the pathogenesis of non-syndromic high myopia. *Sci Rep.* 2019;9:4145.
124. Frajdenberg A. Asocjacja wybranych markerów genetycznych z rodzinną wysoką krótkowzrocznością w rodzinach polskich. Praca doktorska. Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; 2008.
125. Górecki T. Podstawy statystyki z przykładami w R. BTC; 2011.

126. Lupski JR, Gonzaga-Jauregui C, Yang Y, Bainbridge MN, Jhangiani S, Buhay CJ, et al. Exome sequencing resolves apparent incidental findings and reveals further complexity of SH3TC2 variant alleles causing Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Genome Med.* 2013;5:57.
127. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38:e164.
128. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25:2078–9.
129. Bainbridge MN, Wiszniewski W, Murdock DR, Friedman J, Gonzaga-Jauregui C, Newsham I, et al. Whole-genome sequencing for optimized patient management. *Sci Transl Med.* 2011;3:87re3.
130. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7:248–9.
131. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4:1073–81.
132. Pollard KS, Hubisz MJ, Rosenbloom KR, Siepel A. Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies. *Genome Res.* 2010;20:110–21.
133. Schwarz JM, Rödelberger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods.* 2010;7:575–6.
134. Daca-Roszak P, Pfeifer A, Żebracka-Gala J, Rusinek D, Szybińska A, Jarząb B, et al. Impact of SNPs on methylation readouts by Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip Array: implications for comparative population studies. *BMC Genomics.* 2015;16:1003.
135. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med.* 2013;4:627–35.
136. Frajdenberg A, Pecold K, Podfigurna-Musiela M, Rydzanicz M, Mrugacz M, Leal SM, et al. Analiza zmian dna oka w rodzinach obciążonych wysoką krótkowzrocznością. *Klin Oczna.* 2007;109:173–5.
137. Grzybowski A, Kanclerz P. The standardized definition of high myopia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2019;257:1805.
138. Sanz Diez P, Wahl S, Ohlendorf A. The standardized definition of high myopia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2019;257:1807–8.
139. Joseph DS, Thampi B, Joosadima A, Mohan A. A study on association between intraocular pressure and myopia. *Int J Res Med Sci.* 2017;4:2202–5.
140. Lee AJ, Saw S-M, Gazzard G, Cheng A, Tan DTH. Intraocular pressure associations with refractive error and axial length in children. *Br J Ophthalmol.* 2004;88:5–7.

141. Tham Y-C, Aung T, Fan Q, Saw S-M, Siantar RG, Wong TY, et al. Joint Effects of Intraocular Pressure and Myopia on Risk of Primary Open-Angle Glaucoma: The Singapore Epidemiology of Eye Diseases Study. *Sci Rep.* 2016;6:19320.
142. Okukpon JO, Ojo OM. Corneal curvature in young high myopic undergraduates in southern Nigeria. *Int J Res Med Sci.* 2018;6:2592–5.
143. Tasneem AF, Vittal Nayak I, Shwetha BA. A Comparative Study in Axial Length of Eye and Radius of Curvature of Cornea between Myopes and Emmetropes in Indian Population. *J Evol Med Dent Sci.* 2015;4:12097–111.
144. Jonas JB, Bi HS, Wu JF, Xu L, Wang YX, Wei WB, et al. Corneal Curvature Radius in Myopia of Schoolchildren Versus Adult Myopia. *Cornea.* 2016;35:1333–7.
145. Hyman L, Gwiazda J, Hussein M, Norton TT, Wang Y, Marsh-Tootle W, et al. Relationship of age, sex, and ethnicity with myopia progression and axial elongation in the correction of myopia evaluation trial. *Arch Ophthalmol.* 2005;123:977–87.
146. Pärssinen O, Kauppinen M, Viljanen A. The progression of myopia from its onset at age 8-12 to adulthood and the influence of heredity and external factors on myopic progression. A 23-year follow-up study. *Acta Ophthalmol.* 2014;92:730–9.
147. Richdale K, Bullimore MA, Sinnott LT, Zadnik K. The Effect of Age, Accommodation, and Refractive Error on the Adult Human Eye. *Optom Vis Sci.* 2016;93:3–11.
148. Wojciechowski R, Moy C, Ciner E, Ibay G, Reider L, Bailey-Wilson JE, et al. Genomewide scan in Ashkenazi Jewish families demonstrates evidence of linkage of ocular refraction to a QTL on chromosome 1p36. *Hum Genet.* 2006;119:389–99.
149. Lacy SE, Bönnemann CG, Buzney EA, Kunkel LM. Identification of FLRT1, FLRT2, and FLRT3: a novel family of transmembrane leucine-rich repeat proteins. *Genomics.* 1999;62:417–26.
150. Gong S-G, Mai S, Chung K, Wei K. Flrt2 and Flrt3 have overlapping and non-overlapping expression during craniofacial development. *Gene Expr Patterns.* 2009;9:497–502.
151. Bottcher RT, Pollet N, Delius H, Niehrs C. The transmembrane protein XFLRT3 forms a complex with FGF receptors and promotes FGF signalling. *Nat Cell Biol.* 2004;6:38–44.
152. Egea J, Erlacher C, Montanez E, Burtscher I, Yamagishi S, Hess M, et al. Genetic ablation of FLRT3 reveals a novel morphogenetic function for the anterior visceral endoderm in suppressing mesoderm differentiation. *Genes Dev.* 2008;22:3349–62.
153. Karaulanov EE, Böttcher RT, Niehrs C. A role for fibronectin-leucine-rich transmembrane cell-surface proteins in homotypic cell adhesion. *EMBO Rep.* 2006;7:283–90.
154. Maretto S, Müller P-S, Aricescu AR, Cho KWY, Bikoff EK, Robertson EJ. Ventral closure, headfold fusion and definitive endoderm migration defects in mouse

embryos lacking the fibronectin leucine-rich transmembrane protein FLRT3. *Dev Biol.* 2008;318:184–93.

155. Robinson M, Parsons Perez MC, Tébar L, Palmer J, Patel A, Marks D, et al. FLRT3 is expressed in sensory neurons after peripheral nerve injury and regulates neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci.* 2004;27:202–14.

156. Cho G-S, Choi S-C, Han J-K. BMP signal attenuates FGF pathway in anteroposterior neural patterning. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;434:509–15.

157. Le Saux O, Martin L, Aherrahrou Z, Leftheriotis G, Váradi A, Brampton CN. The molecular and physiological roles of ABCC6: more than meets the eye. *Front Genet.* 2012;3:289.

158. Hesse RJ, Groetsch J, Burshell A. Pseudoxanthoma Elasticum: A Novel Mutation in the ABCC6 Gene That Affects Eye Manifestations of the Disease. *Ochsner J.* 2010;10:13–5.

159. Li J, Gao B, Xiao X, Li S, Jia X, Sun W, et al. Exome sequencing identified null mutations in LOXL3 associated with early-onset high myopia. *Mol Vis.* 2016;22:161–7.

160. Li J, Jiang D, Xiao X, Li S, Jia X, Sun W, et al. Evaluation of 12 myopia-associated genes in Chinese patients with high myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:722–9.

161. Pan H, Wu S, Wang J, Zhu T, Li T, Wan B, et al. TNFRSF21 mutations cause high myopia. *J Med Genet.* 2019;56:671–7.

162. Arno G, Hull S, Robson AG, Holder GE, Cheetham ME, Webster AR, et al. Lack of Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein Caused by Homozygous Mutation of RBP3 Is Associated With High Myopia and Retinal Dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:2358–65.

163. Dimasi DP, Chen JY, Hewitt AW, Klebe S, Davey R, Stirling J, et al. Novel quantitative trait loci for central corneal thickness identified by candidate gene analysis of osteogenesis imperfecta genes. *Hum Genet.* 2010;127:33–44.

164. Desronvil T, Logan-Wyatt D, Abdrabou W, Triana M, Jones R, Taheri S, et al. Distribution of COL8A2 and COL8A1 gene variants in Caucasian primary open angle glaucoma patients with thin central corneal thickness. *Mol Vis.* 2010;16:2185–91.

165. Lu Y, Vitart V, Burdon KP, Khor CC, Bykhovskaya Y, Mirshahi A, et al. Genome-wide association analyses identify multiple loci associated with central corneal thickness and keratoconus. *Nat Genet.* 2013;45:155–63.

166. Vithana EN, Aung T, Khor CC, Cornes BK, Tay W-T, Sim X, et al. Collagen-related genes influence the glaucoma risk factor, central corneal thickness. *Hum Mol Genet.* 2011;20:649–58.

167. Vitart V, Bencić G, Hayward C, Skunca Herman J, Huffman J, Campbell S, et al. New loci associated with central cornea thickness include COL5A1, AKAP13 and AVGR8. *Hum Mol Genet.* 2010;19:4304–11.



168. Lu Y, Dimasi DP, Hysi PG, Hewitt AW, Burdon KP, Toh T, et al. Common genetic variants near the Brittle Cornea Syndrome locus ZNF469 influence the blinding disease risk factor central corneal thickness. *PLoS Genet.* 2010;6:e1000947.
169. Hoehn R, Zeller T, Verhoeven VJM, Grus F, Adler M, Wolfs RC, et al. Population-based meta-analysis in Caucasians confirms association with COL5A1 and ZNF469 but not COL8A2 with central corneal thickness. *Hum Genet.* 2012;131:1783–93.
170. Sahebjada S, Schache M, Richardson AJ, Snibson G, MacGregor S, Daniell M, et al. Evaluating the association between keratoconus and the corneal thickness genes in an independent Australian population. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:8224–8.
171. Ulmer M, Li J, Yaspan BL, Ozel AB, Richards JE, Moroi SE, et al. Genome-wide analysis of central corneal thickness in primary open-angle glaucoma cases in the NEIGHBOR and GLAUGEN consortia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:4468–74.
172. Segev F, Héon E, Cole WG, Wenstrup RJ, Young F, Slomovic AR, et al. Structural abnormalities of the cornea and lid resulting from collagen V mutations. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47:565–73.
173. Li X, Bykhovskaya Y, Canedo ALC, Haritunians T, Siscovick D, Aldave AJ, et al. Genetic association of COL5A1 variants in keratoconus patients suggests a complex connection between corneal thinning and keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:2696–704.
174. Swierkowska J, Gajecka M. Genetic factors influencing the reduction of central corneal thickness in disorders affecting the eye. *Ophthalmic Genet.* 2017;38:501–10.
175. Lyhne N, Sjølie AK, Kyvik KO, Green A. The importance of genes and environment for ocular refraction and its determiners: a population based study among 20-45 year old twins. *Br J Ophthalmol.* 2001;85:1470–6.
176. Chen CY-C, Scurrah KJ, Stankovich J, Garoufalis P, Dirani M, Pertile KK, et al. Heritability and shared environment estimates for myopia and associated ocular biometric traits: the Genes in Myopia (GEM) family study. *Hum Genet.* 2007;121:511–20.
177. Klein AP, Suktitipat B, Duggal P, Lee KE, Klein R, Bailey-Wilson JE, et al. Heritability analysis of spherical equivalent, axial length, corneal curvature, and anterior chamber depth in the Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol.* 2009;127:649–55.
178. Wong Y-L, Hysi P, Cheung G, Tedja M, Hoang QV, Tompson SWJ, et al. Genetic variants linked to myopic macular degeneration in persons with high myopia: CREAM Consortium. *PloS One.* 2019;14:e0220143.
179. Hunter A, Spechler PA, Cwanger A, Song Y, Zhang Z, Ying G, et al. DNA Methylation Is Associated with Altered Gene Expression in AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53:2089–105.
180. Jin G-M, Zhao X-J, Chen A-M, Chen Y-X, Li Q. Association of COL1A1 polymorphism with high myopia: a Meta-analysis. *Int J Ophthalmol.* 2016;9:604–9.

181. Zhang D, Shi Y, Gong B, He F, Lu F, Lin H, et al. An association study of the COL1A1 gene and high myopia in a Han Chinese population. *Mol Vis*. 2011;17:3379–83.
182. Liang C-L, Hung K-S, Tsai Y-Y, Chang W, Wang H-S, Juo S-HH. Systematic assessment of the tagging polymorphisms of the COL1A1 gene for high myopia. *J Hum Genet*. 2007;52:374–7.
183. Kobayashi M, Hara K, Yu RT, Yasuda K. Expression and functional analysis of Nr2e3, a photoreceptor-specific nuclear receptor, suggest common mechanisms in retinal development between avians and mammals. *Dev Genes Evol*. 2008;218:439–44.
184. Corso-Díaz X, Simpson EM. Nr2e1 regulates retinal lamination and the development of Müller glia, S-cones, and glycinergic amacrine cells during retinogenesis. *Mol Brain*. 2015;8:37.
185. Pearsall EA, Cheng R, Zhou K, Takahashi Y, Matlock HG, Vadvalkar SS, et al. PPAR $\alpha$  is essential for retinal lipid metabolism and neuronal survival. *BMC Biol*. 2017;15:113.
186. Mollema NJ, Yuan Y, Jelcick AS, Sachs AJ, von Alpen D, Schorderet D, et al. Nuclear receptor Rev-erb alpha (Nr1d1) functions in concert with Nr2e3 to regulate transcriptional networks in the retina. *PloS One*. 2011;6:e17494.
187. Wang KK, Metlapally R, Wildsoet CF. Expression Profile of the Integrin Receptor Subunits in the Guinea Pig Sclera. *Curr Eye Res*. 2017;42:857–63.
188. McBrien NA, Metlapally R, Jobling AI, Gentle A. Expression of collagen-binding integrin receptors in the mammalian sclera and their regulation during the development of myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47:4674–82.
189. Metlapally R, Jobling AI, Gentle A, McBrien NA. Characterization of the integrin receptor subunit profile in the mammalian sclera. *Mol Vis*. 2006;12:725–34.
190. Tian X-D, Cheng Y-X, Liu G-B, Guo S-F, Fan C-L, Zhan L-H, et al. Expressions of type I collagen,  $\alpha$ 2 integrin and  $\beta$ 1 integrin in sclera of guinea pig with defocus myopia and inhibitory effects of bFGF on the formation of myopia. *Int J Ophthalmol*. 2013;6:54–8.
191. Vecino E, Heller JP, Veiga-Crespo P, Martin KR, Fawcett JW. Influence of extracellular matrix components on the expression of integrins and regeneration of adult retinal ganglion cells. *PloS One*. 2015;10:e0125250.
192. Aguilar-Solis ED, Lee-Rivera I, Álvarez-Arce A, López E, López-Colomé AM. FAK phosphorylation plays a central role in thrombin-induced RPE cell migration. *Cell Signal*. 2017;36:56–66.
193. Kornberg LJ, Shaw LC, Spoerri PE, Caballero S, Grant MB. Focal adhesion kinase overexpression induces enhanced pathological retinal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:4463–9.

194. Herrera E, Erskine L, Morenilla-Palao C. Guidance of retinal axons in mammals. *Semin Cell Dev Biol.* 2019;85:48–59.
195. Mei F, Wang J, Chen Z, Yuan Z. Potentially Important MicroRNAs in Form-Deprivation Myopia Revealed by Bioinformatics Analysis of MicroRNA Profiling. *Ophthalmic Res.* 2017;57:186–93.
196. Flitcroft DI, Loughman J, Wildsoet CF, Williams C, Guggenheim JA, for the CREAM Consortium. Novel Myopia Genes and Pathways Identified From Syndromic Forms of Myopia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2018;59:338–48.
197. Halbach P, Pillers D-AM, York N, Asuma MP, Chiu MA, Luo W, et al. Oxytocin expression and function in the posterior retina: a novel signaling pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015;56:751–60.
198. Sargoy A, Sun X, Barnes S, Brecha NC. Differential calcium signaling mediated by voltage-gated calcium channels in rat retinal ganglion cells and their unmyelinated axons. *PloS One.* 2014;9:e84507.
199. Wen D, Song W, Liu S, Tan X, Liu F. Upregulated expression of N-methyl-D-aspartate receptor 1 and nitric oxide synthase during form-deprivation myopia in guinea pigs. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8:3819–26.
200. Fang F, Pan M, Yan T, Tao Y, Wu H, Liu X, et al. The role of cGMP in ocular growth and the development of form-deprivation myopia in guinea pigs. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54:7887–902.
201. Wu J, Liu Q, Yang X, Yang H, Wang X, Zeng J. Changes of nitric oxide synthase and cyclic guanosine mono-phosphate in form deprivation myopia in guinea pigs. *Chin Med J (Engl).* 2007;120:2238–44.
202. Nakazawa T, Endo S, Shimura M, Kondo M, Ueno S, Tamai M. Retinal G-substrate, potential downstream component of NO/cGMP/PKG pathway, is located in subtype of retinal ganglion cells and amacrine cells with protein phosphatases. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005;135:58–68.
203. Blom J, Giove T, Deshpande M, Eldred WD. Characterization of nitric oxide signaling pathways in the mouse retina. *J Comp Neurol.* 2012;520:4204–17.
204. Kopan R. Notch signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4.
205. Riesenberger AN, Liu Z, Kopan R, Brown NL. Rbpj cell autonomous regulation of retinal ganglion cell and cone photoreceptor fates in the mouse retina. *J Neurosci.* 2009;29:12865–77.
206. Mantelli F, Schaffer L, Dana R, Head SR, Argüeso P. Glycogene expression in conjunctiva of patients with dry eye: downregulation of Notch signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50:2666–72.
207. Maurer KA, Riesenberger AN, Brown NL. Notch signaling differentially regulates Atoh7 and Neurog2 in the distal mouse retina. *Development.* 2014;141:3243–54.

208. Mills EA, Goldman D. The Regulation of Notch Signaling in Retinal Development and Regeneration. *Curr Pathobiol Rep*. 2017;5:323–31.
209. Xiong L, Woodward AM, Argüeso P. Notch signaling modulates MUC16 biosynthesis in an in vitro model of human corneal and conjunctival epithelial cell differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52:5641–6.
210. Li M, Yuan Y, Chen Q, Me R, Gu Q, Yu Y, et al. Expression of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway and Its Regulatory Role in Type I Collagen with TGF- $\beta$ 1 in Scleral Fibroblasts from an Experimentally Induced Myopia Guinea Pig Model. *J Ophthalmol*. 2016;2016:5126560.
211. Ma M, Zhang Z, Du E, Zheng W, Gu Q, Xu X, et al. Wnt signaling in form deprivation myopia of the mice retina. *PloS One*. 2014;9:e91086.
212. Leemput J, Masson C, Bigot K, Errachid A, Dansault A, Provost A, et al. ATM localization and gene expression in the adult mouse eye. *Mol Vis*. 2009;15:393–416.
213. Bhatia V, Valdés-Sánchez L, Rodríguez-Martínez D, Bhattacharya SS. Formation of 53BP1 foci and ATM activation under oxidative stress is facilitated by RNA:DNA hybrids and loss of ATM-53BP1 expression promotes photoreceptor cell survival in mice. *F1000Res*. 2018;7:1233.
214. Fedejko - Kap B, Mazerska Z. UDP-glukuronylotransferazy - białka siateczki śródplazmatycznej. *Struktura i mechanizm działania. Postępy Biochemii*. 2011;57:41-8.
215. Siu TL, Morley JW, Coroneo MT. Toxicology of the retina: advances in understanding the defence mechanisms and pathogenesis of drug- and light-induced retinopathy. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2008;36:176–85.
216. Watkins JB, Wirthwein DP, Sanders RA. Comparative study of phase II biotransformation in rabbit ocular tissues. *Drug Metab Dispos*. 1991;19:708–13.
217. Al-Ghananeem AM, Crooks PA. Phase I and phase II ocular metabolic activities and the role of metabolism in ophthalmic prodrug and codrug design and delivery. *Molecules*. 2007;12:373–88.
218. Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Lett*. 2005;227:115–24.
219. Nuzzi R, Scalabrin S, Becco A, Panzica G. Gonadal Hormones and Retinal Disorders: A Review. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9:66.
220. Nuzzi R, Scalabrin S, Becco A, Panzica G. Sex Hormones and Optic Nerve Disorders: A Review. *Front Neurosci*. 2019;13:57.
221. Gong J-F, Xie H-L, Mao X-J, Zhu X-B, Xie Z-K, Yang H-H, et al. Relevant factors of estrogen changes of myopia in adolescent females. *Chin Med J (Engl)*. 2015;128:659–63.

222. Kobayashi K, Mandai M, Suzuma I, Kobayashi H, Okinami S. Expression of estrogen receptor in the choroidal neovascular membranes in highly myopic eyes. *Retina*. 2002;22:418–22.
223. Chen ZT-Y, Wang I-J, Liao Y-T, Shih Y-F, Lin LL-K. Polymorphisms in steroidogenesis genes, sex steroid levels, and high myopia in the Taiwanese population. *Mol Vis*. 2011;17:2297–310.
224. Sommer A, World Health Organization. Vitamin A deficiency and its consequences□: a field guide to detection and control / Alfred Sommer, 3rd ed. World Health Organization; 1995.
225. Rojek A, Niedziela M. [Insulin receptor defect as a cause of Rabson-Mendenhall syndrome and other rare genetic insulin resistance syndromes]. *Pediatr Endocrinol Diabetes Metab*. 2010;16:205–12.
226. Penha AM, Burkhardt E, Schaeffel F, Feldkaemper MP. Effects of intravitreal insulin and insulin signaling cascade inhibitors on emmetropization in the chick. *Mol Vis*. 2012;18:2608–22.
227. Wang X, Fan J, Zhang M, Sun Z, Xu G. Gene expression changes under cyclic mechanical stretching in rat retinal glial (Müller) cells. *PloS One*. 2013;8:e63467.
228. Wang H, Zhuang K, Gao L, Zhang L, Yang H. Increased expression of CCN2 in the red flashing light-induced myopia in guinea pigs. *BioMed Res Int*. 2013;2013:761823.
229. Liu X, Wang P, Qu C, Zheng H, Gong B, Ma S, et al. Genetic association study between INSULIN pathway related genes and high myopia in a Han Chinese population. *Mol Biol Rep*. 2015;42:303–10.
230. Jiang Y, Zhang Q, Steinle JJ. Intravitreal injection of IGFBP-3 restores normal insulin signaling in diabetic rat retina. *PloS One*. 2014;9:e93788.
231. Burren CP, Berka JL, Edmondson SR, Werther GA, Batch JA. Localization of mRNAs for insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-I receptor, and IGF binding proteins in rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:1459–68.
232. Arnold DR, Moshayedi P, Schoen TJ, Jones BE, Chader GJ, Waldbillig RJ. Distribution of IGF-I and -II, IGF binding proteins (IGFBPs) and IGFBP mRNA in ocular fluids and tissues: potential sites of synthesis of IGFBPs in aqueous and vitreous. *Exp Eye Res*. 1993;56:555–65.
233. Zhuang W, Yang P, Li Z, Sheng X, Zhao J, Li S, et al. Association of insulin-like growth factor-1 polymorphisms with high myopia in the Chinese population. *Mol Vis*. 2012;18:634–44.
234. Zhang X, Zhou X, Qu X. The association between IGF-1 polymorphisms and high myopia. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8:10158–67.

235. Miyake M, Yamashiro K, Nakanishi H, Nakata I, Akagi-Kurashige Y, Tsujikawa A, et al. Insulin-like growth factor 1 is not associated with high myopia in a large Japanese cohort. *Mol Vis*. 2013;19:1074–81.
236. Liu Y-X, Sun Y. MMP-2 participates in the sclera of guinea pig with form-deprivation myopia via IGF-1/STAT3 pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22:2541–8.
237. Tang R, Tan J, Deng Z, Zhao S, Miao Y, Zhang W. Insulin-like growth factor-2 antisense oligonucleotides inhibits myopia by expression blocking of retinal insulin-like growth factor-2 in guinea pig. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2012;40:503–11.
238. Frystyk J, Bek T, Flyvbjerg A, Skjaerbaek C, Ørskov H. The relationship between the circulating IGF system and the presence of retinopathy in Type 1 diabetic patients. *Diabet Med J*. 2003;20:269–76.
239. Zhang Q, Jiang Y, Miller MJ, Peng B, Liu L, Soderland C, et al. IGFBP-3 and TNF- $\alpha$  regulate retinal endothelial cell apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54:5376–84.
240. Kowluru RA, Mishra M. Epigenetic regulation of redox signaling in diabetic retinopathy: Role of Nrf2. *Free Radic Biol Med*. 2017;103:155–64.
241. Xu Z, Wei Y, Gong J, Cho H, Park JK, Sung E-R, et al. NRF2 plays a protective role in diabetic retinopathy in mice. *Diabetologia*. 2014;57:204–13.
242. Nakagami Y. Nrf2 Is an Attractive Therapeutic Target for Retinal Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:7469326.
243. Bellezza I. Oxidative Stress in Age-Related Macular Degeneration: Nrf2 as Therapeutic Target. *Front Pharmacol*. 2018;9:1280.
244. Francisco B-M, Salvador M, Amparo N. Oxidative stress in myopia. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:750637.
245. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003;33 Suppl:245–54.
246. Hewitt AW, Wang JJ, Liang H, Craig JE. Epigenetic effects on eye diseases. *Expert Rev Ophthalmol*. 2012;7:127–34.
247. MacArthur DG, Manolio TA, Dimmock DP, Rehm HL, Shendure J, Abecasis GR, et al. Guidelines for investigating causality of sequence variants in human disease. *Nature*. 2014;508:469–76.

## 12. SPIS RYCIN

Rycina 1. Schemat tworzenia się obrazu oddalonych obiektów w oku prawidłowym (A) i w oku z krótkowzrocznością (B).....	s. 10
Rycina 2. Rodowody rodzin HM-14, HM-33, HM-76, HM-77, HM-78, HM-80 i HM-81 zakwalifikowanych do analizy ES. ...	s. 24
Rycina 3. Rodowody pozostałych rodzin, których członkowie zostali poddani analizie fenotypowej i genotypowej. ....	s. 26
Rycina 4. Etapy postępowania eksperymentalnego podczas analizy całogenomowej metylacji DNA. ....	s. 37
Rycina 5. Wykresy zależności między wielkością wady sferycznej a długością osiową gałki ocznej w grupach pacjentów z HM (A), członków rodzin bez HM (B) i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (C). ....	s. 65
Rycina 6. Wykresy zależności między wielkością wady sferycznej a ciśnieniem wewnątrzgałkowym w grupach pacjentów z HM (A), członków rodzin bez HM (B) i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (C). ....	s. 66
Rycina 7. Wykresy zależności między wielkością wady sferycznej a promieniem krzywizny rogówki w grupach pacjentów z HM (A), członków rodzin bez HM (B) i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (C). ....	s. 67
Rycina 8. Wykresy zależności między wielkością wady sferycznej a mocą łamiącą rogówki w grupach pacjentów z HM (A), członków rodzin bez HM (B) i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby (C). ....	s. 68
Rycina 9. Wykresy ilustrujące korelacje pomiędzy wiekiem a poszczególnymi parametrami dla obu oczu łącznie bez podziału badanych na grupy. ....	s. 72
Rycina 10. Rodowód rodziny HM-78 i wynik analizy segregacji wariantów w genach <i>FLRT3</i> (c.1642G>C) i <i>SLC35E2B</i> (c.938C>T). ....	s. 75
Rycina 11. Rodowód rodziny HM-14 i wynik analizy segregacji wariantu w genie <i>SNTG2</i> (c.883G>C). ....	s. 82
Rycina 12. Rodowód rodziny HM-77 i wynik analizy segregacji wariantu w genie <i>ABCC6</i> (c.3704G>A). ....	s. 84

### 13. SPIS TABEL

Tabela 1. Typy klasyfikacji krótkowzroczności .....	11
Tabela 2. <i>Loci</i> krótkowzroczności i wysokiej krótkowzroczności (pogrubione) ujęte w bazie Online Mendelian Inheritance in Man.....	14
Tabela 3. Geny kandydaci powiązane z wysoką krótkowzrocznością, ze wskazaniem kodowanych białek, lokalizacji chromosomowej oraz odniesień literaturowych .....	15
Tabela 4. Polimorfizmy pojedynczego nukleotydu powiązane z wartościami długości osiowej gałki ocznej w analizach GWAS i genotypowaniach .....	16
Tabela 5. Warianty sekwencji powiązane z wartościami ciśnienia wewnątrzgałkowego, rozpoznane w analizach GWAS lub mikromacierzach eksonowych .....	17
Tabela 6. Warianty sekwencji powiązane z wartościami krzywizny rogówki, rozpoznane w analizach GWAS .....	17
Tabela 7. Zestawienie odczynników stosowanych w analizach laboratoryjnych prowadzonych w ramach realizacji pracy doktorskiej.....	27
Tabela 8. Zestawienie ważniejszego sprzętu laboratoryjnego i oprogramowania.....	28
Tabela 9. Członkowie polskich rodzin, którzy zostali zakwalifikowani do badania sekwencjonowaniem eksomowym .....	32
Tabela 10. Wybrane do analiz polimorfizmy pojedynczego nukleotydu powiązane z wartościami długości osiowej gałki ocznej, ciśnienia wewnątrzgałkowego i krzywizną rogówki .....	35
Tabela 11. Podział badanych osób na grupy z uwzględnieniem płci .....	39
Tabela 12. Struktura wieku badanych osób .....	40
Tabela 13. Współistniejące lub przebyte choroby i operacje narządu wzroku oraz choroby ogólne rozpoznane w grupie pacjentów z wysoką krótkowzrocznością .....	41
Tabela 14. Współistniejące lub przebyte choroby narządu wzroku oraz choroby ogólne w grupie członków rodzin bez wysokiej krótkowzroczności .....	42
Tabela 15. Współistniejące lub przebyte choroby narządu wzroku oraz choroby ogólne u członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby .....	43
Tabela 16. Charakterystyka przedniego odcinka oka u członków polskich rodzin z podziałem na badane grupy .....	43
Tabela 17. Charakterystyka dna oka u członków polskich rodzin z podziałem na badane grupy .....	44
Tabela 18. Informacje dodatkowe - ustawienie oczu, zaburzenie widzenia barw.....	45



Tabela 19. Dane kliniczne członków rodziny HM-14.....	46
Tabela 20. Dane kliniczne członków rodziny HM-32.....	47
Tabela 21. Dane kliniczne członków rodziny HM-33.....	49
Tabela 22. Dane kliniczne członków rodziny HM-76.....	50
Tabela 23. Dane kliniczne członków rodziny HM-77.....	51
Tabela 24. Dane kliniczne członków rodziny HM-78.....	52
Tabela 25. Dane kliniczne członków rodziny HM-80.....	53
Tabela 26. Dane kliniczne członków rodziny HM-81.....	54
Tabela 27. Dane kliniczne polskich dzieci z wysoką krótkowzrocznością zakwalifikowanych do analizy całogenomowej metylacji.....	55
Tabela 28. Wyniki statystyki opisowej dla ostrości wzroku do dali z korekcją członków polskich rodzin.....	56
Tabela 29. Wyniki statystyki opisowej dla wartości wady sferycznej członków polskich rodzin.....	57
Tabela 30. Wyniki statystyki opisowej dla wartości ekwiwalentu sferycznego członków polskich rodzin.....	57
Tabela 31. Wyniki statystyki opisowej dla wartości długości osiowej gałki ocznej członków polskich rodzin.....	58
Tabela 32. Wyniki statystyki opisowej dla ciśnienia wewnątrzgałkowego członków polskich rodzin.....	58
Tabela 33. Wyniki statystyki opisowej dla promienia krzywizny rogówki członków polskich rodzin.....	59
Tabela 34. Wyniki statystyki opisowej dla mocy łamiącej rogówki członków polskich rodzin.....	59
Tabela 35. Podsumowanie różnic pomiędzy grupami pacjentów z HM, członków rodzin bez HM i członków rodzin o nieoznaczonym statusie choroby pod względem WS, SE, AL, IOP, CCR i CP.....	63
Tabela 36. Wyniki korelacji pomiędzy wadą sferyczną, ekwiwalentem sferycznym, długością osiową gałki ocznej, ciśnieniem wewnątrzgałkowym, promieniem krzywizny rogówki i mocą łamiącą rogówki.....	64
Tabela 37. Korelacje pomiędzy parametrami okulistycznymi bez podziału pacjentów na grupy.....	69
Tabela 38. Zależności wady sferycznej, ekwiwalentu sferycznego, długości osiowej gałki ocznej, ciśnienia wewnątrzgałkowego, promienia krzywizny rogówki, mocy	

łamiącej rogówki z wiekiem .....	70
Tabela 39. Warianty wybrane do analizy segregacji w rodzinie HM-78 i ich możliwy wpływ na strukturę i funkcje białek .....	74
Tabela 40. Warianty sekwencji DNA wybrane po analizie ES do weryfikacji i analiz segregacji w rodzinach HM-33 i HM-81 .....	76
Tabela 41. Wyniki analizy segregacji w rodzinie HM-33 .....	78
Tabela 42. Wyniki analizy segregacji w rodzinie HM-81 .....	79
Tabela 43. Warianty sekwencji wybrane z nowej analizy bioinformatycznej odczytów sekwencjonowania eksomowego do weryfikacji i analizy segregacji w rodzinach HM-14, HM-33, HM-76, HM-77, HM-78, HM-80 i HM-81 .....	81
Tabela 44. Wyniki sekwencjonowań dla członków rodziny HM-33 .....	82
Tabela 45. Wyniki sekwencjonowań dla członków rodziny HM-76 .....	83
Tabela 46. Wyniki sekwencjonowań dla członków rodziny HM-77 .....	83
Tabela 47. Wyniki sekwencjonowań dla członków rodziny HM-78 .....	85
Tabela 48. Wyniki sekwencjonowań dla członków rodziny HM-80 .....	85
Tabela 49. Wyniki sekwencjonowań dla członków rodziny HM-81 .....	86
Tabela 50. Dinukleotydy CpG z najwyższą różnicą w poziomie hipermetylacji (min. 20% różnicy) u dzieci z HM w porównaniu do kontroli .....	89
Tabela 51. Dinukleotydy CpG, których hipermetylacja może wpływać na wyciszenie genów u dzieci z HM .....	91
Tabela 52. Wzbogacone ścieżki sygnałowe/procesy biochemiczne związane z krótkowzrocznością i/lub okiem, będące wynikiem analizy nadreprezentacji hipermetylowanych genów w ścieżkach molekularnych w bazie danych ConsensusPathDB-human server .....	92
Tabela 53. Dinukleotydy CpG z najwyższą różnicą w poziomie hipometylacji (min. 20% różnicy) u dzieci z HM w odniesieniu do kontroli .....	94
Tabela 54. Hipometylowane dinukleotydy CpG potencjalnie wpływające na nadekspresję genów u dzieci z HM .....	97
Tabela 55. Wzbogacone ścieżki sygnałowe/procesy biochemiczne związane z krótkowzrocznością i/lub okiem otrzymane w analizie nadreprezentacji hipometylowanych genów w ścieżkach molekularnych w bazie danych ConsensusPathDB-human server (p = 0,01 przy udziale przynajmniej pięciu genów z zadanej w analizie listy) .....	98

## 14. ZAŁĄCZNIKI

**Załącznik 1.** Startery stosowane w reakcjach PCR i w sekwencjonowaniu metodą Sangera, podczas weryfikacji wyników sekwencjonowania eksomowego

Rodzina	Gen	Lokalizacja	Wariant sekwencji	Sekwencje starterów
HM-14	<i>SNTG2</i>	2p25.3	Ekson 11 c.883G>C p.D295H	AGAGCGTGGCTGATGACTTC CAAAGCCCTCCTGAGAATGA
	<i>ABLIM2</i>	4p16.1	Ekson 19 c.1682G>A p.R561H	CAGGTGCAGACGCAAGTATG GGGAACATCACCACATCGTT
	<i>ANAPC1</i>	2q13	Ekson 8 c.794T>G p.V265G	TTTGTGCTCTCTTTGGCTTG GAACGTCCTGACCTCAAGTG
	<i>ANKMY2</i>	7p21.1	Ekson 3 c.203A>T p.H68L	GGAAGATCAAAGTGTGGAAGCA GCTCTGTCATGGCAACTGTT
	<i>CPT1B</i>	22q13.33	Ekson 7 c.754G>A p.V252M	CCCAGGCTGCAGAAATACC CGGTCTCCACTCTCCTCATC
	<i>FAM160A1</i>	4q31.3	Ekson 11 c.2417A>G p.D806G	AGTGTCCCCATCAACAACGG ACCTGTGAATGGGGTGCTTT
	<i>IFIT1B</i>	10q23.31	Ekson 1 c.1153G>A p.G385S	TGACCTGGCTGAAACGTATG AAGGAGGCTGACACTTTCCA
	<i>INA</i>	10q24.33	Ekson 1 c.799G>A p.E267K	ATCGAGAAGGTGCATCAGC ATCTGCCTCTCCAAGGACTC
	<i>KDR</i>	4q11-q12	Ekson 16 c.2312C>T p.T771M	CGGGTGTGTAAGTGTGTCCT ACAGTCCAAGCCCTTTTCT
	<i>LRP1B</i>	2q22.1- q22.2	Ekson 43 c.7035G>A p.M2345I	GCTTGGTATTGCCATGTTTC GGACACAAACACAGAGGATCA
HM-33	<i>PRKAA2</i>	1p31	Ekson 4 c.352C>T p.R118W	CTGCTTAGCGACAAAGACAAAC CCTTTCTGAACAACCCTGGA
	<i>PRPF38B</i>	1p13.3	Ekson 6 c.1322G>A p.S441N	AGGCATAGAAGTCGCAGTGC ACTTTGGCTCCTTCGACGAT
	<i>RALGAPB</i>	20q11.23	Ekson 9 c.1258T>C p.S420P	CCGGGCTGTTACTGTGAATAA AGTCATGCTGCTGTCTCTGTTT
	<i>SLC28A1</i>	15q25.3	Ekson 12 c.1013T>C p.V338A	GGCAATGCTGAGGTTTCCAGA AAGATCTGAGGGCTGCTCTG
	<i>ST14</i>	11q24.3	Ekson 5 c.557G>A	TGGGGTGGAAAGAGGGATGA

Rodzina	Gen	Lokalizacja	Wariant sekwencji	Sekwencje starterów
			p.R186H	GCGGGCACGATACTTACTGT
	<i>WDR36</i>	5q22.1	Ekson 1 c.279G>T p.K93N	GTGAGCTCTGGAGGGAGA AGGACTGCAAGTGCCAAATC
	<i>ZC3H13</i>	13q14.13	Ekson 9 c.1049G>T p.R350L	CCTTTGGCTAGAAATGAAGCTC ATTGGAGAGCGATGTCTTGG
	<i>ZNF446</i>	19q13.43	Ekson2 c.221T>G p.F74C	TAGGCCCATCTTGACGATTC AACAGTTGCCCAGGGTCAT
HM-76	<i>MACF1</i>	1p32-p31	Ekson 63 c.11383A>G p.K3795E	TGGCAGTGGGAACCTGTAAT CAATGGCTGGAGAGGGTAAC
	<i>ABCC6</i>	16p13.1	Ekson 26 c.3704G>A p.R1235Q	GCCGTCAGAATGGAATCAGT GTGACCTGCTTTCCTCAAGC
HM-77	<i>PANX1</i>	11q21	Ekson 4 c.928G>A p.E310K	GGGATCCTGAGAAACGACAG AAACCCTACCTTGGAGCTCTG
	<i>PRDM1</i>	6q21	Ekson 4 c.562A>G p.K188E	GGGAGCTTTGGGTCTGACTT CCTTGCATACGCAGCATGT
	<i>FLRT3</i>	20p12.1	Ekson 3 c.1642G>C p.V548L	CCCTCAATCGAGAGCAAGAG TGCCAGCTTCTGCATAGTCA
HM-78	<i>MYO7A</i>	11q13.5	Ekson 7 c.725T>G p.V242G	ACGGAGAGCACAAAGCTGAT GGAAGTAGCCTGGGATGATG
	<i>SLC35E2B</i>	1p36.33	Ekson 8 c.938C>T p.T313M	TTTTTCAGGGCTGTCCTCAGT CTGCATAGCCACACTCATCC
HM-80	<i>ILK</i>	11p15.4	Ekson 3 c.157T>A p.L53M	AGAAACCAGGGGAAGAGCAC CCCTCATGGCATGTATGTGA
	<i>LAMB2</i>	3p21	Ekson 14 c.1750C>A p.R584S	TGTGGGTGGACACGTCTATG AGAGGTTTCAGCCCCAGATTAG
	<i>ABCA1</i>	9q31.1	Ekson 43 c.5773C>T p.R1925W	AACGCAGACCAAGGCTCTT GGTCCCTCTCTTCTCGATGA
HM-81	<i>ATAT1</i>	6p21.33	Ekson 7 c.566T>G p.F189C	ATGCTGCAGTGAGCTGTGAT CCCCGTGGCATCTAGAGTAA
	<i>CFHR2</i>	1q31.3	Ekson 3 c.430+1G>A	GGACAAACACATCTGGAAGGTG CTGGGAGGTGCCATCATTTA
	<i>CRYGD</i>	2q33.3	Ekson 2 c.181G>T p.G61C	TGTGAGACCTCGCCTTGTC GCTTATGTGGGGAGCAAAC

Rodzina	Gen	Lokalizacja	Wariant sekwencji	Sekwencje starterów
	<i>DUT</i>	15q21.1	Ekson 2 c.298C>T p.P100S	TCCGAGAAGGGCTTCAAAC GCAGTCTTTGCCCAAATCTC
	<i>ELAVL4</i>	1p33	Ekson 2 c.148G>A p.V50I	CCCAGTCTCTTGCTCCATCT CTCCCCAGCAGTACCAATCT
	<i>GRB7</i>	17q12	Ekson 7 c.728G>A p.R243Q	GCGAGAAATGCATGTGGAG GGCTGGTACCCTCAAGACCT
	<i>HSD17B14</i>	19q13.33	Ekson 9 c.700G>A p.E234K	CCAGGTAGAAGTGGGGTTCA GGGCAGAAGGACTCGTCTAA
	<i>IL1RAP</i>	3q28	Ekson 11 c.1607G>C p.G536A	CGCCTCCTGGTTGTTCTAAG GTTGCCTGAGGAAGCAGAATAG
	<i>IL36B</i>	2q14.1	Ekson 5 c.391+2T>C	TTGGGTCTTGCAATGGGTAC CGTGTTGGAGGTGGCTAGTT
	<i>CIAO3</i>	16p13.3	Ekson 10 c.1112G>A;p.R371H	CGTTCTTGTCTTCCCTCTG CAGCCTATGGGAGAGCAGAC
	<i>NEIL2</i>	8p23.1	Ekson 3 c.77G>C p.G26A	GGCCATGCTTGCTCTTAAAG TTCTGGCTGAGACACGTGAG
	<i>PGSI</i>	17q25.3	Ekson 8 c.1513G>A p.V505M	TAGATTGCAGCAGCGTGTG CTCCCCTAGTGCAGAGAAAGAA
	<i>PSAT1</i>	9q21.2	Ekson 4 c.328A>C p.K110Q	GCACTTGGTAGAGCATCACTTG AGCTAGTACAGCCACCCAATCT
	<i>RABEPK</i>	9q33.3	Ekson 4 c.256C>T p.R86W	GGCTACCTTCAACCCAATCA TGGCTACTTACCAGGATTCAGG
	<i>SEMA3C</i>	7q21.11	Ekson 9 c.908A>G p.D303G	GACAACCTGATGTGCAGAAGTGG ACCCCCAAACACACACATTC
	<i>SIPA1L2</i>	1q42.2	Ekson 1 c.205C>T p.P69S	CCAAGGCAGTCACAAGAAGAG GGGGGAATGGACAAAGATG
	<i>SLC6A19</i>	5p15.33	Ekson 11 c.1701+1G>A	CGGGTAGCAGAACGTACAGAA TTTCCCCTACCTCCCAACTC

**Załącznik 2.** Startery do łańcuchowej reakcji polimerazy i sekwencjonowania metodą Sangera zastosowane w analizie SNP powiązanych z długością osiową gałki ocznej, ciśnieniem wewnątrzgałkowym i krzywizną rogówki

Gen	Lokalizacja	SNP	Sekwencja startera
<i>RSP01</i>	1p34.3	rs4074961	GCCTGGCCTCTCGATAAGA CATTCCCGAACTGGATTGAC
5,8 kb powyżej <i>ZC3H11B</i>	1q41	rs994767	TTGCTCCCAAGGTTTCTGTC GTGTCCATGTTGCTGGTGTT
<i>LAMA2</i>	6q22.33	rs12193446	CCCAAGACCCACCAAAGA CTTGAAGGCGTCCTCATCTC
55 kb powyżej <i>GJD2</i>	15q14	rs11073058	GAAAGACCTGGAAAGGCTGA GAGCACCTGACCAAAGCAT
38,6 kb powyżej <i>GJD2</i>	15q14	rs634990	GGAGGCTGCAGAAAGTCTGT GCTCTGGAACTGGATGTGAG
53 kb powyżej <i>GJD2</i>	15q14	rs8032019	TGGCACCAAAGTCTTAGACAA TCAGGATTTGTCAACCAAGTG
43,7 kb powyżej <i>GJD2</i>	15q14	rs560766	CTGGACTTGGATGTGGTGTG GGAGGATGGTGTCTGCAACT
<i>CMSS1</i>	3q12.1	rs9811920	ATTCCTGCACAATCCCTCAG CCTCACTCAACCCTCCAGTTT
<i>ZNRF3</i>	22q12.1	rs12321	CTTCTGTCCCCTGCTCACA AGTGGACCCCTAGGCTCAAT
<i>TMCO1</i>	1q24.1	rs7555523	CTGGCCAGGATGTACTCTGTTT CCTGGTTAAGATCCACTGCCTA
<i>GGA3</i>	17q25.1	rs52809447	GGCCAACAAGTCATCAAGT ATGGGCATCAGGGTTACAAG
<i>PKDREJ</i>	22q13.31	rs7291444	TGAGCAGTGTTCTTGGTCTG CGAAGATGCTGGTCCATTTT
<i>ARHGEF12</i>	11q23.3	rs58073046	AGTACAGTGGCGCAAACACA GCCATTCACACCCACTACAA
2,6 kb poniżej <i>PDGFRA</i>	4q12	rs2114039	GGTGGGAGAAGGAGCAGTTAG GGACCAGGCCACCATATGTA
<i>PDGFRA</i>	4q12	rs6554163	CACCTGCCTGAGAGTCAACA CAAGCCATCAGGAAGGAAGA

**Załącznik 3.** Wyniki analizy wariantów c.1642G>C w genie *FLRT3*, c.938C>T w genie *SLC35E2B* i c.3704G>A w genie *ABCC6* w pozostałych 35 rodzinach polskich

Numer pacjenta	Fenotyp	<i>FLRT3</i> c.1642G>C	<i>SLC35E2B</i> c.938C>T	<i>ABCC6</i> c.3704G>A
HM-31-09	HM	GG	CC	GG
HM-31-19	HM	GG	CC	GG
HM-02-07	HM	GG	CC	GG
HM-01-10	HM	GG	CC	GG
HM-02-14	HM	GG	CC	GG
HM-01-07	HM	GG	CC	GG
HM-03-07	HM	GG	CC	GG
HM-06-06	HM	GG	CC	GG
HM-06-11	HM	GG	CC	GG
HM-08-15	HM	GG	CC	GG
HM-08-07	HM	GG	CC	GG
HM-10-07	HM	GG	CC	GG
HM-03-11	HM	GG	CC	GG
HM-05-14	HM	GG	CC	GG
HM-13-03	HM	GG	CC	GG
HM-13-10	HM	GG	CC	GG
HM-16-10	HM	GG	CC	GG
HM-16-16	HM	GG	CC	GG
HM-09-09	HM	GG	CC	GG
HM-10-12	HM	GG	CC	GG
HM-11-04	HM	GG	CC	GG
HM-11-01	HM	GG	CC	GG
HM-12-03	HM	GG	CC	GG
HM-12-11	HM	GG	CC	GG
HM-09-11	HM	GG	CC	GG
HM-32-09	HM	GG	CC	GG
HM-30-03	HM	GG	CC	GG
HM-34-04	HM	GG	CC	GG
HM-30-05	HM	GG	CC	GG
HM-32-26	HM	GG	CC	GG
HM-34-05	HM	GG	CC	GG
HM-05-11	HM	GG	CC	GG
HM-21-07	HM	GG	CC	GG
HM-21-02	HM	GG	CC	GG
HM-23-03	HM	GG	CC	GG
HM-23-07	HM	GG	CC	GG
HM-24-04	HM	GG	CC	GG
HM-24-08	HM	GG	CC	GG
HM-26-11	HM	GG	CC	GG
HM-26-15	HM	GG	CC	GG
HM-37-11	HM	GG	CC	GG

Numer pacjenta	Fenotyp	<i>FLRT3</i> c.1642G>C	<i>SLC35E2B</i> c.938C>T	<i>ABCC6</i> c.3704G>A
HM-39-11	HM	GG	CC	GG
HM-37-06	HM	GG	CC	GG
HM-70-04	HM	GG	CC	GG
HM-70-08	HM	GG	CC	GG
HM-71-08	HM	GG	CC	GG
HM-72-09	HM	GG	CC	GG
HM-72-20	HM	GG	CC	GG
HM-73-05	HM	GG	CC	GG
HM-73-01	HM	GG	CC	GG
HM-74-04	HM	GG	CC	GG
HM-74-06	HM	GG	CC	GG
HM-71-12	HM	GG	CC	GG
HM-75-01	HM	GG	CC	GG
HM-75-13	HM	GG	CC	GG
HM-43-08	HM	GT	CC	GG
HM-43-13	HM	GG	CC	GG
HM-39-07	HM	GG	CC	GG
HM-44-09	HM	GG	CC	GG
HM-44-05	HM	GG	CC	GG
HM-45-14	HM	GG	CC	GG
HM-46-05	HM	GG	CC	GG
HM-45-16	HM	GG	CC	GG
HM-46-08	HM	GG	CC	GG
HM-48-09	HM	GG	CC	GG
HM-48-05	HM	GG	CC	GG
HM-49-07	HM	GG	CC	GG
HM-49-04	HM	GG	CC	GG
HM-50-16	HM	GG	CC	GG
HM-50-07	HM	GG	CC	GG
HM-51-15	HM	GG	CC	GG
HM-51-23	HM	GG	CC	GG



**Załącznik 4A.** Wyniki analizy sekwencji obejmujących polimorfizmy pojedynczych nukleotydów powiązanych z długością osiową gałki ocznej w rodzinach HM-32, HM-76, HM- 78 i HM-80. Sprawdzano także warianty występujące w sąsiedztwie analizowanych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów

Rodzina	Numer pacjenta	Fenotyp	<i>LAMA2</i>	<i>ZC3H11B</i>						<i>RSPO1</i>	<i>ZNRF3</i>	<i>CMSS1</i>
			rs12193446 A>G	rs994767 T>C	rs368636163 C>T	rs182573424 A>G	g.219775277 T>C	g.219775164 A>G	rs1393691 C>A	rs4074961 G>A	rs12321 G>C	rs9811920 G>A
HM-32	HM-32-26	HM	AA	TC	CT	AG	TC	AG	CA	GA	CC	GG
	HM-32-31	HM	AA	TC	CT	AG	TC	AG	CC	GG	CC	GG
	HM-32-19	HM	AA	TC	CT	AA	TC	AG	CA	GG	GC	GG
	HM-32-20	HM	AG	TC	CT	AG	TC	AG	CA	GG	GC	GG
	HM-32-56	N	AA	CC	CT	AA	TC	AG	CA	GG	GG	GG
	HM-32-14	N	AA	CC	CT	AG	TC	AG	CA	GA	GC	GG
	HM-32-12	N	AA	TC	CT	AA	TC	AG	CC	GA	GC	GG
	HM-32-06	N	AA	TC	CT	AA	TC	AG	CA	GA	GC	GG
HM-80	HM-80-06	N	AA	CC	CT	AG	TC	AG	CA	AA	GG	GG
	HM-80-09	HM	AA	TC	CT	AA	TC	AG	CA	GA	GC	GA
	HM-80-04	HM	AA	CC	CT	AA	TC	AG	CA	GA	CC	GG
	HM-80-10	HM	AA	CC	CT	AA	TC	AG	CA	GA	GC	GG
	HM-80-08	N	AA	CC	CT	AA	TC	AG	CA	GG	GC	GG
	HM-80-05	HM	AA	CC	CT	AG	TC	AG	CA	GG	GC	GA
	HM-80-12	N	AA	TC	CT	AA	TC	AG	CA	GA	CC	GA
	HM-80-11	N	AA	CC	CT	AA	TC	AG	CA	AA	GG	GG
HM-78	HM-78-11	HM	-	TC	CT	AA	TC	AG	CA	GG	GC	GG
	HM-78-06	N	-	TC	CT	AA	TC	AG	CC	GG	GC	GG
	HM-78-09	N	-	CC	CT	AA	TC	AG	CA	GG	GC	GG
	HM-78-10	NA	-	TC	CT	AA	TC	AG	CA	GG	GC	GG
	HM-78-12	HM	-	TC	CT	AA	TC	AG	CA	GG	GC	GG

Rodzina	Numer pacjenta	Fenotyp	<i>LAMA2</i>	<i>ZC3H11B</i>						<i>RSPO1</i>	<i>ZNRF3</i>	<i>CMSS1</i>
			rs12193446 A>G	rs994767 T>C	rs368636163 C>T	rs182573424 A>G	g.219775277 T>C	g.219775164 A>G	rs1393691 C>A	rs4074961 G>A	rs12321 G>C	rs9811920 G>A
	HM-78-07	HM	-	TC	CT	AA	TC	AG	CA	GG	GC	GG
	HM-78-08	HM	-	TC	CT	AA	TC	AG	CA	GG	GC	GG
HM-76	HM-76-11	HM	-	TC	CT	AA	TC	AG	CA	AA	GG	GG
	HM-76-13	HM	-	TC	CT	AA	TC	AG	CA	GG	GC	GG
	HM-76-08	N	-	CC	CT	AA	TC	AG	CA	GG	GC	GG
	HM-76-10	N	-	TC	CT	AA	TC	AG	CC	GG	GG	GG
	HM-76-09	N	-	CC	CT	AA	TC	AG	CA	GG	CC	GG
	HM-76-03	HM	-	CC	CT	AA	TC	AG	CA	GA	GC	GG
	HM-76-12	HM	-	TC	CT	AA	TC	AG	CA	AA	GG	GG
	HM-76-04	N	-	TC	CT	AA	TC	AG	CA	GG	CC	GG

HM – wysoka krótkowzroczność, N – brak wysokiej krótkowzroczności, NA – nieoznaczony status choroby

**Załącznik 4B.** Wyniki sekwencjonowań sekwencji obejmujących polimorfizmy pojedynczych nukleotydów powiązane z długością osiową gałki ocznej w rodzinach HM-32, HM-76, HM- 78 i HM-80. Sprawdzano także warianty występujące w sąsiedztwie analizowanych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów

Rodzina	Numer pacjenta	Fenotyp	GJD2 I			GJD2 II			GJD2 III		GJD2 IV		
			rs11073060	rs11073059	rs11073058	rs11856445	rs634990	rs524952	rs8032019	rs8031887	rs78481629	rs12442965	rs560766
			G>T	A>T	C>A	C>T	A>G	A>T	T>C	A>G	A>G	C>T	C>T
HM-32	HM-32-26	HM	GG	AA	CC	CC	AG	AT	TT	AA	AA	CC	CC
	HM-32-31	HM	GT	AT	CA	CC	GG	TT	TC	AG	AA	CC	CT
	HM-32-19	HM	GT	AT	CA	CT	GG	TT	TT	AG	AG	CT	CT
	HM-32-20	HM	TT	TT	AA	CT	GG	TT	TC	GG	AG	CT	TT
	HM-32-56	N	GT	AT	CA	CT	AG	AT	TC	AG	AA	CC	CT
	HM-32-14	N	GT	AT	CA	TT	GG	TT	TC	AG	AA	CC	CT
	HM-32-12	N	GT	AT	CA	TT	GG	TT	TC	AG	AA	CC	CT
	HM-32-06	N	GT	AT	CA	CT	GG	TT	TC	AG	AA	CC	CT
HM-80	HM-80-06	N	GT	AT	CA	CC	AG	AT	TT	AG	AG	CT	CT
	HM-80-09	HM	GT	AT	CA	CC	AG	AT	TC	AG	AA	CC	CT
	HM-80-04	HM	GG	AA	CC	CC	AA	AA	TT	AA	AA	CC	CC
	HM-80-10	HM	GG	AA	CC	CC	AA	AA	TT	AA	AA	CC	CC
	HM-80-08	N	TT	TT	AA	CC	GG	TT	CC	GG	AA	CC	TT
	HM-80-05	HM	GT	AT	CA	CC	AG	TT	TT	AG	AG	CT	CT
	HM-80-12	N	GT	AT	CA	CC	AG	TT	TC	AG	AA	CC	CT
	HM-80-11	N	TT	TT	AA	CT	GG	TT	TC	GG	AG	CT	TT
HM-78	HM-78-11	HM	TT	TT	AA	CT	GG	TT	CC	GG	AA	CC	TT
	HM-78-06	N	TT	TT	AA	TT	GG	TT	CC	GG	AA	CC	TT
	HM-78-09	N	GT	AT	CA	CT	AG	AT	TC	AG	AA	CC	CT
	HM-78-10	NA	TT	TT	AA	CT	GG	TT	TC	GG	AG	CT	TT
	HM-78-12	HM	TT	TT	AA	CT	GG	TT	CC	GG	AA	CC	TT

Rodzina	Numer pacjenta	Fenotyp	GJD2 I			GJD2 II			GJD2 III		GJD2 IV		
			rs11073060 G>T	rs11073059 A>T	rs11073058 C>A	rs11856445 C>T	rs634990 A>G	rs524952 A>T	rs8032019 T>C	rs8031887 A>G	rs78481629 A>G	rs12442965 C>T	rs560766 C>T
	HM-78-07	HM	TT	TT	AA	CC	GG	TT	TC	GG	AG	CT	TT
	HM-78-08	HM	GT	AT	CA	CT	AG	AT	TC	AG	AA	CC	CT
HM-76	HM-76-11	HM	TT	TT	AA	CC	GG	TT	CC	GG	AA	CC	TT
	HM-76-13	HM	GT	AT	CA	CC	AG	AT	TC	AG	AA	CC	CT
	HM-76-08	N	TT	TT	AA	CC	GG	TT	CC	GG	AA	CC	TT
	HM-76-10	N	GG	AA	CC	CC	AA	AA	TT	AA	AA	CC	CC
	HM-76-09	N	GT	AT	CA	CC	AG	AT	TC	AG	AA	CC	CT
	HM-76-03	HM	TT	TT	AA	CC	GG	TT	CC	GG	AA	CC	TT
	HM-76-12	HM	TT	TT	AA	CC	GG	TT	CC	GG	AA	CC	TT
	HM-76-04	N	GT	AT	CA	CC	AG	AT	TC	AG	AA	CC	CT

HM – wysoka krótkowzroczność, N – brak wysokiej krótkowzroczności, NA – nieoznaczony status choroby

**Załącznik 5.** Wyniki sekwencjonowań wariantów rs7555523, rs58073046, rs52809447 i rs7291444 powiązanych z ciśnieniem wewnątrzgałkowym w rodzinach HM-32 i HM-80

<b>Rodzina</b>	<b>Numer pacjenta</b>	<b>Fenotyp</b>	<b><i>TMC01</i> rs7555523 G&gt;T</b>	<b><i>ARHGEF12</i> rs58073046 A&gt;G</b>	<b><i>GGA3</i> rs52809447 A&gt;G</b>	<b><i>PKDREJ</i> rs7291444 A&gt;C A&gt;T</b>
HM-32	HM-32-09	HM	TT	AA	AA	AA
	HM-32-46	N	TT	AA	AA	AA
	HM-32-49	N	TT	AA	AA	AA
	HM-32-31	HM	TT	AA	AA	AA
	HM-32-20	HM	TT	AA	AA	AA
	HM-32-04	HM	TT	AA	AA	AA
	HM-32-55	N	TT	AA	AA	AA
	HM-32-56	N	TT	AA	AA	AA
HM-80	HM-80-06	N	TT	AA	AA	AA
	HM-80-09	HM	TT	AA	AA	AA
	HM-80-04	HM	TT	AA	AA	AA
	HM-80-08	N	TT	AA	AA	AA
	HM-80-14	HM	TT	AA	AA	AA
	HM-80-05	HM	TT	AG	AA	AA
	HM-80-12	N	TT	AA	AA	AA
	HM-80-11	N	TT	AG	AA	AA

HM – wysoka krótkowzroczność, N – brak wysokiej krótkowzroczności

**Załącznik 6.** Wyniki sekwencjonowań wariantów rs2114039 i rs6554163 powiązanych z krzywizną rogówki w rodzinach HM-32 i HM-80

<b>Rodzina</b>	<b>Numer pacjenta</b>	<b>Fenotyp</b>	<b><i>PDGFRA</i> rs2114039 T&gt;C</b>	<b><i>PDGFRA</i> rs6554163 T&gt;A</b>
HM-32	HM-32-09	HM	TT	TT
	HM-32-49	N	TT	TT
	HM-32-46	N	TT	TT
	HM-32-26	HM	TT	TT
	HM-32-45	HM	TT	TT
	HM-32-14	N	TT	TT
HM-80	HM-80-09	HM	TT	TT
	HM-80-15	HM	TC	TT
	HM-80-10	HM	TT	TT
	HM-80-07	N	CC	TT
	HM-80-14	HM	TT	TT
	HM-80-11	N	TC	TT

HM – wysoka krótkowzroczność, N – brak wysokiej krótkowzroczności

#### Finansowanie badań:

Część niniejszych badań została zrealizowana z wykorzystaniem środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego na finansowanie prac badawczych lub rozwojowych, mających na celu rozwój młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN. Tytuł projektu: „Weryfikacja wyników sekwencjonowania całego egzomu oraz analiza segregacji wybranych wariantów sekwencji w wysokiej krótkowzroczności w rodzinach polskich”, kierownik projektu: mgr inż. Joanna Świerkowska, nr projektu: 27/GM/2017.

Autorka otrzymała stypendium doktoranckie Środowiskowego Studium Doktoranckiego Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w latach 2014–2020 na realizację badań i przygotowanie rozprawy doktorskiej.