

## Streszczenie

Stożek rogówki (ang. *keratoconus*, KTCN) jest postępującym schorzeniem degeneracyjnym rogówki oka występującym w populacji światowej z częstością 1 na 2000 osób. KTCN charakteryzuje się pogłębiającym się ścięceniem rogówki, w wyniku którego przyjmuje ona stożkowaty kształt, co prowadzi do znacznego upośledzenia wzroku. Pierwsze symptomy choroby mogą pojawić się już w okresie dojrzewania by kolejno ulegać progresji w trzeciej/czwartej dekadzie życia. Choroba częściej występuje u mężczyzn.

KTCN uznawany jest za chorobę wieloczynnikową o niejasnej etiologii, ze złożonym podłożem genetycznym obejmującym liczne zidentyfikowane *loci* chromosomowe, w tym 13q32, 5q31.1-q35.3, 2q13-q14.3, 20p13-p12.2, oraz warianty sekwencji w obrębie genów kandydujących, do których należą m.in. *VSX1*, *DOCK9*, *STK24*, *IPO5* i *TGFBI*. Również czynniki środowiskowe są wskazywane jako warunkujące KTCN. Historycznie KTCN uznany został za chorobę niezapalną, co obecnie jest podważane przez klinicystów i badaczy ze względu na podniesiony poziom ekspresji cytokin i proteaz w płynie łzowym i surowicy pacjentów.

U pacjentów z wczesnym i średniozaawansowanym KTCN, rogówka w lampie szczelinowej może wyglądać prawidłowo. W celu rozpoznania KTCN, u każdego pacjenta, u którego podejrzewa się chorobę należy wykonać kompleksowe badanie okulistyczne obejmujące ocenę nieskorygowanej i skorygowanej ostrości wzroku, badanie odcinka przedniego w lampie szczelinowej, tomografię rogówki (kamera Scheimpfluga) oraz tomografię przedniego odcinka oka (ang. *anterior segment optical coherence tomography*, AS-OCT).

Nieprawidłowości histopatologiczne rogówki pacjentów z rozpoznaniem KTCN obejmują wszystkie warstwy rogówki. Najbardziej charakterystyczną zmianą histologiczną jest ścięcenie istoty właściwej rogówki. Z kolei nabłonek rogówki (ang. *corneal epithelium*, CE), wobec powstającego uwypuklenia istoty właściwej staje się najcieńszy na szczycie stożka i przyjmuje charakterystyczną strukturę obwarzanka (ang. *doughnut pattern*).

W rozprawie doktorskiej postawiono hipotezę, że przebudowa nabłonka rogówki w przebiegu KTCN stanowi istotny element obrazu klinicznego choroby. Charakterystyczne zmiany grubości nabłonka, rozpoznawane jako struktura obwarzanka, nie były wcześniej uwzględnione w badaniach molekularnych. Podjęte dotychczas próby biologicznej interpretacji zintegrowanych wyników badań klinicznych i molekularnych były niedostateczne.

Rozprawa doktorska obejmuje rezultaty badań przedstawione w zbiorze czterech publikacji będących efektem eksperymentalnych badań transkryptomicznych, proteomicznych, kodujących i niekodujących elementów genomu w nabłonku rogówki, badań epidemiologicznych identyfikujących czynniki środowiskowe warunkujące fenotyp KTCN oraz przeglądu literaturowego.

W oparciu o dotychczasowe badania nad stożkiem rogówki, obejmujące głównie wybrane aspekty molekularne i/lub kliniczne, jak również wyniki badań własnych stwierdzono, że jedynie wielopoziomowe analizy molekularne i łączenie aspektów różnych dziedzin nauki dają możliwość pełniejszego zrozumienia aspektów biologicznych w złożonej naturze KTCN.

W przeprowadzonych w ramach pracy badaniach uwzględniono zróżnicowanie cech morfologicznych w rogówce, po raz pierwszy wyznaczając trzy regiony w obrębie nabłonka

rogówki i wprowadzając termin regionu topograficznego. Na podstawie rozpoznanych zmian w grubości CE u pacjentów z KTCN scharakteryzowano trzy regiony topograficzne (centralny, pośredni i obwodowy), w których zidentyfikowano specyficzne zmiany morfologiczne, transkryptomyczne oraz proteomiczne. W wyniku integracji zebranych danych wskazano mechanizm przebudowy nabłonka rogowki, w którym kluczowymi elementami są rozregulowane ścieżki przejścia epitelialno-mezenchymalnego, komunikacji komórka-komórka i interakcji komórka-macierz zewnątrzkomórkowa, odpowiadające za proces gojenia się ran (ang. *wound healing process*), który pośrednio wpływa na powstawanie charakterystycznego fenotypu stożka. Otrzymane wyniki pozwalają wnioskować, że na etapach projektowania i interpretacji biologicznej przeprowadzanych badań molekularnych powinno się uwzględniać występowanie trzech regionów topograficznych rogowki.

Zweryfikowano wcześniejsze przypuszczenia dotyczące przewlekłego mechanicznego urazu rogowki u pacjentów z KTCN. Pocieranie oczu, nieskorelowane z alergią, powoduje uszkodzenie CE i wyzwała stres komórkowy, który poprzez swój wpływ na apoptozę, migrację i adhezję komórkową również kształtuje fenotyp KTCN.

W ramach niniejszej pracy wykorzystano również technikę sekwencjonowania całego genomu (ang. *whole genome sequencing*, WGS), która do tej pory nie była stosowana w badaniach nad KTCN. W genach lub w ich bliskim sąsiedztwie znaleziono liczne warianty sekwencji kodujących i niekodujących, mogące mieć znaczenie w procesach wrodzonej i adaptacyjnej odpowiedzi układu odpornościowego, co wskazuje na bardziej złożone niż wcześniej przewidywano podłoże zapalne w KTCN. Ponadto wskazano 35 *loci* chromosomowych istotnie wzbogaconych w rozpoznane warianty sekwencji kodujących i niekodujących, specyficzne dla KTCN, w tym w 5q, 9q i 16q, poprzednio rozpoznanych jako powiązane etiologicznie z KTCN.

W efekcie przeprowadzonych prac badawczych potwierdzono złożoność podłoża genetycznego/molekularnego KTCN oraz znaczenie nawracającego/przetrwałego stanu zapalnego, mogącego mieć podłoże genetyczne, na obraz kliniczny stożka.