

Stożek rogówki (ang. *keratoconus*, KTCN) to choroba oczu, która charakteryzuje się stopniowym ścięciem rogówki, które prowadzi do zaburzenia jej normalnej krzywizny i utworzenia charakterystycznego stożkowatego kształtu. Może to prowadzić do pogorszenia, a w zaawansowanych przypadkach nawet do utraty wzroku. Szacuje się, że częstość występowania KTCN w populacji ogólnej waha się od 1/2000 do 1/375 osób i różni się u pacjentów z różnych grup etnicznych. KTCN stanowi jedno z głównych wskazań do przeszczepu rogówki w krajach rozwiniętych.

Nieprawidłowości związane z KTCN mogą być obserwowane we wszystkich 5 warstwach rogówki ludzkiej, od najbardziej zewnętrznego (1) nabłonka, z odkładającymi się złogami żelaza, (2) widocznych pęknięć w błonie Bowmana, poprzez (3) zmianę organizacji włókien kolagenowych w obrębie istoty właściwej i pęknięcia w (4) błonie Descemeta, aż po (5) śródbłonek, który może wykazywać wydłużenie i uszkodzenie komórek. Pomimo rozpoznanych zmian morfologicznych rogówki, zmiany molekularne w komórkach specyficzne dla poszczególnych warstw rogówki w KTCN nadal nie zostały wyjaśnione. Ze względu na złożoną budowę rogówki, w którą zaangażowane są różne typy komórek tworzące w warunkach homeostazy unikalne środowisko, umożliwiające prawidłowe widzenie, przyczynę powstawania stożka w KTCN powinno się badać również na poziomie pojedynczych komórek.

W naszych badaniach stawiamy hipotezę, że określone podtypy komórek, a w szczególności ich zmienione dynamika i cykl komórkowy oraz ich wzajemne interakcje w poszczególnych warstwach rogówki, mogą przyczyniać się do powstawania charakterystycznego dla KTCN stożkowatego kształtu. W ramach projektu, po raz pierwszy na świecie zostanie przeprowadzone sekwencjonowanie RNA na poziomie pojedynczej komórki (ang. *single-cell RNA sequencing*, scRNA-seq) obejmujące materiał pochodzący z kolejnych, sąsiadujących krioskrawków rogówek, które zostały uprzednio wykorzystane w analizie transkryptomiki przestrzennej (ST), a następnie przeprowadzona zostanie integracja danych uzyskanych z obu tych podejść. **Zakładamy, że przy użyciu połączonych technik scRNAseq oraz ST, w podejściu określanym przez nas zintegrowaną oceną typu ‘pomost’, zlokalizujemy w tkance pojedyncze komórki o charakterystycznych cechach transkrypcyjnych i rozpoznamy brakujące aspekty mechanistyczne w etiologii KTCN.** Projekt ma na celu porównanie rogówek pozyskanych od pacjentów z KTCN i kontrolnych pod kątem: 1) charakterystycznych podtypów komórek i składu komórkowego przy użyciu scRNA-seq; 2) zmian w dynamice, cyklu komórkowym i wzajemnych interakcji poszczególnych typów/podtypów komórek; oraz 3) określenia udziału podtypów komórek w mechanizmie powstawania KTCN przy użyciu eksperymentalnego modelu krioskrawków ludzkiej rogówki.

Badanie zostanie przeprowadzone na ludzkich rogówkach pobranych od 5 pacjentów z KTCN, którzy przeszli zabieg przeszczepienia pełnej rogówki, oraz 5 rogówkach z banku tkanek, pochodzących od zmarłych dawców stanowiących grupę kontrolną. Kolejno dla każdej rogówki z grupy badanej i kontrolnej przy użyciu kriostatu, uzyskane zostaną krioskrawki, które posłużą do izolacji pojedynczych komórek z wykorzystaniem opracowywanego przez nas eksperymentalnego protokołu. Tak przygotowane próbki, posłużą do przygotowania bibliotek, które następnie będą sekwencjonowane (scRNA-seq) a uzyskane dane transkryptomyczne dla pojedynczych komórek zostaną poddane analizie bioinformatycznej pod kątem charakterystyki specyficznych dla stożka podtypów komórek, składu komórkowego oraz zmian w dynamice, cyklu komórkowym oraz interakcji międzykomórkowych w KTCN. Ponadto zostanie przeprowadzona analiza integracyjna, które obejmie dane transkryptomyczne, genomyczne i epigenomiczne pochodzące z tego samego materiału biologicznego, z naszych wcześniejszych oraz obecnie realizowanych projektów. Uzyskane wyniki będą zweryfikowane z użyciem barwienia immunofluorescencyjnego wybranych genów markerowych, charakterystycznych dla nowo zidentyfikowanych podtypów komórek w KTCN, na rozszerzonym zestawie rogówek (dodatkowych 5 rogówek z KTCN oraz 5 rogówek kontrolnych).

Badanie umożliwi wykorzystanie wielu krioskrawków danej rogówki w podejściu multi-omicznym, które to jest uznawane za najbardziej odpowiednie w przypadku chorób wieloczynnikowych, takich jak KTCN. Maksymalne wykorzystanie materiału zebranego od danego pacjenta do wielu różnych analiz pozwala na uzyskanie kompleksowego obrazu, co umożliwia formułowanie bardziej szczegółowych wniosków na podstawie wygenerowanych danych, prowadząc do głębszego zrozumienia etiologii choroby. Wyniki wygenerowanej po raz pierwszy **zintegrowanej oceny typu ‘pomost’ scRNA-seq-ST**, będą publicznie dostępne w repozytorium, co pozwoli na ponowne ich wykorzystanie w światowych badaniach nad KTCN.