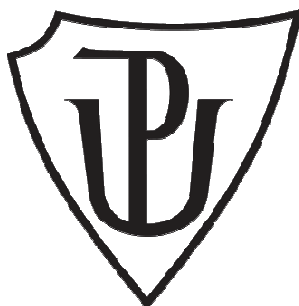


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA OPTIKY



ZMĚNY ENDOTELU ROHOVKY ZPŮSOBENÉ  
VLIVEM EXCIMEROVÉHO LASERU

**Diplomová práce**

**VYPRACOVALA**

Bc. Zdeňka Vaňharová

**VEDOUCÍ PRÁCE**

RNDr. František Pluháček, Ph.D.

**KONZULTANT**

MUDr. Gabriela Pilková

N 5345 Specializace ve zdravotnictví

Optometrie, navazující

Olomouc 2013

## ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: „Změny endotelu rohovky způsobené vlivem excimerového laseru“ vypracovala samostatně pod odborným dohledem vedoucího a konzultanta diplomové práce a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Olomouci, dne 2. 1. 2014

Podpis .....

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji vedoucímu práce RNDr. Františku Pluháčkovi, Ph.D. za všestrannou a vstřícnou péči, podněty a vedení při zpracování diplomové práce. Dále děkuji konzultantce MUDr. Gabriele Pilkové za odborný dohled nad teoretickým obsahem diplomové práce.

## **OBSAH**

1. Úvod.....	6
2. Endotel .....	7
2.1  Rohovka.....	7
2.2  Embryologie endotelu.....	8
2.3  Anatomie, histologie a morfologie endotelu .....	9
3. Fyziologie endotelu.....	11
3.1  Endoteliální iontový transport.....	11
3.2  Hojení endotelových ran.....	12
4. Patologie endotelu.....	13
4.1  Kongenitální onemocnění endotelu.....	13
4.1.1  Zadní keratokonus .....	13
4.1.2  Petersova anomálie.....	14
4.2  Dystrofie endotelu .....	14
4.2.1  Kongenitální hereditární endoteliální dystrofie.....	14
4.2.2  Fuchsova dystrofie rohovky.....	15
4.2.3  Zadní polymorfní dystrofie rohovky .....	16
4.2.4  Iridokorneální endotelový syndrom.....	17
4.3  Degenerace a endoteliopatie .....	17
4.3.1  Hassalova-Henleova tělíska .....	18
4.3.2  Iatrogenní endoteliopatie.....	18
4.3.3  Endoteliopatie indukovaná kontaktními čočkami.....	18
4.3.4  Sekundární endoteliopatie způsobená zánětlivým onemocněním.....	19
4.3.5  Endoteliopatie indukovaná glaukomem .....	19
5. Vyšetřování endotelu .....	20
5.1  Vyšetření na štěrbinové lampě.....	20
5.2  Spekulární mikroskopie .....	22
5.3  Fluorofotometrie .....	23
6. Excimerový laser a základy jeho aplikace .....	24
6.1  LASER.....	24
6.2  Excimerový laser .....	25
6.2.1  Argon - fluoridový laser .....	25
6.3  Aplikace ArF excimerového laseru .....	26

7.	Refrakční zákroky .....	28
7.1	Rohovkové refrakční operace .....	28
7.1.1	Laserové zákroky.....	28
7.1.2	Incizní keratotomie a intrastromální kroužky .....	31
7.2	Nitrooční refrakční operace.....	32
8.	Výzkumná část .....	34
8.1	Cíle výzkumné části.....	34
8.2	Subjekty a metodika.....	34
8.2.1	Postup měření na spekulárním mikroskopu.....	35
8.3	Výsledky.....	37
8.4	Diskuze .....	44
9.	Závěr.....	46
	Seznam použité literatury.....	47

## **1. ÚVOD**

Refrakční laserové operace na rohovce jsou čím dál více oblíbeným řešením očních vad. Tento způsob léčby je trvalým a relativně bezpečným východiskem, ovšem bez možnosti navrácení k původnímu předoperačnímu stavu rohovky.

Při laserovém zákroku je rohovka krátkodobě vystavena vysoké energii laseru a pod tímto vlivem může docházet ke změnám či poškození jejích tkání. V případě stromatu je změna žádoucí a jeho destrukce tvoří základní podstatu rohovkové refrakční chirurgie. Ostatní tkáně však mohou dojít změn a v případě endotelu rohovky, který nemá schopnost regenerace, jsou tyto změny léčitelné jen obtížně.

Tato diplomová práce má za úkol zjistit, jestli dochází k nějakým nežádoucím změnám endotelu po refrakční operaci s pomocí excimerového laseru. Obsahem práce je seznámení s anatómií, fyziologií a patologií endotelu rohovky. Dále je přidán popis vyšetřovacích postupů analýzy endotelu, seznámení s excimerovým laserem a jeho aplikaci v očním lékařství a nástin refrakčních nitroočních i rohovkových zákroků. Posouzením, zda se parametry endotelu vlivem excimerového laseru mění, se zabývá výzkumná část, v níž jsou výsledky měření probandů spekulárním mikroskopem před laserovou operací porovnávány s výsledky parametrů sedm a třicet dní po ní.

## **2. ENDOTEL**

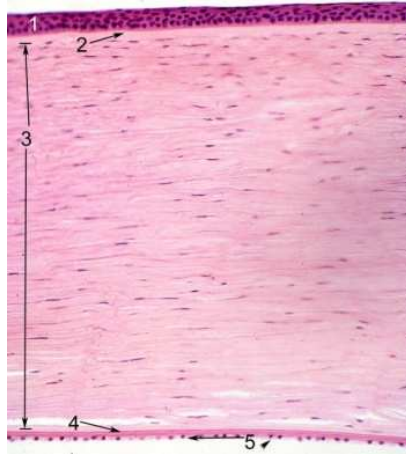
Endotel, lat. *epithelium posterius cornea*, je jednou z vrstev rohovky. Obsahem této kapitoly je stručný popis rohovky, větší důraz je kladen na informace o embryologii, anatomii, histologii a morfologii endotelu rohovky.

### **2.1 Rohovka**

Rohovka, lat. *cornea*, patří k povrchové části oční koule nesoucí označení také *tunica fibrosi oculi*, má přibližně kruhový tvar a tvoří nejdůležitější prvek v optické soustavě oka. Je to homogenní, průhledná a za normálního stavu avaskulární tkáň. Inervuje ji první větev pátého hlavového nervu (*V. nervus trigeminus*) a tato větev se rozděluje na subepiteliální a stromální plexus. Hustá síť nervových zakončení činí z rohovky nejcitlivější tkáň v lidském těle. (1)

Rohovka náleží do bradytrofických tkání, kam spadá též bělim a oční sklivec (lat. *corpus vitreum*). Bradytrofické tkáně mají pomalý metabolismus a z tohoto faktu vyplývá i delší doba hojení. Výživa nemůže probíhat z krevního řečiště přímo, rohovku vyživují především aminokyseliny a glukóza získané difuzí ze slz, z kapilár v limbu rohovky a z komorové vody v případě její vnitřní vrstvy. (2)

Rohovka se sestává z pěti vrstev a její tloušťka je nejmenší v centru (přibližně 550  $\mu\text{m}$ ) a největší v periferii (až 1 mm), kde v místě zvaném limbus přechází v bělimu, lat. *sclera*. První, vnější, vrstva se nazývá epitel, druhá Bowmanova membrána, třetí stroma, čtvrtá Descementova membrána a poslední, vnitřní, vrstva se označuje endotel. (2).



**Obrázek 1: Histologický obraz rohovky (3)**

## 2.2 Embryologie endotelu

Počátek vývoje oka je možné pozorovat již u plodu starého 21 dní. Základ pro buněčnou výstavbu a vývoj oka tvoří buňky ektodermu, mezodermu a entodermu. (4)

Na kraniální části neurálních záhybů embrya se vyvíjí *sulcus opticus*. Postupným růstem překrývá záhyby ektoderm, překrývá *sulcus opticus* a ten zvolna přerůstá do optického váčku. Optický váček se při spojení s povrchovým ektodermem přetváří na čočkovou plakodu a ta se později formuje do očního pohárku. (4) V místě přechodu povrchového a neurálního ektodermu vznikají mezenchymální buňky, které představují základ pro vývoj očních tkání, např. stromatu rohovky, duhovky, skléry, orbity a dalších. Tyto buňky se postupně dělí na zevní a vnitřní vrstvu. Rohovku a skléru tvoří zevní vrstva. (5) Epitel vzniká z povrchového ektodermu, endotel je produktem mezenchymálních buněk. Tento proces probíhá přibližně v 7. týdnu gestačního vývoje plodu. (4)

Endotel získává jednu souvislou vrstvu buněk již v 18. týdnu. Jeho fyziologie a anatomie plní již během prenatálního vývoje důležitou roli při udržování hydratace a tím má vliv i na správný vývoj stromatu rohovky. Ve 4. měsíci produkují endotelové buňky pevné a těsné vazby *zonulae occludentes*, aby mohly čelit obsahu vytvářející se přední komory oka. Sekrečním výtvozem endotelu je zároveň i Descementova membrána, jejíž vývoj končí přibližně v 6. měsíci. Membrána vykazuje velkou aktivitu metabolitů od osmého měsíce vývoje.



V posledních týdnech před porodem, kdy projevuje endotel anatomickou i funkční schopnost, se stává rohovka transparentní. (4)

### 2.3 Anatomie, histologie a morfologie endotelu

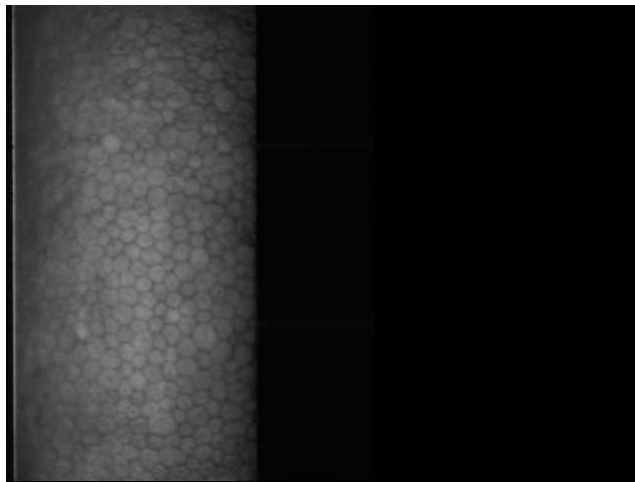
Endotel, lat. *epithelium posterius cornea*, je tkáň tvořená jednou vrstvou z větší části hexagonálních buněk. Celá vrstva endotelu má tloušťku cca 5 $\mu$ m (6)

Každá buňka se skládá z velkého jádra, mitochondrie, Golgiho aparátu a endoplazmatického retikula. Apikálně, povrchově, jsou buňky spojené tzv. *zonulae occludentes* a mezi sebou se spojují interdigitacemi. Interdigitace zaručují díky prstovitým propojením mezi buňkami lepší soudržnost. Apikální spojení tvoří propustnou bariéru pro komorovou vodu. Endotelové buňky mají vysokou metabolicko-sekreční, transportní a syntetizační aktivitu. (7) Buněk je omezené množství bez možnosti obnovy, v dětství to je přibližně 4000 - 5000 buněk/mm<sup>2</sup> u člověka staršího šedesáti let je tento počet snížený na přibližně 2000 buněk/mm<sup>2</sup>. (8) Mezi dvacátým a padesátým rokem věku je u většiny populace hustota buněk endotelu relativně stabilní. (9) Za minimální počet buněk pro zachování rohovkové fyziologie se považuje 400-700 buněk/mm<sup>2</sup>. Při poškození dochází k reparaci postiženého místa tím, že se nezasažené buňky zvětší a posunou tak, aby vyplnily postiženou oblast zadní plochy rohovky. (8) Jakmile klesne počet buněk endotelu pod přibližně 500 buněk /mm<sup>2</sup>, dochází k přerušení správné funkce endotelové pumpy, následkem čehož pak vzniká edém rohovky a nařazení Descementovy membrány. (10)

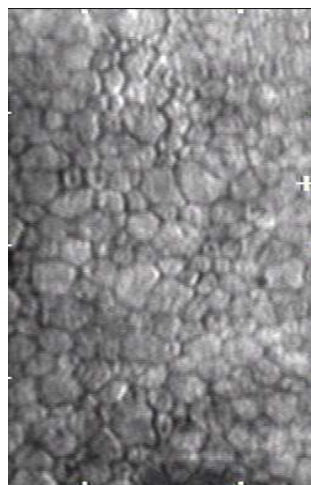
Bazální membránu mezi endotelem a stromatem tvoří Descementova membrána. Skládá se především z kolagenu IV.typu, lamininu a fibronektinu a vzniká jako produkt endotelu. (8) Jeho tloušťka se během života zvětšuje, v mládí má cca 5 $\mu$ m, v dospělosti může být 8 až 10  $\mu$ m. Tato tkáň je rezistentní vůči proteolytickým enzymům a hraje roli při některých patologických onemocněních. (11)

Endotelové buňky mají fyziologicky relativně uniformní velikost a tvar. Stupeň uniformity buňkové velikosti lze měřit. Měřením ploch apikálních

membrán a jejich přepočítáváním se získává tzv. koeficient variace buňkové velikosti (označení CV). Koeficient CV má za normálního stavu rohovky hodnotu přibližně 22 až 31 %. Zvýšené CV poukazuje na nestabilní a stresovanou vrstvu endotelových buněk. Tento stav se nazývá polymegetismus. (9) Jako pleomorfismus se pak v souvislosti s endotelem označuje stav, kdy je zvýšený počet buněk, které mají více nebo méně než 6 stran. Tyto stavy poukazují na poškozenou endotelovou vrstvu a jsou znakem některých onemocnění. Četnost hexagonálního tvaru buněk, nazývaná též hexagonalita, se u zdravého endotelu pohybuje mezi 70 až 80 %. Riziko polymegetismu či pleomorfismu se zvyšuje s věkem, nošením kontaktních čoček, onemocněními nebo chirurgickými zákroky.



**Obrázek 2: Fyzilogický obraz endotelu zachycený endotelovým mikroskopem (10)**



**Obrázek 3: Pleomorfismus endotelových buněk**

### **3. FYZIOLOGIE ENDOTELU**

Endotel hraje nejdůležitější roli při udržování transparentnosti rohovky. Průhlednost rohovky udávají rovnoběžně rozložené dlouhé kolagenní fibrily stromatu se stabilní hydratací a kombinace aktivních a pasivních pochodů, na jejichž základě si rohovka tuto hydrataci udržuje na přibližně 78 %. Pasivní schopnost znamená souhru přirozeného nasávání vody a tím i bobtnání stromatu a nitroočního tlaku. Aktivní funkce tvoří schopnost transportu vody tzv. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATP-ázová pumpa. Při narušení tohoto mechanismu dochází ke snížení hustoty endotelových buněk, zvýšenému průniku komorové vody a dochází k otoku stromatu. (8)

Endotel zachovává transparentnost rohovky na základě svých hlavních funkcí, které můžeme rozdělit na bariérovou a pumpovou. (12) Bariérová funkce endotelu zaručuje částečné prosakování tekutiny z komorové vody, jež je důležité pro doplňování nutričních látek, jako jsou aminokyseliny a glukóza. Rohovková tkáň je avaskulární, tento proces jí tedy pomáhá k získávání výživy. Bariérová funkce navíc regulací přísunu tekutin zabraňuje přirozené schopnosti bobtnavosti stromatu. Hlavní úlohou pumpové funkce je osmotický transport za pomoci aktivního transportu iontů. (9)

#### **3.1 Endoteliální iontový transport**

Endoteliální transport iontů lze rozdělit na několik druhů.

Sodíko-draslíková pumpa na základě aktivity enzymu Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP-áza udržuje normální hladinu hydratace rohovky a probíhá na bazolaterální membráně

Sodíko-vodíková výměna se odehrává též na bazolaterální membráně. Dochází k záměně Na<sup>+</sup> a H<sup>+</sup>, kdy sodík přechází do buňky a vodík do stromatu. Tato výměna acidifikuje extracelulární tekutinu a tím zvyšuje hladinu CO<sub>2</sub>. Oxid uhličitý difunduje do buněk, kde je chemickou reakcí přeměněn na H<sup>+</sup> a bikarbonát HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Vytvořený vodík přechází sodíko-vodíkovou pumpou do stromatu a bikarbonát se spolu se sodíkem vrací apikální membránou do komorové vody. (2)

Mezi další transporty se řadí chloridový transport, jenž nemá dosud dobře objasněný průběh, a transport bikarbonátu, který udržuje záporný potenciál přenosu látek mezi stromatem a komorovou vodou. (7)

### **3.2 Hojení endotelových ran**

Endotelové buňky nemají téměř žádnou schopnost dělení. Jakmile dojde ke ztrátě jedné endotelové buňky, např. vlivem stárnutí organismu, překryjí defekt sousední buňky. V případě porušení většího počtu buněk nastává o mnoho větší posun zdravých buněk i z větších vzdáleností. Po uzavření rány se buňky remodelují zpět do hexagonálního tvaru. Při této reparaci, která trvá tři až čtyři měsíce, dochází k destabilizaci bariérové i pumpové funkce endotelu. (2)

## **4. PATOLOGIE ENDOTELU**

Patologická onemocnění endotelu můžeme rozdělit na kongenitální, dystrofické, degenerativní a endoteliopatie.

### **4.1 Kongenitální onemocnění endotelu**

Kongenitální, vrozená, onemocnění rohovky patří k vzácným vývojovým poruchám, mohou být jedno i oboustranná a mohou být součástí jiných poruch vývoje organismu. (8)

Vrozená onemocnění týkající se přímo endotelové vrstvy rohovky se nazývají zadní keratokonus a Petersova anomálie. Souhrnně se těmito poruchám říká dysgeneze předního segmentu. (8)

#### **4.1.1 Zadní keratokonus**

Zadní keratokonus, lat. *keratoconus posterior*, patří k velmi málo se objevujícím vývojovým poruchám. Vyskytuje se jako monolaterální, nezáneřlivá porucha bez progresu. Toto onemocnění nemá žádnou souvislost s keratokonem přední plochy rohovky, ta zůstává nedotčená. Rohovka je protenčená v centrální části směrem vpřed, avšak zůstává průhledná. Oblast protenčení vypadá jako kráter a jeho okraj může mít pigmentovaný okraj. V místě ohraničeného kráteru dochází k narušení endotelu a Descementovy membrány. Na zadní keratokonus mohou být navázány další poruchy. (2)

Léčba *keratoconus posterior* není zpravidla nutná. V případě neprůhledné tkáně, jež má vliv na zrakovou ostrost, dochází k provedení perforující keratoplastiky. (12)

#### **4.1.2 Petersova anomálie**

Petersova anomálie má podobné znaky jako *keratoconus posterior*. Na rohovce kromě endotelu a Descementovy membrány postihuje i zadní část stromatu. Onemocnění zasahuje mimo rohovky ještě komorový úhel, duhovku a čočku. (12) Rozděluje se na dva typy podle toho, zda došlo k postižení čočky. První typ, bez postižení čočky, vykazuje pouze srůst duhovky se zadní plochou rohovky. Druhý typ postihuje i čočku a vyskytuje se s dalšími anomáliemi jako např. mikroftalmem, aniridií či sklerokorneou. (8) Následkem mělké přední komory dochází u více než poloviny postižených k sekundárnímu glaukomu. Zraková ostrost je ovlivněna závažností onemocnění a edémem v centrální části rohovky. (2)

Léčba se omezuje na lokální, příp. chirurgickou, léčbu glaukomu a pleoptiku. (2)

### **4.2 Dystrofie endotelu**

Dystrofie rohovky jsou klasifikovány jako onemocnění, jejichž průběh se vyznačuje častěji bilateralitou a vrozeným či dědičným původem. Projevit se mohou v kterémkoliv věku. (8)

#### **4.2.1 Kongenitální hereditární endoteliální dystrofie**

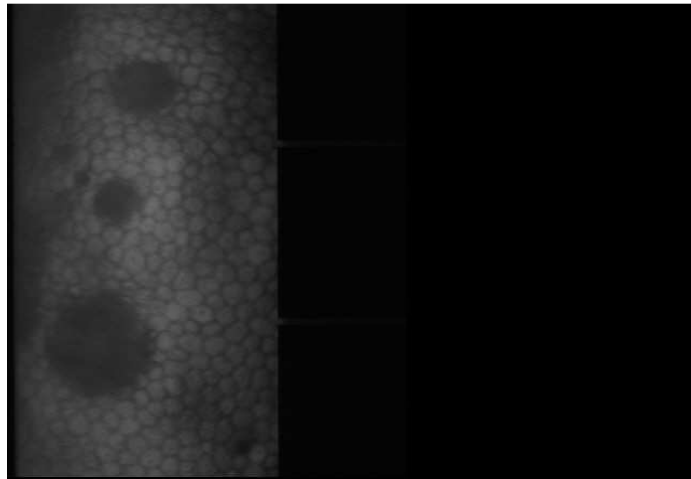
Kongenitální hereditární dystrofii rohovky, zkratka CHED, je možné rozdělit na dva typy. Oba patří mezi vzácné a probíhající oboustranně. První typ CHED je autozomálně dominantní, zatímco druhý typ autozomálně recesivní. (12) Celkově se onemocnění vyznačuje edémem rohovky, atrofií endotelu či jeho úplným chyběním, často s přítomností nystagmu. (2) Poškození Descementovy membrány poukazuje na původ patologie v prenatálním vývoji. (8)

Jedinou a nejlepší terapií je včasná perforující keratoplastika. (8)

#### 4.2.2 Fuchsova dystrofie rohovky

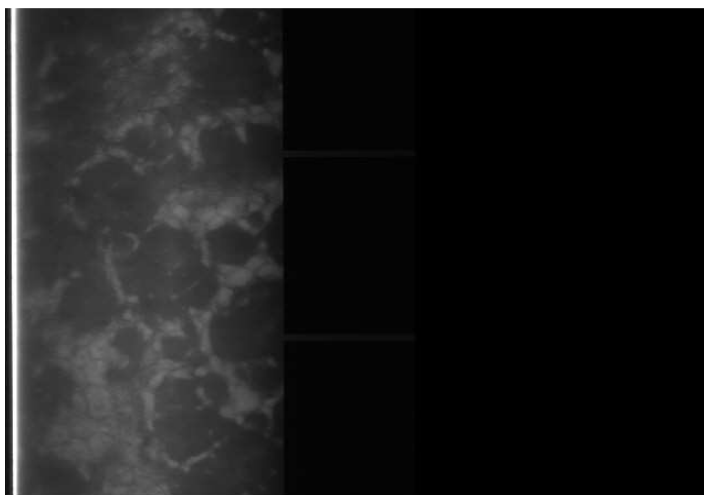
Fuchsova dystrofie rohovky je poměrně časté oboustranné onemocnění častěji se vyskytující u starších žen. Při onemocnění dochází k drobným výchlípkám Descementovy membrány a tyto prominence se postupně zvětšují. Progresí se porušují vazby mezi buňkami endotelu. Tento proces vede k pleomorfismu a k úbytku počtu buněk endotelu. (2) Čtyři fáze onemocnění se rozlišují podle klinického průběhu.

- ▶ Cornea guttata – raná fáze, epitel i stroma jsou beze změn, na endotelu je možné pozorovat pleomorfismus a polymegetismus



**Obrázek 4: Snímek cornea guttata pořízený spekulárním mikroskopem (10)**

- ▶ Edém stromatu bez edému epitelu – endotel neplní správnou funkci a dochází k nasáknutí stromatu a tím zvýšení jeho tloušťky, dochází ke kolísání vízu
- ▶ Bulózní keratopatie – přes stroma prosakuje tekutina až k epitelu a na něm pak vznikají vakuoly, tzv. buly. Tyto buly mají vliv na dlouhodobý pokles zrakové ostrosti, světlolachost a bolestivost onemocnění. Vakuoly praskají a odkrývají nervová zakončení
- ▶ Subepitelová fibróza – toto stádium doprovází snížení senzitivity rohovky, opětovné snížení vízu a další onemocnění (2)



**Obrázek 5: Fuchsova dystrofie zachycená spekulárním mikroskopem (10)**

Léčba Fuchsovy dystrofie se rozděluje na konzervativní a chirurgickou. Při konzervativní terapii, ke které se přistupuje v raných fázích, se podává několikrát denně roztok chloridu sodného a glukózy. Ke zmírnění bolestivosti odhalených nervových zakončení lze aplikovat kontaktní čočku. (8) Chirurgicky se Fuchsova dystrofie řeší perforující nebo zadní lamelární keratoplastikou.

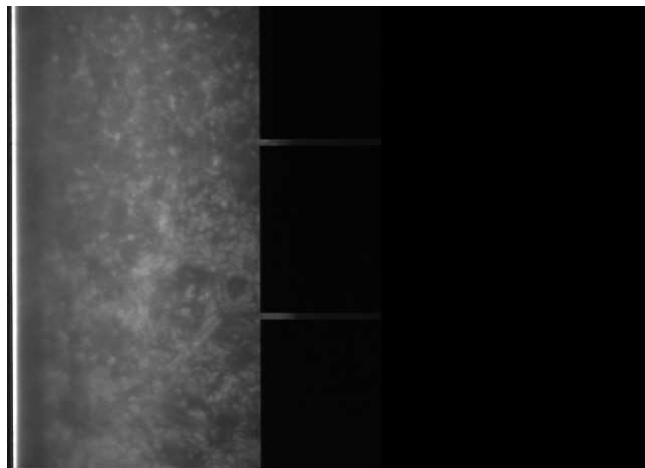
#### **4.2.3 Zadní polymorfní dystrofie rohovky**

Zadní polymorfní dystrofie, zkratka PPD, je bilaterálně probíhající autozomálně dominantní onemocnění. Objevuje se nejčastěji mezi třicátým a čtyřicátým rokem života s pozvolnou progresí. Klinicky dochází k epitelizaci endotelových buněk a onemocnění se rozděluje na dva typy. První typ se nazývá geografický, druhý nese název celulární. (8)

U geografického typu je možné biomikroskopicky zjistit na endotelové vrstvě i Descementově membráně místy kruhová zašedlá ložiska. U typu celulárního jsou tyto změny patrné jen při spekulární mikroskopii. Onemocnění může být doprovázeno edémem rohovky, synechií periferních částí rohovky a duhovky a také sekundárním glaukomem způsobeným přerůstáním tkáně v trabekulu.



Při léčbě je důležité včasné odhalení glaukomu a jeho léčba, která konzervativně nemusí být příliš účinná. Poté se přistupuje k chirurgické trabekulektomii. K perforující keratoplastice dochází v pokročilých stádiích, avšak s rizikem možné recidivy. (2)



**Obrázek 6: Zadní polymorfni dystrofie zachycená spekulárním mikroskopem (10)**

#### **4.2.4 Iridokorneální endotelový syndrom**

Iridokorneální endotelový syndrom vypadá klinicky podobně jako PPD, průběh je vždy ale jednostranný a rychle progresivní. Kromě změn endotelu jsou patrné patologické změny na duhovce, včetně iridokorneálního přilnutí a srůstů. Endotel při pozorování biomikroskopicky i spekulárním mikroskopem jeví známky zvětšených buněk s tmavým středem a bílými okraji vypadajícími jako tzv. tepaný bronz. Přední synechie pak je důvodem vzniku sekundárního glaukomu. (2)

Vzhledem k podobnosti s PPD probíhá léčba stejně jako u zadní polymorfni dystrofie.

### **4.3 Degenerace a endoteliopatie**

Na rozdíl od dystrofií jsou degenerace způsobeny stárnutím organismu. Projevují se mono i bilaterálně, spíše v periferních oblastech rohovky a mohou se

objevit samostatně i jako součást jiných systémových onemocnění. (12)  
Degenerace endotelu nejsou příliš časté, postihují více jiné vrstvy rohovky. Endoteliopatiemi jsou nazývány změny endotelu způsobené vnějšími vlivy jako například nošením kontaktních čoček nebo poškozením vlivem nitroočních operací, či jinými očními onemocněními. (9)

#### **4.3.1 Hassalova-Henleova tělíska**

Vlivem věku hustota buněk endotelu klesá a ztlušťuje se vrstva buněk Descementovy membrány. Hassalova-Henleova tělíska, angl. peripheral corneal guttae, se projevují jako malé vychlípeniny Descementovy membrány. Tyto vychlípeniny jsou identické s vychlípkami, které je možné pozorovat u Fuchsovy dystrofie ve fázi cornea guttata, liší se však umístěním. Tyto protruze se nacházejí v okrajových částech rohovky a způsobuje je zvýšená endoteliální produkce kolagenu. Hassalova-Henleova tělíska nemají vliv na funkci rohovky, jsou pouze degenerací způsobenou stárnutím. (13)

#### **4.3.2 Iatrogenní endoteliopatie**

Při nitroočních operacích, nejčastěji při operaci katarakty, dochází k čtyř až desetiprocentní ztrátě buněk endotelu. Tato ztráta je nazývána jako iatrogenní endoteliopatie a v některých případech může být příčinou rychlejší progresse ztráty endotelu po operaci. Při větší ztrátě buněk způsobené vlivem iatrogenní endoteliopatie se zvyšuje riziko ohrožení správně funkce endotelu a následně i pooperačnímu edému rohovky. (9)

#### **4.3.3 Endoteliopatie indukovaná kontaktními čočkami**

Dlouhodobé nošení kontaktních čoček, převážně z materiálů s malou propustností kyslíku, způsobuje hypoxii rohovky. Tato hypoxie je pak příčinou akutních i chronických změn či poškození endotelu. Z nedostatku kyslíku vzniká polymegetismus a při velkém narušení celistvosti vrstvy endotelu dochází k edému

rohovky, což má za následek fotofobii a kolísavou zrakovou ostrost a někdy i pocit cizího tělíska. Po vysazení kontaktních čoček není pravidlem, že by se postižená tkáň vracela snadno k původnímu stavu. Řešením je úplné přerušení nošení kontaktních čoček, v méně vážných případech přechod na čočky s vyšší permeabilitou pro kyslík. (9)

#### **4.3.4 Sekundární endoteliopatie způsobená zánětlivým onemocněním**

Zánětlivým onemocněním působícím na endotel je iridocyklitida, tedy zánět duhovky a řasnatého tělíska, nebo uveitida, zánět celé uvey. Bílkoviny vytvořené imunitní reakcí při potlačování infekce se uvolňují do přední komory a tento stav se nazývá hypopyon. Buňky bílkovin plovoucí volně v komorové vodě mohou proniknout do prostorů mezi jednotlivými buňkami endotelu a narušit jejich propojení. Uvolněním propojení endotelových buněk se tyto buňky odlučují a dochází k jejich ztrátě. (9)

#### **4.3.5 Endoteliopatie indukovaná glaukomem**

Dlouhodobé působení vyššího nitroočního tlaku na buňky endotelu má vliv na snížení jejich hustoty. Tento stav opět může být při rapidním poklesu hustoty příčinou otoku rohovky a následků z toho vyplývajících. (9)

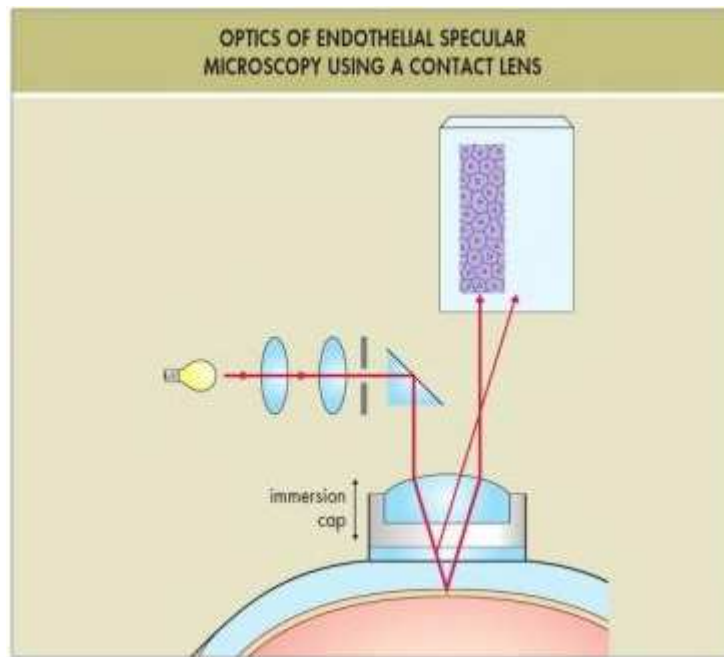
## 5. VYŠETŘOVÁNÍ ENDOTELU

Vyšetření vrstvy endotelu je *in vivo* možné pouhým okem na štěrbinové lampě, nebo v přesném zobrazení a analyzováním při použití spekulárního, zrcadlového, mikroskopu. Kromě těchto dvou metod se endotel posuzuje také při fluorofotometrii.

### 5.1 Vyšetření na štěrbinové lampě

Vyšetření na štěrbinové lampě pracuje na principu optického a paralelního řezu nebo zrcadlového odrazu. Všechny tyto postupy probíhají s přímým osvětlením a zvětšením mikroskopu potřebným ke správnému zobrazení pozorovaných objektů.

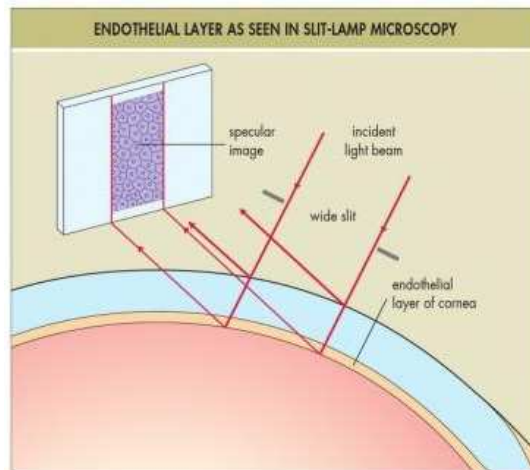
Pozorování endotelu na štěrbinové lampě se dělí na kontaktní a bezkontaktní. Při kontaktní spekulární mikroskopii se na povrch rohovky přiloží kontaktní čočka. Ta má za úkol potlačit rušivý odlesk vznikající na epitelu. (7) Při vyšetřování se zrcadlovým reflexem můžeme kromě vrstvy endotelu pozorovat i slzný film a další struktury včetně přední plochy oční čočky. Využívá se odrazu, ke kterému odchází na rozhraní endotelu a komorové vody. Nastavení štěrbinové lampy se provádí tak, aby osvětlovací paprsek a zobrazovací rameno spolu svíraly stejný úhel, přibližně 45°. S paralelním řezem a při největším zvětšení je pak nutné pohybovat ramenem lampy do doby, kdy se v jednom z okulárů objeví zrcadlový reflex, v druhém je pak možné pozorovat vybraný objekt. (14) Bezkontaktní spekulární mikroskopie probíhá podobně jako na štěrbinové lampě, kde vyšetřující pozoruje endotel v zrcadlovém odrazu. (7)



**Obrázek 7: Schéma spekulárního mikroskopu s kontaktní čočkou (13)**

Další ovšem jen orientační metodou sledování endotelu je optický řez, který patří k nejzákladnějším metodám vyšetření rohovky štěrbinovou lampou. Při jeho použití je nastaven velmi tenký paprsek světla, vysoká intenzita osvětlení a úhel, který spolu svírá osvětlovací a optická část mikroskopu se pohybuje mezi 30° a 60°. Se zvýšením osvětlovacího úhlu však dochází k horší kvalitě zobrazení tkáně a ztíženému pozorování ploch. Při použití optického řezu je možné kromě endotelu pozorovat kvalitu a změny epitelu rohovky a poškození či cizí tělíska ve stromatu. (14)

Paralelní řez používá stejná pravidla jako optický řez, ovšem k pozorování se využívá širšího paprsku, o velikosti přibližně podobné jako samotná tloušťka rohovky. Výhodou vyšetření v paralelním řezu je prostorové zobrazení, možnost pozorování vaskularizací a řasení rohovky. (14)



**Obrázek 8: Princip pozorování endotelu na štěrbinové lampě (13)**

## 5.2 Spekulární mikroskopie

Spekulární mikroskopie slouží k přesnému a podrobnému analyzování vrstvy endotelových buněk rohovky a jejich změn *in vivo*. Zobrazení endotelu tímto mikroskopem je neinvazivní a až stonásobně větší než štěrbinovou lampou. (1) Kromě zvětšení obrazu jsou moderní spekulární mikroskopy schopné pomocí počítačového softwaru propočítat u analyzovaných buněk počet, velikost, tvar i hustotu. (9)

Potřeba vyvinutí spekulárního mikroskopu byla žádoucí pro zpřesnění pozorování endotelu. Proti snadnému pozorování endotelu stojí několik překážek jako např. odraz světla od přední plochy rohovky nebo rozptyl světla prošlého stromatem snižující kontrast pozorovaného obrazu a další. Tyto příčiny byly důvodem ke zkonstruování spekulárního mikroskopu. (13)

David Maurice v roce 1968 zdokonalil metalurgický mikroskop a využil principu zrcadlového odrazu světla. Zrcadlový odraz světla vzniká na rozhraní prostředí s odlišným indexem lomu, v tomto případě endotelu a komorové vody a na tomto principu pracuje spekulární mikroskop. Nedostatkem prvních spekulárních mikroskopů bylo velmi úzké zorné pole pozorované oblasti a rušivý zrcadlový reflex. Moderní spekulární mikroskopy mají vysoké rozlišení, zorné pole

o mnoho větší, navíc mají kvalitnější optiku, která dokáže potlačit odlesk, a také mají zabudovaný kamerový systém s možností uložení pořízeného snímku. (7)

Z uložených snímků, které spekulární mikroskop pořídí, dokáže zabudovaný počítačový software kvantifikovat a vyhodnotit morfológickou analýzu endotelových buněk. Parametry, jež software vyhodnocuje, jsou např. velikost a tvar buněk endotelu, hustota a procentuální výskyt buněk šestihranného tvaru v analyzované oblasti (hexagonalita).

### **5.3 Fluorofotometrie**

Fluorofotometrie slouží jako měřítko endoteliální bariérové funkce a působí jako barometr transportu tekutin. (7) Fluorofotometrie se využívá více při sledování cirkulace komorové vody v přední komoře, ale informace z ní je možné využít i pro vyhodnocení propustnosti endotelu.

Měření probíhá tak, že se lokálně na povrch rohovky aplikuje fluorescein. Fluorescein postupně proniká vrstvami rohovky, až nakonec difunduje do přední komory, kde se smísí s komorovou vodou. Koncentrace fluoresceinu v rohovce i přední komoře je během testu stále sledována a rychlost a koncentrace jsou zaznamenávány do protokolu. (15)

## **6. EXCIMEROVÝ LASER A ZÁKLADY JEHO APLIKACE**

Lasery mají v očním lékařství své nezastupitelné místo. Kromě excimerového laseru používaného k fotoablacii rohovkové tkáně je využíván i NdYAG rubínový laser k léčbě diabetické retinopatie či sekundární katarakty.

### **6.1 LASER**

Slovo LASER je ve skutečnosti zkratka slov *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, což v překladu znamená „zesílení světla stimulované emisí záření“. Laser tvoří koherentní monochromatické záření, které přeměňuje z dodávané energie. Lze ho popsat také jako zdroj elektromagnetického záření, který emituje fotony. (16)

Pracuje na principu excitace elektronových částic. Zdroj laseru se skládá z generátoru energie, aktivního prostředí a rezonátoru a polopropustného zrcadla. Energie z generátoru prochází aktivním prostředím, kde vybudí elektrony a ty emitují energii ve formě fotonů. Fotony se odrážejí od rezonátoru, jenž je tvořen zpravidla zrcadly, od nichž se fotony odrážejí, působí další reakce v aktivním prostředí a tím se jejich tok ještě zesiluje. Proud fotonů je přes polopropustné zrcátko ve formě proudu částic vyzářen ven. (17)

Lasery je možné rozdělit několika způsoby podle druhu aktivního prostředí, vlnové délky výstupního paprsku, typu buzení či časové délky provozu. Podle druhu aktivního prostředí se lasery rozdělují na pevnolátkové, polovodičové, plynové, kapalinové a plazmatické. K plynovým laserům se řadí excimerový laser, který je používán právě při laserových refrakčních operacích. (17)



## 6.2 Excimerový laser

Excimerový laser se řadí mezi lasery s aktivním prostředím tvořeným plynem. Název excimer laser dostal tento laser na základě zdroje svých paprsků. Tímto zdrojem a zároveň i původcem pojmenování je excitovaný dimer, tedy excimer. Excimer se vytváří jen na krátkou přechodnou dobu vzájemným působením vybuzených atomů. Plyny tvořící aktivní prostředí pro excimer jsou buď vzácné plyny, halogenidy vzácných plynů nebo oxidy vzácných plynů. Generátorem energie jsou v případě excimerových laserů elektrické výboje nebo tok elektronů. Buzení probíhá pouze pulzně. (17)

Zkoumáním interakce excimerového laseru na rohovce byly zjištěny čtyři možné situace. Rohovková tkáň může na působení laseru reagovat absorpcí energie, rozptylem, reflexí anebo jí laserový parsek prostoupí. Reflexe není v očním lékařství důležitá. Proniknout tkání dokáže paprsek v oblasti vlnových délek od 400 do 1400 nm. (2)

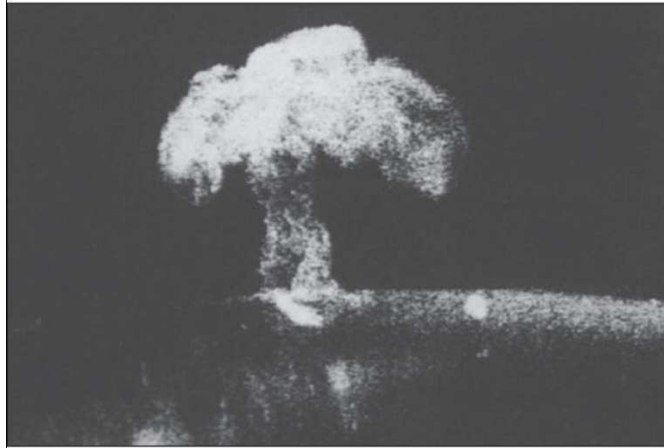
Při zkoumání negativních vlivů excimerových laserů na okolní tkáň došlo k objevu přímé úměrnosti mezi vlnovou délkou použitého laseru a hloubky, do jaké tento laser penetruje. Čím vyšší je vlnová délka paprsku, tím je i větší hloubka, do níž energie pronikne. Pro potřeby rohovkové chirurgie se jeví jako nejlepší možný laser s vlastnostmi, na základě jichž budou rohovkové tkáň energii ve velké míře pohlcovat, ale zároveň nedojde k poškození tkání ve větších hloubkách. (18) Takové vlastnosti vykazuje ultrafialové záření o vlnové délce nižší než 300 nm. Pokud dosáhne vlnová délka velikosti vyšší než 300 nm, dochází k negativnímu působení na endotel a dokonce i oční čočku. (2)

V očním lékařství se k laserovým refrakčním operacím používá argon – fluoridový laser.

### 6.2.1 Argon - fluoridový laser

Argon – fluoridový laser (ArF) emituje ultrafialové záření o vlnové délce 193 nm. Toto UV záření se řadí do třídy UV-C. Působením ArF laseru na tkáň rohovky dochází k rozptylu molekul do prostoru velkou rychlostí. Příčinou je

přerušení vazeb mezi jednotlivými molekulami a tím jejich uvolnění. Tento jev se nazývá vaporizace. Výhodou působení ArF laseru je penetrace záření, jehož maximální prostup činí 3  $\mu\text{m}$  do hloubky tkáně. Odstranění tkáně ArF laserem dostalo název fotoablace. (2)



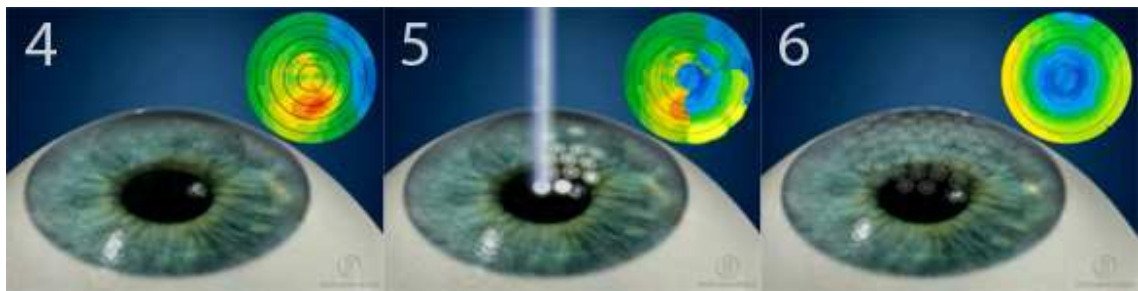
**Obrázek 9: Vysokorychlostně zachycený snímek rozptylu rohovky fotoablací (18)**

Historie v souvislosti s očním lékařstvím se datuje do osmdesátých let dvacátého století. Pokusy na zvířecích rohovkách bylo zjištěno, že fotoablace rohovkové tkáně nepoškozuje ani nedeformuje okolní tkáně a tak byla v roce byla provedena první laserová operace na lidském oku. (2)

### **6.3 Aplikace ArF excimerového laseru**

Aplikace ArF excimerového laseru v rohovkové refrakční chirurgii se datuje do druhé poloviny osmdesátých let dvacátého století. Jeho používání doznalo během let do současnosti mnoha velkých změn. Záhy po uvedení excimerového laseru do praxe operacemi metodou PRK (*photorefractive keratectomy*) byla objevena metoda dokonalejší, kdy se na rohovce nejdříve vytvoří tenký lalok z epitelu a Bowmanovy membrány a poté se působením excimerového laseru odstraní část stromální tkáně. Tato metoda nese jméno LASIK vytvořené z pojmenování *laser in situ keratomileusis*. (2)

Vývojem prošel i samotná postup ablace tkáně. Ablační profily používané u refrakčních vad zůstávají stejné, liší se ovšem samotný průběh ablace. První lasery používaly k ablaci široký svazek paprsku označovaný jako „*broad beam*“. Tento paprsek se vyznačoval širokým rozptylem částic, což vedlo k nepřesným výsledkům a diskomfortu pacientů, jež zákrok absolvovali. Dalším stupněm vývoje byla ablace „*scanning-spot ablation*“, tedy bodová doplněná o sledovací systém. Nejnověji je používán systém s názvem „*flying spots*“, který vytváří celou ablaci pomocí mikroplošek. Přístroje používají i videozáznam pro sledování operovaného oka (*tracking system*) a upravují směr paprsku podle jeho mikropohybů. Paprsek se řídí obrazem duhovky a tak je ablace prováděna podle měření před operací. Tím vzniká velmi přesná korekce refrakční vady. (18)



**Obrázek 10: Ukázka působení „flying spots“ na rohovku**

Samotnému operačnímu zákroku předchází několik měření a indikace k zákroku má určité limity. Předoperační vyšetření by mělo kromě samotného měření refrakce obsahovat i měření pachymetrie rohovky. Na základě pachymetrie pak oční lékař doporučí vhodnost a metodu refrakční operace.

Kromě základních měření probíhá měření na wavefront analyzáru. Tento přístroj kromě měření aberací nižších i vyšších řádů provádí focení duhovky. Wavefront analyzáru obsahuje software, který je základem pro plánování konkrétního operačního průběhu u měřeného klienta. Jeden pulz laseru odstraní 0,25  $\mu\text{m}$  tkáně a počítačový software propočítá počet a přesné rozmístění pulzů laseru. Záznam duhovky, tzv. iris registrace, je použit při operaci pro sledování očních pohybů a laserový paprsek je řízen podle obrazu duhovky. (18)

## **7. REFRAKČNÍ ZÁKROKY**

Refrakční stav oka můžeme ovlivnit několika druhy zákroku. Nitroočními, kdy je do lomivého systému oka voperována umělá nitrooční čočka ke korekci zrakové vady, nebo rohovkovými, tedy zákroky ovlivňujícími její lomivost změnou zakřivení přední plochy rohovky.

Každému refrakčnímu zákroku musí předcházet podrobné oční vyšetření zahrnující měření manifestní refrakce i posouzení binokulárních funkcí, biometrických parametrů oka včetně detailní analýzy rohovky, wavefront analýzy optického zobrazení oka a také biomikroskopické vyšetření předního i zadního segmentu, především očního pozadí. Na základě těchto získaných informací se volí nejvhodnější refrakční zákrok.

### **7.1 Rohovkové refrakční operace**

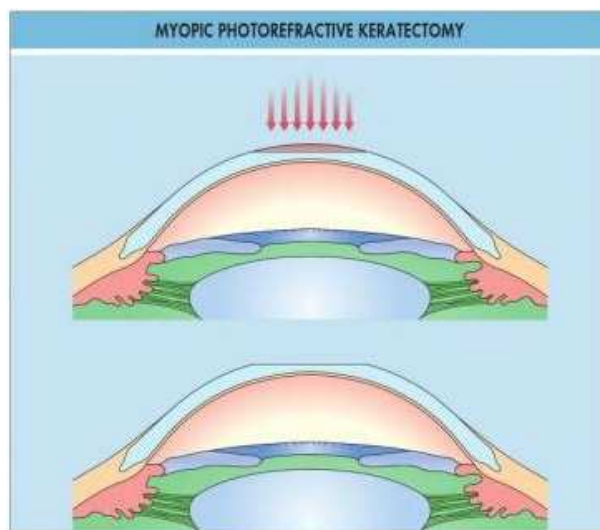
Refrakční zákroky na rohovce se rozdělují na laserové a chirurgické. Laserové metody v sobě zahrnují změny zakřivení rohovky způsobené ablací tkáně na povrchu či v hlubších vrstvách rohovky. Chirurgické zákroky používají ke změně poloměru křivosti umělé implantáty nebo přesně propočítané nářezy, které při následném hojení mění povrch přední plochy rohovky. Veškeré zákroky jsou prováděny v lokální anestezii. (2)

#### **7.1.1 Laserové zákroky**

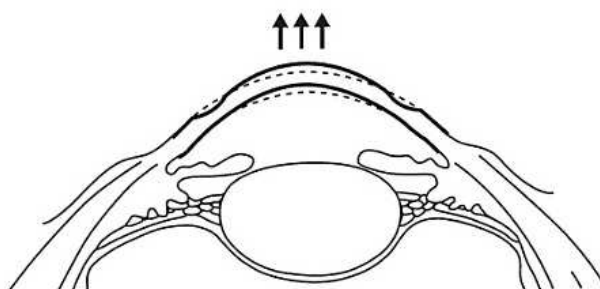
Laserové zákroky mají společný princip fotoablace tkáně rohovky pomocí excimerového laseru o vlnové délce 193 nm. Základem těchto operací je vytvoření tzv. flapu, po jehož odklopení (či odstranění) dochází k ablací obnažené tkáně rohovky. I tyto zákroky je možné také rozdělit na několik druhů podle postupu tvorby flapu a hloubky, v jaké je ablace prováděna. Ablací profil se liší podle refrakční vady. U myopie je žádoucí oploštění přední plochy rohovky. K ablací dochází tedy v centrální části rohovky tak, jak je znázorněno na obr. 11. Při

refrakčním řešením hypermetropie je naopak nutné přední plochu více vyklenout a toho je dosaženo ablací po obvodu vytvořeného flapu (obr. 12).

Počítačový software řídící průběh ablace stromální tkáně může být naprogramován tak, aby cílená ablace korigovala kromě základních refrakčních vad i aberace vyšších řádů.



**Obrázek 11: Ablace tkáně při operaci myopie (13)**



**Obrázek 12: Ablace tkáně při operaci hypermetropie (2)**

### *Photorefractive keratectomy (PRK)*

Při laserové refrakční operaci metodou PRK je ablace prováděna povrchově. Vrstva epitelu je narušena mechanicky nebo chemicky, poté odstraněna a obnažená vrstva stromatu může být ablací excimerovým laserem odstraněna. Po skončení ablace je povrch rohovky překryt terapeutickou kontaktní čočkou. Ta má za úkol zmírnit bolestivost vzniklou narušením vrstvy epitelu a obnažením nervových zakončení. Přeepitelizování abrazované tkáně trvá přibližně čtyři dny. (2)

Tento zákrok je používán spíše u nižších a nižších středních stupňů myopie a astigmatismu a je vhodný i pro rohovky s malou hodnotou pachymetrie.

### *Laser sub epithelial keratomileusis (LASEK)*

Refrakční metoda operace LASEK je modifikací PRK. Liší se tím, že epitel je u tohoto postupu mechanicky narušen a jen odhrnut k okraji. Po provedení ablace se navrácí zpět na původní místo. Rohovka se následně pro snazší průběh hojení překryje kontaktní čočkou. Doba hojení epitelu je oproti PRK kratší a méně bolestivější. Metoda je vhodná pro pacienty se sušším okem, s vyššími refrakčními vadami, včetně hypermetropie, a tenkou rohovkou. (2)

### *Laser in situ keratomileusis (LASIK)*

Ablace tkáně u LASIK probíhá ve větší hloubce rohovky než u předchozích dvou metod. Postup operace má dvě etapy. První částí je vytvoření laloku tzv. flapu, tedy částečné oddělení epitelu, Bowmanovy membrány a malé části stromatu, k otevření plochy pro ablací excimer laseru. V druhé části je pak odstraněna tkáň stromatu podle přesně propočítaných dat. Vytvoření flapu v dnešní době probíhá dvěma způsoby – mikrokeratomem nebo femtosekundovým laserem. Mikrokeratom je speciální nůž, kterým je flap odříznut. Femtosekundový laser proniká do přesně nastavené hloubky, kde řízenou disrupcí buněk vytváří lalok z tkáně epitelu, Bowmanovy membrány a části stromatu. Po ablací se

rohovkový lalok přiklopí zpátky a uhladí se. Metoda LASIK má bezbolestný průběh hojení a zraková ostrost je dobrá krátce po operaci.

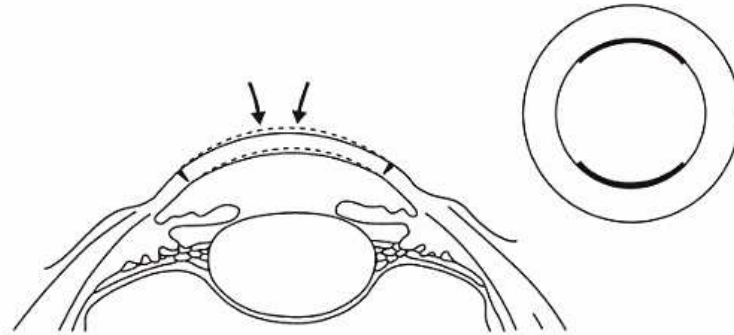
Metoda LASIK je vhodná pro nízké, střední i vysoké refrakční vady za podmínky dostatečné tloušťky rohovky

### **7.1.2 Incizní keratotomie a intrastromální kroužky**

#### *Incizní keratotomie*

Incizní keratotomie byla první metodou rohovkových refrakčních operací. Princip incizní keratotomie spočívá v provádění zářezů do hlubokých vrstev rohovky. Následným hojením těchto ran mění rohovka zakřivení přední plochy a tím se mění i refrakční stav. Doba hojení se pohybuje mezi třemi až šesti měsíci. Na to, do jaké míry bude keratotomie úspěšná, má vliv věk operovaného pacienta, hloubka a počet incizí a místo provedení incize. (2)

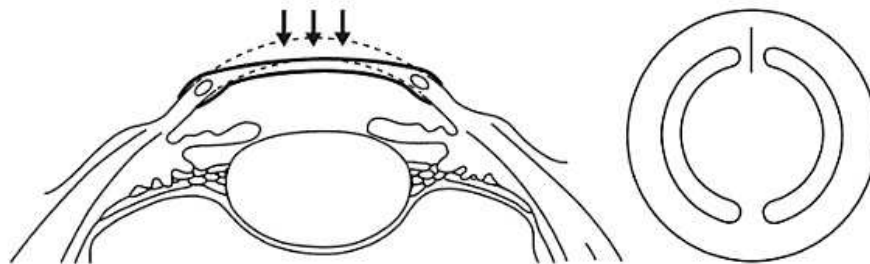
Keratotomie se podle místa a provedení incize dělí na radiální, hexagonální a astigmatické. Radiální a hexagonální metoda se v dnešní době již nepoužívá. Korekce rohovkového astigmatismu pomocí astigmatické keratotomie je používána stále a její možnosti jsou dále zdokonalovány (obr. 13). Pod názvem limbální relaxační incize je využívána pro korekci nižšího astigmatismu například po operaci katarakty, perforující keratoplastice či jiné rohovkové refrakční operaci. Řez je prováděn v okrajové, tzv. limbální, části rohovky vždy v nejstrmějším meridiánu. (2)



**Obrázek 13: Astigmatická incizní keratotomie (2)**

#### *Intrastromální kroužky (ICR a ICRS)*

Implantace intrastromálních kroužků se zakládá také na principu oploštění centrálního zakřivení přední plochy rohovky. Oploštění je dosaženo implantací speciálních kroužků nebo segmentů těchto kroužků vyrobených z polymethylmetakrylátu (PMMA) do stromatu. Touto metodou se koriguje nízká a střední myopie a výhodou je malý zásah do struktur rohovky a reverzibilita zákroku. ICRS je také možností řešení keratokonu, někdy ještě v kombinaci s *corneal cross linking*.



**Obrázek 14: Intrastromální kroužky (2)**

## **7.2 Nitrooční refrakční operace**

Nitrooční operace probíhají tak, že se do refrakčního systému vloží umělá čočka upravující refrakční vadu. Implantací umělé intraokulární čočky je možné korigovat myopii, hypermetropii, astigmatismus či léčit kataraktu.



Čočky implantované k vlastní oční čočce nesou název fakické, protože v oku je ponechána přirozená čočka a tím i zachována akomodace. Rozdělují se na předněkomorové a zadněkomorové. S implantací fakických čoček je spojen úbytek endotelových buněk. Před samotnou operací se měří hustota buněk endotelu a její nízká hodnota může být kontraindikací k zákroku. (2)

Léčba katarakty nebo *clear lens extraction* (CLE) probíhá odstraněním vlastní oční čočky a nahrazením čočkou umělou. Stav po výměně přirozené oční čočky se nazývá pseudofakie a dochází při něm k úplné a nenahraditelné ztrátě akomodační schopnosti. Existují monofokální i multifokální čočky, jimiž je možné akomodaci do jisté míry nahradit. Úbytek endotelových buněk není při CLE nebo při operaci katarakty tak velký jako u fakických čoček. (2)

## **8. VÝZKUMNÁ ČÁST**

Praktická část se zabývá měřením parametrů endotelu rohovky a pozorováním jeho změn způsobených refrakčním zákrokem metodou femtoLASIK, tedy metody, při níž se rohovková lamela vytvoří pomocí femtosekundového laseru a úběr tkáně stromatu způsobuje excimerový laser. Vyhodnocení těchto změn je prováděno z dat naměřených spekulárním mikroskopem u pacientů před laserovou operací, sedm a třicet dnů po laserové operaci.

### **8.1 Cíle výzkumné části**

Cílem praktické části diplomové práce je zjistit možné změny zadní endotelové vrstvy rohovky u pacientů podstupujících laserovou refrakční operaci. S přihlédnutím k výsledkům studie španělských vědců z *Universidad de Alicante School of Medicine* Pérez-Santonja JJ, Sakla HF, Gobbi F, Alió JL a amerických vědců z *Mayo Clinic, Department of Ophthalmology* Klingler KN, McLaren JW, Bourne WM, Patel SV. je možné ve struktuře endotelu předpokládat jen malé změny.

### **8.2 Subjekty a metodika**

Statistické analýze byl podroben vzorek 27 probandů v celkovém počtu 53 očí. Z tohoto počtu probandů bylo 12 mužů a 15 žen ve věku od 24 do 44 let. Průměrný věk i medián všech účastníků studie byl 31 let. Směrodatná odchylka od průměrného věku činí 4,7 let. Hodnota modus ukazuje 30 let. Podmínkami k podstoupení refrakčního zákroku a tím i zařazení do této studie byl věk od 18 do 45 let, fyziologický stav a dostatečná tloušťka rohovky k provedení laserové operace.

Studie probíhala od října do prosince 2013. Všichni pacienti byli klienty pražské Oční kliniky DuoVize provádějící refrakční zákrok pomocí metody femtoLASIK na přístroji VisuMax (Carl Zeiss) a dále na excimerovém laseru Zeiss Mel 80 (Carl Zeiss). Každý klient byl před refrakční operací seznámen s průběhem

a riziky operace a podepsal informovaný souhlas, ve kterém souhlasil s provedením zákroku.

Každý účastník absolvoval na stejném pracovišti a za stejných světelných podmínek 3 měření endotelové vrstvy rohovky na spekulárním mikroskopu. První měření u každého probanda bylo provedeno před laserovou operací, druhé 7 dní po zákroku a třetí 30 dní po refrakční operaci. Výzkum se však neuskutečňoval vždy ve stejný den v týdnu ani ve stejnou denní dobu. Měření nebyla prováděna pokaždé stejnou osobou, kromě autorky diplomové práce se na měření účastnily ještě zdravotní sestry oční kliniky.

Před samotným refrakčním zákrokem byly u všech probandů změřeny pomocí spekulárního mikroskopu Nidek CEM-530 parametry centrální oblasti endotelu rohovky. Endotelový mikroskop dokáže změřit kromě hustoty a počtu buněk také procento hexagonality buněk z měřené oblasti endotelu. Výsledky měření mohou být ovlivněny vnějšími faktory jako například suchým okem, změnami fixace měřeného pacienta a mikropohyby měřených očí. Při každé analýze dochází k měření ne vždy stejné plochy endotelových buněk, proto může docházet k drobným odchylkám při následném porovnávání naměřených dat. V některých případech probandi neabsolvovali všechny určené kontroly a data z měření po jednom týdnu nebo po jednom měsíci po operaci chybějí. Relativně nízký vzorek probandů může přinést u některých proměnných výsledky, které zcela neodpovídají realitě.

### **8.2.1 Postup měření na spekulárním mikroskopu**

Spekulární mikroskop musí být umístěn na pevné vyrovnané podložce. Tato podložka je součástí mechanického stolečku, na němž lze ovládat zvedání a snižování výšky, aby bylo možné upravit vyšetřovací přístroj pro měřenou osobu.

Před samotným měřením je podložka pod bradu vyšetřovaného a opěrka čela očištěna desinfekcí. Na začátku ještě před spuštěním měření je nutné vyšetřovanému vysvětlit, co a jakým způsobem bude na spekulárním mikroskopu změřeno. Měřený subjekt se posadí k přístroji a opře si bradu a čelo do opěrek

přístroje. Výška přístroje je upravena tak, aby seděl vyšetřovaný vzpřímeně a lehce se opíral čelem a bradou do přístroje. Ovládním bradové podložky se výška očí opřené hlavy měřeného upraví do výšky značky zaznačené na přístroji.

Měřený je vyzván ke sledování fixační zelené značky přímo před okem. Přístroj v automatickém módu promítne ze strany na rohovku pruh zeleného světla a v jeho odrazu zachytí při obrovském zvětšení vrstvu endotelu. Vyšetřující má k dispozici šestnáct sekvenčních snímků, které spekulární mikroskop během jednoho měření zachytí. Z těchto snímků je možné vybrat ten nejkvalitnější a zabudovaný software pak přepočítá změřenou plochu na přesné parametry. Tiskárna, která je součástí přístroje, naměřené hodnoty přehledně vytiskne a výsledky se pak mohou uchovávat a archivovat. Ukázka vytištěného výsledku je zobrazena na obrázku číslo 15.

Před měřením je možné ještě nastavit fixační značku do patnácti směrů k analyzování i jiných než centrálních oblastí endotelových buněk. U všech měřených probandů této studie byla měřena jen centrální část endotelu.

### ***Parametry měřené spekulárním mikroskopem použité v této studii:***

- ▶ Počet buněk (NUM): množství analyzovaných buněk
- ▶ Hustota buněk (CD): hustota buněk na jednotkovou plochu 1 mm<sup>2</sup>
- ▶ Průměrná plocha buněk (AVG): průměrná velikost analyzované plochy, údaj v μm<sup>2</sup>
- ▶ Standardní odchylka (SD): standardní odchylka analyzované plochy buněk endotelu
- ▶ Koeficient odchylky (CV): standardní odchylka podle vypočítaného průměru měřené plochyAVG, údaj v %
- ▶ Hexagonalita (HEX): procentuální vyjádření poměrné části buněk hexagonálního tvaru

	<R>	<L>
NUM	134	187 (cell)
CD	2584	2778 (cell/mm <sup>2</sup> )
AVG	387	360 (μm <sup>2</sup> )
SD	94	80 (μm <sup>2</sup> )
CV	26	23 (%)
MAX	919	867 (μm <sup>2</sup> )
MIN	132	174 (μm <sup>2</sup> )
HEX	70	71 (%)
-----		
CT	579	591 (μm)
FIX	C	C
	<R>	<L>
		
NIDEK CEM-530		

**Obrázek 15: Záznam výsledků měření z endotelového mikroskopu Nidek CEM-530**

Všechny naměřené hodnoty ze spekulárního mikroskopu byly vepsány do tabulky a z těchto údajů následně vypočítány průměrné hodnoty, směrodatná odchylka, modus, medián a mezi vybranými proměnnými propočítán oboustranný párový T-test při hladině významnosti 5 % (0,05). Na základě tohoto testu byla hodnocena hypotéza o rovnosti sledovaných dat, přičemž došlo k jejímu zamítnutí, pokud pravděpodobnost jejího zamítnutí v případě, že skutečně platí, byla menší než 5 % (v tomto případě byl rozdíl dat označen za signifikantní). Pokud nebyla hypotéza zamítnuta, byl rozdíl mezi daty označen za nesignifikantní. Pro přehled je též vždy uvedena mezní hladina významnosti P, pro kterou by v případě daných dat byla jejich rovnost právě zamítnuta. (19)

### 8.3 Výsledky

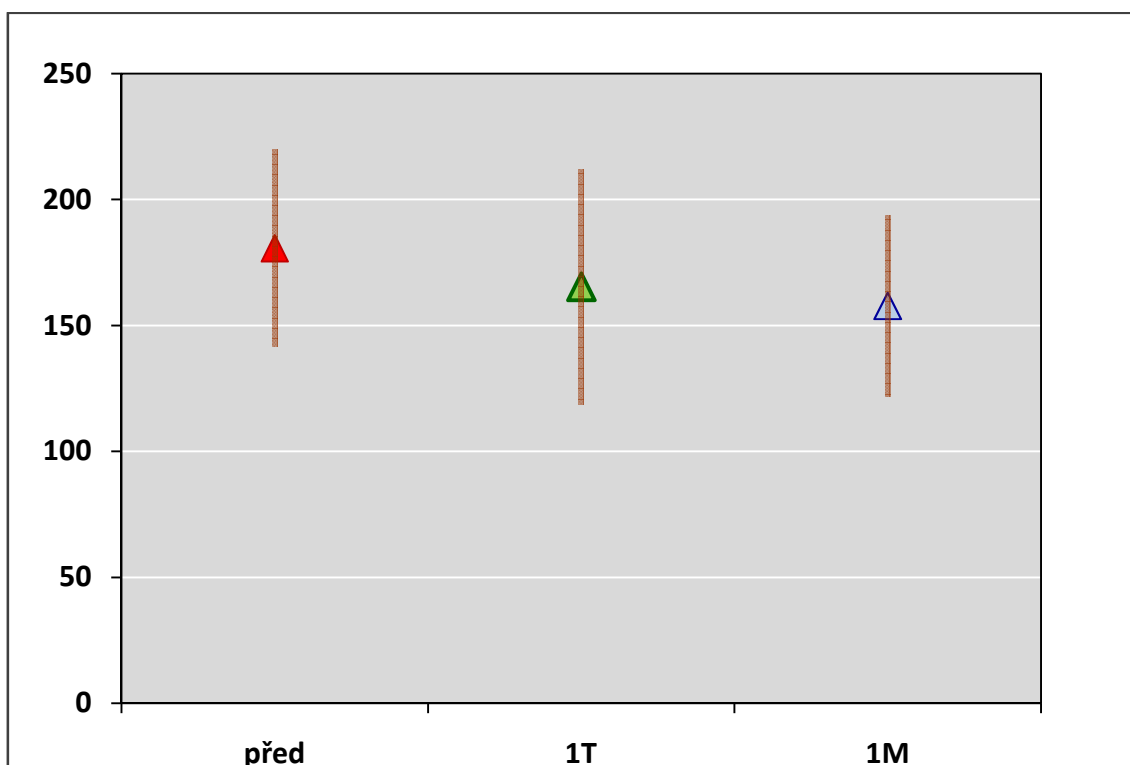
Z naměřených dat vyplynuly následující výsledky.

Průměr plochy rohovky, na níž byly parametry měřeny, byl před podstoupením operace  $371 \mu\text{m}^2 \pm 28 \mu\text{m}^2$ , po sedmi dnech od operace  $371 \mu\text{m}^2 \pm 29 \mu\text{m}^2$  a třicet dnů po operaci  $370 \mu\text{m}^2 \pm 30 \mu\text{m}^2$ .

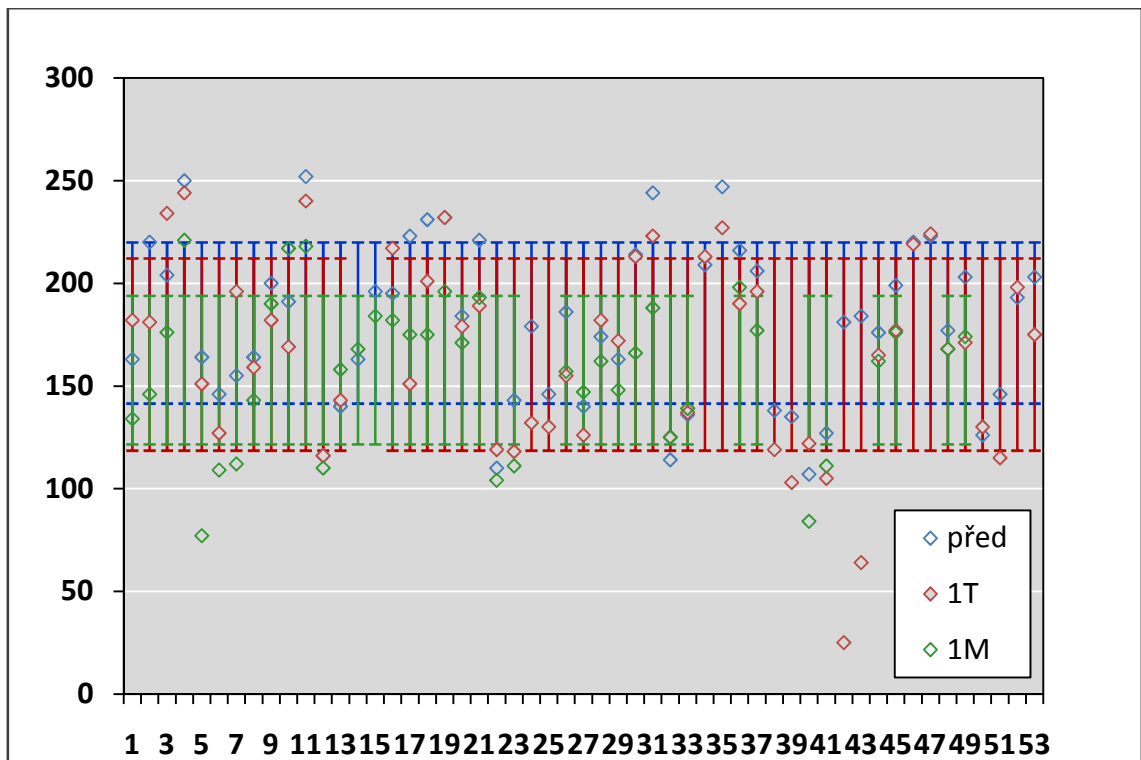
Průměrná hodnota standardní odchylky činila při měření před operací  $103 \mu\text{m}^2 \pm 22 \mu\text{m}^2$ , jeden týden po operaci  $102 \mu\text{m}^2 \pm 20 \mu\text{m}^2$  a po měsíci od operace  $105 \mu\text{m}^2 \pm 20 \mu\text{m}^2$ .

Průměrné procento koeficientu odchylky dosáhlo před operací  $29 \% \pm 6 \%$ , po sedmi dnech od provedení operace  $29 \% \pm 5 \%$  a třicet dnů po operaci  $30 \% \pm 6 \%$ .

Množství analyzovaných buněk před operací bylo průměrně  $181 \pm 39$  buněk, týden po operaci byl průměrný počet analyzovaných buněk  $165 \pm 49$  buněk a měsíc po operaci byl průměrný počet analyzovaných buněk  $158 \pm 36$  buněk.



**Graf 1: Průměrný počet analyzovaných buněk a směrodatná odchylka (před operací, týden po operaci a měsíc po operaci)**



**Graf 2: Hodnoty měření počtu buněk vnesených do grafu spolu s chybovými úsečkami znázorňující směrodatnou odchylku (před operací, týden a měsíc po operaci)**

Prvním vyhodnocením změny prošly hodnoty naměřené hustoty endotelových buněk před operací a jeden týden po ní. Pro posouzení rovnosti hodnot byl použit oboustranný T-test. Proměnnými v tomto testu byly hodnoty hustoty analyzovaných endotelových buněk z měření před operačním zákrokem a jeden týden po něm. Na základě tohoto testu nebyl mezi daty nalezen významný rozdíl. Průměrná hustota před operací dosáhla hodnot 2607 buněk se směrodatnou odchylkou  $\pm 535$  a sedm dní po operaci 2712 buněk se směrodatnou odchylkou  $\pm 209$  buněk. Tento rozdíl způsobily s největší pravděpodobností vnější vlivy.

Hodnota NUM před operací		Hodnota NUM 1 T po operaci		P
Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka	
2607	535	2712	209	0,1498

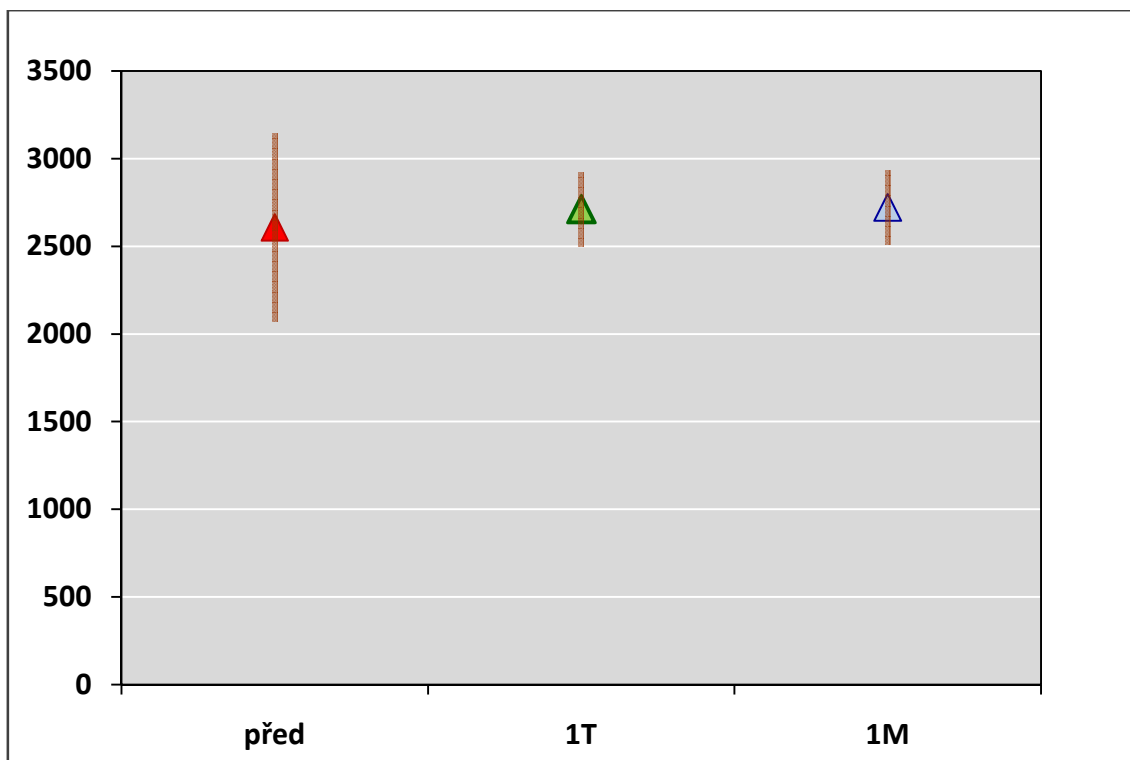
**Tabulka 1: Průměrná hodnota a směrodatná odchylka počtu NUM endotelových buněk na mm<sup>2</sup> před operací a jeden týden po operaci včetně mezní hodnoty hladiny významnosti P**

Zhodnocením změn prošly hodnoty naměřené hustoty endotelových buněk před operací a třicet dnů po ní. Proměnnými v tomto testu byly hodnoty hustoty analyzovaných endotelových buněk z měření před operačním zákrokem a jeden měsíc po něm. Na základě tohoto testu došlo ke zjištění rovnosti dat. Průměrná hustota před operací dosáhla hodnot 2607 buněk se směrodatnou odchylkou  $\pm 535$  a třicet dnů po operaci 2721 buněk se směrodatnou odchylkou  $\pm 210$  buněk. Tento rozdíl mohly s největší pravděpodobností způsobit vnější vlivy.

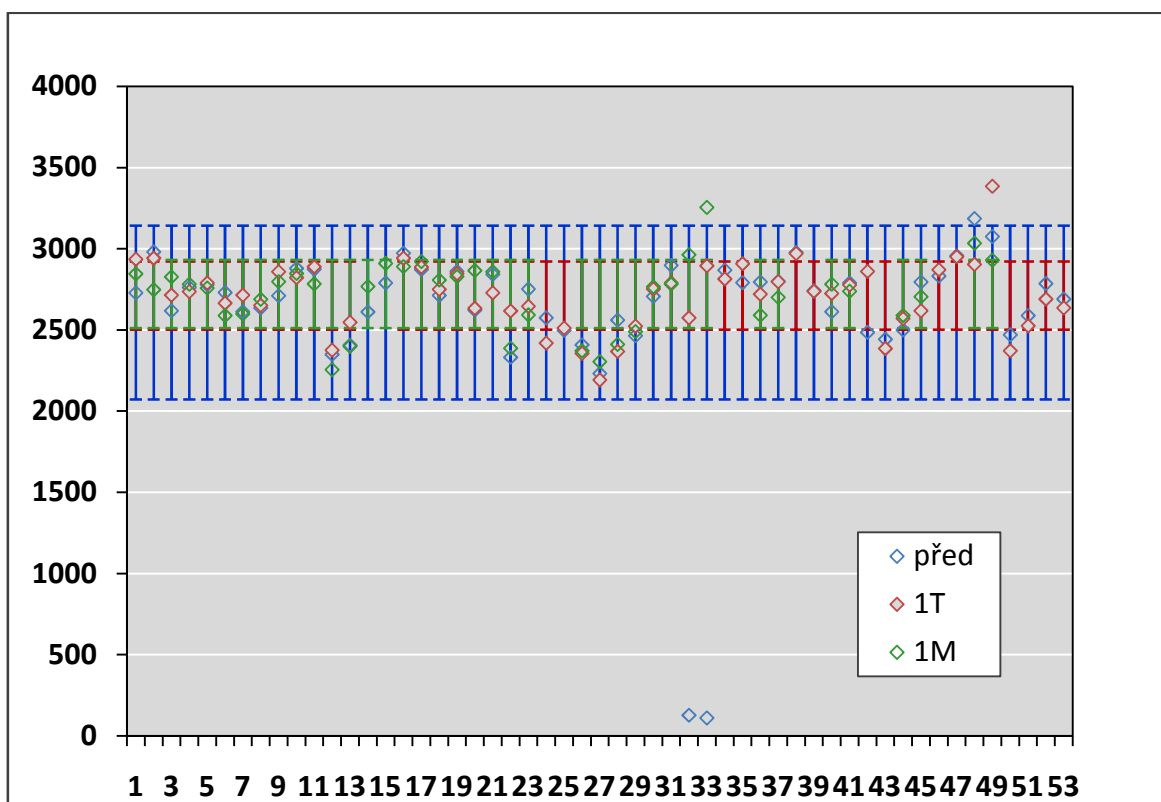
Hodnota NUM před operací		Hodnota NUM 1 M po operaci		P
Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka	
2607	535	2721	210	0,1915

**Tabulka 2: Průměrná hodnota a směrodatná odchylka počtu NUM endotelových buněk na mm<sup>2</sup> před operací a jeden měsíc po operaci včetně mezní hodnoty hladiny významnosti P**





Graf 3: Grafické znázornění hustoty buněk před operací, 1T a 1M po operaci se znázorněním směrodatné odchylky



Graf 4: Hodnoty měření hustoty buněk vynesené do grafu spolu s chybovými úsečkami znázorňující směrodatnou odchylku (před operací, týden a měsíc po operaci)

Dalším vyhodnocením změn prošly hodnoty hexagonality endotelových buněk před operací a jeden týden po ní. K posouzení, zda se data rovnají, byl použit oboustranný T-test. Proměnnými v tomto testu byly hodnoty hexagonality analyzovaných endotelových buněk z měření před operačním zákrokem a jeden týden po něm. Na základě tohoto testu došlo k zjištění nesignifikantního rozdílu. Průměrně 66 % buněk se směrodatnou odchylkou  $\pm 7$  % zahrnovalo měření před operací, po operaci tento průměr tvořilo 66 % se směrodatnou odchylkou  $\pm 6$  %

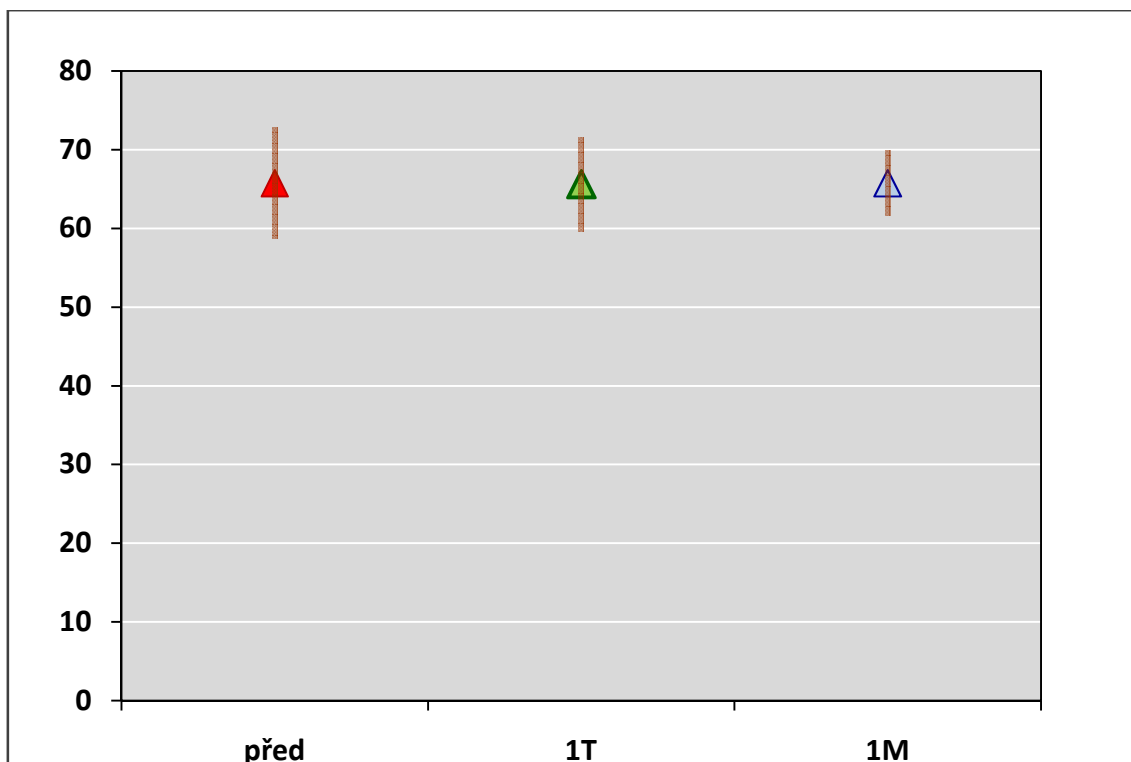
Hodnota HEX před operací		Hodnota HEX 1 T po operaci		P
Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka	
66	7	66	6	0,9721

**Tabulka 3: Průměrná hodnota a směrodatná odchylka hexagonality HEX endotelových buněk na mm<sup>2</sup> před operací a jeden týden po operaci včetně mezní hodnoty hladiny významnosti P**

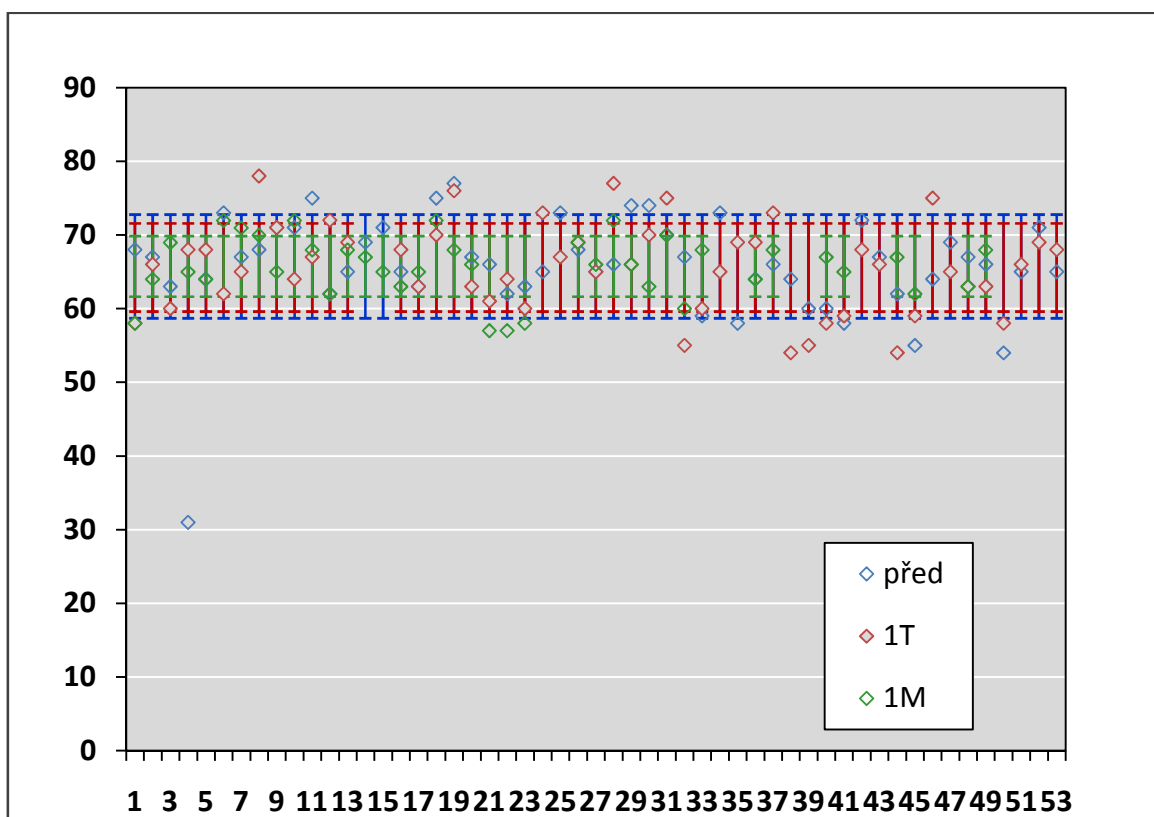
Na základě T-testu došlo k potvrzení rovnosti dat u srovnání poměru hexagonality buněk v době před operací a třicet dní po provedení operačního zákroku. Průměrná hexagonalita před operací dosáhla hodnot 66 % celkového počtu buněk se směrodatnou odchylkou 7 a třicet dnů po operaci 66 % počtu buněk se směrodatnou odchylkou 4 % buněk. Tento rozdíl mohly s největší pravděpodobností způsobit vnější vlivy.

Hodnota HEX před operací		Hodnota HEX 1 M po operaci		P
Průměr	Směrodatná odchylka	Průměr	Směrodatná odchylka	
66	7	66	4	1

**Tabulka 4: Průměrná hodnota a směrodatná odchylka hexagonality HEX endotelových buněk na mm<sup>2</sup> před operací a jeden měsíc po operaci včetně mezní hodnoty hladiny významnosti P**



Graf 5: Grafické znázornění průměrné hexagonality před operací, 1T a 1M po operaci se znázorněním směrodatné odchylky



Graf 6: Hodnoty měření hexagonality vynesené do grafu spolu s chybovými úsečkami znázorňující směrodatnou odchylku (před operací, týden a měsíc po operaci)

## 8.4 Diskuze

Uvedené výsledky zkoumají změny parametrů rohovkového endotelu. Vybrané parametry byly měřeny u probandů v době před podstoupením refrakční operace, sedm a třicet dnů po refrakčním zákroku metodou femtoLASIK. Hodnoty byly získávány měřením spekulárním mikroskopem.

Průměrný věk skupiny probandů je relativně nízký, 32 let. U mladších účastníků se nepředpokládají degenerativní změny endotelu, zároveň to poukazuje na fakt, že refrakční laserové operace jsou vhodné spíše pro nepresbyopický věk.

Zhodnocením párového T-testu v případě porovnávání proměnných ukazujících počet buněk/mm<sup>2</sup> před operací a sedmi i třicet dní po ní došlo k potvrzení původní domněnky, že počet endotelových buněk dojde jen k minimálním změnám způsobeným vlivem excimerového laseru. Při srovnávání proměnných udávajících procentuální hustotu šestistranných buněk (hexagonálitu) byly také vyhodnoceny malé změny při porovnávání dat před operací s daty sedm a třicet dní po ní.

Vědci z amerického výzkumného pracoviště uvádějí ve své studii, v níž zkoumali endotel po pěti letech od provedení refrakčních operací, že změny hexagonality i standardní odchylky po uplynulé době byly jen v řádech desetin procent. (20) Španělští vědci zveřejnili ve své studii výsledek bez žádných signifikantních změn hexagonality nebo hustoty buněk endotelu rohovky u různého pohlaví i věku. (21)

Oproti zahraničním studiím byl čas věnovaný vlastní výzkumné části kratší. Změny v měřených parametrech tedy není možné porovnat s odstupem doby delší než třicet dní po refrakčním zákroku. Nízký počet probandů účastnících se výzkumné části může vydat výsledek ne úplně odpovídající skutečnosti. Avšak i přes tento rozdíl ve stáří dat a relativně malý vzorek účastníků se s ohledem na zahraniční studie potvrdila domněnka minimálních změn endoteliálních buněk rohovky po působení excimerového laseru.

Do budoucna by tato studie mohla být podkladem a podnětem k dalšímu zkoumání vlivů rohovkových i nitroočních refrakčních operací s větším počtem

probandů. Výzkum zaměřený na změny endotelu po operaci katarakty by byl neméně důležitý. Operace katarakty má na endotel rohovky větší vliv než laserová refrakční operace. Svou roli zde hraje i věk operovaných pacientů a tím i větší riziko endoteliálních dystrofií a degenerací projevujících se právě v pozdějším věku.

## 9. ZÁVĚR

Moderní doba vyžaduje perfektní zrakovou ostrost. Pracovní i volnočasové aktivity jsou náročné na dobré vidění a brýle nebo kontaktní čočky jsou mnohdy překážkou v jejich vykonávání. Pro zvýšení komfortu osob s refrakční vadou byly vyvinuty refrakční operace. Kromě neoddiskutovatelných výhod ovšem přinášejí i rizika. Některá rizika jsou všeobecně známá, o jiných se mluví zřídka.

Laserové metody odstranění dioptrií jsou rychlé a téměř bezbolestné. Lasery používané v refrakční chirurgii mají natolik přesné působení, že k poškozením okolních tkání spíše nedochází. Otázka změn endotelu rohovky po absolvování laserové refrakční operace byla předmětem této diplomové práce.

Diplomová práce se na úvod zabývá popisem anatomie, embryologie, morfologie, fyziologie a patologie endotelu rohovky. Obsahuje popis vyšetřovacích metod při posuzování kvantity a kvality endotelu, seznámení s principem a působením excimerového laseru a stručný popis a charakteristiku refrakčních rohovkových a nitroočních očních operací.

Výzkumná část posuzuje změny parametrů endotelu měřené bezkontaktním spekulárním mikroskopem před laserovou refrakční operací a sedm a třicet dní po operaci. Zahraniční výzkumy popisují, že změny endotelu rohovky po provedení laserových operací jsou jen velmi malé (21) a bez velkých procentuálních signifikantních projevů (20). Tento výsledek byl s přihlédnutím k zahraničním výzkumům očekáván a samotným posuzováním naměřených parametrů potvrzen.

Hodnota tohoto výzkumu spočívá v prohloubení zájmu o problematiku nejen laserové refrakční chirurgie ale také nitrooční. Nitrooční operace, refrakční i kataraktové, mají podle dostupných poznatků na endotel mnohem větší vliv. Tímto směrem by se tedy mohl ubírat další zájem výzkumu endoteliálních změn.

## Seznam použité literatury

1. **Kanski, Jack J. a Bowling, Brad.** *Clinical Ophthalmology: A Systematic Approach, 7th ed.* London : Elsevier, 2011. 978-0-7020-4093-1.
2. **Kuchynka, Pavel a kol.** *Oční lékařství.* Praha : Grada Publishing a.s., 2007. ISBN 978-80-247-1163-8.
3. **Anonymous.** *MISSION FOR VISION.* [Online] 2005.  
<http://www.images.missionforvisionusa.org/anatomy/2005/10/cornea-histology.html>.
4. **Gerinec, Anton.** *Detská oftalmológia.* Martin : Vydavateľstvo Osveta, 2005. 80-8063-181-6.
5. **Sadler, Thomas W.** *Langmanova lékařská embryologie.* Praha : Grada Publishing, 2011. 978-80-247-2640-3.
6. **Jirsová, Kateřina.** Tkáně - oční tkáň: Koordinační středisko transplantací. *Web Koordinační středisko transplantací.* [Online] [http://www.kst.cz/web/?page\\_id=2807](http://www.kst.cz/web/?page_id=2807).
7. **Agarwal, Sunita, Agarwal, Athiya a Apple, David J.** *Textbook of Ophthalmology.* New Delhi : Jaypee Brothers Publishers, 2002. 81-7179-884-5.
8. **Kraus, Hanuš a kolektiv.** *Kompendium očního lékařství.* místo neznámé : Grada Publishing, 1997. 80-7169-079-1.
9. **Craig, Thomas.** Use Specular Microscopy to Diagnose Corneal Disease. *Review of Optometry.* [Online] 15. 6 2009. <http://www.revoptom.com/content/d/cornea/c/14605/>.
10. **Klemensová, Regina.** *Analýza rohovky.* Praha : Přednáškový materiál k výuce předmětu Analýza rohovky, Univerzita Palackého v Olomouci, 2010.
11. **www.missionforvisionusa.org.** Cornea Histology: MISSION FOR VISION. *MISSION FOR VISION.* [Online] <http://www.missionforvisionusa.org/>.
12. **Basak, Samar K.** *Diseases of the cornea.* New Delhi : Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd, 2011. 978-93-5025-261-1.
13. **Yanoff, M. a Duker, J.** *Ophthalmology: Expert Consult: Online and Print, 4th edition.* místo neznámé : Elsevier Inc., 2013. Elektronická kniha. 978-1-4557-3983-7.
14. **Petrová, S. a kolektiv.** *Základy aplikace kontaktních čoček.* Brno : Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, 2008. 978-80-7013-470-2.
15. **Shaarawy, T.M., a další.** *Glaucoma: Medical Diagnosis & Therapy.* London : Elsevier, 2009. 978-0-7020-2977-6.
16. **Basting, Dirk a Marowsky, Gerd.** *Excimer Laser Technology.* Berlin : Springer, 2005. 3-540-20056-8.

17. **Vrbová, Miroslava, Jelínková, Helena a Gavrilov, Petr.** *Úvod do laserové techniky.* Praha : Vydavatelství ČVUT, 1998. 80-01-01108-9.
18. **Krueger, Ronald R., Rabinowitz, Yaron S. a Binder, Perry S.** Healy Ophthalmology. *The 25th Anniversary of Excimer Lasers in Refractive Surgery: Historical Review.* [Online] 2010. <http://www.healy.com/ophthalmology/journals/jrs/%7Bd5a84af8-a420-4ebeb7a3-f8e4922848d7%7D/the-25th-anniversary-of-excimer-lasers-in-refractive-surgery-historical-review>.
19. **Hendl, Jan.** *Přehled statistických metod: analýza a metaanalýza dat.* Praha : Portál, s.r.o., 2009. 978-80-7367-482-3.
20. **Klingler KN, McLaren JW, Bourne WM, Patel SV.** Corneal endothelial cell changes 5 years after laser in situ keratomileusis: femtosecond laser versus mechanical microkeratome. *Journal of cataract and refractive surgery.* 2012, Sv. 38.
21. **Pérez-Santonja JJ, Sakla HF, Gobbi F, Alió JL.** Corneal endothelial changes after laser in situ keratomileusis. *Journal of cataract and refractive surgery.* 1997, Sv. 23.



## Seznam grafů

Graf 1: Průměrný počet analyzovaných buněk a směrodatná odchylka (před operací, týden po operaci a měsíc po operaci).....	38
Graf 2: Hodnoty měření počtu buněk vynesných do grafu spolu s chybovými úsečkami znázorňující směrodatnou odchylku (před operací, týden a měsíc po operaci) .....	39
Graf 3: Grafické znázornění hustoty buněk před operací, 1T a 1M po operaci se znázorněním směrodatné odchylky.....	41
Graf 4: Hodnoty měření hustoty buněk vynesné do grafu spolu s chybovými úsečkami znázorňující směrodatnou odchylku (před operací, týden a měsíc po operaci) .....	41
Graf 5: Grafické znázornění průměrné hexagonálnosti před operací, 1T a 1M po operaci se znázorněním směrodatné odchylky.....	43
Graf 6: Hodnoty měření hexagonálnosti vynesné do grafu spolu s chybovými úsečkami znázorňující směrodatnou odchylku (před operací, týden a měsíc po operaci) .....	43

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Histologický obraz rohovky (3).....	8
Obrázek 2: Fyziologický obraz endotelu zachycený endotelovým mikroskopem (10) .....	10
Obrázek 3: Pleomorfismus endotelových buněk.....	10
Obrázek 4: Snímek cornea guttata pořízený spekulárním mikroskopem (10) .....	15
Obrázek 5: Fuchsova dystrofie zachycená spekulárním mikroskopem (10) .....	16
Obrázek 6: Zadní polymorfní dystrofie zachycená spekulárním mikroskopem (10) .....	17
Obrázek 7: Schéma spekulárního mikroskopu s kontaktní čočkou (13).....	21
Obrázek 8: Princip pozorování endotelu na štěrbinové lampě (13).....	22
Obrázek 9: Vysokorychlostně zachycený snímek rozptylu rohovky fotoablaží (18).....	26
Obrázek 10: Ukázka působení „flying spots“ na rohovku .....	27
Obrázek 11: Ablace tkáně při operaci myopie (13).....	29
Obrázek 12: Ablace tkáně při operaci hypermetropie (2).....	29
Obrázek 13: Astigmatická incizní keratotomie (2).....	32
Obrázek 14: Intrastromální kroužky (2) .....	32
Obrázek 15: Záznam výsledků měření z endotelového mikroskopu .....	37

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Průměrná hodnota a směrodatná odchylka počtu NUM endotelových buněk na mm <sup>2</sup> před operací a jeden týden po operaci včetně mezní hodnoty hladiny významnosti P .....	40
Tabulka 2: Průměrná hodnota a směrodatná odchylka počtu NUM endotelových buněk na mm <sup>2</sup> před operací a jeden měsíc po operaci včetně mezní hodnoty hladiny významnosti P .....	40
Tabulka 3: Průměrná hodnota a směrodatná odchylka hexagonálnosti HEX endotelových buněk na mm <sup>2</sup> před operací a jeden týden po operaci včetně mezní hodnoty hladiny významnosti P .....	42
Tabulka 4: Průměrná hodnota a směrodatná odchylka hexagonálnosti HEX endotelových buněk na mm <sup>2</sup> před operací a jeden měsíc po operaci včetně mezní hodnoty hladiny významnosti P .....	42

## Seznam zkratek

lat.	latinsky
tzv.	takzvaný/ -á /-é
např.	například
angl.	anglicky
CHED	kongenitální hereditární endotelová dystrofie (angl. congenital hereditary endothelial dystrophy)
PPD	zadní polymorfní dystrofie (angl. posterior polymorphous dystrophy)
PRK	photorefractive keratectomy
LASEK	Laser sub epithelial keratomileusis
LASIK	laser in situ keratomileusis
ICR	intrastromal corneal ring, intrastromální kroužky
ICRS	intrastromal corneal ring segment, výseč intrastromálního kroužku
PMMA	polymethylmetakrylát
CLE	clear lens extraction
ArF laser	argon – fluoridový laser