

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**Lékařská fakulta v Hradci Králové**

# **DISERTAČNÍ PRÁCE**



Doktorský studijní program

**Oční lékařství**

**LÉČBA KERATOKONU METODOU  
AKCELEROVANÉHO CROSSLINKINGU ROHOVKY**

**TREATMENT OF KERATOCONUS  
USING ACCELERATED CORNEAL CROSS-LINKING**

**MUDr. Věra Veliká**

Školitel: prof. MUDr. Frederik Raiskup, Ph.D.

Hradec Králové, 2018

## Prohlášení autora

---

### Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy v Praze.

Hradec Králové, 2018

MUDr. Věra Veliká

## **Poděkování**

Děkuji tímto panu prof. MUDr. Frederiku Raiskupovi, Ph.D., FEBO za odborné vedení při studiu, dále panu prof. MUDr. Pavlu Rozsivalovi, CSc., FEBO a paní prof. MUDr. Nadě Jiráskové, Ph.D., FEBO za poskytnutí možnosti postgraduálního studia. Za spolupráci při statistickém hodnocení dat děkuji panu ing. Josefu Kvasničkovi.

## **OBSAH**

<b>Prohlášení autora</b>	<b>4</b>
<b>Poděkování</b>	<b>5</b>
<b>Obsah</b>	<b>6</b>
<b>Seznam použitých zkratk</b>	<b>8</b>
<b>Souhrn</b>	<b>11</b>
<b>1. Úvod do problematiky</b>	<b>12</b>
<b>1.1. Keratokonus</b>	<b>12</b>
1.1.1. Historie	12
1.1.2. Etiopatogeneze keratokonu	14
1.1.3. Biochemické změny v rohovce u keratokonu	18
1.1.4. Biomechanické změny rohovky u keratokonu	20
1.1.5. Histopatologický nález u keratokonu	21
1.1.6. Biomikroskopický nález u keratokonu	25
1.1.7. Symptomy	29
1.1.8. Klasifikace keratokonu	30
1.1.9. Diagnostika keratokonu	34
1.1.10. Léčba keratokonu	36
<b>1.2. Corneal cross-linking</b>	<b>39</b>
1.2.1. Indikace k provedení CXL	40
1.2.2. Mechanismus CXL	41
1.2.3. Základní účinky CXL	43
1.2.4. Standardní metoda CXL	44
1.2.5. Modifikace standardního provedení CXL	44
1.2.6. Kombinace CXL a jiných metod	51
1.2.7. Bezpečnost CXL	53
<b>2. Cíl práce</b>	<b>54</b>
<b>3. Metodika</b>	<b>54</b>
3.1. Soubor	54
3.2. Sledované parametry	56
3.3. Průběh zákroku, pooperační péče	57
3.4. Statistické zpracování	58
<b>4. Výsledky</b>	<b>58</b>

<b>4.1. Zraková ostrost</b>	<b>58</b>
<b>4.2. Keratometrické hodnoty</b>	<b>63</b>
<b>4.3. Astigmatismus rohovky</b>	<b>66</b>
<b>4.4. Pachymetrie</b>	<b>69</b>
<b>5. Diskuse</b>	<b>75</b>
<b>6. Závěr</b>	<b>80</b>
<b>7. Literatura</b>	<b>82</b>

## Seznam použitých zkratk

ACXL	Accelerated Corneal Cross-linking, akcelerovaný crosslinking rohovky
ALDH	Aldehyddehydrogenáza
angl.	anglicky
Arg134Cys	mutace genu - nahrazuje aminokyselinu cystein aminokyselinou arginin v pozici 134 v proteinu vytvořeném tímto genem
ARVO	The Association for Research in Vision and Ophthalmology
BAC	Benzalkoniumchlorid
BFS	Best Fit Sphere
CACXL	Contact Lens-assisted Cross-linking
CD45	transmembránová fosfotyrozínová fosfatáza
CH	Corneal Hysteresis
CNVs	Copy Number Variations
COL1A1	gen kódující strukturální proteiny kolagenu
COL4A3	gen kódující strukturální proteiny kolagenu
COL4A4	gen kódující strukturální proteiny kolagenu
CRF	Corneal Resistance Factor
CXL	Corneal Cross-linking, crosslinking rohovky, zesíťování kolagenu rohovky
D	dioptrie
Da	dalton
DALK	hluboká přední lamelární keratoplastika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DOCK9	gen regulující expresi G proteinu
EDTA	sodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové
GWAS	Genome-wide Association Study, celogenomové asociační studie
HGF	gen pro růstový faktor pro hepatocyty
ICAM	intracelulární adhezivní molekula
ICRS	Intastromal Corneal Ring Segment, umělé intrastromální rohovkové segmenty
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
J	joule



J/cm <sup>2</sup>	joule na centimetr čtverečný
K <sub>max</sub>	maximální hodnota zakřivení přední plochy rohovky
K <sub>mean</sub>	průměrná hodnota keratometrie přední plochy rohovky
K1	hodnota keratometrie přední plochy rohovky v nejplošším meridiánu
K2	hodnota keratometrie přední plochy rohovky v nejstrmějším meridiánu
LASIK	Laser Assisted Stroma In Situ Keratomileusis
LOX	lysoxidáza
Mir-184	krátká nekódující molekula ribonukleové kyseliny
mm	milimetr
mtDNA	mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
mW/cm <sup>2</sup>	miliwatt na centimetr čtverečný
nm	nanometr
NZO	nejlépe korigovaná zraková ostrost
OSI	Oxidative Stress Index
PiCXL	fotorefrakční intrastromální crosslinking
PKP	perforující keratoplastika
PMMA	polymethylmetakrylát
PRK	fotorefrakční keratektomie
RAB3GAP1	gen pro katalytickou podjednotku proteinu aktivující GTPázu
RMS	Root Mean Square
SE	sférický ekvivalent
SOD1	superoxiddismutáza
SMILE	Small Incision Lenticule Extraction
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPARC	Secreted Protein, Acidic and Rich in Cysteine
TE CXL	Transepithelial Corneal Cross-linking, transepitelální crosslinking rohovky
TIMP3	tkáňový inhibitor metaloproteinázy
TNF-alfa	Tumornecrosis Faktor alfa
Topo-PRK	Topography-guided photorefractive keratectomy, dle topografu přizpůsobená fotorefrakční keratektomie
TOS	Total Oxidant Status
UVA	ultrafialové záření A
UVB	ultrafialové záření B

VCAM1	molekula buněčné adheze
VSX1	Visual System Homeobox 1
ZO	nekorigovaná zraková ostrost
μm	mikrometr

## **Souhrn:**

Práce se zabývá léčbou progredujícího keratokonu metodou akcelerovaného crosslinkingu rohovky (ACXL). Obsahuje vyhodnocení souboru pacientů, kteří podstoupili tuto léčebnou metodu na Oční klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové v letech 2012 - 2014. Byly sledovány tyto parametry: nekorigovaná zraková ostrost (ZO), nejlépe korigovaná zraková ostrost (NZO), hodnota keratometrie rohovky v nejplošším (K1) a nejstrmějším (K2) meridiánu, hodnota maximálního zakřivení přední plochy rohovky (K<sub>max</sub>), hodnota rohovkového astigmatismu a pachymetrie v nejtenčím místě rohovky. Předoperační data byla porovnána s výsledky získanými za 6 měsíců, 1 rok a 2 roky po operačním zákroku. Výsledky byly statisticky zpracovány neparametrickým Wilcoxonovým testem.

Ve sledovaném souboru pacientů jsme zaznamenali statisticky významné zlepšení keratometrických hodnot (K2) a hodnot rohovkového astigmatismu ve dvouletém sledování. V období do 1 roku po operaci bylo zjištěno signifikantní ztenčení rohovky.

Klíčová slova: keratokonus, akcelerovaný corneal cross-linking

## **Summary:**

The study evaluates the efficacy of treatment of progressive keratoconus using Accelerated Corneal Cross-linking (ACXL) method. It includes evaluation of patients who underwent ACXL method at the Dept. of Ophthalmology of University Hospital in Hradec Králové between 2012 - 2014. Uncorrected distance visual acuity, best corrected visual acuity, keratometry (K1, K2, K<sub>max</sub>), corneal astigmatism and corneal pachymetry were measured preoperatively, in 6 months, 1 year a 2 years after the surgery. The results were statistically analysed by non-parametric Wilcoxon test. Steep keratometry (K2) and corneal astigmatism was statistically significant decreased. The pachymetry in the thinnest location was preoperatively  $469 \pm 33 \mu\text{m}$ . The value of pachymetry was statistically significant decreased in 1 year after the surgery by comparison with preoperative value.

Key words: keratoconus, Accelerated Corneal Cross-linking

## 1. Úvod do problematiky

Biochemické a biomechanické vlastnosti rohovky zásadním způsobem ovlivňují její optické vlastnosti. I minimální změny těchto parametrů mohou způsobit narušení stability rohovkové tkáně a vznik tzv. ektázie. Nejčastější formou ektatického onemocnění rohovky je keratokonus. Projevuje se progresivním ztenčováním a kónickým vyklenováním rohovky. Vzniká nepravidelný astigmatismus a myopie, což vede k poruše optického systému oka a snížení zrakové ostrosti.

V posledních letech došlo k výraznému rozšíření léčebných metod, které umožňují ovlivnit průběh tohoto onemocnění a zlepšit kvalitu života pacientů s keratokonem. Jednou z nich je crosslinking rohovky (corneal cross-linking - CXL). Jedná se o druh fotodynamické terapie, při které vznikají nové chemické vazby mezi kolagenními vlákny předního stromatu rohovky, umožňující zpevnění rohovky a obnovení její biochemické a biomechanické stability.

### 1.1. Keratokonus

Keratokonus (z řeckého slova kerato = roh, konos = kužel) je ektatické onemocnění, při kterém dochází k progresivnímu ztenčování a kónickému vyklenování oční rohovky. Následkem tohoto procesu dochází ke snížení zrakové ostrosti způsobené vznikem nepravidelného astigmatismu a v pokročilém stadiu jizvením rohovky (36). Mezi subjektivní potíže pacienta s keratokonem patří rozostřené vidění, monokulární diplopie až vícenásobné rozdělení obrazu, světloplachost a svědění oka. Při postižení obou očí může dojít k výraznému snížení kvality života pacienta. Keratokonus je dnes možno odhalit již v raných stádiích a správně volenou léčbou zabránit často plíživé a nenápadné progresi tohoto onemocnění.

#### 1.1.1. Historie

První záznamy o tomto onemocnění se datují do 18. století. V roce 1748 německý profesor anatomie a chirurgie a průkopník oftalmologie Burchard David Mauchart

(1696 - 1751) provedl ve své disertační práci jednoduchý popis onemocnění, při kterém se vyklenuje rohovka a nazval jej stafyloma diaphanum. V roce 1854 onemocnění podrobně a jasně popsal britský lékař John Nottingham. Stav pojmenoval kónickou rohovkou a zaznamenal několik klasických znaků nemoci, čímž toto onemocnění odlišil od jiných ektatických onemocnění rohovky (8). Další pokrok v diagnostice keratokonu nastal v roce 1859, kdy britský chirurg William Bowman dokázal pomocí oftalmoskopu diagnostikovat keratokonus. Popsal, jak nejlépe zkoumat kónický tvar rohovky pomocí pozorovacího zrcátka. Bowman byl také prvním, kdo se pokoušel keratokonus korigovat chirurgicky (22). V roce 1862 podrobně osvětlil toto onemocnění ve své monografii Friedrich August von Ammon, profesor Lékařské akademie v Drážďanech (10). Slovo keratokonus poprvé použil ve své práci „On the treatment of keratoconus“ švýcarský oftalmolog Johann Horner v roce 1869 (77). V r. 1888 francouzský oftalmolog Eugene Kalt začal korigovat keratokonus kompresí strmého apexu rohovky pomocí skleněné kontaktní čočky. Od začátku 20. století se možnosti diagnostiky a léčby keratokonu výrazně rozšířily. První úspěšná transplantace rohovky jako léčba keratokonu byla provedena v roce 1936 (dr. Ramon Castroviejo). Po dlouhou dobu byla transplantace rohovky jedinou možnou chirurgickou léčbou tohoto onemocnění. V letech 1993 - 1997 byla prof. Theo Seilerem a prof. Eberhardem Spoerlem na Technické univerzitě v Drážďanech vyvíjena a zkoumána nová přelomová metoda vedoucí ke stabilizaci keratokonické rohovky nazvaná crosslinking rohovky (CXL). Cílem této léčebné metody je stabilizace rohovky v případě progredující mírné až střední formy keratokonu. Široké využití této metody v současnosti ve výsledku znamená nižší procento prováděných transplantací rohovky v rámci léčby keratokonu (170). Dalším cílem výzkumu dnešní doby je zhodnocení efektu různých modifikací tohoto léčebného zákroku. Jednou z nich je tzv. akcelerovaný crosslinking rohovky (Accelerated corneal cross-linking, ACXL). Hodnocením výsledků léčby progresivního keratokonu pomocí této metody se zabývá tato disertační práce.

Současně dnes existují i další chirurgické postupy, kterými můžeme dokonce docílit lepšího refrakčního stavu oka u pacientů s keratokonem, jako např. implantace intrastromálních rohovkových prstenců, dle topografu přizpůsobená fotorefrakční keratektomie nebo implantace fakických nitroočních čoček (95, 164, 169).

### 1.1.2. Etiopatogeneze keratokonu

Etiopatogeneze keratokonu je multifaktoriální a pravděpodobně představuje konečnou společnou cestu pro celou řadu různých patologických procesů. Ačkoli rodinná anamnéza je přítomna pouze v menšině případů, současný výzkum na úrovni molekulární genetiky podává celou řadu důkazů o vlivu genetických faktorů na rozvoj tohoto onemocnění (42).

Jako první prokázal tuto skutečnost ve své práci Rabinowitz a spol. (209). V současné době jsou již dostupné studie, které se zabývají identifikací nových výzkumných strategií zaměřených na odhalení genetické predispozice a vlivu zevního prostředí na fenotypovou expresi tohoto onemocnění (42).

Keratokonus se vyskytuje buď izolovaně, nebo jako součást jiných onemocnění, např. vernální konjunktivitida, granulární dystrofie rohovky, zadní polymorfni dystrofie rohovky (115). Vzácná, autozomálně dominantní forma těžkého keratokonu sdružená s přední polární kataraktou je způsobena mutací v krátké nekódující molekule ribonukleové kyseliny (Mir-184) (80). Známa je dále asociace keratokonu s atopickým ekzémem, sennou rýmou, alergií, nebo deficitem hořčíku. Významný je rovněž častější výskyt keratokonu v souvislosti s některými vrozenými genetickými a systémovými chorobami (Turnerův syndrom, Chandlerův syndrom, hypotyreoidismus, Marfanův syndrom, Laurence-Moon-Biedlův syndrom, Riegerův syndrom, neurofibromatóza, Leberova kongenitální amauróza (127), Ehlers-Danlosův syndrom (159), prolaps mitrální chlopně, Apertův syndrom, Crouzonův syndrom, Angelmanův syndrom, Noonanův syndrom, osteogenesis imperfecta). Nález keratokonu u lidí postižených Downovým syndromem je výrazně častější než v běžné populaci, i když důvody tohoto spojení ještě nebyly přesně stanoveny (146).

Pozitivní rodinnou anamnézu má 6 až 23,5 % postižených keratokonem s vyšším výskytem u monozygotních dvojčat (42, 145). Podobně jako u jiných očních genetických poruch, mají i příbuzní pacientů s keratokonem vyšší riziko rozvoje tohoto onemocnění (15 - 67krát vyšší) ve srovnání s příbuznými zdravých osob (104). Skutečnost, že jde o onemocnění s možným familiárním výskytem uvádí i další studie (223, 200). Autosomálně dominantní dědičnost je častější a je obvykle hlášena v rodinách, které vykazují neúplné penetrance s variabilní expresivitou (19).

Cenným nástrojem v klinické diagnostice keratokonu je identifikace specifických genetických markerů. V současné době existuje více genomických přístupů, které se využívají k identifikaci chromozomálních míst a genů zapojených do patogeneze keratokonu.

Neocenitelné nahlédnutí do identifikace kandidátních genetických lokusů, které mohou nést patogenní mutace, poskytují tzv. vazebné „family-based linkage“ analýzy. Pomocí těchto metod již bylo identifikováno nejméně 17 genomických lokusů, což svědčí o genetické heterogenitě v epidemiologii tohoto onemocnění. Keratokonus by tedy mohl být způsoben mutacemi v řadě různých genů v různých rodinách (106, 161).

Mezi další významné přístupy používané k identifikaci genetických komponent v rodinách s podezřením na dominantní formy keratokonu se nazývá analýza kandidátních genů. Genetický výzkum se soustředí především na geny LOX, VSX1, SOD1, DOCK9, RAB3GAP1 a HGF (213).

V případě keratokonu se předpokládá, že je přítomen defekt genu pro enzym lisyloxidázu (LOX) (197), jiné studie však toto vyvracejí. Lisyloxidáza je extracelulární enzym, který katalyzuje tvorbu aldehydů z lysinových zbytků v kolagenu a elastinu. Tyto aldehydy jsou vysoce reaktivní, a podrobují se další spontánní chemické reakci s tvorbou vazeb, což má zásadní význam pro stabilizaci kolagenních a elastinových vláken a integritu a pružnost zralého kolagenu a elastinu (33). Na potenciální roli tohoto genu v etiopatogenezi keratokonu poukazuje meta-analýza autorů Zhang a kol. (225). Pro ověření výsledků jsou však nutné další rozsáhlejší a multietnické genetické studie.

De Bonis provedl na základě mutační analýzy pěti genů VSX1, SPARC, SOD1, LOX, a TIMP3 sekvenování a fragmentační analýzu u 302 pacientů s diagnózou keratokonu. Nové mutace byly nalezeny v genu pro VSX1. Nové a již hlášené variace byly identifikovány i v architektuře genů SPARC a SOD1. V LOX a TIMP3 nebyly identifikovány žádné patogenní varianty (37).

Gen VSX1 (Visual System homeobox 1) se účastní regulace exprese genů pro opsin zevních segmentů fotoreceptorů během embryonálního vývoje (71, 84). Mutace v genu VSX1 byly poprvé prokázány v souvislosti se zadní polymorfni dystrofií rohovky (73). Od té doby je exprese VSX1 v lidské rohovce stále diskutována a zkoumána (136). Je známo, že VSX1 je vyjádřen v keratocytech

pouze u poraněné rohovky a je spojen s fibroblastickou transformací (15). V současnosti již existuje celá řada studií, zabývajících se problematikou mutace tohoto genu v souvislosti s etiopatogenezí keratokonu. I když VSX1 zůstává nejčastěji studovaným genem v rámci studie keratokonu, v současné době trvá závěr, že tento gen nemá významnou roli v molekulární etiologii tohoto onemocnění, neboť data z různých populací naznačují, že patogenetické mutace tohoto genu byly identifikovány pouze u 2 – 3 % pacientů s keratokonem. Tato zjištění jsou současně v souladu s koncepcí genetické různorodosti tohoto onemocnění (35, 73, 166).

Jednou z nejdůležitějších funkcí rohovky je neutralizace volných radikálů a oxidantů, které vznikají jako produkt buněčného metabolismu a expozice ultrafialového záření. K zajištění této funkce slouží enzymy superoxiddismutáza, glutathion peroxidáza a další (186). Enzym superoxiddismutáza 1, kódovaný genem SOD1, byl shledán rovněž autory Wojcik a kol. jako potenciální kandidát pro vznik keratokonu, neboť oxidativní stres je jednou z hlavních hypotéz vzniku tohoto onemocnění (214). Alterace antioxidační cesty může vést k akumulaci toxických bioproduktů, které případně mohou indukovat apoptózu buněk rohovky. Je známo, že mutace v genu SOD1 se podílí na vzniku familiární amyotrofické laterální sklerózy (162). Přestože studie Topraka a kol. prokazuje statisticky významně zvýšené sérové hodnoty tzv. „total oxidant status“ (TOS) a „oxidative stress index“ (OSI) u pacientů s keratokonem oproti zdravé kontrolní skupině (203) a de Bonis prokazuje na základě mutační analýzy určité nové variace v genu SOD1 u pacientů s keratokonem, mnohé studie mutace v genu SOD1 neprokázaly. Zůstává tedy stále nejasné, zda SOD1 hraje roli v patogenezi keratokonu (213).

Jiné studie poukazují na přítomnost edému mitochondrií buněk rohovky postižených keratokonem (6). Tyto buňky rohovky vykazují poškození mitochondriální deoxyribonukleové kyseliny (mtDNA) ve větší míře, než v případě zdravé rohovky (12). Další výzkum v této oblasti zjišťuje, že fibroblasty keratokonické rohovky vykazují hypersenzitivní reakci na oxidativní stres, což způsobuje mitochondriální dysfunkci a poškození mtDNA (86). V důsledku těchto zjištění se shledává možnost přecitlivělosti fibroblastů na oxidační stres jako další možná příčina rozvoje a progresu keratokonu (85). V současné době existuje několik studií, které prokázaly mutace genu pro mtDNA u pacientů s keratokonem (4, 140). Pro objasnění role oxidativního stresu a relevanci mitochondriálních genů



v etiopatogenezi keratokonů jsou nutné další studie velkých kohort různých etnických skupin.

Gen DOCK9 reguluje expresi G proteinu, který se účastní buněčné signalizační kaskády. Rovněž mutace v tomto genu je v současné době zkoumána a potvrzuje se její možná součinnost v patogenezi keratokonů (96).

Další z významných genů, které je nutno zmínit v rámci výzkumu etiopatogeneze keratokonů a jehož variace byly identifikovány je gen SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) (11). Tento gen kóduje protein, který vyvolává změny tvaru buněk, kalcifikaci kostní hmoty, inhibuje progresi buněčného cyklu a má vliv na syntézu extracelulární matrix. Mutace tohoto genu je známa v souvislosti s onemocněním osteogenesis imperfecta 17 (78). Autozomálně recesivní forma osteogenesis imperfecta je charakterizována řídkou kostní hmotou, křehkostí kostí a náchylností ke zlomeninám i po minimálním traumatu. Onemocnění má ale rovněž extraskeletální projevy, mezi které patří ztráta sluchu a modré skléry.

Kromě kódování mutací genů se v současné době soustředí pozornost na variace v počtu kopií deoxyribonukleové kyseliny (copy number variation - CNVs) v patogenezi keratokonů. Studium CNVs je obor v oblasti genomiky a je definován jako jev, při kterém se opakují části genomu, přičemž počet opakování v genomu se liší mezi jednotlivci v lidské populaci. Jedná se tedy o druh strukturální variace (duplikace nebo delece), která postihuje značný počet párů bází (124, 183). Například kolektiv autorů Rosenfeld a kol. identifikoval duplikace a delece deoxyribonukleové kyseliny (DNA) na chromozomu 5q31 v rodinách s autozomálně dominantně dědičnou formou keratokonů (163).

Přítomnost strukturálního remodelingu a metabolického stresu v epitelálních a stromálních vrstvách buněk rohovky u keratokonů prokazují proteomické studie. V obou vrstvách bylo nalezeno mnoho proteinů a proteoglykanů extracelulární matrix, které jsou zapojeny v proliferaci, růstu a migraci buněk. Průkaz změn epitelálních a stromálních strukturálních proteinů u keratokonů v porovnání s běžnou rohovkou naznačuje strukturální remodelaci rohovkové tkáně během rozvoje a progresu keratokonů (92).

Nové výsledky v identifikaci patogeneze keratokonů jsou prezentovány díky výsledkům tzv. celogenomových asociačních studií (genome-wide association study,

GWAS). Jde o rozsáhlé genetické studie zkoumající vztahy mezi společnou sekvenční variací a predispozicí k onemocnění (125). Tato technologie využívá tzv. jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism, SNP), což jsou odchylky individuálních nukleotidů v sekvenci DNA. Dostupné údaje genotypů celého genomu umožní studovat případné interakce mezi geny a prostředím. Například studie autorů Li a kol. identifikovala jednonukleotidový polymorfismus blízky RAB3GAP1 jako potenciálně citlivý lokus pro keratokonus (118). Je zajímavé, že mutace v genu RAB3GAP1 jsou pravděpodobně spojeny s tzv. Warburg micro syndromem, což je vzácný autosomálně recesivní syndrom, charakterizovaný očními vývojovými abnormalitami (mikroftalmus, mikrokornea, vrozená katarakta a oční atrofie) (133). Shledána byla rovněž asociace polymorfismu v genu pro růstový faktor pro hepatocyty (HGF) (26) a v genech kódujících strukturální proteiny kolagenu (COL4A, COL4A4) (196). Tyto nové technologie významně urychlují genetický výzkum keratokonu, což vede ke zdokonalení diagnostiky a cílení správné terapie (213).

Keratokonius je multifaktoriální onemocnění s významným podílem genetické složky, jejíž projev je ovlivněn vnějšími vlivy včetně chování daného pacienta (3). Budoucí studie velkých kohort v různých etnických skupinách mohou poskytnout přesnější vhled do patofyziologických mechanismů tohoto komplexního onemocnění.

### **1.1.3. Biochemické změny v rohovce u keratokonu**

Biochemické a imunohistochemické studie prokazují rozdíly mezi normální rohovkou a rohovkou postiženou keratokonem. Významné místo zaujímají studie, které popisují přítomnost zvýšené aktivity proteináz, např. metaloproteinázy (5) a nižší expresi inhibitorů proteáz (195). Snížená aktivita inhibitorů proteáz a zvýšená aktivita proteáz v rohovkové tkáni vede k pomalému rozpadu Bowmannovy membrány a bazální membrány epitelu rohovky (46). Epitel se dostává do kontaktu se stromatem rohovky a uvolňuje růstový faktor interleukin-1 (IL-1), který je normálně produkován jen epitelem a endotelem rohovky. Keratocyty stromatu mají receptory pro IL-1, dochází k proliferaci, diferenciaci a následně smrti buněk se vznikem jizvené tkáně. Epiteliální abnormalita jako primární příčina vyúsťující v uvolnění

proteolytických enzymů, které degradují stromální kolagen a vedou ke ztenčení a vyklenování rohovky, byla jednou z prvních zjištění vysvětlujících vznik keratokonu (201). Tato hypotéza by rovněž vysvětlovala vzájemné souvislosti mezi progresí keratokonu a mechanickým poškozením rohovky, např. mnutím oka, nošením kontaktních čoček nebo při atopii. Tuto vzájemnou souvislost již potvrdily i další studie (16, 89, 99).

Rozporuplné důkazy o patogenezi keratokonu přinášejí práce zabývající se studiem proteoglykanů. Proteoglykany jsou základní složkou extracelulární matrix pojivových tkání, váží se na kolagenní fibrily a tvorbou sítí zajišťují viskoelastické vlastnosti kolagenní tkáně. Některé studie dokazují snížené hladiny proteoglykanů (171, 172), jiné zvýšené (31). Výzkum proteomu keratokonické tkáně potvrdil zvýšenou expresi keratan sulfátu a dekorinu ve srovnání s normální rohovkou (51). Keratan sulfát se ve tkáni postižené keratokonem současně jeví jako strukturálně alterovaný pravděpodobně díky nižšímu obsahu keratansulfátových řetězců (52).

Většina současných studií potvrzuje snížení obsahu kolagenu ve stromatu keratokonické rohovky. Nebyly však zjištěny výrazné změny v distribuci různých typů kolagenu nebo molekulárního uspořádání kolagenu ve stromatu rohovky. Výjimkou je distribuce kolagenu typu III v jizvících se regiorech rohovkové tkáně postižené keratokonem (229).

Jiná hypotéza vzniku keratokonu je založena na působení ultrafialového záření B (UVB), které společně s dalšími podpůrnými faktory (atopie, mnutí očí) působí v rohovce oxidativní stres a mechanické poškození. To má za následek produkci volných radikálů, které se mění na látky ze skupiny aldehydů. Tyto sloučeniny podléhají za účasti enzymu aldehyddehydrogenázy (ALDH) oxidaci na karboxylové skupiny, které jsou dále metabolizovány. V případě rohovky postižené keratokonem byl enzym ALDH prokázán ve sníženém množství a aldehydy se tak mohou významně podílet na destrukci rohovkové tkáně (57). Druhou dráhou působení volných radikálů je reakce s oxidem dusnatým za vzniku peroxynitritu, který je rovněž pro tkáň destruktivní (138).

Jako další hypotézu lze vyslovit možnost vzniku keratokonu jako následek defektu v produkci extracelulární matrix rohovkového pojiva, destrukce tohoto pojiva s následným posunem kolagenních vláken (98).

Současné moderní vyšetřovací metody umožňují zkoumat a porovnávat na molekulární úrovni normální zdravou rohovku a rohovku postiženou keratokonem.

CD45 (transmembránová fosfotyrosinová fosfatáza) je označení pro běžný antigen leukocytu. CD45 byl zaznamenán ve více keratocytech v rohovce postižené keratokonem než u keratocytů nacházejících se ve zdravé rohovce. Tyto buňky mohou představovat zdroj některých proteolytických enzymů, o kterých se míní, že jsou spojeny s keratokonem.

Zatímco keratokonus je považován za nezápřítivé onemocnění, studie autorů Lema a kol. poukázala na to, že nošení kontaktních čoček u pacientů s keratokonem vede k nadměrné expresi prozánětlivých cytokinů identifikovatelné v slzné tekutině (116).

#### **1.1.4. Biomechanické změny rohovky u keratokonu**

Změny biomechanických vlastností rohovky hrají důležitou roli v patogenezi rohovkových ektatických onemocnění. V současné době je k dispozici 80 - 100 publikací zabývajících se touto problematikou (39). Výzkum v oblasti biomechaniky rohovky poukazuje na významné snížení pevnosti ektatické rohovky ve srovnání s normální lidskou rohovkou (41). Biomechanické vlastnosti rohovky závisí na stavu matrix, kolagenních vláken a obsahu proteoglykanů. Prostorové uspořádání kolagenních lamel stromatu rohovky určuje mechanickou odolnost rohovky. Parametry, kterými hodnotíme biomechanické vlastnosti rohovky, jsou hystereze rohovky (corneal hysteresis - CH) a faktor odporu rohovky (corneal resistance factor - CRF). Termín hystereze znamená rozdíl mezi nitroočním tlakem naměřeným na počátku a na konci dynamického procesu deformace rohovky proudem vzduchu, který trvá několik milisekund. Měření tohoto jevu umožňuje výpočet CRF, který přímo charakterizuje celkové viskoelastické vlastnosti rohovky. Hodnota CH i CRF se u normálních očí pohybuje kolem 10 mmHg. U pacientů s keratokonem vykazuje hystereze rohovky výrazně snížené hodnoty (11, 180). U rohovek s keratokonem byly rovněž zjištěny změny elasticity v reakci na tahovou, tlakovou a posuvnou sílu (134).

V současnosti jsou však známé práce, které významné změny v CH nebo CRF u rohovek postižených keratokonem nezjistily (169). Spoerl a kol. prokázali, že pro zjištění biomechanického stavu rohovky nejsou ani tak důležité hodnoty CH a CRF, jako tzv. hodnota p2area. Tato hodnota je u zdravé rohovky významně vyšší než u rohovky postižené keratokonem. (194).

Významný posun ve studiu biomechanických vlastností rohovky znamenal v posledních letech vývoj a využití tzv. dynamické korneální topografie pomocí přístroje Corvis ST (Oculus, Německo) (20). Tato kombinovaná technologie, která byla navržena jako koncept pro integrální analýzu rohovky, včetně rohovkové biomechaniky, využívá dynamické bidirekční aplanační technologie a vysokorychlostní topografie.

### **1.1.5. Histopatologický nále z u keratoknu**

Histologicky rozeznáváme na rohovce 5 vrstev: 3 buněčné (epitel, stroma, endotel) a 2 mezibuněčné (Bowmanova membrána, Descemetová membrána). Epitel rohovky tvoří bariéru před vlivy vnějšího prostředí. Jedná se o vrstevnatý, nekeratinizující epitel složený ze 4 - 6 vrstev buněk a charakterizovaný vysokou mírou jednotvárnosti v jednotlivých vrstvách. Na povrchu jsou umístěny ploché polygonální buňky. Apikální vrstva těchto buněk má na svých povrchových membránách systém mikroplik a mikrovilli. Produktem těchto povrchových buněk epitelu rohovky a podpovrchové části epitelu spojivky je tzv. mucin-like glykoprotein, který na apikálním povrchu epitelu tvoří tzv. glykokalyx. Jedná se o velmi delikátní strukturu, která spojuje slzný film s povrchem epitelu. Navzájem mezi sebou jsou tyto buňky spojeny buněčnými spoji typu „tight junctions“, které brání pronikání vody, toxinů a mikrobiálního agens do intercelulárního prostoru (38). Tato vlastnost epitelu rohovky hraje významnou roli v případě léčby keratokonu metodou CXL, kdy je nutné tuto bariéru porušit a umožnit tak průnik molekul fotosenzibilizátoru riboflavinu do stromatu rohovky. Pod povrchovou vrstvou rohovky nacházíme vrstvu méně plochých tzv. suprabazálních buněk. Nejhlubší vrstvu epitelových buněk tvoří basální sloupovité buňky, které jsou systémem hemidesmozomů spojeny s basální membránou epitelu. Epitel rohovky má vysokou schopnost regenerace a migrace. Rohovkový epitel se obnovuje každých 7-10 dní. Pro obnovu epitelu jsou zásadní epiteliální kmenové buňky, které jsou lokalizovány v oblasti limbu rohovky. Bazální membrána epitelu rohovky, silná jen asi 0,05  $\mu\text{m}$ . Pokud dojde k poškození basální membrány epitelu rohovky, zvýší se hladina fibronektinu v buňkách a obnova basální membrány nastane do 6 týdnů. Během této doby mají epiteliální vazby nově vznikající vrstvy epiteliálních buněk tendenci být nestabilní a slabé. Tato skutečnost

je důležitá v případě správné edukace pooperační péče u pacientů, kteří podstupují rohovkové operace, při kterých dochází k odstranění epitelu, jako např. standardní CXL nebo povrchové laserové ablace. Bazální membrána epitelu nasedá na vrstvu zvanou Bowmanova membrána. Jde o nebuněčný kondenzát nejpovrchnější vrstvy stromatu. Tato hladká vrstva je 15  $\mu\text{m}$  tenká a napomáhá v udržení tvaru rohovky. V případě poškození neregeneruje a může v případě narušení vytvářet jizvení (38).

Při postižení rohovky keratokonem můžeme nacházet poruchu struktury epitelových buněk, ruptury a rozpuštění kolagenních vláken v bazální membráně epitelu rohovky, depozita hemosiderinu v bazální membráně epitelu rohovky, případně trhliny v Bowmanově membráně.

Nejsilnější vrstvou rohovky je stroma, které zaujímá 80 - 85 % tloušťky rohovky a je tvořeno svazky kolagenních vláken, extracelulární matrix a fibroblasty. Hlavními buňkami stromatu rohovky jsou keratocyty, které jsou odpovědné za syntézu kolagenu rohovky, glykosaminoglykanů a matrixmetaloproteináz, které mají zásadní roli v udržení stromální homeostázy. Většina keratocytů se nachází v přední části stromatu. Hlavní komponentou extracelulárního prostoru stromatu rohovky tvoří kolagenní vlákna. Kolagenní vlákna mají přesný průběh a uspořádání v jednotlivých vrstvách a v jednotlivých kvadrantech rohovky. Kolagenní vlákno je vysoce uspořádaná, komplexní vláknitá struktura, měkká, ohebná, nepružná a vysoce pevná v tahu. V lidské rohovce se vyskytuje nejméně 12 typů kolagenů, které tvoří 71 % její suché hmotnosti. Ve stromatu rohovky jsou lamely tvořeny především kolagenem typu I, který dává tkáni rohovky pevnost v tahu. Na kolagenní fibrile je vázáno 6 proteoglykanů, které se paprscitě váží k 6 nejbližším nesousedním kolagenním fibrilám (90). Tyto proteoglykany extracelulární matrix (keratansulfát, dermatansulfát, chondroitinsulfát) se společně s mikrofilamentárními strukturami podílí na stabilizaci kolagenních fibril a na udržení jejich konstantní vzájemné vzdálenosti. Velmi důležitým mukopolysacharidem extracelulární matrix je keratansulfát typ I. Hraje důležitou roli v uspořádání a orientaci kolagenních lamel, která má vliv na transparentnost rohovky a její hydrataci (141). Obnova kolagenu ve stromatu rohovky je pomalá a trvá asi 2 - 3 roky (90).

Stavba kolagenního vlákna je zajímavá s ohledem na etiopatogenezi keratokonu. Primární strukturu kolagenu tvoří aminokyseliny s nejvyšším zastoupením prolinu, lysinu a glycinu. Defekt Arg134Cys (mutace genu

COL1A1 - nahrazuje aminokyselinu cystein aminokyselinou arginin v pozici 134 v proteinu vytvořeném tímto genem) u klasického typu Ehlers-Danlosova syndromu znamená poruchu struktury kolagenního vlákna a může souviset s častějším výskytem keratokonu u tohoto typu vrozeného genetického onemocnění. Sekundární strukturu tvoří polypeptid protokolagen, kde posttranslační modifikací vzniká hydroxyprolin a hydroxylysin. Hydroxyprolin má základní význam pro následnou stabilitu kolagenního vlákna. Terciální strukturu nazýváme prokolagen – trihelix (šroubovice ze tří polypeptidů). Extracelulárním odštěpením registačních peptidů poté vzniká tropokolagen jako základní jednotka kolagenního vlákna. Zesíťováním tropokolagenu pomocí enzymu lisyloxidázy dochází ke tvorbě pevných vzájemných vazeb hydroxylysinových a lysinových zbytků v sousedních molekulách tropokolagenu a vzniká kvarterní struktura – kolagenní vlákno. Tyto vazby jsou další podmínkou mechanické pevnosti kolagenní tkáně. Defekt genu kódujícího lisyloxidázu v etiopatogenezi keratokonu byl již zmíněn výše. Na deregulaci uspořádání extracelulární matrix, interfibrilárního uspořádání a interakci mezi kolagenem a proteoglykany v rohovkách postižených kratokonem poukazuje práce Stachse a kol. (197).

Stroma rohovky tvoří 200 až 250 s povrchem paralelních lamel. Kolagenní vlákna v každé lamele probíhají v pravém úhlu oproti průběhu vláken v sousední lamele (122). Počet lamel na hranici s limbem se zvyšuje na téměř 500 (90). Periferní stroma je tedy silnější než centrální část stromatu. Lamely tvoří široké pásy, které se vertikálně i horizontálně štěpí a vzájemně protínají. Některé lamely zasahují ze stromatu do Bowmanovy vrstvy a podílejí se na udržení stabilního tvaru přední části rohovky (90). Vlákna rovněž mohou změnit směr a probíhat po obvodě v oblasti limbu (128). Toto vysoce organizované uspořádání lamel stromatu rohovky redukuje rozptyl světla a přispívá k mechanické pevnosti rohovky.

Stroma rohovky postižené keratokonem vykazuje v chronických pokročilých stádiích výrazné ztenčení. Zavedení elektronové mikroskopie umožnilo potvrdit mnoho patologických změn v tkáni rohovky postižené keratokonem i jinými degenerativními nebo zánětlivými procesy (144). Studie autorů Patey a kol. poukázala na základě automatické analýzy obrazu tkáně rohovky na skutečnost, že příčinou stromálního ztenčení, jako charakteristického znaku keratokonu, je redukce počtu lamel kolagenu v oblasti postiženého regionu. Mechanismus vzniku tohoto ztenčení je však zatím nejistý (139). Přesto, že stromální ztenčení rohovky

postižené keratokonem je přičítáno degradaci kolagenu prostřednictvím proteolytických enzymů nebo sníženou hladinou inhibitorů proteinázy, je rovněž zvažována hypotéza určité patologické redistribuce kolagenu v rámci rohovky s "prokluzováním" mezi lamelami. Tento mechanismus je rovněž podporován pozorováním sníženého počtu interlamelárních adhezí u rohovky postižené keratokonem (23) a rovněž sníženým počtem lamelárních inzercí s Bowmannovou membránou (132). Rovněž studie autorů Radner a kol. na základě hodnocení tkání keratokonických rohovek poukazuje na zjištění redistribuce a změnu organizace kolagenu v apikálních částech keratokonické rohovky ve srovnání s oblastmi paraapikálními (147).

Významnou roli ve zmapování orientace kolagenu a distribuce kolagenní fibrilární hmoty v rohovkové tkáni zaujímá strukturální analýza pomocí rentgenové difrakční analýzy. Tato metoda poskytuje jeden z nejsilnějších důkazů alterace uspořádání, orientace a distribuce kolagenních fibril v apikálním regionu rohovky u pokročilého keratokonu. Meek a kol. ve své práci poukazují, že při rozvoji keratokonu dochází k vysokému stupni interlamelárního a pravděpodobně také intralamelárního posunu kolagenu, které vede ke ztenčení centrální části rohovky a změně v zakřivení rohovky (130). Vše tedy nasvědčuje tomu, že u keratokonu musí být narušeno zesíťování uvnitř kolagenu na úrovni terciální a kvarterní struktury (1).

Prokazatelné změny uspořádání tkáně keratokonické rohovky nejsou pouze v apikálních vrstvách. Analýza periferní rohovkové tkáně z keratokonických a zdravých dárců odhalila rozdíly, které mohou představovat časné příznaky v patogenezi keratokonu. Sherwin a kol. popsali diskrétní vniknutí jemných buněčných procesů do Bowmanovy membrány v periferní oblasti rohovky postižené keratokonem (184).

Tuhost předního stromatu rohovky se jeví být částečně důležitá pro udržování zakřivení rohovky. Rozdílné uspořádání kolagenních svazků v předním stromatu rohovky může přispívat k vyšší pevnosti v této oblasti a může vysvětlovat, proč zakřivení přední plochy rohovky více odolává změnám při stromální hydrataci ve srovnání se zadní částí stromatu (38).

Další vrstvou rohovky je Descemetová membrána. Je produkována buňkami endotelu a je velmi odolná při poraněních a infekcích. V Descemetové membráně keratokonické rohovky se formují trhliny, které biomikroskopicky odpovídají



tzv. Vogtovým striím. Buňky endotelu migrují do defektu a napomáhají při formování nové membrány. Chybějící část poté nahradí zvláštní forma kolagenu vzniklého přeměnou extracelulární matrix. Striata je výsledek asymetrického nabobtnání zadního stromatu oproti více rigidnímu přednímu stromatu rohovky. Pro normální průhlednost rohovky je důležitý obsah vody kolem 78 %. Pokud se obsah vody zvýší, kolagenové fibrily zvětší svůj objem, což naruší pravidelnou strukturu a nastává rohovkové zkalení a zbobtnání – edém stromatu. Závažnou akutní komplikací keratokonu je tektonická ruptura Descemetové membrány, která způsobí obnažení stromatu a vznik prudkého edému, tzv. akutního hydropsu rohovky (53).

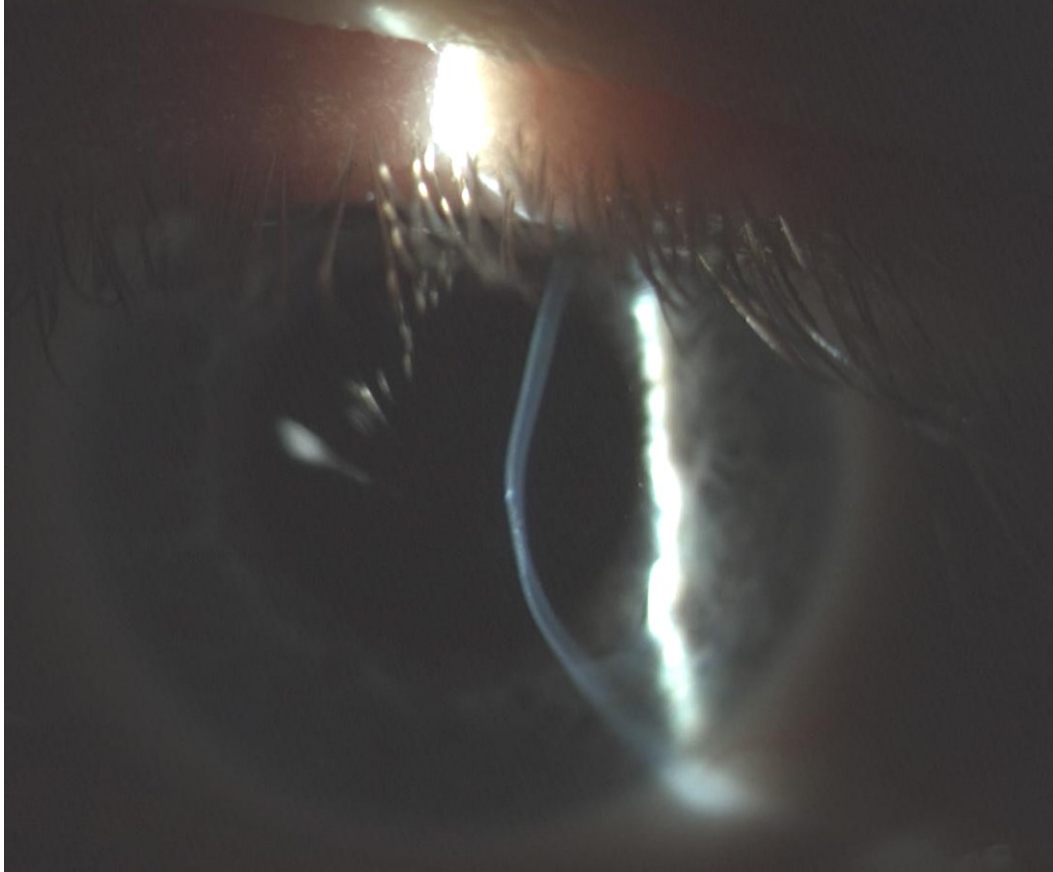
Poslední buněčnou vrstvu tvoří rohovkový endotel. Stroma rohovky je udržováno v deturgescentním stavu právě prostřednictvím aktivity buněk endotelu (53). Tato „dehydratace“ se děje na základě několika faktorů. Bariérová funkce endotelu je unikátní tím, že je propustná pouze do určité míry, aby umožňovala tok iontů nezbytných ke stanovení osmotického gradientu (211). Buňky endotelu keratokonické rohovky mohou být pleoformní a směrem k ose konusu prodloužené (199). Pleomorfismus buněk endotelu přičítají někteří autoři spíše vlivu nošení kontaktních čoček a mnutí oka (198).

#### **1.1.6. Biomikroskopický nález u keratoknu**

Ve středně pokročilém a pokročilém stadiu lze v biomikroskopickém nálezu rohovky popsat následující možné změny:

##### **Ztenčení a vyklenutí (kónický tvar) rohovky**

Při keratokonu se rohovka ztenčuje a vyklenuje (obr. 1). Nejtenčí a nejstrmější místo na postižené rohovce se nazývá apex keratokonu. Nejčastěji se vyskytuje pod anatomickým středem a je posunut do strany, spíše temporálně.



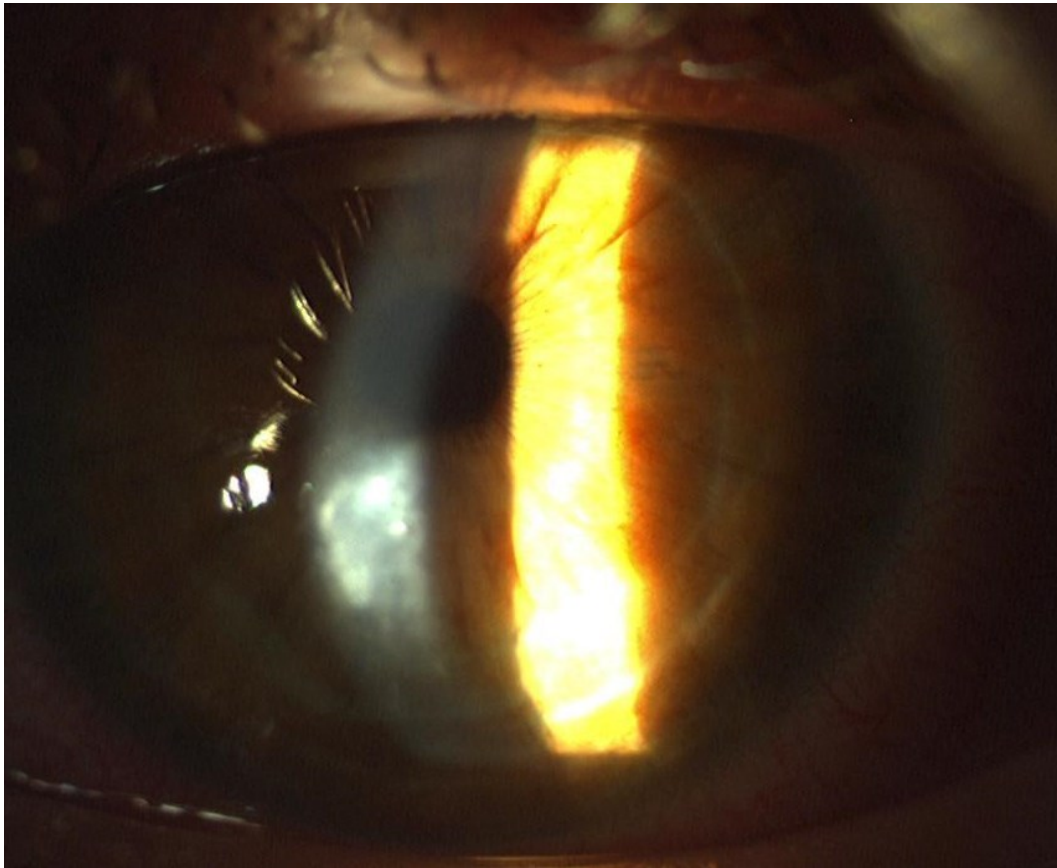
*Obr. 1: Vyklenutí a ztenčení rohovky u keratokonu 3 - 4 stupně  
zdroj: fotodokumentace autora*

### **Munsonův znak**

Projevuje se v pokročilých fázích keratokonu, vyklenutí rohovky způsobuje při pohledu dolů konformaci dolního víčka ve tvaru písmene „V“.

### **Bowmanův stín a jizvy v předních vrstvách stromatu**

Tyto stíny se tvoří přímo na apexu konu nebo v jeho těsné blízkosti. Jedná se o strukturální ruptury v Bowmanově membráně, které mají za následek nepravidelnou povrchní neprůhlednost způsobenou fibrotizující pojivovou tkání. U pokročilých forem to může vést ke značné ztrátě ostrosti vidění (obr. 2).



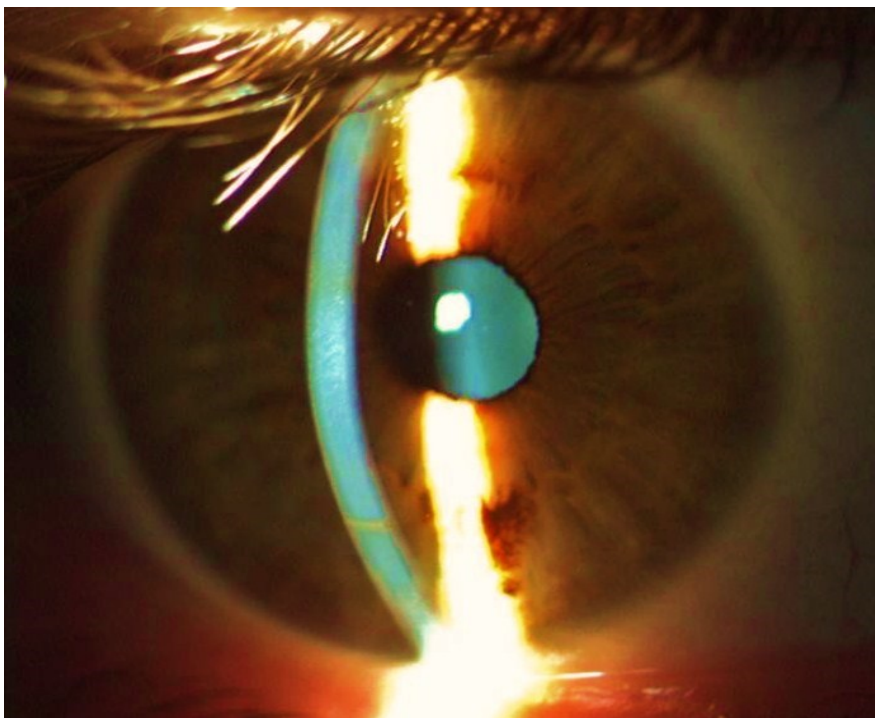
*Obr. 2: Bowmanův stín  
zdroj: fotodokumentace autora*

### **Fleischerův prstenec**

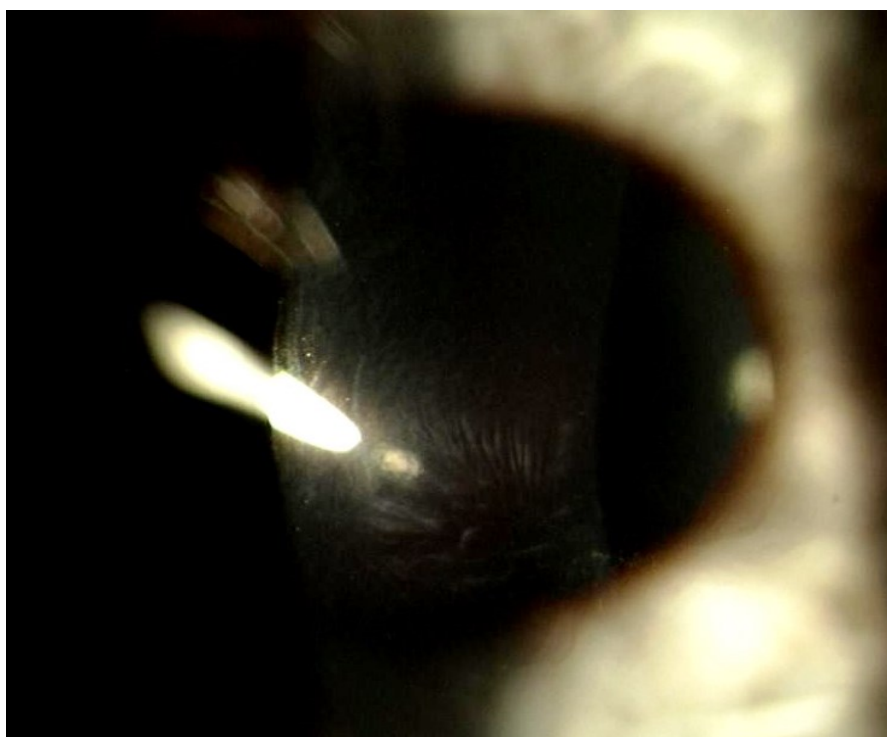
Fleischerův prstenec je označení pro pigmentový kruh usazeného hemosiderinu kolem base konu. Vyskytuje se buď jako celý kruh, nebo pouze jeho část. Barva závisí na množství uloženého železa v basální epitelové vrstvě přiléhající na Bowmanovu membránu. Může být žlutá, olivově zelená až hnědá. Necelý, přerušovaný nebo rozbitý prstenec se objevuje přibližně v 50 % případů (obr. 3).

### **Vogtovy strie**

Vogtovy strie jsou série jemných pruhů bělavého zbarvení ve stromatu a v Descemetské membráně. Roztahováním rohovkových lamel v apexu konu praská Descemetská membrána s následným prosakováním a zašednutím rohovkového stromatu. (obr. 4).



*Obr. 3: Fleischerův prstenec rohovky postižené keratokonem  
zdroj: fotodokumentace autora*



*Obr. 4: Vogtovy strie  
zdroj: fotodokumentace autora*

### **Endoteliální pohárový reflex (Endothelial Cup Reflex)**

Tento jasný světelný reflex je viděný ve vrcholu kužele. Díky vyššímu stupni zakřivení zadní plochy rohovky se zvýší její odrazivost, a tak působí jako konvexní zrcadlo.

### **Axenfeldův znak**

Tento znak můžeme dobře pozorovat až v pokročilých stádiích onemocnění. Extrémní ztenčení rohovky způsobuje snížení až ztrátu její citlivosti. V důsledku snížené tloušťky můžeme pozorovat až pulsaci apexu konu.

### **Rizzutiho znak**

Osvětlíme-li rohovku z temporální strany v oblasti limbu strmě fokusovaným paprskem, můžeme pozorovat kónický reflex světla nazálně.

### **Scissoring**

Jde o distorzi retinoskopického obrazu v dilatované zornici.

### **Hydrops**

Hydrops rohovky je akutní forma keratokonu, která se vyskytuje v pokročilých stádiích. Je způsobený edémem stromatu rohovky. Zakalení je následek ruptur endotelu rohovky a Descemetové membrány, což způsobí pronikání komorové vody do stromatu. Trhliny mají typický tvar půlměsíce a jsou lokalizovány v Descemetové membráně a v endotelu v blízkosti apexu konu. Objeví-li se edém rohovky v optické ose, jsou zrakové funkce oka omezeny. Subjektivně nastává náhlé, výrazné snížení centrální zrakové ostrosti, doprovázené světloplachostí a velkou bolestivostí. Hydrops se objevuje buď spontánně, nebo jako následek traumatu (promnutí) oka.

#### **1.1.7. Symptomy**

Pro keratokonus je charakteristický chronický průběh. Nejdříve pozorujeme na postiženém oku narůstající myopii, objevuje se astigmatismus. Ten je nejdříve pravidelný, později se manifestuje do astigmatismu nepravidelného, který nelze korigovat brýlemi. S postupujícím vyklenováním konu se navíc neustále mění osa astigmatismu. Vznikají aberace vyššího řádu, především koma. Důsledkem tohoto

procesu vzniká několik optických zón, každá z nich pak fokusuje stejný obraz na rozdílná místa sítnice. To vede ke vzniku několika obrazů, v anglické literatuře se označuje jako „ghosting“, pacient vidí „duchy“. Pacienti si stěžují na rozostřené vidění, zhoršené vidění za šera, mají fotofobii, astenopeické obtíže a pocit cizího tělíška v oku (24).

### **1.1.8. Klasifikace keratokonu**

Keratokonus lze klasifikovat dle různých hledisek. Modifikovaná Krumeichova klasifikace hodnotí strmost rohovky, indukovanou refrakční vadu a patologii rohovky (tab. 1). V současné době je používán nový klasifikační systém, tzv. ABCD Grading System (obr. 5), který hodnotí zakřivení přední plochy rohovky (A), zadní plochy rohovky (B), tloušťku rohovky v nejtenčím místě (C) a nejlépe korigovanou zrakovou ostrost na dálku (D) v 5 stupních (stupeň 0 - 4). Navrhovaný systém těsně odpovídá stávajícím stupňům Amslerovy klasifikace v předním zakřivení rohovky. Vzhledem k tomu, že zahrnuje také hodnocení zakřivení zadní plochy rohovky a tloušťky rohovky v nejtenčím místě, nikoli v apexu keratokonu, lépe odráží anatomické a funkční změny pozorované u keratokonu (17).

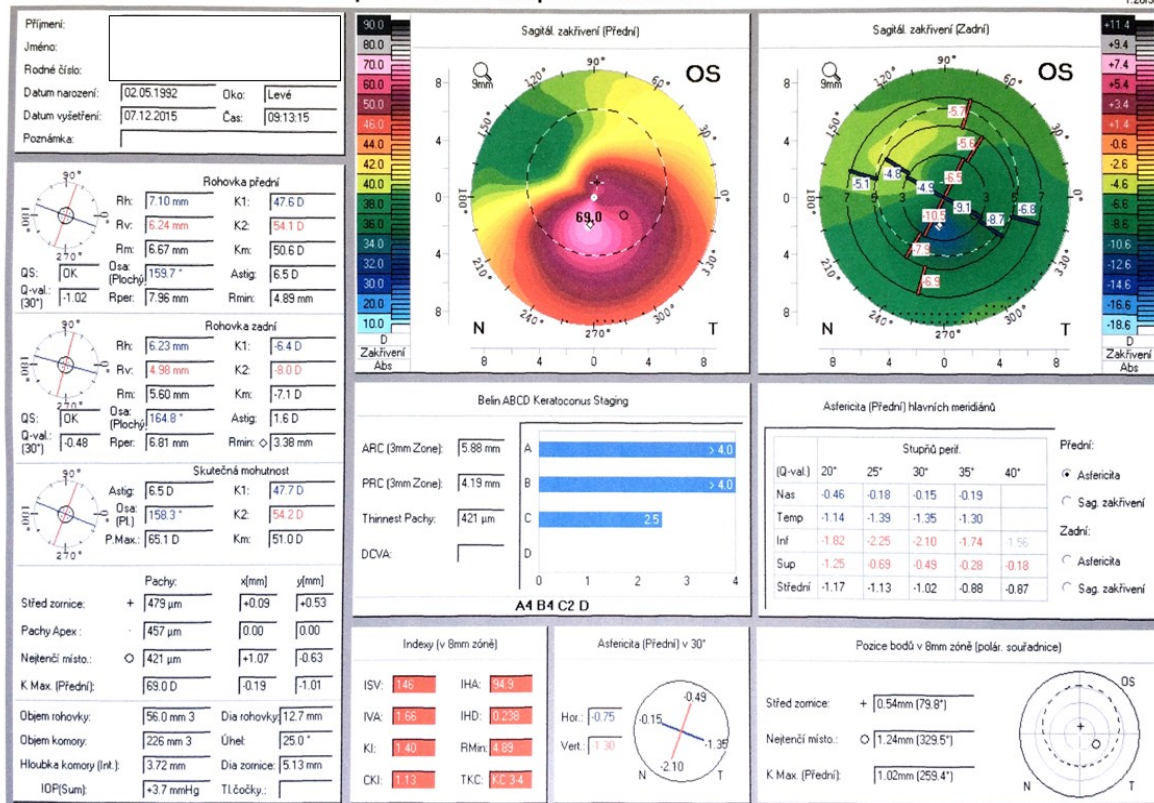
Tab. 1: Modifikovaná Krumeichova klasifikace

STADIUM	NÁLEZ
1	<p>Excentrické rohovkové zestržení</p> <p>Indukovaná myopie a/nebo astigmatismus &lt;5.00 D</p> <p>Poloměr zakřivení <math>\leq 48</math> D</p> <p>Vogtovy strie</p> <p>Absence jizvení</p>
2	<p>Indukovaná myopie a/nebo astigmatismus &gt;5.00 D &lt;8.00 D</p> <p>Poloměr zakřivení <math>\leq 53</math> D</p> <p>Absence jizvení</p> <p>Tloušťka rohovky <math>\geq 400</math> <math>\mu\text{m}</math></p>
3	<p>Indukovaná myopie a/nebo astigmatismus &gt;8.00 D &lt;10.00 D</p> <p>Poloměr zakřivení &gt;53 D</p> <p>Absence jizvení</p> <p>Tloušťka rohovky 300-400 <math>\mu\text{m}</math></p>
4	<p>Neměřitelná refrakce</p> <p>Poloměr zakřivení &gt;55 D</p> <p>Centrální jizvení, perforace</p> <p>Tloušťka rohovky &lt;200 <math>\mu\text{m}</math></p>

zdroj: Gore, DM., Shortt, AJ., Allan, BD.: *New clinical pathways for keratoconus Eye*, 2013; 27: 329–339.

**OCULUS - PENTACAM Topometrické / Stupně keratokonu**

1.2098



Obr. 5: ABCD Grading System, vyhodnocení pomocí přístroje Pentacam zdroj: fotodokumentace autora

V závislosti na čase nástupu manifestace keratokonu je možná následující klasifikace:

a/ keratokonus u dětí a dospívajících

Keratokonus začínající v dospívání je nejčastější typ, oboustranný, stranově asymetrický, rychle progredující. Autoři Chatzisa Hafezi uvádějí 88% výskyt progresu keratokonu o 1 dioptrii maximálního zakřivení rohovky v průběhu jednoho roku u pacientů ve věku 8 – 19 let. Výskyt progresu v této věkové skupině byl natolik alarmující, že vedl autory v závěru práce k doporučení provedení CXL u dětí co nejdříve po zjištění onemocnění, a to i bez čekání na rozvoj progresu (83).

b/ keratokonus začínající v 2. - 3. dekádě života je oboustranný, manifestace je méně asymetrická s pomalou progresí.



V rámci nomenklatury ektatických onemocnění rohovky se setkáváme s jednotkou zvanou frustrní keratokonus. Jde o subklinické onemocnění, kdy bez zjevných biomikroskopických známek keratokonu nacházíme keratotopografický nález projevující se zónou nepravidelného astigmatismu ležící v centrální nebo paracentrální části rohovky. Stav zůstává stabilní během celého života. Jeho zjištění je významné v případě zvažování provedení refrakční laserové operace. Ztenčení rohovky a zásah do stability rohovky prostřednictvím operace LASIK (laser assisted stromal in situ keratomileusis) může znamenat projev tohoto onemocnění ve smyslu vzniku iatrogení pooperační ektázie. Diagnóza, nebo podezření na přítomnost frustrního keratokonu tedy patří mezi kontraindikace tohoto refrakčního zákroku. Například autoři Abad a kol. popsali nový topografický vzor, tzv. „vertical D-pattern“ (2). Pacienti s tímto typem rohovkové asymetrie mohou být nevhodní k refrakční operaci LASIK z důvodu vysokého rizika vzniku ektázie po operaci (126). Randleman a kol. uvedli 5 rizikových faktorů pro vznik ektázie po rohovkovém laserovém refrakčním zákroku. Jsou to v pořadí významu: abnormální předoperační topografie, nízká tloušťka reziduálního stromálního lůžka, mladý věk, nízká hodnota předoperační tloušťky rohovky a vysoká krátkozrakost. Přičemž strategie skříninku, která selektivně váží všechny tyto faktory, byla významně účinnější než zvažování jakéhokoli faktoru samostatně (156).

Zadní kerkatokonus je atypickou formou keratokonu známý ve dvou projevech (keratoconus posticus totalis, keratoconus posticus circumscriptus). Jedná se o vzácné nezánnětlivé neprogredující onemocnění, unilaterální, kdy je vyklenuta pouze zadní plocha rohovky, přední plocha rohovky není poškozena. Někteří autoři však i v této oblasti určité změny popisují (120).

Sofistikované topografické přístroje nám dnes poskytují možnost klasifikace keratokonu pomocí vyhodnocení jednotlivých indexů získaných na základě snímaných parametrů rohovky. Vyhodnocení je velice přesné, přehledné a uživatelsky příjemné.

### 1.1.9. Diagnostika keratokonu

Diagnostika keratokonu se dříve opírala především o anamnézu (osobní, rodinnou, pracovní), subjektivní obtíže, visus, vyšetření na šterbinové lampě, autorefraktometrii, pachymetrii a keratometrii. I v současné době jsou tyto vyšetřovací metody používány, ale jejich izolované využití je nedostačující. V současné době můžeme v klinické praxi sledovat mnoho parametrů svědčících pro podezření na toto onemocnění díky vyspělým technologiím, jako například systémy se Scheimpflugovou kamerou, aberometry nebo optické koherenční tomografie. Zásadní pro hodnocení očního nálezu u pacientů s keratokonem je vyšetření pomocí topografických přístrojů, které na základě bezkontaktního vyšetření umožňují s vysokou přesností zhodnotit velikost a tvar astigmatismu přední a zadní plochy rohovky a jsou tak cenným nástrojem pro potvrzení diagnózy tohoto onemocnění (146).

V klinické praxi je velmi důležité včas odhalit velmi časně formy keratokonu. Termín suspektní keratokonus je chápán jako nález, kdy rohovka nevykazuje biomikroskopické známky keratokonu, ale topografický nález naznačuje rysy podobné prvotním změnám při keratokonu (25). Mnohé studie poukazují na parametry, které přispívají k časně diagnostice subklinických forem tohoto onemocnění. Jsou to především hodnoty zakřivení přední plochy rohovky, elevační mapy a zakřivení zadní plochy rohovky v tangenciálním zobrazení (100).

První refrakční oční rozhraní (přední plocha rohovky) má zásadní vliv na vznik obrazu. Proto je výskyt vysokých hodnot rohovkových aberací způsobených nepravidelným povrchem keratokonické rohovky nejdůležitějším zdrojem optických chyb. Také proto je analýza předního povrchu rohovky důležitým nástrojem detekce keratokonu. Toto zobrazení poskytují keratotopografické přístroje. Typický keratotopografický nález při diagnóze keratokonu vykazuje fokální zestržení většinou v dolní části rohovky, které koreluje s místem nejtenčí tloušťky rohovky a kónickou protruzí, často expandující až do dvou kvadrantů. Při hodnocení přední plochy rohovky sledujeme na topografickém zobrazení hodnoty K1 (keratometrie přední plochy rohovky v nejplošším meridiánu), K2 (keratometrie přední plochy rohovky v nejstrmějším meridiánu),  $K_{max}$  (maximální hodnota zakřivení přední plochy rohovky), hodnotu astigmatismu a asymetrii v hodnotě zakřivení dolního a horního

kvadrantu. Detailnější informace o lokálních změnách zakřivení rohovky poskytuje tangenciální zobrazení.

Asféricita rohovky je jednou z nejdůležitějších kvantitativních indexů popisujících přední povrch rohovky. Charakterizuje postupné změny zakřivení povrchu rohovky směrem z centra do periferie. Normální hodnota u mladých dospělých se pohybuje v rozmezí  $Q = -0,23 \pm 0,08$  (58). V případě keratokonické rohovky přední protruze generuje vyšší negativitu hodnoty Q.

Analýzou aberometrických dat přední plochy rohovky byly prokázány vyšší hodnoty aberace vyšších řádů (vertikální koma) a coma-like root mean square (RMS) (54). Změny v hodnotách aberací vyššího řádu u keratokonu způsobují změny kvality vidění u pacientů s keratokonem (131). V roce 2006 vydal Alio a kol. první „grading“ systém pro keratokonus, který používá hodnoty coma-like aberací přední plochy rohovky (7). Rovněž zadní plocha keratokonické rohovky vykazuje vyšší hodnoty aberací např. sférické aberace, vertikální koma a coma-like root mean square (RMS) (142).

K přesné diagnostice a zjištění pokročilosti nálezu je nutné znát zakřivení a elevační mapu nejen přední, ale i zadní plochy rohovky a pachymetrickou mapu rohovky. Právě tato zobrazení byla shledána jako validnější v hodnocení právě časných forem keratokonu (142, 187). V současné době proto hraje významnou roli v diagnostice keratokonu vyšetření na přístroji Pentacam (Oculus, Německo). Pentacam je rotační Scheimpflugova kamera, která poskytuje ostré a kontrastní obrazy předního segmentu oka od přední plochy rohovky k zadnímu pouzdru čočky. Na základě tohoto vyšetření dostáváme přesné topografické mapy nejen přední, ale i zadní plochy rohovky, a to v sagitálním i tangenciálním zobrazení. Díky tomuto jednoduchému neinvazivnímu vyšetření máme k dispozici i hodnoty pachymetrie v každém bodě v celé ploše rohovky, včetně vyhodnocení nejtenčího místa rohovky. V případě diagnostiky keratokonu nás také zajímá stadium onemocnění. Pentacam poskytuje i tento výpočet. Zásadní funkcí je možnost srovnání jednotlivých naměřených hodnot v čase s cílem zjistit nejdůležitější faktor z hlediska další léčby keratokonu - progresi onemocnění.

Dynamická korneální topografie pomocí přístroje Corvis ST (Oculus, Německo) využívá dynamické bidirekční aplanační technologie a vysokorychlostní topografie (20). Měření deformace rohovky pomocí bezkontaktní tonometrie zaznamenává reakci rohovky na definovaný proud vzduchu pomocí nově vyvinuté

vysokorychlostní Scheimpflugovy kamery, která přebírá 4300 snímků za sekundu. Tento software tak poskytuje podrobnou analýzu snímků odebraných v průběhu deformace rohovky a umožňuje měřit hodnotu nitroočního tlaku a tloušťku rohovky s vysokou přesností. Pomocí tohoto přístroje lze provádět komplexní biomechanické sledování keratokonu. Dále lze provést včlenění dat z Pentacamu pro kombinované tomografické a biomechanické analýzy. Kombinováním tomografických dat z Pentacamu s biomechanickými daty z přístroje Corvis ST lze takto zlepšovat citlivost a specifičnost v detekci pacientů se závažným rizikem vyvíjející se ektázie např. po refrakční operaci. Měření změny v deformační charakteristice rohovky po crosslinkingu pomocí Corvis ST je rovněž možné vyjádřit efekt tohoto zákroku na biomechanické vlastnosti rohovky. Velmi důležitou roli má toto vyšetření v detekci subklinických forem keratokonu (207).

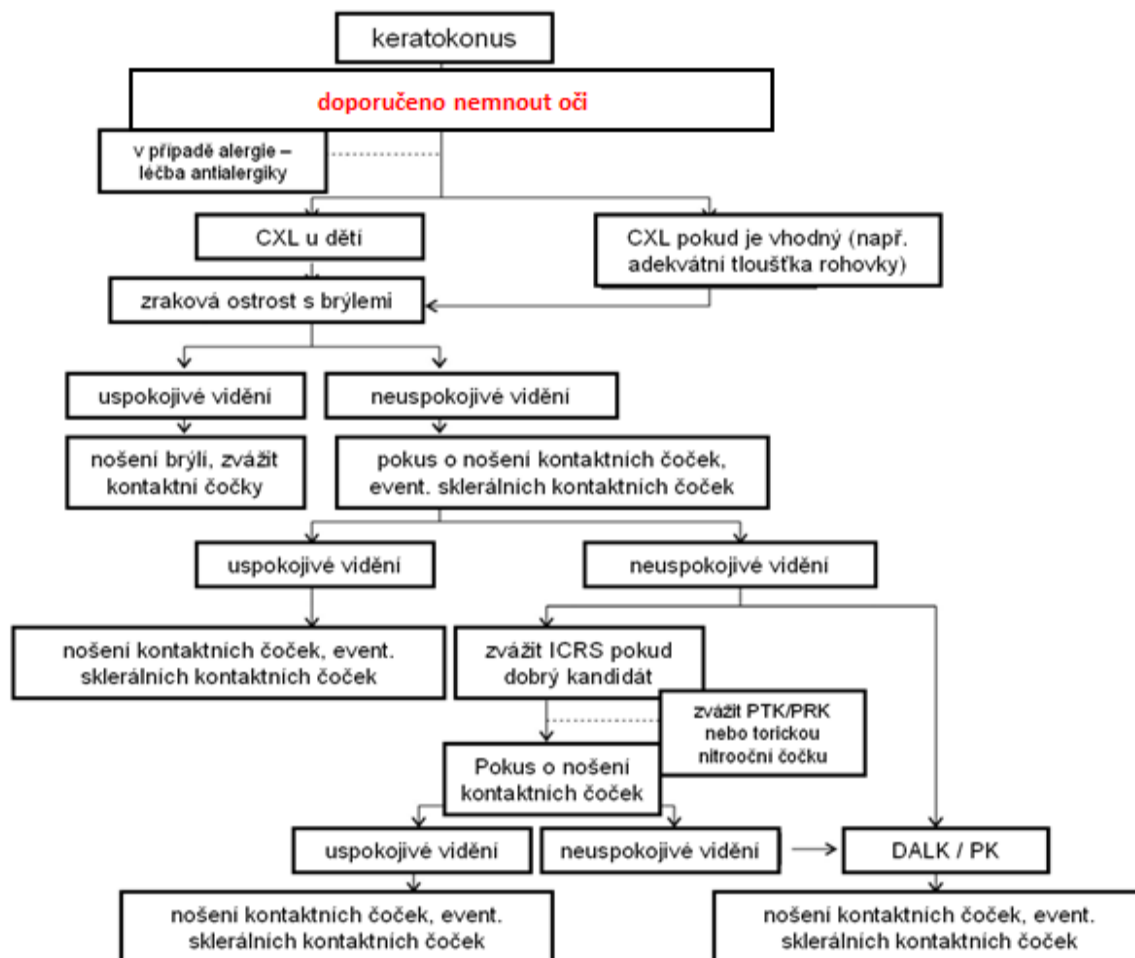
Topografický nálezn falešně svědčící pro keratokonus může vyvolat nesprávná pozice hlavy nebo očních víček pacienta během vyšetření, stejně také nošení kontaktních čoček před vyšetřením. V tomto případě hovoříme o tzv. pseudokeratokonu.

#### **1.1.10. Léčba keratokonu**

Navzdory rozsáhlým znalostem o diagnóze a léčbě ektatických onemocnění rohovky, stále existují spory o definici, koncepci, metodách diagnostiky, klinickém řízení a chirurgické léčbě těchto onemocnění. Z tohoto důvodu byl vypracován projekt vyústující ve vytvoření konsensu, který zahrnuje aktuální pokyny pro zvládání těchto klinických stavů.

Způsob léčby keratokonu závisí na stupni keratokonu a na stupni jeho progresu. Hlavním cílem léčby keratokonu je zastavit progresi onemocnění s následnou rehabilitací vidění. Nechirurgické postupy léčby jsou voleny především v časných fázích keratokonu a zahrnují správnou edukaci pacienta (např. poučení nemnout oči), nošení brýlové korekce měkkých kontaktních čoček. V případě neuspokojivého vidění s brýlemi nebo měkkými kontaktními čočkami je vhodné doporučit nošení tvrdých, plynopropustných kontaktních čoček. Pokud je přítomna nesnášenlivost těchto typů kontaktních čoček, jsou k dispozici i další typy, např. korneosklerální nebo sklerální kontaktní čočky. Chirurgická léčba keratokonu

zahrnuje corneal cross-linking, implantaci rohovkových prstenců a transplantace rohovky. Přehledné zobrazení léčebné strategie u keratokonu vyplývající z projektu „Global consensus on keratoconus and ectatic diseases“ zachycuje obr. 6 (56).



Obr. 6: Konsensus léčby keratokonu

zdroj: Gomes, JA., Tan, D., Rapuano, C.J. et al: Global consensus on keratoconus and ectatic diseases. Cornea. 2015 Apr; 34(4): 359-69.

CXL je zákrok, který je doporučován jako léčba keratokonu v případě prokázané klinické progrese onemocnění bez věkového omezení, případně pokud je vnímáno riziko progrese, zvláště po předchozích refrakčních operacích (56).

Další možností je implantace umělých intrastromálních rohovkových segmentů (intrasromal corneal ring segment - ICRS), a to i u dětských a dospívajících pacientů (204). Tyto operace hrají roli především v rehabilitaci vidění.

V současné době jsou dostupné 2 typy intrakorneálních prstenců: inkompletní a kompletní. Popisovány jsou dvě metody implantace: mechanická a za asistence femtosekundového laseru. Eefektem implantace intrastromálních rohovkových prstenců v léčbě keratokonu se zabývá řada studií, které prokazují snížení hodnot centrální keratometrie, astigmatismu a zlepšení korigované zrakové ostrosti (29, 228). U většiny pacientů se současně zlepšuje i nekorigovaná zraková ostrost. Tato metoda poskytuje výrazně lepší výsledky u pacientů s těžkou formou nemoci (204). Pro částečné odstranění nepravidelného astigmatismu a snížení sférické i cylindrické komponenty vady je u keratokonu možné indikovat dle topografu přizpůsobenou fotorefrakční keratektomii (Topo-PRK). Ablace by v tomto případě měla být co nejtenčí, tedy do 50 $\mu$ m, doprovázená CXL současně před nebo po ablaci rohovky (164). Jako další možnost je implantace torické fakické nitrooční čočky. U starších pacientů lze provést refrakční lensektomii s implantací torické zadněkomorové nitrooční čočky (67). V současné době dominuje studium možných kombinací dvou i třech metod v léčbě keratokonu.

Mezi další chirurgické postupy v řešení keratokonu patří hluboká přední lamelární keratoplastika (DALK) nebo perforující keratoplastika (PKP) (56). Důležitým faktorem při zvažování perforující keratoplastiky je přítomnost výrazného jizvení rohovky, velmi tenká rohovka (méně než 200 mikrometrů), keratokonus s vysokým rizikem vzniku hydropsu a v případě, že jiné chirurgické zákroky selhávají, nebo jsou kontraindikovány (56). Srovnání DALK a PKP v léčbě keratokonu přinesla metaanalýza autorů Liu a kol. Sledovanými parametry byly: nejlépe korigovaná zraková ostrost (NZO), odmítnutí štěpu a selhání štěpu, pooperační sférický ekvivalent (SE), pooperační astigmatismus, počet endotelových buněk a centrální tloušťka rohovky. Do přehledu bylo zahrnuto šestnáct klinických studií (celkem 6625 očí: 1185 očí podstoupilo DALK, 5440 očí PKP). Ve skupině pacientů, kteří podstoupili DALK byly shledány tyto výsledky: významně lepší pooperační NZO, méně případů rejekce transplantátu a vyšší hodnoty počtu endotelových buněk. V obou skupinách nebyl zjištěn rozdíl v počtu selhání štěpu. Rovněž nebyly zjištěny žádné významné rozdíly v parametrech SE, astigmatismu a tloušťky rohovky. Autoři tedy došli k závěru, že DALK má ve srovnání s PKP nižší účinnost, ale vyšší bezpečnost (119).

## 1.2. Corneal cross-linking

Biomechanické vlastnosti rohovky závisí na uspořádání kolagenu, proteoglykanů a extracelulární matrix. K zabránění progresu ektatických onemocnění rohovky byla vyvinuta metoda fotooxidačního zesíťování kolagenu, která využívá vitamín B2 a ultrafialové záření A (UVA) – crosslinking rohovky (corneal cross-linking, CXL). Cílem této relativně nové léčebné metody je uměle zvýšit stupeň zesíťování v korneálním stromatu, a tím zabránit progresi onemocnění zajištěním dostatečné mechanické stability rohovky. Metodu CXL používáme nejčastěji k zastavení progresu keratokonu. Dále je možné tuto techniku použít při léčbě mikrobiálního rohovkového vředu, ke snížení rizika iatrogenní keratektázie po rohovkových laserových refrakčních zákrocích a ke stabilizaci pellucidní marginální degenerace, což je rovněž forma ektatického onemocnění rohovky.

Vznik této metody se datuje do roku 1996, kdy byla poprvé představena na zasedání ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) ve Fort Lauderdale v USA vědeckou skupinou pod vedením prof. Seilera. Studie sledovala změny fyzikálních vlastností prasečí rohovky po aplikaci CXL in vitro (176). Výsledky vedly autory k dalšímu rozvinutí této metody a její modulaci k využití na lidské rohovce in vitro a později i na léčebnou aplikaci in vivo. Od doby, kdy v roce 2003 Wollensak a kol. poprvé popsali využití procesu CXL v léčbě keratokonu u lidí a zjistili, že progresu keratokonu byla zastavena u všech léčených očí bez vedlejších nežádoucích efektů, byla provedena celá řada významných sledování hodnotících efekt metody CXL také z dlouhodobějšího hlediska (218). Výsledky metody CXL v šestiletém sledování prokázala na obsáhlém souboru 241 očí skupina autorů Raiskup a kol. v roce 2008 (153). V roce 2015 byla prezentována účinnost a bezpečnost metody při léčbě progresivního keratokonu dosažením dlouhodobé stabilizace rohovky a snížením potřeby transplantace rohovky (170, obr. 7). Autoři Raiskup a kol. v retrospektivní studii vyhodnotili 10leté sledování souboru 34 očí léčených pro progresivní keratokonus pomocí CXL. Na konci sledovacího období byl zjištěn významný pokles hodnoty střední apikální keratometrie z 61,5 D před operací na 55,3 D na konci sledovacího období a zlepšení nejlépe korigované zrakové ostrosti. Počet endoteliálních buněk zůstal nezměněn (152).

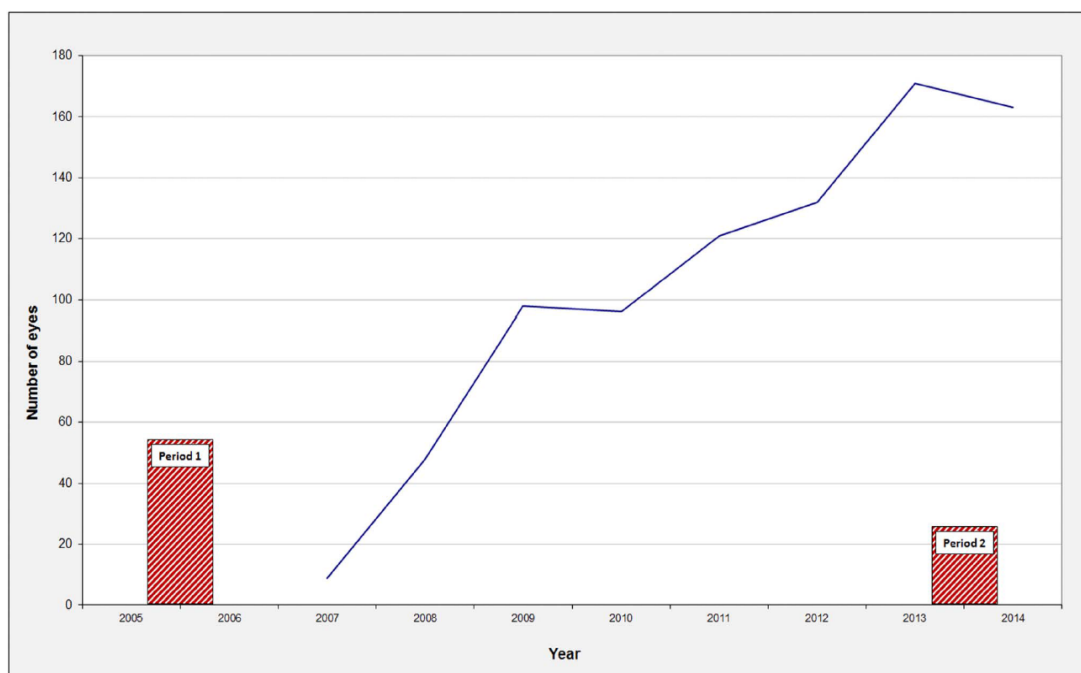


FIGURE 1. The annual number of CXL treatments from 2007 to 2015 (blue line), and the number of keratoplasties for keratoconus in period 1 (2005–2006) and period 2 (2013–2014).

*Obr. 7: Celkový souhrn počtu očí léčených metodou CXL v období od roku 2007 do roku 2015 a porovnání počtu provedených transplantací rohovky v období let 2005 – 2006 a 2013 – 2014.*

*zdroj.: Sandvik, GF., Thorsrud, A., Råen, M. et al.: Does Corneal Collagen Cross-linking Reduce the Need for Keratoplasties in Patients With Keratoconus? Cornea, 2015 Sep; 34(9): 991-5.*

### 1.2.1. Indikace k provedení CXL

Indikace k provedení CXL jsou následující:

- progredující keratokonus (mírný až středně pokročilý stupeň)
- nárůst  $K_{max}$  o 1D za rok nebo dříve (153)
- tloušťka rohovky více než 400 $\mu$ m při dodržení standardního protokolu (192)
- u dětí a dospívajících do 19 let může být CXL indikován v čase diagnózy bez nutnosti prokazatelné progresse (83)
- iatrogenní ektázie: léčba (50, 64, 208, 222) a profylaxe (227)
- pellucidní marginální degenerace (110)
- dekompenzace Fuchsovy endoteliální dystrofie (43)



- bulózní keratopatie (105)
- infekční vřed rohovky (88)
- rozpouštění (angl. „melting“) rohovky (168)

### 1.2.2. Mechanismus CXL

Crosslinks (zesíťovací vazby) je obecný pojem pro chemické můstky mezi řetězci molekul, které vznikají na základě určité chemické reakce. Výsledkem těchto reakcí je změna fyzikálních vlastností daného materiálu. Crosslinking (zesíťování) je hojně využíván v chemickém průmyslu, kde některé technologie dokonce umožňují vratnost těchto změn.

V lidské rohovce můžeme pozorovat vznik těchto můstků spontánně ve vyšším věku (13). Zesíťování molekul kolagenu v tkáních, projevující se ve změně stavby kolagenu v průběhu stárnutí, se projevují v různých částech lidského těla (klouby, cévní systém, ledviny, kapiláry sítnice). Analogické změny způsobuje i vliv slunečního záření a kouření (97). Síťování zahrnuje v lidském organismu dva různé mechanismy. V prvním případě se jedná o přesný enzymatický děj, řízený během vývoje a růstu. Druhý náhodný, neenzymatický mechanismus, známý jako glykace, je součástí procesu stárnutí nebo vzniká jako vedlejší znak některých systémových chorob (diabetes mellitus). Pochopení těchto mechanismů je nyní v popředí vzhledem k rozvoji oblastí vědy zabývajících se potlačením účinků stárnutí (13).

Existuje řada různých možností vzniku cross-linkingu (193):

- enzymatický cross-linking kolagenu za účasti enzymu lisyloxidázy
- prostřednictvím transglutaminázy
- glykace (diabetes mellitus)
- chemický cross-linking (glutaraldehyd, formaldehyd)
- fotochemický cross-linking (pomocí UV záření nebo ionizujícího záření)

Fotosenzibilizátorem v procesu CXL je vitamín B2 (riboflavin). Během CXL procedury se používá ultrafialové záření A (UVA) o vlnové délce 370 nm. Intenzita záření je při standardní metodě CXL 3 mW/cm<sup>2</sup>. Celková energie je 3,4 J a celková expozice záření 5,4 J/cm<sup>2</sup> (192).

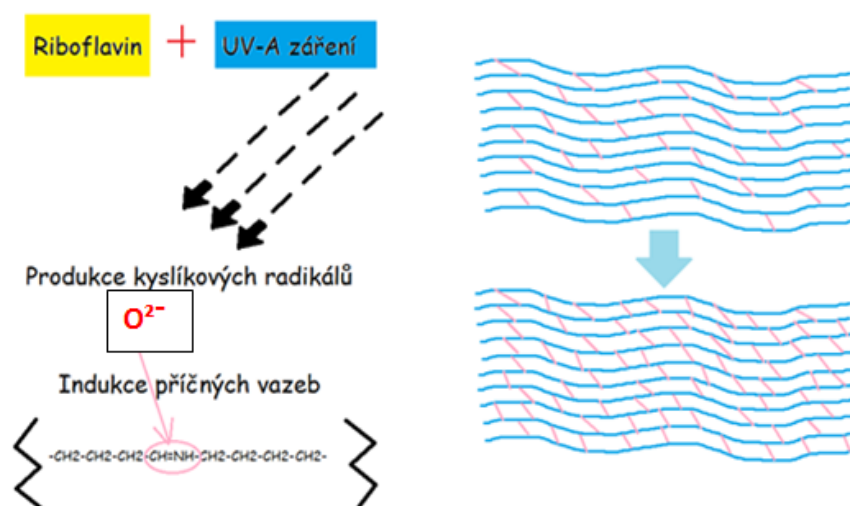
Riboflavin má tedy v procesu CXL dvě důležité funkce:

a/ absorpce UVA záření

Při provedení CXL podle standardního protokolu dochází v deepitelizované rohovce o tloušťce 400  $\mu\text{m}$  k absorpci 94 % UV záření. Tím riboflavin poskytuje tzv. „stínící efekt“ (riboflavin shielding), čímž zabraňuje poškození hlubších okulárních struktur (9, 192).

b/ funkce fotosenzibilizátoru

Svou excitací po působení světla umožňuje vznik volných kyslíkových radikálů, které způsobí chemickou změnu amino-skupiny mezi aminokyselinovými zbytky kolagenních vláken a vznik nových síťovaných spojů – tzv. příčných vazeb (crosslinking bonds, cross links) mezi molekulami kolagenu i mezi proteiny proteoglykanového jádra (226) (obr. 8). Zdá se, že mohou vznikat i interfibrilární vazby, nezvyšuje se však počet interlamelárních vazeb (217). Maximální účinek zesíťování kolagenu je v přední části rohovky v hloubce 300  $\mu\text{m}$ . Je to z důvodu rychlého poklesu UVA záření v rohovkovém stromatu v důsledku absorpce UVA záření fotomediátorem.



Obr. 8: Princip metody CXL

U fotooxidačního zesíťování metodou CXL se realizuje aerobní i anaerobní typ fotochemické reakce. U aerobního typu (typ II) fotochemické reakce reaguje

tripletový riboflavin s molekulárním kyslíkem za vzniku singletového kyslíku. Pokud dojde k depleci nezbytného kyslíku, převládá anaerobní reakce (typ I), kdy tripletový riboflavin reaguje přímo s kolagenními bílkovinami a vytváří volné radikály.

### 1.2.3. Základní účinky CXL

Mezi prokazatelné účinky CXL patří: zvýšení biomechanické pevnosti rohovky o 328,9 % (219), zvýšení rigidity a biomechanické stability rohovky (191), zvýšení odolnosti k hydrataci (216), zvýšení průměru kolagenních lamel (221), zvýšení modulu pružnosti v čase, zvýšení odolnosti vůči enzymatické degradaci (195), snížení permeability rohovky (198). Po provedení CXL dále dochází k apoptóze keratocytů do hloubky přibližně 300  $\mu\text{m}$  (220). Významné jsou prokazatelné antimikrobiální účinky této metody (121). Studium vlivu CXL na biomechanické vlastnosti rohovky in vivo umožňuje Ocular Response Analyzer (ORA, Reichert Ophthalmic Instruments, Depew, New York) a dynamické korneální topografie (OCULUS Corvis ST, OCULUS, Německo) (20). Autoři Sedaghat a kol. prokázali na souboru 97 očí zvýšené hodnoty hystereze rohovky a faktoru rezistence rohovky po zákroku CXL, změny však nebyly statisticky signifikantní (174, 175). Spoerl a kol. poukázali na význam tzv. hodnoty  $p2\text{area}$ , jejíž hodnota po provedení CXL statisticky významně vzrůstá (194). Vliv metody CXL na tuhost rohovky, průměr kolagenních vláken odolnost vůči hydrataci a enzymatickému štěpení sledovala rovněž skupina autorů Beshtawi a kol. Výsledky ukazují, že CXL pomocí UVA a riboflavinu zvyšuje biomechanické vlastnosti rohovkové tkáně, které zůstávají v čase stabilní. Docházejí k závěru, že tato léčba by se mohla stát budoucím standardem léčby progredujícího keratokonu (18). Další metody, které přinášejí nové poznatky v měření vlastností rohovky, jsou konfokální mikroskopie (91, 173), ultrazvuková elastografie (74) a autofluorescence (81). Účinnost léčby metodou CXL v zastavení progresu keratokonu závisí především na stabilitě indukovaných biomechanických účinků.

#### **1.2.4. Standardní metoda CXL**

Standardní „Drážďanský“ protokol zahrnuje následující postup. Výkon se provádí za sterilních podmínek na operačním sále. Před zahájením léčby se provede kontrola intenzity záření pomocí kalibrovaného přístroje. Po odstranění epitelu rohovky se jako fotosenzibilizátor používá isoosmolární 0,1% roztok riboflavinu, který je aplikován na rohovku každé 2 minuty po dobu 30 minut. Plocha o průměru 8 mm v centrální části rohovky je poté ozářena UVA zářením o vlnové délce 370 nm a intenzitě 3 mW/cm<sup>2</sup>. Během 30minutového ozařování je na rohovku aplikován riboflavin ve formě kapek, a to každé 3 minuty (dle doporučení výrobce). Pacient fixuje centrální světelnou diodu sondy. V průběhu výkonu je pacient pod nepřetržitou kontrolou centraxe ozařovacího svazku. Pooperačně pacient obdrží antibiotika ve formě kapek s poučením aplikace do spojivkového vaku 5 x denně celkem 5 dní a epitelizancia. Po operaci je nasazena terapeutická kontaktní čočka. V průběhu metody CXL používáme k ozáření rohovky UVA záření. Hodnota doby ozařování je dle Drážďanského protokolu stanovena na 30 min, celková expozice záření 5,4 W/cm<sup>2</sup>. Radiační intenzita UV záření se během průchodu tkání rohovky sníží natolik, že při síle UVA záření 3 mW/cm<sup>2</sup> není dosaženo prahu destrukce pro endotel. Při dodržení daných parametrů dosahujeme absorpce 94 % UV záření v deepitelizované rohovce o tloušťce 400 µm bez ohrožení endotelu rohovky, čočky nebo sítnice. Volba ozařované oblasti o průměru 8 mm zaručuje zesíťování pouze v požadované části rohovky (192).

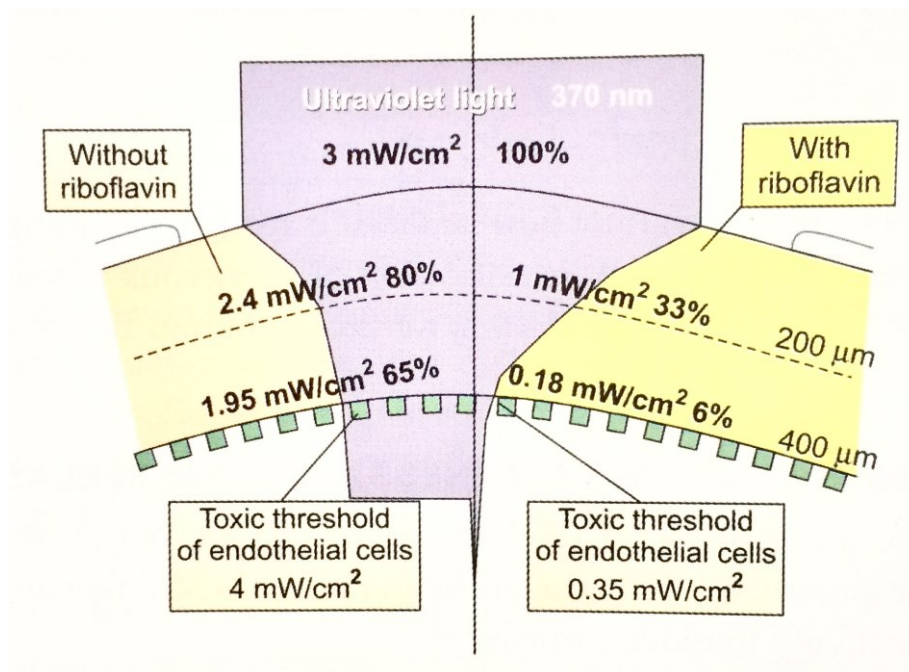
#### **1.2.5. Modifikace standardního provedení CXL**

##### **CXL u tenké rohovky**

V pokročilých stadiích keratokonu dochází k poklesu tloušťky rohovky. Jedním z důležitých předpokladů pro bezpečnost CXL procedury je dle "Drážďanského protokolu" zachování rohovkového stromatu (po peroperační deepitelizaci rohovky) v minimální tloušťce 400 µm. Toto vede k omezení UVA záření na 0,18 mW/cm<sup>2</sup> na úrovni endotelu, což je pod hranicí prahu poškození endotelu rohovky, která je dána hodnotou 0,35 mW/cm<sup>2</sup> a pod hranicí prahu poškození čočky a sítnice.

To by platilo za předpokladu, že rohovka byla fotosenzitivována 0,1% roztokem isoosmolárního riboflavinu v 20% dextranu po dobu 30 minut a vystavena UVA záření 370 nm při 3 mW/cm<sup>2</sup> po dobu 30 minut (141, 192) (obr. 9).

Pokud by během procedury byla tloušťka stromatu tenčí než 400 μm, došlo by vlivem UVA záření k ireverzibilnímu poškození struktur oka (192). Použití hypoosmolárního roztoku způsobí perioperační nabobtnání rohovky, zvýšení tloušťky stromální vrstvy rohovky a v důsledku toho ochranu endotelu i dalších struktur oka. Rovněž je tímto způsobem zabráněno vzniku stromálních jizev (149). Pro úspěšný postup CXL je však třeba dodržet minimální předoperační tloušťku stromatu 330 μm (63).



Obr. 9: Snížení intenzity UV záření v hloubce rohovky 400 μm v případě přítomnosti a nepřítomnosti riboflavinu.

zdroj: Pinelli R, Leccisotti A.: *Keratoconus surgery and cross-linking*. Jaypee, 2009; 768 s. ISBN 978-81-8448-493-9. 186s:16

V roce 2009 publikovali prof. Hafezi a kol. první studii léčby keratokonu v případě tloušťky rohovky méně než 400 μm metodou CXL. Jako fotosenzibilizátor použil hypoosmolární roztok bez dextranu, ředěný fyziologickým roztokem. Po deepitalizaci byla průměrná tloušťka rohovky 365 μm s minimem 323 μm.

Po aplikaci roztoku riboflavinu byla rohovka ve všech případech vyšší než 400  $\mu\text{m}$ . Zastavení nebo snížení progresu bylo popsáno u všech případů (65).

Contact Lens-assisted cross-linking (CACXL) je alternativa léčby tenkých rohovek metodou CXL pomocí isoosmolárního roztoku (obsahující dextran). Zvýšení funkční tloušťky rohovky před ozáření je způsobeno nasazením 100  $\mu\text{m}$  tenké kontaktní čočky, která propouští UV světlo a která je rovněž perioperačně sycena riboflavinem. Po aplikaci proběhne záření o intenzitě 3  $\text{mW}/\text{cm}^2$ .

Sachdev popisuje techniku obdobné stromální expanze tenkých a ultratenkých rohovek keratokonických pacientů pomocí stromálních lentikulí dárců, které se uchovávají po proběhlé metodě SMILE (small incision lenticule extraction). Stromální lentikula je umístěna na hostitelskou rohovku po odstranění epitelu. Nejtlustší oblast o průměru lentikuly o 6,2 mm odpovídá nejtenčí části konu rohovky. Zbývající postup kolagenu síťování (CXL) se provádí rutinním způsobem (167).

Snaha o vylepšení konvenční procedury CXL, která by vedla ke snížení rizika vážných komplikací spojených se standardním protokolem, jako je např. infekce, haze nebo dekompenzace rohovky a zlepšení komfortu pro pacienta, byla počátkem vzniku modifikací standardního protokolu (129).

### **Transepiteliální CXL**

Peroperační odstranění epitelu rohovky způsobuje pooperační bolest a vystavuje rohovku vyššímu riziku vzniku infekce, riziku perzistujícího epiteliálního defektu a trvalé rohovkové jizvy. Jednou z metod, která je založena na ušetření epitelu rohovky, a tedy snížení uvedených rizik, je transepiteliální CXL (TE CXL).

S touto metodou jsou spojeny dvě zásadní výzvy:

- průnik molekul riboflavinu intaktní vrstvou epitelu (72)
- vysoký UVA absorpční koeficient epitelu rohovky a Bowmanovy membrány (143)

Molekulární hmotnost riboflavinu je 340 Da. Průnik molekul intaktním epitelem rohovky je výrazně snížen již od molekulární hmotnosti 180 Da (79). Koeficient difúze

riboflavinu pro epitel rohovky je ve srovnání se stromatem rohovky nižší (21). Navíc v případě použití dextransu v roztoku riboflavinu je spektrofotometricky prokazatelné, že průnik riboflavinu stromatem rohovky není dostatečný i přes provedené narušení epitelu (72). Riboflavin tedy prakticky neproniká intaktním epitelem rohovky a jeho použití v případě neporušení epitelové bariéry v rámci procedury CXL může způsobit vážné poškození oka zářením.

Způsoby zvýšení penetrace riboflavinu přes epitel rohovky mohou být následující:

- změna permeability epitelu:
  - benzalkoniumchlorid (BAC)
    - podávaný izolovaně před procedurou
    - součást komerčně vyráběných roztoků riboflavinu (Ricola TE, Sooft, Montegiorgio, Itálie)
  - kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)
  - tetrakain, ethanol a gentamicin
- změna fyzikálně-chemických vlastností roztoku riboflavinu (osmolarita, iontoforéza, koncentrace roztoku) (59)
- částečné mechanické narušení epitelu (68)
- využití excimerového laseru k částečnému odstranění epitelu rohovky (14)
- využití femtosekundového laseru k vytvoření centrální stromální kapsy pro aplikaci riboflavinu (93).

V posledních letech bylo publikováno mnoho prací zabývajících se efektivitou a bezpečností TE CXL. Raikup a kol. experimentálně prokázali, že za použití benzalkoniumchloridu a hypoosmolárního chloridu sodného dochází k narušení pevných meziepitelových spojů (angl. „tight junctions“) epitelové bariéry. Za těchto podmínek jsou koncentrace riboflavinu v králičí rohovce srovnatelné jako při odstranění epitelu. Klinické výsledky však odhalily problémy s bezpečností ve smyslu perzistujícího rohovkového defektu (150). Zesíťování kolagenu rohovky lze zobrazit pomocí optické koherentní tomografie v předním stromatu rohovky demarkační linií danou hranicí apoptózy keratocytů. Tato linie je potvrzena v hloubce 250 - 330  $\mu\text{m}$  v případě standardního CXL oproti 100 - 140  $\mu\text{m}$  v případě metody TE CXL (123).

Výsledky léčby keratokonu metodou TE CXL publikovali v roce 2014 Lesniak a kol. V diskusi autoři rozvedli srovnání s předchozí publikací, která sledovala stejné parametry při standardním protokolu. Srovnání ukázalo, že při TE CXL dochází k signifikantnímu oploštění rohovky, které je však menší než v případě standardního protokolu (117). Cerman a kol. rovněž porovnávali TE CXL a standardní CXL. Sledovací období bylo 18 měsíců. V závěru autoři shrnují, že metoda TE CXL by měla být používána pouze u pacientů, kde nemůžeme provést standardní CXL. TE CXL nemá tak výrazný efekt na snížení  $K_{max}$ , avšak efekt na zrakovou ostrost může být stejný jako u standardního CXL (27). Stejně výsledky přináší rovněž studie Soeterse a kol. (189).

Skupina autorů Shalchi a kol. publikovala v roce 2015 rozsáhlý přehled srovnávající efektivitu a bezpečnost TE CXL a standardního CXL v léčbě keratokonu. Byly sledovány parametry: nekorigovaná (ZO) a nejlépe korigovaná zraková ostrost (NZO), průměrný SE (sférický ekvivalent), astigmatismus, maximální keratometrie ( $K_{max}$ ) a nežádoucí účinky. V hodnocení parametrů ZO, NZO, průměrný SE, astigmatismus a  $K_{max}$ , došlo k významnému zlepšení při poslední kontrole celkem v 81%, 85%, 93%, 62%, a 93% studií s použitím standardního CXL oproti 66,7%, 80%, 75%, 33%, a 40% studií s použitím TE CXL. Většina studií prokázala po léčbě pokles tloušťky rohovky. Stromální edém, zánět nebo jizvení rohovky, selhání léčby, reoperace a konverze na transplantaci rohovky byly hlášeny pouze ve studiích standardního CXL. Počet endotelových buněk zůstal nezměněn (181).

Mezi výhody transepiteliální CXL patří jednoduchost, minimální pooperační diskomfort pacienta, rychlý návrat zrakové ostrosti a bezpečnost, především nižší riziko infekce rohovky. Studie prokazují snížení citlivosti rohovky s následnou plnou rehabilitací následně po obou metodách, dříve však při metodě TE CXL (190).

### **Akcelerovaný CXL**

Jinou modifikací přináší změna času působení UVA záření při zachování celkové energie aplikovaného záření (akcelerovaný CXL – ACXL)).

Bunsen-Roscoe zákon fotochemické reciprocitity říká, že stejného fotochemického efektu se zachováním konstantní celkové energie dosáhneme kratším iradiačním intervalem při aplikaci zvýšené intenzity záření. Komerčně



dostupné přístroje tedy dosahují zrychleného zesíťování během několika minut zvýšením intenzity UVA záření a zkrácení doby expozice při zachování stejné celkové energie záření. Přístroje jsou schopné poskytovat záření o intenzitě do 43 mW/cm<sup>2</sup>, kdy celkový čas 2 minuty dosahuje hodnot celkové energie Drážďanského protokolu, tj. 3,4 J a celkovou expozici záření 5,4 J/cm<sup>2</sup>.

V současné době jsou dostupné experimentální studie, které prokazují srovnatelné zvýšení pevnosti rohovky po standardním a akcelerovaném CXL (188). Zároveň jsou však dostupné publikace, které dokazují snížení biomechanického účinku za použití akcelerovaného CXL oproti standardnímu CXL. Tento nedostatečný efekt je zde vysvětlován nedostatečným množstvím kyslíku způsobeným nedostatečnou intrastromální difúzní kapacitou kyslíku a zvýšenou spotřebu kyslíku při vyšší intenzitě a kratším trvání záření (66). CXL je fotooxidativní reakce vyžadující kyslík během formace kovalentních vazeb (151). Nedostatečné průběžné doplňování kyslíku v rohovce během AXCL může být limitujícím faktorem efektivity této procedury.

Hammer a spol. sledovali ex vivo na prasečích rohovkách vliv různé intenzity záření za adekvátně upravené doby trvání záření (při zachování zákona reciprocity) na tkáň rohovky. Parametry použitého záření na prasečí rohovky byly: 3 mW/cm<sup>2</sup> (doba záření 30 minut), 9 mW/cm<sup>2</sup> (doba záření 10 minut), a 18 mW/cm<sup>2</sup> (doba záření 5 minut). Všechny skupiny byly porovnávány mezi sebou navzájem a současně s kontrolní skupinou, ve které proběhla pouze aplikace 0,1% riboflavinu bez ozáření (66). Autoři zjistili statisticky významně nižší biomechanický účinek crosslinkingu při použití vyšší intenzity záření za současného zkrácení doby ozáření ve srovnání se standardní procedurou (3 mW/cm<sup>2</sup>, doba záření 30 minut). Autoři v závěru uvádějí, že intrastromální difúzní kapacita kyslíku a zvýšená spotřeba kyslíku spojená s vyšší intenzitou záření může být omezujícím faktorem, který může vést ke snížení účinnosti léčby.

Tuto hypotézu podporuje rovněž experimentální studie autorů Richoze a spol., ve které byl zkoumán vliv akcelerovaného CXL (9 mW/cm<sup>2</sup>, doba záření 10 minut) na pevnost rohovky za normální a snížené koncentrace kyslíku v prostředí. Biomechanický účinek procedury byl zaznamenán pouze v případě normální koncentrace kyslíku v prostředí, nikoli pokud byla koncentrace kyslíku v prostředí nižší (158).

Další pohled na zvyšování intenzity záření v rámci metody CXL přináší práce Wernliho, který ve své studii ex vivo prokazuje, že Bunsen-Roscoe zákon reciprocity je platný pouze pro UV záření o intenzitě do 45 mW/cm<sup>2</sup> a době trvání záření delší než 2 minuty. Kratší doba trvání ozáření při vyšších intenzitách již nedosahuje požadovaného léčebného efektu (212).

V souvislosti s výše uvedenými poznatky je však nutno brát v úvahu jiné podmínky plynoucí z provádění experimentálních studií na enukleovaných zvířecích očích, které nelze plně srovnávat s výsledky dosaženými in vivo u pacientů s keratokonem. Stejně tak průběh fotochemické reakce může být odlišný v normální rohovce a v rohovce s keratektázií (210).

V posledních letech se tedy objevují studie, které popisují efekt a výsledky ACXL v klinické praxi. Mezi hlavní sledované parametry patří zraková ostrost, keratometrické hodnoty, keratometrické indexy, biomechanické vlastnosti a tloušťka rohovky, hloubka demarkační linie, denzita keratocytů předního stromatu rohovky, výskyt haze a počet endotelových buněk (69, 185, 137).

Hashemi přináší dlouhodobé výsledky léčby metodou ACXL v porovnání se standardní procedurou. Studie zahrnovala 31 pacientů s oboustranným progresivním keratokonem, kdy jedno oko bylo léčeno standardně a druhé metodou ACXL (18 mW/cm<sup>2</sup>, doba záření 5 minut) se zachováním celkové expozice záření 5,4 J/cm<sup>2</sup> v obou skupinách. K zastavení progresu keratokonu došlo v obou skupinách. Ve skupině očí léčených standardní procedurou bylo pooperační oploštění rohovky větší. V žádné skupině nedošlo k úbytku endotelových buněk (69).

Shetty a kol. provedli prospektivní randomizovanou studii, ve které byl porovnáván efekt různých modifikací času a intenzity záření. Byla sledována nejlépe korigovaná zraková ostrost, keratometrie, pachymetrie, endotelová mikroskopie a demarkační linie. Byly použity následující moduly: 3 mW/cm<sup>2</sup> (doba záření 30 minut), 9 mW/cm<sup>2</sup> (doba záření 10 minut), 18 mW/cm<sup>2</sup> (doba záření 5 minut) a 30 mW/cm<sup>2</sup> (doba záření 3 minuty). Na konci sledovacího období vykazovaly konvenční a akcelerovaný CXL do 18 mW/cm<sup>2</sup> lepší výsledky zrakové ostrosti, refrakční i keratometrické. V závěru autoři uvádí, že metody ACXL používající 9 mW/cm<sup>2</sup> a 18 mW/cm<sup>2</sup> se zdají být slibné (185).

Ozgurhan léčil 34 pacientů s tloušťkou rohovky pod 400 μm metodou ACXL s použitím záření 30 mW/cm<sup>2</sup> (doba záření 3 minuty). Prokázal stabilizaci progresu keratokonu bez ztráty endotelových buněk (137).

## **„Customized“ CXL**

Další možnou modifikací zákroku je tzv. „Customized Corneal Cross-linking“. Prof. Seiler a kol. porovnávali v prospektivní studii stabilizační efekt této metody o intenzitě záření  $9 \text{ mW/cm}^2$  a celkové energie záření v rozmezí od  $5,4 \text{ J/cm}^2$  až do  $10 \text{ J/cm}^2$  (záření bylo centrováno na oblast maximálního vyklenutí rohovky) a kontrolní skupiny ( $9 \text{ mW/cm}^2$ , celková energie  $5,4 \text{ J/cm}^2$ ). V obou skupinách byly zaznamenány statisticky významné změny 1 rok po operaci v hodnotách pachymetrie a  $K_{\text{max}}$ . Doba hojení epitelu, změna  $K_{\text{max}}$  a index regularizace byl výrazně lepší ve skupině „customized“ CXL (177).

## **Pulzní CXL**

Speciální systém pro CXL (Avedro KXL Systém, Avedro, Inc., Waltham, USA) dokáže vyvinout nejen kontinuální, ale i pulzní vlnu záření. Při využití pulzního systému záření  $30 \text{ mW/cm}^2$  po dobu 8 minut o celkové dávce energie  $7,2 \text{ J/cm}^2$  byl zjištěn vyšší apoptotický efekt keratocytů než u kontinuální léčby.

### **1.2.6. Kombinace CXL a jiných metod**

Principem zákroku CXL je stabilizace ektázie zpevněním rohovky prostřednictvím indukce nových kovalentních vazeb v kolagenu přední části stromatu rohovky. Vedlejším přínosem jsou i změny svědčící pro zlepšení nálezu v čase (zlepšení hodnot zakřivení rohovky a korigované zrakové ostrosti). Tyto změny mají však minimální refrakční efekt. Z tohoto důvodu je na místě zvážení použití laserové rohovkové refrakční chirurgie ke zlepšení zrakové ostrosti. Jednou z upřednostňovaných metod je laserová povrchová ablace rohovky metodou fotorefrakční keratektomie. Studie poukazují na zlepšení sledovaných parametrů. K této problematice je však nutno přistupovat opatrně s ohledem na skutečnost, že zákrok podstupují rohovky již primárně postižené ektázií, kdy fotoablačním zákrokem zeslabíme již tak tenkou rohovku. Je tedy nutno postupovat s ohledem na

možnost vyššího rizika vzniku pooperačních komplikací, především iatrogenní ektázie.

Upřednostňována je metoda simultánní topoPRK („topography-guided photorefractive keratectomy“) s navazujícím CXL (102). Publikovány byly rovněž případy kombinace fotorefrakční keratektomie (PRK) (47) a CXL nebo použití transepiteliální fotorefrakční keratektomie (transPRK) a CXL (109). Do této kategorie léčebných metod patří rovněž provedení CXL podle tzv. Aténského protokolu. Obnáší odstranění epitelu, částečnou stromální, topograficky vedenou, ablací excimer laserem a následné provedení akcelerovaného (high-fluence) CXL (95).

Využití jiné metody laserových refrakčních zákroků (např. LASIK) u pacientů s keratokonem přináší z dlouhodobého hlediska vysoké pooperační riziko potencující progresi ektázie, neboť tvorbou rohovkové lamely dochází k mechanickému narušení kolagenních vláken stromatu rohovky. Naopak, v současné době je intenzivně studován efekt CXL v prevenci pooperační ektázie u pacientů podstupujících tuto laserovou refrakční operaci (178).

Samostatnou a z hlediska určování směru vývoje refrakční chirurgie zajímavou jednotkou je fotorefrakční intrastromální CXL (photorefractive intrastromal CXL - PiCXL). Tento nový postup má za cíl využít zesíťování pomocí riboflavinu a symetrického homogenního UV záření ke změně kolagenu rohovky tak, že způsobí změnu lomu paprsku. Využití má být zaměřeno na korekci mírné krátkozrakosti, dalekozrakosti a astigmatismu.

V centru pozornosti je rovněž kombinace metody CXL a implantace intrastromálních rohovkových prstenců (intraströmäl corneal ring segment - ICRS), a to jak v případě simultánního provedení, tak v aplikaci postupné (205). V případě použití obou metod odděleně po sobě je vhodnější nejprve implantace ICRS a poté následné provedení CXL (28). Tvorba kanálů pro implantaci ringů pomocí femtosekundového laseru je možná i po předchozím provedení ošetření rohovky metodou CXL, ale je zapotřebí upravit parametry výkonu femtosekundového laseru (45). Popsáno je rovněž využití kombinace tří metod: ICRS, PRK a CXL (28, 87).

Jako další možnost kombinace metod při řešení dioptrické vady u pacientů s keratokonem se nabízí využití implantace fakické nitrooční čočky následně po provedení CXL. V posledních letech jsou publikovány další možné varianty využití, např. v rámci tzv. „3-stage procedure“, které obnášejí kombinaci implantace ICRS, provedení CXL a následně implantaci torické fakické nitrooční čočky (30).

### 1.2.7. Bezpečnost CXL

V rámci procedury CXL může dojít ke komplikacím, které se objevují v 1 - 10% dle pokročilosti nálezu (179). Odstranění epitelu rohovky v rámci standardní metody s sebou přináší vyšší riziko pooperačních komplikací. Jednou z nejzávažnějších je infekční keratitida, která může mít původ bakteriální (155), virový (49) i mykotický (154). Aplikace terapeutické kontaktní čočky po dokončení zákroku zvyšuje riziko vzniku akantamébové keratitidy. Další možnou komplikací je prodloužená reepitelizace rohovky, která může ve výsledku způsobit trvalé, nevratné snížení zrakové ostrosti vznikem centrální jizvy (četnost výskytu ve 2,8%) (101). Po nekomplikovaném průběhu operace se může vyskytnout haze (148). Raiskup a kol. analyzoval rozvoj permanentního jizvení korneálního stromatu rohovky po provedení CXL. Jejich soubor zahrnoval 163 očí 127 pacientů s keratokonem ve stadiu 1 – 3. Výskyt významného jizvení rohovky 1 rok po CXL byl u 8,6 % očí a rozvinul se zejména u očí s vysokými hodnotami  $K_{max}$  a tenkou rohovkou (149). Po operaci CXL byla rovněž popsána přítomnost sterilních infiltrátů rohovky v periférii rohovky (7,6 %), které vznikají pravděpodobně jako výsledek hypersenzitivní reakce na riboflavin a UVA záření (160).

Mezi další komplikace patří vznik tzv. „meltingu“ (z angl. melting = rozpad, rozpuštění změkčení) rohovky (48). Kymionis a kol. popsali ve své práci vznik stromální lamelární keratitidy po provedení CXL u pacienta s ektázií rohovky po provedeném laserovém refrakčním zákroku LASIK (107).

Fatální komplikací CXL je keratolýza a perforace rohovky (114). Poškození endotelových buněk se vznikem rohovkového edému může vzniknout jako následek léčby tenké rohovky použitím isotonického roztoku s dextrans, který způsobí perioperační ztenčení rohovky a nezajistí tak dostatečnou tloušťku „ochranné“ stromální zóny (55, 112, 182). S ohledem na výčet těchto vážných komplikací jsou v současné době stanoveny určité indicie vyššího rizika známého vzniku těchto stavů, kterými jsou: tenká rohovka (v hodnotách splňujících indikační kritéria), věk nad 35 let, visus 20/25 a lepší,  $K_{max}$  nad 65 D, resp. 58 D (101), přítomnost Vogtových strií (11, 101) a přidružená onemocnění, např. Downův syndrom (48) nebo atopie (40). Selhání léčby je obvykle definováno jako kontinuální progrese nemoci se zvýšením  $K_{max}$  o 1 D přes předoperační hodnoty (101).

## **2. Cíl práce**

První klinické studie hodnotící využití crosslinkingu rohovky v léčbě progredujícího keratokonu byly publikovány před více než 10 lety. Od té doby byla tato metoda, jejíž postup se řídil podle tzv. standardního protokolu rozsáhle studována a následně byl demonstrován její jasný příznivý klinický i topografický efekt v zabránění progresu keratokonu. Určitým nedostatkem tohoto konvenčního postupu je dlouhé trvání procedury. V současné době jsou intenzivně studovány alternativní postupy vedoucí se zkrácení tohoto léčebného procesu. Metoda akcelerovaného crosslinkingu rohovky využívá tzv. zákona recipacity, dle kterého lze téhož fotochemického účinku dosáhnout při snížené době ozáření a odpovídajícím způsobem zvýšené intenzitě záření tak, aby celková dávka zůstala stejná. Tato modifikace výkonu tak přináší primárně větší časový komfort pro pacienta.

Cílem naší práce bylo zhodnocení léčby keratokonu metodou akcelerovaného crosslinkingu rohovky ve dvouletém sledování na základě vyhodnocení následujících parametrů: nekorigovaná a nejlépe korigovaná zraková ostrost, keratometrie přední plochy rohovky v nejplošším a nejstrmějším meridiánu, maximální hodnota keratometrie a tloušťka rohovky v nejtenčím místě.

## **3. Metodika**

### **3.1. Soubor**

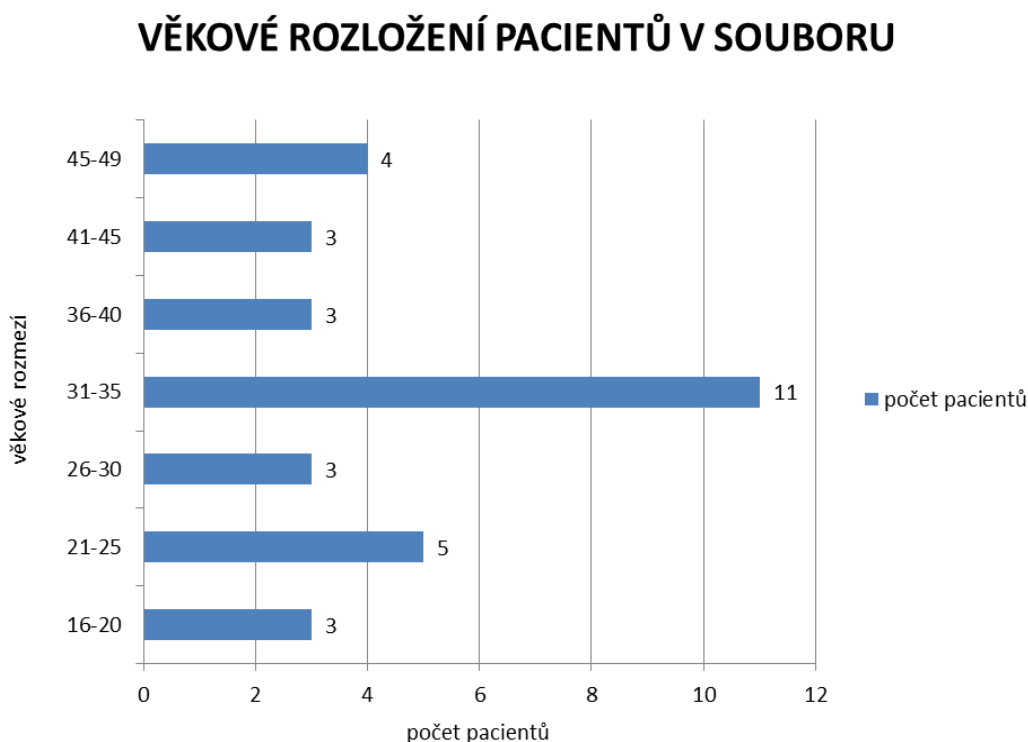
Soubor tvořilo 35 očí 32 pacientů, kteří podstoupili akcelerovaný corneal cross-linking na Oční klinice Fakultní nemocnice Hradec Králové v letech 2012 - 2014. Jednalo se o 23 mužů, 7 žen. Průměrný věk byl 32 let (16 - 47 let). Věkové rozložení pacientů v souboru a rozložení podle pohlaví zobrazuje graf 1 a graf 2.

Při vstupním vyšetření bylo provedeno odebrání anamnézy, vyšetření nekorigované a nejlépe korigované zrakové ostrosti (brýlová korekce), biomikroskopie, změření nitroočního tlaku (bezkontaktní tonometr, NT-530, NIDEK, Japonsko), vyšetření refrakce (autorefraktometr, AR 310A, NIDEK, Japonsko), topografie rohovky a pachymetrie (Pentacam, Oculus, Inc., Německo). K zákroku

CXL jsme indikovali pacienty, kteří splňovali indikační kritérium progresu keratokonu: zvýšení hodnoty maximální keratometrie v apexu keratokonu ( $K_{max}$ ) o 1 D a více za rok nebo dříve. Soubor obsahoval 9 pacientů s předoperační tloušťkou rohovky v nejtenčím místě 400 - 450  $\mu\text{m}$  včetně epitelu. U těchto pacientů jsme použili k syčení rohovky hypotonický roztok riboflavinu (MedioCROSS H hypotonický, Avedro Inc., USA). V ostatních případech jsme použili izotonický roztok riboflavinu (MedioCROSS M izotonický, Avedro Inc., USA). Předoperační data byla porovnána s výsledky získanými za 6 měsíců, 1 rok a dva roky po operačním zákroku.

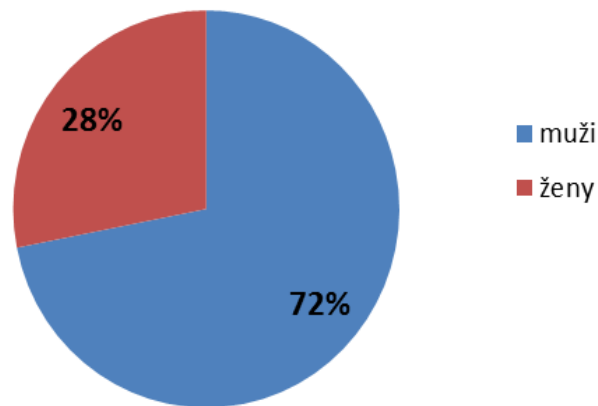
Vyřazovací kritéria byla: jizvení v centrální části rohovky, tloušťka rohovky v nejtenčím místě méně než 400  $\mu\text{m}$  včetně epitelu, věk <15let a >50 let, refrakční operace nebo jiné operace očí v anamnéze, oční herpetická infekce nebo infekce herpes viry v anamnéze, jiné současné infekční onemocnění oka nebo těžká infekční onemocnění oka v anamnéze, jiné rohovkové nebo oční onemocnění, diabetes mellitus, těhotenství a laktace.

Graf 1: Věkové rozložení pacientů v souboru.



Graf 2: Věkové rozložení pacientů v souboru.

## ROZLOŽENÍ PACIENTŮ V SOUBORU PODLE POHLAVÍ



### 3.2. Sledované parametry

ZO - nekorigovaná zraková ostrost

NZO - nejlépe korigovaná zraková ostrost (brýlová korekce)

K1 - keratometrie přední plochy rohovky v nejplošším meridiánu  
(sagitální zobrazení)

K2 - keratometrie přední plochy rohovky v nejstrmějším meridiánu  
(sagitální zobrazení)

K<sub>max</sub> – maximální hodnota zakřivení přední plochy rohovky  
(sagitální zobrazení)

Rohovkový astigmatismus - astigmatismus přední plochy rohovky

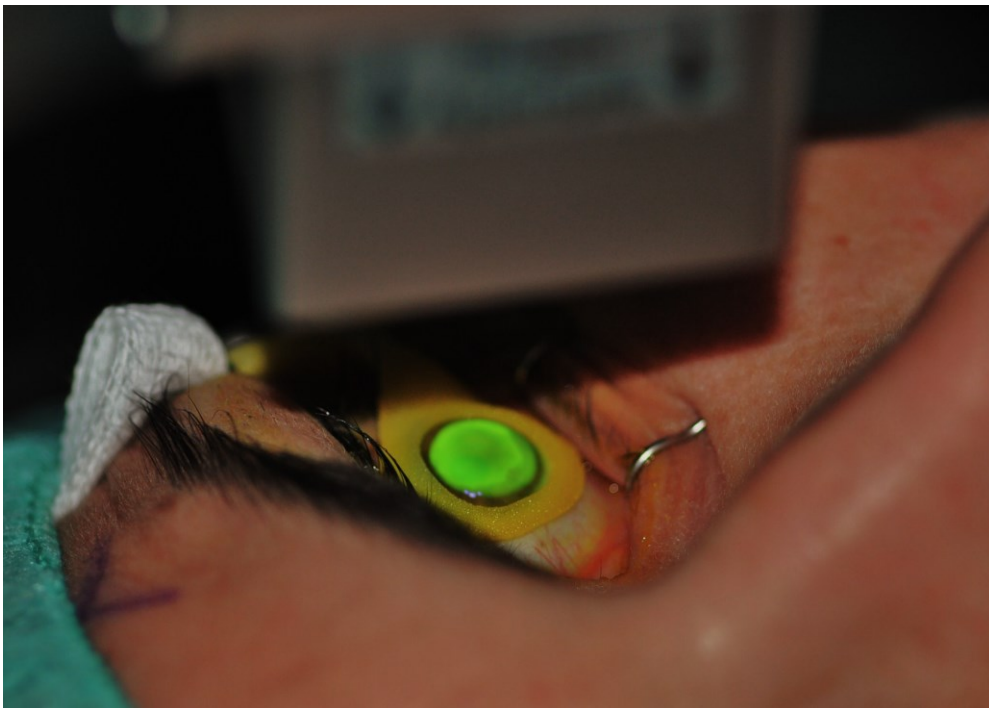
pachymetrie – tloušťka rohovky v nejtenčím místě

Parametry K1, K2, K<sub>max</sub>, rohovkový astigmatismus a pachymetrie byly získány měřeními na přístroji Pentacam.



### 3.3. Průběh zákroku, pooperační péče

Zákrok byl prováděn ambulantně za sterilních podmínek na operačním sále. Všechny zákroky provedl 1 operatér. Třicet minut před výkonem byly pacientovi podány léky proti bolesti (Paralen 500 mg tbl. Zentiva, Česká republika). Po aplikaci lokální anestézie (Benoxi 0,4% gtt, Unimed Pharma, Slovensko) jsme nasadili rozvěrač víček a provedli manuální abrazi epitelu rohovky spatulí. Jako fotosenzibilizátor jsme použili 0,1% roztok riboflavinu, který jsme aplikovali na rohovku každé 2 minuty po dobu 30 minut (MedioCROSS M isotonický, Avedro Inc., USA). V případě tloušťky rohovky 400 – 450  $\mu\text{m}$  včetně epitelu jsme aplikovali hypotonický roztok riboflavinu (MedioCROSS H hypotonický, Avedro Inc., USA). Plocha o průměru 9,5 mm v centrální části rohovky byla poté ozářena UVA zářením o vlnové délce 365 nm a intenzitě 9  $\text{mW}/\text{cm}^2$  (přístroj UV-X 2000, IROC Innocross, Švýcarsko). Průběh ozáření rohovky nasycené riboflavinem UVA zářením ukazuje obr. 10.



*Obr. 10: Ozáření rohovky nasycené riboflavinem UVA zářením  
zdroj: fotodokumentace autora*

Během desetiminutového ozařování jsme na rohovku dále aplikovali riboflavin ve formě kapek, a to každých 5 minut (dle doporučení výrobce). Pacient fixoval centrální světelnou diodu sondy. V průběhu výkonu byl pacient pod nepřetržitou kontrolou centrace ozařovacího svazku záření lékařem.

Pooperačně pacient obdržel antibiotika ve formě kapek (Gentamicin 0,3% gtt, Polfa, Polsko) s poučením aplikace do spojivkového vaku každé 2 hodiny mimo noční spánek celkem 5 dní a epitelizancia (Oftagel, Santen Oy, Finsko) 5x denně. Oko bylo kryto obvazem po dobu 4 dnů. Pacienta jsme poučili o pooperační bolestivosti a pooperačním dráždění. První kontrola proběhla 4. pooperační den. Po reepitelizaci rohovky, nejčastěji 5. pooperační den, jsme vysadili lokální antibiotickou terapii a nasadili lokálně kortikoidy (Flucon gtt, Alcon, Novartis, Švýcarsko) s četností aplikace 4 x denně po dobu 3 týdnů. Další kontrolu jsme provedli za 1 měsíc po operaci. V případě uspokojivého hojení, bez známek vzniku jizvení, jsme pacienta poučili o dalším postupu léčby, která spočívala v aplikaci kortikoidů (Flucon gtt, Alcon, Novartis, Švýcarsko) 3 x denně 2 týdny, dále 2 x denně 2 týdny a 1 x denně 2 týdny do spojivkového vaku. Další kontrola byla stanovena za 3 měsíce, 6 měsíců, 1 rok a každý následující rok od operace. Sledované parametry byly vyhodnoceny za 6, 12 a 24 měsíců po operačním zákroku.

### **3.4. Statistické zpracování**

Ke statistickému zpracování jsme použili neparametrický Wilcoxonův test, neboť analyzované veličiny (zraková ostrost, keratometrické hodnoty, rohovkový astigmatismus a pachymetrie) se neřídí normálním rozdělením. Hodnocení statistické významnosti bylo hodnoceno na hladině významnosti 0,05.

## **4. Výsledky**

### **4.1. Zraková ostrost**

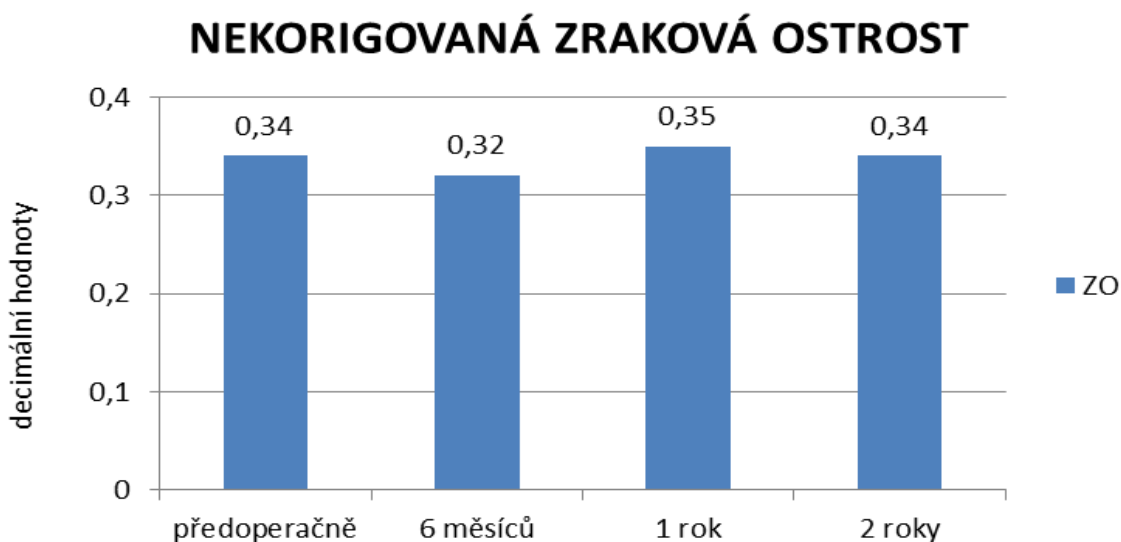
Průměrná ZO byla před operací  $0,34 \pm 0,29$  (decimální hodnoty), 6 měsíců po operaci došlo k nesignifikantnímu zhoršení na hodnotu  $0,32 \pm 0,27$  ( $p = 0,520$ ).

Na konci sledovacího období odpovídala nekorigovaná zraková ostrost předoperačním hodnotám.

Průměrná NZO (brýlová korekce) byla předoperačně  $0,53 \pm 0,26$ ; 2 roky po operaci se průměrná hodnota zlepšila na  $0,57 \pm 0,26$ . Tato změna však nebyla statisticky významná ( $p = 0,259$ ). V průběhu sledování tedy nedošlo ke statisticky významné změně hodnot nekorigované ani nejlépe korigované zrakové ostrosti ve srovnání s předoperační hodnotou. Vývoj průměrné nekorigované a nejlépe korigované zrakové ostrosti ukazuje graf 3 a graf 4.

Ke zlepšení nebo stabilizaci NZO došlo po dvou letech sledování u 66 % očí. U 12 očí (34 %) došlo ke zhoršení NZO (graf 5). Změnu hodnot nejlépe korigované zrakové ostrosti na konci sledovacího období v porovnání s předoperační hodnotou pro jednotlivé případy vyjadřuje graf 6. V 7 případech doprovázelo zhoršení NZO mírné jizvení rohovky a u 5 očí z této skupiny jsme zaznamenali progresi v hodnotě  $K_{max}$ . Ve třech případech byl vzhledem k předoperačním hodnotám tloušťky rohovky méně než 450  $\mu m$  použit během zákroku hypotonický roztok riboflavinu. Přehled očí s poklesem nejlépe korigované zrakové ostrosti na konci sledovacího období a přidružené hodnoty maximálního zakřivení rohovky, tloušťky rohovky a hodnoty rohovkového astigmatismu jsou podrobně uvedeny v tab. 2.

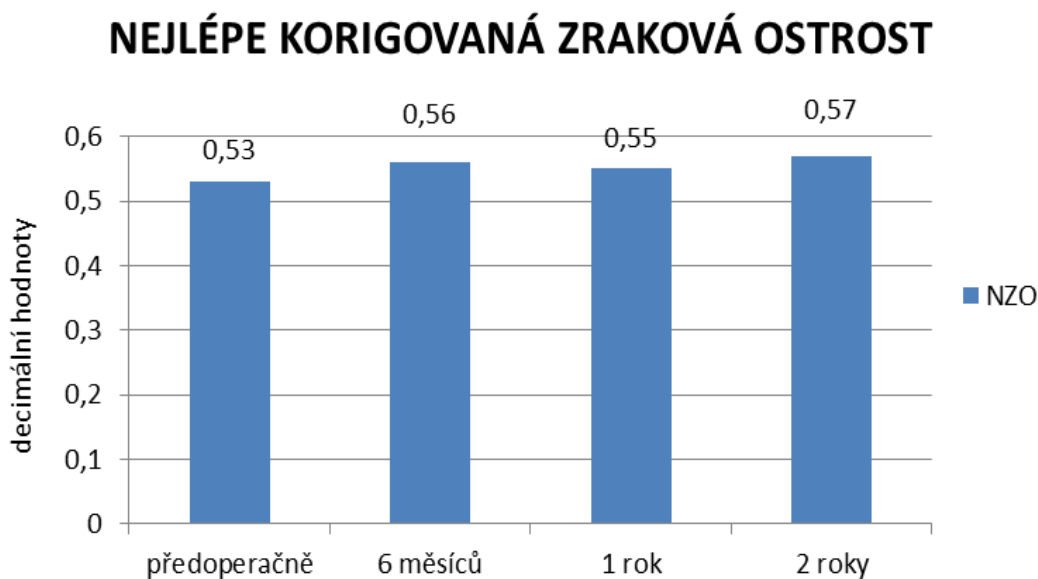
Graf 3: Vývoj nekorigované zrakové ostrosti v průběhu sledování.



legenda:

ZO: nekorigovaná zraková ostrost

Graf 4: Vývoj průměrné nejlépe korigované zrakové ostrosti v průběhu sledování

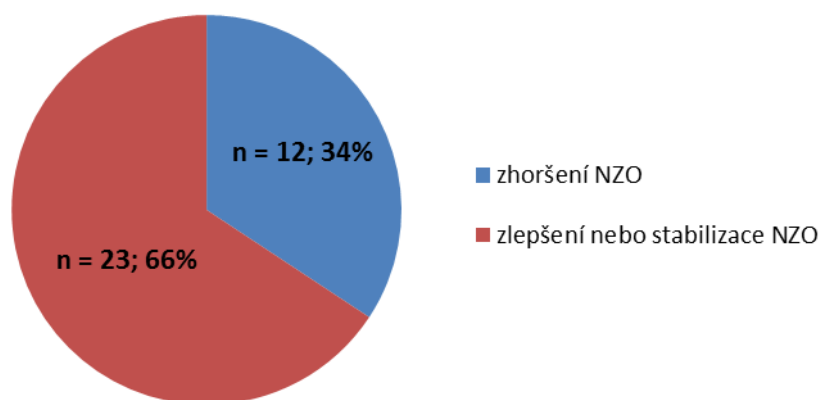


legenda:

NZO: nejlépe korigovaná zraková ostrost

Graf 5: Změna hodnot nejlépe korigované zrakové ostrosti – porovnání předoperační hodnoty a hodnoty na konci sledovacího období

### ZMĚNA HODNOT NEJLÉPE KORIGOVANÉ ZRAKOVÉ OSTROSTI VE DVOULETÉM SLEDOVÁNÍ I.



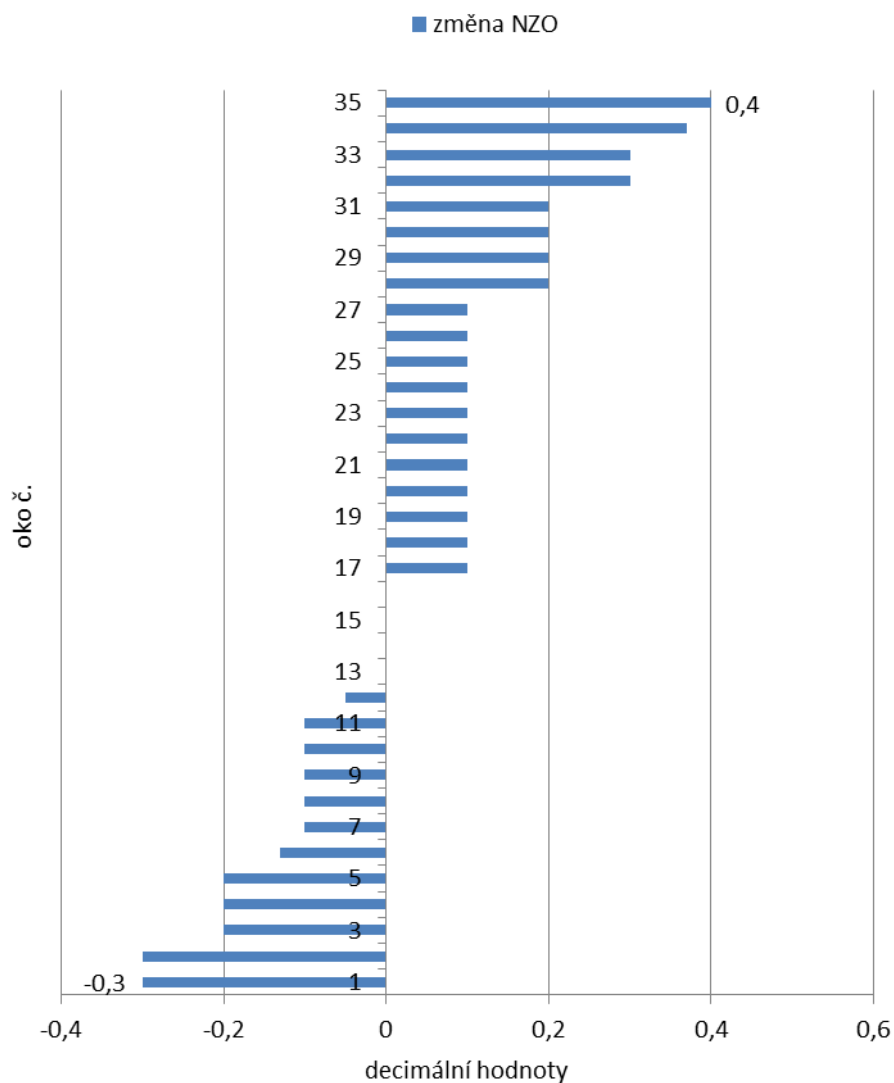
legenda:

NZO: nejlépe korigovaná zraková ostrost

n: počet očí

Graf 6: Změna hodnot nejlépe korigované zrakové ostrosti na konci sledovacího období v porovnání s předoperační hodnotou, grafické vyjádření jednotlivých případů

### ZMĚNA HODNOT NEJLÉPE KORIGOVANÉ ZRAKOVÉ OSTROSTI VE DVOULETÉM SLEDOVÁNÍ II.



legenda:

NZO: nejlépe korigovaná zraková ostrost

Tab 2: Přehled očí s poklesem nejlépe korigované zrakové ostrosti na konci sledovacího období v porovnání s předoperačními hodnotami

Pacient č.	předoperační hodnoty				2 roky po operaci				přítomnost haze	progrese Kmax (D)	hypotonický roztok
	NZO	Kmax	AST	TL	NZO	Kmax	AST	TL			
1	0,2	52	8,3	494	0,15	56,2	6,3	471	+	+	
2	0,5	61,10	2,5	413	0,4	60,00	2,3	410			+
3	0,6	55	7,2	469	0,5	53,4	6,3	475	+		
4	0,6	48,2	2,5	491	0,4	49,3	2	465		+	
5	0,4	54,5	1,2	469	0,3	58,2	3,5	455		+	
6	1	53,9	1,2	460	0,7	53,7	0,6	459	+		
7	1	50,2	3,2	543	0,9	49,4	3,2	545	+		
8	0,4	55,5	2,5	400	0,2	54,5	1,3	423	+		+
9	0,3	55,9	5,3	466	0,2	57,4	5	458		+	
10	0,6	53,1	3,2	527	0,5	52,4	3,1	523	+		
11	1	48,8	0,2	442	0,8	47,9	2,1	444			+
12	0,9	53,5	4,9	477	0,6	54,7	4,9	486	+	+	

legenda:

NZO: nejlépe korigovaná zraková ostrost

Kmax: průměrná hodnota maximálního zakřivení přední plochy rohovky

AST: hodnota rohovkového astigmatismu

TL: tloušťka rohovky v nejtenčím místě

## 4.2. Keratometrické hodnoty

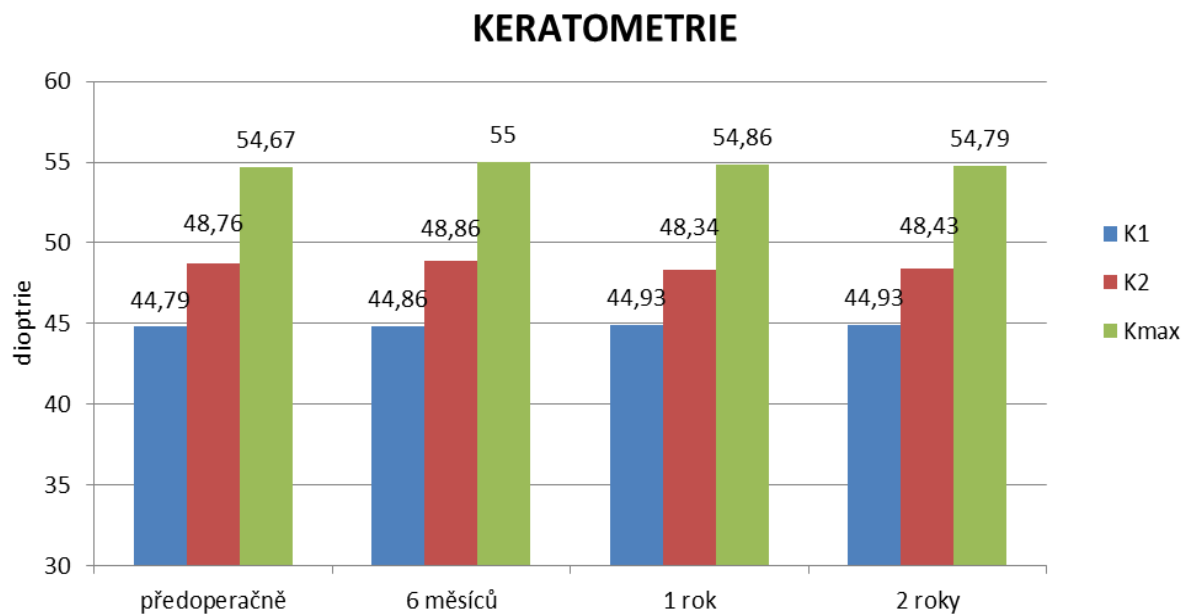
Průměrné hodnoty zakřivení přední plochy rohovky v místě nejploššího a nejstrmějšího meridiánu byly před operací: K1:  $44,79 \pm 3,46$  D; K2:  $48,76 \pm 3,8$  D. Wilcoxonův test prokázal statisticky významné změny v hodnotách K2 mezi předoperačními hodnotami a hodnotami po jednom roce (K2:  $48,34 \pm 3,9$  D;  $p = 0,008$ ) a na konci sledovacího období (K2:  $48,43 \pm 3,65$  D;  $p = 0,011$ ). V hodnotách K1 nedošlo ke statisticky významným změnám v porovnání předoperačních hodnot a hodnot na konci sledovacího období ( $p = 0,822$ ).

Průměrná předoperační hodnota maximálního zakřivení přední plochy rohovky byla  $K_{max} = 54,67 \pm 4,96$  D; na konci sledovacího období byla zjištěna hodnota  $54,79 \pm 5,18$  D. V hodnotách  $K_{max}$  rovněž nedošlo ke statisticky významným změnám v porovnání předoperačních hodnot a hodnot na konci sledovacího období ( $p = 0,844$ ). Průměrné keratometrické hodnoty zachycuje graf 7.

K progresi v hodnotě  $K_{max}$  ve dvouletém sledování došlo v 17 případech (49 %) v průměru o 1,46 D. Změnu hodnoty maximálního zakřivení rohovky dva roky po provedení zákroku ukazuje graf 8.

K zákroku CXL jsme indikovali pacienty, kteří splňovali indikační kritérium progresu keratokonu: zvýšení hodnoty maximální keratometrie v apexu keratokonu ( $K_{max}$ ) o 1 D a více za rok. K progresi hodnoty  $K_{max}$  o více než 2 D za 2 roky po operaci došlo u 5 očí 5 pacientů (14,3 %). Vstupní a výstupní parametry těchto pacientů zachycuje tab. 3.

Graf 7: Vývoj průměrných keratometrických hodnot zakřivení přední plochy rohovky



*legenda:*

*K1: průměrná hodnota zakřivení přední plochy rohovky v místě nejploššího meridiánu*

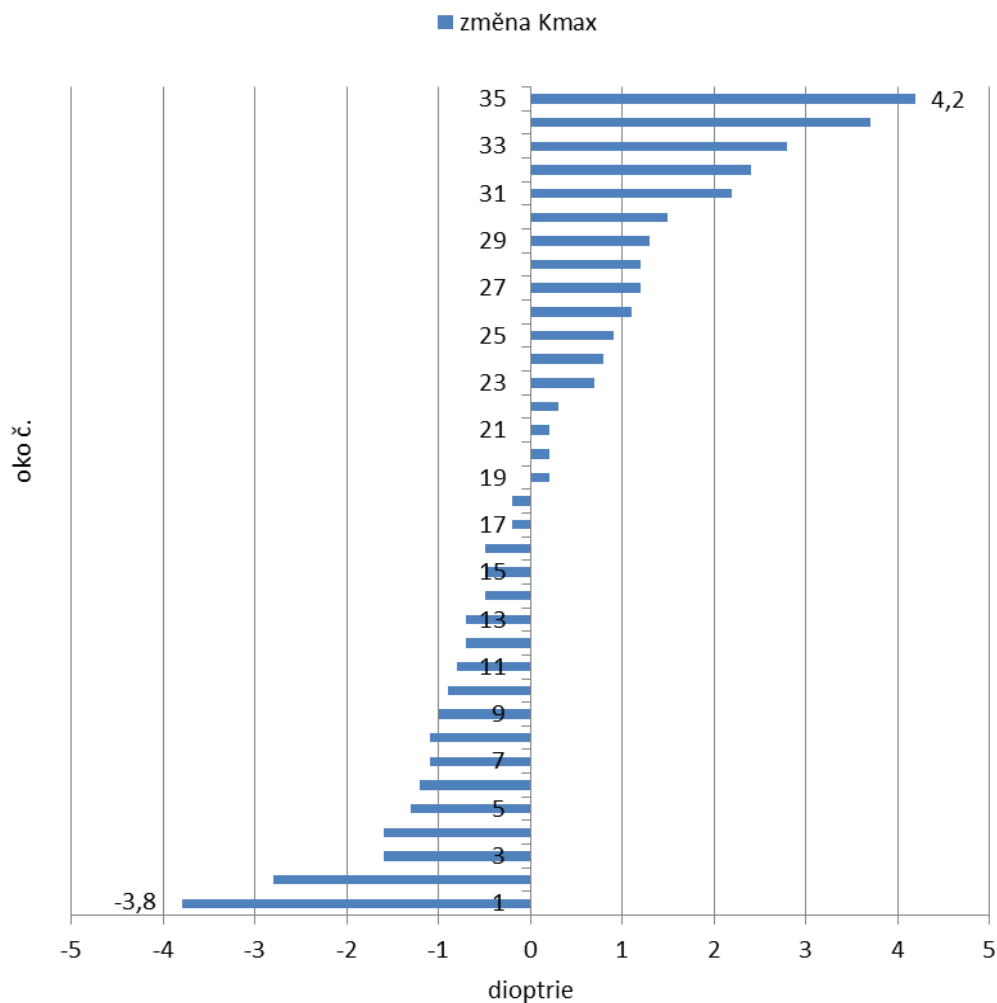
*K2: průměrná hodnota zakřivení přední plochy rohovky v místě nejstrmějšího meridiánu*

*Kmax: průměrná hodnota maximálního zakřivení přední plochy rohovky*



Graf 8: Změna hodnot maximálního zakřivení rohovky ( $K_{max}$ ) na konci sledovacího období v porovnání s předoperační hodnotou, grafické vyjádření jednotlivých případů

### ZMĚNA HODNOTY MAXIMÁLNÍHO ZAKŘIVENÍ ROHOVKY VE DVOULETÉM SLEDOVÁNÍ



legenda:

$K_{max}$ : průměrná hodnota maximálního zakřivení přední plochy rohovky

Tab. 3: Skupina očí vykazujících progresi hodnoty maximálního zakřivení přední plochy rohovky na konci sledovacího období o více než 2 D v porovnání s předoperační hodnotou

Pacient č.	předoperačně						2 roky po operaci					
	Kmax	K1	K2	NZO	AST	TL	Kmax	K1	K2	NZO	AST	TL
1	56,8	39,4	46,5	0,3	7,1	452	59,6	41,2	46,5	0,5	5,3	441
2	52	39,6	47,9	0,2	8,3	494	56,2	44,1	50,4	0,15	6,3	471
3	55,6	45,3	49,8	0,4	4,6	478	57,8	46,5	48,8	0,5	2,3	472
4	54,5	48,8	49,9	0,4	1,2	469	58,2	47,4	50,9	0,3	3,5	455
5	60,8	47,9	55,6	0,4	7,8	499	63,2	50,4	54,8	0,5	4,5	462

legenda:

NZO: nejlépe korigovaná zraková ostrost

Kmax: průměrná hodnota maximálního zakřivení přední plochy rohovky

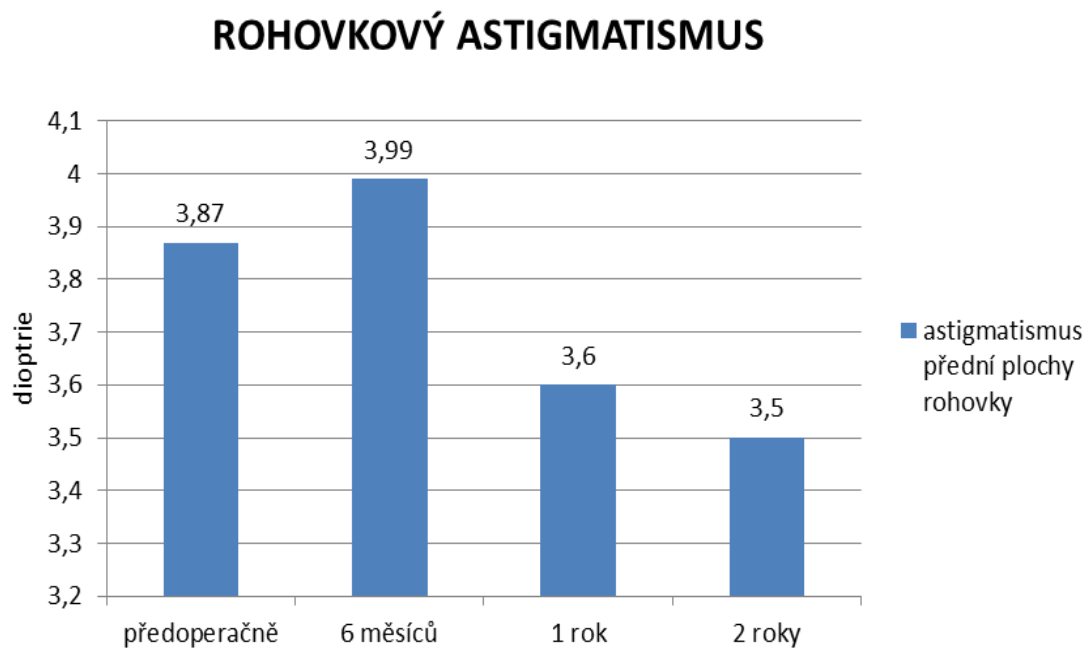
AST: hodnota rohovkového astigmatismu

TL: tloušťka rohovky v nejtenčím místě

### 4.3. Astigmatismus rohovky

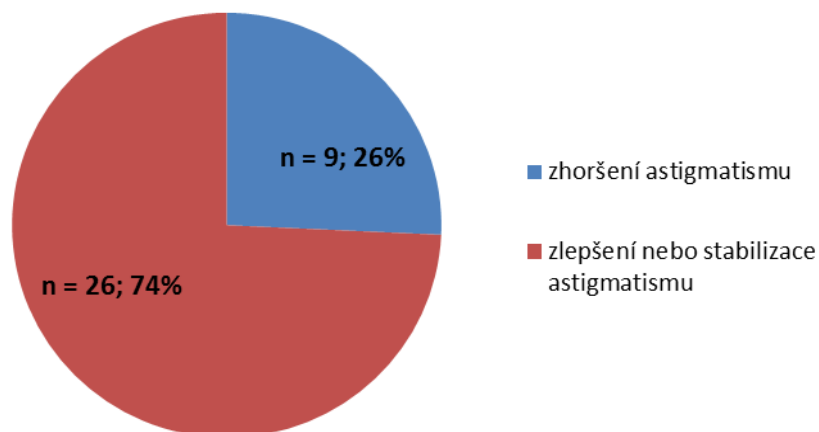
Astigmatismus přední plochy rohovky statisticky významně klesl z průměrné předoperační hodnoty  $3,87 \pm 2,15$  D na hodnotu  $3,5 \pm 1,6$  D na konci sledovacího období ( $p = 0,047$ ). Výsledek odráží změny v keratometrických hodnotách. Vývoj průměrných hodnot astigmatismu v průběhu sledovacího období je znázorněn v grafu 9. Ke zlepšení hodnot došlo na konci sledovacího období v porovnání s předoperační hodnotou u 26 očí (74 %), v 9 případech (26 %) jsme zaznamenali zhoršení hodnot astigmatismu. Rozložení změn v souboru znázorňuje graf 10. Graf 11 ukazuje změnu hodnot astigmatismu přední plochy rohovky na konci sledovacího období v porovnání s předoperační hodnotou u jednotlivých případů.

Graf 9: Vývoj průměrných hodnot rohovkového astigmatismu v průběhu sledování



Graf 10: Změna hodnot rohovkového astigmatismu - porovnání předoperační hodnoty a hodnoty na konci sledovacího období

### ZMĚNA HODNOTY ROHOVKOVÉHO ASTIGMATISMU VE DVOULETÉM SLEDOVÁNÍ I.

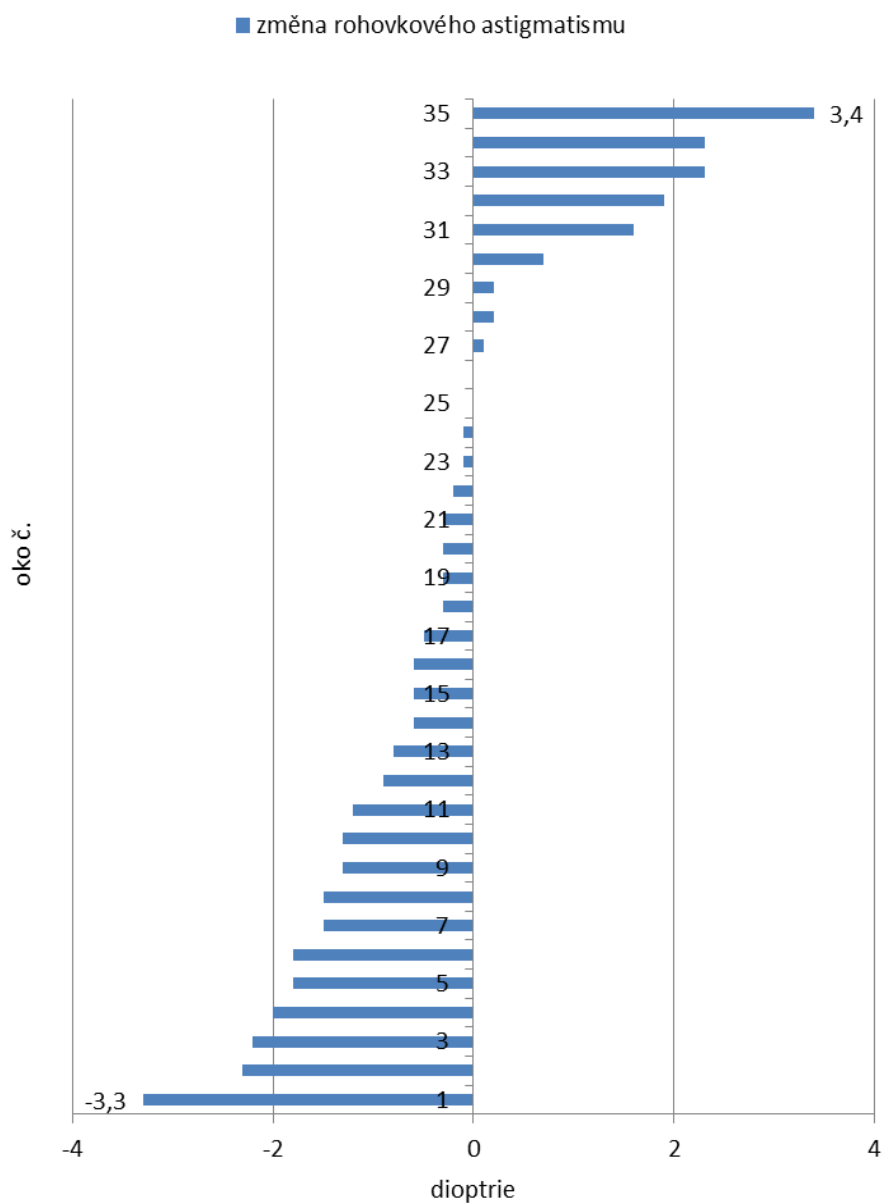


legenda:

n: počet očí

Graf 11: Změna hodnot astigmatismu přední plochy rohovky na konci sledovacího období v porovnání s předoperační hodnotou, grafické vyjádření jednotlivých případů

## ZMĚNA HODNOTY ROHOVKOVÉHO ASTIGMATISMU VE DVOULETÉM SLEDOVÁNÍ II.

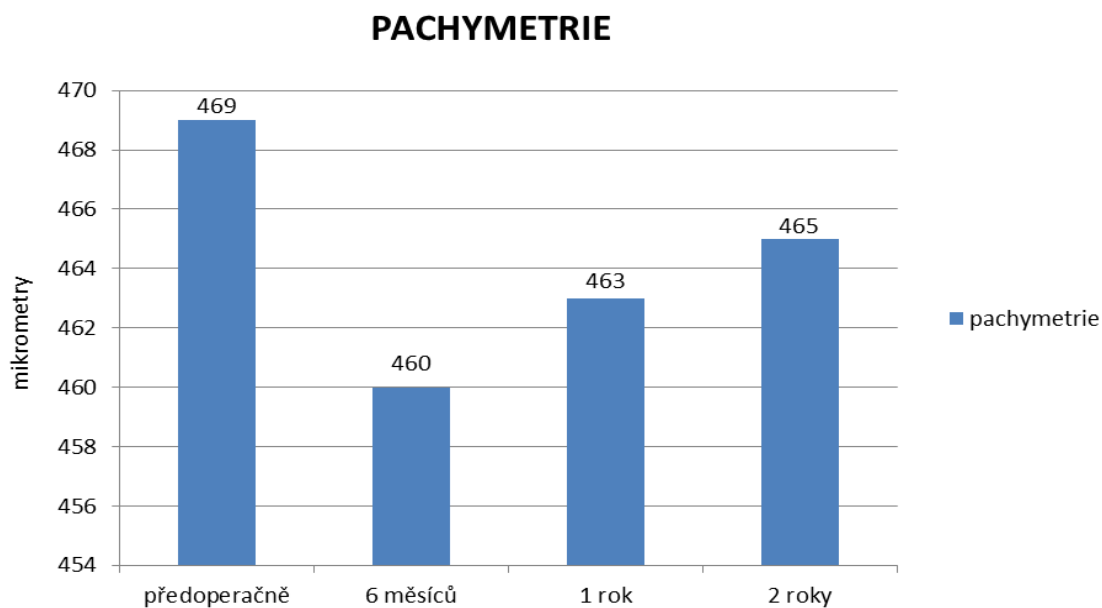


#### 4.4. Pachymetrie

Průměrná hodnota pachymetrie v nejtenčím místě rohovky byla předoperačně  $469 \pm 33 \mu\text{m}$ . Za 6 měsíců po operaci se hodnota statisticky významně snížila na průměrnou hodnotu  $460 \pm 31 \mu\text{m}$  ( $p = 0,002$ ), 1 rok po operaci byla průměrná hodnota pachymetrie  $463 \pm 30 \mu\text{m}$  a na konci sledovacího období jsme již nezaznamenali statisticky významný rozdíl naměřené hodnoty ve srovnání s předoperačním nálezem. Vývoj průměrných hodnot tloušťky rohovky v nejtenčím místě ukazuje graf 12. K poklesu hodnoty pachymetrie došlo ve 21 případech (60%), k nárůstu hodnoty došlo u 14 očí (40 %) (graf 13). Ve skupině očí, u kterých jsme zaznamenali nárůst hodnoty pachymetrie v průběhu dvouletého sledování jsme v 6 případech použili peroperačně hypotonický roztok riboflavinu, neboť předoperační hodnota pachymetrie včetně epitelu byla nižší nebo rovna  $450 \mu\text{m}$ . Ve 12 případech (86 %) v této podskupině dosahovala předoperační hodnota pachymetrie méně než  $500 \mu\text{m}$  (graf 14). Graf 15 zaznamenává změnu hodnot pachymetrie v nejtenčím místě rohovky na konci sledovacího období v porovnání s předoperační hodnotou v jednotlivých případech.

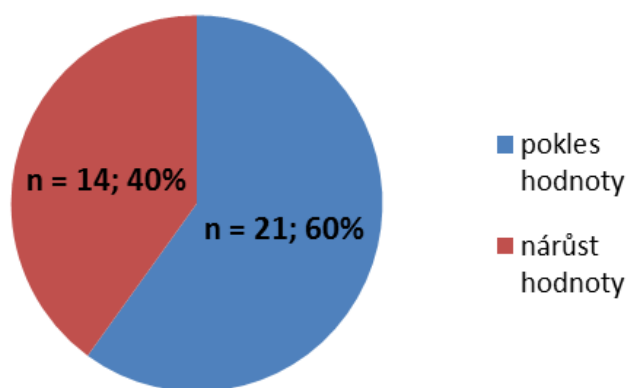
Hypotonický roztok riboflavinu jsme v našem souboru použili celkem v 9 případech. Vývoj jednotlivých sledovaných parametrů v této skupině očí je shrnut v tab. 4. Závěrečný souhrnný přehled průměrných hodnot všech sledovaných parametrů ve dvouletém hodnocení zobrazuje tab. 5.

Graf 12: Vývoj průměrných hodnot tloušťky rohovky v nejtenčím místě



Graf 13: Změna hodnot pachymetrie v nejtenčím místě rohovky - porovnání předoperační hodnoty a hodnoty na konci sledovacího období

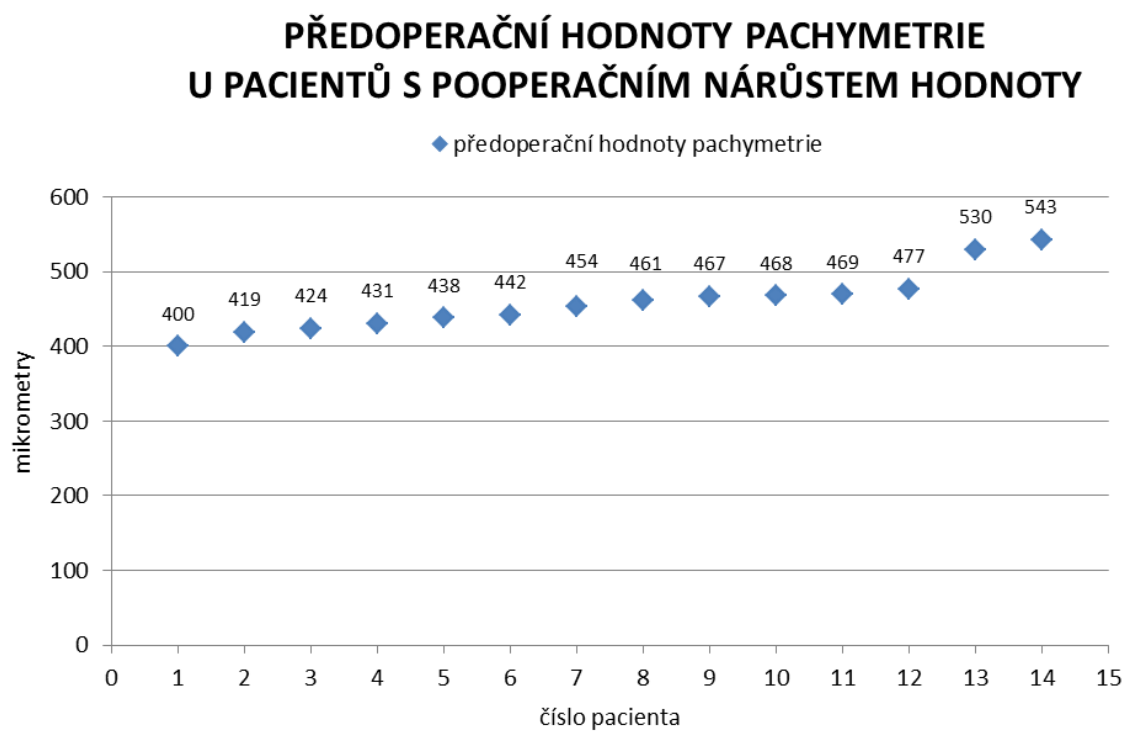
### ZMĚNA HODNOTY PACHYMETRIE VE DVOULETÉM SLEDOVÁNÍ I.



legenda:

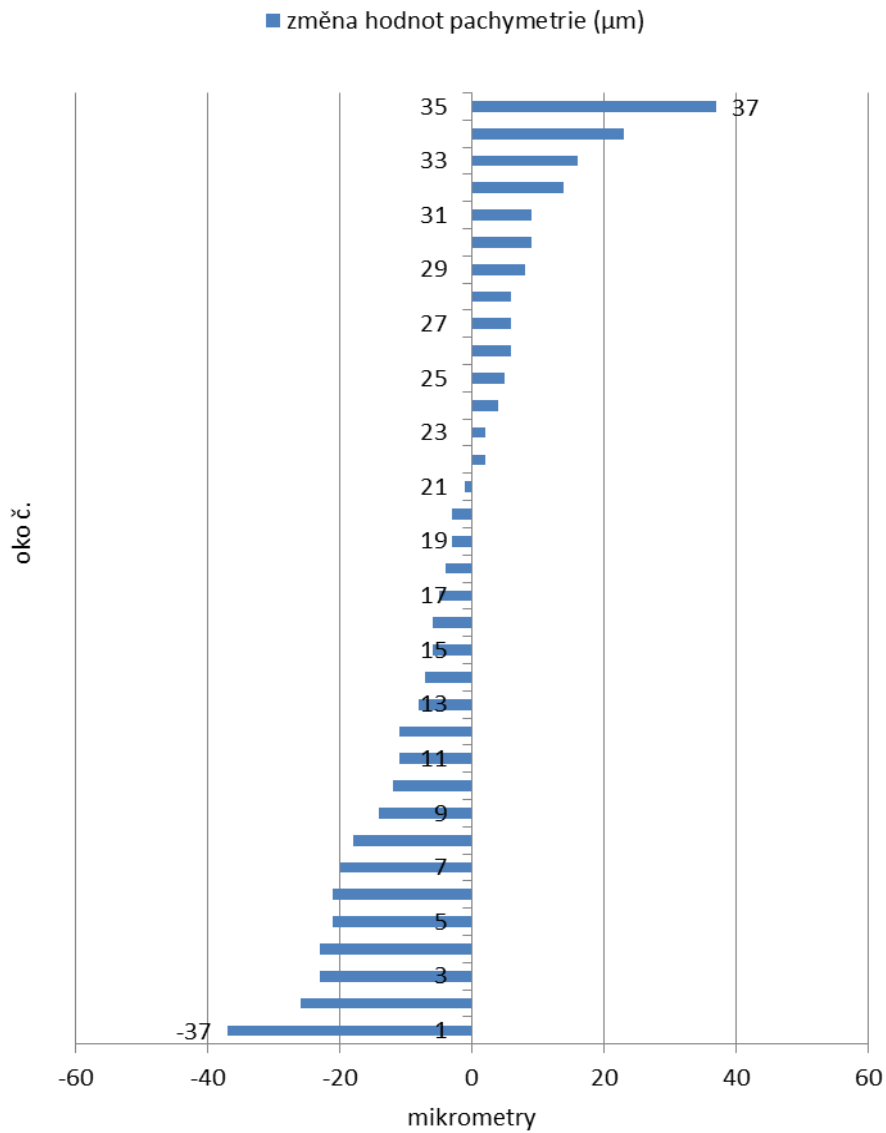
n: počet očí

Graf 14: Změna hodnot pachymetrie v nejtenčím místě rohovky v průběhu sledování



Graf 15: Změna hodnot pachymetrie v nejtenčím místě rohovky na konci sledovacího období v porovnání s předoperační hodnotou, grafické vyjádření jednotlivých případů

## ZMĚNA HODNOTY PACHYMETRIE VE DVOULETÉM SLEDOVÁNÍ II.





Tab. 4: Vývoj hodnot sledovaných parametrů ve skupině očí léčených metodou ACXL s použitím hypotonického roztoku riboflavinu

Pacient č.	předoperačně				2 roky po operaci			
	TL	NZO	Kmax	AST	TL	NZO	Kmax	AST
1	446	0,4	48,6	3,2	435	0,8	48,8	2,6
2	413	0,5	61,10	2,5	410	0,4	60,00	2,3
3	400	0,4	55,5	2,5	423	0,2	54,5	1,3
4	431	0,05	71,4	5	437	0,15	72,3	4,2
5	440	0,9	49,1	2	437	1	49,3	1,9
6	438	0,5	58,6	2,8	475	0,5	57,3	6,2
7	424	0,4	61,1	3,9	430	0,6	59,5	2,4
8	419	0,5	50,7	3,7	423	0,7	49,6	3,1
9	442	1	48,8	0,2	444	0,8	47,9	2,1

legenda:

TL: tloušťka rohovky v nejtenčím místě

NZO: nejlépe korigovaná zraková ostrost

K<sub>max</sub>: průměrná hodnota maximálního zakřivení přední plochy rohovky

AST: hodnota rohovkového astigmatismu

Tab. 5: Souhrnný přehled průměrných hodnot všech sledovaných parametrů ve dvouletém hodnocení – porovnání hodnot předoperačně s hodnotami získanými 6 měsíců, 1rok a 2 roky po operaci

parametr	předoperačně	6 měsíců	1 rok	2 roky
ZO (decimální hodnoty)	0,34	0,32	0,35	0,34
NZO (decimální hodnoty)	0,53	0,56	0,55	0,57
K1 (D)	44,79	44,86	44,93	44,93
K2 (D)	48,76	48,86	48,34* ( <i>p</i> = 0,008)	48,43* ( <i>p</i> = 0,011)
Kmax (D)	54,67	55,00	54,86	54,79
rohovkový astigmatismus (D)	3,87	3,99	3,60	3,50* ( <i>p</i> = 0,047)
pachymetrie (μm)	469	460* ( <i>p</i> = 0,002)	463* ( <i>p</i> = 0,013)	465

legenda:

ZO: nekorigovaná zraková ostrost

NZO: nejlépe korigovaná zraková ostrost (brýlová korekce)

K1: průměrná keratometrie přední plochy rohovky v nejplošším meridiánu

K2: průměrná keratometrie přední plochy rohovky v nejstrmějším meridiánu

Kmax: maximální hodnota zakřivení přední plochy rohovky v apexu keratokonu

\*: statisticky významná změna hodnoty

*p*: hladina významnosti

## 5. Diskuse

V průběhu sledování nedošlo v našem souboru ke statisticky významné změně nekorigované ani nejlépe korigované zrakové ostrosti ve srovnání s průměrnou předoperační hodnotou.

Statisticky signifikantní změny hodnot zrakové ostrosti (ZO, NZO) 1 rok po provedení akcelerovaného CXL neprokazuje ani studie Sadoughiho a kol., která porovnávala konvenční metodu CXL (3 mW/cm<sup>2</sup>, doba záření 30 minut) s akcelerovaným CXL (9 mW/cm<sup>2</sup>, doba záření 10 minut) (165).

Elbaz a kol. sledovali 16 očí 14 pacientů, kteří podstoupili akcelerovaný CXL (9 mW/cm<sup>2</sup>, doba záření 10 minut) rok po operaci. Na konci sledovacího období prokázali mírné zlepšení nekorigované zrakové ostrosti, nejlépe korigovaná zraková ostrost a keratometrické hodnoty byly stabilní (44).

Kanellopoulos zjistil odlišný výsledek, a to signifikantní zlepšení zrakové ostrosti ve čtyřletém sledování. Zaznamenal zlepšení ZO, NZO a astigmatismu. Hodnota K<sub>max</sub> poklesla ze 49,5 D na 46,1 D. Autor aplikoval akcelerovaný CXL (7 mW/cm<sup>2</sup>, doba záření 15 minut) s využitím odstranění epitelu excimerovým laserem technikou PTK (fototerapeutická keratektomie) (94). Dosažení výborného efektu léčby lze vysvětlit na základě současného odstranění Bowmannovy membrány během deepitelizace rohovky a tedy výskyt polymerizační reakce i v hlubších vrstvách sromatu.

S ohledem na změny hodnot zrakové ostrosti po provedení CXL je nutno zmínit základní skutečnost, že CXL je obecně metoda, jejímž primárním cílem je zabránění progresu keratokonu, nikoli snížení refrakce oka. V případě plánované změny refrakce u oka postiženého keratokonem existuje několik způsobů jak kombinovat techniku CXL s různými metodami korekce dioptrické vady, jak již bylo zmíněno v obecné části práce.

CXL je metodou léčby progredujícího keratokonu. Výsledky studií naznačují, že dochází nejen k dlouhodobé stabilizaci keratektázie, ale zároveň ke zlepšení keratometrických parametrů. Nejrozsáhlejší publikovanou sérií na toto téma zahrnuje práce autorů Raiskup a kol. Tato retrospektivní studie sledovala 241 očí u 130 pacientů s diagnózou keratokonu po dobu až 6 let po provedení standardního CXL.

Práce potvrdila statisticky významné zlepšení maximální hodnoty zakřivení rohovky  $K_{max}$ , astigmatismu a nejlépe korigované zrakové ostrosti (153).

Vyhodnocení keratometrických hodnot v našem souboru prokázalo stabilizaci keratokonu následně po provedení akcelerovaného CXL ve dvouletém sledování. V hodnotách zakřivení rohovky v nejstrmějším meridiánu ( $K_2$ ) bylo navíc zaznamenáno statisticky významné zlepšení dva roky po operaci ve srovnání s předoperační hodnotou. Největší pokles hodnoty maximálního zakřivení rohovky v apexu keratokonu ( $K_{max}$ ) jsme zaznamenali u 35leté pacientky s keratokonem 2 - 3 stupně. Hodnota  $K_{max}$  poklesla o 3,8 D z předoperační hodnoty 61,7 D na hodnotu 57,9 D na konci sledovacího období. U této pacientky došlo rovněž ke snížení hodnoty rohovkového astigmatismu za stejné období z hodnoty 5,0 D na hodnotu 3,2 D. Nekorigovaná zraková ostrost se zlepšila z 0,2 na 0,5 (decimálních hodnot). Zde se jedná o zajímavé zjištění, neboť literatura uvádí vyšší četnost progresse keratokonu po provedení standardního CXL v případě hodnoty  $K_{max}$  větší než 58 D (206). Použití akcelerovaného CXL u výše uvedené pacientky s předoperační hodnotou  $K_{max} = 61,7$  D vedlo nejen ke stabilizaci onemocnění, ale rovněž k postupnému zlepšení keratometrických hodnot a hodnot nejlépe korigované zrakové ostrosti. Podobné výsledky přináší studie autorů Chan a kol. Jejich práce prokázala signifikantně větší oploštění rohovky po zákroku ACXL u pokročilého keratokonu než u mírného a středního stadia tohoto onemocnění (82).

Rovněž další studie potvrzují stabilizační efekt ACXL (34). Skupina japonských autorů Tomita a kol. porovnávali efekt léčby progresivního keratokonu metodou akcelerovaný CXL (30 mW/cm<sup>2</sup>, doba záření 3 minuty) se standardní CXL (3 mW/cm<sup>2</sup>, doba záření 30 minut). Pooperační změny zrakové ostrosti, keratometrie a morfologické změny v rohovce byly srovnatelné. Autoři dále nezaznamenali signifikantní rozdíl v biomechanických vlastnostech rohovky v obou skupinách (202).

Srovnatelný stabilizační efekt standardního (3 mW/cm<sup>2</sup>, doba záření 30 minut) a akcelerovaného (18 mW/cm<sup>2</sup>, doba záření 5 minut) CXL zjistil ve své studii rovněž Hashemi a kol. Současně však prokázal větší oploštění rohovky při využití standardního CXL oproti akcelerovanému CXL (69).

Další průkaz srovnatelného stabilizačního efektu akcelerovaného a standardního CXL v krátkodobém sledování přinesla větší srovnávací studie autorů Hashemian a kol., která porovnávala změny morfologických parametrů a zrakové ostrosti obou metod. Zajímavým zjištěním bylo signifikantní snížení denzity

keratocytů předního stromatu rohovky a subbasálního nervového plexu v obou skupinách jeden měsíc po operaci. V průběhu sledování autoři prokázali významně vyšší snížení těchto parametrů ve skupině standardního CXL. Na konci sledovacího období již ale nebyl signifikantní rozdíl v těchto parametrech v obou skupinách (70).

Zajímavé výsledky z tohoto pohledu přinesla srovnávací studie autorů Ng a kol., kteří prokázali statisticky významné zlepšení hodnot  $K_{max}$ ,  $K_{mean}$  (průměrná hodnota zakřivení přední plochy rohovky) a NZO ve skupině léčené metodou akcelerovaného CXL (9 mW/cm<sup>2</sup>, doba trvání ozáření 10 minut) i standardní metodou (3 mW/cm<sup>2</sup>, doba záření 30 minut). Demarkační linie byla však umístěna hlouběji u očí po provedení CXL standardní technikou. Hloubka demarkační linie navíc významně korelovala se změnou v hodnotě  $K_{mean}$ . Pacienti, kteří podstoupili konvenční CXL, tedy vykazovali větší oploštění rohovky. Byla rovněž nalezena signifikantní korelace mezi  $K_{mean}$  a hloubkou demarkační linie. Korelaci mezi  $K_{max}$  a hloubkou demarkační linie autoři neprokázali. Hlubší demarkační linie znamená více nových kovalentních vazeb ve větší hloubce rohovky a tedy i její větší oploštění (135).

Rovněž Kymionis a kol. porovnávali hloubku demarkační linie ve skupině standardního CXL a akcelerovaného CXL (9 mW/cm<sup>2</sup>, doba záření 10 minut) jeden měsíc po operaci pomocí předněsegmentového AS-OCT. Demarkační linie byla signifikantně níže po standardním CXL ve srovnání s akcelerovaným CXL (113).

Cílem léčby keratokonu metodou CXL je stabilizace ektázie. K zákroku CXL jsme v našem souboru indikovali pacienty, kteří splňovali indikační kritérium progresu keratokonu: zvýšení hodnoty maximální keratometrie v apexu keratokonu ( $K_{max}$ ) o 1 D a více za rok. K progresi v hodnotě  $K_{max}$  došlo ve dvouletém sledování v 17 případech (49%) v průměru o 1,46 D (graf 8). K progresi hodnoty  $K_{max}$  o více než 2 D za 2 roky po operaci došlo u 5 očí 5 pacientů (14%). Přestože u těchto uvedených pacientů došlo k dané progresi v hodnotách  $K_{max}$ , rohovkový astigmatismus vykázal ve 4 případech pokles hodnot. U všech pěti pacientů rovněž došlo ke snížení hodnoty tloušťky rohovky v průměru o 18  $\mu$ m. Tuto skutečnost lze vysvětlit na základě remodelace rohovky po zákroku, kdy dochází ke změnám v zakřivení rohovky – změnám hodnot  $K_1$  a  $K_2$ , které určují následně hodnotu rohovkového astigmatismu přední plochy rohovky. Změna hodnot těchto parametrů

po zákroku následně vedla ke snížení hodnoty rohovkového astigmatismu i přes zvýšení hodnot  $K_{max}$ .

Nejvyšší hodnotu progresu parametru  $K_{max}$  na konci sledovacího období jsme zjistili u 24letého muže s předoperační hodnotou rohovkového astigmatismu 8,3 D, hodnotou  $K_{max} = 52,0$  D a tloušťkou rohovky 494  $\mu\text{m}$ . Keratokonus vykazoval hodnoty pokročilého stadia (klasifikace dle Pentacamu stupně 3 – 4). Zajímavé byly nízké předoperační hodnoty keratometrie v nejplošším a nejstrmějším meridiánu ( $K1 = 39,6$  D;  $K2 = 47,9$  D). Po operaci došlo k výrazné změně zakřivení rohovky:  $K1 = 44,1$  D;  $K2 = 50,4$  D, progresi  $K_{max}$  na hodnotu 56,4 D a snížení tloušťky rohovky o 23  $\mu\text{m}$  na 471  $\mu\text{m}$ . Pacient subjektivně tuto změnu nevnímal, přestože došlo k mírnému snížení nejlépe korigované zrakové ostrosti z hodnoty 0,2 na hodnotu 0,15 (decimálních hodnot). Stav lze vysvětlit na základě skutečnosti, že apex keratokonu nebyl lokalizován v ose vidění a tedy změna zakřivení v tomto místě neměla významný vliv na změnu pooperační zrakové ostrosti. V případě tohoto pacienta jsme pooperačně zaznamenali zpomalení reepitelizace následně po zákroku trvajícím 7 dní, doprovázené následně vznikem jemného jizvení v paracentrální části rohovky.

Dnes již známým zjištěním je změna tloušťky rohovky během léčby CXL a v následujícím období po provedení zákroku, která se potvrdila i v našem souboru. Průměrná hodnota pachymetrie byla předoperačně  $468,6 \pm 32,66$   $\mu\text{m}$ . Za 6 měsíců po operaci se statisticky významně snížila tloušťka rohovky na průměrnou hodnotu  $460,43 \pm 31,12$   $\mu\text{m}$  ( $p=0,002$ ), 1 rok po operaci byla průměrná hodnota pachymetrie  $463,2 \pm 30,38$   $\mu\text{m}$ , rovněž statisticky významně nižší ve srovnání s předoperační hodnotou ( $p=0,013$ ). Na konci sledovacího období jsme však již nezaznamenali statisticky významný rozdíl hodnoty ve srovnání s předoperačním nálezem ( $p = 0,05$ ). Obdobné výsledky potvrzuje i odborná literatura v rámci hodnocení standardního (62) i akcelerovaného CXL (210). Hodnoty pachymetrie jsou odrazem změn ve stromatu rohovky na úrovni extracelulární i buněčné. Ztenčení rohovky po zákroku je doprovázeno excesivní apoptózou keratocytů stromatu rohovky až do hloubky 350  $\mu\text{m}$  (192). Buněčná smrt keratocytů je nejvýraznější v předním stromatu rohovky. Buňky pod touto tzv. demarkační linií nejsou zářením nijak poškozeny. Další možnou příčinou vysvětlení změn tloušťky rohovky po provedení zákroku jsou ischemie rohovky a epitelizace rohovky po zákroku (76).

Hypotonický roztok jsme v našem souboru použili celkem u 9 očí. Zajímavé bylo zjištění, že u 6 očí (67 %) byl po dvou letech zjištěn nárůst hodnoty pachymetrie ve srovnání s předoperační hodnotou. Celkově v této podskupině došlo k nárůstu průměrné hodnoty pachymetrie za dva roky po operaci o 7  $\mu\text{m}$ , doprovázené snížením průměrné hodnoty  $K_{\text{max}}$  o 0,63 D. Toto zjištění potvrzuje bezpečnost použití hypotonického roztoku ve spojení s provedením akcelerovaného CXL u tenkých rohovek.

CXL je technicky jednoduchá a relativně bezpečná procedura. Biomechanický účinek CXL je podmíněn přítomností dostatečné koncentrace riboflavinu ve stromatu rohovky, kterou docílíme abrazí epitelu rohovky před aplikací roztoku riboflavinu. Deepitelizace však může způsobit výraznou bolest a snížení zrakové ostrosti během prvních několika dnů po operaci trvajících až do kompletního obnovení epitelu rohovky. V souvislosti s odstraněním epitelu a následným použitím terapeutické kontaktní čočky byly popsány infekční komplikace bakteriální keratitidy (224), herpes viry (111) i pseudomonádová nebo akantamébová infekce rohovky. V našem souboru jsme oko kryli po operaci obvazem. Kontaktní čočku jsme neaplikovali. V našem souboru jsme nezaznamenali žádnou infekční komplikaci.

Časně po provedení CXL standardní metodou dochází k prokazatelné apoptóze keratocytů střední vrstvy stromatu, která se projevuje jako demarkační zóna a vymizení subepiteliálního nervového plexu. K jeho rehabilitaci dochází do 6 měsíců po zákroku (123).

CXL indukuje procesy hojení, které jsou pozorovatelné od období časně po operaci až do 36 měsíců po léčbě (32). Konfokální mikroskopie a biomikroskopie v časných fázích prokazuje stromální edém, apoptózu keratocytů a redukci denzity nervových vláken v přední části stromatu (subepiteliální nervový plexus) v hloubce 250 až 300  $\mu\text{m}$  (215). V průběhu 3 až 6 měsíců lze prokázat ústup edému, zvýšení denzity extracelulární matrix stromatu a postupnou repopularizaci stromatu aktivovanými keratocyty z periferie rohovky (108). K plné repopulaci a regeneraci dochází do 12 měsíců po operaci (94). Vlivem těchto procesů může být po operaci viditelná haze a demarkační linie, která postupně spontánně ustupuje do 6 měsíců (60). Do 6 měsíců po operaci dochází k snížení citlivosti rohovky, nebyl však zjištěn vliv na bazální sekreci slz a stabilitu slzného filmu (103). Po CXL

prokazatelně klesá tloušťka rohovky (61). Rok po proběhlém zákroku je nález na rohovce normalizován.

Jizvení rohovky je relativně častou komplikací (60). Nachází se v přední části stromatu, přibližně do 60% hloubky stromatu rohovky a může způsobit zhoršení zraku (157, 196).

V našem souboru jsme zaznamenali vznik haze po operaci u 9 očí. Hypotonický roztok byl použit u 3 pacientů z této skupiny. Průměrná předoperační hodnota pachymetrie rohovky byla v této skupině 468  $\mu\text{m}$  (rozmezí od 400  $\mu\text{m}$  do 543  $\mu\text{m}$ ), průměrná předoperační hodnota maximálního zakřivení rohovky byla 56,2 D (v rozmezí od 50,2 D do 71,4 D).

Vážné komplikace by nastaly při nedodržení léčebného postupu. Při použití vysoké dávky UV záření s nízkou dávkou riboflavinu hrozí edém rohovky a nevratné poškození sítnice, čočky a endotelových buněk. U pacientů ve sledovaném souboru jsme nezaznamenali žádnou vážnou pooperační komplikaci. Hlavní podíl na tom má přísné dodržení vstupních kritérií, předoperační i pooperační péče a léčebného protokolu. Stejně důležitá je i důkladná edukace pacienta.

## 6. Závěr

Výsledky práce potvrzují, že akcelerovaný CXL je léčebnou metodou, která vede k zastavení progresu keratokonu. Hodnoty nekorigované a nejlépe korigované zrakové ostrosti zůstaly stabilní po celou dobu sledování. Hodnoty astigmatismu rohovky a hodnota zakřivení v místě nejstrmějšího meridiánu (K2) na konci sledovacího období statisticky významně klesly ve srovnání s předoperační hodnotou. Hodnota maximálního zakřivení rohovky  $K_{\text{max}}$  zůstala rovněž po dobu sledování stabilní. V hodnotách tloušťky rohovky jsme zaznamenali ztenčení v průběhu 1 roku po operaci. Na konci sledovacího období jsme již neprokázali statisticky významný rozdíl této hodnoty ve srovnání s předoperačním nálezem.

Corneal cross-linking má pro svůj stabilizující efekt nezastupitelné místo v léčbě ektatických onemocnění rohovky. Vedle klinického přínosu má tato technika velmi nízký výskyt komplikací a vedlejších nežádoucích účinků a přináší vyšší časový komfort pro pacienta. CXL lze snadno provádět ambulantně, jedná se o minimálně



invazivní, nákladově efektivní léčbu. V neposlední řadě vykazuje i značné ekonomické a psychosociální výhody. Akcelerovaný corneal cross-linking přináší zvýšený komfort pro pacienta z důvodu zkrácení celkové doby procedury. V našem souboru jsme prokázali stabilizační efekt této metody v léčbě progredujícího keratokonu.

## 7. Literatura

1. Andreassen, TT., Simonsen, AH., Oxlund, H.: Biomechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res*, 1980 Oct; 31(4): 435-41.
2. Abad, JC., Rubinfeld, RS., Del Valle, M. et al.: Vertical D: a novel topographic pattern in some keratoconus suspects. *Ophthalmology*, 2007 May; 114(5): 1020-6.
3. Abu-Amero, KK., Al-Muammar, AM., Kondkar, AA.: Genetics of keratoconus: where do we stand? *J Ophthalmol*, 2014; 2014: 641-708.
4. Abu-Amero, KK., Azad, TA., Kalantan, H. et al.: "Mitochondrial sequence changes in keratoconus patients," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2014; 55(3): 1706–1710.
5. Ahn, CS., MC Mahon, T., Sugar, J.: Levels of alpha1-proteinase inhibitor and alpha 2-macroglobulin in the tear film of patients with keratoconus. *Cornea*, 1999; 18: 194-198.
6. Aktekin, M., Sargon, MF., Çakar, P.: "Ultrastructure of the cornea epithelium in keratoconus," *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, 1998;75(1):45-53.
7. Alió, JL., Shabayek, MH.: Corneal higher order aberrations: a method to grade keratoconus. *J Refract Surg*, 2006 Jun; 22(6): 539-45.
8. Ammon, A.: *Illustrierte pathologische Anatomie der menschlichen Kornea, Sklera, Choroidea und des optischen Nerven* -hrsg. Von Warnatz, Leipzig 1862.
9. Arbelaez, MC., Sekito, MB., Vidal, C. et al.: Collagen cross-linking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: One-year results. *Oman J Ophthalmol*, 2009 Jan-Apr; 2(1): 33-38.
10. Arffa, R.: *Grayson's Diseases of the Cornea*. 1997. Chap. 17. Mosby. pp. 452–454.

11. Ashok, G. Pinelli, R.: Mastering Corneal Collagen Cross Linking (C3-R/CCL/CxL).  
New Delhi: Jaypee, 2009; 768 s. ISBN 978-81-8448-493-9, 160s.
12. Atilano, SR., Coskun, P., Chwa, M. et al.: "Accumulation of mitochondrial DNA damage in keratoconus corneas," Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2005; 46(4): 1256-1263.
13. Bailey, AJ., Paul, RG., Knott, L.: Mechanisms of maturation and ageing of collagen. Mech Ageing Dev, 1998 Dec 1;106(1-2): 1-56.
14. Bakke, EF., Stojanovic, A., Chen, X.: Penetration of riboflavin and postoperative pain in corneal collagen crosslinking: excimer laser superficial versus mechanical full-thickness epithelial removal. J Cataract Refract Surg, 2009 Aug; 35(8): 1363-6.
15. Barbaro, V., Di Iorio, E., Ferrari, S. et al.: Expression of VSX1 in human corneal keratocytes during differentiation into myofibroblasts in response to wound healing. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006 Dec; 47(12): 5243-50.
16. Bawazeer, AM., Hodge, WG., Lorimer, B.: Atopy and keratoconus: a multivariate analysis, The British Journal of Ophthalmology, 2000 Aug;84 (8): 83-6.
17. Belin, MW., Duncan, JK.: Keratoconus: The ABCD Grading System. Klin Monbl Augenheilkd, 2016 Jun; 233(6): 701-7.
18. Beshtawi, IM., O'Donnell, C., Radhakrishnan, H.: Biomechanical properties of corneal tissue after ultraviolet-A-riboflavin crosslinking. J Cataract Refract Surg, 2013 Mar; 39(3): 451-62.
19. Bisceglia, L., De Bonis, P., Pizzicoli, C. et al.: Linkage analysis in keratoconus: replication of locus 5q21.2 and identification of other suggestive Loci. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009 Mar; 50(3):1081-6.

20. Bonatti, JA., Bechara, SJ., Carricondo, PC.: Proposal for a new approach to corneal biomechanics: dynamic corneal topography. *Arq Bras Oftalmol*, 2009 Mar-Apr; 72(2): 264-7.
21. Bottós, KM., Schor, P., Dreyfuss, JL. et al.: Effect of corneal epithelium on ultraviolet-A and riboflavin absorption. *Arq Bras Oftalmol*. 2011 Sep-Oct; 74(5): 348-51.
22. Bowman, W.: On conical cornea and its treatment by operation. *Ophthalmic Hosp Rep and JR Lond Ophthalmic Hosp*. 1859; 9: 157.
23. Bron, AJ.: Keratoconus. *Cornea*. 1988; 7(3): 163-9.
24. Brooks, NO., Greenstein, S., FRY, K., Hersh, PS.: Patient subjective visual function after corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia. *J Cataract Refract Surg*. 2012 Apr; 38(4): 615-9.
25. Bühren, J., Kühne, C., Kohnen, T: Defining subclinical keratoconus using corneal first-surface higher-order aberrations. *Am J Ophthalmol*, 2007 Mar; 143(3): 381-9.
26. Burdon, KP., Macgregor, S., Bykhovskaya, Y. et al.: Association of polymorphisms in the hepatocyte growth factor gene promoter with keratoconus. *Invest ophthalmol Vis Sci*, 2011; Oct 31; 52(11): 8514-9.
27. Çerman, E., Toker, E., Ozcan D2.: Transepithelial versus epithelium-off crosslinking in adults with progressive keratoconus. *J Cataract Refract Surg*. 2015 Jul; 41(7): 1416-25.
28. Coskunseven, E., Jankov, MR., Grentzelos, MA. et al.: Topography-guided transepithelial PRK after intracorneal ring segments implantation and corneal collagen CXL in a three-step procedure for keratoconus. *J Refract Surg*, 2013 Jan; 29(1): 54-8.

29. Coskunseven, E., Jankov, MR., Grentzelos, MA. et al.: INTACS followed by KeraRing intrastromal corneal ring segment implantation for keratoconus. *Refract Surg*, 2010 May; 26(5): 371-4.
30. Coşkunseven E., Sharma, DP., Jankov, MR. et al.: Collagen copolymer toric phakic intraocular lens for residual myopic astigmatism after intrastromal corneal ring segment implantation and corneal collagen crosslinking in a 3-stage procedure for keratoconus. *J Cataract Refract Surg*, 2013 May; 39(5): 722-9.
31. Critchfield, JW., Calandra, AJ., Nesburn, AB. et al.: Keratoconus: I. Biochemical studies. *Exp Eye Res*, 1988 Jun; 46(6): 953-63.
32. Croxatto, JO., Tytiun, AE., Argento, CJ.: Sequential in vivo confocal microscopy study of corneal wound healing after cross-linking in patients with keratoconus. *J Refract Surg*, 2010 Sep; 26(9): 638-45.
33. Csiszar, K.: Lysyl oxidases: a novel multifunctional amine oxidase family. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2001; 70: 1-32.
34. Cýnar, Y., Cingü, AK., Turkcu, FM. et al.: Accelerated corneal collagen cross-linking for progressive keratoconus. *Cutan Ocul Toxicol*, 2014 Jun; 33(2): 168-71.
35. Dash, DP., George, S., O'Prey, D. et al.: Mutational screening of VSX1 in keratoconus patients from the European population. *Eye (Lond)*, 2010 Jun; 24(6): 1085-92.
36. Davidson, AE., Hayes, S., Hardcastle, AJ., at al.: The pathogenesis of keratoconus. *Eye (Lond)*, 2014 Feb; 28(2): 189-95.
37. De Bonis, P., Laborante, A., Pizzicoli, C. et al: Mutational screening of VSX1, SPARC, SOD1, LOX, and TIMP3 in keratoconus. *Molecular vision*, 2011; 17: 2482-94.

38. DelMonte, DW., Terry, K.: Anatomy and physiology of the cornea. *J cat refract surg*, 2011; 37: 588-598.
39. Dupps, WJ., Roberts, CJ.: Corneal biomechanics: A decade later. *J Cat refr surg*, 2014 Jun: 857.
40. Eberwein, P., Auw-Hadrich, C., Birnbaum, F. et al.: [Corneal melting after cross-linking and deep lamellar keratoplasty in a keratoconus patient]. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2008; 225(1): 96-8.
41. Edmund C.: Corneal elasticity and ocular rigidity in normal and keratoconic eyes. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 1988 Apr; 66(2): 134-40.
42. Edwards, M., McGhee, CN., Dean, S.: The genetics of keratoconus. *Clin Experiment Ophthalmol*, 2001 Dec; 29(6): 345-51.
43. Ehlers, N., Hjortdal, J.: Riboflavin-ultraviolet light induced cross-linking in endothelial decompensation. *Acta Ophthalmol* 2008; 86(5): 549-51.
44. Elbaz, U., Shen, C., Lichtinger, A. et al.: Accelerated (9-mW/cm<sup>2</sup>) corneal collagen crosslinking for keratoconus-A 1-year follow-up. *Cornea*, 2014 Aug; 33(8): 769-73.
45. El-Raggal, TM.: Effect of corneal collagen crosslinking on femtosecond laser channel creation for intrastromal corneal ring segment implantation in keratoconus. *J Cataract Refract Surg*, 2011 Apr; 37(4): 701-5.
46. Epstein, A.: Keratoconus and related disorders. *North Shore Contact Lens*. zdroj: <http://www.northshorecontactlens.com/Keratoconus>. Retrieved 2007-09-08.
47. Fadlallah, A., Dirani, A., Chelala, E. et al.: Non-topography-guided PRK combined with CXL for the correction of refractive errors in patients with early stage keratoconus. *J Refract Surg*, 2014 Oct; 30(10): 688-93.

48. Faschinger, C., Kleinert, R., Wedrich, A.: [Corneal melting in both eyes after simultaneous corneal cross-linking in a patient with keratoconus and Down syndrome]. *Ophthalmologe*, 2010; 107(10): 951-2, 4-5.
49. Ferrari G, Iuliano L, Viganò M et al. Impending corneal perforation after collagen cross-linking for herpetic keratitis. *J Cataract Refract Surg*. 2013; 39(4): 638-641.
50. Ferreira, TB., Marques, EF., Filipe, HP.: Combined corneal collagen crosslinking and secondary intraocular lens implantation for keratectasia after radial keratotomy.  
*J Cataract Refract Surg*, 2014 Jan; 40(1): 143-7.
51. Funderburgh, JL., Hevelone, ND., Roth, MR. Et al.: Decorin and biglycan of normal and pathologic human corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998 Sep; 39(10): 1957-64.
52. Funderburgh, JL., Panjwani, N., Conrad, GW. Et al.: Altered keratan sulfate epitopes in keratoconus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989 Oct; 30(10): 2278-81.
53. Geroski, DH., Matsuda, M., Yee, RW.: Pump function of the human corneal endothelium. Effects of age and cornea guttata. *Ophthalmology*. 1985 Jun; 92(6): 759-63.
54. Gobbe, M., Guillon, M.: Corneal wavefront aberration measurements to detect keratoconus patients. *Cont Lens Anterior Eye*, 2005 Jun; 28(2): 57-66.
55. Gokhale, NS.: Corneal endothelial damage after collagen cross-linking treatment. *Cornea* 2011; 30(12): 1495-8.
56. Gomes, JA., Tan, D., Rapuano, CJ. et al: Global consensus on keratoconus and ectatic diseases. *Cornea*. 2015 Apr; 34(4): 359-69.

57. Gondhowiardjo, TD., Van Haeringen, NJ., Völker-Dieben, HJ.: Analysis of corneal aldehyde dehydrogenase patterns in pathologic corneas. *Cornea*, 1993 Mar; 12(2): 146-54.
58. González-Méijome JM, Villa-Collar C, Montés-Micó R, Gomes A. Asphericity of the anterior human cornea with different corneal diameters. *J Cataract Refract Surg*. 2007 Mar; 33(3): 465-73.
59. Gore, DM., Shortt, AJ., Allan, BD.: New clinical pathways for keratoconus *Eye*, 2013; 27: 329-339.
60. Greenstein, SA., Fry, KL., Bhatt, J. et al.: Natural history of corneal haze after collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: Scheimpflug and biomicroscopic analysis. *J Cataract Refract Surg*. 2010; 36: 2105-14.
61. Greenstein, SA., Shah, VP., Fry, KL. et al.: Corneal thickness changes after corneal collagen crosslinking for keratoconus and corneal ectasia: one-year results. *J Cataract Refract Surg*, 2011 Apr; 37(4): 691-700.
62. Gu, S., Fan, Z., Wang, L. et al.: Corneal collagen cross-linking with hypoosmolar riboflavin solution in keratoconic corneas. *Biomed Res Int*, 2014;2014:754182.
63. Hafezi, F.: Limitation of collagen cross-linking with hypoosmolar riboflavin solution: failure in an extremely thin cornea. *Cornea*, 2011 Aug; 30(8): 917-9.
64. Hafezi, F., Kanellopoulos, J., Wiltfang, R. et al.: Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet A to treat induced keratectasia after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg*, 2007; 33: 203540.
65. Hafezi, F., Mrochen, M, Iseli, HP. et al.: Collagen crosslinking with ultraviolet-A and hypoosmolar riboflavin solution in thin corneas. *J Cataract Refract Surg*. 2009 Apr; 35(4): 621-4.



66. Hammer, A., Richo, O., Arba Mosquera, S. et al.: Corneal biomechanical properties at different corneal cross-linking (CXL) irradiances. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014 May 2; 55(5): 2881-4.
67. Hashemi, H., Heidarian, S., Seyedian, MA. et al.: Evaluation of the Results of Using Toric IOL in the Cataract Surgery of Keratoconus Patients. *Eye Contact Lens*, 2015 Nov; 41(6): 354-8.
68. Hashemi, H., Miraftab, M., Hafez, F. et al.: Matched comparison study of total and partial epithelium removal in corneal cross-linking. *J Refract Surg*, 2015 Feb; 31(2): 110-5.
69. Hashemi, H., Miraftab, M., Seyedian, MA. et al.: Long-term Results of an Accelerated Corneal Cross-linking Protocol (18 mW/cm<sup>2</sup>) for the Treatment of Progressive Keratoconus. *Am J Ophthalmol*, 2015 Dec; 160(6): 1164-1170.
70. Hashemian, H., Jabbarvand, M., Khodaparast, M. et al.: Evaluation of corneal changes after conventional versus accelerated corneal cross-linking: a randomized controlled trial. *J Refract Surg*, 2014 Dec; 30(12): 837-42.
71. Hayashi, T., Huang, J., Deeb, SS.: RINX(VSX1), a novel homeobox gene expressed in the inner nuclear layer of the adult retina. *Genomics*, 2000;67:128–139.
72. Hayes, S., O'Brart, DP., Lamdin, LS. et al.: Effect of complete epithelial debridement before riboflavin-ultraviolet-A corneal collagen crosslinking therapy. *J Cataract Refract Surg*, 2008 Apr; 34(4): 657-61.
73. Héon, E., Greenberg, A., Kopp, KK. et al.: VSX1: a gene for posterior polymorphous dystrophy and keratoconus. *Hum Mol Genet*, 2002 May 1;11(9):1029-36.

74. He, X., Spoerl, E., Tang, J. et al.: Measurement of corneal changes after collagen crosslinking using a noninvasive ultrasound system. *J Cataract Refract Surg*; 36(7): 1207-12.
75. Hirji, N., Sykakis, E., Lam, FC. et al.: Corneal collagen crosslinking for keratoconus or corneal ectasia without epithelial debridement. *Eye (Lond)*, 2015 Jun; 29(6): 764-8.
76. Holopainen, JM., Krootila, K.. Transient corneal thinning in eyes undergoing corneal cross-linking. *Am J Ophthalmol*, 2011 Oct; 152(4): 533-6.
77. Horner, JF.: Zur Behandlung des Keratoconus. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 1869.
78. <http://www.omim.org/entry/182120>.
79. Huang, AJ., Tseng, SC., Kenyon KR.: Paracellular permeability of corneal and conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989 Apr; 30(4): 684-9.
80. Hughes AE., Bradley DT., Campbell M., et al.: Mutation altering the miR-184 seed region causes familial keratoconus with cataract. *Am J Hum Genet*. 2011, Nov 11; 89(5): 628-33.
81. Chai, D., Gaster, RN., Roizenblatt, R. et al.: Quantitative Assessment of UVA-Riboflavin Corneal Cross-Linking Using Nonlinear Optical Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011; 52(7): 4231-8.
82. Chan, TC., Chow, VW., Jhanji, V. et al.: Different Topographic Response Between Mild to Moderate and Advanced Keratoconus After Accelerated Collagen Cross-linking. *Cornea*, 2015 Aug; 34(8): 922-7.
83. Chatzis N., Hafezi F.: Progression of keratoconus and efficacy of corneal collagen cross-linking in children and adolescents. *Journal of Refractive Surgery*, 2012; 28(11): 753-758.

84. Chow, RL., Volgyi, B., Szilard, RK. et al.: Control of late off-center cone bipolar cell differentiation and visual signaling by the homeobox gene *Vsx1*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 1754-1759.
85. Chwa M, Atilano SR., Hertzog, et al.: "Hypersensitive response to oxidative stress in keratoconus corneal fibroblasts," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2008; 49(10): 4361-4369.
86. Chwa, M., Atilano, SR., Reddy, V.: "Increased stress-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in human keratoconus fibroblasts," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2006; 47(5): 1902-1910.
87. Iovieno, A., Légaré, ME., Rootman, DB. et al.: Intracorneal ring segments implantation followed by same-day photorefractive keratectomy and corneal collagen cross-linking in keratoconus. *J Refract Surg*, 2011 Dec; 27(12): 915-8.
88. Iseli, HP., Thiel, MA., Hafezi, F. et al.: Ultraviolet A/riboflavin corneal cross-linking for infectious keratitis associated with corneal melts. *Cornea*, 2008; 27(5): 590-4.
89. Jafri, B., Lichter, H., Stulting, RD.: Asymmetric keratoconus attributed to eye rubbing. *Cornea*, 2004 Aug; 23(6): 560-4.
90. Jirsová, K., Merjavá, S., Lišková P.: Kolageny v lidské rohovce – jejich typy, lokalizace a role. *Čes. a slov. Oftal.*, 64, 2008, No. 4, p. 167-170 .
91. Jordan, C., Patel, DV., Abeysekera, N. et al.: In vivo confocal microscopy analyses of corneal microstructural changes in a prospective study of collagen cross-linking in keratoconus. *Ophthalmology*, 2014 Feb; 121(2): 469-74.
92. Joseph, R., Srivastava, OP., Pfister, RR.: Differential epithelial and stromal protein profiles in keratoconus and normal human corneas. *Exp Eye Res*, 2011 Apr; 92(4): 282-98.

93. Kanellopoulos AJ.: Collagen cross-linking in early keratoconus with riboflavin in a femtosecond laser-created pocket: initial clinical results. *J Refract Surg*, 2009 Nov; 25(11): 1034-7.
94. Kanellopoulos AJ.: Long term results of a prospective randomized bilateral eye comparison trial of higher fluence, shorter duration ultraviolet A radiation, and riboflavin collagen cross linking for progressive keratoconus. *Clin Ophthalmol*, 2012; 6: 97-101.
95. Kanellopoulos, AJ., Asimellis, G.: Keratoconus management: long-term stability of topography-guided normalization combined with high-fluence CXL stabilization (the Athens Protocol). *J Refract Surg*, 2014 Feb; 30(2): 88-93.
96. Karolak, JA., Rydzanicz, M., Ginter-Matuszewska, B. et al.: Variant c.2262A>C in DOCK9 Leads to Exon Skipping in Keratoconus Family. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015 Dec; 56(13): 7687-90.
97. Kennedy, C., Bastiaens, MT., Bajdik, CD. et al.: Leiden Skin Cancer Study. Effect of smoking and sun on the aging skin. *J Invest Dermatol*, 2003 Apr; 120(4): 548-54.
98. Klintworth, GK., Damms, T.: Corneal dystrophies and keratoconus. *Curr Opin Ophthalmol Curr Sci*, 1995; 6: 44-56.
99. Koenig, SB.: Bilateral recurrent self-induced keratoconus. *Eye & Contact Lens*, 2008 Nov; 34(6): 343-4.
100. Koller, T., Iseli, HP., Donitzky, C. et al.: Topography-guided surface ablation for forme fruste keratoconus. *Ophthalmology*, 2006 Dec; 113(12): 2198-202.
101. Koller, T., Mrochen, M., Seiler, T.: Complication and failure rates after corneal crosslinking. *J Cataract Refract Surg*, 2009 Aug; 35(8): 1358-62.

102. Kontadakis, GA., Kankariya, VP., Tsoulnaras, K. et al.: Long-Term Comparison of Simultaneous Topography-Guided Photorefractive Keratectomy Followed by Corneal Cross-linking versus Corneal Cross-linking Alone. *Ophthalmology*, 2016 May; 123(5): 974-83.
103. Kontadakis, GA., Kymionis, GD., Kankariya, VP. et al.: Effect of corneal collagen cross-linking on corneal innervation, corneal sensitivity, and tear function of patients with keratoconus. *Ophthalmology*, 2013 May; 120(5): 917-22.
104. Krachmer, JH., Feder, RS., Belin, MW.: Keratoconus and related noninflammatory corneal thinning disorders. *Surv Ophthalmol*, 1984 Jan-Feb; 28(4): 293-322.
105. Krueger, RR., Ramos-Esteban, JC., Kanellopoulos, AJ.: Staged intrastromal delivery of riboflavin with UVA cross-linking in advanced bullous keratopathy: laboratory investigation and first clinical case. *J Refract Surg*, 2008; 24(7): 730-6.
106. Kuželová, H., Macek, M., Raboch, J. et al.: Genetická variabilita u poruchy pozornosti s hyperaktivitou (ADHD). *Cesk Slov Neurol N* 2014; 77/110(4): 423-427.
107. Kymionis, GD., Bouzoukis, D., Diakonis, VF. Et al.: Diffuse lamellar keratitis after corneal crosslinking in a patient with post-laser in situ keratomileusis corneal ectasia. *J Cataract Refract Surg*, 2007; 33(12): 2135-7.
108. Kymionis, GD., Diakonis, VF., Kalyvianaki, M.: One-year follow-up of corneal confocal microscopy after corneal cross-linking in patients with post laser in situ keratosmileusis ectasia and keratoconus. *Am J Ophthalmol*, 2009 May; 147(5): 774-8, 778.

109. Kymionis, GD., Grentzelos, MA., Kankariya, VP. et al.: Long-term results of combined transepithelial phototherapeutic keratectomy and corneal collagen crosslinking for keratoconus: Cretan protocol. *J Cataract Refract Surg*, 2014 Sep; 40(9): 1439-45.
110. Kymionis, GD., Karavitaki, AE., Kounis, GA. et al.: Management of pellucid marginal corneal degeneration with simultaneous customized photorefractive keratectomy and collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg*, 2009; 35(7): 1298-301.
111. Kymionis, GD., Portaliou, DM., Bouzoukis, DI. et al.: Herpetic keratitis with iritis after corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A for keratoconus. *J Cataract Refract Surg*, 2007 Nov; 33(11): 1982-4.
112. Kymionis, GD., Portaliou, DM., Diakonis, VF. Et al.: Corneal Collagen Cross-linking With Riboflavin and Ultraviolet-A Irradiation in Patients With Thin Corneas. *Am J Ophthalmol* 2012; 153(1): 24-8.
113. Kymionis, GD., Tsoulnaras, KI., Grentzelos, MA. et al.: Corneal stroma demarcation line after standard and high-intensity collagen crosslinking determined with anterior segment optical coherence tomography. *J Cataract Refract Surg*, 2014 May; 40(5): 736-40.
114. Labiris, G., Kaloghianni, E., Koukoula, S. et al.: Corneal melting after collagen cross-linking for keratoconus: a case report. *J Med Case Rep*, 2011 Apr 16; 5:152.
115. Lam, HY., Wiggs, JL., Jurkunas, UV.: Unusual presentation of presumed posterior polymorphous dystrophy associated with iris heterochromia, band keratopathy, and keratoconus. *Cornea*, 2010; 29(10): 1180-1185.

116. Lema, I., Durán, JA., Ruiz, C. et al.: Inflammatory response to contact lenses in patients with keratoconus compared with myopic subjects. *Cornea*, 2008 Aug; 27(7): 758-63.
117. Lesniak, SP., Hersh, PS.: Transepithelial corneal collagen crosslinking for keratoconus: six-month results. *J Cataract Refract Surg*, 2014 Dec; 40(12): 1971-9.
118. Li, X., Bykhovskaya, Y., Haritunians, T. et al.: A genome-wide association study identifies a potential novel gene locus for keratoconus, one of the commonest causes for corneal transplantation in developed countries. *Hum Mol Genet*, 2012; Jan 15; 21(2): 421-9.
119. Liu, H., Chen, Y., Wang, P. et al.: Efficacy and safety of deep anterior lamellar keratoplasty vs. penetrating keratoplasty for keratoconus: a meta-analysis. *PLoS One*, 2015 Jan 29; 10(1): e0113332.
120. Mannis, MJ., Lightman, J., Plotnik, RD.: Corneal topography of posterior keratoconus. *Cornea*, 1992 Jul; 11(4): 351-4.
121. Martins, SA., Combs, JC., Noguera, G et al.: Antimicrobial efficacy of riboflavin/UVA combination (365 nm) in vitro for bacterial and fungal isolates: a potential new treatment for infectious keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008 Aug; 49(8): 3402-8.
122. Maurice, DM.: The transparency of the corneal stroma (letter). *Vision Res*, 1970; 10: 107-108.
123. Mazzotta, C., Balestrazzi, A., Traversi, C. et al.: Treatment of progressive keratoconus by riboflavin-UVA-induced cross-linking of corneal collagen: ultrastructural analysis by Heidelberg Retinal Tomograph II in vivo confocal microscopy in humans. *Cornea*, 2007 May; 26(4): 390-7.

124. Mccarroll, SA., Altshuler, DM.: "Copy-number variation and association studies of human diseases". *Nature Genetics*, 2007; 39: 37-42.
125. McCarthy, MI., Abecasis, GR., Cardon, LR. Et al.: Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nat Rev Genet*, 2008 May; 9(5): 356-69.
126. Mcleod, SD., Kisla, TA., Caro, NC. et al.: Iatrogenic keratoconus: corneal ectasia following laser in situ keratomileusis for myopia". *Archives of Ophthalmology*, 118 (2): 282-4.
127. McMahan, TT., Kim, LS., Fishman, GA. At al.: CRB1 gene mutations are associated with keratoconus in patients with leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009 Jul; 50(7): 3185-7.
128. Meek, KM., Boote, C.: The organization of collagen in the corneal stroma. *Exp Eye Res*, 2004; 78: 503-512.
129. Meek, KM., Hayes, S.: Corneal cross-linking--a review. *Ophthalmic Physiol Opt*, 2013 Mar; 33(2): 78-93.
130. Meek, KM., Tuft, SJ., Huang, Y. et al.: Changes in collagen orientation and distribution in keratoconus corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2005 Jun; 46(6): 1948-56.
131. Miháltz, K., Kovács, I., Kránitz, K. et al.: Mechanism of aberration balance and the effect on retinal image quality in keratoconus: optical and visual characteristics of keratoconus. *J Cataract Refract Surg*, 2011 May; 37(5): 914-22.
132. Morishige, N., Shin-Gyou-Uchi, R., Azumi, H.: Quantitative analysis of collagen lamellae in the normal and keratoconic human cornea by second harmonic



- generation imaging microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014 Nov 25; 55(12): 8377-85.
133. Morris-Rosendahl, DJ., Segel, R., Born, APOD. et al.: New RAB3GAP1 mutations in patients with Warburg Micro Syndrome from different ethnic backgrounds and a possible founder effect in the Danish. *Eur J Hum Genet*, 2010; 18: 1100–1106.
134. Nash, IS., Greene, PR., Foster, CS.: Comparison of mechanical properties of keratoconus and normal corneas. *Exp Eye Res* 1982; 35: 413-423.
135. Ng, AL., Chan, TC., Cheng, AC.: Conventional versus accelerated corneal collagen cross-linking in the treatment of keratoconus. *Clin Exp Ophthalmol*, 2016 Jan-Feb; 44(1): 8-14.
136. Ohtoshi, A., Wang, SW., Maeda, H., et al.: Regulation of retinal cone bipolar cell differentiation and photopic vision by the CVC homeobox gene *Vsx1*. *Curr Biol*, 2004; 14: 530-536.
137. Ozgurhan, EB., Akcay, BI., Kurt, T. et al.: Accelerated Corneal Collagen Cross-Linking in Thin Keratoconic Corneas. *J Refract Surg*, 2015 Jun; 31(6): 386-90.
137. Pacher, P., Beckman, JS., Liaudet, L.: Nitric Oxide and Peroxynitrite: in Health and disease. *Physiological Reviews*, 2007; 87(1): 315-424.
139. Patey, A., Savoldelli, M., Pouliquen, Y.: Keratoconus and normal cornea: a comparative study of the collagenous fibers of the corneal stroma by image analysis. *Cornea*, 1984; 3(2): 119-24.
140. Pathak, D., Nayak, B., Singh, et al.: “Mitochondrial complex 1 gene analysis in keratoconus,” *Molecular Vision*, 2011; 17 1514–1525.
141. Pinelli R, Leccisotti A.: *Keratoconus surgery and cross-linking*. Jaypee, 2009; 768 s. ISBN 978-81-8448-493-9. 186s:16.

142. Piñero, DP., Alió, JL., Alesón, A. et al.: Pentacam posterior and anterior corneal aberrations in normal and keratoconic eyes. *Clin Exp Optom*, 2009 May; 92(3):297-303.
143. Podskochy A.: Protective role of corneal epithelium against ultraviolet radiation damage. *Acta Ophthalmol Scand*, 2004 Dec; 82(6): 714-7.
144. Polack, FM.: Contributions of electron microscopy to the study of corneal pathology. *Surv Ophthalmol*. 1976 May-Jun; 20(6): 375-414.
145. Rabinowitz, YS.: Ectatic Disorders of the Cornea. *The Cornea* (4th ed.), 2004; 889-911.
146. Rabinowitz, YS.: Keratokonus. *Surv. Ophthalmol*, 1998 Jan-Feb; 42(4): 297-319.
147. Radner, W., Zehetmayer, M., Skorpik, C. et al.: Altered organization of collagen in the apex of keratoconus corneas. *Ophthalmic Res*, 1998; 30(5): 327-32.
148. Raiskup, F., Hoyer, A., Spoerl, E.: Permanent corneal haze after riboflavin-UVA-induced cross-linking in keratoconus. *J Refract Surg*. 2009 Sep; 25(9): 824-8.
149. Raiskup, F., Kissner, A., Spoerl, E. et al.: [Corneal cross-linking with hypo-osmolar riboflavin solution for keratoconus with thin corneas]. *Ophthalmologe* 2011; 108(9): 846-851.
150. Raiskup, F., Pinelli, R., Spoerl E.: Riboflavin osmolar modification for transepithelial corneal cross-linking. *Curr Eye Res*, 2012 Mar; 37(3): 234-8.
151. Raiskup, F., Spoerl, E.: Corneal crosslinking with riboflavin and ultraviolet A. I. Principles. *Ocul Surf*, 2013 Apr; 11(2): 65-74.
152. Raiskup, F., Theuring, A., Pillunat, LE. et al.: Corneal collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in progressive keratoconus: Ten year results. *J Cataract Refract Surg* 2015; 41:41-46

153. Raiskup-Wolf, F., Hoyer, A., Spoerl, E., Pillunat LE. Collagen crosslinking with riboflavin and ultraviolet-A light in keratoconus: long-term results. *J Cataract Refract Surg* 2008; 34(5): 796-801.
154. Rama, P., Di Matteo, F., Matuska, S. et al.: Acanthamoeba keratitis with perforation after corneal crosslinking and bandage contact lens use. *J Cataract Refract Surg*, 2009; 35(4): 788-791.
155. Rana, M., Lau, A., Aralikatti, A. et al.: Severe microbial keratitis and associated perforation after corneal crosslinking for keratoconus. *Cont Lens Anterior Eye*, 2015; 38(2): 134-137.
156. Randleman, JB., Woodward, M., Lynn, MJ. et al.: Risk assessment for ectasia after corneal refractive surgery. *Ophthalmology*, 2008 Jan; 115(1): 37-50.
157. Razmjoo, H., Rahimi, B., Kharraji, M. et al.: Corneal haze and visual outcome after collagen crosslinking for keratoconus: A comparison between total epithelium off and partial epithelial removal methods. *Adv Biomed Res*, 2014 Nov 29;3:221.
158. Richo, O., Hammer, A, Tabibian, D. et al.: The Biomechanical Effect of Corneal Collagen Cross-Linking (CXL) With Riboflavin and UV-A is Oxygen Dependent. *Transl Vis Sci Technol*, 2013 Nov; 2(7): 6.
159. Robertson, I.: Keratoconus and the Ehlers-Danlos syndrome: a new aspect of keratoconus. *Med J Aust*, 1975 May 3; 1(18): 571-3.
160. Rodríguez-Ausín, P., Gutiérrez-Ortega, R., Arance-Gil, A. et al.: Keratopathy after cross-linking for keratoconus. *Cornea*, 2011 Sep; 30(9): 1051-3.
161. Romero-Jiménez, M., Santodomingo-Rubido, J., Wolffsohn, JS.: Keratoconus: a review. *Cont Lens Anterior Eye*. 2010 Aug; 33(4): 157-66.

162. Rosen, DR., Siddique, T., Patterson, D. et al.: Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 1993; 362: 59-62.
163. Rosenfeld, JA., Drautz, JM., Clericuzio, CL. et al.: Deletions and duplications of developmental pathway genes in 5q31 contribute to abnormal phenotypes. *Am J Med Genet A*, 2011; Aug; 155A(8):1906-16.
164. Rozsival, P. et al.: *Trendy soudobé oftalmologie, svazek 7*, Praha, Galen, 2011: 50.
165. Sadoughi, MM., Einollahi, B., Baradaran-Rafii, A.: et al.: Accelerated versus conventional corneal collagen cross-linking in patients with keratoconus: an inpatient comparative study. *Int Ophthalmol*, 2016 Dec 29.
166. Saeed-Rad, S., Hashemi, H., Mirafteb, M. et al.: Mutation analysis of VSX1 and SOD1 in Iranian patients with keratoconus. *Mol Vis*, 2011; 17: 3128-36.
167. Sachdev, MS., Gupta, D., Sachdev, G. et al.: Tailored stromal expansion with a refractive lenticule for crosslinking the ultrathin cornea. *J Cataract Refract Surg*. 2015 May; 41(5): 918-23.
168. Said, DG., Elalfy, MS., Gatziofias, Z. et al.: Collagen cross-linking with photoactivated riboflavin (PACK-CXL) for the treatment of advanced infectious keratitis with corneal melting. *Ophthalmology*, 2014 Jul; 121(7): 1377-82.
169. Sakla H., Altroudi W., Munoz G., et al.: Simultaneous Topography-Guided Photorefractive Keratectomy and Accelerated Corneal Collagen Cross-Linking for Keratoconus. *Cornea*, 2016 Jul; 35(7): 941-5.
170. Sandvik, GF., Thorsrud, A., Råen, M. et al.: Does Corneal Collagen Cross-linking Reduce the Need for Keratoplasties in Patients With Keratoconus? *Cornea*, 2015 Sep; 34(9): 991-5.

171. Sawaguchi, S., Twining, SS., Yue, BY. Etal.: Alpha 2-macroglobulin levels in normal human and keratoconus corneas. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994 Nov; 35(12): 4008-14.
172. Sawaguchi, S., Yue, BY., Sugar, J. et al.: Proteoglycan molecules in keratoconus corneas. Invest Ophtalmol Vis Sci, 1991; 32(6):1864-53.
173. Scarcelli, G., Pineda R., Yun, SH.: Brillouin optical microscopy for corneal biomechanics. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2012 Jan 20; 53(1): 185-90.
174. Sedaghat, M., Bagheri, M., Ghavami, S. et al.: Changes in corneal topography and biomechanical properties after collagen cross linking for keratoconus: 1-year results. Middle East Afr J Ophthalmol, 2015 Apr-Jun; 22(2): 212-9.
175. Sedaghat, M., Naderi, M., Zarei-Ghanavati, M.: Biomechanical parameters of the cornea after collagen crosslinking measured by waveform analysis. J Cataract Refract Surg, 2010 Oct; 36(10): 1728-31.
176. Seiler. T., Spoerl, E., Huhle, M.: Conservative therapy of keratoconus by enhancement of collagen cross-links. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996; 37: S1017.
177. Seiler, TG., Fischinger, I., Koller, T. et al.: Customized Corneal Cross-linking: One-Year Results. Am J Ophthalmol. 2016 Jun; 166: 14-21.
178. Seiler, TG., Fischinger, I., Koller, T. et al.: Superficial corneal crosslinking during laser in situ keratomileusis. J Cataract Refract Surg. 2015 Oct; 41(10): 2165-70.
179. Seiler, TG., Schmidinger, G., Fischinger, I. et al.: [Complications of corneal cross-linking]. [Article in German] Ophthalmologe, 2013 Jul; 110(7): 639-44.
180. Shah, S., Laiquzzaman, M., Bhojwani, R. et al.:Assessment of the biomechanical properties of the cornea with the ocular response analyzer in

- normal and keratoconic eyes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2007; 48(7): 3026-3031.
181. Shalchi, Z., Wang, X., Nanavaty, MA.: Safety and efficacy of epithelium removal and transepithelial corneal collagen crosslinking for keratoconus. *Eye (Lond)*, 2015 Jan; 29(1): 15-29.
182. Sharma, A., Mirchia, K., Mohan, K. et al.: Persistent corneal edema after collagen cross-linking for keratoconus. Reply. *Am J Ophthalmol*, 2013 Apr; 155(4): 775-6.
183. Sharp, AJ., Locke, DP., Mcgrath, SD. et al.: "Segmental Duplications and Copy-Number Variation in the Human Genome". *The American Journal of Human Genetics*, 2005; 77 (1): 78–88.
184. Sherwin, T., Brookes, NH., Loh, IP. Et al.: Cellular incursion into Bowman's membrane in the peripheral cone of the keratoconic cornea. *Exp Eye Res*, 2002 Apr; 74(4): 473-82.
185. Shetty, R., Pahuja, NK., Nuijts, RM. et al.: Current Protocols of Corneal Collagen Cross-Linking: Visual, Refractive, and Tomographic Outcomes. *Am J Ophthalmol*, 2015 Aug; 160(2): 243-9.
186. Shoham, A., Hadziahmetovic, M., Dunaief, JL. et al.: Oxidative stress in diseases of the human cornea. *Free Radic Biol Med*, 2008 Oct 15; 45(8): 1047-55.
187. Schlegel, Z., Hoang-Xuan, T., Gatinel D.: Comparison of and correlation between anterior and posterior corneal elevation maps in normal eyes and keratoconus-suspect eyes. *J Cataract Refract Surg*, 2008 May; 34(5): 789-95.
188. Schumacher, S., Oeffiger, L., Mrochen, M.: Equivalence of biomechanical changes induced by rapid and standard corneal cross-linking, using riboflavin

- and ultraviolet radiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011 Nov 25; 52(12): 9048-52.
189. Soeters, N., Wisse, RP., Godefrooij, DA. et al.: Transepithelial versus epithelium-off corneal cross-linking for the treatment of progressive keratoconus: a randomized controlled trial. *Am J Ophthalmol*. 2015 May;159(5):821-8.
190. Spadea, L., Salvatore, S., Paroli, MP. et al.: Recovery of corneal sensitivity after collagen crosslinking with and without epithelial debridement in eyes with keratoconus. *J Cataract Refract Surg*, 2015 Mar; 41(3): 527-32.
191. Spoerl, E., Huhle, M., Seiler, T.: Induction of cross-links in corneal tissue. *Exp Eye Res*, 1998 Jan; 66(1): 97-103.
192. Spoerl, E., Mrochen, M., Sliney, D. et al.: Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea*, 2007; 26: 385-9.
193. Spoerl E., Physical background of the riboflavin/UV crosslinking of the cornea. World Vision Surgery Symposium, Sirmione, Italy, 22-23 June 2007.
194. Spoerl, E., Terai, N., Scholz, F. et al.: Detection of biomechanical changes after corneal cross-linking using Ocular Response Analyzer. *J Refract Surg*, 2011 Jun; 27(6): 452-7.
195. Spoerl, E., Wollensak, G., Seiler, T.: Increased resistance of crosslinked cornea against enzymatic digestion. *Curr Eye Res*, 2004 Jul; 29(1): 35-40.
196. Stabuc-Silih, M., Ravnik-Glavac, M., Glavac, D.: Polymorphisms in COL4A3 and COL4A4 genes associated with keratoconus. *Mol Vis*, 2009; Dec 20; 15: 2848-60.
197. Stachs, O., Bochert, A., Gerber, T. et al.: The extracellular matrix structure in keratoconus. *Ophthalmologe* 2004; 101: 384-9.

198. Stewart, JM., Lee, OT., Wong, FF. et al.: Cross-linking with ultraviolet-a and riboflavin reduces corneal permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011 Nov 29; 52(12): 9275-8.
199. Sturbaum, CW., Peiffer, RL.: Pathology of corneal endothelium in keratoconus. *Ophthalmologica*, 1993; 206(4): 192-208.
200. Szczotka-Flynn, L., Slaughter, M., McMahon, T. et al.: Disease severity and family history in keratoconus. *Br J Ophthalmol*. 2008 Aug;92(8): 1108-11.
201. Teng, CC.: Electron microscope study of the pathology of keratoconus: *Am J Ophthalmol*, 1963; 55: 18-47.
202. Tomita, M., Mita, M., Huseynova, T.: Accelerated versus conventional corneal collagen crosslinking. *J Cataract Refract Surg*. 2014 Jun; 40(6): 1013-20.
203. Toprak, I., Kucukatay, V., Yildirim, C. et al.: Increased systemic oxidative stress in patients with keratoconus. *Eye (Lond)*, 2014 Mar; 28(3): 285-9.
204. Vega-Estrada, A., Alio, JL., Brenner, LF. et al.: Outcome analysis of intracorneal ring segments for the treatment of keratoconus based on visual, refractive, and aberrometric impairment. *Am J Ophthalmol*, 2013 Mar; 155(3): 575-584.
205. Vicente, LL., Boxer Wachler BS: Factors that correlate with improvement in vision after combined Intacs and trans-epithelial corneal crosslinking. *Br J Ophthalmol*. 2010 Dec; 94(12): 1597-601.
206. Vinciguerra, P., Albè, E, Trazza, S. et al.: Intraoperative and postoperative effects of corneal collagen cross-linking on progressive keratoconus. *Arch Ophthalmol*, 2009 Oct; 127(10): 1258-65.
207. Vinciguerra, R., Ambrósio, R., Roberts, CJ. et al.: Biomechanical Characterization of Subclinical Keratoconus Without Topographic or Tomographic Abnormalities. *J Refract Surg*, 2017 Jun 1; 33(6): 399-407.



208. Wang, Y., Cui, C., Li, Z. et al.: Corneal ectasia 6.5 months after small-incision lenticule extraction. *Cataract Refract Surg*, 2015 May; 41(5): 1100-6.
209. Wang, Y., Rabinowitz, YS., Rotter, J. at al.: Genetic epidemiological study of keratoconus: evidence for a major gene determination. *American Journal of Medical Genetics*, 2000; 93: 403-409.
210. Waszczykowska, A., Jurowski, P.: Two-year accelerated corneal cross-linking outcome in patients with progressive keratoconus. *Biomed Res Int*, 2015; 2015:325157
211. Watsky, MA., McDermott, ML., Edelhauser, HF.: In vitro corneal endothelial permeability in rabbit and human: the effects of age, cataract surgery and diabetes. *Exp Eye Res*, 1989 Nov; 49(5): 751-67.
212. Wernli, J., Schumacher, S., Spoerl, E. et al.: The efficacy of corneal cross-linking shows a sudden decrease with very high intensity UV light and short treatment time. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013 Feb 1; 54(2): 1176-80.
213. Wheeler, J., Hauser, MA., Afshari, NA. et al.: The Genetics of Keratoconus: A Review. *Reprod Syst Sex Disord*, 2012 Jun 3;(Suppl 6)
214. Wojcik, KA., Kaminska, A., Blasiak, J. et al: Oxidative stress in the pathogenesis of keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Int J Mol Sci.* 2013 Sep 23; 14(9): 19294-308.
215. Wollensak G.: Histological changes in human cornea after cross-linking with riboflavin and ultraviolet A. *Acta Ophthalmol*, 2010 Mar; 88(2): e17-8.
216. Wollensak, G., Aurich, H., Pham, DT. Et al.: Hydration behavior of porcine cornea crosslinked with riboflavin and ultraviolet A. *J Cataract Refract Surg*, 2007 Mar; 33(3): 516-21.

217. Wollensak, G., Spoerl, E., Mazzotta, C. et al.: Interlamellar cohesion after corneal crosslinking using riboflavin and ultraviolet A light. *Br J Ophthalmol*, 2011;95(6):876-80.
218. Wollensak, G., Spoerl, E., Seiler, T.: Riboflavin/ultraviolet-a- induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus. *Am J Ophthalmol*, 2003; 135(5): 620-627.
219. Wollensak, G., Spoerl, E., Seiler, T.: Stress-strain measurements of human and porcine corneas after riboflavin-ultraviolet-A-induced cross-linking. *J Cataract Refract Surg*, 2003 Sep; 29(9): 1780-5.
220. Wollensak, G., Spoerl, E., Wilsch, M. et al.: Keratocyte apoptosis after corneal collagen cross-linking using riboflavin/UVA treatment. *Cornea*, 2004 Jan; 23(1): 43-9.
221. Wollensak, G., Wilsch, M., Spoerl, E. et al.: Collagen fiber diameter in the rabbit cornea after collagen crosslinking by riboflavin/UVA. *Cornea*, 2004 Jul; 23(5): 503-7.
222. Yildirim, A., Cakir, H., Kara, N. et al.: Corneal collagen crosslinking for ectasia after laser in situ keratomileusis: long-term results. *J Cataract Refract Surg*, 2014 Oct; 40(10): 1591-6.
223. Zadnik, K., Barr, JT., Edrington, TB.: Baseline findings in the Collaborative Longitudinal Evaluation of Keratoconus (CLEK) Study. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, December 1998; 39(13): 2537-46.
224. Zamora, KV., Males, JJ.: Polymicrobial keratitis after a collagen cross-linking procedure with postoperative use of a contact lens: a case report. *Cornea*, 2009; 28: 474-476.

225. Zhang, J., Zhang, L., Hong, J. et al.: Association of Common Variants in LOX with Keratoconus: A Meta-Analysis. PLoS One, 2015 Dec 29; 10(12).
226. Zhang, Y., Conrad, AH., Conrad, G., W.: Effects of ultraviolet-A and riboflavin on the interaction of collagen and proteoglycans during corneal cross-linking. J Biol Chem; 286(15):13011-22.
227. Zhang, ZY., Zhang, XR.: Prevention of ectasia for laser in situ keratomileusis with simultaneous corneal crosslinking. J Cataract Refract Surg, 2012Dec; 38(12): 2206-7.
228. Ziaei, M., Barsam, A., Shamie, N. et al.: Reshaping procedures for the surgical management of corneal ectasia. J Cataract Refract Surg, 2015 Apr; 41(4): 842-72.
229. Zimmermann, DR. Fischer, RW., Winterhalter, KH. et al.: Comparative studies of collagens in normal and keratoconus corneas. Exp Eye Res, 1988 Mar; 46(3): 431-42.