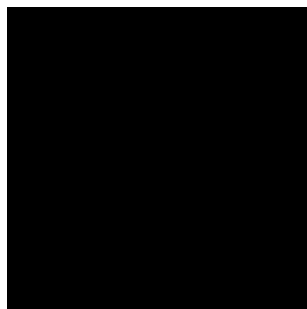


**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Studijní program: experimentální chirurgie



**MUDr. Marie Česká Burdová**

**Změny tkání oka u pacientů s diabetem mellitem s důrazem na tkáň  
povrchu oka**

**Changes in eye tissues in patients with diabetes mellitus, with emphasis on  
the tissue surface of the eye**

Disertační práce

Školitel: MUDr. Gabriela Mahelková, Ph.D.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 12/08/2019

Marie Česká Burdová

Podpis

Podpořeno projektem Ministerstva zdravotnictví koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 FN MOTOL.

## Poděkování

Poděkování patří mé školitelce MUDr. Gabriele Mahelkové, Ph.D. za trvalou podporu a odborné vedení.

Velice ráda bych poděkovala všem spoluautorům vědeckých publikací, které jsou součástí mé disertační práce.

Prof. MUDr. Dagmar Dotřelová, CSc., FEBO <sup>1</sup>

Prof. MUDr. Kateřina Štechová, Ph.D. <sup>2</sup>

MUDr. Gabriela Mahelková, Ph.D. <sup>1 3</sup>

MUDr. Milan Odehnal, MBA <sup>1</sup>

MUDr. Tereza Lainová Vrabcová <sup>1</sup>

MUDr. Šárka Malá <sup>2</sup>

MUDr. Lucie Hoskovcová <sup>2</sup>

Doc. Mgr. Michal Kulich, Ph.D. <sup>4</sup>

<sup>1</sup> Oční klinika dětí a dospělých 2.LF UK a FN Motol

<sup>2</sup> Interní klinika 2. LF UK a FN Motol

<sup>3</sup> Ústav fyziologie 2.LF UK

<sup>4</sup> Katedra pravděpodobnosti a matematické statistiky Matematicko-fyzikální fakulty UK

Ráda bych poděkovala své rodině za zázemí a trpělivost.

## **Identifikační záznam:**

ČESKÁ BURDOVÁ, Marie. *Změny tkání oka u pacientů s diabetem mellitem s důrazem na tkáň povrchu oka [Changes in eye tissues in patients with diabetes mellitus, with emphasis on the tissue surface of the eye]* Praha, 2019. 91 s, 4 příl. Disertační práce (Ph.D.). Univerzita Karlova, 2. lékařská fakulta, Oční klinika dětí a dospělých 2. LF UK.

Školitel: MUDr. Mahelková, Gabriela, Ph.D.

## Souhrn

**Hypotéza:** Diabetes mellitus 1. typu (DM 1) ovlivňuje denzitu buněk a stav subbazálního nervového plexu rohovky.

**Cíl práce:** Zhodnotit možnou souvislost mezi změnami rohovky a diabetickou retinopatií (DR), dobou trvání DM 1 a věkem v době diagnózy DM 1 a parametry kompenzace diabetu.

**Metodika:** Do studie bylo zařazeno 60 pacientů s DM 1, z toho 20 pacientů v intenzifikovaném inzulínovém režimu, a 20 zdravých kontrolních subjektů. Účastníci studie byli vyšetřeni in vivo konfokálním mikroskopem rohovky (IVCM). Pomocí IVCM byla hodnocena denzita bazálních epitelálních buněk, keratocytů a buněk endotelu a stav subbazálních nervových vláken rohovky [denzita nervových vláken rohovky (NFD), délka nervových vláken (NFL), denzita větvení nervových vláken (NBD) a tortuozita (NFT)]. Hodnoceny byly možné souvislosti mezi parametry kompenzace diabetu [glykovaný hemoglobin (HbA1c), glykémie a dávka inzulínu] a dalšími klinickými faktory.

**Výsledek:** Denzita bazálních epitelálních buněk se zvyšovala s věkem ( $p = 0,026$ ), zatímco denzita stromálních buněk a buněk endotelu s věkem klesala ( $p = 0,003$ ,  $p = 0,0005$ ,  $p < 0,0001$ ). Po stanovení diagnózy DM 1 tato asociace s věkem oslabila. U pacientů s DM 1 jsme prokázali poškození nervových vláken ( $p < 0,0001$ ). Poškození korelovalo se stupněm DR. Pacienti s DM 1 s vyšším věkem při stanovení diagnózy DM 1 měli vyšší denzitu nervových vláken ( $p = 0,0021$ ). Hodnota HbA1c neměla vliv na stav nervových vláken rohovky. NBD byla nejvyšší u pacientů s vyšší glykemickou variabilitou ( $p = 0,023$ ). NFD, NFL a NBD byly statisticky významně vyšší u pacientů s vyšší celkovou dávkou inzulínu na kilogram váhy ( $p = 0,02$ ,  $p = 0,01$ , resp.  $p = 0,012$ ).

**Závěr:** Výsledky naznačují, že věk v době diagnózy DM 1 může mít důležitý vliv na stav nervových vláken a denzitu buněk rohovky. Celková dávka inzulínu na kilogram váhy je důležitým faktorem ovlivňujícím stav nervových vláken a musí být zohledněna v budoucích studiích diabetické neuropatie a její progresi. Při objasňování vývoje diabetických komplikací musí být věnována větší pozornost dalším možným faktorům.

**Klíčová slova:** Konfokální mikroskopie rohovky, Diabetes mellitus 1. typu, Diabetická keratopatie, Nervová vlákna rohovky, Diabetická retinopatie, Diabetická neuropatie, Glykemická variabilita

## Summary

**Hypothesis:** Diabetes mellitus type 1 (DM 1) influences density of cells and the status of subbasal nerve fibers of the cornea.

**Purpose:** A possible association between changes in the cornea and diabetic retinopathy (DR), DM duration, age at the time of DM diagnosis, and parameters of diabetes compensation are evaluated.

**Methods:** The study included 60 patients with DM 1, among these 20 patients were treated with an intensified insulin regimen, and 20 healthy control subjects. The subjects were examined using in vivo corneal confocal microscopy (IVCM). The density of basal epithelial cells, keratocytes and endothelial cells, and the status of the subbasal nerve fibers [corneal nerve fiber density (NFD), nerve fiber length (NFL), nerve branch density (NBD), and tortuosity (NFT)] were evaluated using IVCM. Possible associations between parameters of diabetes compensation [glycated hemoglobin (HbA1c), glycemia, and insulin dose], and other clinical factors were analyzed.

**Results:** Basal epithelial cell density increased with age ( $p=0.026$ ), while stromal and endothelial cell density decreased with age ( $p = 0.003$ ,  $p = 0.0005$ ,  $p <0.0001$ ). After the DM1 diagnosis was established, this association with age weakened. We showed nerve fibers damage in DM 1 patients ( $p <0.0001$ ). The damage correlated with the degree of DR. DM1 patients with higher age at DM 1 diagnosis had a higher nerve fiber density ( $p = 0.0021$ ). HbA1c had an insignificant effect on corneal nerve parameters. NBD was the highest in those with higher glycemic variability ( $p = 0.023$ ). NFD, NFL, and NBD were statistically significantly higher in those with higher total insulin per kilogram ( $p = 0.02$ ,  $p = 0.01$ , and  $p = 0.012$ , respectively).

**Conclusion:** The results indicate that age at DM1 diagnosis potentially has an important effect on final nerve fiber and corneal cell density. Total insulin dose per kilogram is an important factor influencing nerve fiber status and needs to be considered in future studies of diabetic neuropathy and its progression. Also, more attention must be paid to other possible factors when elucidating the development of diabetic complications.

**Key words:** Corneal confocal microscopy, Diabetes mellitus type 1, Diabetic keratopathy, Corneal nerve fiber, Diabetic retinopathy, Diabetic neuropathy, Glucose variability

## OBSAH

1. Úvod .....	10
1.1. Anatomie a funkce rohovky .....	11
1.1.1. Epitel .....	12
1.1.2. Bowmanova membrána .....	13
1.1.3. Stroma .....	13
1.1.4. Descemetova membrána .....	14
1.1.5. Endotel .....	14
1.1.6. Nervové zásobení rohovky .....	15
1.2. Diabetická keratopatie a neuropatie rohovky .....	17
1.3. Patogeneze diabetické keratopatie a neuropatie rohovky .....	17
1.3.1. Metabolické změny .....	18
1.3.1.1. Oxidační stres .....	18
1.3.1.2. Polyolová dráha .....	19
1.3.1.3. Pokročilé produkty glykace (AGE) .....	20
1.3.1.4. Neurotrofické faktory .....	20
1.3.1.5. Imunitní mechanismy .....	21
1.4. Konfokální mikroskop .....	21
1.4.1. Princip konfokální mikroskopie .....	22
1.4.2. In vivo konfokální mikroskopie rohovky .....	22
1.4.2.1. Tandem scanning konfokální mikroskop .....	23
1.4.2.2. Slit scanning konfokální mikroskop .....	23
1.4.2.3. Laserový skenovací konfokální mikroskop .....	24
1.4.3. Skeny z konfokálního mikroskopu .....	24
1.4.4. Obraz jednotlivých vrstev rohovky při vyšetření rohovkovým konfokálním mikroskopem .....	25
1.4.5. Porovnání nálezů získaných pomocí různých typů přístrojů .....	30
1.4.6. Současná úskalí a omezení IVCM při hodnocení nervových vláken .....	31
1.5. Diabetická neuropatie .....	32

1.6. Glykemická variabilita .....	34
1.7. Léčba pacientů s DM 1 .....	35
2. <b>Hypotéza</b> .....	37
3. <b>Cíle práce</b> .....	37
4. <b>Materiál a metodika</b> .....	38
4.1. Obecné postupy .....	38
4.2. Vyhodnocení stavu sítnice .....	38
4.3. In vivo konfokální mikroskop .....	39
4.4. Analýza skenů rohovky .....	40
4.5. Glykemická variabilita .....	41
4.6. Statistická analýza .....	42
4.6.1. Diabetická retinopatie a změny nervových vláken hodnocené konfokální mikroskopií rohovky .....	42
4.6.2. Vliv doby trvání a věku v době diagnózy diabetes mellitus 1. typu na denzitu rohovkových buněk a nervová vlákna .....	42
4.6.3. Vliv klinických faktorů na nervová vlákna rohovky u pacientů s DM 1 ...	42
5. <b>Výsledky</b> .....	44
5.1. Diabetická retinopatie a změny nervových vláken hodnocené in vivo konfokální mikroskopií rohovky .....	44
5.2. Vliv doby trvání a věku v době diagnózy diabetes mellitus 1. typu na denzitu rohovkových buněk a nervová vlákna .....	48
5.3. Vliv klinických faktorů na nervová vlákna rohovky u pacientů s DM 1 .....	55
5.3.1. Vliv klinických faktorů nesouvisejících přímo s diabetem na parametry nervových vláken rohovky .....	55
5.3.2. Vliv klinických faktorů souvisejících s diabetem na parametry nervových vláken rohovky .....	55
6. <b>Diskuze</b> .....	62
7. <b>Závěr</b> .....	70
8. <b>Souhrn</b> .....	73
9. <b>Summary</b> .....	75
10. <b>Literatura</b> .....	77
11. <b>Přílohy</b> .....	92
11.1. Seznam použitých zkratk .....	92
11.2. Informované souhlasy .....	94



11.3.	Seznam publikací .....	98
11.3.1.	Seznam vědeckých publikací s tématem disertační práce .....	98
11.3.2.	Seznam vědeckých publikací bez vztahu k tématu disertace .....	99

## 1. Úvod

Diabetes mellitus (DM) je chronické metabolické onemocnění způsobené vrozeným a/nebo získaným nedostatkem produkce inzulínu pankreatem nebo neúčinností již vytvořeného inzulínu. Absolutní nebo relativní nedostatek inzulínu vedoucí k hyperglykemii je společným jmenovatelem pro diabetes mellitus 1. typu (DM 1) i 2. typu (DM 2). Zvýšená koncentrace glukózy v krvi vede k metabolickým, funkčním a morfologickým změnám, jejichž důsledkem jsou pozdní mikroangiopatické a makroangiopatické komplikace diabetu (Gubitosi-Klug R. A. et al., 2014).

Diabetes mellitus představuje nejrozšířenější systémové onemocnění na světě, a to s narůstající prevalencí. Od počátku 21. století se hovoří již o epidemii DM (Threatt J. et al., 2013). Podle světové zdravotnické organizace (World Health Organization) trpí celosvětově diabetem 422 milionů lidí. Odhaduje se, že do roku 2030 onemocnění postihne 555 milionů a v roce 2040 až 640 milionů lidí (Markoulli M. et al., 2018). Jen v České republice se počet pacientů s DM blíží již 1 milionu lidí.

Diabetická neuropatie (DN) a retinopatie (DR) jsou spolu s diabetickou nefropatií nejzávažnější mikroangiopatické komplikace DM. Oftalmologické komplikace, které se manifestují hlavně diabetickou retinopatií, patří mezi hlavní příčiny slepoty ve vyspělých zemích (Markoulli M. et al., 2018).

Naopak změny tkání povrchu oka spojené s DM, včetně rohovky, nejsou dobře známy. Poškození jednotlivých vrstev rohovky se označuje souhrnným pojmem keratopatie, která se rozvine až u dvou třetin pacientů s diabetem (Han S. B. et al., 2019). Tento pojem v širším smyslu zahrnuje i neuropatii rohovky. U pacientů s DM dochází postupně k poškození nervových vláken rohovky, jehož důsledkem je snížená citlivost (Tavakoli M. et al., 2010). Neuropatie rohovky má dále za následek zhoršení hojení rohovkového epitelu a zvýšenou náchylnost k přetrvávajícím epiteliálním defektům a rohovkovým infekcím (Cruzat A. et al., 2017, O' Donnell C. et al., 2012). Tyto komplikace mohou rovněž vést ke slepotě, která podtrhuje důležitost porozumění dopadu DM na povrchové tkáni oka (Han S. B. et al., 2019).

Diabetická neuropatie představuje závažnou, až život ohrožující komplikaci DM, která postihuje 50-90 % pacientů (LeCaire T. J. et al., 2013). Diagnóza DN bývá často stanovena pozdě, protože neurologické a elektrofyzilogické metody identifikují až rozvinutou neuropatii. K zajištění co nejlepšího účinku léčby je však potřeba identifikovat neuropatii v její časně fázi, při postižení nemyelinizovaných tenkých vláken (Tavakoli M. et al., 2013).

Byla prokázána úzká souvislost mezi rozvojem DN a patologickými změnami nervových vláken rohovky. Morfologické změny nervové pleteně v rohovce předcházejí klinickým projevům DN (Tavakoli M. et al., 2010).

V oftalmologii v současné době narůstá zájem o neinvazivní metody umožňující studovat in vivo tkáň na buněčné úrovni. Jednou z takových metod je in vivo konfokální mikroskopie rohovky (IVCM), neinvazivní, rychle se rozvíjející vyšetřovací metoda. Průhlednost rohovky umožňuje zobrazit in vivo jednotlivé vrstvy na buněčné úrovni (Lutty G. A., 2013). IVCM se tak stává nadějnou metodou nejen pro zjištění diabetické keratopatie, ale mohla by sloužit k vyhledávání pacientů s rizikem rozvoje DN a odhalení časného stupně DN již v presymptomatologickém období. Metoda je využitelná i při kvantifikování pokročilé DN. Kromě potenciálního diagnosticko-preventivního významu, představuje IVCM významný výzkumný nástroj, který je důležitý pro pochopení patofyziologie změn při DM.

### **1.1. Anatomie a funkce rohovky**

Rohovka je specializovaná transparentní a avaskulární tkáň, která je zároveň hlavní refrakční částí optického systému oka.

Rohovka má dvě hlavní funkce. Za prvé představuje mechanickou bariéru vůči vnějšímu prostředí a za druhé umožňuje průchod a lom světla. Její průhlednost je dána přesným uspořádáním jednotlivých vrstev a složek extracelulární matrix, správnou hydratací a avaskularitou (Krachmer J., 2011).

Výměna kyslíku a metabolitů v rohovce probíhá prostou difuzí z komorové tekutiny endotelem a ze slzného filmu pomocí epitelu (Levin L. A., et al. 2011).

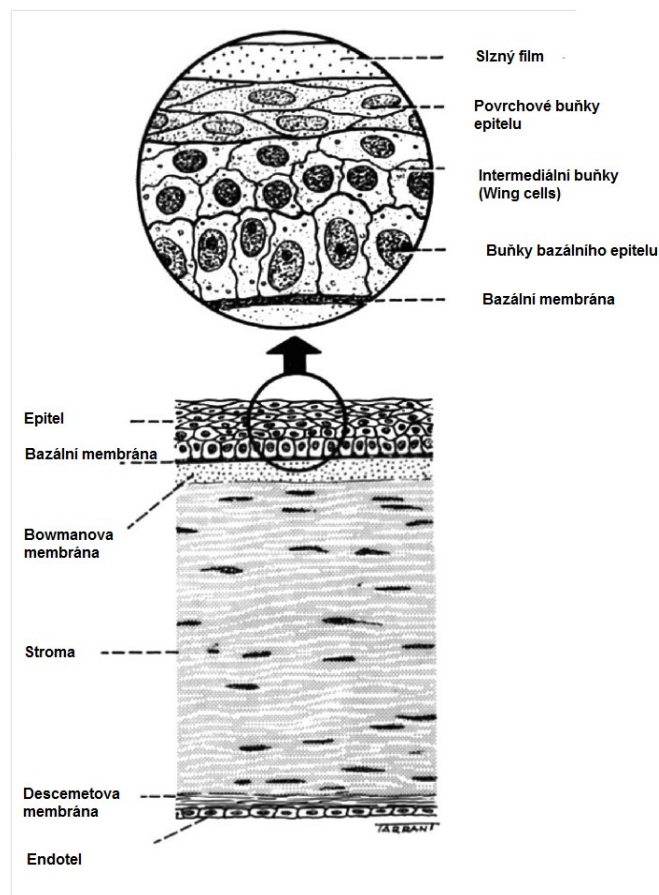
Přední povrch rohovky je pokryt slzným filmem, zadní povrch ohraničuje prostor přední komory oka vyplněný komorovou tekutinou. Rohovka v periférii plynule přechází do neprůhledné skléry, která je kryta semitransparentní spojivkou. Rozhraní mezi rohovkou a sklerou se nazývá limbus. Limbus je bohatě vaskularizovaný a obsahuje kmenové buňky (Levin L. A., et al., 2011).

Z anatomického hlediska se rohovka skládá z pěti vrstev: epitelu a jeho bazální membrány, Bowmanovy membrány, stromatu, Descemetovy membrány a endotelu (Obr. 1)

Rohovka se zakládá již kolem pátého týdne embryonálního vývoje. Z ektodermu se vytváří rohovkový epitel, z neuroektodermu derivovaných mesenchymálních buněk se vyvine stroma a endotel a z neuroektodermu nervová vlákna (Levin L. A., et al., 2011, Krachmer J., 2011).

Dospělost a stárnutí doprovází další strukturální změny rohovky. Dochází k ztluštění bazální membrány epitelu a Descemetovy membrány, k poklesu denzity keratocytů ve stromatu a počtu buněk endotelu. V důsledku věkem podmíněné glykace kolagenních vláken stromatu rohovky dochází ke změnám uspořádání kolagenních vláken, a tím k nárůstu tuhosti stromatu (Levin L. A. et al., 2011).

**Obr. 1 Anatomie rohovky**  
(převzato z Kanski J.J. et al., 2011)



### 1.1.1. Epitel

Epitel rohovky vytváří mechanickou bariéru mezi vnitřním prostorem oka a zevním prostředím. Je tvořen 5-7 vrstvami dlaždicových, nekeratinizujících buněk. Jeho tloušťka je přibližně 40-50  $\mu\text{m}$ . Zevní část epitelu je tvořena 2-3 vrstvami povrchových plochých buněk. Intermediální část je složena ze 2-3 vrstev kubických buněk s laterálními výběžky, tzv. wing cells. Nejhlouběji leží jedna řada cylindrických buněk bazálního epitelu, které jsou pevně připojeny pomocí hemidesmosomů k bazální membráně. Buňky epitelu jsou mezi

sebou pevně spojeny desmosomy a na apikální straně povrchových dlaždicových buněk také těsnými mezibuněčnými spoji – zonulae occludentes.

Epitel rohovky se trvale obnovuje. Buňky bazálního epitelu se symetrickou mitózou rozdělí na dvě dceřiné buňky, které se posouvají směrem k povrchu, kde se postupně diferencují do dlaždicových buněk povrchového epitelu. Po uvolnění mezibuněčných spojení se odlučují do slz při mrkání. Celý epitel se obmění za 7-10 dní. Tato "vertikální proliferace" buněk je doplňována "horizontální proliferací" z progenitorových kmenových buněk. Ty jsou uloženy limbálně v přechodové zóně mezi rohovkou a spojivkou, v záhybech nazývaných Vogtovy palisády. Po asymetrické/symetrické mitóze dceřiná buňka migruje centripetálně, kde doplňuje buňky bazálního epitelu. Důležitá je rovnováha mezi horizontální proliferací a následnou migrací buněk centripetálně s terminální vertikální proliferací a současnou diferenciací směrem k povrchovým dlaždicovým buňkám (Levin L. A. et al., 2011).

### **1.1.2. Bowmanova membrána**

Bowmanova membrána je nebuněčná, membráně podobná vrstva, mezi rohovkovým epitelem a stromatem. Její tloušťka je přibližně 40-50  $\mu\text{m}$ . Je tvořena nepravidelně uspořádanými kolagenními vlákny, především typu I, III, a V. Bowmanova membrána neregeneruje, při poranění je nahrazena jizevnatou tkání (Levin L. A. et al., 2011).

### **1.1.3. Stroma**

Stroma je transparentní vrstva, která tvoří 90 % tloušťky rohovky (cca 500  $\mu\text{m}$ ). Je tvořena převážně vodou, která je vázaná extracelulárně v extracelulární matrix, kolagenu či glykoproteinech a intracelulárně v keratocytech.

Keratocyty představují jen 10 % objemu stromatu. Průměrný počet keratocytů je 20 000 keratocytů/ $\text{mm}^3$ . S věkem dochází k úbytku keratocytů přibližně o 0,5 % za rok. Keratocyty jsou modifikované fibrocyty. Mají hvězdicovitý tvar s dlouhými dendritickými výběžky a jsou vnořeny mezi kolagenní vlákna. Jejich hlavní funkcí je syntéza kolagenových vláken, včetně jejich uspořádání, a dále tvorba extracelulární stromální matrix složené z proteoglykanů a glykosaminoglykanů. Jádra keratocytů lehce lomí světlo, ale cytosol obsahuje rozpustný protein krystalin, který je zodpovědný za redukci zpětného odrazu světla od keratocytů, a přispívá tak k optimální průhlednosti rohovky.

Kolagen představuje 70 % suché váhy rohovky. Nejvíce je zastoupen kolagenem typu I, dále v menší míře kolagen typu III, V a VI. Vlákna jsou uspořádána do paralelních svazků neboli fibril, ty jsou dále uspořádány do paralelních lamel. Přesná organizace kolagenových vláken a extracelulární matrix zajišťuje průhlednost stromatu. Obměna kolagenu v rohovce probíhá pomalu během 2-3 let.

Ve stromatu jsou přítomny i progenitorové kmenové buňky, dále dendritické buňky a histiocyty (Krachmer J. et al., 2011, Forrester J. et al., 2000).

#### **1.1.4. Descemetova membrána**

Descemetova membrána je bazální membránou endotelu. Má tloušťku asi 10  $\mu\text{m}$ . Buňky endotelu během života vytvářejí další amorfní složky membrány, a tím narůstá její tloušťka. Je tvořena především kolagenem typu IV a laminem. Membrána neregeneruje (Krachmer J. et al., 2011).

#### **1.1.5. Endotel**

Endotel je tvořen jednou vrstvou převážně hexagonálních buněk o výšce 6  $\mu\text{m}$  a šířce 20  $\mu\text{m}$ . Po narození je jejich počet přibližně 5 000 buněk/ $\text{mm}^2$ . Lidské buňky endotelu mají velmi omezenou proliferační kapacitu zřejmě díky kontaktní inhibici a inhibitorům růstových faktorů, které jsou přítomné v komorové tekutině. Počet endotelových buněk s věkem klesá, na prahu dospělosti přibližně na 3 000 buněk/ $\text{mm}^2$  a v pozdějším věku se ztráta prohlubuje na 2 500 buněk/ $\text{mm}^2$ . Buňky jsou migrací a rozprostíráním se do větší plochy schopny reparovat poškozená místa a následně obnovit mezibuněčné spoje a funkci. Výsledkem je zvýšení tvarové pestrosti (pleomorfismus) a narůst velikosti (polymegatismus) buněk endotelu. Také v endotelu jsou přítomny progenitorové kmenové buňky. Jsou uloženy poblíž Schwalbeho linie, v přechodné zóně mezi trabekulem a periferní částí endotelu. Po asymetrické/symetrické mitóze se šíří centripetálně. Jejich limitovaná aktivita se zvyšuje poraněním. Dále mají význam v době růstu.

Endotel má dvě základní funkce. Vytváří bariéru proti volnému prostupu komorové tekutiny a současně obstarává transport živin, vody a metabolitů do stromatu. Obsahuje velké množství mitochondrií pro zajištění aktivního transportu především molekul vody. Neustálý transport vody ze stromatu do komorové tekutiny zprostředkovávají membránové iontové pumpy pro sodík a bikarbonát, tzv.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  a  $\text{HCO}_3^-$  ATPázy (adenosin trifosfatáza), které

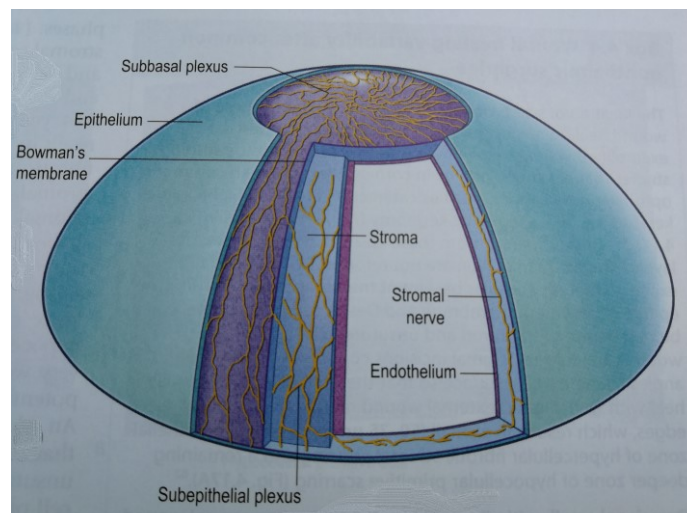
vytváří osmotický gradient pro transport vody. Cílem je správná hydratace, a tím transparence rohovky (Levin L. A., et al., 2011, Forrester J. et al., 2000).

### 1.1.6. Nervové zásobení rohovky

Rohovka patří mezi tkáně s nejbohatší inervací v lidském těle, s přibližně 16 000 volnými epiteliálními nervovými zakončeními na mm<sup>2</sup>. Densita nervových zakončení je 300–400krát větší než v lidské pokožce (Muller L. et al., 1997, Levin L. A., et al. 2011). Nervové zásobení rohovky je tvořeno volnými terminálními zakončeními senzitivních nervových vláken, nn. ciliares longi (n. ophthalmicus via n. nasociliaris), pocházejících z 1. větve n. trigeminus. Nervová vlákna se radiálně větví, procházejí v oblasti limbu do stromatu rohovky a vytvářejí stromální nervová vlákna. Přibližně po 1 mm ztrácejí perineurium a postupně i myelinové pochvy. V hloubce  $293 \pm 106 \mu\text{m}$  od povrchu rohovky jsou nervová vlákna obalena pouze Schwannovými buňkami. Stromální periferní nervy tedy zahrnují jak myelinizované, tak nemyelinizované nervové svazky. V centru stromatu jsou již jen nemyelinizované nervové svazky obsahující axony obklopené amorfni extracelulární matrix (Muller L. J. et al., 2003). V prostoru pod Bowmanovou membránou vytvářejí nervová vlákna subepitelový plexus. Mezi vrstvou bazálních epitelových buněk a předními vrstvami Bowmanovy membrány se vlákna větví a vytváří subbazální nervový plexus (Obr. 2). Následně se vlákna otáčí o 90 stupňů směrem k povrchu rohovky a končí jako volná subepiteliální nervová zakončení (Guthoff R. F. et al., 2005, Stachs O. et al., 2007).

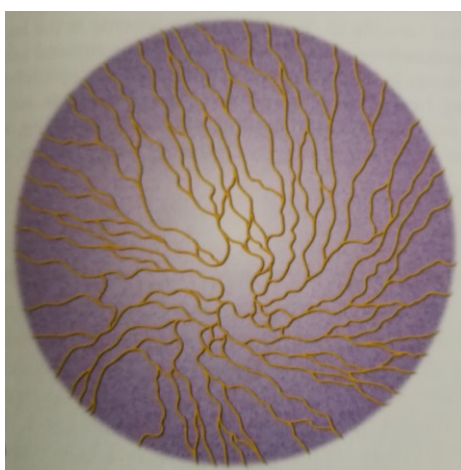
#### Obr. 2 Nervové zásobení rohovky

(převzato z Levin L. A., et al., 2011)



Nervová vlákna subbazálního nervového plexu se směrem od limbu ke středu rohovky stáčí a vytvářejí inferonasálně od centra rohovky přeslenovitou strukturu (Obr. 3), kde je síť nervových vláken nejhustší (Patel D. V. et al., 2013). Předpokládá se, že inferonasální posunutí je důsledkem smykové síly pohybu víčka během mrkání (Doane M. G., 1980). Rohovka je zásobována i autonomními sympatickými nervovými vlákny, která pocházejí z nadřazeného cervikálního ganglia (Marfurt C. F. et al., 1989). Není jasné, zda rohovka obsahuje i parasympatická nervová vlákna (Muller L. J. et al., 2003). Převážnou část vláken tvoří heterogenní sensorická vlákna z 1. větve n. trigeminus. Jednou z hlavních funkcí je přenášet mechanické, chemické a tepelné podněty v podobě bolesti (Cruzat A. et al., 2017).

**Obr. 3 Nervová vlákna subbazálního nervového plexu**  
(převzato z Levin L. A., et al., 2011)



Lidská nervová vlákna rohovky jsou obtížně studovatelná ex vivo. Již po 14 hodinách od smrti degenerují (Cruzat A. et al., 2017). Stromální nervy rohovky jsou robustnější a přežívají posmrtně déle oproti subbazálním nervům, proto jsou pro in vitro studie rohovky vhodnější (Simo Mannion L. et al., 2005).

Nervová vlákna obsahují velké množství mitochondrií, ve kterých probíhá aerobní glykolýza a oxidativní fosforylace za vzniku ATP (adenosintrifosfát) cestou elektronových přenašečů v Krebsově cyklu (Levin L. A., et al., 2011, Alberts B. et al., 1998)



## **1.2. Diabetická keratopatie a neuropatie rohovky**

Ve studiích věnujících se buněčným změnám rohovky diabetických pacientů ve srovnání se zdravými subjekty bylo zdokumentováno, že při diabetické keratopatii dochází ke snížení tloušťky epitelu, poklesu denzity buněk bazálního epitelu, buněk stromatu (keratocytů) a endotelu (Rosenberg M. E. et al. 2000, Quadrado M. J. et al., 2006, Szalai E. et al. 2016, Dehghani C. et al., 2016).

Studie u diabetických pacientů prokázaly pokles v denzitě a délce nervových vláken, snížení počtu větvení nervových vláken rohovky a současně nárůst jejich tortuozity (Threatt J. et al., 2013, Zochodne D. W., 2007).

## **1.3. Patogeneze diabetické keratopatie a neuropatie rohovky**

Chronická hyperglykémie a kolísání glykémie je hlavním faktorem vysvětlující mechanismus patogeneze vedoucí k rozvoji diabetické neuropatie či retinopatie a dalších systémových mikroangiopatických komplikací. Společný podklad uváděný v patofyziologických, epidemiologických a některých genetických studiích naznačuje souvislost výskytu DR (zejména těžších stupňů) a DN (Hosseini S. M. et al., 2015).

Do nervových buněk vstupuje glukóza facilitovanou difuzí pomocí transportérů nezávislých na inzulínu, proto jsou zvláště vulnerabilní k hyperglykemii. Hyperglykémie vede k postižení vasa nervorum nebo k přímému postižení nervových vláken několika cestami.

Při postižení vasa nervorum mají zpočátku hlavní roli funkční změny. Převažují vazokonstrikční faktory nad vazodilatačními. Při nedostatku vazodilatačních endotelových faktorů jako je oxid dusnatý a prostaglandin, převažuje tvorba vazokonstričních faktorů, jako je endotelin 1 a angiotenzin II. Dochází k aktivaci koagulace a rozvoji protrombotického prostředí, které podporují rheologické změny. Mezi ně patří zvýšená agregabilita a snížená deformabilita erytrocytů, které zvyšují viskozitu krve a poškozují mikrovaskulární perfuzi. Následné strukturální změny endotelu a jeho bazální membrány prohlubují nedostatečnost perfuze. Distální nervová vlákna jsou rovněž citlivá k ischemicko – reperfuznímu poškození, při kterém hlavní roli hraje oxidační stres (Kramerov A. A., 2016, Kotas R. a Ambler, 2012).

Patogeneze diabetické keratopatie a neuropatie rohovky jako bezcévné tkáně je dána hlavně metabolickými změnami, které způsobují přímé postižení nervových vláken. Vznikají abnormality ve struktuře axonů a myelinových pochev, které se zřejmě podílejí na atrofii

a degeneraci axonů a segmentální demyelinizaci a apoptóze buněk (Kotas R. a Ambler Z. 2012, Babizhayev M. A. et al., 2015).

### **1.3.1. Metabolické změny**

Intracelulární hyperglykémie aktivuje hlavní metabolické patologické cesty vedoucí k mikroangiopatickým diabetickým komplikacím. Vlivem zvýšené koncentrace glukózy se jsou vystupňovány pochody, při nichž vznikají produkty podmiňující poruchu regulace funkce buněk i pojiva. Podstata spočívá ve struktuře samotné glukózy, která umožňuje, aby jednak reagovala s proteiny a měnila jejich vlastnosti, jednak aby se spontánně oxidovala (tzv. autooxidace) a vytvářela tak reaktivní meziproducty a přitom umožnila vznik reaktivním formám kyslíku (Škrha J., 2010). Dále dochází rychle k saturaci normální glykolytické cesty, což vede ke zvýšené aktivitě tzv. polyolové dráhy nebo k neenzymatické glykaci vedoucí k hromadění pokročilých produktů glykace (AGE – advanced glycation end-products) (Babizhayev M.A. et al., 2015). Svou roli dále hrají deficit neurotrofických faktorů, imunologické faktory a porucha metabolismu esenciálních mastných kyselin a dyslipidemie. Výsledkem je mikroangiopatie v prostoru endoneuria a přímé poškození nervových vláken, jehož důsledkem je urychlení neurální apoptózy a zvýšení oxidačního stresu (Bovlton A. J., et al., 2004).

Metabolické změny vysvětlující patogenezi diabetické neuropatie jsou velmi komplexní, se vzájemnou interakcí (Ziegler D., 2008). Zde se zaměříme jen na hlavní z nich.

#### **1.3.1.1. Oxidační stres**

Chronická hyperglykémie vede k nadměrnému přísunu glukózy do mitochondrií, což v důsledku urychleného oxidačního metabolismu glukózy podporuje tvorbu vysoce reaktivních forem kyslíku (Babizhayev M. A. et al., 2015).

Dochází k ovlivnění funkce mitochondriálních elektronových přenašečů  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  (nikotinamidadenindinukleotid/redukovaná forma) a  $\text{NAPD}^+/\text{NADPH}$  (nikotinamidadenindinukleotidfostát/redukovaná forma) a nárůstu reaktivních forem kyslíku, které vedou k poškození mitochondrií (Babizhayev M. A. et al., 2015, Alberts B. et al., 1998).

Zvýšená tvorba reaktivních forem kyslíku je za normálních podmínek neutralizovaná dostatečnou kapacitou "scavengerového" systému. Při chronické hyperglykemii dochází ke snížení této antioxidační kapacity, ať již v důsledku geneticky podmíněného polymorfismu

genů (single-nucleotide polymorphisms), který vede ke snížené účinnosti antioxidantních enzymů (např. mitochondriální a extracelulární superoxiddismutázy), nebo ke zvýšení tvorby reaktivních forem kyslíku (Bovlton A.J., et al. 2004, Škrha J., 2010).

Nervová vlákna a endotel jsou při vysokém počtu mitochondrií k oxidačnímu stresu vysoce citlivá. Dochází k demyelinizaci a poruše vedení nervovými vlákny. Narůstající oxidační stres dále prohlubuje poškození nervových vláken, degeneraci axonů a apoptózu buněk rohovky (Bovlton A. J., et al., 2004, Obrosova I. G. et al., 2009, Gerald P. et al., 2010, Han S. B. et al., 2019). Experimentální studie rovněž potvrdila, že marker oxidativního stresu, 8-hydroxydeoxyguanosin, byl zvýšen v rohovce zvířecího diabetického modelu, což naznačuje možnou úlohu reaktivního oxidačního stresu v apoptóze buněk rohovky při DM (Kim J. et al., 2011).

Mitochondriální poškození je také spojeno s poklesem neurotrofických faktorů, včetně nervového růstového faktoru (NGF – nerve growth factor) (Tomlinson D. R. 1997, Han S. B. et al., 2019).

### 1.3.1.2. Polyolová dráha

Nasycení normální glykolytické dráhy způsobené hyperglykemií vede v nervových buňkách k náhradnímu odbourávání přebytku glukózy tzv. polyolovou dráhou. V prvním kroku dochází k přeměně glukózy na sorbitol a dále na fruktózu pomocí enzymů aldózoreduktázy a sorbitoldehydrogenázy (Stavniichuk R. et al., 2012). Vlivem akumulace osmoticky aktivního sorbitolu a fruktózy v nervovém vlákně dochází k zvýšení osmotického tlaku (Bovlton A. J., et al., 2004). Dalším závažnějším faktorem se jeví narůstající oxidační stres. Při přeměně glukózy na sorbitol pomocí aldózoreduktázy je kofaktorem NADPH a při změně sorbitolu na fruktózu sorbitoldehydrogenázou je kofaktorem  $\text{NAD}^+$ . Kofaktory NADPH a  $\text{NAD}^+$  mají přímou vazbu na oxidační stres, kofaktor antioxidantních reakcí NADH je spotřebováván při odbourávání glukózy, naopak při zpětné oxidační reakci  $\text{NAD}^+$  vzniká reaktivní forma kyslíku. V tzv. polyolové dráze tak v mitochondriích vznikají ve zvýšené míře vysoce reaktivní formy kyslíku a zároveň se spotřebovávají kofaktory k jejich odbourávání, a tím se snižuje antioxidantní kapacita "scavengerového" systému buňky proti oxidačnímu stresu (Oates P. J., 2008, Škrha J., 2010).

Již samotná zvýšená intracelulární hladina glukózy vede ke snížení aktivity  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázy, jejímž důsledkem je snížená rychlost vedení nervovým vláknem a inhibice regenerace nervu (Obrosova I.G. et al., 2009, Greene D.A. et al., 1992). Současně akumulace

fruktózy a sorbitolu vede ke snížení volné nervové intracelulární signální molekuly – myoinositolu, které prohloubí pokles aktivity  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPázy. Navíc tzv. polyolovou dráhou vyvolané snížení myoinositolu vede rovněž k poklesu aktivity proteinkinázy C. Proteinkináza C patří mezi enzymy aktivující kaskádu řady intracelulárních signálních drah, prostřednictvím kterých dochází k ovlivnění cévní permeability, krevního průtoku i angiogeneze a ke změnám exprese genů pro intracelulární adhezivní molekuly, cytokiny a růstové faktory (Greene D. A. et al., 1992, Chung S. S. M. et al., 2003, Boulton A. J., et al., 2004, Gerald P. et al., 2010).

### **1.3.1.3. Pokročilé produkty glykace (AGE)**

Následkem aktivace tzv. polyolové dráhy je zvýšená tvorba a ukládání produktů AGE (Sugimoto K. 2008, Shih K. C. et al., 2017). Produkty AGE hrají také důležitou roli v patogenezi periferní neuropatie (Aubert C. E. et al., 2014, Ryle C. et al., 1995). Glykace je neenzymatické spojení molekul cukru, včetně glukózy nebo fruktózy, s proteinem nebo lipoproteinem. Výsledkem je vznik produktů AGE se změnou strukturou a funkcí (Babizhayev M. A. et al., 2015). Patologická glykace myelinových proteinů a ukládání produktů AGE v perineurálním kolagenu, Schwannových buňkách a axoplasmě neuronů vede k poškození periferních nervů a degeneraci axonů (Ryle C. et al., 1995, Sugimoto K. et al., 2008). Akumulace AGE v epitelu rohovky a bazální membráně podporuje proapoptotické a antiproliferační lokální signální dráhy a zvyšuje oxidační stres a zánět (Kim J. et al., 2011, Han S. B. et al., 2019 a Shih K. C. et al., 2017).

### **1.3.1.4. Neurotrofické faktory**

Extracelulární přítomnost růstových faktorů je pro buňku nezbytná. Určitá hladina je nutná k trvalé stimulaci buňky. Jejich nízká hladina vede k apoptóze buňky. Naopak zvýšená hladina může stimulovat buněčné dělení (Vinik A. L., et al., 2003, Alberts B. et al., 1998).

Studie u lidí i experimentální studie in vitro či na zvířecích modelech poukazují na růstové faktory hrající roli v patogenezi neuropatie. Snížená syntéza NGF hraje pravděpodobně úlohu při vzniku poruch tenkých nervových vláken (Han S. B. et al., 2019). Wu et al ve své studii prokázal v slzách pacientů s DM 1 a DM 2 významně vyšší hladiny IGFBP3 (inzulin-like growth factor-binding protein 3) ve srovnání s dospělými jedinci bez diabetu IGFBP3 ovlivňuje účinek inzulin-like růstového faktoru IGF-1 (inzulin-like growth factor-1) (Wu Y. C. et al., 2012). Protein IGFBP3 a IGF-1 si vzájemně konkurují při vazbě na buněčný

receptor pro IGF-1. V širším kontextu tak IGFBP3 ovlivňuje inzulínovou rezistenci, apoptózu i oxidační poškození. Nejsou známy procesy ovlivňující sekreci IGFBP3 v rohovkové epiteliální tkáni. V experimentech s imortalizovanými lidskými rohovkovými epiteliálními buňkami bylo zjištěno, že vysoké hladiny glukózy v kultivačním médiu mohou indukovat produkci IGFBP3, což naznačuje, že hyperglykémie u pacientů s DM může být příčinou zvýšené tvorby hladiny IGFBP3 (Wu Y. C. et al., 2012, Shih K. C. et al., 2017).

Ve studiích *in vitro* (Xu K. P. et al., 2009, Zhou Q. et al., 2015) a se zvířecími modely (Kim J. et al., 2011) byly zmapovány časové změny hladiny receptoru epiteliálního růstového faktoru (EGF – Epithelial growth factor), ciliárního neurotrofického faktoru (CNFT – Ciliary neurotrophic factor) a jaderného faktoru kappa B (NFkB – Nuclear factor kappa B) v rohovce. Bylo zjištěno, že zvýšené hladiny EGF a jeho receptoru a CNFT působí protektivně, podporují hojení rohovkového epitelu. Ve studiích sledujících hojení ran rohovky byly zjištěny snížené hladiny EGF a jeho receptoru a CNFT. NFkB, který je důležitým transkripčním faktorem ovlivňujícím zánět a vývoj buněk, byl naopak ve studiích zkoumajících hojení ran zvýšen (Akhtar S. et al., 2009, Bettahi I. et al., 2014, Lan W. et al., 2012, Shih K. C. et al., 2017).

#### **1.3.1.5. Imunitní mechanismy**

Experimentální studie na zvířecím modelu diabetické myši prokázala v rohovce a v okolí nervových vláken rohovky vysokou koncentraci antigen prezentujících buněk, včetně dendritických buněk. Počet dendritických buněk negativně koreloval s denzitou nervových vláken rohovky, což naznačuje možnou roli zánětu při vývoji neuropatie rohovky u DM (Leppin K. et al., 2014, Han S. B. et al., 2019).

### **1.4. Konfokální mikroskop**

Konfokální mikroskop poprvé popsal Goldmann v roce 1940 a později ho v roce 1957 patentoval M. Minsky (Erie J. C. et al., 2009, Jalbert I. et al., 2003). O deset let později M. Petrůň a M. Hadravský z Lékařské fakulty UK v Plzni patentovali konfokální mikroskopii na bázi rotujícího Nipkowova kotouče (Petran M. et al., 1968). S tímto přístrojem (v odborné literatuře je znám pod názvem Tandem Scanning Confocal Microscope) byly poprvé získány kvalitní optické řezy ze silného preparátu, konkrétně z mozkové tkáně.

V současnosti je princip konfokální mikroskopie využíván i pro in vivo zobrazení povrchu oka, zejména rohovky. Metoda umožňuje zobrazit jednotlivé vrstvy rohovky ve frontální rovině. Je neinvazivní a představuje rychlou metodu k zobrazení rohovky v "naturálním" (fyziologickém) stavu, bez artefaktů způsobených zpracováním ex vivo preparátů. Umožňuje in vivo kvantitativně i kvalitativně posoudit strukturu jednotlivých vrstev rohovky včetně počtu buněk, nervových vláken a jejich morfologii. Pro svou neinvazivnost je vhodný také ke sledování změn v čase (Erie J. C. et al., 2009, Jalbert I. et al., 2003, Guthoff R. F. et al. 2009, Alzubaidi R. et al., 2016). V současnosti dochází k rychlému rozvoji této metody, a tím k rozšíření možností jejího využití. V české oftalmologické literatuře publikovala Pirnerová a spol. základní informace o metodě IVCM a možnostech jejího využití, především při diagnostice a následném sledování onemocnění rohovky (Pirnerová L. et al., 2010).

#### **1.4.1. Princip konfokální mikroskopie**

Rozlišovací schopnost klasických optických mikroskopů je interferenčními jevy omezena na cca 0,2  $\mu\text{m}$ , přičemž tato hranice je v praxi obtížně dosažitelná zejména u silnějších preparátů. Nepříznivě se projevuje zvláště vliv parazitního osvětlení. Z nezaostřených rovin se odráží mnohem více světla než z roviny zaostřené. Rušivého zamlžení obrazu světlem z mimo ohniskových rovin se lze do značné míry zbavit pomocí konfokální mikroskopie.

Termín konfokální ("mající stejné ohnisko") označuje optickou soustavu, ve které jsou objektiv i kondenzor zaostřeny na stejný bod. V konfokálním mikroskopu je světlo bodového zdroje zaostřeno na vybraný bod do roviny preparátu. Světlo odražené, nebo jím prošlé, je zaostřeno na bodovou clonu, která zachytí světlo přicházející z okolí, a to jak ze stran, tak z míst nad i pod ohniskovou rovinou. Tato clona tedy působí jako prostorový filtr. Světlo, které nenes informace ze zvoleného bodu preparátu je z tvorby výsledného obrazu vyloučeno. Intenzita světla v obrazové rovině velmi rychle klesá s rostoucí vzdáleností od pozorovaného bodu, proto má zobrazovací soustava velmi malou hloubku ostrosti, ale vysokou rozlišovací schopnost (Krachmer J. et al., 2011, Lovblom L. E. et al., 2015).

#### **1.4.2. In vivo konfokální mikroskopie rohovky**

V roce 1985 Lemp a spolupracovníci publikovali první konfokální skeny rohovky v celé její tloušťce (Lemp M. A. et al., 1985). Jak již bylo zmíněno výše, má konfokální soustava v porovnání s konvenčními mikroskopy redukovanou hloubku ostrosti s nejen kvalitnějším

axiálním, ale zároveň i laterálním rozlišením. Klinické rohovkové konfokální mikroskopy mají typicky hloubku ostrosti od 4 do 26  $\mu\text{m}$ , dle typu mikroskopu, a laterální rozlišení 1-2  $\mu\text{m}$ . Zároveň je takto uspořádaný systém limitovaný velmi malým zorným polem. Větší zorné pole je získáno pomocí postupného snímání "bod po bodu". To může být teoreticky zajištěno buď pohybem vzorku před stacionárním mikroskopem, či pohybem mikroskopu nad stacionárním vzorkem nebo rozmítáním (rozpohybováním) paprsku. Moderní in vivo konfokální mikroskopy používají druhou nebo třetí možnost. Protože však při snímání živých objektů nemůžeme zcela vyloučit mimovolní pohyby (dýchání, oční pohyby), je laterální rozlišení limitováno rychlostí snímání jednotlivých obrazů (snímků). Signál produkovaný odraženým světlem in vivo konfokálního mikroskopu je typicky dále detekován elektronickým zařízením typu „CCD kamery“, které jsou běžně používané v digitálních kamerách a fotoaparátech. Skeny jsou zachyceny s rychlostí nejméně 25 snímků za sekundu (Jalbert I. et al., 2003, Patel D. V. et al., 2007, Kaufman S. C. et al., 2006).

V současnosti se v odborné literatuře můžeme potkat s třemi typy in vivo rohovkových konfokálních mikroskopů.

#### **1.4.2.1. Tandem scanning konfokální mikroskop**

Tandem scanning konfokální mikroskop pracuje na bázi rotujícího Nipkowova kotouče. Je tak získán sken s relativně nízkým kontrastem, což může omezovat zobrazení malých struktur (pod 5  $\mu\text{m}$ ) (Erie J. C. et al., 2009, Patel D. V. et al., 2007, Kaufman S. C. et al., 2006). Komerčně je již nedostupný.

#### **1.4.2.2. Slit scanning konfokální mikroskop**

Slit scanning konfokální mikroskop (SSCM) používá pro osvětlení i pozorování aperturu ve formě úzké vertikální štěrbin. Rychle oscilující dvoustranné zrcadlo snímá postupně konfokální obrázky z osvětlovací a zobrazující štěrbin. Štěrbínovitá apertura (300  $\mu\text{m}$  v případě typu Confoscan 4, NIDEK Technologies) umožňuje větší množství pronikajícího světla než v případě Tandem scanning konfokálního mikroskopu, což zvyšuje jas a kontrast pozorovaného pole. Díky tomu se pozorované struktury zobrazují jasněji, ostřeji a s více detaily. Zvýšeného jasu a kontrastu u SSCM je částečně dosaženo na úkor zvýšené hloubky ostrosti, která je v případě Confoscan 3 a Confoscan 4 přibližně 26  $\mu\text{m}$ . Rovněž použití štěrbin znamená, že mikroskop je skutečně konfokální jen v ose kolmé na výšku štěrbin. Během jednoho snímání lze získat až 350 snímků. Krok posunu mezi skeny lze nastavit

od 1  $\mu\text{m}$ . Při nastaveném kroku 5  $\mu\text{m}$  tak v jednom cyklu nasnímáme rohovku v celé její tloušťce dvakrát (Erie J. C. et al., 2009, Patel D. V. et al., 2007, Masters B. R. et al., 2001).

#### **1.4.2.3. Laserový skenovací konfokální mikroskop**

Příkladem laserového skenovacího konfokálního mikroskopu (LSCM) je Heidelberg Retina Tomograph Rostock Corneal Module (HRT II nebo HRT III), který používá koherentní červené světlo o vlnové délce 670 nm z helium-neonového laserového zdroje. Jde o laser třídy 1, který dle definice nepředstavuje žádné nebezpečí pro oko. Laserový paprsek je promítán postupně nad každým bodem vyšetřované oblasti. Pro nasnímání obrázku musí být laserový paprsek vychýlený ve dvou na sebe kolmých směrech. Toho je dosaženo dvěma snímacími zrcadly: rezonanční skener snímá paprsek horizontálně a galvanometrický skener snímá tuto linii vertikálně, a vytváří tak obraz zorného pole. Snímání odraženého světla je zajištěno stejnými dvěma zrcadly. Odražené světlo je vychýleno na detektor (diodu), následně je signál digitalizován a vytvořen obraz. Laterální rozlišení tohoto mikroskopu je dle údajů výrobce 1  $\mu\text{m}$  a hloubka ostroti 4  $\mu\text{m}$ . V manuálním modu lze získat optické řezy celou tloušťkou rohovky, pomocí automatického modu však jen řezy v rozmezí 80  $\mu\text{m}$  tloušťky (Erie J. C. et al., 2009, Petroll W. M. et al., 2015).

#### **1.4.3. Skeny z konfokálního mikroskopu**

Kvalita snímků obecně závisí na dvou hlavních faktorech: kontrastu a rozlišení. Rozlišení závisí na numerické apertuře objektivu, reflektivitě pozorovaných struktur a vlnové délce osvětlujícího světla.

Všemi zmíněnými typy přístrojů lze získat skeny na úrovni mikrostruktury rohovky. Zřetelné jsou morfologické změny ve struktuře buněk epitelu a endotelu, jádra keratocytů, v některých případech i těla keratocytů a jejich výběžky, nervová vlákna i cizorodé elementy, například lze pozorovat vlákna plísni i jiné mikroorganismy. Další výhodou je možnost kvantitativního hodnocení zobrazených struktur za normálních okolností i v případech patologií nebo po chirurgických zákrocích na rohovce. Kvalita zachycených struktur se však může významně lišit v závislosti na typu použitého přístroje a také na zkušenosti vyšetřujícího (Patel D. V. et al., 2007, Masters B. R. et al., 2001, Erie E. A. et al., 2008).

Všechny zmíněné rohovkové konfokální mikroskopy vyžadují při vyšetření určitý typ kontaktu s rohovkovou. V případě Tandem scanning konfokálního mikroskopu a SSCM optický kontakt zprostředkovává viskózní gel nanášený na objektiv přístroje. V případě



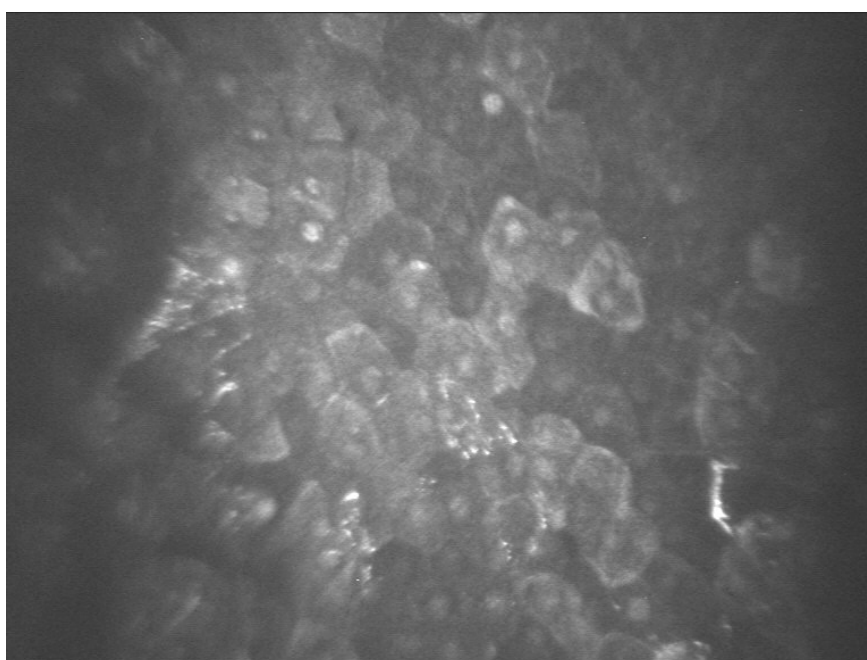
LSCM se používá speciální násadka (kryt) na objektiv, která během vyšetření rohovku oplošťuje. Ve všech případech získáme obrázky jednotlivých vrstev rohovky ve frontální rovině. Skeny pořízené LSCM mají vyšší kontrast než z SSCM a Tandem scanning konfokálního mikroskopu. Kromě toho v případě SSCM dále kontrast klesá směrem k periférii snímků. Je rovněž nutné si uvědomit, že velikost objektů na získaných snímcích lze přímo porovnávat jen na snímcích získaných ze stejného typu mikroskopu a při užití stejné intenzity osvětlení (Erie J. C. et al., 2009, Szaflik J. P. et al., 2007).

#### **1.4.4. Obraz jednotlivých vrstev rohovky při vyšetření rohovkovým konfokálním mikroskopem**

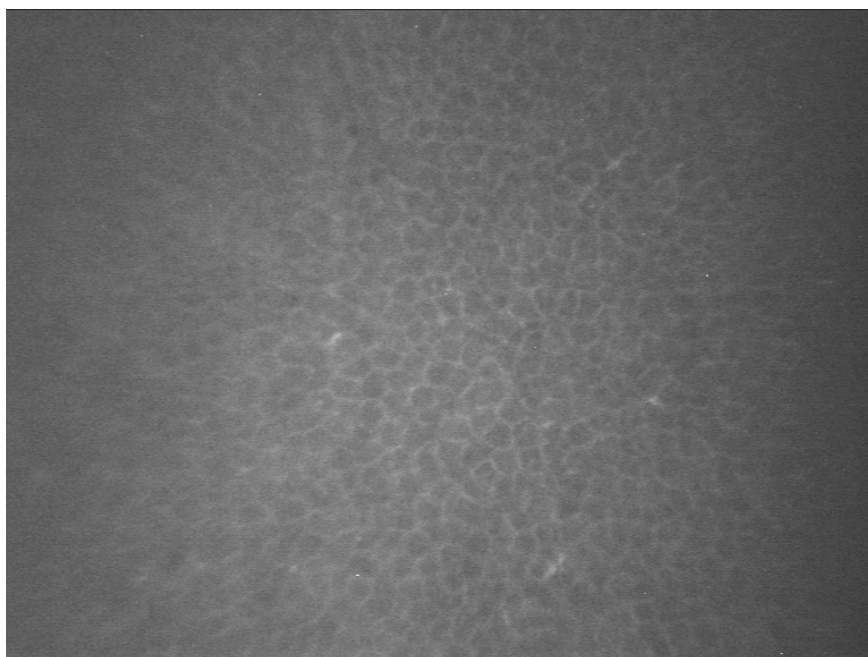
Anatomii lidské rohovky a její inervaci se věnovala celá řada studií pomocí světelné a elektronové mikroskopie a v posledních letech také pomocí konfokální mikroskopie rohovky (Al-Aqaba M. A. et al., 2009 et 2010, Marfurt C. F. et al., 2019).

Konfokální mikroskopie rohovky umožňuje zobrazit jednotlivé vrstvy rohovky *in vivo*. Ve skenu rohovkového epitelu můžeme zobrazit postupně vrstvy 3 typů buněk: ploché povrchové buňky (Obr. 4), intermediální kubické buňky a vrstvu cylindrických buněk bazálního epitelu (Obr. 5). Normální hodnoty buněčné denzity a velikosti buněk v jednotlivých vrstvách epitelu se výrazně liší.

**Obr. 4 Povrchové buňky epitelu**



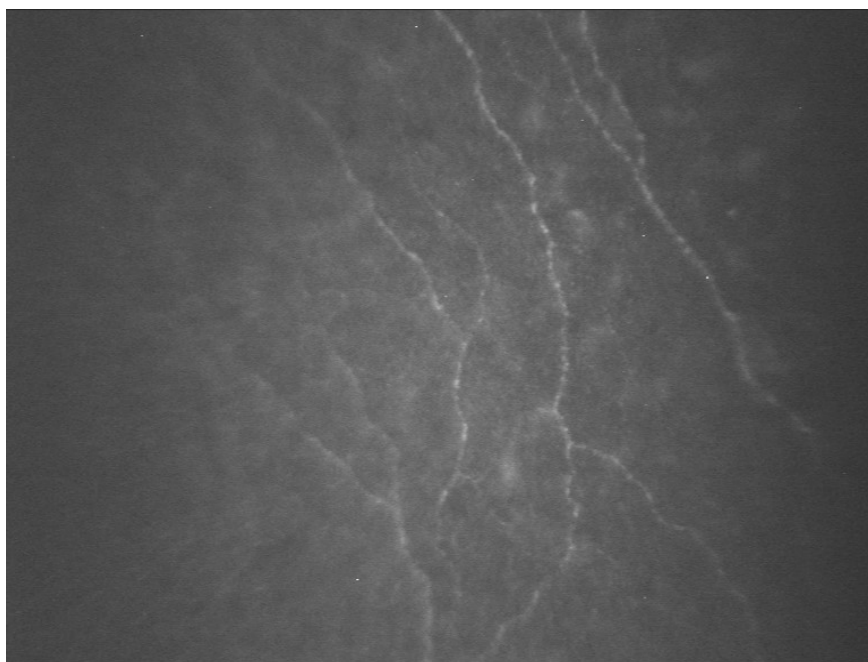
### Obr. 5 Bazální buňky epitelu



Obvykle není možné zobrazit detaily acelulárních struktur bazální membrány epitelu a Bowmanovy membrány. U zdravých rohovek je však dobře rozeznatelný subbazální nervový plexus (Obr. 6), který je lokalizovaný mezi vrstvou bazálních epitelových buněk a předními vrstvami Bowmanovy membrány, a subepitelový plexus lokalizovaný pod Bowmanovou membránou. Subbazální nervový plexus je pomocí IVCM velmi dobře zachytitelný a hodnotitelný pro svůj paralelní průběh k povrchu rohovky, protože je snímán právě ve frontální rovině (Oliveira-Soto L. et Efron N., 2001, Chiou A. G. Y. et al., 2006, Jalbert I. et al., 2003).

Ve skenu stromatu rohovky můžeme rozlišit složku buněčnou, nebuněčnou a neurosenzoricou. V obrazu konfokálního mikroskopu typicky nacházíme nepravidelná reflektivní oválná tělíčka, která představují jádra keratocytů, jež jsou obklopena téměř transparentní (tmavě šedou nebo černou) acelulární matrix. V nepřítomnosti patologických procesů ve stromatu se tak složky extracelulární matrix a kolagenní lamely nezobrazují vzhledem k jejich takřka dokonalé průhlednosti. Průměrná denzita keratocytů je nejvyšší v předním stromatu (Obr. 7) a klesá směrem k vrstvám středního stromatu a následně opět mírně stoupá v zadním stromatu (Obr. 8) (Alzubaidi R. et al., 2016).

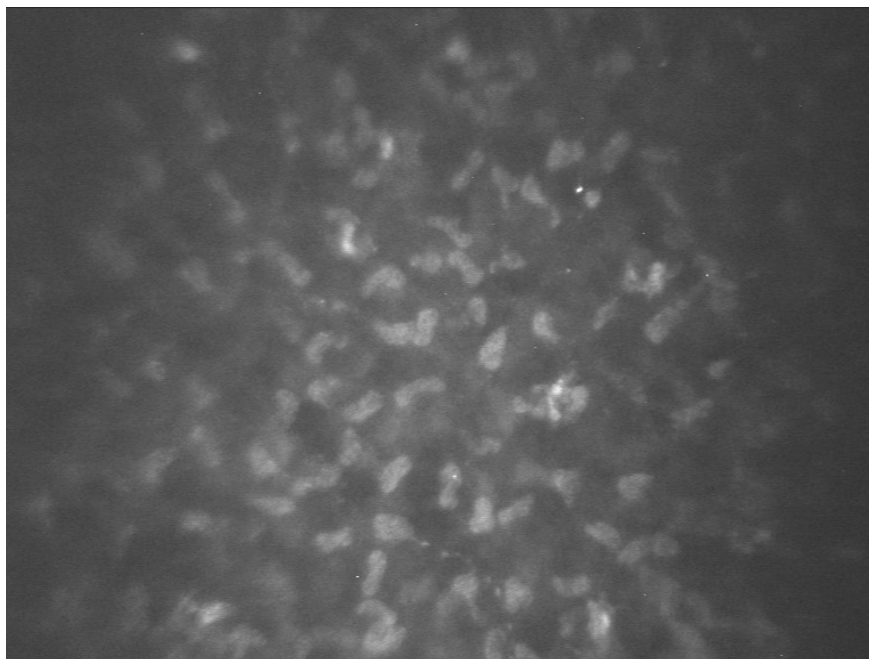
**Obr. 6 Subbazální nervový plexus**



Dále se ve stromatu, především v jeho povrchových vrstvách, zobrazují nervová vlákna náležející k hlubokému stromálnímu plexu. Nervová vlákna jsou zde tři až pětkrát silnější než vlákna subbazálního a subepiteliálního plexu a často zastihneme i typická větvení ve tvaru ypsilon (Obr. 9). Pomocí IVCM byly stromální nervy zkoumány méně intenzivně než nervová vlákna subbazálního plexu. Výsledky studií, které se zaměřily na kvantifikaci stromálních nervů, nebyly jednoznačné vzhledem k jejich řídkému výskytu a pro skenování nepříznivému šikmému průběhu rohovkou (Oliveira-Soto L. et Efron N., 2001, Hoşal B. M. et al., 2005, Chiou A. G. Y. et al., 2006, Jalbert I. et al., 2003). Nervová vlákna se obvykle nenacházejí v zadních vrstvách stromatu. Descemetova membrána není u zdravých rohovek, podobně jako Bowmanova membrána, v konfokálním mikroskopu zobrazitelná. Jsou však zobrazitelné její patologické změny při některých onemocněních rohovky, jako je zadní rohovková dystrofie (Cruzat A., et al., 2017) nebo změny u primárního vrozeného glaukomu (Mahelková G., et al., 2013).

Nejvnitřnější vrstvu představuje jednovrstevný endotel. Zobrazuje se jako vrstva hexagonálních nebo polygonálních pravidelně uspořádaných buněk (Obr. 10). Descemetova membrána a endotel nemá u člověka nervové zásobení (Erie J. C. et al., 2009, Jalbert I. et al., 2003, Guthoff R. F. et al. 2009, Mastropasqua L. et al., 2002, Chiou A. G. et al., 2006).

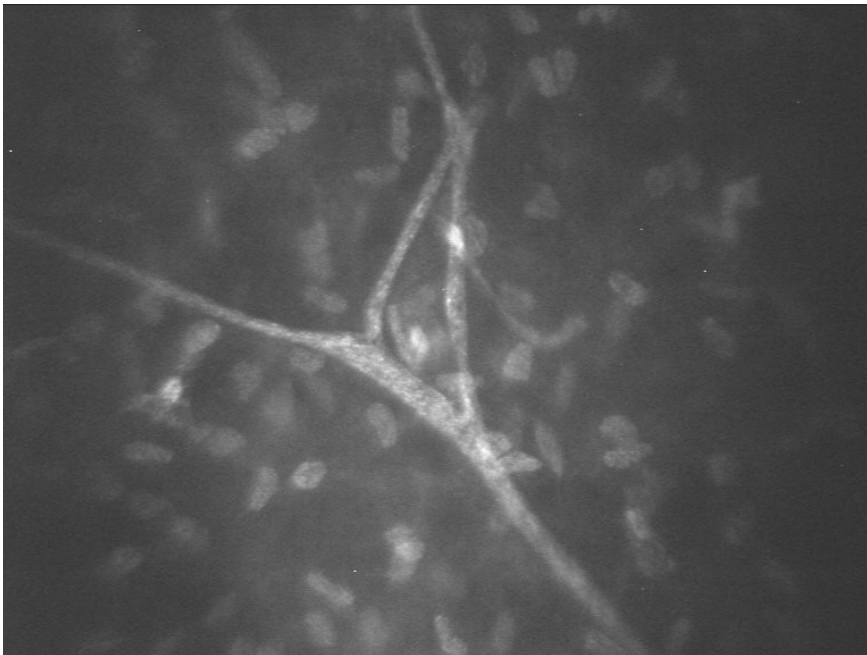
**Obr. 7 Buňky předního stromatu**



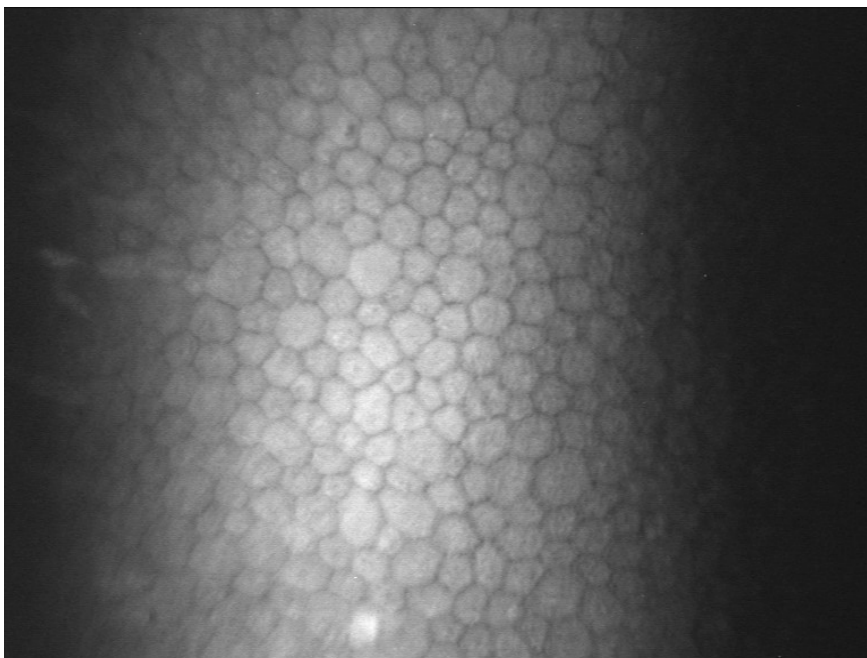
**Obr. 8 Buňky zadního stromatu**



**Obr. 9 Nervová vlákna stromatu s typickým větvením ve tvaru ypsilon**



**Obr. 10 Endotel**



#### 1.4.5. Porovnání nálezů získaných pomocí různých typů přístrojů

Při srovnání přístrojů pracujících na principu bílého světla i laseru nebyly nalezeny zásadní rozdíly při zobrazení struktur zdravé a patologické rohovky. Zdá se, že pro studium změn buněk epitelu je možné získat lepší zobrazení pomocí LSCM, naopak pro studium změn endotelu se jeví jako výhodnější použití SSCM (Confoscan 3, NIDEK Technology). Při vyšetření pomocí LSCM dochází k přímému kontaktu přístroje (objektivu, respektive jeho krytu) s rohovkou, a to může vést ke vzniku některých artefaktů. Typicky jsou při vyšetření LSCM často pozorovatelná nařazení v oblasti Descemetovy membrány, která mohou imitovat nálezy např. u keratokonu nebo pooperačně v oblasti terče po keratoplastice. Signifikantní rozdíly byly rovněž nalezeny při hodnocení denzity endotelových buněk pomocí obou systémů. Počty endotelových buněk při hodnocení pomocí LSCM jsou signifikantně vyšší než výsledky získané pomocí Confoscan 3 a spekulárním mikroskopem (SP1000, Topcon) (Patel D. V. et al., 2007, Erie E. A. 2008).

Velká pozornost je v poslední době věnována také změnám subbazálního nervového plexu u různých systémových onemocnění, jako je diabetes mellitus (Papanas N. et Ziegler D., 2015, Tavakoli M. et al., 2013, Misra S. L. et al., 2015, Jiang M. S. et al., 2016), revmatologická onemocnění (Alhatem A. et al. 2012) a neurologická onemocnění (m. Parkinson, amyotrofická laterální skleróza, idiopatická polyneuropatie tenkých vláken (Wang E. F. et al., 2015, Patel D. V. et McGhee C. N., 2009).

Pro zobrazení nervových vláken byl využíván především přístroj SSCM a LSCM. Mezi hodnocené parametry obvykle patří celkový počet (hlavních) nervových vláken, celková délka nervových vláken, počet větvení a tortuozita nervových vláken (Tavakoli M. et al., 2015). Absolutní hodnoty převedené na mm<sup>2</sup> se mohou lišit dle použitého přístroje. Jako vysoce vypovídající parametr byla vyhodnocena délka a počet nervových vláken (Papanas N. et Ziegler D., 2015, Petropoulos I. N. et al., 2013). Obecně bývá hodnota celkové délky vláken ve studiích prováděných na přístrojích typu SSCM nebo Tandem scanning IVCM nižší než při použití LSCM, celkový počet vláken bývá naopak vyšší (Patel D.V. et al., 2009). Potenciálně zajímavý, ale dosud s nedořešeným systémem hodnocení, je parametr tortuozity (Edwards K. et al., 2014, Lagali N. et al., 2015).

V současnosti se dále rozšiřuje především využití LSCM systému, který má vyšší rozlišení a dovoluje lepší zobrazení rohovkového epitelu a předního stromatu, včetně nervového plexu. Nejnovější přístroje již obsahují i automatický software k hodnocení snímků a např. možnost rekonstrukce prostorových 3D obrazů (Papanas N. et Ziegler D., 2015, Prakasam R. K. et al.,

2013). Při hodnocení výsledků různých studií je třeba mít na paměti, že nelze přímo srovnávat výsledky získané při vyšetření na různých typech rohovkových konfokálních mikroskopů (Erie E. A. et al., 2008, Szaflik J. P. et al., 2007). Dalším faktorem ovlivňující hodnoty sledovaných parametrů je kvalita získaného obrazu. Kvantifikace parametrů rohovkových nervových vláken závisí na kvalitě obrazu a skeny s nižší kvalitou jsou spojeny s nižšími hodnotami jejich parametrů (Sturm D. et al., 2019).

#### **1.4.6. Současná úskalí a omezení IVCM při hodnocení nervových vláken**

Při sledování nervových vláken rohovky jsou běžně využívány skeny z centrální oblasti rohovky. Nejvyšší počet nervových vláken rohovky je ve skutečnosti inferonasálně od centra rohovky. Pokles celkové délky nervových vláken (NFL) v oblasti inferonasálního přeslenu byl však u pacientů s periferní DN srovnatelný s poklesem NFL v centrální oblasti rohovky (Petropoulos I. N. et al., 2015). Přestože v oblasti přeslenu byl sken více specifický pro periferní DN (Pritchard L. et al., 2015, Utsunomiya T. et al., 2015), snímání centrální části rohovky nepřineslo snížení specifity a sensitivity IVCM jako diagnostického testu DN (Petropoulos I. N. et al., 2015).

Někteří autoři upozorňují na možná omezení hodnocení relativně krátkých nervů avaskulární rohovky k analogické predikci poškození dlouhých somatických nervů u DN (Malik R. A. et al., 1989). Bylo však prokázáno, že změny subbazální nervové pleteně rohovky velmi dobře korelují s poklesem počtu intraepidermálních nervových vláken hodnocených z bioptických vzorků kůže (Quattrini C. et al., 2007) a s měřením funkčních změn nervových vláken při DN (Sivaskandarajah G. A. et al., 2013).

Na zvířecích modelech s DN byla prokázána závislost změn nervových vláken rohovky na průtoku krve v arteriálním řečišti oka. Při poklesu krevního průtokův zadní ciliární arterii byl zaznamenán současný pokles počtu nervových vláken zjištěných pomocí IVCM. Následné zlepšení krevního průtoku po podání inhibitoru vazopeptidázy vedoucí k vazodilataci vedlo k obnově nervové pleteně rohovky (Davidson E. P. et al., 2012).

Hodnocení změn nervových vláken rohovky může dále komplikovat prokázaný fyziologický pokles počtu a délky nervových vláken s věkem a nelze vyloučit vliv pohlaví. Proto je snaha vytvořit normativní databázi, která by tyto změny hodnot zohledňovala (Kovalová I. et al., 2017, Tavakoli M. et al., 2015). Nadále panuje nejistota ohledně rasových rozdílů. Dalším úskalím je samotné hodnocení snímků vyžadující zkušenost a také časová náročnost ručního hodnocení obrazu. V současnosti je proto velká pozornost věnována vývoji

automatické a semiautomatické analýzy obrazu pro rychlou kvantifikaci rohovkových změn (Patel W. M. 2013, Petroll W. M. et al., 2013, Sturm D. et al., 2019), která by vykazovala vysokou korelaci s ručním hodnocením, zejména počtu a délky nervových vláken (Dabbah M. A. et al., 2011, Ostrovski I. et al., 2015, Petropoulos I. N. et al., 2014, Li Q. et al., 2019). Plně automatizovaná metoda ve srovnání s manuálním hodnocením mírně podhodnocuje sledované parametry nervových vláken rohovky (Li Q. et al., 2019). Standardizace analýzy obrazu IVCM prostřednictvím centralizovaných čtecích center by mohla mít zásadní význam v budoucnosti (Patel D. V. et al., 2013).

### **1.5. Diabetická neuropatie**

Diabetes mellitus postihuje několik orgánových systémů závažnými mikroangiopatickými a makroangiopatickými komplikacemi. Mikroangiopatické komplikace probíhají pod obrazem diabetické nefropatie, retinopatie a neuropatie. Neuropatie patří mezi nejčastější pozdní komplikace DM, postihující více než 50-90 % pacientů s DM (Bovlton A. J. et al., 2004, Vinik A. I. et al., 2003, Petropoulos I. N., 2018).

Snaha odhalit tyto komplikace včas a zamezit jejich další progresi vede k neustálému hledání nových vhodných screeningových metod, které by byly schopné odhalit tyto komplikace v jejich nejranějším stadiu. Proto je také věnována značná pozornost možnému vztahu mezi úbytkem nervových vláken rohovky a přesnější klasifikací DN. Mezi nejčastější DN patří neuropatie senzomotorická (Dyck P. J. et al., 1993 a 2010, Zochodne D. W., 2007, Petropoulos I. N., 2018).

Současné metody zjišťování periferní neuropatie zahrnují odebrání anamnézy a klinické vyšetření periferní citlivosti, elektrofyziologické vyšetření, invazivní biopsii nervových vláken kůže, ev. včetně genetického vyšetření (Hosseini S. M. et al., 2015, Petropoulos I. N. et al., 2014 a 2018, Tavakoli M. et al., 2013, Wang B. E. F. et al., 2015). V časném stádiu DN mají běžně používané diagnostické metody omezenou citlivost (Asghar O. et al., 2014, Misra S. L. et al., 2015, Quattrini C. et al., 2007). Potencionálně objektivní, citlivější a přesnější bioptické metody nejsou zase běžně použitelné pro svou invazivitu. Naproti tomu IVCM poskytuje optické řezy rohovkou rychle a neinvazivně. Následně umožňuje kvantitativní analýzu nervových vláken rohovky (Hertz P. et al., 2011, Tavakoli M. et al., 2013).



Již v roce 1977 byla popsána souvislost mezi neurotrofními vředy rohovky a DM (Hyndiuk R.A. et al. 1977). Následně bylo ex vivo prokázáno snížení denzity nervů rohovky u experimentálně navozeného diabetu krys (Yamada J. et al., 2003). V roce 2000 popsal Rosenberg a kol. souvislost změn subbazálního nervového plexu rohovky a snížení citlivosti rohovky s použitím bezkontaktní esteziometrie u pacientů s DN (Rosenberg M. E. et al., 2000). Od té doby další studie ukázaly na možnost přesněji kvantifikovat změny subbazálního nervového plexu rohovky (Kovalová I. et al., 2017, Malik R. A. et al., 2003, Messmer E. M. et al. 2010, Midena E. et al., 2006, Rosenberg M. E. et al., 2000, Stachs O. et al., 2007, Tavakoli et al., 2012, Tavakoli et al., 2010). Ve studiích bylo zjištěno, že pacienti s DM vykazují výrazné snížení denzity nervů subbazálních plexu rohovky ve srovnání se zdravými subjekty (Patel D. V. et McGhee C. N., 2013, Tavakoli M. et al., 2013, Wang B. E. F. et al., 2015). Pokles denzity subbazálních nervů je spojen s příznaky periferní neuropatie a se snížením počtu intraepidermálních nervů (Quattrini C. et al., 2007, Tavakoli M. et al., 2010). Denzita nervových vláken rohovky koreluje s klinicky a elektrofyziologicky zhodnoceným stupněm DN (Petropoulos I. N. et al., 2015, Quattrini C. et al., 2007, Tavakoli M. et al., 2010). In vivo konfokální mikroskopie prokázala a kvantifikovala časné poškození malých nervových vláken (Hossain P. et al., 2005, Malik R. A. et al., 2003, Tavakoli M. et al., 2010) s dobrou senzitivitou a specifitou (Tavakoli M. et al., 2010). Detekována byla již mírná neuropatie (Edwards K. et al., 2012). Zejména délka nervových vláken rohovky má vysokou sensitivitu (91 %) a specifitu (93 %) při identifikaci diabetické senzomotorické polyneuropatie (Ahmed A et al., 2012, Hertz P. et al., 2011). Ve studiích bylo ověřeno, že změny subbazálního nervového plexu rohovky předcházejí jiným klinickým či elektrofyziologickým projevům DN (Hossain P. et al., 2005, Lovblom L. E. et al., 2015, Misra S. L. et al., 2015, Pritchard N. et al., 2015). Až 50 % pacientů s DM, kteří neměli žádné klinické příznaky DN, již mělo abnormální změny subbazálního nervového plexu. Byly prokázány snížené hodnoty celkové délky nervových vláken nejen u jedinců se zvýšenou hodnotou glykovaného hemoglobinu (HbA1c), ale již s poruchou glukozové tolerance. Časný nástup degenerace nervových vláken rohovky diagnostikovaný při poruše glukozové tolerance a novém záchytu DM typu 2 (DM 2) (Asghar O., et al., 2014, Azmi S. et al. 2015, Ziegler D. et al., 2014) podporují hypotézu, že patofyziologie diabetické neuropatie začíná velmi časně po nástupu onemocnění (Asghar O., et al., 2014, Azmi S. et al. 2015, Bitirgen G. et al., 2014, Papanas N. et al., 2011, Petropoulos I. N. et al., 2014, Quattrini C. et al., 2007). Ve dvou longitudinálních studiích bylo potvrzeno, že pokles délky nervových vláken rohovky předchází nástupu klinických projevů DN u subjektů s DM 1. Diabetická polyneuropatie

(nebo senzomotorická neuropatie) se u těchto subjektů projevila do 3,5-4 let od počátku onemocnění (Lovblom L. E. et al., 2015, Pritchard N. et al., 2015). Longitudinální studie Dehghani a kol. byla zaměřená na rizikové faktory u subjektů se změnami subbazálního nervové plexu bez přítomnosti DN. Po čtyřech letech sledování prokázala úbytek vláken subbazálního nervového plexu v závislosti na klinických a metabolických faktorech, jako je věk, hladina glykovaného hemoglobinu a porucha lipidového metabolismu (Dehghani C. et al., 2016). Změny nervové pleteně byly popsány rovněž u dětí s DM 1 (Sellers E. A. et al. 2013).

Tavakoli a kol. (Tavakoli M. et al., 2015) prokázal pokles počtu, délky i větvení nervových vláken pomocí IVCM rovněž u skupiny s prokázanou diabetickou autonomní neuropatií ve srovnání s DM bez autonomní DN a s kontrolní skupinou zdravých subjektů. Změny korelovaly se stupněm autonomní DN s vysokou sensitivitou a specifitou. Metoda IVCM by se tak mohla stát také neinvazivním markerem autonomní DN. Tyto výsledky je však třeba ještě ověřit (Maddaloni E. et al., 2015, Misra S. L. et al., 2015).

Pomocí IVCM byla dále prokázána regenerace nervových vláken rohovky u pacientů s DM 1 po transplantaci slinivky břišní, kombinované transplantaci ledvin a slinivky břišní (Mehra S. et al., 2007, Navarro X. et al., 1997, Tavakoli M. et al., 2013), po převedení na kontinuální subkutánní infuzi inzulínu (Azmi S. et al., 2015) a po zlepšení základních rizikových faktorů vedoucích k DN (především hodnoty glykovaného hemoglobinu, cholesterolu a krevního tlaku) (Tavakoli M. et al., 2011).

## **1.6. Glykemická variabilita**

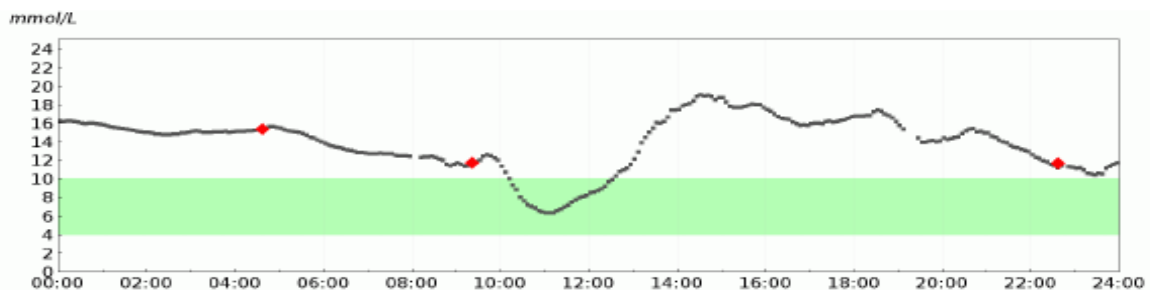
Dobrá glykemická kontrola je zásadní pro prevenci chronických komplikací DM, včetně neuropatie. Nicméně pacienti s DM s podobnou průměrnou hladinou glukózy nebo hladinou HbA1c často vykazují rozdíly jak z hlediska počtu, tak stupně exkurzí/výkyvů glukózy (degree of glucose excursions) (Jung H. S. et al., 2015). Tento fenomén, nazývaný glykemická variabilita (GV), může být zodpovědný za rozdílný stupeň mikrovaskulárních změn mezi pacienty s DM se stejnými průměrnými hodnotami HbA1c. Navíc nové výsledky naznačují, že tento proces je složitější. Může zahrnovat řadu molekulárních změn a abnormalit inzulínové signalizace doprovázející neurodegeneraci (Zochodne D. W., 2015). V současné době diabetologové mají vynikající nástroj, kontinuální monitorování glukózy (CGM), ke kvantifikaci a pečlivé monitoraci GV. Systémy CGM mohou být provozovány ve slepém nebo otevřeném režimu (RT-CGM), což umožňuje pacientovi okamžitě reagovat.

Systém CGM se skládá z malého glukózového senzoru umístěného v subkutánní tkáni s připojeným vysílačem (transmitter). V případě RT-CGM režimu mají pacienti přijímač u sebe. Může se jednat o speciální zařízení, jako je například inzulinová pumpa nebo i chytrý mobilní telefon. Systémy CGM registrují glykémii (tj. koncentraci glukózy v intersticiální tkáni) v 5minutových intervalech (Obr. 11). To poskytuje 288 hodnot za den pro analýzu dat. Z těchto hodnot lze vypočítat různé parametry odrážející GV. Standardní odchylka glykémie (SD) je užitečný, běžně používaný parametr, který je snadno vypočitatelný (Inchiostro S. et al., 2013). Tento parametr samozřejmě můžeme vypočítat i ze standardních glykemických profilů měřených pomocí osobních glukometrů (Inchiostro S. et al., 2013, Klonoff D. C. et al., 2017).

### Obr. 11 Ukázka RT-CGM záznamu

*Zelený pruh vyznačuje cílové pásmo hodnot koncentrace glukózy. Červené body ukazují měření glukometrem, které pacient použil pro ověření hodnoty ze senzoru či pro kalibraci přístroje. Pokud by se ale pacient měřil pouze glukometrem v této obvyklé frekvenci tj. 3-4 měření za den, nevěděl by o výrazném vzestupu glykémie po obědě, který byl způsoben podhodnocením dávky inzulinu k obědu. Informace z RT-CGM umožňuje pacientovi jednak okamžitou reakci, ale i možnost se poučit z konkrétní situace do budoucna a zlepšit tak kompenzaci diabetu.*

*Pozn.- Doba životnosti glukózového senzoru je cca týden (liší se dle typu senzoru).*



## 1.7. Léčba pacientů s DM 1

Na základě výsledků studie DCCT (Diabetes Control Complication Trial) je jedinou alternativou pro pacienty s diabetem 1. typu po skončení postiniciální remise intenzifikovaný inzulinový režim (IIR). Ten může být realizován buď jako MDI režim, tj. Multiple Daily Injections (režim vícečetných injekcí), kdy si pacienti aplikují denně 1-2 dávky bazálního (dlouhodobě působícího) inzulinu a zvláště pak aplikují tzv. prandiální inzulin k pokrytí vzestupu glykémie po jídle (to znamená další 3 injekce krátkodobě působícího inzulinu). Druhou alternativou IIR je léčba inzulinovou pumpou (Obr. 12), kdy v zásobníku pumpy je

obsažen rychle působící inzulin a přístroj dává tzv. bazální dávku dle přednastaveného programu a pacient stiskem tlačítek vydává dávku inzulínu k jídlu. Existují dnes i inzulínové pumpy propojené se CGM a letos se na český trh dostává zařízení, které díky propojení se CGM a díky speciálnímu algoritmu je schopné dávkovat automaticky bazální dávku podle hodnot ze CGM. To představuje zásadní krok k „umělé beta buňce“.

### **Obr. 12 Inzulínová pumpa**

*Pozn. - Kanyla je zavedena do podkoží a je ji nutné měnit každé 2-3 dny*



## 2. Hypotéza

Diabetes mellitus poškozuje nervová vlákna subbazálního nervového plexu rohovky a ovlivňuje denzitu epiteliálních, endoteliálních a stromálních buněk. Změny v rohovce u pacientů s DM 1 jsou závislé na stupni DR, věku v době diagnózy, době trvání DM 1 a na parametrech kompenzace.

## 3. Cíle práce

Cílem naší prospektivní studie bylo:

1. Zhodnotit rozdíly v denzitě epiteliálních, stromálních a endotelových buněk mezi skupinou pacientů s DM 1 a skupinou zdravých jedinců.
2. Zhodnotit stav nervových vláken subbazálního nervového plexu rohovky a stanovit možnou souvislost mezi změnami v rohovce a stupněm DR.
3. Zhodnotit možnou souvislost mezi změnami v rohovce a dobou trvání DM 1, věkem v době diagnózy DM 1 a kompenzací diabetu (HbA1c).
4. Zhodnotit závislost parametrů kompenzace diabetu (tj. HbA1c, glykemickou variabilitou vyjádřenou jako standardní odchylka glykémie a dávkou inzulínu na kilogram) a stavem subbazálního nervového plexu rohovky u pacientů s DM 1 léčených v intenzifikovaném inzulínovém režimu.

## 4. Materiál a metodika

### 4.1. Obecné postupy

Do jednotlivých ramen prospektivní studie byli zařazeni dospělí pacienti s diabetem mellitem 1. typu Oční kliniky dětí a dospělých 2. LF UK a FN Motol nebo Interní kliniky 2. LF UK a FN Motol. Kontrolní skupinu tvořili zdraví dobrovolníci a personál nemocnice. Všichni účastníci studie podepsali informovaný souhlas s vyšetřením pomocí konfokální mikroskopie rohovky/ souhlasy s vyšetřením pomocí konfokální mikroskopie rohovky a s celkovým vyšetřením ve studii zaměřené na glykemickou variabilitu, schváleno Etickou komisí Fakultní nemocnice v Praze Motole (Příloha 11.2.). Studijní protokol splňoval zásady Helsinské deklarace pro výzkum zahrnující lidské účastníky.

V rámci očního vyšetření, po odebrání celkové a oční anamnézy, bylo provedeno biomikroskopické vyšetření očí a vyšetření pomocí IVCM. Údaje o celkovém stavu a kompenzaci subjektů byly získány ze zdravotní dokumentace. V jednom z ramen studie byli zařazeni pacienti s DM 1 léčení v IIR, mezi který patří i kontinuální subkutánní inzulínová infuze (CSII), neboli inzulínová pumpa. Zpracování údajů o celkové kompenzaci proběhlo ve spolupráci s Interní klinikou 2. LF UK a FN Motol. Podrobné charakteristiky souborů jsou uvedeny v tabulkách (Tab. 1, 3 a 7).

Vylučující kritéria zahrnovala anamnézu nitrooční operace, refrakční laserové operace nebo úrazu oka a chronické oční topické léčby, dále nositele kontaktních čoček nebo pacienty s jiným systémovým onemocněním, které by mohlo nepříznivě ovlivnit tkáň povrchu oka. Dále bylo u všech subjektů provedeno vyšetření rohovky pomocí in vivo konfokálního rohovkového mikroskopu.

### 4.2. Vyhodnocení stavu sítnice

Pacienti s DM 1 byli dle Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) rozděleni do tří skupin dle stupně diabetické retinopatie (Wilkinson C. P. et al., 2003, Kalvodova B. et al., 2012). První skupinu tvořili pacienti **bez DR**. Druhá skupina obsahovala pacienty s nálezem neproliferativní DR maximálně do stupně modica, označovaná jako **lehká DR**, nevyžadující laserové ošetření sítnice v rozsahu panretinální fotokoagulace sítnice. Třetí skupinu tvořili pacienti s těžkou neproliferativní DR a proliferativní DR označovanou jako

**těžká DR**, u které již pro pokročilost ischemických změn sítnice je indikováno zahájení laserového ošetření sítnice v rozsahu panretinální fotokoagulace sítnice dle ETDRS. Následně byly vzájemně porovnány nálezy u skupiny zdravých jedinců a jednotlivých skupin s DM 1 rozdělených dle stupně DR.

### 4.3. In vivo konfokální mikroskop

U všech účastníků studie bylo provedeno vyšetření rohovky pomocí in vivo konfokálního rohovkového mikroskopu (Confoscan 3.0, NIDEK Technologies, Itálie; Obr. 12). Tento typ konfokálního mikroskopu používá pro osvětlení i pozorování aperturu ve formě úzké vertikální štěrbinu (slit-scanning confocal microscopy, SSCM). Zdrojem světla je 12V halogenová lampa. Mikroskop je vybavený 40x zvětšujícím, bezkontaktním, imersním objektivem s pracovní vzdáleností 1,92 mm od povrchu rohovky (Achroplan, Zeiss, Oberkochen, Germany). V souladu s návodem k použití byla po lokální aplikaci oxybuprocainu 0,4 % (Benoxi, Unimed Pharma) a nanesení imersního gelu (carbomerum, Vidisic gel, Bausch&Lomb) skenována centrální oblast rohovky (450x335 $\mu$ m) v celé její tloušťce počínaje endotelem (v automatickém nebo semiautomatickém modu, 350 snímků na jeden cyklus). Předozadní posun objektivu byl nastaven na 5  $\mu$ m. U každého oka bylo snímání provedeno nejméně dvakrát, počínaje endotelem, tím bylo získáno nejméně 700 skenů rohovky z každého oka (Smith A. G. et al., 2013).

**Obr. 12 Confoscan 3.0, NIDEK Technologies**



#### 4.4. Analýza skenů rohovky

Denzita (1) bazálních epitelálních buněk, (2) keratocytů (buněk) v předním a zadním stromatu a (3) endotelových buněk byla hodnocena za použití analytického softwaru v manuálním režimu, který je součástí softwaru konfokálního mikroskopu. Pro hodnocení denzity buněk byly vybrány dva reprezentativní skeny (jeden z každého oka) zachycující bazální buňky epitelu a endotelu. Bylo dodrženo doporučení poskytovatele softwaru pro stanovení počtu buněk, pro buňky endotelu bylo počítáno alespoň 35 buněk (plocha polygonu přibližně 0,02 mm<sup>2</sup>) a pro buňky bazálního epitelu bylo počítáno přibližně 80 buněk (plocha polygonu přibližně 0,01 mm<sup>2</sup>).

Průměrný počet jader všech keratocytů ve fixní ploše 0,08 mm<sup>2</sup> byl vypočten vždy ze dvou skenů centrální oblasti předního a zadního stromatu. Pro denzitu keratocytů zadního stromatu byly hodnoceny dva skeny následující po posledním skenu endotelu a pro denzitu keratocytů předního stromatu byly použity dva skeny předcházející sken epitelu. Průměrná hodnota získaná z vyhodnocených skenů byla zaznamenána jako denzita buněk v konkrétní vrstvě (počet buněk/plocha = No/mm<sup>2</sup>).

Pro hodnocení nervových vláken subbazálního nervového plexu byla použita manuální identifikace nervových vláken a jejich větvení a dále ruční "trasování" délky nervových vláken (Edwards K. et al., 2012 a 2014, Dabbah M. A. et al., 2011, Heneghan C. et al., 2002).

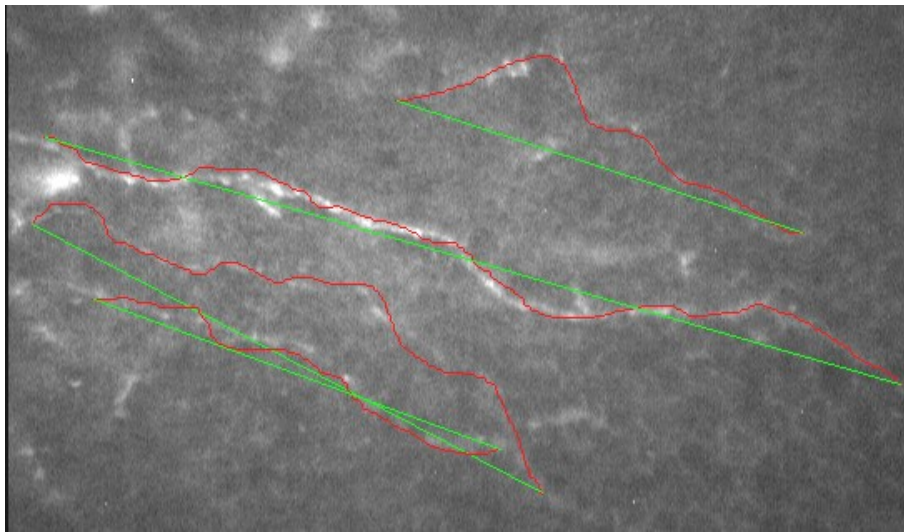
Pro analýzu nervových vláken byl použit individualizovaný software pro analýzu obrazu (NIS-Elements, Laboratory Imaging, Česká republika). Confoscan 3 produkuje skeny se sníženou kvalitou obrazu v okrajových částech (Szaflík J.P., 2007), proto byla hodnocena centrální ostrá část skenu o ploše 0,10 mm<sup>2</sup>.

Pro zhodnocení nervových vláken byly vybrány čtyři nejreprezentativnější skeny subbazálního plexu rohovky (dva z každého oka). Byla stanovena hodnota celkové délky nervových vláken (NFL; mm/mm<sup>2</sup>), denzita (počet) hlavních nervových vláken (NFD; No/mm<sup>2</sup>), celková denzita všech nervových vláken (t-NFD; No/mm<sup>2</sup>), denzita bodů větvení nervových vláken (NFB; No/mm<sup>2</sup>) a tortuozita nervových vláken (NFT; bezrozměrný index) rohovky. K určení tortuozity nervových vláken (Obr. 13) byla použita metoda navržená pro stanovení tortuozity sítnicových cév, jako poměr nejkratší vzdálenosti mezi konci nervových vláken a skutečnou délkou vlákna (Heneghan C. et al., 2002).

Hodnocení snímků bylo prováděno anonymně, bez znalosti celkového a očního nálezu.



**Obr. 13 Stanovení tortuozity nervových vláken rohovky (NFT; bezrozměrný index)**



#### **4.5. Glykemická variabilita**

Kompletní soubory údajů byly k dispozici u 20 pacientů s DM 1: 12 žen a 8 mužů. Všech 20 pacientů bylo léčeno pomocí intenzifikovaného inzulínového režimu, z toho 17 (17/20) pomocí CSII. V době zahájení studie devět pacientů (9/20) bylo bez chronických diabetických komplikací, u 5/20 se již vyvinula jedna chronická diabetická komplikace a 6/20 trpělo více chronickými diabetickými komplikacemi (1x pouze DN, 3x jen DR a jeden pacient s diabetickou nefropatií, 4x byla DN, doprovázená DR a dva pacienti měli všechny tři typy mikrovaskulárních komplikací (neuropatie, nefropatie a také retinopatie). Jedenáct pacientů (11/20) mělo BMI (body mass index) < 25. Šest (6/20) bylo kuřáků (z toho 3 měli BMI < 25), 2/20 byli klasifikováni jako bývalí kuřáci (jeden měl BMI < 25) a 12/20 nikdy nekouřili (z toho 7 mělo BMI < 25). U devíti (9/20) pacientů bylo diagnostikováno onemocnění štítné žlázy (autoimunního původu), z toho pět (5/9) užívalo substituční terapii thyreoidálními hormony a 4/9 iso-hormonální léčbu. Šest pacientů bylo léčeno inhibitory angiotensin konvertujícím enzymem (ACEI); čtyři pacienti perindoprilem a další dva ramiprilem. Tři z pacientů léčených ACEI měli GV < 3,5 mmol / l a 3 pacienti GV > 3,5 mmol / l; 2 pacienti měli ID < 0,6 IU / kg a 4 pacienti měli ID > 0,6 IU / kg. Další léky používané pacienty ve studijní skupině by neměly interferovat s analýzou. Ostatní charakteristiky pacientů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 7).

## 4.6. Statistická analýza

### 4.6.1. Diabetická retinopatie a změny nervových vláken hodnocené konfokální mikroskopií rohovky

Ve studii bylo provedeno statistické zhodnocení vztahu rohovkové neuropatie a stupně DR pomocí IBM softwaru SPSS v. 23 (Shapiro-Wilk test pro ověření normality dat, ANOVA a Bonferroni post-hoc test pro testování rozdílů mezi skupinami). IBM SamplePower v. 23 software byl použit pro zhodnocení statistické síly použitých testů. Výsledky jsou uváděny jako průměr  $\pm$  směrodatná odchylka. Hodnota  $p \leq 0.05$  byla považována za statisticky významnou.

### 4.6.2. Vliv doby trvání a věku v době diagnózy diabetes mellitus 1. typu na denzitu rohovkových buněk a nervová vlákna

Srovnání věku, trvání DM1 a HbA1c mezi skupinami subjektů bylo provedeno klasickým jednosměrným ANOVA testem. Pro odhad souvislosti pomocí více parametrů, vliv věku, trvání DM 1, HbA1c, přítomnost/nepřítomnost DM 1 (DM 1 status) a stupeň DR, byl použit test GEE modelů (generalized estimating equation), kde dvě nebo čtyři měření daného výsledku, na obou očích jediného subjektu, byly ošetřeny jako multivariační pozorování. Vykazované p-hodnoty a intervaly spolehlivosti byly získány použitím Waldova statistického testu. Model GEE byl vyplněn získanými údaji s fungující strukturou nezávislosti, vrstvený odhad byl použit k úpravě rozptylu pro korelaci výsledků. První, neupravené univariální modely byly vhodné pro zhodnocení celého vzorku subjektů ( $n = 80$ ), s lineárním věkem, přítomností/nepřítomností DM 1 (status DM 1) a skupinou DR (bez DR, lehká DR a těžká DR), která je vnořená do skupiny DM 1 pacientů, a to odděleně, jako jednotlivé prediktory. Dále upravené modely byly souběžně a vzájemně upraveny pro testování skupiny pacientů s DM 1 ( $n = 60$ ) pro parametry: věk v době diagnózy DM 1, doba trvání DM 1, HbA1c a stupeň DR. K provedení analýz byla použita knihovna "GEE" ve statistickém balíčku R 3.3.0.

### 4.6.3. Vliv klinických faktorů na nervová vlákna rohovky u pacientů s DM 1

Pro zhodnocení parametrů glykemické variability byla statistická analýza provedena pomocí softwaru SPSS SW v. 24 (IBM SPSS Statistics, IBM Corporation, Chicago, IL, USA). Neparametrické korelační analýzy byly provedeny na všech parametrech (Spearman's rho). Mann-Whitneyův test byl použit pro srovnání ve dvou skupinách a Kruskal-Wallisův

test pro tři nebo více skupinová srovnání. Pro kategorizaci byly použity hodnoty dle doporučení České diabetologické společnosti pro léčebné cíle. Pro jednotlivé skupiny byly použity následující parametry: pohlaví, BMI (pacienti s  $BMI \leq 25$  byli srovnáni s pacienty s  $BMI > 25$ ), kuřáci (kuřák/ex-kuřák/nekuřák), HbA1c (pacienti s  $HbA1c \leq 60$  mmol/mol oproti pacientům s  $HbA1c > 60$  mmol/mol), glykemická variabilita (referenční hodnota GV = 3,5 mmol/l), dávka inzulínu (referenční hodnota ID = 0,6 IU/kg), LDL cholesterol (LDL-low density lipoprotein) (referenční hodnota byla 2,5 mmol/l), hladina vitamínu D (referenční hodnota byla 50 nmol/l), funkce štítné žlázy (hormony stimulující štítnou žlázu (TSH) a hladiny hormonu volného tyroxinu [fT4]) a vysoký krevní tlak (systolický krevní tlak  $\geq 140$  mm Hg, diastolický krevní tlak  $\geq 90$  mm Hg). Další proměnné, které by mohly být potenciálně použity jako skupinové proměnné, nebyly v naší analýze hodnoceny vzhledem k malé variabilitě v rámci skupiny. Například nikdo netrpěl ischemickou chorobou dolních končetin, proto index kotník-paže (ABI) nebo parametr tloušťka intima-media (IMT) nebyly použity. Dále u většiny pacientů byly normální hodnoty HDL cholesterolu (HDL – high density lipoprotein) a triglyceridy.

Jiné proměnné, které by mohly být potenciálně použity jako skupinové proměnné, nemohly být použity v naší analýze vzhledem k malé četnosti výskytu v rámci skupin.

## 5. Výsledky

### 5.1. Diabetická retinopatie a změny nervových vláken hodnocené in vivo konfokální mikroskopii rohovky

Klinická a demografická charakteristika souboru je uvedena v tabulce (Tab. 1). Průměrná úroveň kompenzace hodnocená na základě hodnoty glykovaného hemoglobinu (HbA1c) se mezi jednotlivými skupinami DR statisticky významně nelišila ( $p = 0,86$ ; Tab 1). Rovněž průměrný věk se mezi jednotlivými skupinami pacientů ani kontrolní skupinou statisticky významně nelišil ( $p = 0,80$ ). Doba trvání diabetu byla u pacientů s těžkou DR statisticky významně delší než u pacientů bez DR a s lehkou DR ( $p = 0,009$ ). U všech vyšetřovaných očí byly získány kvalitní a dobře hodnotitelné skeny subbazálního nervového plexu rohovky.

**Tab. 1** Charakteristika souboru

*DM 1 - diabetes mellitus 1. typu, DR – diabetická retinopatie, HbA1c – glykovaný hemoglobin*

	Skupina	Počet subjektů	Věk (roky)	Trvání DM (roky)	HbA1c (mmol/mol)
Kontrola	zdraví	12	30,1±8,7	-	-
DM 1	Bez DR	14	33,0±8,4	15,1±5,7	69,8±17,4
DM 1	Lehká DR	14	33,2±10,3	18,3±9,0	72,6±11,1
DM 1	Těžká DR	10	33,2±8,3	23,6±6,8	70,9±11,0

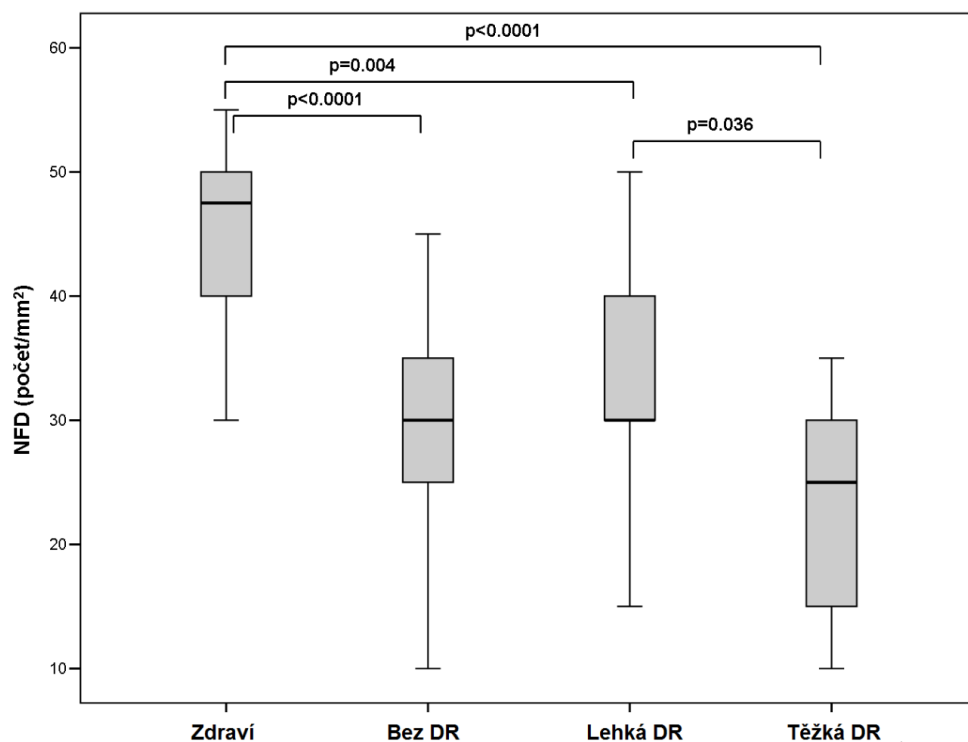
Ve všech sledovaných parametrech nervových vláken byly prokázány statisticky významné rozdíly mezi skupinami ( $p < 0,0001$ ) při statistické síle testu  $> 99$  %. Při hodnocení NFD byl ve všech skupinách pacientů s DM 1 (bez DR, s lehkou DR a těžkou DR) prokázán úbytek počtu nervových vláken ve srovnání se zdravými jedinci ( $p < 0,0001$ ,  $p = 0,004$ , resp.  $p < 0,0001$ ; Graf 1). NFD byla rovněž statisticky významně nižší ve skupině s těžkou DR než ve skupině s lehkou DR ( $p = 0,036$ ; Graf 1). Při srovnání denzity všech zastižených nervových vláken rohovky (t-NFD) byl prokázán statisticky významně nižší počet nervových vláken u pacientů ve skupině bez DR a ve skupině s těžkou DR než u zdravých jedinců ( $p=0,024$ , resp.  $p < 0,0001$ ; Graf 2). Obdobně při srovnání NFL byl prokázán statisticky významný pokles celkové délky vláken ve skupině bez DR a s těžkou DR, oproti hodnotám

zdravých jedinců ( $p = 0,007$ , resp.  $p < 0,0001$ ; Graf 3). Zároveň byla prokázána nižší hodnota NFL u pacientů s těžkou DR oproti pacientům s lehkou DR ( $p=0,028$ ). Při zhodnocení NFT byl naopak patrný nárůst tortuozity ve skupině s těžkou DR ve srovnání se skupinou zdravých jedinců i skupinou bez DR ( $p < 0,0001$ , resp.  $p = 0,001$ ; Graf 4). Podrobně jsou výsledky pro NFD, t-NFD, NFL a NFT pro jednotlivé sledované skupiny uvedeny tabulce (Tab. 2)

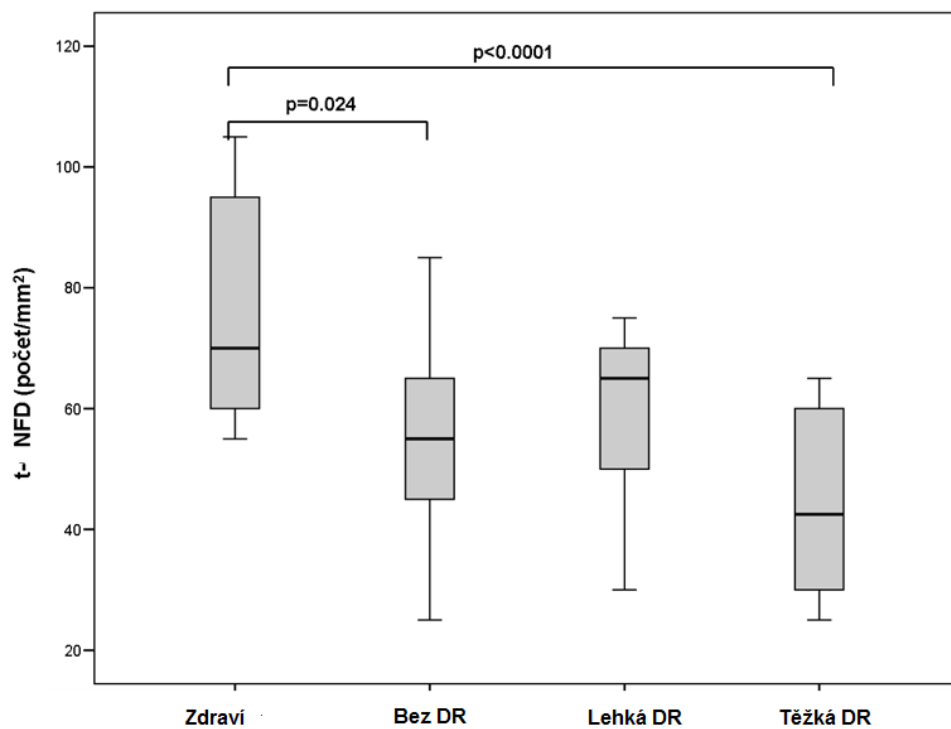
**Tab. 2** Parametry nervových vláken rohovky dle stupně diabetické retinopatie (DR)  
t-NFD (No/ mm<sup>2</sup>) - *denzita všech zachycených nervových vláken*; NFD (No/mm<sup>2</sup>) - *denzita hlavních nervových vláken*; NFL (mm/mm<sup>2</sup>) - *celková délka nervových vláken*; NFT, *bezrozměrné číslo – tortuozita nervových vláken*

	Skupina	Průměr	Směrodatná odchylna	Median	Minimum	Maximum
t-NFD (No/mm <sup>2</sup> )	Zdraví	75,4	18,6	70,0	55,0	105,0
	Bez DR	56,1	14,7	55,0	25,0	85,0
	Lehká DR	58,6	13,6	65,0	30,0	75,0
	Těžká DR	45,0	14,3	42,5	25,0	65,0
NFD (No/mm <sup>2</sup> )	Zdraví	45,8	7,3	47,5	30,0	55,0
	Bez DR	29,6	9,7	30,0	10,0	45,0
	Lehká DR	32,9	9,1	30,0	15,0	50,0
	Těžká DR	24,0	8,8	25,0	10,0	35,0
NFL (mm/mm <sup>2</sup> )	Zdraví	17,0	3,1	17,7	12,5	21,8
	Bez DR	12,5	3,2	12,5	6,3	18,1
	Lehká DR	14,0	3,3	14,8	7,4	17,7
	Těžká DR	9,9	3,6	10,5	4,3	15,5
NFT	Zdraví	1,077	0,013	1,080	1,060	1,103
	Bez DR	1,082	0,013	1,082	1,065	1,115
	Lehká DR	1,091	0,017	1,096	1,062	1,116
	Těžká DR	1,109	0,021	1,099	1,088	1,153

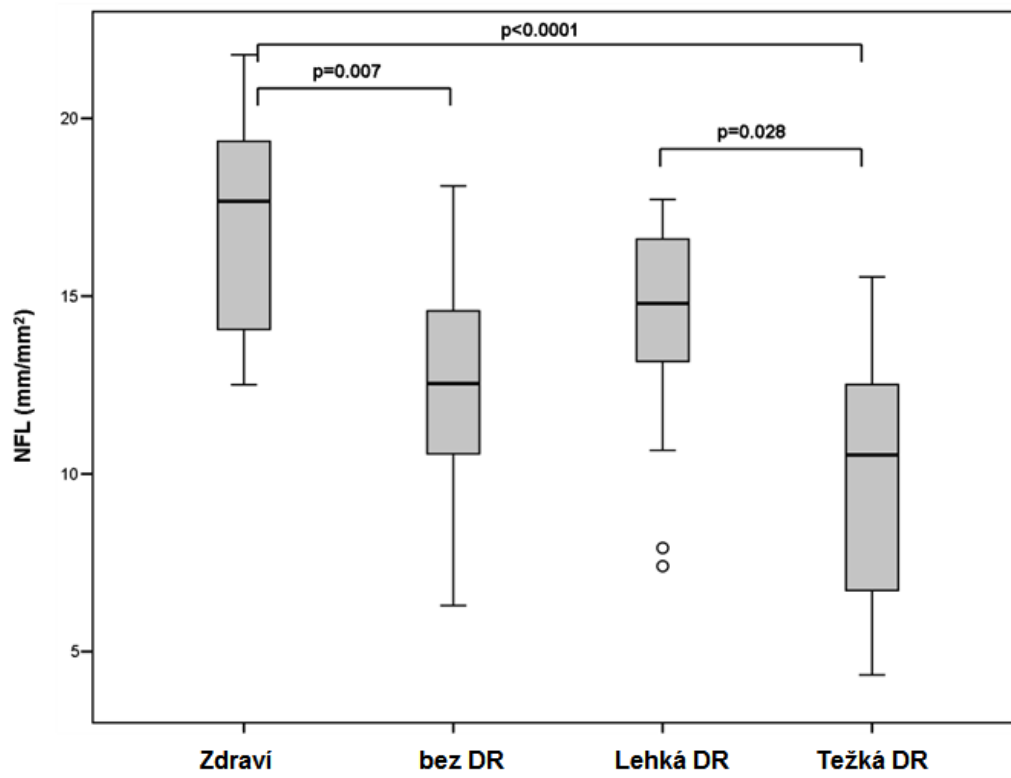
**Graf 1** Densita hlavních nervových vláken rohovky (NFD)



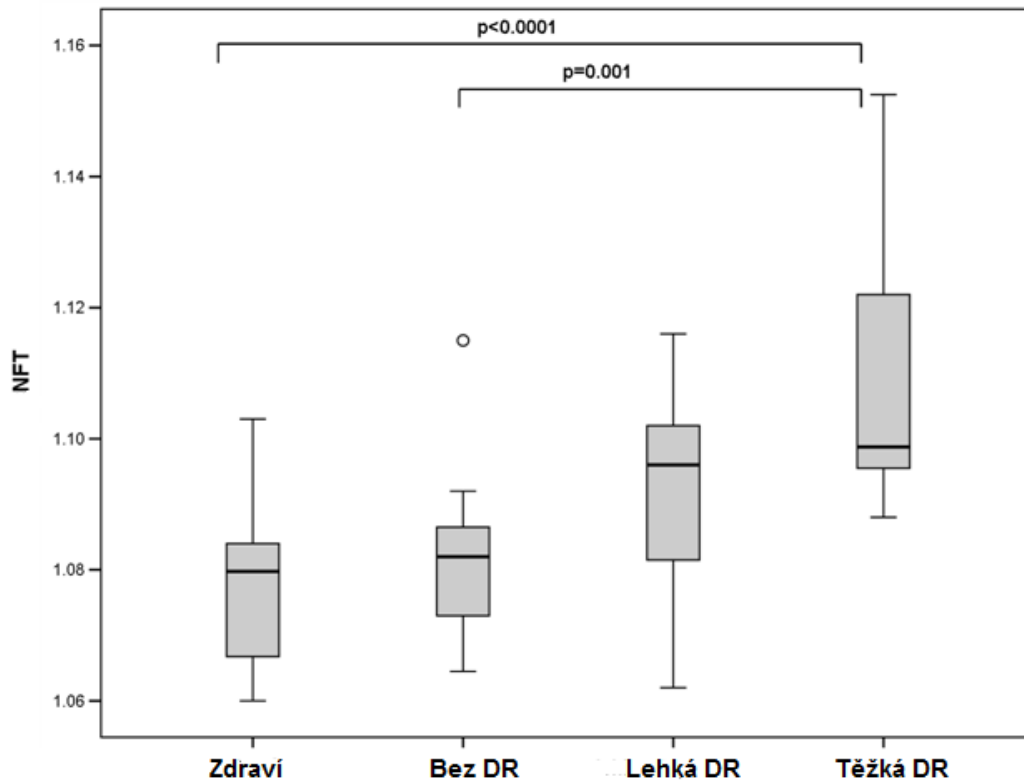
**Graf 2** Densita všech nervových vláken rohovky (t-NFD)



**Graf 3** Celková délka nervových vláken rohovky (NFL)



**Graf 4** Tortuozita nervových vláken rohovky (NFT; bezrozměrný index)



## 5.2. Vliv doby trvání a věku v době diagnózy diabetes mellitus 1. typu na denzitu rohovkových buněk a nervová vlákna

Klinická a demografická charakteristika souboru je uvedena v tabulce (Tab. 3). Soubor tvořilo 60 pacientů s DM 1 a 20 zdravých kontrolních subjektů. Průměrný věk subjektů se mezi skupinami nelišil ( $p = 0,36$ ). Potvrdili jsme signifikantně delší dobu trvání DM 1 u pacientů s těžkou DR (průměr 24,0 let) a lehkou DR (průměr 20,4 let) ve srovnání s pacienty bez DR (průměr 13,5 let;  $p$ -hodnota rozdílu = 0,0004). Hodnota HbA1c se mezi jednotlivými skupinami diabetických pacientů nelišila ( $p = 0,83$ ). Hodnoty denzity buněk pro jednotlivé vrstvy rohovky jsou uvedeny v tabulce (Tab. 4). Prokázali jsme závislost denzity buněk v hodnocených vrstvách rohovky na věku (Tab. 5).

Počet buněk bazálního epitelu se zvýšil o 116 buněk/mm<sup>2</sup> každých 10 let věku (95 % CI 14–219 buněk/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,026$ ). Naopak denzita buněk stromatu a endoteliálních buněk se s věkem snižovala. Denzita buněk předního stromatu poklesla o 55 buněk/mm<sup>2</sup> každých 10 let (95 % CI pro pokles 17–94 buněk/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,005$ ), denzita buněk zadního stromatu se snížila o 20 buněk/mm<sup>2</sup> každých 10 let (95 % CI pro pokles 9–30 buněk/mm<sup>2</sup>  $p = 0,0003$ ) a počet buněk endotelu se snížil o 163 buněk/mm<sup>2</sup> každých 10 let (95 % CI pro pokles 90–237 buněk/mm<sup>2</sup>;  $p < 0,0001$ ).

U pacientů s DM 1 byly účinky závislé hlavně na věku v době diagnózy DM 1 a byly nezávislé na délce trvání onemocnění (Tab. 6). Po stanovení diagnózy DM 1 se závislost věku a denzity bazálních epiteliálních buněk stala zanedbatelnou a asociace věku v době diagnózy a denzity buněk v ostatních vrstvách rohovky oslabila a stala se statisticky nevýznamnou. Denzita buněk rohovky nebyla závislá na přítomnosti/nepřítomnosti DM 1 s výjimkou denzity buněk předního stromatu, která byla nižší o 92 buněk/mm<sup>2</sup> u subjektů s DM 1 než u zdravých kontrol (95 % CI pro rozdíl 23–161 cells/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,009$ ). Největší pokles denzity buněk předního stromatu byl pozorován u pacientů s DM 1 bez diabetické retinopatie (o 122 buněk/mm<sup>2</sup> nižší než u zdravých kontrol, 95 % CI 32–213 cells/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,008$ , Graf 5). Nebyla prokázána žádná souvislost mezi denzitou buněk v jednotlivých vrstvách rohovky a HbA1c nebo stupněm diabetické retinopatie (Tab. 6, Graf 5).

Souhrn výsledků parametrů subbazálního nervového plexu je uveden v tabulce (Tab. 4). Nebyly nalezeny žádné vazby mezi věkem a NFD, t-NFD, NBD, NFL nebo NFT (Tab. 5). Sledované parametry NFD, t-NFD, NBD a NFL byly statisticky významně nižší u pacientů s DM 1 než u kontrol ( $p \leq 0,0001$ , Tab 5) a výsledky naznačovaly, že se dále snižují se stupněm DR. Hodnoty NFD, t-NFD, NBD, a NFL se nelišily mezi skupinami bez DR



a lehké DR, ale byly významně nižší ve skupině s těžkou DR ve srovnání bez DR ( $p = 0,0012$ ,  $p = 0,0010$ ,  $p = 0,0194$ ,  $p = 0,079$ , Tab. 6, Graf 6). Hodnota NFT byla vyšší ve skupině s lehkou DR a s těžkou DR oproti kontrolní skupině ( $p = 0,0077$ ,  $p = 0,0024$ , Tab. 5). U pacientů s DM 1 byla NFT vyšší u lehké DR a těžké DR ve srovnání bez DR ( $p = 0,0394$ ,  $p = 0,0155$ , resp., Tab. 6). Pacienti s vyšším věkem v době diagnózy DM 1 měli vyšší NFD ve srovnání s pacienty stejného věku a stupně DR, kteří byli v době diagnózy DM 1 mladší ( $p = 0,0021$ ). Podobná situace byla pozorována při hodnocení parametru NFL ( $p = 0,0540$ , Tab. 6). Mezi parametry nervových vláken a HbA1c nebo délkou trvání DM 1 nebyla prokázána závislost (Tab. 6).

**Tab. 3** Charakteristika souboru

*Diabetes mellitus 1. typu (DM 1), diabetická retinopatie (DR), glykovaný hemoglobin (HbA1c)*

Skupina		Věk	Trvání DM 1	Věk v době dg. DM 1	HbA1c
		<i>Průměr (SD)</i>	<i>Průměr (SD)</i>	<i>Průměr (SD)</i>	<i>Průměr (SD)</i>
Zdraví	$n=20$	32.2 (9.9)	-	-	-
DM 1, Bez DR	$n=24$	37.7 (12.3)	13.5 (7.2)	24.2 (12.8)	70.8 (16.0)
DM 1, Lehká DR	$n=21$	35.9 (11.1)	20.4 (9.1)	15.5 (12.8)	73.3 (11.2)
DM 1, Těžká DR	$n=15$	33.6 (7.7)	24.0 (7.3)	9.6 (3.2)	71.6 (13.4)
	$n = 80$	$p=0.36$	$p=0.0004$	$p=0.0007$	$p=0.83$

**Tab. 4** Denzita buněk bazálního epitelu, stromatu, endotelu a parametry subbazálního nervového plexu

Počet buněk nebo nervových vláken/mm<sup>2</sup>; (No/mm<sup>2</sup>) nebo délka nervových vláken (mm/mm<sup>2</sup>, diabetes mellitus 1. typu (DM 1), diabetická retinopatie (DR)

	<b>Zdraví (n=20)</b>	<b>DM 1 bez DR (n=24)</b>	<b>DM 1 lehká DR (n=21)</b>	<b>DM 1 těžká DR (n=15)</b>
Denzita bazálních buněk epitelu <i>Průměr (SD; No/mm<sup>2</sup>)</i>	6464.2 (522.4)	6759.4 (558.3)	6534.4 (446.4)	6566.2 (576.5)
Denzita buněk předního stromatu <i>Průměr (SD; No/mm<sup>2</sup>)</i>	782.3 (134.1)	659.8 (180.1)	712.7 (147.9)	711.8 (110.4)
Denzita buněk zadního stromatu <i>Průměr (SD; No/mm<sup>2</sup>)</i>	534.4 (56.1)	500.4 (63.0)	536.0 (56.2)	532.7 (48.5)
Denzita buněk endotelu <i>Průměr (SD; No/mm<sup>2</sup>)</i>	2927.4 (398.0)	2701.8 (479.4)	2779.8 (272.9)	2925.2 (344.0)
Denzita hlavních nervových vláken <i>Průměr (SD; No/mm<sup>2</sup>)</i>	43.12 (7.20)	31.98 (9.30)	31.31 (7.19)	19.33 (8.04)
Denzita všech nervových vláken <i>Průměr (SD; No/mm<sup>2</sup>)</i>	69.50 (16.93)	55.73 (19.77)	51.55 (14.84)	32.67 (14.95)
Délka nervových vláken <i>Průměr (SD; mm/mm<sup>2</sup>)</i>	16.45 (3.40)	12.37 (4.23)	11.98 (2.98)	7.50 (3.29)
Tortuozita nervových vláken <i>Průměr (SD; index)</i>	1.08 (0.01)	1.08 (0.01)	1.09 (0.02)	1.12 (0.05)
Denzita bodů větvení nervových vláken <i>Průměr (SD; No/mm<sup>2</sup>)</i>	30.38 (18.82)	21.15 (12.42)	19.29 (11.89)	10.06 (7.36)

**Tab 5**

Výsledky univariačního modelu: asociace věku, Přítomnost/nepřítomnost DM1 (status DM1), supně diabetické retinopatie (vzájemně nejsou upravené) s densitou buněk rohovky a sledovanými parametry nervových vláken rohovky. Soubor: 60 pacientů s DM 1 a 20 kontrolních subjektů.

	<b>Denzita bazálních buněk epitelu</b> (absolutní změna, No/mm <sup>2</sup> )			<b>Denzita buněk předního stromatu</b> (absolutní změna, No/mm <sup>2</sup> )			<b>Denzita buněk zadního stromatu</b> (absolutní změna, No/mm <sup>2</sup> )			<b>Denzita buněk endotelu</b> (absolutní změna, No/mm <sup>2</sup> )		
	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>P</i>	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>p</i>	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>p</i>	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>p</i>
Věk (za 10 let)	116	(14 – 219)	0.0262	-55	(-94 – -17)	0.0051	-20	(-30 – -9)	0.0003	-163	(-237 – -90)	0.0000
DM 1 vztaženo ke kontrole	172	(-88 – 432)	0.1946	-92	(-161 – -23)	0.0093	-13	(-42 – 15)	0.3483	-143	(-340 – 53)	0.1521
DR vztaženo ke kontrole			0.2782			0.0567			0.1318			0.1760
<i>Bez DR</i>	295	(-17 – 608)	0.0641	-122	(-213 – -32)	0.0083	-34	(-68 – 0)	0.0525	-226	(-479 – 28)	0.0809
<i>Lehká DR</i>	70	(-221 – 361)	0.6360	-70	(-154 – 15)	0.1055	2	(-32 – 35)	0.9262	-148	(-352 – 57)	0.1575
<i>Těžká DR</i>	115	(-249 – 479)	0.5354	-73	(-153 – 6)	0.0715	-2	(-35 – 32)	0.9234	-2	(-245 – 242)	0.9903

	<b>Délka nervových vláken</b> (absolutní změna, μm/mm <sup>2</sup> )			<b>Tortuozita nervových vláken</b> (absolutní změna, % nad 1)		
	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>P</i>	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>p</i>
Věk (za 10 let)	0.16	(-0.65 – 0.96)	0.7014	0.264	(-0.072 – 0.600)	0.1235
DM 1 vztaženo ke kontrole	-5.28	(-7.04 – -3.51)	0.0000	1.615	(0.648 – 2.582)	0.0011
DR vztaženo ke kontrole			0.0000			0.0024
<i>Bez DR</i>	-4.05	(-6.28 – -1.82)	0.0004	0.487	(-0.276 – 1.251)	0.2108
<i>Lehká DR</i>	-4.47	(-6.38 – -2.56)	0.0000	1.397	(0.369 – 2.425)	0.0077
<i>Těžká DR</i>	-8.66	(-10.84 – -6.49)	0.0000	3.919	(1.386 – 6.452)	0.0024

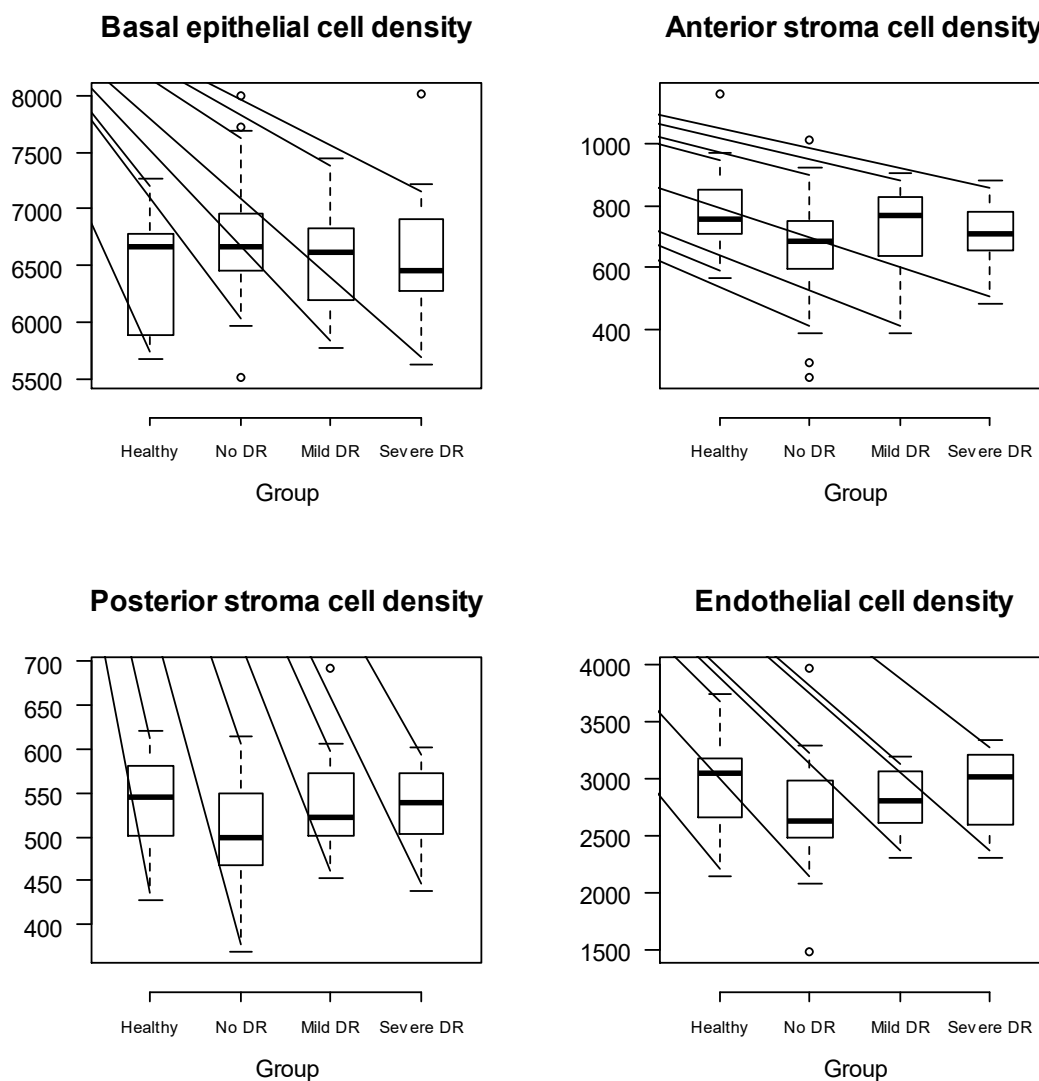
	<b>Denzita nervových vláken</b> (relativní změna)			<b>Denzita všech nervových vláken</b> (relativní změna)			<b>Denzita větvení nervových vláken</b> (relativní změna)		
	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>P</i>	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>p</i>	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>p</i>
Věk (za 10 let)	1.010	(0.952 – 1.072)	0.7403	0.993	(0.924 – 1.067)	0.8500	1.009	(0.895 – 1.137)	0.8822
DM 1 vztaženo ke kontrole	0.664	(0.594 – 0.743)	0.0000	0.699	(0.605 – 0.807)	0.0000	0.579	(0.424 – 0.791)	0.0006
DR vztaženo ke kontrole			0.0000			0.0000			0.0000
<i>Bez DR</i>	0.742	(0.648 – 0.848)	0.0000	0.802	(0.674 – 0.954)	0.0127	0.700	(0.492 – 0.996)	0.0476
<i>Lehká DR</i>	0.726	(0.644 – 0.818)	0.0000	0.742	(0.633 – 0.869)	0.0002	0.597	(0.420 – 0.850)	0.0042
<i>Těžká DR</i>	0.448	(0.358 – 0.559)	0.0000	0.466	(0.362 – 0.601)	0.0000	0.329	(0.207 – 0.523)	0.0000

<b>Tab 6</b>	Výsledky multivariačního modelu: asociace věku v době diagnózy DM 1, trvání DM1, HbA1c (vzájemně upravené) a diabetické retinopatie dle stupně (upraveno podle věku při diagnóze DM 1 a trvání DM 1) s denzitou buněk rohovky a sledovanými parametry nervových vláken rohovky. Soubor: 60 pacientů s DM 1 a 20 kontrolních subjektů											
	<b>Denzita bazálních buněk epitelu</b> (absolutní změna, No/mm <sup>2</sup> )			<b>Denzita buněk předního stromatu</b> (absolutní změna, No/mm <sup>2</sup> )			<b>Denzita buněk zadního stromatu</b> (absolutní změna, No/mm <sup>2</sup> )			<b>Denzita buněk endotelu</b> (absolutní změna, No/mm <sup>2</sup> )		
	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>p</i>	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>P</i>	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>p</i>	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>P</i>
Věk v době diagnózy (za 10 let)	111	( 4 – 219)	0.0424	-49	(-98 – 0)	0.0479	-20	(-32 – -8)	0.0014	-150	(-238 – -62)	0.0009
Trvání DM 1 (za 10 let)	1	(-141 – 143)	0.9874	-33	(-86 – 21)	0.2311	-17	(-36 – 2)	0.0754	-56	(-164 – 51)	0.3052
HbA1c (po 10 mmol/mol)	-51	(-139 – 37)	0.2544	-6	(-27 – 15)	0.5838	2	(-10 – 14)	0.7991	23	(-50 – 96)	0.5356
DR vztaženo k bez DR			0.5657			0.7550			0.0757			0.6614
<i>Lehká DR</i>	-149	(-444 – 146)	0.3215	38	(-62 – 138)	0.4553	38	( 4 – 72)	0.0284	3	(-217 – 223)	0.9799
<i>Těžká DR</i>	-51	(-489 – 388)	0.8215	21	(-81 – 123)	0.6840	34	(-4 – 72)	0.0787	95	(-170 – 360)	0.4807
	<b>Délka nervových vláken</b> (absolutní změna, μm/mm <sup>2</sup> )			<b>Tortuozita nervových vláken</b> (absolutní změna, % nad 1)								
	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>p</i>	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>P</i>						
Věk v době diagnózy (za 10 let)	0.95	(-0.02 – 1.92)	0.0540	-0.07	(-0.434 – 0.294)	0.7060						
Trvání DM 1 (za 10 let)	-0.45	(-1.51 – 0.60)	0.3997	0.559	(-0.108 – 1.227)	0.1005						
HbA1c (po 10 mmol/mol)	0.26	(-0.47 – 0.99)	0.4828	-0.059	(-0.566 – 0.448)	0.8190						
DR vztaženo k bez DR			0.0035			0.0246						
<i>Lehká DR</i>	0.21	(-1.79 – 2.21)	0.8363	1.058	(0.051 – 2.064)	0.0394						
<i>Těžká DR</i>	-3.55	(-6.17 – -0.93)	0.0079	3.687	(0.702 – 6.673)	0.0155						
	<b>Denzita nervových vláken</b> (relativní změna)			<b>Denzita všech nervových vláken</b> (relativní změna)			<b>Denzita větvení nervových vláken</b> (relativní změna)					
		<i>95% CI</i>	<i>p</i>	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>P</i>	<i>Coef.</i>	<i>95% CI</i>	<i>p</i>			
Věk v době diagnózy (za 10 let)	1.101	(1.036 – 1.171)	0.0021	1.068	(0.981 – 1.164)	0.1307	1.104	(0.960 – 1.271)	0.1653			
Trvání DM 1 (za 10 let)	0.981	(0.896 – 1.074)	0.6777	0.944	(0.839 – 1.062)	0.3379	0.862	(0.706 – 1.054)	0.1486			
HbA1c (po 10 mmol/mol)	1.011	(0.951 – 1.074)	0.7312	1.003	(0.936 – 1.075)	0.9346	1.035	(0.931 – 1.149)	0.5262			
DR vztaženo k bez DR			0.0009			0.0032			0.0603			
<i>Lehká DR</i>	1.024	(0.886 – 1.183)	0.7486	0.953	(0.803 – 1.131)	0.5833	0.952	(0.708 – 1.280)	0.7461			
<i>Těžká DR</i>	0.654	(0.506 – 0.845)	0.0012	0.612	(0.457 – 0.820)	0.0010	0.570	(0.356 – 0.913)	0.0194			

**Graf 5** Densita buněk rohovky u zdravých subjektů a pacientů s DM 1 rozdělených dle stupně diabetické retinopatie (DR)

(bez DR = *No DR*, lehká DR = *Mild DR*, těžká DR = *Severe DR*)

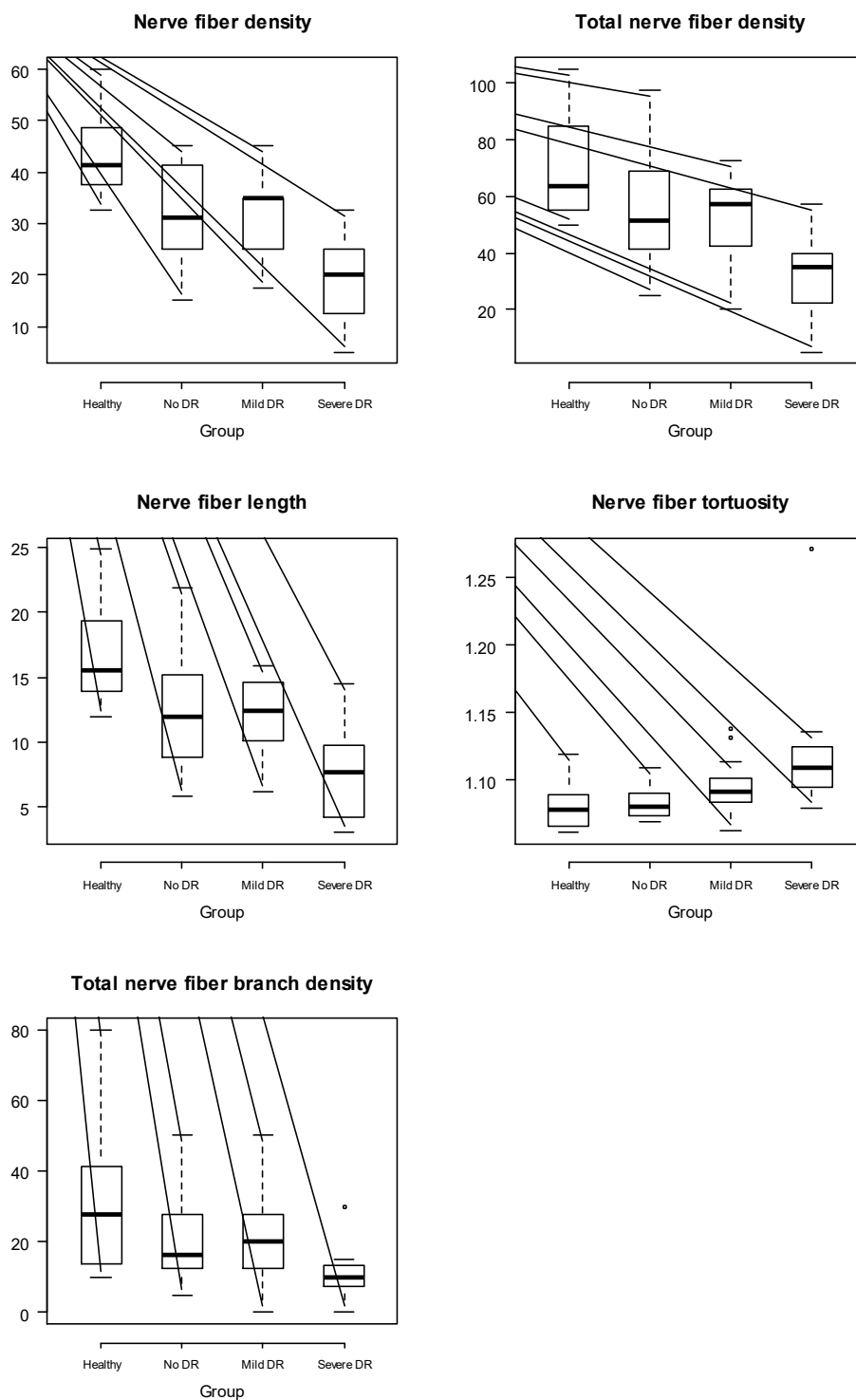
Densita buněk bazálního epitelu (*Basal epithelial cell density*), densita buněk předního stromatu (*Anterior stroma cell density*), densita buněk zadního stromatu (*Posterior stroma cell density*), densita buněk endotelu (*Endothelial cell density*);



**Graf 6 Hodnocené parametry nervových vláken rohovky u zdravých subjektů a pacientů s DM1 rozdělených dle stupně diabetické retinopatie (DR)**

(bez DR = *No DR*, lehká DR = *Mild DR*, těžká DR = *Severe DR*)

Denzita hlavních nervových vláken (*Nerve fiber density: NFD; No/mm<sup>2</sup>*), denzita všech nervových vláken (*Total nerve fiber density: t-NFD; No/mm<sup>2</sup>*), délka nervových vláken (*Nerve fiber length: NFL; mm/mm<sup>2</sup>*), tortuozita nervových vláken (*NFT; bezrozměrný index*), denzita bodů větvení (*Total nerve fiber branch density NFB; No/mm<sup>2</sup>*) u zdravých subjektů a pacientů s DM 1, rozdělených dle stupně diabetické retinopatie (bez DR = *No DR*, lehká DR = *Mild DR*, těžká DR = *Severe DR*)



### **5.3. Vliv klinických faktorů na nervová vlákna rohovky u pacientů s DM 1**

#### **5.3.1. Vliv klinických faktorů nesouvisejících přímo s diabetem na parametry nervových vláken rohovky**

Neprokázali jsme žádný vliv věku, pohlaví, BMI nebo kouření cigaret na sledované parametry nervových vláken rohovky (tj. NFD, NFL a NBD). Rovněž jsme neprokázali žádný vliv parametrů, které byly použity jako skupinové proměnné (hladina vitamínu D, lipidy – LDL cholesterol, systolický a diastolický krevní tlak) na stav nervových vláken rohovky (Tab. 7).

Jak již bylo zmíněno, faktory jako triglyceridy, IMT nebo ABI nebyly použity jako skupinové proměnné vzhledem k malé variabilitě našeho souboru v rámci těchto kategorií. Byl však pozorován neočekávaný vztah mezi funkcí štítné žlázy a sledovanými parametry nervových vláken rohovky. Ačkoliv jsme neprokázali závislost parametrů rohovkových nervů na hladině TSH (Tab. 8), prokázali jsme pozitivní korelaci mezi hladinami fT4 a NFD ( $r = 0,46$ ,  $P = 0,041$ ) a mezi fT4 a NBD ( $r = 0,535$ ,  $P = 0,015$ ; Graf 7 a 8).

Tři (3/6) pacienti léčení ACEI měli GV  $< 3,5$  mmol/l a tři (3/6) pacienti GV  $> 3,5$  mmol/l; dva (2/6) pacienti měli ID  $< 0,6$  IU/kg a čtyři (4/6) pacienti měli ID  $> 0,6$  IU/kg. Vzhledem k tomu, že dva (2/6) pacienti užívali dva různé preparáty ACEI s jinou účinnou látkou v různých dávkách, léčba pomocí ACEI nebyla použita jako parametr skupinové variability.

#### **5.3.2. Vliv klinických faktorů souvisejících s diabetem na parametry nervových vláken rohovky**

Glykemická variabilita vyjádřená jako SD glykémie vypočtená z CGM profilů byla asociována se všemi analyzovanými nervovými parametry (tj. NFD, NFL a NBD). Překvapivě byly tyto parametry vyšší u pacientů s DM 1 s vyšší glykemickou variabilitou (Tab. 7, Graf 9, 10 a 11). Nejzřetelnější spojení bylo pozorováno mezi GV a NBD, kdy pacienti s vyšší hodnotou GV měli vyšší NBD ( $p = 0,023$ ; Graf 9). Asociace mezi HbA1c a sledovanými parametry nervových vláken rohovky byla zanedbatelná.

Celková ID na kilogram byla také asociována s GV ( $r = 0,531$ ,  $p = 0,016$ ). Hodnoty NFD, NFL a NBD u pacientů s vyšší celkovou dávkou inzulínu na kilogram byly statisticky významně vyšší ( $p = 0,02$ ,  $p = 0,01$ ,  $p = 0,012$ , resp. Tab. 7, Graf. 12, 13 a 14).

**Tab 7. Charakteristika souboru**

*Diabetes mellitus 1. typu (DM 1), glykovaný hemoglobin (HbA1c), body mass index (BMI), standardní odchylka (SD) glykémie*

	<b>Průměr</b>	<b>Median</b>	<b>SD</b>
Věk (roky)	39.5	41.6	13.1
Trvání DM 1 (roky)	15.5	16.2	10.7
HbA1c (mmol/mol)	68.0	71.4	14.2
Glykémie SD* (mmol/l)	3.5	3.4	0.6
Celková dávka inzulínu za 24 h (IU)	37.5	42.9	15.3
Celková dávka inzulínu za 24 h dávka//kg (IU/kg)	0.5	0.6	0.2
TSH (mIU/l)	1.1	1.8	2.1
fT4 (pmol/l)	14.2	14.1	2.5
LDL (mmol/l)	2.3	2.4	0.7
25-OH vitamin D (nmol/l)	56.1	52.7	15.9
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.6	25.1	2.7
Systolický krevní tlak (mmHg)	129.0	126.8	14.0
Diastolický krevní tlak (mmHg)	79.0	78.9	6.3

\* hodnota vypočítaná z CGM profilů (Continuous Glucose Monitoring)



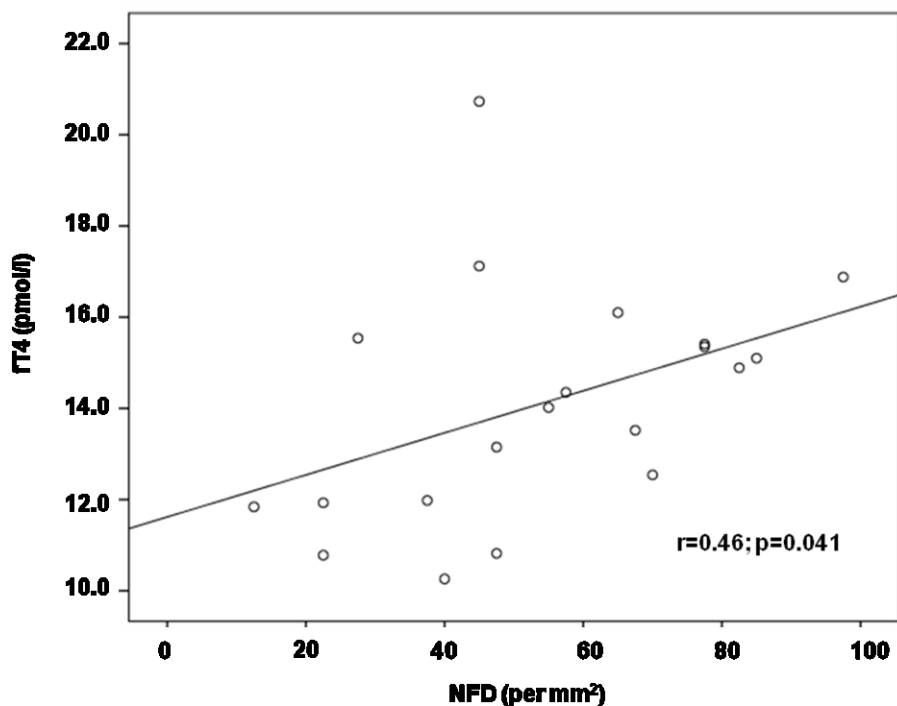
**Tab. 8 Neparametrická korelační analýza**  
(použit Spearman's rho test; N=20)

		<b>NFD</b>	<b>NFL</b>	<b>NBD</b>
Pohlaví	Korelační koeficient	-0.115	-0.195	-0.116
	Sig. (2-tailed)	0.629	0.411	0.628
Věk (roky)	Korelační koeficient	0.026	0.096	0.002
	Sig. (2-tailed)	0.915	0.686	0.992
Body mass index (BMI ; kg/m <sup>2</sup> )	Korelační koeficient	-0.026	0.063	-0.014
	Sig. (2-tailed)	0.915	0.791	0.952
Kuřák	Korelační koeficient	-0.247	-0.206	-0.244
	Sig. (2-tailed)	0.293	0.385	0.300
Glykovaný hemoglobin (HbA1c; mmol/mol)	Korelační koeficient	0.071	0.109	0.071
	Sig. (2-tailed)	0.765	0.649	0.766
LDL(cholesterol)	Korelační koeficient	-0.144	-0.091	-0.082
	Sig. (2-tailed)	0.544	0.704	0.731
Thyreotropní hormon (TSH; mIU/l)	Korelační koeficient	0.183	0.239	0.079
	Sig. (2-tailed)	0.439	0.310	0.740
Volný thyroxin (fT4; pmol/l)	Korelační koeficient	0.460*	0.321	0.535*
	Sig. (2-tailed)	0.041	0.167	0.015
25-OH vitamin D (nmol/l)	Korelační koeficient	0.266	0.292	0.400
	Sig. (2-tailed)	0.257	0.212	0.080
Systolický krevní tlak	Korelační koeficient	-0.047	-0.060	0.091
	Sig. (2-tailed)	0.845	0.801	0.704
Diastolický krevní tlak	Korelační koeficient	-0.359	-0.339	-0.250
	Sig. (2-tailed)	0.120	0.144	0.289
Glykemická variabilita (GV; mmol/l)	Korelační koeficient	0.358	0.429	0.513*
	Sig. (2-tailed)	0.121	0.059	0.021
Inzulínová dávka (ID; IU/kg)	Korelační koeficient	0.502*	0.568**	0.509*
	Sig. (2-tailed)	0.024	0.009	0.022

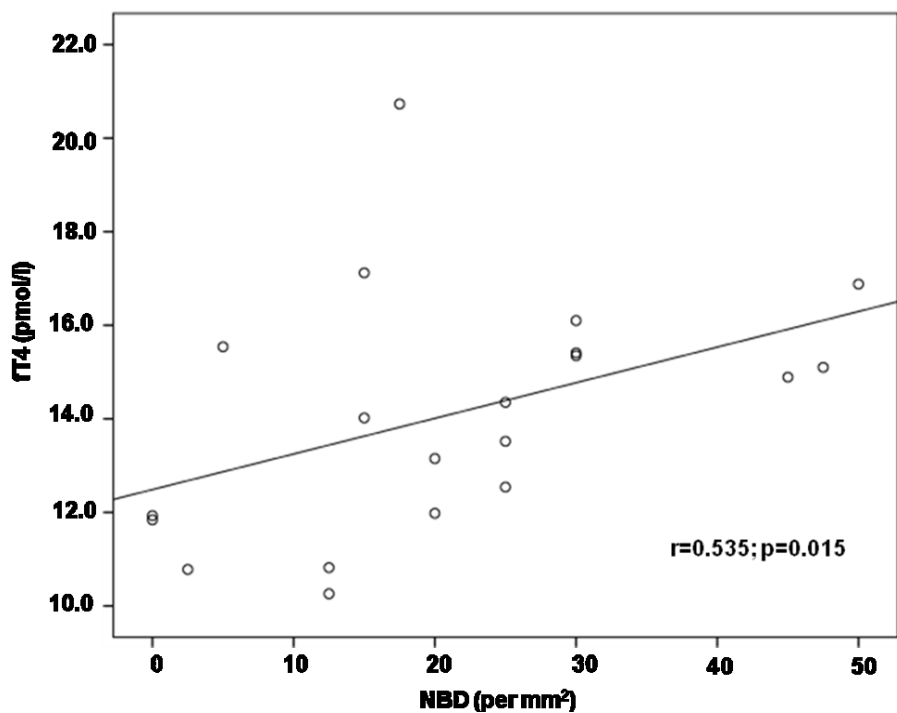
\* Korelační koeficient je statisticky významný na hladině významnosti < 0,05

\*\* Korelační koeficient je statisticky významný na hladině významnosti < 0,01

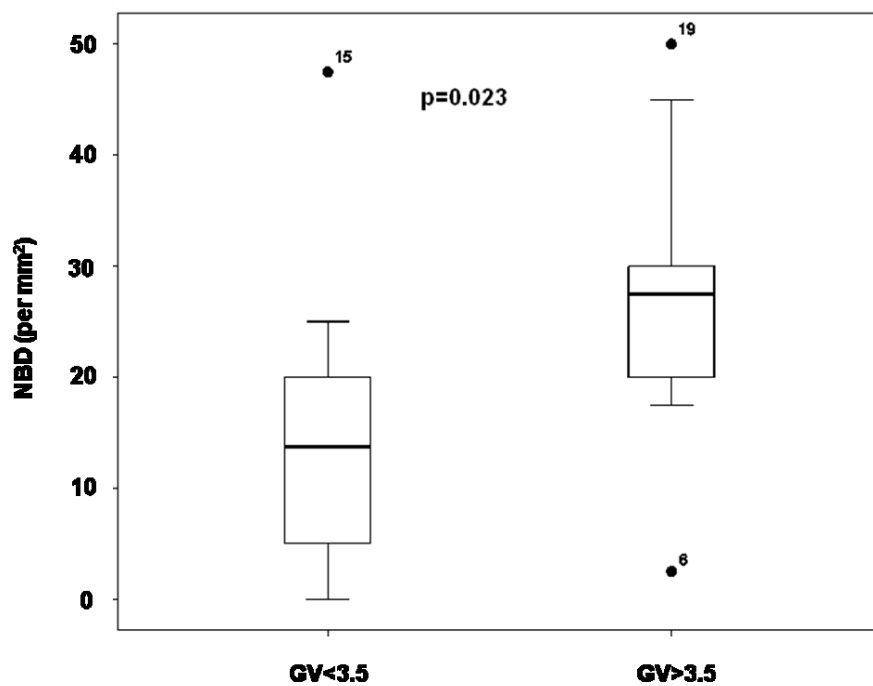
Graf 7 Korelace mezi hladinou volného tyroxinu (fT4; pmol/l) a densitou nervových vláken rohovky (NFD; No/ mm<sup>2</sup>)



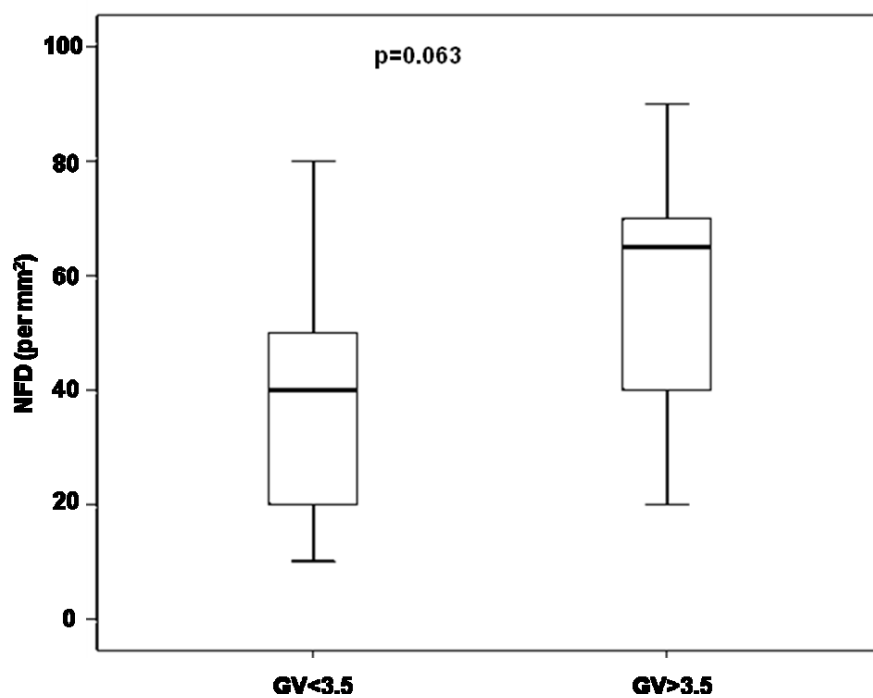
Graf 8 Korelace mezi hladinou volného tyroxinu (fT4; pmol/l) a densitou bodů větvení nervových vláken rohovky (NBD; No/ mm<sup>2</sup>)



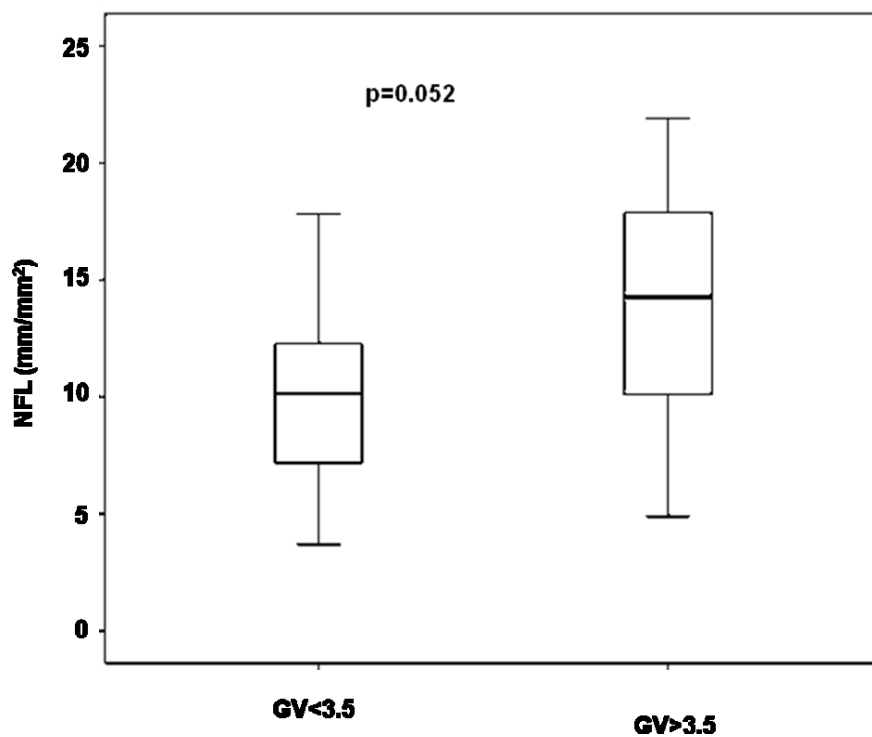
Graf 9 Efekt glykemické variability (GV; mezní hodnota GV=3,5 mmol/l) na denzitu bodů větvení nervových vláken rohovky (NBD; No/mm<sup>2</sup>)



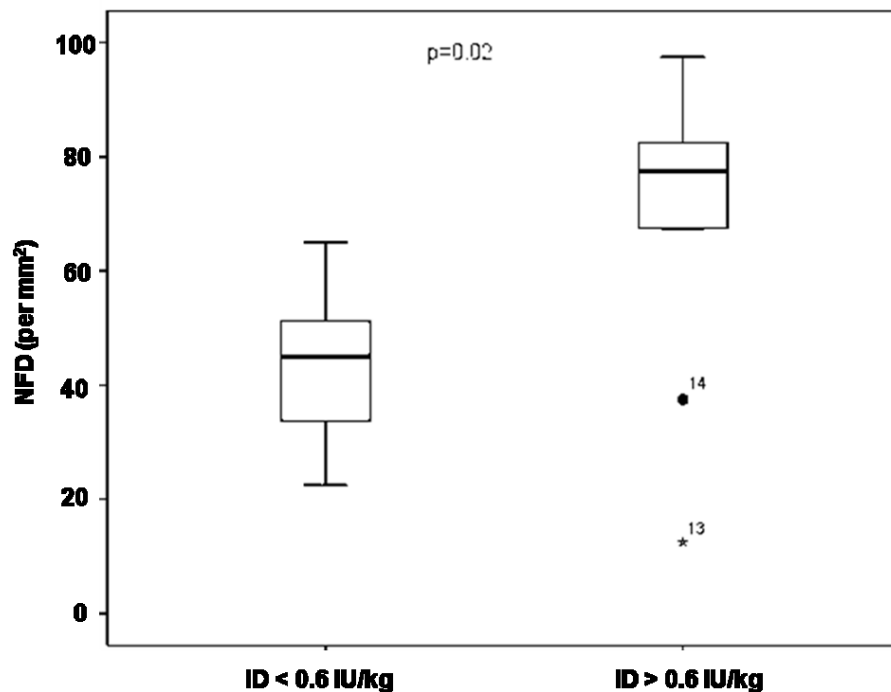
Graf 10 Efekt glykemické variability (GV; mezní hodnota GV=3,5 mmol/l) na denzitu nervových vláken rohovky (NFD; No/mm<sup>2</sup>)



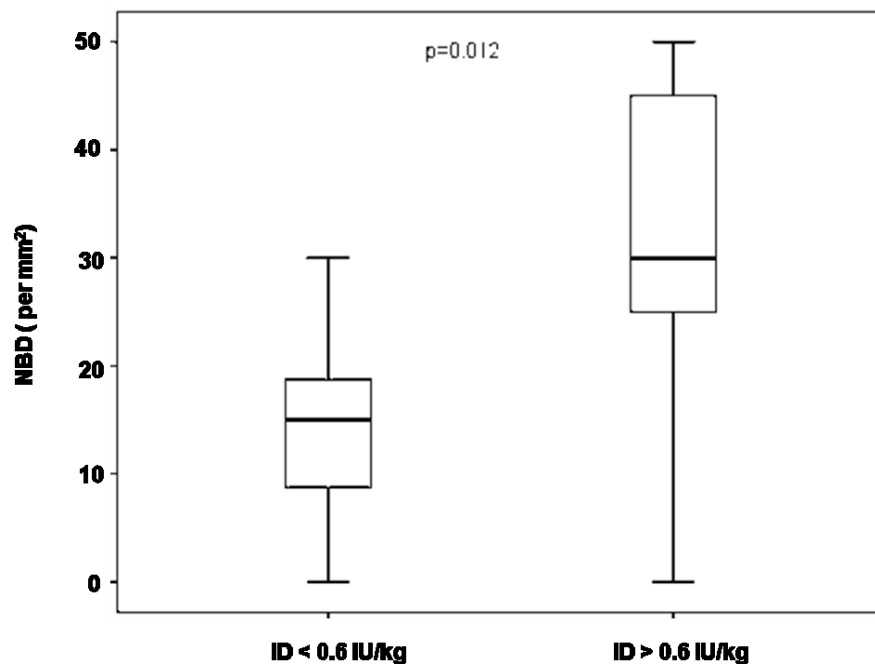
Graf 11 Efekt glykemické variability (GV; mezní hodnota GV=3,5 mmol/l) na celkovou délku nervových vláken rohovky (NFL; mm/mm<sup>2</sup>)



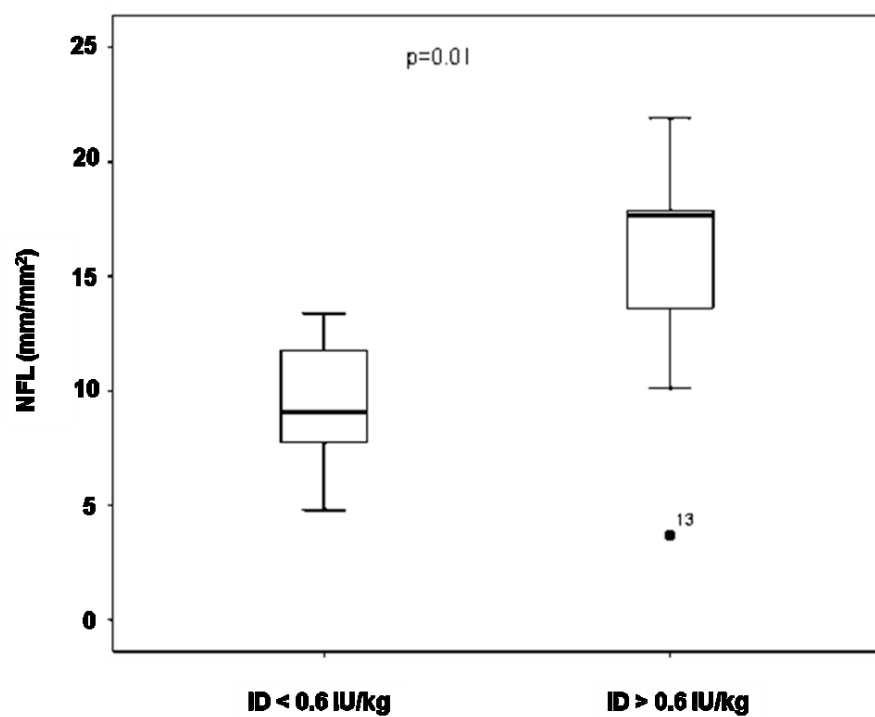
Graf 12 Efekt celkové inzulínové dávky (ID; mezní hodnota ID=0.6 IU/kg) na denzitu nervových vláken rohovky (NFD; No/mm<sup>2</sup>)



Graf 13 Efekt celkové inzulínové dávky (ID; mezní hodnota ID=0.6 IU/kg) na denzitu bodů větvení nervových vláken rohovky (NBD; No/mm<sup>2</sup>)



Graf 14 Efekt celkové inzulínové dávky (ID; mezní hodnota ID=0.6 IU/kg) na celkovou délku nervových vláken rohovky (NFL; mm/mm<sup>2</sup>)



## 6. Diskuze

V celosvětovém měřítku představuje DM jeden z nejzávažnějších zdravotních problémů. U pacientů s DM se vlivem dlouhodobě působící hyperglykémie rozvíjí chronické mikrovaskulární poškození. V popředí zájmu stále zůstává zrak ohrožující DR. Diabetické komplikace postihují také tkáň povrchu oka, včetně rohovky. Souvislost mezi DM a poškozením jednotlivých vrstev rohovky, označovaným jako diabetická keratopatie, je obecně akceptována. Předpokládá se, že se rozvine u dvou třetin pacientů (Shih K.C. et al., 2017, Threatt J. et al., 2013). Zahrnuje změnu denzity buněk bazálního epitelu, keratocytů či endotelu rohovky, a především progresivní poškození nervových vláken rohovky, tzv. rohovkovou neuropatii (Han S.B. et al., 2019).

### Denzita bazálního epitelu

V předchozích studiích hodnotících buňky epitelu u zdravých subjektů ve vztahu k věku se nepodařilo nalézt signifikantní korelaci mezi denzitou buněk bazálního epitelu a věkem (Gambato C. et al., 2015, Niederer R.L. et al., 2007, Vanathi M. et al., 2003, Deák E.A. et al., 2019), ačkoliv byl trend úbytku buněk epitelu s věkem ve studiích naznačen (Niederer R.L. et al., 2007, Vanathi M. et al., 2003). Dále se předpokládá pokles počtu buněk bazálního epitelu vlivem hyperglykemií navozené apoptózy, který byl prokázán na myším modelu ve studii, kdy byl u zvířat diabetes navozen streptozotocinem. Snížená denzita buněk epitelu byla zjištěna při hodnotách hladiny glukózy zvýšené o 200 % nad normu (Cai D. et al., 2014).

V naší studii nebyl potvrzen významný rozdíl mezi denzitou buněk bazálního epitelu u pacientů s DM 1 a kontrolní skupinou. Zároveň bylo zjištěno, že denzita buněk bazálního epitelu se naopak s věkem zvyšovala. Nicméně podle našich výsledků spojitost s věkem vymizela po stanovení diagnózy DM 1. Naše výsledky mohou naznačovat, že DM 1 má na denzitu bazálních epitelálních buněk opačný vliv než věk.

Některé z předchozích studií, které se zabývaly DM 2, zaznamenaly pokles denzity buněk bazálního epitelu (Dehghani C. et al., 2016, Bitirgen G. et al., 2014, Quadrado M.J. et al., 2006). Z etiopatogenetického hlediska je DM 1 zásadně odlišná choroba než DM 2. Současně byl věk subjektů ve studovaných souborech vyšší (cca 60 let), což by mohlo vysvětlit, proč se nám nepodařilo najít významný rozdíl mezi počtem buněk

bazálního epitelu ve skupině s DM 1 a kontrolní skupinou. Vysvětlením našich výsledků může být protichůdný vliv věku a působení DM 1.

V slzách diabetických pacientů byla popsána zvýšená hladina IGFBP3 (Wu Y.C. et al., 2012). IGFBP3 patří do rodiny proteinů s vyšší afinitou k receptoru IGF-1, která slouží k sekvestraci extracelulárního IGF-1 a zabránění aktivace IGF-1 receptoru (Baxter R.C., 2000). Bylo prokázáno, že IGFBP3 ovlivňuje inzulinovou resistenci a apoptózu v různých typech buněk na IGF-1 nezávislou cestou (Muzumdar R.H. et al., 2006, Jia Y. et al., 2010). To naznačuje, že dlouhodobé zvýšení exprese IGFBP3 může přispět k patogenezi abnormalit epitelu rohovky u pacientů s diabetem prostřednictvím zeslabení normální signalizace IGF-1. V některých studiích s DM 1 pacienty naopak nebylo nalezeno signifikantní zvýšení IGFBP3, pravděpodobně v důsledku zkreslení výsledků při současné léčbě inzulinem (Song F. et al., 2016, Wu Y.C. et al. 2012). Dále bylo prokázáno, že léčba inzulinem obnovuje cirkadiánní rytmus dělení buněk epitelu rohovky u diabetických myší (Song F. et al., 2016).

Léčba subjektů s DM 1 inzulinem může být dalším důvodem, proč jsme v naší studii nepozorovali pokles denzity buněk bazálního epitelu ve srovnání se zdravými jedinci (Klocek M.S. et al., 2009).

### **Denzita buněk stromatu**

Výsledky týkající se účinku DM na denzitu buněk stromatu jsou protichůdné. Někteří autoři nenašli rozdíl v počtu buněk stromatu mezi DM 2 nebo DM 1 a kontrolními subjekty. (Quadrado M.J. et al., 2006, Dehghani C. et al., 2016). Szalai et al. našel vyšší denzitu buněk stromatu u pacientů s DM 1 bez DR ve srovnání s kontrolami (Szalai E. et al., 2016).

V naší studii byla zaznamenána nižší denzita buněk v předním stromatu rohovky diabetických pacientů (nejvíce vyjádřeno ve skupině bez DR) a kontrolními subjekty. Nebyl zjištěn rozdíl v denzitě buněk v zadním stromatu mezi skupinami s DM 1 a zdravými subjekty.

Výsledky jsou v souladu se studií Bitirgen et al., který také prokázal sníženou denzitu buněk v předním stromatu u pacientů s DM 2, ale žádný rozdíl v denzitě buněk v zadním stromatu ve srovnání s kontrolními subjekty (Bitirgen G. et al., 2014).

V naší práci jsme na rozdíl od jejich výsledků prokázali nejvýraznější snížení denzity buněk v předním stromatu u pacientů s DM 1 bez DR, ve které byl nižší průměrný věk. V souladu s předchozími studiemi jsme prokázali, že denzita buněk jak předního, tak

zadního stromatu se snižuje s věkem (Dehghani C. et al., 2016, Gambato C. et al., 2015, Niederer R.L. et al., 2007). Po stanovení diagnózy DM 1 se závislost denzity buněk stromatu s věkem oslabuje. To může opět naznačovat, že DM 1 a/nebo léčba inzulinem má vliv na regulaci počtu buněk stromatu.

### **Denzita endotelu**

Studie prokázaly, že diabetem navozené změny endotelu ovlivňují jeho permeabilitu, čímž je porušena jeho bariérová funkce. Dále se zvyšuje polymegetismus a pleomorfismus buněk endotelu a současně se snižuje denzita buněk endotelu v porovnání s kontrolní skupinou obdobného věku (Inoue K. et al., 2002, Calvo-Maroto A.M. et al., 2015, Sudhir R.R. et al., 2012, Szalai E. et al., 2016). Bitirgen et al. popsali sníženou denzitu endotelových buněk pouze u pacientů s DM 2 s proliferativní DR (Bitirgen G. et al., 2014). Byla také nalezena souvislost mezi HbA1c a stupněm DR (Sudhir R.R. et al., 2012, Modis L.J.R. et al., 2010).

V naší studii jsme potvrdili obecně známý vliv věku na pokles denzity endotelových buněk (Gambato C. et al., 2015, Niederer R.L. et al., 2007). V naší studii nebyl překvapivě zjištěn žádný rozdíl v denzitě buněk endotelu při srovnání pacientů DM 1 se zdravými subjekty. Zdá se však, že vliv věku na denzitu endotelu se oslabí po stanovení diagnózy DM 1, což bylo obdobně pozorováno u denzity keratocytů. Zjištění může opět naznačovat, že DM 1 a/nebo léčba inzulinem má vliv na denzitu buněk endotelu. Tento efekt by tedy měl být posouzen v dalších studiích.

V naší studii nebyla nalezena žádná souvislost mezi trváním DM 1, hodnotou HbA1c či stupněm diabetické retinopatie a denzitou buněk v jednotlivých vrstvách rohovky.

### **Stav nervových vláken**

Bylo prokázáno, že DM ovlivňuje stav subbazálních nervových vláken rohovky (Papanas N. and Ziegler D., 2015, Jiang M.S. et al. 2016, Petropoulos I. N. et al., 2018, Deák EA et al., 2019). Porovnání výsledků z různých studií je však komplikované vzhledem k rozdílné metodice a/nebo použití odlišných přístrojů pro konfokální mikroskopii rohovky. Hodnoty získané použitím různých typů zařízení nejsou přímo srovnatelné (Erie E.A. et al., 2008, Szaflik J.P. et al., 2007). Obecně platí, že hodnoty NFD (obvykle definovány jako denzita hlavních nervových vláken) jsou vyšší při použití SSCM v porovnání s LSCM. Nižší rozlišení SSCM může vysvětlit obtíže



při rozpoznávání hlavních vláken, což vysvětluje jejich nadhodnocení (Tavakoli M. et al., 2015, Petropoulos I.N. et al., 2015).

V naší studii jsme hodnotili také parametr t-NFD, ale nezdálo se, že by to mohl být vhodnější parametr ve srovnání s NFD. Jako velmi vhodný se jeví parametr NFL. Hodnoty NFL jsou často nižší při použití SSCM, na rozdíl od NFD, které jsou naopak lehce nadhodnoceny (Tavakoli M. et al., 2012, Petropoulos I.N. et al. 2015, Jiang M.S. et al., 2016).

Panuje neshoda ohledně vlivu věku na denzitu nervových vláken rohovky (Oliveira-Soto L. a Efron N, 2001, Patel D.V. et al., 2009, Erie J.C. et al., 2005). Tavakoli M. et al. při vytváření normativní databáze hodnot sledovaných parametrů nervových vláken prokázali mírný vliv věku na tyto parametry (Tavakoli M et al., 2015).

V naší studii nebyl zjištěn vliv věku na stav nervových vláken v DM 1 a kontrolním vzorku. Naší studii však tvořili mladší pacienti ve věku 22-49 let. V některých studiích bylo prokázáno významné snížení denzity nervových vláken rohovky s věkem, ale věk pacientů byl ve studiích výrazně vyšší (věk cca 70 let a starší) (He J. et al., 2010, Reichard M. et al., 2014).

V naší studii, obdobně jako v jiných studiích, jsme prokázali pokles parametrů NFD, t-NFD, NBD a NFL u pacientů s DM 1 ve všech skupinách (bez DR, lehká DR, těžká DR) ve srovnání se zdravými subjekty (Tavakoli M et al. 2012, Messmer E.M. et al., 2010, Tavakoli M. et al., 2010, Chang P.Y. et al., 2006, Papanas N.a Ziegler D., 2015). Dále jsme prokázali ve shodě s předešlými pracemi nižší hodnoty NFD i NFL u pacientů s těžkou DR v porovnání se skupinou pacientů s lehkou DR (Utsunomiya T., et al., 2015, Nitoda E. et al. 2012) a dále u pacientů bez DR ve srovnání se zdravými jedinci. Naopak mezi zdravými jedinci a pacienty s lehkou DR se hodnoty NFL nelišily. Dále bylo v naší studii zjištěno výraznější poškození nervových vláken u pacientů s těžkou DR, než u pacientů bez DR. Tento výsledek může naznačovat nelineárnost výskytu jednotlivých orgánových komplikací u pacientů s DM 1. Zhivov et al. v souladu s našimi výsledky uvádí rovněž statisticky významně nižší hodnoty NFD i NFL již u pacientů s DM 1 bez klinicky prokazatelné DR ve srovnání se zdravými jedinci (Zhivov A., et al., 2013). Ve studii Utsunomiya et al. se, obdobně jako v našem publikovaném souboru, počet nervových vláken i jejich celková délka u pacientů bez DR statisticky významně nelišily od skupiny pacientů s lehkou DR či těžkou DR a jejich průměrná hodnota se dokonce spíše blížila hodnotě pacientů s těžkou DR (Utsunomiya T. et al., 2015). Vysvětlením může být polymorfismus

mikrovaskulárních komplikací vedoucích k DR a rohovkové neuropatii (Hosseini S.M. et al., 2015). Dle Hafnera et al. je možné vysvětlení hledat v odlišné patogenezi rohovkových a sítnicových změn. Neurodegenerativní změny sítnice jsou na rozdíl od neurodegenerativních změn bezcévné rohovky spojeny s kombinovaným efektem metabolických neurodegenerativních vlivů a vlivu poškození retinální mikrovaskulární perfuze (Hafner J. et al., 2019). Jiným možným vysvětlením může být fakt, že diagnostika počínající DR vede u pacientů s DM 1 k intenzifikaci terapie a/nebo k zodpovědnějšímu přístupu pacienta k léčbě, a tím ke zlepšení kompenzace, což může umožnit částečnou regeneraci nervových vláken (Mehra S. et al., 2007, Tavakoli M. et al., 2013).

V našem souboru ovšem této hypotéze neodpovídají aktuální hodnoty glykovaného hemoglobinu, i když tento parametr nezobrazuje dynamiku vývoje onemocnění v delším časovém úseku, jenž je zásadní pro pomalý rozvoj chronických orgánových komplikací, včetně neuropatie (Gorst C. et al., 2015). Rovněž stav subbazálního plexu rohovky u DM 1 může ovlivňovat samotná léčba inzulinem (Chen D.K. et al., 2013).

Dalším prokázaným významným faktorem pro rozvoj orgánových komplikací je doba trvání DM 1 (Lorenzi G.M. et al., 2015).

V našem souboru se doba trvání DM 1 ve skupině bez DR a s lehkou DR nelišila.

Tortuozita nervových vláken je běžně hodnocený parametr sloužící k popisu změn sub-bazálního plexu. Přesto stále neexistuje jednotná metodika jeho hodnocení (Lagali N. et al., 2015). V naší studii byla použita metoda popsána Heneghanem a kol., která byla navržena pro hodnocení tortuozity sítnicových cév (Heneghan C. et al., 2002).

V souladu s předchozími studiemi jsme zaznamenali zvýšenou NFT u pacientů s DM 1 ve srovnání se zdravou kontrolní skupinou. Předchozí studie prokázaly možnou pozitivní vazbu mezi NFT s DR (Chang P.Y. et al., 2006, Lagali N et al., 2015, Nitoda E. et al., 2012). Dále jsme zjistili, že NFT se zvyšuje se stupněm DR.

Poškození cévního zásobení nervů (vasa nervorum) již není považováno za jediný etiopatogenetický faktor pro vznik DN. Existují důkazy, že diabetes způsobuje apoptózu jak nervových, tak vaskulárních složek. Je tedy dobrý důvod definovat diabetickou neuropatii a retinopatii jako formu chronické neurovaskulární degenerace (Barber A.J. et al., 2011, Zochodne D.W., 2015, Shih K.C. et al., 2017).

Z tohoto hlediska není pozorovaná souvislost mezi poškozením subbazálních nervových vláken a stupněm diabetické retinopatie v naší studii překvapivím. Dle výsledků Hafnera et al. by mohla bezcévná rohovka představovat možný ojedinělý

model neurodegenerativních změn bez přidaného vlivu poškození mikrovaskulární perfuze (Hafner J. et al., 2019).

### **Vliv věku a věku v době diagnózy DM 1 na stav nervových vláken**

Prokázaný vliv věku v době diagnózy DM 1 může předznamenávat větší citlivost mladších jedinců k trvalému poškození nervových vláken. Dle Davidsona et al. vysvětlení spočívá ve stále probíhajícím vývoji nervových vláken rohovky u mladších jedinců nebo dětí (Davidson E.P. et al., 2012).

V naší práci nebyl nalezen žádný vztah mezi dobou trvání DM 1 nebo HbA1c a sledovanými parametry nervových vláken. Výsledky však poukázaly na možný vztah mezi věkem v době diagnózy DM 1 a stavem nervových vláken, což je důležité a nově popsané zjištění.

V naší studii prokázané nepříznivé účinky DM 1 na NFD se zdály být rovněž více vyjádřeny u pacientů, u kterých byla DM 1 diagnostikována v mladším věku. Rozvoj onemocnění DM 1 v mladším věku může zpomalit až zastavit vývoj nervů a přispět tím k rozvoji degenerace nervových vláken (Davidson E.P. et al., 2012). Navíc pro mladé lidi a adolescenty je společným jmenovatelem obtížné udržení celkové kompenzace a ochota dodržovat léčebný režim (non-compliance). Tyto faktory mohou také přispět k výraznějšímu poškození nervových vláken.

Hlavním limitujícím faktorem prezentované studie bylo nízké rozlišení mikroskopu SSCM. Pro své kvalitnější axiální rozlišení je v současné době pro hodnocení nervových vláken rohovky častěji používán systém LSCM (Villani E. et al., 2014). Naše výsledky jsou však v souladu s předchozími studiemi používajícími pro zobrazení rohovky SSCM (Tavakoli M. et al., 2012, Wang E.F. et al., 2015). Rovněž je v naší studii prokázaný vliv DM na subbazální nervová vlákna v souladu s výsledky studií používajících LSCM, přestože se absolutní hodnoty parametrů lišily.

### **Vliv klinických faktorů na nervová vlákna rohovky**

Rozsáhlá studie Diabetes Control and Complications Trial přesvědčivě prokázala, že riziko zvýšení mikrovaskulárních komplikací se zvyšuje s nárůstem HbA1c. (Nathan D.M. et al., 1993). Nicméně i v rámci stejných průměrných hladin HbA1c se mohou jednotlivci lišit v počtu a stupni glykemických exkurzí. Nedávné studie ukázaly, že to může být další rizikový faktor pro rozvoj diabetické retinopatie a nefropatie (Jung H.S. et al., 2015, Hermann J.M. et al., 2014, Hietala K., et al., 2013, Marcovecchio

M.L. et al., 2011, Takao T. et al., 2011). Výsledky studií hodnotících souvislost mezi kolísáním GV nebo HbA1c a rizikem diabetické neuropatie jsou však kontroverzní (Jung H.S. et al., 2015, Virk S.A. et al., 2016). Virk et al. zjistil souvislost mezi GV a kardiovaskulární autonomní neuropatií (Virk S.A. et al., 2016). Kromě toho Virk et al. ve své studii popsal podstatně vyšší vliv GV než průměrné hodnoty HbA1c na rozvoj mikrovaskulárních komplikací dospívajících s DM 1. Naproti tomu rozvoj periferní neuropatie neměl souvislost ani s průměrnou hodnotou HbA1c ani GV. Vzhledem k vysoké statistické síle studie autoři předpokládají, že výsledky mohou odrážet další neznámé patogenetické faktory (Virk S.A. et al., 2016). I když někteří autoři zjistili, že hladiny HbA1c jsou nezávislým prediktivním faktorem změn rohovkových vláken, zejména parametrů NFL a NFD u pacientů s DM 1 (Edwards K. et al. 2012, Ishibashi F. 2012 a 2016), jiní autoři souvislost s HbA1c neprokázali (Szalai E. et al., 2016) nebo našli spojení s jinými parametry celkové kompenzace (Dehghani C. et al. 2016).

V naší studii jsme nenalezli závislost mezi hodnotami HbA1c a změnami sledovaných parametrů nervových vláken rohovky. Překvapivě jsme však zjistili vyšší hodnoty NFL a NBD u pacientů s vyšší GV. Felicio et al. již dříve zdokumentoval závislost mezi GV a ID (Felicio K.M. et al., 2018).

V naší studii jsme dále prokázali významný vliv celkové ID na kilogram na stav nervových vláken rohovky. Celková ID na kilogram může tedy být jedním z faktorů, v naší studii potvrzeným, které naznačují Virk et al. (Virk S.A. et al., 2016).

Již dříve bylo zjištěno, že inzulín nepůsobí pouze na regulaci metabolismu glukózy. Bylo prokázáno, že inzulín podporuje regeneraci nervů periferního nervového systému (Zochodne D.W. et al., 2015). Dokonce i nízké dávky intratekálně podaného inzulinu byly schopny zvrátit elektrofyziologické i strukturální změny experimentálně navozené diabetické neuropatie (Brussee V. et al., 2004). Navíc inzulín aplikovaný na rohovku diabetických myší zabránil ztrátě nervových vláken subbazálního plexu detekovaného pomocí IVCN (Chen D.K. et al., 2013). Vyšší celková dávka inzulinu u pacientů s vyšším GV tedy může vysvětlit lepší stav nervových vláken rohovky a může také vysvětlit nejednotné výsledky studií hodnotících vztah mezi neuropatií a jinými parametry kontroly glykémie. Je otázkou, zda je toto zlepšení stavu nervových vláken rohovky důsledkem lepší kompenzace glykémie na základě léčby CSII či je způsobeno neuroprotektivním účinkem inzulinu jako takového.

Bylo prokázáno, že inhibitory angiotenzin konvertujícího enzymu (ACEI) mají potenciálně neuroprotektivní efekt (Shih K.C. et al., 2017). Vzhledem k tomu, že v naší

studii byl počet pacientů léčených ACEI ve skupinách se sledovanou GV i ID téměř stejný, je nepravděpodobné, že by tento faktor interferoval s našimi výsledky.

Sérové abnormality hormonů štítné žlázy jsou u pacientů s DM běžné (Moura Neto A. et al., 2016, Duntas L.H. et al., 2011, Ferrannini E. et al., 2017).

V naší studii byla zjištěna možná souvislost mezi volnými hladinami hormonů štítné žlázy (konkrétně fT4) a hodnocenými parametry nervových vláken rohovky. Bylo prokázáno, že tyroxin zvyšuje hladinu NGF a zvyšuje regeneraci nervů (Oble D.A. et al., 2004). Ve vyvíjejícím se kuřecím zárodku exogenně podaný tyroxin zvyšuje prodlužování nervů (Conrad A.H. et al., 2008). Receptory pro hormony štítné žlázy jsou přítomny ve všech vrstvách rohovky (Conrad A.H. et al., 2006). Účinky tyroxinu na regeneraci rohovkových nervů však známy nejsou (Shaheen B.S: et al. 2014). Nedávno byla vyslovena hypotéza, že jedním z možných vlivů ovlivňujících rozvoj diabetických změn, je nerovnováha v aktivitě enzymu dejodázy. Vyšší hladina glukózy v krvi a/nebo inzulínová rezistence může snížit aktivitu dejodázy a snížit tak periferní konverzi hormonu thyroxinu (T4) dejodázou na trijodthyronin (T3). Případně může nedostatečná kontrola glykémie působit přes zvýšenou aktivitu prozánětlivých mediátorů a tím ovlivnit hladiny thyroidních hormonů (Moura Neto A. et al., 2016). S ohledem na tyto skutečnosti může být pozorovaná asociace mezi hladinou volného thyroxinu (fT4) a rohovkovými nervovými vlákny pouze náhodná a zavádějící, bez skutečné příčinné souvislosti.

Hlavním možným limitem této části naší prospektivní studie je relativně malý počet zařazených pacientů. Hodnoceni byli pouze pacienti s kompletními klinickými údaji, což samozřejmě omezilo počet studovaných subjektů. I přes malou studijní skupinu však mohou mít zjištěná data zásadní význam. Podle dostupných informací nebyl možný vliv celkové ID v předchozích studiích testován. Celková dávka inzulínu (ID na kilogram) však může být důležitým faktorem ovlivňujícím stav nervových vláken u pacientů s DM 1 a je třeba ho v budoucích studiích zaměřených na diabetickou neuropatii zohlednit.

Vzhledem k tomu, že je DM multifaktoriální chronické onemocnění, je důležité dobře rozlišit změny, které vyvolává rozvoj samotného onemocnění, od změn, jež jsou způsobeny sekundárními komplikacemi (Shih K.C. et al., 2017), nebo léčbou DM.

## 7. Závěr

Závěrem uvádím odpovědi na cíle dizertační práce

### 1. Rozdíly v denzitě epitelálních, stromálních a endotelových buněk mezi skupinou pacientů s DM 1 a skupinou zdravých jedinců.

#### Denzita bazálního epitelu

Nebyl potvrzen významný rozdíl mezi denzitou buněk bazálního epitelu u pacientů s DM 1 a kontrolní skupinou. Denzita buněk bazálního epitelu se s věkem navyšovala.

Spojitosť s věkem vymizela po stanovení diagnózy DM 1.

Naše výsledky mohou naznačovat, že léčba inzulinem u pacientů s DM 1 má na denzitu epitelálních buněk opačný vliv než věk.

#### Denzita keratocytů

Byla zaznamenána nižší denzita keratocytů v předním stromatu diabetických pacientů (nejvíce vyjádřeno ve skupině bez DR) a kontrolními subjekty. Nebyl zjištěn rozdíl v denzitě keratocytů v zadním stromatu mezi skupinami s DM 1 a zdravými subjekty.

Spojitosť s věkem na denzitu keratocytů se po stanovení diagnózy DM 1 oslabila.

Naše výsledky mohou naznačovat, že DM 1 a/nebo léčba inzulinem má pozitivní vliv na denzitu keratocytů.

#### Denzita endotelu

Potvrdili jsme známý vliv věku na denzitu endotelových buněk.

Nebyl prokázán rozdíl v denzitě buněk endotelu při srovnání pacientů DM 1 se zdravými subjekty.

Závislost denzity endotelu na věku se po stanovení diagnózy DM 1 oslabila.

Naše výsledky mohou naznačovat, že DM 1 a/nebo léčba inzulinem má pozitivní vliv na denzitu endotelu.

Neprokázáli jsme souvislost mezi trváním DM 1, hodnotou HbA1c či stupněm diabetické retinopatie a denzitou buněk v jednotlivých vrstvách rohovky.

Asociace věku a denzity buněk rohovky se po stanovení diagnózy DM 1 oslabila.

Je třeba tento možný vliv DM ověřit v dalších studiích.

## **2. Stav nervových vláken subbazálního nervového plexu rohovky a možná souvislost mezi změnami v rohovce a stupněm DR**

### Stav nervových vláken

Prokázali jsme pokles parametrů NFD, t-NFD, NBD a NFL u pacientů s DM 1 ve všech skupinách (bez DR, lehká DR, těžká DR) ve srovnání se zdravými subjekty.

Prokázali jsme výraznější úbytek nervových vláken (nižší hodnoty NFD i NFL) u pacientů s těžkou DR v porovnání se skupinou pacientů s lehkou DR, dále u pacientů bez DR ve srovnání se zdravými jedinci. Naopak mezi zdravými jedinci a pacienty s lehkou DR se hodnoty NFL nelišily.

Prokázali jsme výraznější poškození nervových vláken u pacientů s těžkou DR, než u pacientů bez DR.

Prokázali jsme zvýšenou NFT u pacientů s DM 1 ve srovnání s kontrolní skupinou, NFT se zvyšovala se stupněm DR.

Prokázali jsme úbytek nervových vláken subbazálního nervového plexu rohovky u pacientů s DM 1 ve všech skupinách pacientů s DM 1 (bez DR, lehká DR, těžká DR) ve srovnání se zdravými subjekty.

Výsledky mohou naznačovat nelineárnost výskytu jednotlivých orgánových komplikací u pacientů s DM 1. Vysvětlením může být kombinovaný efekt vaskulárních a neurodegenerativních vlivů.

## **3. Možná souvislost mezi změnami v rohovce a dobou trvání DM 1, věkem v době diagnózy DM 1 a kompenzací diabetu (HbA1c).**

### Denzita buněk rohovky

Neproukázali jsme souvislost mezi trváním DM 1, hodnotou HbA1c a denzitou buněk v jednotlivých vrstvách rohovky.

### Stav nervových vláken

Nebyl zjištěn vliv věku, trvání DM 1 nebo hodnoty HbA1c na sledované parametry nervových vláken rohovky.

Byl prokázán možný vliv věku v době diagnózy DM 1 na sledované parametry nervových vláken rohovky, což je důležité a nově popsané zjištění.

#### **4. Závislost parametrů kompenzace diabetu (tj. HbA1c, glykemické variability vyjádřené jako standardní odchylka glykémie a dávkou inzulínu na kilogram) a stavem subbazálního nervového plexu rohovky u pacientů s DM 1 léčených v intenzifikovaném inzulínovém režimu.**

##### Vliv parametrů kompenzace glykémie

Neprokázali jsme závislost mezi hodnotami HbA1c a změnami sledovaných parametrů nervových vláken rohovky.

Prokázali jsme vyšší hodnoty parametrů stavu nervových vláken (NFL a NBD) u pacientů s vyšší glykemickou variabilitou.

Prokázali jsme vztah mezi parametry nervových vláken rohovky a celkovou denní dávkou inzulínu na kilogram.

Celková denní dávka inzulínu na kilogram může tedy být jedním z dalších faktorů, který jako faktor ovlivňující stav nervových vláken u diabetické neuropatie DM 1 pacientů, nebyl dosud testován. V budoucnu plánujeme dále testovat dynamiku parametrů celkové kompenzace při intenzifikovaném inzulínovém léčebném režimu ve vztahu k rohovkové keratopatii a možnému neuroprotektivnímu efektu.

Během posledních deseti let byl v mnoha studiích dokumentován potenciální přínos rozvíjející se IVCM pro popis změn rohovky, včetně změn nervových vláken rohovky při celé řadě očních i celkových onemocněních a především DM. Lidská rohovka obsahuje nejhustší síť senzorických nemyelinizovaných axonů v lidském těle. Ukazuje se, že bezcévná rohovka může představovat biomodel neurodegenerativních změn s vyloučením efektu mikrovaskulární perfuze. In vivo konfokální mikroskopie rohovky se jeví jako ideální neinvazivní klinická technika, která může hodnotit mikroskopické patologické změny rohovky. Změny morfologie rohovkových nervů předcházejí klinickým projevům neurodegenerativních změn jinde v organismu. Patofyziologie chronických změn DM je předmětem širokého zájmu vědeckých výzkumných týmů po celém světě, proto má tato neinvazivní a relativně snadno proveditelná vyšetřovací metoda významný diagnostický, klinický i výzkumný význam. Konfokální mikroskopie rohovky prokázala velký potenciál v oblasti získávání důležitých informací, které jsou potřebné k objasnění vzájemných a komplikovaných patofyziologických mechanismů ovlivňujících průběh DM.



## 8. Souhrn

**Úvod:** Vztah diabetes mellitus (DM) k diabetické keratopatii a změnám nervových vláken rohovky je již obecně akceptován. Diabetická neuropatie zároveň patří mezi nejčastější dlouhodobé komplikace DM. Pro prevenci této komplikace je nezbytná dobrá kontrola glykémie. Pacienti s DM s obdobnou průměrnou hladinou glukózy nebo glykovaného hemoglobinu (HbA1c) však často vykazují rozdíly v rozvoji diabetických komplikací. Jedním z důvodů těchto rozdílů může být rozdílná glykemická variabilita.

**Hypotéza:** DM poškozuje nervová vlákna subbazálního nervového plexu rohovky a ovlivňuje denzitu epitelálních, endoteliálních a stromálních buněk. Změny v rohovce u pacientů s DM jsou závislé na stupni diabetické retinopatie (DR), na věku v době diagnózy a na době trvání DM a parametrech celkové kompenzace.

**Cíl práce:** Porovnat změny denzity buněk v jednotlivých vrstvách rohovky a stavu subbazálního nervového plexu rohovky u pacientů s DM 1. typu (DM 1) a u zdravých subjektů. Zhodnotit závislost změn rohovky diabetických pacientů na stupni DR, na době trvání DM 1, na věku v době diagnózy DM 1 a na parametrech kompenzace glykémie.

**Metody:** Do studie bylo zařazeno 60 pacientů s DM 1 a 20 zdravých kontrolních subjektů. Účastníci studie byli vyšetřeni in vivo konfokální mikroskopií rohovky (IVCM). Pomocí IVCM jsme hodnotili změny denzity buněk bazálního epitelu, stromatu a endotelu a stav subbazálních nervových vláken rohovky [denzita nervových vláken (NFD), délka nervových vláken (NFL), denzita větvení nervových vláken (NBD) rohovky a tortuozita nervových vláken (NFT)]. Zhodnotili jsme závislost změn rohovky diabetických pacientů na stupni DR, na době trvání a na věku v době diagnózy DM 1 a na parametrech celkové kompenzace. U 20 pacientů s DM 1 v intenzifikovaném inzulínovém režimu byly hodnoceny možné souvislosti mezi parametry kompenzace glykémie (HbA1c, SD glykémie a dávky inzulínu) a dalšími klinickými faktory a stavem nervových vláken rohovky.

**Výsledky:** Denzita bazálních epiteliálních buněk se zvyšovala s věkem ( $p = 0,026$ ), zatímco denzita stromálních buněk a buněk endotelu s věkem klesala ( $p = 0,003$ ,  $p = 0,0005$ ,  $p < 0,0001$ ). Po stanovení diagnózy DM 1 se tato asociace s věkem oslabila. U pacientů s DM 1 jsme prokázali poškození nervových vláken ( $p < 0,0001$ ). Poškození korelovalo se stupněm DR. Čím vyšší byl věk pacientů s DM 1 v době stanovení diagnózy DM 1, tím byla hustota nervových vláken vyšší ( $p = 0,0021$ ). Neprokázali jsem vliv HbA1c na parametry nervových vláken rohovky. NBD byla vyšší u pacientů s vyšší glykemickou variabilitou ( $p = 0,023$ ). NFD, NFL a NBD byly statisticky významně vyšší u pacientů s vyšší celkovou dávkou inzulínu na kilogram váhy ( $p = 0,02$ ,  $p = 0,01$ , resp.  $p = 0,012$ ).

**Závěr:** Naše výsledky naznačují, že věk v době diagnózy DM 1 může mít významný vliv na stav nervových vláken a denzitu buněk rohovky. Důležitým faktorem ovlivňujícím stav nervových vláken rohovky je rovněž celková dávka inzulínu na kilogram a měla by se vzít v úvahu v budoucích studiích diabetické neuropatie a její progresu. Při objasňování vývoje diabetických komplikací musí být věnována větší pozornost i dalším možným celkovým faktorům.

**Klíčová slova:** Konfokální mikroskopie rohovky, Diabetes mellitus 1. typu, Diabetická keratopatie, Nervová vlákna rohovky, Diabetická retinopatie, Diabetická neuropatie, Glykemická variabilita

## 9. Summary

**Introduction:** Relation of diabetes mellitus (DM) to the diabetic keratopathy and various stages of corneal nerve fiber damage has been well accepted. A possible association between changes in the cornea of diabetic patients and diabetic retinopathy (DR), DM duration, and age at the time of DM diagnosis were evaluated. Neuropathies are among the most common long-term complications of diabetes mellitus. Good glycemic control is essential in prevention of this complication. DM patients with similar mean glucose levels or glycated hemoglobin (HbA1c) levels often exhibit differences in evaluation of diabetic complications. One reason for these differences may be the differences in glucose variability.

DM patients with similar mean glucose levels or HbA1c levels often exhibit differences in glucose variability

**Hypothesis:** Diabetes mellitus damages the subbasal nerve fibers of the corneal and affects the density of epithelial, endothelial and stromal cells. Corneal changes in patients with DM are dependent on the degree of diabetic retinopathy (DR), age at diagnosis, duration of DM, and compensation parameters.

**Purpose:** To compare changes in cell density in individual layers of cornea and status of subbasal nerve fibers in patients with type 1 DM (DM 1) and in healthy subjects. To evaluate the dependence of corneal changes in diabetic patients and the degree of DR, duration of DM 1, age at the time of diagnosis of DM 1 and parameters of glycemic compensation.

**Methods:** The study included 60 patients with DM 1 and 20 healthy control subjects. The subjects were examined using in vivo corneal confocal microscopy (IVCM). The density of basal epithelial cells, keratocytes and endothelial cells, and the status of the subbasal nerve fibers [corneal nerve fiber density (NFD), nerve fiber length (NFL), and nerve branch density (NBD)] were evaluated using IVCM. We evaluated the dependence of corneal changes in diabetic patients and the degree of DR, duration of DM 1, age at the time of diagnosis of DM 1 and parameters of glycemic compensation.

Among 20 patients with DM 1 treated with an intensified insulin regimen, possible associations between the status of the subbasal nerve fibers and parameters of glycemic compensation (HbA1c, glycemia SD, and insulin dose), and other clinical factors were evaluated.

**Results:** Basal epithelial cell density increased with age ( $p=0.026$ ), while stromal and endothelial cell density decreased with age ( $p=0.003$ ,  $p=0.0005$ ,  $p<0.0001$ ). After the DM 1 diagnosis was established, this association with age weakens. We proved nerve fiber damage in DM 1 patients ( $p<0.0001$ ). The damage correlated with the degree of DR. DM 1 patients with higher age at DM 1 diagnosis had a higher nerve fiber density ( $p=0.0021$ ). HbA1c had a negligible effect on corneal nerve parameters. Also, NBD was the highest in those with higher glycemic variability ( $p = 0.023$ ). NFD, NFL, and NBD were statistically significantly higher in those with higher total insulin per kilogram ( $p = 0.02$ ,  $p = 0.01$ , and  $p = 0.012$ , respectively).

**Conclusion:** These results indicate that age at DM 1 diagnosis has an important effect on final nerve fiber and corneal cell density. Total insulin dose per kilogram may be an important factor influencing nerve fiber status and needs to be considered in future studies of diabetic neuropathy and its progression. Also, more attention must be paid to other possible factors when elucidating the development of diabetic complications.

**Key words:** Corneal confocal microscopy, Diabetes mellitus type 1, Diabetic keratopathy, Corneal nerve fiber, Diabetic retinopathy, Diabetic neuropathy, Glucose variability

## 10. Literatura

1. Ahmed A, Bril V, Orszag A, et al: Detection of diabetic sensorimotor polyneuropathy by corneal confocal microscopy in type 1 diabetes: a concurrent validity study. *Diabetes Care* 2012;35(4):821–828.
2. Al-Aqaba MA, Alomar T, Miri A et al.: Ex vivo confocal microscopy of human corneal nerves. *Br J Ophthalmol* 2010; 94:1251–7.
3. Al-Aqaba MA, Fares U, Suleman H, et al.: Architecture and distribution of human corneal nerves. *Br J Ophthalmol* 2009; 94:784–9.
4. Alberts B, Bray D, Johnson A et al.: *Essential cell biology*. Garland publishing. 1998
5. Alhatem A, Cavalcanti B, Hamrah P: In vivo confocal microscopy in dry eye disease and related conditions. *Semin Ophthalmol* 2012; 27:138–148.
6. Akhtar S, Almubrad T, Bron AJ, Yousif MH, Benter IF: Role of epidermal growth factor receptor (EGFR) in corneal remodelling in diabetes. *Acta Ophthalmol* 2009; 87:881–889.
7. Alzubaidi R, Sharif MS, Qahwaji R, et al.: In vivo confocal microscopic corneal images in health and disease with an emphasis on extracting features and visual signatures for corneal diseases: a review study. *Br J Ophthalmol* 2016; 100: 41–55.
8. Asghar O, Petropoulos IN, Alam U, et al.: Corneal confocal microscopy detects neuropathy in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes Care* 2014; 37: 2643–2646.
9. Aubert CE, Michel PL, Gillery P, et al.: Association of peripheral neuropathy with circulating advanced glycation end products, soluble receptor for advanced glycation end products and other risk factors in patients with type 2 diabetes. *Diabetes MeTab Res Rev.* 2014;30(8):679–685.
10. Azmi S, Ferdousi M, Petropoulos IN, et al.: Corneal Confocal Microscopy Identifies Small-Fiber Neuropathy in Subjects With Impaired Glucose Tolerance Who Develop Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2015; 38:1502–1508.
11. Azmi S, Ferdousi M, Petropoulos IN, et al.: Corneal confocal microscopy shows an improvement in small-fiber neuropathy in subjects with type 1 diabetes on continuous subcutaneous insulin infusion compared with multiple daily injection. *Diabetes Care* 2015; 38: e3–e4.
12. Babizhayev MA, Stokov IA, Nosikov VV, et al.: The role of oxidative stress in diabetic neuropathy: generation of free radical species in the glycation reaction and gene polymorphisms encoding antioxidant enzymes to genetic susceptibility

to diabetic neuropathy in population of type I diabetic patients. *Cell Biochem Biophys.* 2015;71(3):1425–1443.

13. Barber AJ, Gardner TW, Abcouwer SF: The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52:1156-1163.
14. Baxter RC: Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am J Physiol Endocrinol MeTab* 2000; 278: e967-976.
15. Bitirgen G, Ozkagnici A, Malik RA et al.: Corneal nerve fibre damage precedes diabetic retinopathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* 2014; 31(4):431–438.
16. Bettahi I, Sun H, Gao N, Wang F, Mi X, Chen W, et al.: Genome-wide transcriptional analysis of differentially expressed genes in diabetic, healing corneal epithelial cells: hyperglycemia-suppressed TGFbeta3 expression contributes to the delay of epithelial wound healing in diabetic corneas. *Diabetes* 2014; 63:715–727.
17. Boulton AJ, Malik RA, Arezzo JC, et al.: Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care.* 2004; 27:1458–1486.
18. Brussee V, Cunningham FA, Zochodne DW: Direct insulin signaling of neurons reverses diabetic neuropathy. *Diabetes.* 2004; 53:1824–1830.
19. Cai D, Zhu M, Petroll WM, Koppaka V, Robertson DM: The impact of type 1 diabetes mellitus on corneal epithelial nerve morphology and the corneal epithelium. *Am J Pathol* 2014; 184:2662–2670.
20. Calvo-Maroto AM, Cervino A, Perez-Cambrodi RJ, Garcia-Lazaro S, Sanchis-Gimeno JA: Quantitative corneal anatomy: evaluation of the effect of diabetes duration on the endothelial cell density and corneal thickness. *Ophthalmic Physiol Opt* 2015; 35:293–298.
21. Conrad AH, Straffuss JM, Wittman MD, et al.: Thyroxine increases the rate but does not alter the pattern of innervation during embryonic chick corneal development. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008; 49:139–153.
22. Conrad AH, Zhang Y, Walker AR, et al.: Thyroxine affects expression of KSPG-related genes, the carbonic anhydrase II gene, and KS sulfation in the embryonic chicken cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47:120–132.
23. Cruzat A, Qazi Y, Hamrah P: In vivo confocal microscopy of corneal nerves in health and disease. *The Ocular Surface* 2017;15(1):15–47.
24. Dabbah MA, Graham J, Petropoulos IN, et al.: Automatic analysis of diabetic peripheral neuropathy using multi-scale quantitative morphology of nerve fibres in corneal confocal microscopy imaging. *Med Image Anal* 2011;15(5):738–747.

25. Davidson EP, Coppey LJ, Holmes A, et al.: Changes in corneal innervation and sensitivity and acetylcholine-mediated vascular relaxation of the posterior ciliary artery in a type 2 diabetic rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(3):1182–1187.
26. Davidson EP, Coppey LJ, Yorek MA: Early loss of innervation of cornea epithelium in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats: improvement with ilepatril treatment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(13): 8067–8074.
27. Dehghani C, Pritchard N, Edwards K et al.: Risk Factors Associated With Corneal Nerve Alteration in Type 1 Diabetes in the Absence of Neuropathy. A Longitudinal In Vivo Corneal Confocal Microscopy Study. *Cornea* 2016; 35:847–852.
28. Doane MG: Interactions of eyelids and tears in corneal wetting and the dynamics of the normal human eyeblink. *Am J Ophthalmol* 1980; 89: 507–16.
29. Deák EA, Szalai E, Tóth N, Malik RA, Berta A, Csutak A: Longitudinal Changes in Corneal Cell and Nerve Fiber Morphology in Young Patients with Type 1 Diabetes with and without Diabetic Retinopathy: A 2 – Year Follow-up Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019;60(2):830–837.
30. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL et al.: The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 1993;43: 817–824.
31. Dyck PJ, Overland CJ, Low PA et al.: Signs and symptoms versus nerve conduction studies to diagnose diabetic sensorimotor polyneuropathy: CI vs. NPhys trial. *Muscle and Nerve* 2010; 42(2):157–164.
32. Duntas LH, Orgiazzi J, Brabant G: The interface between thyroid and diabetes mellitus. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011; 75: 1–9.
33. Edwards K, Pritchard N, Vagenas D et al: Utility of corneal confocal microscopy for assessing mild diabetic neuropathy: baseline findings of the LANDMark study. *Clin Exp Optom* 2012; 95(3): 348–354.
34. Edwards K, Pritchard N, Vagenas D, et al.: Standardizing corneal nerve fibre length for nerve tortuosity increases its association with measures of diabetic neuropathy. *Diabet Med* 2014; 31:1205–1209.
35. Erie JC, McLaren JW, Hodge DO et al: The effect of age on the corneal subbasal nerve plexus. *Cornea* 2005; 24(6):705–709.
36. Erie EA, McLaren JW, Kittleson KM, et al.: Corneal subbasal nerve density: a comparison of two confocal microscopes. *Eye Contact Lens* 2008; 34: 322–325.

37. Erie JC, McLaren JW, Patel SV: Confocal microscopy in ophthalmology. *Am J Ophthalmol* 2009; 148: 639–646.
38. Felicio KM, de Souza A, Neto JFA, et al.: Glycemic variability and insulin needs in patients with type 1 diabetes mellitus supplemented with vitamin D: a pilot study using continuous glucose monitoring system. *Curr Diabetes Rev.* 2018; 14: 394–403.
39. Ferrannini E, Iervasi G, Cobb J, et al.: Insulin resistance and normal thyroid hormone levels: prospective study and metabolic analysis. *Am J Physiol Endocrinol MeTab* 2017; 312: e429–e436.
40. Forrester J, Dick A, McMenamin P, et al.: *The Eye: Basic Science in Practice.* 2000
41. Gambato C, Longhin E, Catania AG, Lazzarini D, Parrozzani R, Midena E: Aging and corneal layers: an in vivo corneal confocal microscopy study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015; 253:267–275.
42. Geraldès P, King GL.: Activation of protein kinase C isoforms and its impact on diabetic complications. *Circ Res.* 2010;106(8):1319–1331.
43. Gorst C, Kwok CS, Aslam S, et al.: Long-term Glycemic Variability and Risk of Adverse Outcomes: A Systematic Review and Meta-analysis. *Diabetes Care* 2015; 38: 2354–2369.
44. Greene DA, Sima AA, Stevens MJ, Feldman EL, Lattimer SA: Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes Care.* 1992; 15(12):1902–1925.
45. Gubitosi-Klug RA: The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study at 30 years: summary and future directions. *Diabetes Care* 2014; 37:44–49.
46. Guthoff RF, Wiens H, Hahnel C, et al.: Epithelial innervation of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea* 2005; 24: 608–613.
47. Guthoff RF, Zhivov A, Stachs O: In vivo confocal microscopy, an inner vision of the cornea – a major review. *Clin Experiment Ophthalmol* 2009; 37: 100–117.
48. Han SB, Yang HY et Hyon JY: Influence of diabetes mellitus on anterior segment of the eye. *Clinical Interventions in Aging* 2019;14: 53–63
49. He J, Bazan NG, Bazan He: Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Exp Eye Res* 91, 2010, 513–523
50. Heneghan C, Flynn J, O'Keefe M et al.: Characterization of changes in blood vessel width and tortuosity in retinopathy of prematurity using image analysis. *Med Image Anal* 2002; 6: 407–429.



51. Hertz P, Bril V, Orszag A, et al.: Reproducibility of in vivo corneal confocal microscopy as a novel screening test for early diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabetic Medicine*, 2011; 28(10):1253–1260.
52. Hermann JM, Hammes HP, Rami-Merhar B, et al.: HbA1c variability as an independent risk factor for diabetic retinopathy in type 1 diabetes: a German/Austrian multicenter analysis on 35,891 patients. *PLoS One*. 2014; 9: e91137.
53. Hietala K, Waden J, Forsblom C, et al. HbA1c variability is associated with an increased risk of retinopathy requiring laser treatment in type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2013; 56: 737–745.
54. Hoşal BM, Ornek N, Zilelioğlu G, et al.: Morphology of corneal nerves and corneal sensation in dry eye: a preliminary study. *Eye (Lond)* 2005; 19(12):1276–1279.
55. Hossain P, Sachdev A, Malik RA. et al.: Early detection of diabetic peripheral neuropathy with corneal confocal microscopy. *Lancet* 2005; 366(9494): 1340–1343.
56. Hosseini SM, Boright AP, Sun L et al.: The association of previously reported polymorphisms for microvascular complications in a meta-analysis of diabetic retinopathy. *Hum Genet* 2015; 134: 247–257.
57. Hyndiuk RA, Kazarian EL, Schultz RO et al.: Neurotrophic corneal ulcers in diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol* 1977; 95(12): 2193–2196.
58. Hafner J, Karst S, Sacu S, Scholda C, Pablik E, Schmidt-Erfurth U: Correlation between corneal and retinal neurodegenerative changes and their association with microvascular perfusion in type II diabetes. *Acta Ophthalmol*. 2019; 97(4): e545–e550.
59. Chen DK, Frizzi KE, Guernsey LS, et al.: Repeated monitoring of corneal nerves by confocal microscopy as an index of peripheral neuropathy in type-1 diabetic rodents and the effects of topical insulin. *J Peripher Nerv Syst*. 2013; 18: 306–315.
60. Chang PY, Carrel H, Huang JS, et al.: Decreased density of corneal basal epithelium and subbasal corneal nerve bundle changes in patients with diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2006; 142(3): 488–490.
61. Kalvodová B., Sosna T., Pelikánová T., Kvapil M. et al: Doporučené postupy pro diagnostiku a léčbu diabetické retinopatie. *Čes. a slov. Oftal.*, 68, 2012, 236–241.
62. Chiou AG, Kaufman SC, Kaufman HE, et al.: Clinical corneal confocal microscopy. *Surv Ophthalmol* 2006; 51:482-500.

63. Chung SSM, Ho EC, Lam KS, Chung SK: Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14(8 Suppl 3): 233S–236S.
64. Inchiostro S, Candido R, Cavalot F: How can we monitor glycaemic variability in the clinical setting? *Diabetes Obes MeTab* 2013; 15 (Suppl 2): 13–16.
65. Inoue K, Kato S, Inoue Y, Amano S, Oshika T: The corneal endothelium and thickness in type II diabetes mellitus. *Jpn J Ophthalmol* 2002; 46:65–69.
66. Ishibashi F, Kojima R, Taniguchi M et al.: The Expanded Bead Size of Corneal C-Nerve Fibers Visualized by Corneal Confocal Microscopy Is Associated with Slow Conduction Velocity of the Peripheral Nerves in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes Research*, 2016; 2016: 3653459.
67. Ishibashi F, Okino M, Ishibashi M, et al.: Corneal nerve fiber pathology in Japanese type 1 diabetic patients and its correlation with antecedent glycemic control and blood pressure. *J Diabetes Investig.* 2012; 3: 191–198.
68. Jalbert I, Stapleton F, Papas E, et al.: In vivo confocal microscopy of the human cornea. *Br J Ophthalmol*, 2003; 87: 225-236.
69. Jia Y, Lee KW, Swerdloff R, et al.: Interaction of insulin-like growth factor-binding protein-3 and BAX in mitochondria promotes male germ cell apoptosis. *J Biol Chem* 2010; 285:1726–1732.
70. Jiang MS, Yuan Y, Gu ZX, et al.: Corneal confocal microscopy for assessment of diabetic peripheral neuropathy: a meta-analysis. *Br J Ophthalmol* 2016; 100:9–14.
71. Jung HS: Clinical implications of glucose variability: chronic complications of diabetes. *Endocrinol MeTab (Seoul)*. 2015; 30: 167–174.
72. Kim J, Kim CS, Sohn E, Jeong IH, Kim H, Kim JS: Involvement of advanced glycation end products, oxidative stress and nuclear factor-kappaB in the development of diabetic keratopathy. *Graef Arch Clin Exp Ophthalmol=Albrecht von Graef Arch Klin Exp Ophthalmol* 2011; 249: 529–536
73. Kaufman SC, Kaufman HE: How has confocal microscopy helped us in refractive surgery? *Curr Opin Ophthalmol* 2006; 17:380–388.
74. Kanski JJ et al.: *Clinical ophthalmology: A systematic approach.* 7th edition. Elsevier Sanders 2011
75. Klocek MS, Sassani JW, McLaughlin PJ, Zagon IS: Naltrexone and insulin are independently effective but not additive in accelerating corneal epithelial healing in type I diabetic rats. *Exp Eye Res* 2009; 89:686–692.
76. Klonoff DC, Ahn D, Drincic A: Continuous glucose monitoring: a review of the technology and clinical use. *Diabetes Res Clin Pract.* 2017; 133: 178–192.

77. Kim J, Kim CS, Sohn E, Jeong IH, Kim H, Kim JS: Involvement of advanced glycation end products, oxidative stress and nuclear factor- $\kappa$ B in the development of diabetic keratopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2011;249(4):529–536.
78. Kotas R. a Ambler Z.: Patofyziologie diabetické neuropatie: *Neurol. praxi* 2012; 13(Suppl. E): 7–11.
79. Kovalová I, Horáková M, Vlčková E. et al.: Hodnocení rohovkové inervace pomocí konfokální mikroskopie. *Česk Slov Neurol N*, 2017; 80/113(1): 49–57.
80. Krachmer J, Mannis M, Holland E.: *Cornea: Fundamentals, Diagnosis and Management*. MOSBY, Elsevier, 2011.
81. Kramerov AA, Ljubimov AV.: Stem cell therapies in the treatment of diabetic retinopathy and keratopathy. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2016 Mar; 241(6):559–68.
82. Lagali N, Poletti E, Patel DV, et al.: Focused Tortuosity Definitions Based on Expert Clinical Assessment of Corneal Subbasal Nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015; 56:5102–5109.
83. Lan W, Petznick A, Heryati S, Rifada M, Tong L: Nuclear factor- $\kappa$ B: central regulator in ocular surface inflammation and diseases. *Ocul Surf* 2012; 10: 137–148.
84. LeCaire TJ, Palta M, Klein R, Klein BE, et al.: Assessing progress in retinopathy outcomes in type 1 diabetes: comparing findings from the Wisconsin Diabetes Registry Study and the Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* 2013; 36:631–637.
85. Lemp MA, Dilly PN, Boyde A: Tandem-scanning (confocal) microscopy of the full-thickness cornea. *Cornea* 1985; 4:205–209.
86. Leppin K, Behrendt AK, Reichard M et al.: Diabetes mellitus leads to accumulation of dendritic cells and nerve fiber damage of the subbasal nerve plexus in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(6): 3603–3615.
87. Levin L.A., Nilsson SFF et al.: *Adler's physiology of the eye – 11th edition*. Elsevier Sanders.2011
88. Li Q, Zhong Y, Zhang T, Zhang R et al.: Quantitative analysis of corneal nerve fibers in type 2 diabetics with and without diabetic peripheral neuropathy: Comparison of manual and automated assessments. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019;151:33–38. [Epub ahead of print]
89. Lorenzi GM, Braffett BH, Arends VL, et al.: Quality Control Measures over 30 Years in a Multicenter Clinical Study: Results from the Diabetes Control and Complications Trial / Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study. *PLoS One* 2015; 10: e0141286.

90. Lovblom LE, Halpern EM, Wu T et al.: In vivo corneal confocal microscopy and prediction of future-incident neuropathy in type 1 diabetes: a preliminary longitudinal analysis. *Can J Diabetes*, 2015;39: 390–397.
91. Lutty GA: Effects of diabetes on the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013;54: 81–87.
92. Maddaloni E, Sabatino F, Del Toro R et al: In vivo corneal confocal microscopy as a novel non-invasive tool to investigate cardiac autonomic neuropathy in Type 1 diabetes. *Diabet Med*, 2015; 32(2): 262–6.
93. Mahelková G, Filous A, Odehnal M, Cendelín J: Corneal changes assessed using confocal microscopy in patients with unilateral buphthalmos. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(6):4048–53.
94. Malik RA, Kallinikos P, Abbott CA et al.: Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients. *Diabetologia*, 2003;46(5): 683–688.
95. Malik RA, Newrick PG, Sharma AK et al.: Microangiopathy in human diabetic neuropathy: relationship between capillary abnormalities and the severity of neuropathy. *Diabetologia*, 1989; 32(2): 92–102.
96. Markoulli M, Flanagan J, Tummanapalli SS, Wu J, Willcox M: The impact of diabetes on corneal nerve morphology and ocular surface integrity. *Ocul Surf*. 2018;16(1):45–57.
97. Marcovecchio ML, Dalton RN, Chiarelli F, et al.: HbA1c variability as an independent risk factor for microalbuminuria in young people with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2011; 34: 1011–1013.
98. Marfurt CF, Cox J, Deek S, et al.: Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res*, 2019; 90: 478–92.
99. Marfurt CF, Kingsley RE, Echtenkamp SE: Sensory and sympathetic innervation of the mammalian cornea. A retrograde tracing study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1989; 30: 461–72.
100. Masters BR, Bohnke M: Confocal microscopy of the human cornea in vivo. *Int Ophthalmol* 2001; 23:199–206.
101. Mastropasqua L, Nubile N: Confocal Microscopy of the Cornea. Thorofare, NJ USA, SLACK Incorporated, 2002.
102. Mehra S, M, Kallinikos PA et al.: Corneal confocal microscopy detects early nerve regeneration after pancreas transplantation in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 2007; 30: 2608–2612.

103. Messmer EM, Schmid-Tannwald C, Zapp D et al.: In vivo confocal microscopy of corneal small fiber damage in diabetes mellitus. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2010; 248: 1307–1312.
104. Midena E, Brugin E, Ghirlando A et al.: Corneal diabetic neuropathy: a confocal microscopy study. *J Refract Surg*, 2006; 22(9 Suppl): 1047–1052.
105. Misra SL, Craig JP, Patel DV et al.: In Vivo Confocal Microscopy of Corneal Nerves: An Ocular Biomarker for Peripheral and Cardiac Autonomic Neuropathy in Type 1 Diabetes Mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015; 56: 5060–5065.
106. Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F et al.: Corneal nerves: structure contents and function. *Exp Eye Res*, 2003;76: 521–42.
107. Muller LJ, Vrensen GF, Pels L et al.: Architecture of human corneal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997; 8: 985–994.
108. Modis L Jr, Szalai E, Kertesz K, Kemeny-Beke A, Kettesy B, Berta A: Evaluation of the corneal endothelium in patients with diabetes mellitus type I and II. *Histol Histopathol* 2010; 25:1531–1537.
109. Muzumdar RH, Ma X, Fishman S, et al.: Central and opposing effects of IGF-I and IGF-binding protein-3 on systemic insulin action. *Diabetes* 2006; 55:2788–2796.
110. Nathan DM, Genuth S, Lachin J, et al.: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993; 329: 977–986.
111. Navarro X, Sutherland DER, Kennedy WR: Long-term effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. *Annals of Neurology* 1997; 42(5): 727–736.
112. Moura Neto A, Parisi MC, Alegre SM, et al.: Relation of thyroid hormone abnormalities with subclinical inflammatory activity in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*. 2016; 51: 63–71.
113. Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, McGhee CN: Age-related differences in the normal human cornea: a laser scanning in vivo confocal microscopy study. *Br J Ophthalmol* 2007; 91:1165–1169.
114. Nitoda E, Kallinikos P, Pallikaris A, et al.: Correlation of diabetic retinopathy and corneal neuropathy using confocal microscopy. *Curr Eye Res* 2012; 37:898–906.
115. Oates P.J.: Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Curr Drug Targets* 2008; 9: 14-36
116. Oble DA, Burton L, Maxwell K, et al.: A comparison of thyroxine – and polyamine-mediated enhancement of rat facial nerve regeneration. *Exp Neurol*. 2004; 189: 105–111.

117. Obrosova IG. Diabetes and the peripheral nerve. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1792:931–940.
118. O'Donnell C, Efron N: Diabetes and contact lens wear. *Clin Exp Optom*. 2012; 95(3):328–337.
119. Oliveira-Soto L, Efron N: Morphology of corneal nerves using confocal microscopy. *Cornea*, 2001; 20: 374–384.
120. Ostrovski I, Lovblom LE, Farooqi MA et al.: Reproducibility of In Vivo Corneal Confocal Microscopy Using an Automated Analysis Program for Detection of Diabetic Sensorimotor Polyneuropathy. *PLoS One*, 2015;10: e0142309.
121. Papanas N, Vinik AI, Ziegler D et al.: Neuropathy in prediabetes: does the clock start ticking early? *Nat Rev Endocrinol*, 2011;7: 682–690.
122. Papanas N, Ziegler D: Corneal confocal microscopy: Recent progress in the evaluation of diabetic neuropathy. *J Diabetes Investig*, 2015; 6: 381–389.
123. Patel DV, McGhee CN: Contemporary in vivo confocal microscopy of the living human cornea using white light and laser scanning techniques: a major review. *Clin Experiment Ophthalmol* 2007; 35:71–88.
124. Patel DV, McGhee CN: In vivo confocal microscopy of human corneal nerves in health, in ocular and systemic disease, and following corneal surgery: a review. *Br J Ophthalmol*, 2009;93: 853–860.
125. Patel DV, McGhee CN: Quantitative analysis of in vivo confocal microscopy images: a review. *Surv Ophthalmol* 2013; 58: 466–75.
126. Patel DV, Tavakoli M, Craig JP, et al.: Corneal sensitivity and slit scanning in vivo confocal microscopy of the subbasal nerve plexus of the normal central and peripheral human cornea. *Cornea* 2009; 28:735–740.
127. Petran M, Hadravsky M, Egger M, et al.: Tandem-scanning reflected-light microscope. *J Opt Soc Am* 1968; 58:661–664.
128. Petroll WM, Robertson DM: In Vivo Confocal Microscopy of the Cornea: New Developments in Image Acquisition, Reconstruction, and Analysis Using the HRT-Rostock Corneal Module. *Ocul Surf*; 2015; 13:187–203.
129. Petroll WM, Weaver M, Vaidya S et al.: Quantitative 3-dimensional corneal imaging in vivo using a modified HRT-RCM confocal microscope. *Cornea*, 2013; 32(4): e36–e43.
130. Petropoulos IN, Alam U, Fadavi H et al.: Rapid automated diagnosis of diabetic peripheral neuropathy with in vivo corneal confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2014; 55: 2071–2078.

131. Petropoulos IN, Green P, Chan AW et al.: Corneal confocal microscopy detects neuropathy in patients with type 1 diabetes without retinopathy or microalbuminuria. *PLoS One*, 2015;10: e0123517.
132. Petropoulos IN, Ferdousi M, Marshall A et al.: The inferior whorl for detecting diabetic peripheral neuropathy using corneal confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015; 56: 2498–504.
133. Petropoulos IN, Manzoor T, Morgan P, et al.: Repeatability of in vivo corneal confocal microscopy to quantify corneal nerve morphology. *Cornea* 2013, 32: e83–89.
134. Petropoulos IN, Ponirakis G, Khan A, Almuhammad H, Gad H, Malik RA: Diagnosing Diabetic Neuropathy: Something Old, Something New. *Diabetes MeTab J*. 2018; 42(4):255–269.
135. Pirnerová L, Horáčková M, Vlková E et al.: Využití konfokální mikroskopie rohovky v klinické praxi. *Čes. a Slov. Oftal*, 2010; 66 (6): 239–247.
136. Prakasam RK, Winter K, Schwiede M, et al.: Characteristic quantities of corneal epithelial structures in confocal laser scanning microscopic volume data sets. *Cornea*, 2013; 32:636–643.
137. Pritchard N, Dehghani C, Edwards K et al.: Utility of assessing nerve morphology in central cornea versus whorl area for diagnosing diabetic peripheral neuropathy. *Cornea*, 2015; 34: 756–61.
138. Pritchard N, Edwards K, Russell AW et al.: Corneal confocal microscopy predicts 4-year incident peripheral neuropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 2015; 38: 671–675.
139. Quadrado MJ, Popper M, Morgado AM, Murta JN, Van Best JA: Diabetes and corneal cell densities in humans by in vivo confocal microscopy. *Cornea* 2006; 25:761–768.
140. Quattrini C, Tavakoli M, Jeziorska M, et al.: Surrogate markers of small fiber damage in human diabetic neuropathy. *Diabetes*, 2007; 56(8): 2148–2154.
141. Reichard M, Hovakimyan M, Guthoff RF, Stachs O: In vivo visualisation of murine corneal nerve fibre regeneration in response to ciliary neurotrophic factor. *Exp Eye Res*, 2014; 120: 20-27.
142. Rosenberg ME, Tervo TM, Immonen IJ et al.: Corneal structure and sensitivity in type 1 diabetes mellitus. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000; 41(10): 2915–2921.
143. Ryle C, Donaghy M: Non-enzymatic glycation of peripheral nerve proteins in human diabetics. *J Neurol Sci*. 1995;129(1):62–68.

144. Sellers EA, Clark I, Tavakoli M. et al.: The acceptability and feasibility of corneal confocal microscopy to detect early diabetic neuropathy in children: a pilot study. *Diabet Med*, 2013; 30(5): 630–631.
145. Shih KC, Lam KSL, Tong L: A systematic review on the impact of diabetes mellitus on the ocular surface. *Nutr Diabetes*. 2017; 7: e251.
146. Shaheen BS, Bakir M, Jain S: Corneal nerves in health and disease. *Surv Ophthalmol*. 2014; 59: 263–285.
147. SimoMannion L, Tromans C, O'Donnell C, et al.: An evaluation of corneal nerve morphology and function in moderate keratoconus. *Cont Lens Anterior Eye*, 2005;28(4): 185–192.
148. Sivaskandarajah GA, Halpern EM, Lovblom LE, et al.: Structure-function relationship between corneal nerves and conventional small-fiber tests in type 1 diabetes. *Diabetes Care*, 2013;36(9):2748–55.
149. Smith AG, Kim G, Porzio M, et al.: Corneal confocal microscopy is efficient, well-tolerated, and reproducible. *J Peripher Nerv Syst*, 2013;18: 54–58.
150. Song F, Xue Y, Dong D, et al.: Insulin Restores an Altered Corneal Epithelium Circadian Rhythm in Mice with Streptozotocin-induced Type 1 Diabetes. *Sci Rep* 2016; 6:32871.
151. Stachs O, Zhivov A, Kraak R, et al.: In vivo three-dimensional confocal laser scanning microscopy of the epithelial nerve structure in the human cornea. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2007; 245: 569–575.
152. Stavniichuk R, Shevalye H, Hirooka H, Nadler JL, Obrosova IG: Interplay of sorbitol pathway of glucose metabolism, 12/15-lipoxygenase, and mitogen-activated protein kinases in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy. *Biochem Pharmacol*. 2012; 83(7):932–940.
153. Sturm D, Vollert J, Greiner T, et al.: Implementation of a Quality Index for Improvement of Quantification of Corneal Nerves in Corneal Confocal Microscopy Images: A Multicenter Study. *Cornea* 2019 Apr 11. doi: 10.1097. [Epub ahead of print]
154. Sugimoto K, Yasujima M, Yagihashi S: Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr Pharm Des*. 2008;14(10): 953–961.
155. Sudhir RR, Raman R, Sharma T: Changes in the corneal endothelial cell density and morphology in patients with type 2 diabetes mellitus: a population-based study, Sankara Nethralaya Diabetic Retinopathy and Molecular Genetics Study (SN-DREAMS, Report 23). *Cornea* 2012; 31:1119–1122.
156. Szaflik JP: Comparison of in vivo confocal microscopy of human cornea by white light scanning slit and laser scanning systems. *Cornea* 2007; 26:438–445.



157. Szalai E, Deak E, Modis L, Jr., et al.: Early Corneal Cellular and Nerve Fiber Pathology in Young Patients With Type 1 Diabetes Mellitus Identified Using Corneal Confocal Microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016; 57:853–858.
158. Škrha J: Oxidační stress a jeho vztah ke komplikacím diabetu. *Interní medicína pro praxi* 2010; 12(9): 414–418
159. Takao T, Ide T, Yanagisawa H, et al.: The effects of fasting plasma glucose variability and time-dependent glycemic control on the long-term risk of retinopathy in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011; 91: e40–e42.
160. Tavakoli M, Begum P, McLaughlin J et al.: Corneal confocal microscopy for the diagnosis of diabetic autonomic neuropathy. *Muscle Nerve*, 2015;52(3): 363–70.
161. Tavakoli M, Ferdousi M, Petropoulos IN, et al.: Normative values for corneal nerve morphology assessed using corneal confocal microscopy: a multinational normative data set. *Diabetes Care*, 2015;38: 838–843.
162. Tavakoli M, Kallinikos P, Iqbal A, et al.: Corneal confocal microscopy detects improvement in corneal nerve morphology with an improvement in risk factors for diabetic neuropathy. *Diabet Med*, 2011; 28:1261–1267.
163. Tavakoli M, Mitu-Pretorian M, Petropoulos IN, et al.: Corneal confocal microscopy detects early nerve regeneration in diabetic neuropathy after simultaneous pancreas and kidney transplantation. *Diabetes*, 2013;62: 254–260.
164. Tavakoli M, Petropoulos IN, Malik RA, et al.: Assessing corneal nerve structure and function in diabetic neuropathy. *Clin Exp Optom*, 2012; 95(3): 338–347.
165. Tavakoli M, Petropoulos IN, Malik RA: Corneal Confocal Microscopy to Assess Diabetic Neuropathy: An Eye on the Foot. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 2013;7:1179–1189.
166. Tavakoli M, Quattrini C, Abbott C, et al: Corneal confocal microscopy: a novel noninvasive test to diagnose and stratify the severity of human diabetic neuropathy. *Diabetes Care*, 2010;33(8): 1792–1797.
167. Threatt J, Williamson JF, Huynh K, et al.: Ocular disease, knowledge and technology applications in patients with diabetes. *Am J Med Sci*, 2013;345: 266–270.
168. Tomlinson DR, Fernyhough P, Diemel LT: Role of neurotrophins in diabetic neuropathy and treatment with nerve growth factors. *Diabetes*. 1997; 46(Suppl 2): S43–S49.
169. Utsunomiya T, Nagaoka T, Hanada K, et al.: Imaging of the Corneal Subbasal Whorl-like Nerve Plexus: More Accurate Depiction of the Extent of Corneal Nerve Damage in Patients With Diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2015; 56: 5417–5423.

170. Vanathi M, Tandon R, Sharma N, Titiyal JS, Pandey RM, Vajpayee RB: In-vivo slit scanning confocal microscopy of normal corneas in Indian eyes. *Indian J Ophthalmol.* 2003; 51:225–230.
171. Villani E, Baudouin C, Efron N, et al.: In Vivo Confocal Microscopy of the Ocular Surface: From Bench to Bedside. *Curr Eye Res.* 2014 March; 39: 213–231.
172. Vinik AI, Maser RE, Mitchell BD, et al.: Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care.* 2003; 26: 1553–1579.
173. Virk SA, Donaghue KC, Cho YH, et al.: Association between HbA1c variability and risk of microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol MeTab* 2016; 101: 3257–3263.
174. Wang BEF, Misra SL, Patel DV, et al.: In Vivo Confocal Microscopy of the Human Cornea in the Assessment of Peripheral Neuropathy and Systemic Diseases. *BioMed Res Int*; 2015:951081.
175. Wilkinson CP, Ferris FL, 3rd, Klein RE, et al.: Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* 2003; 110:1677–1682.
176. Wu YC, Buckner BR, Zhu M, Cavanagh HD, Robertson DM: Elevated IGF1 levels in diabetic tears: a negative regulator of IGF-1 signaling in the corneal epithelium. *Ocul Surf* 2012; 10: 100–107.
177. Xu KP, Li Y, Ljubimov AV, Yu FS: High glucose suppresses epidermal growth factor receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway and attenuates corneal epithelial wound healing. *Diabetes* 2009; 58: 1077–1085.
178. Yamada J, Dana MR, Sotozono C et al.: Kinoshita S. Local suppression of IL-1 by receptor antagonist in the rat model of corneal alkali injury. *Exp Eye Res*, 2003; 76(2): 161–167.
179. Ziegler D: Treatment of diabetic neuropathy and neuropathic pain. How far have we come? *Diabetes Care* 2008; 31(Suppl 2): S255–S261
180. Ziegler D, Papanas N, Zhivov A, et al.: Early detection of nerve fiber loss by corneal confocal microscopy and skin biopsy in recently diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes*, 2014; 63: 2454–2463.
181. Zhivov A, Winter K, Hovakimyan M, et al.: Imaging and quantification of subbasal nerve plexus in healthy volunteers and diabetic patients with or without retinopathy. *PLoS One* 2013; 8: e52157.
182. Zhou Q, Chen P, Di G, Zhang Y, Wang Y, Qi X et al.: Ciliary neurotrophic factor promotes the activation of corneal epithelial stem/progenitor cells and accelerates corneal epithelial wound healing. *Stem Cells* 2015; 33: 1566–1576.

183. Zochodne DW: Diabetes mellitus and the peripheral nervous system: manifestations and mechanisms. *Muscle Nerve*, 2007; 36: 144–166.
184. Zochodne DW: Diabetes and the plasticity of sensory neurons. *Neurosci Lett*. 2015; 596: 60–65.

## 11. Přílohy

### 11.1. Seznam použitých zkratk

Zkratka		
<b>ABI</b>	Index kotník-paže	Ankle-brachial index
<b>AGE</b>	Pokročilé produkty glykace	Advanced glycation end-products
<b>ATP</b>	Adenosintrifosfát	Adenosine triphosphate
<b>BMI</b>	Index tělesné hmotnosti	Body mass index
<b>CGM</b>	Kontinuální monitorování glukózy	Continuous glucose monitoring
<b>CNFT</b>	Ciliární neurotrofický faktor	Ciliary neurotrophic factor
<b>CSII</b>	Kontinuální subkutánní inzulinová infuze	Continuous subcutaneous insulin infusion
<b>DM</b>	Diabetes mellitus	
<b>DM 1</b>	Diabetes mellitus 1. typu	Type 1 diabetes mellitus
<b>DM 2</b>	Diabetes mellitus 2. typu	Type 2 diabetes mellitus
<b>DN</b>	Diabetická neuropatie	Diabetic neuropathy
<b>DR</b>	Diabetická retinopatie	Diabetic retinopathy
<b>EGF</b>	Epiteliální růstový faktor	Epithelial growth factor
<b>ETDRS</b>		Early Treatment of Diabetic Retinopathy Study
<b>GV</b>	Glykemická variabilita	Glucose variability
<b>HbA1c</b>	Glykovaný hemoglobin A1c	Glycated hemoglobin A1c
<b>HDL</b>		High density lipoprotein
<b>ID</b>	Inzulinová dávka (na kilogram)	Insulin dose (per kilogram)
<b>IGF-1</b>	Inzulin-like růstový faktor-1	inzulin-like growth faktor-1
<b>IGFBP3</b>		Inzulin-like growth factor-binding protein 3
<b>IIR</b>	Intenzifikovaný inzulinový režim	
<b>IMT</b>	Tloušťka intima-media	Intima-media thickness
<b>IVCM</b>	In vivo konfokální mikroskopie	In vivo confocal microscopy
<b>LDL</b>		Low density lipoprotein
<b>LSCM</b>	Laserový skenovací konfokální mikroskop	Laser scanning confocal microscopy
<b>MDI</b>	Režim vícečetných injekcí	Multiple Daily Injections
<b>Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPázy</b>	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> adenosin trifosfatáza	
<b>NAD<sup>+</sup>/NADH</b>	Nikotinamidadeninukleotid/ redukovaná forma	
<b>NAPD<sup>+</sup>/NADH</b>	Nikotinamidadeninukleotid/ redukovaná forma	
<b>NFB</b>	Denzita bodů větvení	Density of branch cross points
<b>NFD</b>	Denzita hlavních nervových vláken	Corneal main nerve denfiber density
<b>NfκB</b>	jaderný faktor kappa B	Nuclear factor kappa B
<b>NFL</b>	Délka nervových vláken	Nerve fiber lenght
<b>NFT</b>	Tortuozita nervových vláken	Nerve fiber tortuosity
<b>NGF</b>	Nervový růstový faktor	Nerve growth factor

<b>RT-CGM</b>	Kontinuální monitorování glukózy v reálném čase	Real time – Continuous glucose monitoring
<b>SD</b>	Standardní odchylka	Standard deviation
<b>SSCM</b>	Slit scanning konfokální mikroskop	Slit-scanning confocal microscopy
<b>t-NFD</b>	Denzita všech nervových vláken	Total corneal nerve fiber density
<b>TSH</b>	Tyreotropní hormon	

## 11.2. Informované souhlasy



*Univerzita Karlova v Praze*

*2.Lékařská fakulta*

*V Úvalu 84, 150 00 Praha 5 – Motol*



### **INFORMOVANÝ SOUHLAS S VYŠETŘENÍM NA ROHOVKOVÉM KONFOKÁLNÍM MIKROSKOPU**

Rohovkový konfokální mikroskop (Confoscan 3, NIDEK Technology, Italy) slouží k zobrazení a analýze jednotlivých vrstev rohovky. Může být využit pro posouzení struktury a k průkazu patologie v jednotlivých vrstvách rohovky nebo pro znázornění a posouzení případného poškození nervových vláken rohovky.

Vyšetření je zcela nebolestivé. Během vyšetření může být pacient oslněn blikajícím světlem. Přístroj pracuje v oblasti viditelného světla. Při vyšetření nedochází k přímému kontaktu přístroje a rohovky vyšetřovaného. Před vyšetřením je nutno povrch rohovky místně znecitlivit za použití krátkodobě působících znecitlivujících kapek, které jsou opakovaně před vyšetřením aplikovány do vyšetřovaného oka. Při vlastním vyšetření dochází ke kontaktu oka s očním gelem běžně užívaným při léčbě unavených a suchých očí ("umělé slzy"). Po vyšetření je nutno, po dobu přetrvávajícího znecitlivění povrchu oka (cca 20-30 min), dbát zvýšené opatrnosti, aby nedošlo k nechtěnému kontaktu s povrchem oka (např. při otírání slz kapesníkem či rukou apod.).

Během vyšetření nejsou používány léky, které mohou ovlivnit zrakové funkce a tím schopnost řízení motorového vozidla. Přesto může těsně po vyšetření krátce přetrvávat určité rozmlžení jako následek oslnění a kontaktu s viskózním gelem. Před případným řízením motorového vozidla je nutno vyčkat, dokud pocit rozmlženého vidění nevymizí.



*Univerzita Karlova v Praze*

*2.Lékařská fakulta*

*V Úvalu 84, 150 00 Praha 5 – Motol*



Vážená paní, Vážený pane,

podpis tohoto Informovaného souhlasu je formální podmínkou zařazení výsledků Vašeho vyšetření do dlouhodobé studie v rámci Projektu (Ministerstva zdravotnictví) koncepčního rozvoje výzkumné organizace 00064203 (FN MOTOL) probíhající na našem pracovišti. Váš souhlas je zcela dobrovolný, rozhodnutí o účasti můžete kdykoli odvolat. Pokud se rozhodnete vyšetření nepodstoupit nebo nesouhlasit se zařazením Vašich výsledků do studie, nebude to mít žádný vliv na péči o Vás na našem pracovišti a ve Fakultní nemocnici v Motole. Vaše případné dotazy ráda zodpoví MUDr. Gabriela Mahelková, Ph.D. z Oční kliniky dětí a dospělých 2.LF UK a FN Motol (tel: 22443 2701).

Informovaný souhlas jsem si přečetl/a, rozumím jeho obsahu a souhlasím s vyšetřením a s dalším zpracováním výsledků vyšetření v rámci zmiňované studie.

Jméno a podpis pacienta  
lékaře

Jméno a podpis

V Praze dne



**Univerzita Karlova v Praze**

**2.Lékařská fakulta**

**V Úvalu 84, 150 00 Praha 5 – Motol**



### **Informovaný souhlas**

pro výzkumný projekt: **Poruchy motility horní části gastrointestinálního traktu jako ukazatel závažnosti postižení autonomní neuropatií u osob s DM 1. typu a její změny při změnách kompenzace základního onemocnění – sledování metabolických parametrů a zhodnocení motility pomocí funkčních diagnostických metod (elektrogastrografie, event. jícnová a antroduodenální manometrie) a scintigrafického vyšetření žaludku.**

Vážená paní, vážený pane,

obracíme se na Vás se žádostí o spolupráci na výzkumném projektu vztahu diabetické autonomní neuropatie a funkce zažívacího traktu.

Cílem výzkumu je porovnat projevy poruchy funkce zažívacího traktu a diabetické autonomní neuropatie (porucha funkce nervového systému při onemocnění cukrovkou) při standardní léčbě diabetu a po období intenzifikované léčby s pomocí inzulinové pumpy.

Před zahájením terapie inzulinovou pumpou budete vyšetřeni spektrem metod, které umožní zhodnocení diabetických makro a mikrovaskulárních komplikací:

**Echokardiografie**

**Duplexní sonografické vyšetření karotických a vertebrálních tepen**

**Vyšetření HR variability**

**Vyšetření diabetické autonomní neuropatie**

**Oční vyšetření**

Funkce zažívacího traktu bude hodnocena těmito metodami:

**Elektrogastrografie (EGG)** – EGG je metoda záznamu a počítačového zpracování elektrické aktivity žaludku – princip je podobný klasickému EKG. Po uložení na záda a nalepení elektrod do oblasti horní části břicha se snímá grafický záznam elektrické aktivity žaludku nalačno a po požití testovací stravy. Hodnotí se frekvence a amplituda žaludečních kontrakcí. Vyšetření se zpravidla provádí 30 min nalačno a 90 min po standardní snídani.





Univerzita Karlova v Praze

2.Lékařská fakulta

V Úvalu 84, 150 00 Praha 5 – Motol



**Scintigrafické vyšetření evakuační funkce žaludku** – Jde o vyšetření s pomocí otevřených radioaktivních zářičů, tj. látek, které jsou v tomto případě aplikovány požitím standardizované potraviny (mléčná rýže). Při scintigrafickém vyšetření evakuace žaludku se sleduje průběh a rychlost vyprázdnění žaludku po požití tohoto polotuhého jídla. Dávka ionizujícího záření, kterou obdržíte odpovídá 5 RTG snímkům hrudníku, čili efektivní dávce 0,1mSv, kterou obdrží každý člověk ze záření z přírodních zdrojů a kosmického záření v ČR během 15 dnů. Látka podaná při scintigrafii nemá vedlejší účinky, nezpůsobuje alergii ani jiné zdravotní komplikace.

Kromě těchto vyšetření Vám bude z důvodu optimální monitorace hladin glykémie zaveden před zahájením terapie inzulinovou pumpou **podkožní senzor**.

---

Pokud s účastí na projektu souhlasíte, připojte prosím podpis, kterým vyslovujete souhlas s níže uvedeným prohlášením.

#### **Prohlášení**

Prohlašuji, že souhlasím s účastí na výše uvedeném projektu. Řešitel/ka projektu mne informoval/a o podstatě výzkumu a seznámil/a mne s cíli a metodami a postupy, které budou při výzkumu používány, podobně jako s výhodami a riziky, které pro mne z účasti na projektu vyplývají. Souhlasím s tím, že všechny získané údaje budou použity jen pro účely výzkumu a že výsledky výzkumu mohou být anonymně publikovány.

Měl/a jsem možnost vše si řádně, v klidu a v dostatečně poskytnutém čase zvážit, měl/a jsem možnost se řešitele/ky zeptat na vše, co jsem považoval/a za pro mne podstatné a potřebné vědět. Na tyto mé dotazy jsem dostal/a jasnou a srozumitelnou odpověď. Jsem informován/a, že mám možnost kdykoliv od spolupráce na projektu odstoupit, a to i bez udání důvodu.

Tento informovaný souhlas je vyhotoven ve dvou stejnopisech, každý s platností originálu, z nichž jeden obdrží moje osoba (nebo zákonný zástupce) a druhý řešitel projektu.

Jméno, příjmení a podpis řešitele projektu: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ V \_\_\_\_\_ dne: \_\_\_\_\_

Jméno, příjmení a podpis účastníka v projektu (zákonného zástupce): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

V \_\_\_\_\_ dne: \_\_\_\_\_

## 11.3. Seznam publikací

### 11.3.1. Seznam vědeckých publikací s tématem disertační práce

#### s IF

1. Mahelková G, Česká Burdová M, Malá Š, Hoskovcová L, Dotřelová D, Štechová K. Higher Total Insulin Dose Has Positive Effect on Corneal Nerve Fibers in DM1 Patients. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018 Aug 1;59(10):3800-3807.

**IF 2017/2018 3.388**

2. Česká Burdová M, Kulich M, Dotřelová D, Mahelková G. Effect of diabetes mellitus type 1 diagnosis on the corneal cell densities and nerve fibers. *Physiol Res*. 2018 Dec 18;67(6):963-974.

**IF 2017/2018 1.324**

3. Česká Burdová M, Lainová Vrabcová T, Dotřelová D, Mahelková G. Diabetická retinopatie a změny nervových vláken hodnocené konfokální mikroskopií rohovky. *Cesk Slov Neurol N*. 2017; 80/113(1): 59-65.

**IF 0.508**

#### bez IF

1. Česká Burdová, M, Lainová Vrabcová T, Dotřelová D, Mahelková G.: Possibilities of in vivo corneal confocal microscopy of corneal nerves in diabetes. Možnosti in vivo konfokální mikroskopie nervových vláken rohovky u diabetiků. *Čes.a slov. Oftal.*,73, 2017, 4:154-157.

2. Mahelková G, Česká Burdová M, Odehnal M, Dotřelová D.: In vivo corneal confocal microscopy: Basic principles and application. In vivo konfokální mikroskopie rohovky: princip metody a současné možnosti. *Čes.a slov. Oftal.*, 73, 2017, 4:155-160.

### 11.3.2. Seznam vědeckých publikací bez vztahu k tématu disertace

1. Dítě J, Štěpánková J, **Česká Burdová M**, Dotřelová D. Význam zhodnocení vývoje OCT obrazu při konzervativním řešení vitreomakulární trakce komplikované makulární dírou. *Čes.a slov. Oftal.*, 74, 2018, 6:240-244.
2. Píšová A, Chovanec M, Betka J, Ferrová K, **Česká Burdová M**, Odehnal M, Dotřelová D, Mahelková G. Osmolarita slz u pacientů s lagofthalmem. *Čes.a slov. Oftal.*, 72, 2016, 5:172-176.
3. **Česká Burdová M**, Ferrová K, Filouš A et al: Srovnávací studie měření nitroočního tlaku aplanační tonometrií, bezkontaktní tonometrií a TonoPenem. *Čes.a slov. Oftal.*, 68, 2012, 1:43-46.
4. **Česká Burdová M**, Ferrová K, Filouš A et al.: Závislost nitroočního tlaku měřeného aplanační tonometrií, bezkontaktní tonometrií a TonoPenem na centrální tloušťce rohovky. *Čes.a slov. Oftal.*, 67, 2011, 5-6:154-157.
5. **Česká Burdová M**, Dotřelová D.: Kazuistika 4, Kazuistiky v oftalmologii II, 2008, 22-27.
6. Gergelyová K, Odehnal M, Pochop P, **Česká Burdová M**, Kováčová, M.: Diabetická retinopatie, Postgraduální medicína, 07, 2001, 789-798.
7. Filouš A, **Burdová, M.**: Peroperační aplikace 5-fluorourcilu při trabekulektomii pro komplikovaný glaukom u dětí. *Čes.a slov. Oftal.*, 54, 1998, 3:86-91.
8. Filouš A, **Burdová M.**, Malec J.: Tono-Pen XL – tonometr vhodný pro standardní i méně obvyklé podmínky při měření nitroočního tlaku. *Čes.a slov. Oftal.*, 54, 1998, 3:159-165.
9. Filouš A, Malec J, **Burdová M.**: Naše zkušenosti s bezkontaktní tonometrií u dětí. *Čes.a slov. Oftal.*, 54, 1998, 3:154-158.