

3.4 Oberflächenerkrankungen des Auges unterschiedlicher Genese – klinische und konfokalmikroskopische Untersuchungen

Pathological Conditions of the Ocular Surface – A Clinical and Confocal Laser-Scanning Microscopy Study

K. Falke, R. K. Prakasam, M. Hovakimyan, A. Zhivov, R. F. Guthoff, O. Stachs
Augenklinik, Universität Rostock

Zusammenfassung

Die konfokale In-vivo-Mikroskopie ist ein etabliertes Verfahren zur nicht-invasiven und hochauflösenden Darstellung morphologischer Veränderungen der Hornhaut und Bindehaut. Die Interpretation pathologischer Befunde erfordert Erfahrung und Untersuchungen an einem großen Patientenkollektiv. Es sollen daher verschiedene korneale Oberflächenstörungen infektiöser, stoffwechselbedingter und traumatischer Ursachen dargestellt und ihre Bedeutung diskutiert werden. Bei Fällen infektiöser Erkrankungen lassen sich in Abhängigkeit des jeweiligen Erregers häufig Reaktionen auf Ebene des Epithels und vorderen Stromas in Form von Hyphen, dendritischer Zellen und granulozytärer Infiltrationen unterscheiden. Stoffwechselerkrankungen führen zu vielfältigen Veränderungen, deren Auswirkungen in der Hornhaut zur Darstellung kommen und eventuell als zusätzlicher Parameter in die Evaluierung der Stoffwechselerkrankung beitragen können. Am Beispiel von Verlaufsuntersuchungen nach Verletzungen werden Informationen über Wundheilungsvorgänge gewonnen. Die konfokale Mikroskopie erlaubt damit die nicht-invasive Diagnostik auf zellulärer Ebene und ergänzt daher die klinische Routinediagnostik.

Abstract

Confocal in vivo laser scanning microscopy is an established technique to visualise morphology of the cornea and conjunctiva, whereby the image interpretation needs experience. We report about changes of the ocular surface in the pathological conditions of infectious, metabolic and traumatic genesis and discuss their relevance. The micromorphology of the corneal epithelium and stroma in respect to pathogens (bacterial, fungal) is discussed. Metabolic disease induces multifaceted corneal alterations which can be visualised and used for assessment of the disease progression. Follow-up microscopic investigations allow for an assessment of the wound healing dynamics and enable a prognosis to be made for

corneal recurrence. Taken together, confocal in vivo microscopy allows a non-invasive microscopy on the cellular level and thus complements clinical diagnostics.

3.4.1 Einleitung

Mittels in vivo konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) kann die zelluläre Morphologie der Hornhaut nichtinvasiv dargestellt werden. Je nach Pathologie finden sich dabei Veränderungen des Epithels, des subbasalen Nervenplexus, des Stromas oder des Endothels [1],[2],[3],[4],[5]. Die konfokalmikroskopische Untersuchung kann im klinischen Alltag nicht nur die Diagnosestellung, sondern auch die Therapiestrategie beeinflussen. Unterschiedliche Studien, auch in Kombination mit histologischen Präparations- und Färbetechniken, tragen zur Interpretation der gefundenen Veränderungen bei [6],[7],[8]. Häufige Probleme finden sich dabei in der Verlaufsbeobachtung, Reproduktion und Quantifizierung der Ergebnisse. Ebenso spielt die Erfahrung des jeweiligen Untersuchers eine große Rolle [9].

Im Rahmen einer retrospektiven Analyse werden daher verschiedene Fälle kornealer Oberflächenstörungen vorgestellt. Dabei werden klinisch relevante Aspekte wie Erregerdiagnostik, Monitoring von Stoffwechselerkrankungen und Erfassung von Wundheilungsvorgängen berücksichtigt. Es wird versucht, eine mögliche Interpretation zu liefern und somit zu einem besseren Verständnis der auftretenden Veränderungen beizutragen.

3.4.2 Methoden

Die konfokalmikroskopischen Untersuchungen erfolgten mittels HRTII/RCM (Heidelberg Retina Tomograph II mit Rostock Cornea Module, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland) unter Lokalanästhesie mit Proparackain POS® 0,5% (Ursapharm, Saarbrücken, Deutschland) jeweils im Zentrum der Hornhaut, im Defektbereich und vergleichend auch am kontralateralen Auge. Die optischen Schnitte können einzeln, im sogenannten Volume-Modus oder unter Verwendung eines speziellen Mapping-Programms, dem Composite-Modus, aufgenommen werden. Die Standardbildgröße beträgt $400 \times 400 \mu\text{m}$ (384×384 Pixel). Der zusätzliche Einsatz des modifizierten Volume Scans liefert eine Fokusserie aus 960 Einzelbildern (3 Zyklen mit je 2×160 Bilder) in je 25,8 Sekunden, was eine spätere statistische Auswertung erleichtert. Mittels des Composite Modus gelingt eine übersichtliche Darstellung von Bildern in Größenskalen von maximal $3,2 \times 3,2 \text{ mm}$ (3072×3072 Pixel).

Zusätzlich erfolgte in einigen Fällen auch die Darstellung mittels optischer Kohärenztomografie (OCT) im Vorderabschnitts-Mode (Spectralis, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland). Diese Bildgebungstechnik erlaubt eine bessere Übersichts- und Tiefendarstellung.

3.4.3 Ergebnisse

Infektionen

Es werden 3 Fälle unterschiedlicher infektiöser Hornhauterkrankungen dargestellt (► Abb. 3.21). Im 1. Fall handelt es sich um eine 83-jährige Patientin mit schlecht heilender Erosio nach Pflanzenblattverletzung. In der Folge kam es zu rezidivierenden, therapierefraktären Infektionen des betroffenen rechten Auges. Es zeigten sich zunehmend weißliche Trübungen im Defektgrund (► Abb. 3.21a). In der mikrobiologischen Diagnostik konnten anhand von Abstrichen keine Erreger nachgewiesen werden. In der durchgeführten konfokalmikroskopischen Untersuchung kamen hingegen typische langgestreckte, hyperreflektive Pilzhyphen zur Darstellung

(► Abb. 3.21b). Die histologische Präparation einer Probiopsie bestätigte letztendlich den Befund, ohne dass eine spezielle Typisierung der Pilze möglich war. Unter intensiver antimykotischer Lokaltherapie kombiniert mit systemischen Antimykotika konnte ein langsames Ausheilen der Läsion unter bleibender Vernarbung erreicht werden.

Vergleichend wird ein Fall mit chronisch disziformer Herpeskeratitis vorgestellt. Der 36-jährige Patient litt seit 7 Jahren unter rezidivierenden Infektionen mit Notwendigkeit einer dauerhaften niedrig dosierten, lokalen Steroidtherapie. In Folge der Entzündungen zeigte die Hornhaut multiple, diffus verteilte, punktförmige Trübungen und Vernarbungen (► Abb. 3.21c). Konfokalmikroskopisch stellte sich intaktes Epithel mit massiver Akkumulation

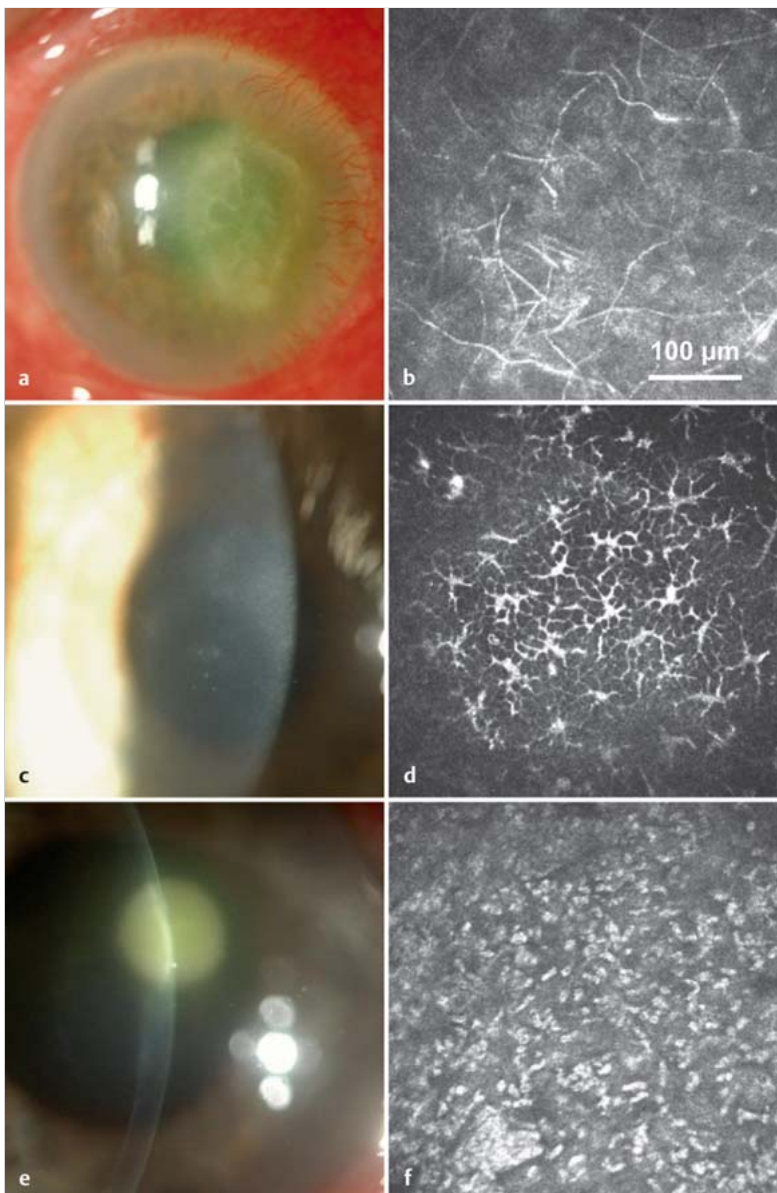


Abb. 3.21 CLSM bei infektiösen Hornhauterkrankungen.

- a** Spaltlampenmikroskopischer Befund einer therapierefraktären Erosio nach Pflanzenverletzung mit weißlichen Einlagerungen.
- b** CLSM: darstellbare Pilzhyphen am betroffenen Auge.
- c** Spaltlampenbefund mit Vernarbungen und granulären Trübungen bei chronisch disziformer Herpeskeratitis.
- d** CLSM: ausgeprägte Infiltration mit dendritischen Zellen im Übergangsbereich zwischen Bowman-Membran und vorderem Stroma unter niedrig dosierter Steroiddauertherapie.
- e** Spaltlampenbefund mit weißer, tief reichender Infiltration im Bereich einer Fremdkörperverletzung.
- f** CLSM: massive Akkumulation granulöser Zellen im Bereich der Läsion.

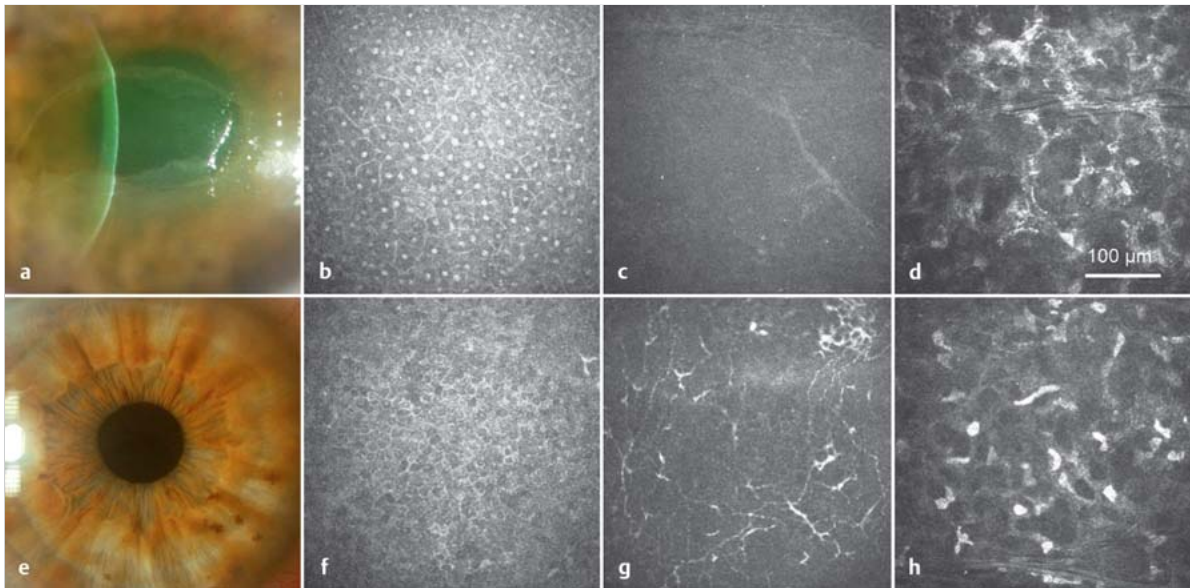


Abb. 3.22 CLSM bei 63jähriger, weiblicher Patientin mit Diabetes mellitus Typ II, HbA_{1c} 9,3 %, Erkrankungsdauer 10 Jahre.
a Schlecht heilende Erosio corneae am rechten Auge mit reduzierter Hornhautsensibilität von 20 mm (Cochet-Bonet).
b CLSM: Vergrößerte Epithelzellen mit hyperreflektiven Kernen im Defektbereich.
c Übergang zwischen Bowman-Membran und vorderem Stroma ohne darstellbare Nervenfasern.
d Anteriores Stroma mit sternartigen Keratozyten.
e Spaltlampenbefund des linken Auges mit klarer und glatter Hornhaut.
f CLSM: Basalzellen in regelrechter Konfiguration.
g Subbasal wenig, dünne Nervenfasern mit dendritischen Zellen.
h Anteriores Stroma mit hyperreflektiven Keratozytenkernen.

dendritischer Zellen auf Ebene der Basalzellen des Epithels dar (► Abb. 3.21d). Diese entzündlichen Veränderungen lassen auf einen latent vorhandenen Reizzustand schließen, woraufhin ein komplettes Ausschleichen der Steroide weiterhin nicht empfohlen werden konnte.

Im letzten Fall handelt es sich um ein bakterielles Infiltrat in Folge eines Hornhautfremdkörpers bei einem 50-jährigen Patienten. Mittels Abstrich wurde kein Erregernachweis erbracht. Es zeigte sich spaltlampenmikroskopisch eine bis in das Stroma reichende, weißliche Infiltration (► Abb. 3.21e). In den konfokalmikroskopischen Schnitten wurden hyperreflektive, granulozytäre Zellen nahe des Defektbereichs dokumentiert (► Abb. 3.21f). Das umliegende epitheliale und stromale Gewebe stellte sich in regelrechter Morphologie dar. Durch intensive zunächst antibakterielle und im Verlauf steroidale Lokaltherapie blasste das betroffene Areal zunehmend ab. Es verblieb eine kreisrunde Narbe.

Allgemeinerkrankungen

Es werden 2 Fälle von Hornhauterkrankungen beschrieben, die Indikatoren für eine Allgemeinerkrankung darstellen können.

Im 1. Fall handelt es sich um eine 63-jährige Diabetikerin mit schlecht heilender Hornhauterosio unklarer Genese (► Abb. 3.22a). Die Hornhautsensibilität an der be-

troffenen rechten Seite war mit 20 mm nach Cochet-Bonet deutlich reduziert (Norm zwischen 50–60 mm). Linksseitig stellte sich eine intakte Hornhautoberfläche mit einer Sensibilität von 50 mm dar (► Abb. 3.22e). Konfokalmikroskopisch kamen an der betroffenen Seite keine subbasalen Nervenfasern zur Darstellung (► Abb. 3.22c). Kontralateral zeigten sich wenige, dünne Nervenfasern umgeben von dendritischen Zellen (► Abb. 3.22g). Im Defektbereich stellten sich epitheliale Zellen mit hyperreflektiven Zellkernen dar (► Abb. 3.22b). Auf Ebene des Stromas erschienen die Keratozyten sternartig mit verlängerten Ausläufern (► Abb. 3.22d). Links wurde im Vergleich eine regelrechte Epithel- und Stromamorphologie (► Abb. 3.22f, ► Abb. 3.22h) erfasst. Sowohl die schlechte Heilung der Läsion als auch die reduzierte Nervenfaserdichte können hier bereits Hinweise auf eine länger bestehende Stoffwechsellentgleisung geben. Der HbA_{1c} der Patientin lag bei 9,3 % und damit deutlich zu hoch.

Im 2. Fall handelt es sich um eine 58-jährige Patientin mit chronischer Graft-versus-Host-Erkrankung nach erfolgter Knochenmarktransplantation bei chronisch myeloischer Leukämie. Die körperlichen Symptome umfassten Polyneuropathie, Sklerodermie, Xerostomie, subpleurale Fibrosen und chronische Gastritis. An der Hornhaut zeigte sich eine zentrale Einschmelzung mit drohender Perforation (► Abb. 3.23b). In den konfokalmikroskopischen Schnitten fiel das nahezu vollständigen Fehlen von

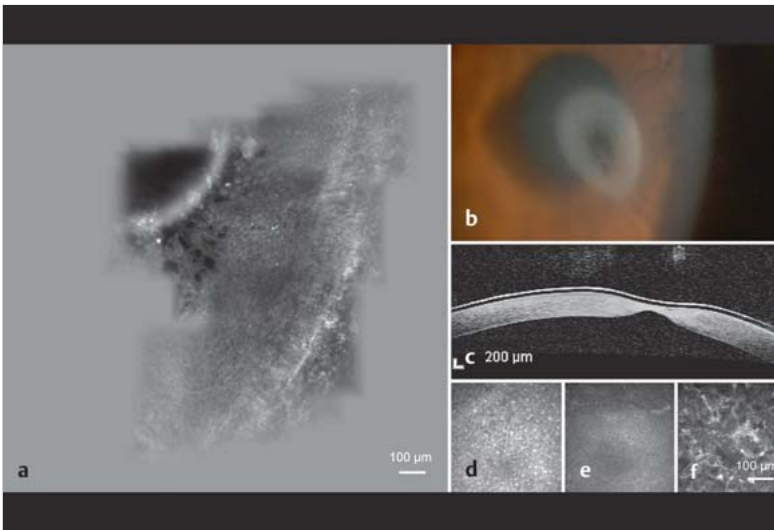


Abb. 3.23 CLSM bei chronischer Graft-versus-Host-Erkrankung.

- a** CLSM Mapping-Bild in der Größe $1,6 \times 1,6$ mm mit Darstellung des Ulcus ohne entzündliche Umgebungsreaktion.
- b** Spaltlampenbefund des Hornhautdefekts.
- c** OCT im Vorderabschnitts-Mode mit deutlich ausgedünntem Hornhautareal. Bild unter therapeutischer Kontaktlinse.
- d** CLSM Einzelbild: Epithelzellen mit hyperreflektiven Kernen angrenzend an den Defektbereich.
- e** Subbasale Region ohne Darstellung von entzündlichen Gewebsreaktionen oder Nervenfasern. Hornhautsensibilität 10 mm.
- f** Anteriores Stroma mit wenig Keratozyten und teils hyperreflektiver Matrix.

Entzündungszeichen auf (► Abb. 3.23a, ► Abb. 3.23e). Es fanden sich weder dendritische noch granulozytäre Zellen als Zeichen einer Immunantwort. Im Bereich des Epithels traten hyperreflektive Zellkerne auf (► Abb. 3.23d), subbasal kamen keine Nervenfasern zur Darstellung (► Abb. 3.23e). Im Stroma fanden sich wenige Keratozyten mit teils hyperreflektiver Matrix (► Abb. 3.23f). Der Hornhautsensibilität betrug 10 mm. Eine zusätzliche OCT-Bildgebung verdeutlicht die starke Hornhautausdünnung (► Abb. 3.23c). Im Verlauf musste das Auge trotz wiederholter Amnionmembranaufnahmen enukleiert werden.

Wundheilung

Mechanische Störungen der Hornhautoberfläche können zu bleibenden Vernarbungen führen. Diese Vernarbungsreaktion kann innerhalb des Hornhautstromas anhand der Keratozytenmorphologie verfolgt werden. Sogenannte aktivierte Keratozyten stellen dabei die Schiene der Wundheilung dar. Im Tierversuch wurden sie als langgestreckte, nadelartige Strukturen identifiziert [6]. Anhand der verschiedenen Fallbeispiele wird auf einige humane Keratozytenformen und deren Interpretation eingegangen.

Im ersten Fall handelt es sich um eine Verätzung mit Pflanzenflüssigkeit bei einem 40jährigen Patienten. Nach anfänglich aufgetretener Hornhautstippung zeigten sich spaltlampenmikroskopisch persistierende zarte, longitudinale Trübungen (► Abb. 3.24a). Konfokalmikroskopisch fanden sich bei intaktem Epithel langgestreckte, nadelartige Keratozyten im vorderen und mittleren Stroma (► Abb. 3.24b), welche morphologisch identisch zu den Formen migrierender Zellen im Tierversuch sind. Sie bestanden auch noch nach 4 Monaten, jedoch in reduzierter Ausprägung (► Abb. 3.24d). Spaltlampenmikroskopisch blassten die Trübungen ebenfalls ab (► Abb. 3.24c).

Der zweite Fall stellt einen Quellungszustand der Hornhaut bei einem 48jährigen Patienten dar. Die Hornhautdicke betrug etwa $875 \mu\text{m}$. Zunächst bildeten sich in Folge einer Hornhauterosio Descemet-Falten, und es kam zu einer endothelialen Reaktion (► Abb. 3.24e). Im gequollenen Zustand der Hornhaut waren sternförmige Keratozyten auf Ebene des anterioren und mittleren Stromas sichtbar (► Abb. 3.24f). Im Tierversuch wurden morphologisch identische Formen als abgestorbene Zellkörper interpretiert. Im Verlauf klarte die Hornhaut allmählich auf (► Abb. 3.24g). Mittels CLSM stellten sich nach einer Woche noch ablassende, sternähnliche Strukturen dar (► Abb. 3.24h), teilweise war die regelrechte Stromamorphologie wiederhergestellt. Es kam zu keiner bleibenden Vernarbung.

3.4.4 Diskussion

Störungen der Hornhautoberfläche führen zu teils schmerzhaften visuellen Einschränkungen des Patienten, und die therapeutischen Spektren erweitern sich zunehmend. Nicht perforierende Verfahren wie die Descemet-Membran-Endothelzelltransplantation ermöglichen inzwischen eine atraumatischere Transplantation endothelialen Gewebes mit bisher vielversprechenden Resultaten [10],[11]. Solche therapeutischen Fortschritte können insbesondere durch ein besseres Verständnis von Krankheitsursachen und Krankheitsentwicklung erzielt werden. Um dieses Verständnis zu fördern, werden konfokalmikroskopische Untersuchungen an unterschiedlichen Patienten durchgeführt.

Hornhautinfektionen unterschiedlicher Genese werden häufig anhand klinischer Parameter diagnostiziert und behandelt. In einigen Fällen zeigen sich jedoch therapieresistente Verläufe, die eine zusätzliche Erregerdiagnostik notwendig machen. Hornhautabstriche liefern dabei häu-

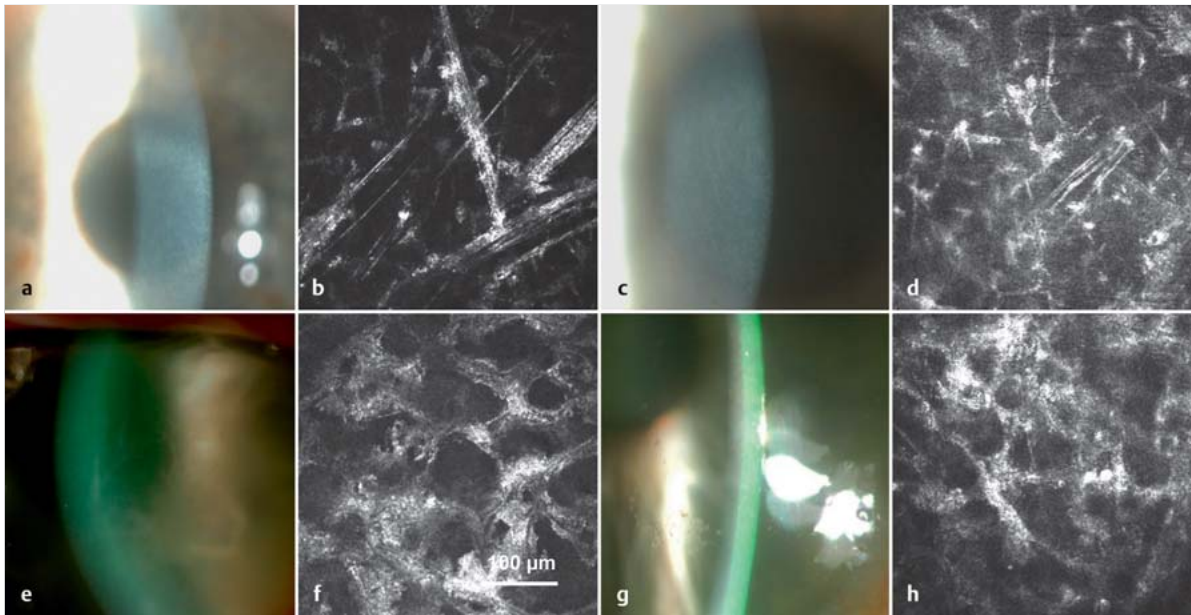


Abb. 3.24 CLSM im Rahmen der Wundheilung.

- a Spaltlampenbefund nach abgelaufener Verätzung mit longitudinalen Trübungen.
- b CLSM: nadelartig verlängerte, stark hyperreflektive Keratozytenformen auf Ebene des anterioren und mittleren Stromas.
- c Spaltlampenbefund des gleichen Patienten nach 4 Monaten mit abgeblassten Trübungen.
- d CLSM: persistierende langgestreckte Strukturen in milderer Ausprägung nach 4 Monaten.
- e Spaltlampenbefund einer gequollenen Hornhaut mit Descemet-Falten und endothelialen Präzipitaten nach Erosio.
- f CLSM: sternartige Keratozyten auf Ebene des anterioren und mittleren Stromas.
- g Gleicher Patient 1 Woche später mit deutlich aufgeklärter Hornhaut und vereinzelt endothelialen Präzipitaten.
- h CLSM: abblassende Sternkonfigurationen.

fig unspezifische Befunde [12]. Die konfokale Mikroskopie konnte als diagnostisches Verfahren insbesondere in Fällen fungaler oder Akanthamöben-assoziiertes Keratitis angewendet werden [13],[14],[15]. Dabei ist eine Differenzierung zwischen fadenförmigen Pilzen (*Aspergillus*-Spezies, *Fusarium solani*) und Hefen (*Candida*-Spezies) möglich [16],[17]. In dem Fall der hier dargestellten Patientin handelte es sich um eine aggressive und lange Zeit therapierefraktäre Infektion. Nur konfokalmikroskopisch und histologisch konnten Pilzhyphen ohne genauere Klassifikation nachgewiesen werden. Der Vorteil der CLSM liegt in dem dadurch entstandenen Zeitgewinn. Es konnte mit einer entsprechenden Therapie begonnen werden, bevor das histologische Ergebnis vorlag. Bakterielle und virale Reizzustände fallen konfokalmikroskopisch eher durch unspezifische entzündliche Reaktionen auf. Eine Diagnosestellung ist prinzipiell zügig möglich, wobei Verwechslungen auftreten können. In der Studie von Hau et al. [9] wurde eine Sensitivität konfokalmikroskopischer Untersuchungen an verschiedenen Keratitiden von bis zu 55,8% sowie eine Spezifität von bis zu 84,2% in Abhängigkeit des Untersuchers ermittelt.

Hornhautveränderungen können aber auch Hinweise auf Stoffwechselstörungen liefern. Hier entwickelt sich die CLSM aktuell zu einer vielversprechenden diagnostischen Methode und wird in Fällen diabetischer Neuro-

pathie zunehmend diskutiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Zusammenhänge zwischen Neuropathie und Veränderungen des subbasalen Nervenplexus der Hornhaut existieren [18],[19]. Durch verbesserte Quantifizierungstechniken eröffnen sich zukünftig vielfältige Möglichkeiten für Frühdiagnostik und eventuell auch Therapiemonitoring [3]. In dem hier dargestellten Fall einer Hornhauterosio bei Diabetes mellitus ließen sich am betroffenen Auge keine Nervenfasern darstellen. Korrespondierend dazu wurde eine stark herabgesetzte Hornhautsensibilität nachgewiesen. Aber auch das Partnerauge zeigte Veränderungen der Nervenfasermorphologie bei intakter Sensibilität, die Hinweise auf eine unzureichende Blutzuckereinstellung geben können. Der HbA_{1c} von 9,3% bestätigt diese These. Das Fehlen von Entzündungszellen im 2. Fall kann ebenso ein Indikator der gestörten Immunfunktion sein. Die im Epithel der erkrankten Augen auffällig gewordenen hyperreflektiven Zellkerne können ohne histologische Präparation nicht eingeordnet werden. Bei mitotischen Zellen verdichtet sich prinzipiell der Zellkörper und der Kern kondensiert. In beiden Fällen traten auch Veränderungen in der stromalen Morphologie auf, die im Folgenden an anderen Beispielen diskutiert werden sollen.

Keratozyten übernehmen eine entscheidende Funktion im Rahmen der Wundheilung. Es kommt zur Umwand-