

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde  
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. S. Clemens)  
und  
dem Institut für Anatomie  
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. J. Fanghänel)  
der medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Zur vergleichenden Morphologie des Bindehautepithels zwischen  
Impressionszytologie und konfokaler LASER Scanning Mikroskopie**

**I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n**

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin

(Dr. med. dent.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2005

vorgelegt von: Robert Rath

geb. am: 04.11.1977

in: Rostock

**Dekan:**

**1. Gutachter:**

**2. Gutachter:**

**3. Gutachter:**

**Tag der Disputation:**

**Ort, Raum:**

*Meiner lieben Mutter.*

## Inhaltsverzeichnis:

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 1.       | <u>Einleitung und Fragestellung</u>  | 7  |
| 2.       | <u>Literaturübersicht</u>  | 9  |
| 2.1.     | Die Zytologie der Bindehaut  | 9  |
| 2.1.1.   | Anatomische Grundlagen unter besonderer Berücksichtigung des Bindehautepithels | 9  |
| 2.1.2.   | Visualisierende Verfahren in der Zytodiagnostik                                | 11 |
| 2.1.2.1. | Oberflächenmorphologie im SEM Bild   | 11 |
| 2.1.2.2. | Die TEM  | 11 |
| 2.1.2.3. | Die Lichtmikroskopie   | 13 |
| 2.1.3.   | Die IPZ  | 15 |
| 2.2.     | Konfokale LSM  | 16 |
| 2.2.1.   | Grundprinzip   | 16 |
| 2.2.2.   | Das RLSM   | 17 |
| 2.2.3.   | Anwendungen der konfokalen Mikroskopie   | 20 |
| 3.       | <u>Material und Methodik</u>   | 23 |
| 3.1.     | Impressionszytologische Materialentnahme                                       | 23 |
| 3.2.     | Konfokale in vivo Zytodiagnostik mit dem RLSM                                  | 25 |
| 3.3.     | Bewertung der Abbildungen und Präparate  | 27 |
| 3.3.1.   | Lichtmikroskopische Untersuchung der impressionszytologischen Präparate        | 27 |
| 3.3.2.   | Auswertung der konfokalen in vivo Aufnahmen                                    | 28 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.     | <u>Ergebnisse</u>   | 30 |
| 4.1.   | IPZ   | 30 |
| 4.1.1. | Allgemeine Aussagen der IPZ   | 30 |
| 4.1.2. | Aussagen zur Morphologie  | 31 |
| 4.2.   | Konfokale LSM   | 34 |
| 4.2.1. | Aussagen zum Zellverband  | 34 |
| 4.2.2. | Aussagen zur Einzelzelle  | 36 |
| 4.2.3. | Topographische Ergebnisse   | 40 |
| 4.2.4. | Wesentliche Einzelbefunde   | 44 |
| 4.3.   | Vergleichende Beurteilung der Lichtmikroskopie und der konfokalen LSM | 52 |
| 5.     | <u>Diskussion</u>   | 54 |
| 6.     | <u>Zusammenfassung</u>  | 59 |
| 7.     | <u>Anhang</u>   | 61 |

## Abkürzungsverzeichnis

1. Abb. – Abbildung
2. Aqua dest. – Aqua destillata
3. bzw. – beziehungsweise
4. ca. - circa
5. CALT – conjunctiva associated lymphoid tissue
6. EM - Elektronenmikroskopie
7. etc. – et cetera
8. EDV – elektronische Datenverarbeitung
9. Fa. – Firma
10. fix - fixiert
11. HE - Hämatoxylin-Eosin
12. HRT- Heidelberg Retina Tomograph
13. IPZ- Impressionszytologie
14. LSM - Laser Scanning Mikroskopie
15. KPR – Kern Plasma Relation
16. LASER – Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
17. LM – Lichtmikroskopie
18. MALT - Mukosa associated lymphoid tissue
19. Nr. - Nummer
20. PAS – Perjod- Acid (Säure) Schiff- Reagens
21. RLSM – Rostocker LASER Scanning Mikroskop
22. SEM – Scanning Elektronen Mikroskop
23. Tab. – Tabelle
24. TEM – Transmissions Elektronen Mikroskopie
25. u.a.- unter anderem
26. z.B. – zum Beispiel

## **1. Einleitung und Fragestellung**

Die Bindehaut ist ein wesentlicher Bestandteil der Augenoberfläche und trägt zum Erhalt der Transparenz der Hornhaut bei. Für die Gewährleistung dieser Funktionen ist das Bindehautepithel mit sekretorischen Zellen (Becherzellen) ausgestattet, deren Sekret zur Befeuchtung des Auges und zur Stabilisierung des Tränenfilms beiträgt. Die Becherzellen und ihre Funktion, stehen im Mittelpunkt des Interesses bei degenerativen Erkrankungen der Bindehaut (z.B. Sicca Syndrom). Bisherige Diagnoseverfahren (Schirmer Test, Tränenfilmaufriszeit) ermöglichen erst bei ausgeprägter, klinischer Manifestation eine zuverlässige Diagnose (Tost, 1995). Die zytologische Untersuchung der Konjunktiva kann frühe Anzeichen für ein Sicca - Syndrom besser darstellen und helfen die schon bei geringen klinischen Symptomen vom Patienten wahrgenommene Beschwerden richtig zuzuordnen. Für die morphologische Begutachtung des hochdifferenzierten Epithelzellverbandes ist die IPZ eine geeignete Technik (Murube und Rivas, 2003; Tseng et al., 2001). Mit dieser Methode ist der Untersucher in der Lage, Störungen an der Epithelbarriere der Augenoberfläche sichtbar zu machen. Praktische Anwendungen und Untersuchungen zeigen, dass mit dieser Methode bereits Mikroveränderungen des Bindehautepithels mit hoher Wahrscheinlichkeit zu erfassen sind (Tost, 1995).

Ziel dieser Arbeit ist es, die bekannten zytomorphologischen Befunde der IPZ mit der neuen in vivo Methode der konfokalen LSM anhand des Normalbefundes des humanen Bindehautepithels im Rahmen einer Mustererkennung und Beschreibung zu vergleichen. Letzteres bildet die wissenschaftliche Voraussetzung, um die moderne in vivo Methodik auch in der klinisch-ophthalmologischen Diagnostik erfolgreich einsetzen zu können. Die konfokal dargestellten Strukturmuster, sollen daher in einen direkten analogen Bezug zu den bekannten morphologischen Abbildungsmustern der IPZ gesetzt werden. Erst dadurch kann die zuzuordnende morphologische Struktur im konfokalen Bild des RLSM unter wissenschaftlichen Aspekten zuverlässig definiert werden. Mit Hilfe dieser „Mustererkennung“ wird eine Interpretation der im konfokalen Mikroskop

sichtbaren Strukturen ermöglicht. Von unmittelbarem Interesse ist hierbei die Augenoberfläche, da die IPZ nur die oberflächlichen Epithelschichten (ca. 2-3 Epithelzelllagen) erfasst.

Auf Grundlage der gewonnenen Erfahrungen mit der *in vivo* Methodik an der normalen konjunktivalen Epitheloberfläche beim Gesunden soll letztendlich ein Ausblick auf die konfokale Abbildung tieferer Schichten der Bindehaut (*in vivo*) gegeben werden. Im Unterschied zur konventionellen exfoliativen Bindehautzytologie bietet die *in vivo* Diagnostik einen sofortigen Einblick auf die gesamte Dicke des Epithels und subepitheliale Strukturen. Das Verfahren hat damit das Potential die klinischen Untersuchungsmöglichkeiten der Augenheilkunde enorm zu erweitern.

## **2. Literaturübersicht**

### **2.1. Die Zytologie der Bindehaut**

Die Zytologie ist ein in der klinischen Diagnostik etabliertes Verfahren. Im Rahmen der Stufendiagnostik des „Trockenen Auges“, kommt der IPZ zur Differenzierung des Ausmaßes von Benetzungsstörungen eine besondere Bedeutung zu (Espejo et al. 1989).

Um die zytologische Untersuchung durchführen zu können, bedarf es der Gewinnung von Material, welches mit verschiedenen Verfahren entnommen werden kann. Das Prinzip solcher Abnahmeverfahren beruht auf der Zellgewinnung durch Ausschneiden, Abreißen oder Abschaben vom Entnahmeort. Etablierte Verfahren sind hier die IPZ und die Exfoliativzytologie (z.B. Cytobrush).

Bei der Untersuchung der Proben werden unterschiedliche Verfahren, wie Lichtmikroskopie und EM, sowie die TEM eingesetzt, welche in Abhängigkeit vom Erkennungsprinzip umfangreiche Aussagen zu den beurteilten Strukturen zulassen.

#### **2.1.1 Anatomische Grundlagen unter besonderer Berücksichtigung des Bindehautepithels**

Die Tunica conjunctiva ist eine Schleimhaut, die anatomisch in drei verschiedene Abschnitte eingeteilt wird:

1. Conjunctiva bulbi
2. Conjunctiva palpebralis
3. Conjunctiva fornicis

Histologisch handelt es sich bei der Bindehaut um eine zwei- bis fünflagige Zellschicht mit sekretorischen und nicht sekretorischen Epithelzellen. Je nach Ort der Probenentnahme sind unterschiedliche Morphologien der Epithelzellen zu beobachten.

Der größte Anteil der Conjunctiva bulbi und – palpebralis besteht aus einem kubischen Epithelzellverband. Dieser zeigt im mechanisch beanspruchteren Bereich der Lidkanten und in Limbusnähe (also im Bereich der Lidspalte), eine zunehmende Abflachung der Zellen zur

Oberfläche hin, welche Ergebnis der höheren, mechanischen Beanspruchung ist. Auch Medikamente sind als Ursache für solche degenerativen Erscheinungen denkbar (Dursun et al. 2002). Die Plattenepithelbildung wird durch zunehmendes Alter und Einlagerung von hyalinen Substanzen in die Zellen begünstigt (Tost, 2004).

Am Übergang in die Fornices und im Bereich derselben findet man zylindrische Zellformen.

Die Zellschichten sitzen einer Basalmembran auf, an welche sich eine Bindegewebsschicht anschließt. Die Bindehaut und ihre zellulären Bestandteile sind Teile des MALT, welches eine wichtige Rolle in der Immunabwehr spielt (Knop und Knop, 2000). Für die Bindehaut favorisieren die Autoren die spezifische Bezeichnung als CALT.

Die exakte Epithelstruktur ist bis heute nicht vollständig geklärt, wie die bisherigen Erkenntnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen (siehe 2.1.2.). Im Bereich der Conjunctiva bulbi lassen sich zwei weitere, strukturell besondere Bereiche voneinander unterscheiden (Lütjen Drecoll et al., 1982).

- a. Limbusnahe Konjunktiva
- b. Bindehaut im Bereich des Übergangs von bulbärer in fornikale Konjunktiva

In vivo ist die gesunde Bindehaut schwach rosa gefärbt, semitransparent, feucht und glatt. Bei Reizung z.B. durch mechanische Alterationen imponiert eine deutliche Rotfärbung, die durch eine reaktive Hyperämie der Schleimhaut bedingt ist. Die Verschieblichkeit und Elastizität bedingt in vivo eine sichtbare Faltenentstehung, welche bei älteren Patienten verstärkt zu beobachten ist.

## **2.1.2. Visualisierende Verfahren in der Zytodiagnostik**

### **2.1.2.1. Oberflächenmorphologie im SEM Bild**

Die Form der Bindehautoberfläche ist durch ihre Funktion geprägt und kann am besten durch die sehr aufwendige, aber detaillierte Untersuchung mit dem SEM betrachtet werden. Das SEM eignet sich besonders zur Darstellung der Membrandifferenzierungen oberflächlicher Epithelzellen. Außerdem werden Organellen im apikalen Kompartiment dieser Zellen visualisiert. Die Oberflächenepithelzellen sind durch zahlreiche Mikrovilli charakterisiert, die bauliche Unterschiede aufweisen. So zeigen einige der Mikrovilli Verdickung zu sogenannten Microplacae, während andere sich aufteilen (Steuhl und Knorr, 1990). Veränderungen von Anzahl und Form der Endungen werden bei verschiedenen Medikamentengaben und Erkrankungen des Auges beobachtet (Tost, 1995).

Mikrovilli dienen der Stabilisation des Tränenfilms und Vergrößerung der resorbierenden Oberfläche. Dort können Fremdkörper eingelagert und mit Muzin für die Beseitigung über den Tränenfilm vorbereitet werden.

Ebenfalls sichtbar sind die äußeren Öffnungen der intraepithelial vorhandenen, aber im SEM Bild nicht erkennbaren Becherzellen. Ihr Durchmesser wird mit 1-3 µm angegeben. Auch die zur Oberflächenvergrößerung dienlichen Krypten des Epithels imponieren durch Öffnungen, deren Durchmesser aber mit 10-60µm größer ist.

### **2.1.2.2. Die TEM**

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der konjunktivalen Epithelzellen ergab eine Unterteilung in fünf unterschiedlichen Zelltypen (Rohen und Lütjen Drecoll, 1991).

#### a.) Typ I

Als Typ I Zellen werden die Becherzellen bezeichnet (englisch: goblet cells), die für die Synthese und Sekretion von Muzin zuständig sind und somit einen wichtigen Teil zum Schutz des Auges vor

Fremdkörpern beitragen. Becherzellen sind merokrine Drüsenzellen. Sie zeigen elektronenoptisch einen hohen Anteil an Granula, die nahezu das gesamte Zytoplasma ausfüllen. Neben diesen sekretorischen Muzingranula enthalten diese Zellen auch Hyaluronsäure .

b.) Typ II

Diese Zellen werden auch als „non goblet secretory cells“ bezeichnet und tragen ebenfalls zur Herstellung des Schleimes auf der Augenoberfläche bei. Größenuntersuchungen der Vesikel dieser sekundären Schleimbildner am menschlichen Auge erbrachten Werte von 100-500  $\mu\text{m}$  (Kessing, 1968), während in der Konjunktiva von Kaninchen 200-800 nm große Vesikel gefunden wurden (Steuhl und Rohen, 1984).

c.) Typ III

Die sogenannten Golgi Zellen, welche mit zahlreichen Golgi Komplexen und einem geringen Anteil an Mitochondrien sowie rauem, endoplasmatischen Retikulum ausgestattet sind. Sie tragen ebenfalls zur Schleimproduktion bei.

d.) Typ IV

Sie werden auch als endoplasmatische Retikulumszellen bezeichnet. Die Typ IV Zellen weisen einen hohen Anteil an rauem endoplasmatischem Retikulum auf. Sie dienen vorrangig der Proteinsynthese.

e.) Typ V

Diese Zellen enthalten einen hohen Anteil an Mitochondrien. Bis zu 40 dieser Organellen kommen in einer Typ V Zelle vor. Der Anteil von Golgi Komplexen und der des rauem endoplasmatischen Retikulums ist in diesen Zellen gering. Im EM Bild erscheint das Zytoplasma dieser Zellen elektronendichter als das der anderen Epithelzellen.

### **2.1.2.3. Die Lichtmikroskopie**

Die Lichtmikroskopie ist für die klinische Routinediagnostik das etablierteste Verfahren.

Das lichtmikroskopische Bildmuster ist Grundlage für die Erhebung des Normalbefundes der Bindehautmorphologie. Der Vergleich mit den bekannten morphologischen Erkennungsmustern aus der Lichtmikroskopie, wurde auch für die Interpretation von Bildmaterial der TEM durchgeführt (Abdel-Khalek et al., 1978).

Die Form der Epithelzellen im lichtmikroskopischen Bild ist rund bis polygonal. Die KPR beträgt 1:1 bis 1:2 (Nelson et al., 1983), aber auch Werte von 1:4 wurden beschrieben (Sanderson et al., 1980). Das Größenverhältnis ist abhängig von der Region, aus der das untersuchte Zellmaterial stammt. So liegt die KPR im Bereich der Lidspalte (3 und 9 Uhr Position) bei 1:4 (Saini et al., 1990). Das Zytoplasma der Epithelzellen erscheint nach der PAS Färbung zart blau bis rötlich und beinhaltet Muzin granula, die sich durch den Gehalt an PAS positiven Glycosaminoglycanen färben. Der Kern der Epithelzellen imponiert dunkler als der Zellkörper. Er liegt exzentrisch im Plasma und ist rund bis oval geformt (Marcon et al., 1989a).

Durch die in der Lichtmikroskopie verwendete PAS Hämatoxylin Färbung der zytologischen Präparate stellen sich die muzinhaltigen Becherzellen rot dar und sind somit eindeutig von anderen Zellen unterscheidbar (Adams and Dilly, 1989). Lichtmikroskopisch sind Becherzellen an der gesamten konjunktivalen Oberfläche in regional unterschiedlicher Anzahl zu finden. Die Ergebnisse für die Dichte der Typ I Zellen, variieren je nach Untersucher, Art und Ort der Präparatgewinnung und Patientenkollektiv.

Untersuchungen der bulbären Bindehaut ergaben eine Becherzellfrequenz von 26-40 pro mm<sup>2</sup> und es wurde eine höhere Anzahl sekretorischer Typ I Zellen bei Kindern und junge Erwachsenen ermittelt (Marquardt und Wenz, 1979). Bei der Bestimmung der Becherzellzahl zeigten sich jedoch erhebliche Abweichungen der Einzelwerte vom Mittelwert, so finden sich Werte von 170 (+/-56)/mm<sup>2</sup> und 35 bis 500/mm<sup>2</sup> (Tost, 1995). Nach morphologischen Untersuchungen zum Verteilungsmuster von Becherzellen in der menschlichen Konjunktiva (Rivas et al., 1991) findet sich die größte Anzahl im

Bereich des oberen Fornix und die geringste im Gebiet der Lidspalten. Auch hier lassen sich jedoch Becherzellen finden (Breitbach und Spitznas, 1988).

Im Gegensatz dazu wurde in anderen Untersuchungen (Kessing, 1968) die größte Dichte im nasalen, unteren Bereich des Bulbus und auf der Plica semilunaris gefunden. Im temporalen oberen Teil waren wenige und in der Nähe des Hornhautlimbus keine Becherzellen nachzuweisen.

Da diese Ergebnisse von klinisch gesunden Patienten gewonnen wurden, scheinen die im Bereich der Lidspalte einwirkenden exogenen Umwelteinflüsse als Ursache für die geringere Dichte wahrscheinlich zu sein. Auch bei Kontaktlinsenträgern wurden hier Veränderungen der Becherzellfrequenz festgestellt (Adar et al., 1997).

Pathologische Veränderungen der Bindehautmorphologie verursachen Funktionseinbußen des Epithels und die degenerierten Epithelbestandteile ziehen charakteristische Symptome nach sich. Die squamöse Metaplasie stellt eine solche Veränderung dar, bei der sich das Bindehautepithel zunehmend in ein verhorntes und weniger differenziertes Plattenepithel umwandelt. Diese Transformation ist auch durch die Abnahme der sekretorischen Zellen gekennzeichnet und wird durch mechanische Beanspruchung der Augenoberfläche (z.B. durch Kontaktlinsen) begünstigt (Albietz, 2001). Das resultierende Krankheitsbild ist eine chronische Konjunktivitis.

Diagnostisch ist die Konjunktivitis unterschiedlicher Ätiopathogenese an pathologischen Veränderungen der Zellmorphologien zu erfassen, so finden sich z.B. vergrößerte Epithelzellen (Verschiebungen der KPR auf 1:4 bis 1:12). Auch Snake Zellen, welche schlangenlinienförmig angeordnetes Kernplasma aufweisen, werden beschrieben (Marner, 1980; Rivas et al., 1998).

Die Anzahl der Becherzellen und ihre Veränderung im pathologischen Epithel spielt eine entscheidende Rolle für die Diagnostik der metaplastischen Veränderung (Tost, 1995). Es werden aber auch topographische Unterschiede angegeben, so traten bei der Keratoconjunctivitis sicca im temporalen Anteil der Bindehaut zwar metaplastische Veränderungen, aber keine Differenzen der Becherzelldichte gegenüber dem Normalbefund auf (de Rojas et al., 1993).

### **2.1.3. Die IPZ**

Die Materialentnahme durch die IPZ ist eine unkomplizierte, minimalinvasive, wiederholbare und für den Patienten schonende Methode zur Gewinnung von oberflächlichen Bindehautzellen und liefert konstant gute Ergebnisse bei der Interpretation morphologischer Merkmale und Veränderungen des Epithelzellverbandes (Götz et al., 1986; Paschides et al., 1991; Reddy et al., 1991; Kim, 1997; Tseng et al., 2001; Simon et al., 2002; Murube und Rivas, 2003).

Allerdings handelt es sich dabei um eine punktuelle Untersuchung, die nicht ohne weiteres Rückschlüsse auf die gesamte Bindehaut gestattet.

Daher sind mehrere Materialentnahmen aus unterschiedlichen Regionen empfehlenswert (Tost, 1995). Eine Tropfanästhesie des Auges erleichtert das Verfahren und macht es für den Patienten absolut schmerzfrei. Nach Entfernung des Tränenfilms, wird für die Materialgewinnung ein Zelluloseacetat-Filter auf die gewünschte Stelle der Bindehaut aufgebracht. Die zukünftige Trägerschicht geht mit den Mikrovilli der oberen Epithelzellen eine Bindung ein. Mit einer Pinzette wird der Filter von der Bindehaut abgezogen, wobei die oberen Schichten des Epithels am Filter haften bleiben. Je nach Stärke der adhäsiven Kräfte bleiben 1-3 Zellschichten an der Filteroberfläche haften.

Die so gewonnenen Zellen liegen auf dem Filter im Verband vor. Das Filterpapier stellt die Trägerschicht für die Zellen dar. Er wird mittels eines Klebestreifens auf einen Objektträger aufgebracht und dann der weiteren Bearbeitung und Färbung zugeführt.

In Abhängigkeit von der Aufbereitung können die Präparate licht- oder elektronenmikroskopisch untersucht werden.

Die Bearbeitung für die Lichtmikroskopie beinhaltet folgende Schritte:

1. Fixierung
2. Färbung des Präparates
3. Erreichen der nötigen Filtertransparenz
4. Ablösen der Trägerschicht und der darauf befindlichen Zellen vom Objektträger
5. Aufbringen der modifizierten Präparate auf einen vorbereiteten Objektträger
6. Fixierung mit Kanadabalsam und Eindecken des Präparates (Deckgläschen)

Ziel der Fixierung ist der langfristige Erhalt der Proben mit gleichzeitig minimaler Beeinflussung der Morphologie des Zellverbandes und der Einzelzelle. Die Fixierung der gewonnenen Präparate wurde von vielen Untersuchern auf unterschiedliche Art und Weise vorgenommen. Dabei kam überwiegend die Lufttrocknung zum Einsatz. Um eventuelle Veränderungen des Zellmaterials ausschließen zu können wurden auch andere Verfahren eingesetzt (Streeten und Streeten, 1985; Hanuschik, 1991; Knop und Brewitt, 1992). Die Trocknung des entnommenen Zellmaterials benötigt ca. 5-10 Sekunden (Schumann et al., 1980). Neben zahlreichen anderen Methoden zur Fixierung ist die Behandlung mit industriell angebotenen Alkoholspray zu nennen (Ganghofer et al., 1992). Untersuchungen der Veränderung zytologischer Proben durch verschiedene Fixierungsmethoden (Götz et al., 1986) ergaben keine morphologischen Veränderungen nach Lufttrocknung gegenüber Präparaten mit Fixierung durch alkoholische Lösungen.

## **2.2. Konfokale LSM**

### **2.2.1. Grundprinzip**

Die konfokale LSM zeichnet sich durch die Bildentstehung aus einzeln abgetasteten Bildpunkten des betrachteten Objektes aus. Das Bild entsteht durch die Zusammensetzung einzelner, ausnahmslos aus der Brenn- bzw. Fokusebene des Mikroskopes stammender und deswegen scharf dargestellten Bildpunkte. Alle Bestandteile des Objektes, werden von einer punktförmigen Lichtquelle nacheinander belichtet (gescannt), datentechnisch erfaßt und durch eine zweidimensionale Rekonstruktion zu einem Bild zusammengefügt.

Durch die Zwischenschaltung eines Detektors in den Strahlengang des reflektierten Lichtes wird nur das Licht aus der Fokusebene des Mikroskopes für die Bildinformation der einzelnen Punkte zugelassen. Der Detektor erkennt dieses Licht als scharf fokussiert, da seine Brennebene der des Mikroskopes entspricht. Dieses Verfahren ermöglicht somit die optimale Belichtung des Objektbildes. Durch die präzise Abstimmung des optischen Systems kann eine Fokussierung auch

innerhalb des zu betrachtenden Präparates erfolgen. Diese Möglichkeit der Abbildung wird als Tiefenschärfe bezeichnet.

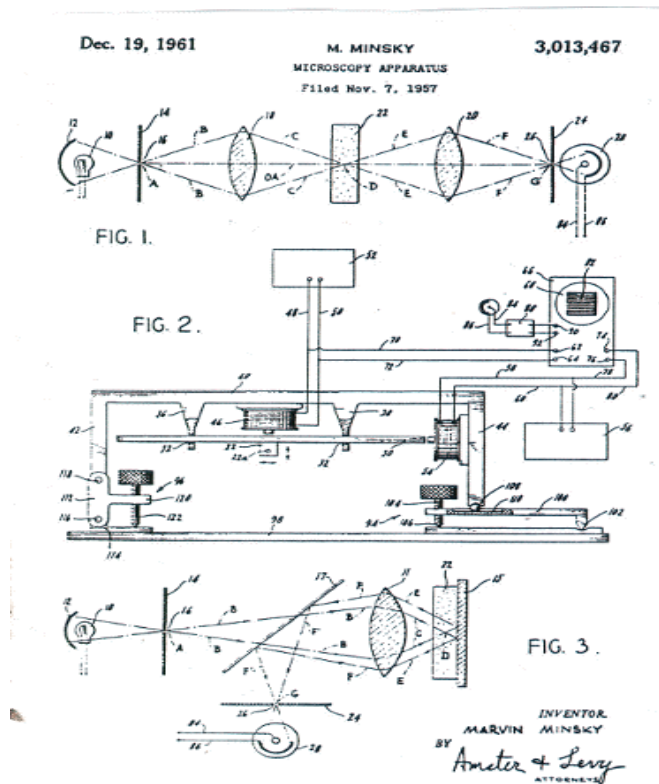


Abb. 1: Zeichnung des konfokalen Mikroskopes (Minsky, 1962).

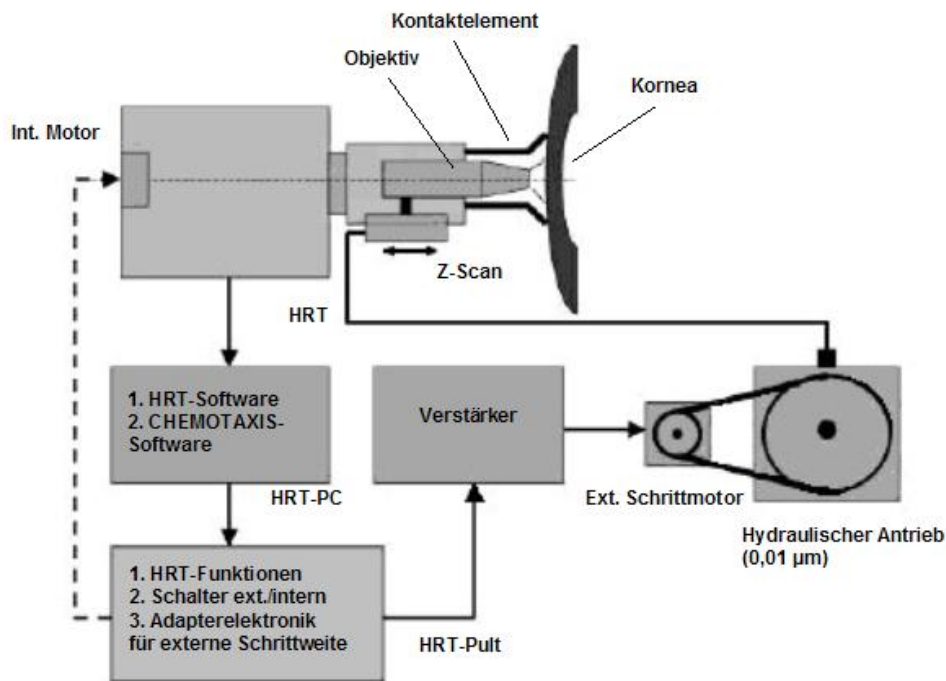
Das von Minsky erdachte Prinzip war mit den damaligen technischen Mitteln nicht realisierbar. Erst die computergestützte Verarbeitung von Bildinformationen lässt die Entstehung eines Bildes aus den digitalisierten Intensitäten des Lichtes der Fokusebene zu.

### 2.2.2. Das RLSM

Das RLSM ist auf der Basis des HRT aufgebaut, welcher nach dem konfokalen Prinzip funktioniert, jedoch keine axiale, konfokale Abtastung (z Scanning) ermöglicht. In das bestehende System des HRT, wurde beim RLSM ein computergestützter z Scan so integriert, das zu den Funktionen des Tomographen die Möglichkeit der optischen Tiefenauflösung hinzugewonnen werden konnte.

Die Verschiebung der Fokusebene in z Richtung ermöglicht ein externer, hydraulischer Antrieb, der mit dem z Scan Vorsatz einerseits und der elektronischen Steuereinheit des Tomographen

andererseits verbunden ist. So kann die Verschiebung der Fokusebene unter computergestützter Überwachung von Tiefe, Lage des Fokus und Startpunkt des z Scans (interne Steuerung), mittels des externen Antriebes über einen hydraulisch bewegten Miniaturschlitten gesteuert werden (externe Steuerung).



**Abb. 2:** Aufbau des RLSM (Stave et al., 2002)

Das vorgesetzte, plane Kontaktelement (Plexiglasscheibe) stellt die Bezugsebene dar, von der aus die Parameter der internen Steuerung ermittelt werden. Der Vorteil des Kontaktvorsatzes liegt darin, dass der Abstand der äußeren Oberfläche der Scheibe vom optischen System konstant ist und bei Kontakt mit dem Auge, dessen Oberfläche gleichgesetzt werden kann. Zur definierten Fokusverschiebung wird diese äußere Oberfläche gleich Null gesetzt. Die von hier aus ermittelten Werte entsprechen somit denen des untersuchten Auges. Das RLSM zeichnet sich durch eine hohe Tiefenauflösung, gleichmäßige Bildfeldausleuchtung und eine hohe Aufnahmegeschwindigkeit aus. Es konnte eine wesentliche Verbesserung der bisherigen Schwachpunkte optischer Diagnoseverfahren mit Tiefenauflösung erreicht werden. Ein Beispiel hierfür sind Tandem Scanning

Mikroskope, welche Halogen- oder Quecksilberhochdrucklampen zur Bildfeldausleuchtung verwenden und so nur ungleichmäßig helle Messfelder besitzen.

Auch Systeme, deren langsame Vorschubbewegung in z Richtung (z.B. MICROPHTHAL Mikroskop = 10 Sekunden) erhebliche Verzerrungen der Bildserien durch die immer vorhandenen Augenbewegungen zur Folge haben, werden übertroffen.

Das RLSM ermöglicht die Aufnahme von Bildserien in einer definierten Tiefe, oder ausgehend von einer bestimmten Fokusebene in die Tiefe. Der Vorschub erfolgt hierbei ruckfrei um je  $0,1 \mu\text{m}$  ausgehend von der gewählten Scan Tiefe.

Die entstehenden Bildserien (eine Serie entspricht 64 einzelnen Bildern) werden innerhalb von nur 0,7 Sekunden erfasst. Hierdurch wird der Einfluß der Augenbewegung auf die Bildqualität der Serien minimiert und ein seitlicher Versatz der Einzelbilder  $<10 \mu\text{m}$  erreicht (Stave et al., 2002).

Die benötigte Zeit für die automatisch angefertigte Bildanzahl von  $3 \times 64$  Bildern beträgt für die Ausführung eines z Scans drei Minuten. Die Verkürzung des Aufnahmezeitraumes verbessert die Ergebnisse bei der Tiefenverschiebung der Fokusebene erheblich.

Die eigentliche Ursache der seitlichen Abweichungen, ist aber die Veränderung der z Koordinate des Fokus während der linearen Vorschubbewegung durch die Eigenbewegung des Auges. Dieser Fehler wird bei anderen optischen Systemen mit Tiefenauflösung nicht korrigiert, so daß immer mit einer Verzerrung der Ergebnisse gerechnet werden muß. Man bezeichnet diese Verzerrung als Bildversatz. Das RLSM baut auf dieser Erkenntnis auf und kann mit einer veränderten Vorschubbewegung des Laserfokus diesen methodischen Fehler korrigieren. Eine nicht lineare, sondern treppenförmige Bewegung der Fokusebene in z Richtung, garantiert eine stets senkrecht zur Vorschubrichtung abgebildete Bildebene. Diese Veränderung ist entscheidend für die Qualität der Darstellung der untersuchten Strukturen und trägt auch zur Präzision der Tiefenzuordnung bei. Andersartige Bildverzerrungen, wie z.B. Bildfeldkrümmungen, wurden nicht beschrieben (Stave et al., 2001).

### **2.2.3. Anwendungen der konfokalen Mikroskopie**

Der entscheidende Vorteil der Methode liegt in der bereits erwähnten Tiefen- und Punktauflösung von untersuchten Objekten und Präparaten im konfokalen Bild. Durch die Möglichkeit von in vivo Untersuchungen, wird die diagnostische Bedeutung gesteigert und die Anzahl der klinischen Anwendungsmöglichkeiten erhöht. Die Darstellung des unveränderten Zellverbandes ermöglicht über die Definition eines Normalbefundes schnellere und eindeutige Diagnosen manifester oder beginnender Veränderungen. Untersuchungen der Kornea bestätigen dies beispielsweise für die Akanthamöbenkeratitis aber auch für die Keratoconjunctivitis epidemica (Knappe et al., 2004).

Konfokale Bilder können genau aus der gewünschten Ebene, im Mikrometerbereich, erstellt und die Strukturen, deren Vorhandensein in dieser Ebene untersucht werden soll, unverändert (in vivo) beurteilt werden (Jalbert et al., 2003). Diese Möglichkeit schließt artifizielle Veränderungen der Morphologie des beurteilten Materials aus, welche bisher durch notwendige Aufbereitungs- und Fixierungsmethoden für die Herstellung auswertbarer Proben unabdingbar waren (siehe 2.1.). Hinzu kommt eine geringere psychische Belastung des Patienten bei in vivo Verfahren, da die Materialentnahme (z.B. durch Biopsie oder Exzision) entfällt. Die Untersuchungsergebnisse der konfokalen LSM sind schneller verfügbar und durch die computergestützte Bildbearbeitung qualitativ hochwertig (Vanathi et al., 2003).

Bei der Untersuchung mit dem RLSM, kommt die Möglichkeit der Darstellung in axialer Richtung hinzu. Die Aneinanderreihung (Animation) der einzelnen optischen Schnitte ermöglicht eine Beurteilung der Morphologie und Topographie der Einzelzelle, des Zellverbandes, sowie innerer und äußerer Oberflächen in einer durch den Betrachter frei wählbaren Tiefe.

Die Merkmale der verschiedenen Schichten und Strukturänderungen im Aufbau ihrer Bestandteile, können vom Computer erkannt und nach Bearbeitung mit verschiedenen Techniken (z.B. Falschfarbendarstellung, Histogramme, digitale Filter) verbessert dargestellt werden. Neben der Optimierung des Bildes mittels vermehrter Ausschöpfung der Ausleuchtung in den Randbereichen, ist eine 600 fach vergrößerte Darstellung möglich, die entscheidend dazu beiträgt Einzelheiten der Gewebestruktur besser zu beurteilen. Gleichzeitig ist die bessere Bildausleuchtung und die höhere

Bildqualität Grundlage für computergestützte Anwendungen zur Auswertung der abgebildeten Strukturen. Im Rahmen von Hornhautuntersuchungen mit dem RLSM wurden Zählungen der vorhandenen Keratozyten computergestützt (Chemotaxis® Software) durchgeführt, was erst durch die genannten Optimierungen der Bildqualität möglich wurde (Stave, 2001).

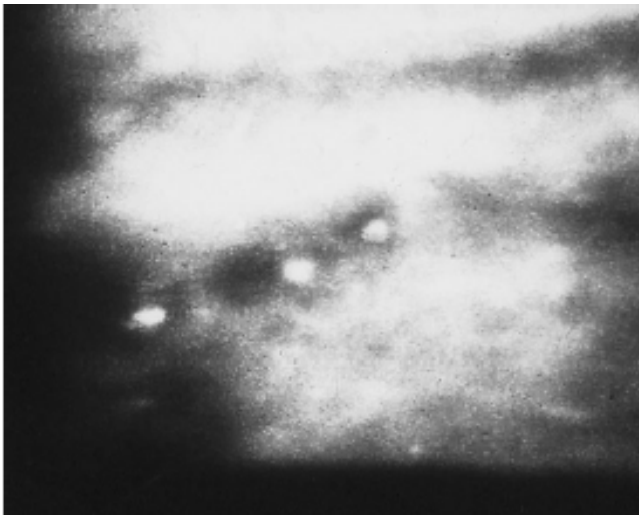
Aufgrund der Möglichkeiten der konfokalen Mikroskopie ergeben sich neue Einsatzgebiete, die z.B. in der Früherkennung pathologischer Veränderungen auf Zellebene liegen und das Verständnis für die Ursachen und Entstehungsmechanismen von Erkrankungen entscheidend verbessern könnten (Cavanagh et al., 2000). Die konfokale Mikroskopie ist somit ein neues und nützliches Instrument für die ophthalmologische Diagnostik (Masters und Bohnke 2001).

Histologische Schnitte stellen immer einen Querschnitt des natürlichen Objektes in einem fixiertem Zustand dar und auch wenn dieser Fehler durch andere Methoden, wie die IPZ vermieden werden kann, so ist doch die Genauigkeit durch die herstellbare Schichtdicke limitiert, welche immer mehrere Zelllagen zur Abbildung bringt. Auch notwendige Verfahren zur Konservierung und Fixierung von Proben sind potentielle Fehlerquellen.

Diese Faktoren können sich auf die Diagnostik von Krankheitsbildern, wie der Akanthamöbenkeratitis nachteilig auswirken, die trotz steigender Häufigkeit in Europa vielfach erst in einem späten Stadium diagnostiziert wird. Das Interesse an der Verbesserung einer frühzeitigen Erkennung ist groß, da im Frühstadium meist eine vollständige Visusrehabilitation erreicht werden kann, während bei später Diagnose ein operativer Eingriff unumgänglich ist. Die konfokale Mikroskopie stellt hier eine überlegene Methode zur Früherkennung dar, deren Darstellungsvermögen von keinem anderen derzeit existenten Diagnoseverfahren übertroffen wird (Cavanagh et al., 1993).

Das am häufigsten angewendete Diagnoseverfahren, die Spaltlampenmikroskopie, kann nur Aufschluss über allgemeine Veränderungen in der gesamten Hornhaut geben. Diese sind jedoch vielfältig und können nicht spezifisch der Akanthamöbenkeratitis zugeordnet werden. Eine Vielzahl von Fehldiagnosen ist zwangsläufig die Folge. Der Einsatz der konfokalen in vivo Diagnostik kann die Ergebnisse der Spaltlampenmikroskopie bei der Akanthamöbenkeratitis, aber auch bakterieller Infektionen der Kornea bestätigen (Chew et al., 1992).

Die eindeutige Diagnose ist nur über den Nachweis von intraepithelialen Zysten oder des Trophozoiten möglich. Zuverlässige Ergebnisse können darstellende Verfahren, wie die Lichtmikroskopie oder die aufwendige EM liefern (Auran et al., 1994). Deren Anwendung setzt aber eine erfolgreiche Materialentnahme voraus, welche die spezifischen Bedingungen am Sehorgan berücksichtigen muß. Einerseits stellt die Entnahme eine Verletzung der Augenoberfläche, - hüllen dar, die mit einer zusätzlichen Vernarbung oder Trübung z.B. im Hornhautbereich oder gar der Hornhautperforation einhergehen kann. Andererseits werden oft oberflächliche Zellen gewonnen (u.a. um die Perforationsgefahr bei der Entnahme zu reduzieren), aus denen dann die Diagnose mit den genannten, zuverlässigen, bildgebenden Untersuchungstechniken eventuell nicht gestellt werden kann. Die konfokale Mikroskopie kann dem behandelnden Arzt sofort und in vivo den pathognomonischen Hinweis auf die Akanthamoebenkeratitis geben (Winchester et al., 1995).



**Abb. 3:** Darstellung des Trophozoiten im konfokalen Bild in Form von hochreflektierenden Strukturen, deren Größe mit 10 bis 25  $\mu\text{m}$  angegeben wird (Guthoff, 2000).  
(Konfokales in vivo Bild, Kornea)

### **3. Material und Methodik**

In der durchgeführten Studie sollten die IPZ und die konfokale LSM verglichen werden. Hierzu wurden von 23 augengesunden Probanden 110 vergleichende, zytologische Proben mittels der bereits beschriebenen IPZ entnommen (siehe 2.1.3.). Durch lichtmikroskopische Beurteilung fünf qualitativer und quantitativer Parametern (siehe 3.3.), fand eine standardisierte morphologische Betrachtung der sichtbaren Strukturen statt.

Weiterhin wurden in vivo Bilder von den identischen Entnahmeorten an der Oberfläche und in einer Tiefe von 14-16 µm mit dem RLSM derselben Entnahmeorte angefertigt, deren Informationsgehalt in identischer Weise bewertet wurde. Durch diese Vorgehensweise sollte die neue, konfokale Darstellung des konjunktivalen Epithels überprüft und die sich ergebenden Bildmuster zu den bekannten lichtmikroskopischen Befunden aus der Bindehautzytologie in Bezug gesetzt werden.

#### **3.1. Impressionszytologische Materialentnahme**

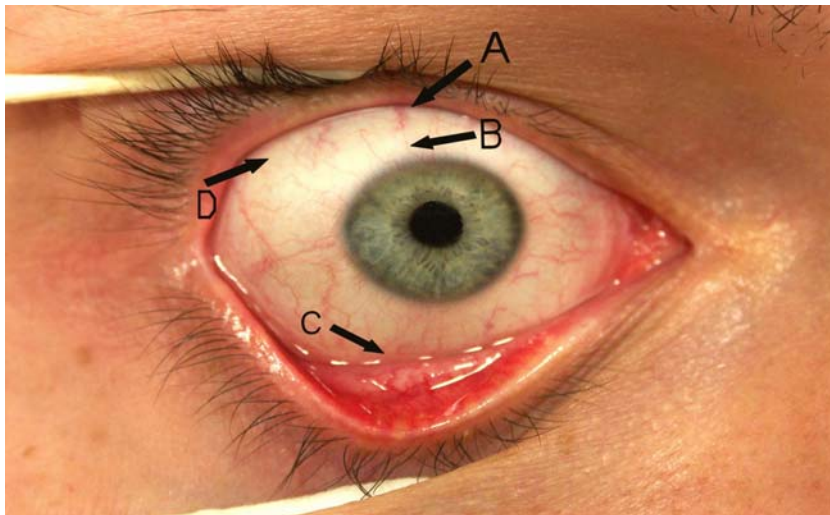
Die Präparate der IPZ wurden wie unter 2.1.3. erläutert entnommen und für den Nachweis von Muzin mit der PAS Hämatoxin Färbung aufbereitet. Im Folgenden ist der Ablauf in seinen wesentlichen Schritten angegeben.

1. Einlegen in Perjodsäure 5 min
2. 3-malige Spülung mit Aqua dest.
3. Einlegen in Schiff's Reagenz 5 min
4. Einlegen in Kaliummetabisulfat 1 min
5. 3-malige Spülung mit Aqua dest.
6. Einlegen in Hämatoxylin 5 min
7. 3-malige Spülung mit Aqua dest.
8. Einlegen in Lithiumcarbonat 1 min
9. Aufsteigende Alkoholreihe 70, 95, 99%
10. Lufttrocknung
11. Aufhellung mit Xylol

Die Festlegung der Präparatentnahmestellen erfolgte nach den bisherigen Erkenntnissen der zytologischen Untersuchungen des Bindehautepithels. Die Entnahmeorte wurden wie folgt bezeichnet:

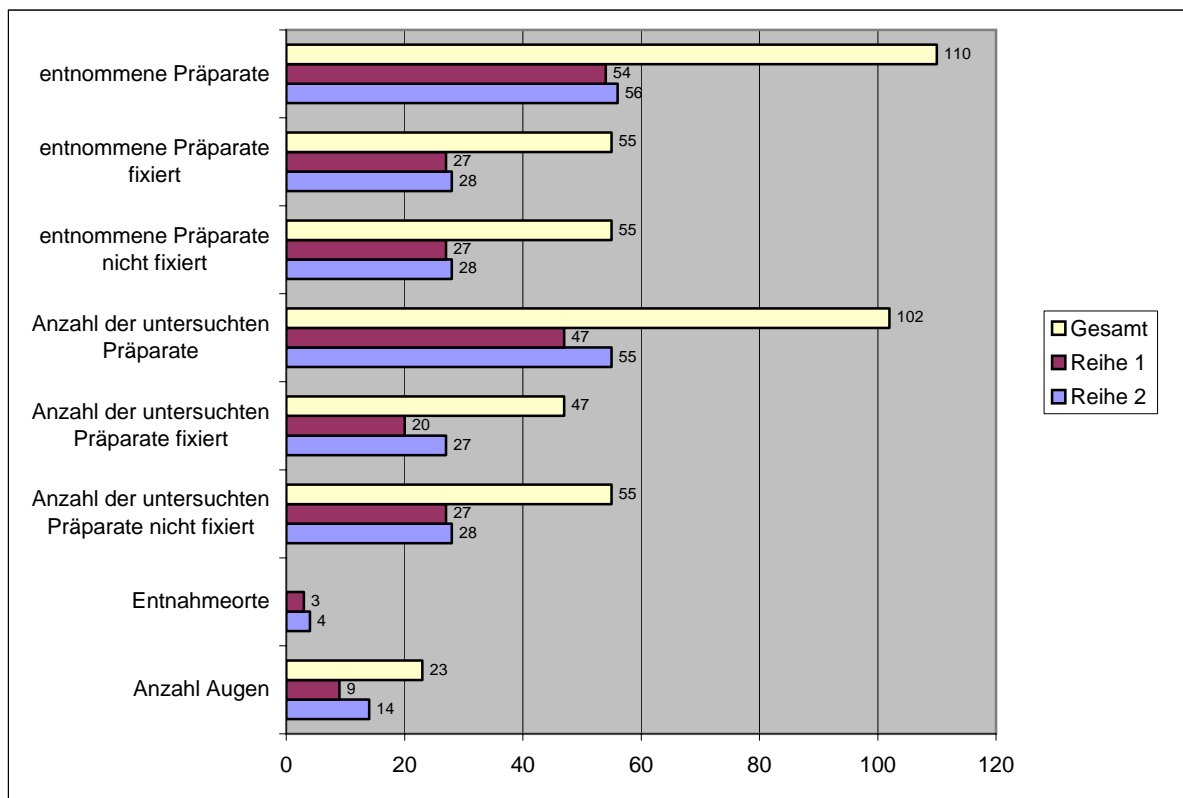
- A= oberer Fornixbereich ( 12 Uhr Position)
- B= limbusnaher Bereich der oberen Bindehaut
- C= unterer Fornixbereich der Bindehaut (6 Uhr Position)
- D= temporaler Teil der Bindehaut (10 Uhr Position)

Die Entnahmeorte A, B und C wurden für alle Probanden definiert. Für die Betrachtung der temporalen Konjunktiva wurde eine weitere Entnahmestelle D hinzugefügt.



**Abb. 4:** Darstellung der Entnahmestellen an den jeweiligen Bindehautregionen eines rechten Auges. (Locus A: oberer Fornixbereich, limbusfern, 12 Uhr Position; Locus B: limbusnaher Bereich der oberen Bindehaut; Locus C: unterer Fornixbereich, 6 Uhr Position; Locus D: temporaler Teil der Bindehaut, 10 Uhr Position)

Um eventuell auftretende Unterschiede in der morphologischen Darstellung von in vivo Bild der Entnahmestelle und in vitro Bild des zugehörigen impressionszytologischen Präparates besser erklären und systemische Fehler der Methode ausschließen zu können, wurden aus jeder Entnahmeregion (A, B, C) der ersten 9 Augen je 2 Proben entnommen (Reihe 1). Im Anschluß fixierten wir diese doppelt vorhandenen Proben je einmal mit Alkoholspray , während die zweite Probe getrocknet wurde. Für die 14 Augen mit den Entnahmestellen A, B, C, D (Reihe 2) erfolgte die Fixierung jeweils für sieben Augen mit Alkoholspray und für weitere sieben durch Lufttrocknung. Damit gingen insgesamt 110 zytologische Proben nach der Entnahme in die Präparataufbereitung ein. Eine Übersicht über die Anzahl und Aufteilung der Proben gibt das Diagramm 1.



**Diagramm 1:** Übersicht über die Anzahl der entnommenen und ausgewerteten, impressionszytologischen Proben, bezogen auf die unterschiedlichen Fixierungstechniken, Untersuchungsreihen und Entnahmeorte.

Die Reihe 1 bilden neun Augen von neun unterschiedlichen Probanden mit den Entnahmeorten A, B und C und je einer fixierten und einer nicht fixierten Probe pro Entnahmeort (54 Präparate).

Reihe 2 setzt sich aus 14 Augen von 14 unterschiedlichen Probanden mit den Entnahmeorten A, B, C und D zusammen, von denen sieben Augen mit jeweils vier fixierten und sieben Augen mit jeweils vier nicht fixierten Proben (insgesamt 56 Präparate) in die Aufbereitung eingingen.

### 3.2. Konfokale in vivo Zytodiagnostik mit dem RLSM

Nach der Entnahme der impressionszytologischen Präparate, fand die Untersuchung der Probanden am RLSM statt. Analog zur IPZ fertigten wir konfokale Bilder der Entnahmeregionen A, B, C und D an. Der untere Fornixbereich (C) konnte mit dem RLSM nicht dargestellt werden (siehe 4.2.3.).

Zur Minimierung der Augenbewegung und Verringerung der Patientenbelastung, wurde auch bei der konfokalen Untersuchung eine Tropfanästhesie durchgeführt. Nach Instruktion der Patienten über

das Verhalten während der Untersuchung und Übung der erforderlichen Augenbewegungen, wurden diese sitzend in eine Stirn- und Kinnstütze positioniert.

Die Kontaktfläche (vorderer, gelbeschichteter Rand der Plexiglasscheibe) des RLSM stellte einen flächenhaften Kontakt zur Augenoberfläche her und koppelte diese optisch an das RLSM. Die Überwachung der groben Annäherung des Auges an die Nullebene des RLSM, durch eine schwenkbare Kamera und die Abbildung auf einem externen, dem Untersucher zugewandten Monitor, erleichterte diesen Vorgang und trug zur zeitlichen Beschleunigung der Untersuchung bei.

Mittels des externen z Scan Adapters, der hydraulisch kontrolliert vorgeschoben wurde, fand die präzise Positionierung der Vorderfläche der Plexiglasscheibe am Auge statt. Nach erfolgreicher, optischer Ankopplung der Augenoberfläche, war nun die Verlagerung der Bildebene in das untersuchte Auge mittels des konfokalen Prinzips möglich. Die hydraulische Steuerung ermöglichte hierbei eine präzise Zuordnung der Ebene im Mikrometerbereich.

Um vergleichbare Ergebnisse von den verschiedenen Probanden zu erhalten, wurden ähnliche Untersuchungstiefen angestrebt. Von unmittelbarem Interesse war die Augenoberfläche, um eventuell vorhandene Veränderungen zu erfassen, welche für den angestrebten Vergleich mit der Lichtmikroskopie von Interesse sein konnten. Außerdem wurden Aufnahmen in einer Tiefe von ca. 15µm angefertigt, in der sich die Basalschicht des Bindehautepithels befindet, um verschiedene Bindehautschichten im konfokalen Bild vergleichen zu können.

Unmittelbar nach Herstellung der Bildserien (automatisch 3x64 Bilder derselben Ebene), wurde das gewonnene Bildmaterial evaluiert und repräsentative Einzelaufnahmen gespeichert. Die Bewertung der Aussagekraft fand primär anhand der Dichte des dargestellten Epithelzellverbandes statt. Abweichungen von den regulären Mustern wurden ebenfalls archiviert, wenn zelluläre Strukturen erkennbar waren. Patientennamen, Serien- und Bildnummer wurden im Computer gespeichert und Untersuchungsdatum, Tiefe der jeweiligen Serie und der untersuchte Augenabschnitt schriftlich fixiert, um eine eindeutige Zuordnung des gewonnenen Materials sicherzustellen.

### **3.3. Bewertung der Abbildungen und Präparate**

Für die Beurteilung des konfokalen Bildmaterials, ist ein Vergleich mit den Ergebnissen der Lichtmikroskopie Voraussetzung. Dies wird in dieser Studie anhand von Parametern sichergestellt, die optische Mindestanforderungen an das bildgebende Verfahren definieren und charakteristische Merkmale des konjunktivalen Epithels im mikroskopischen Bild beschreiben. Bei den erhobenen Werten handelt es sich um Schätzungen durch den Untersucher.

Die gewählten Kriterien waren:

1. Qualität des Epithelverbandes (0 = kein Verband, 1 = einzelne Zellflächen, 2 = lockerer Verband, 3 = zusammenhängender Epithelzellverband)
2. KPR der sichtbaren Epithelzellen (angegeben als Größenverhältnis des Zellkerns zur Epithelzelle)
3. freies Muzin (0 = kein Muzin sichtbar, 1 = geringe Menge/ einzelne Granula, 2 = deutlich sichtbare Muzinmenge, 3 = viel Muzin)
4. Becherzellanzahl (0 = keine Becherzellen, 1 = vereinzelte Becherzellen, 2 = regelmäßig im Epithelzellverband integrierte Becherzellen, 3 = gehäuftes Vorkommen)
5. Kerngröße der Epithelzellen (0 = keine Kerne erkennbar, 1 = kleine Kerne, 2 = normale Größe, 3 = überdurchschnittlich große Kerne)

#### **3.3.1. Lichtmikroskopische Untersuchung der impressionszytologischen Präparate**

Die lichtmikroskopische Untersuchung wurde an den impressionszytologisch gewonnenen Präparaten durchgeführt. Die Beurteilung erfolgte an einem Lichtmikroskop (Olympus BX 50) mit digitalem Bilddokumentationssystem (Olympus SC 35). Die Aussagekraft des erhaltenen Bildmaterials wurde anhand der bereits erwähnten Parameter (siehe 3.3.) definiert. Das Ergebnis der Evaluation wurde parallel zur Untersuchung handschriftlich in Tabellenform festgehalten und durch Auffälligkeiten im lichtmikroskopischen Bild (Artefakte) im Punkt „Sonstiges“ ergänzt. Zusätzlich zu der Betrachtung unter dem Mikroskop fertigten wir digitale Bilder repräsentativer Präparate, für die Veranschaulichung der Vorgehensweise bei der Bewertung, an.

### **3.3.2. Auswertung der konfokalen in vivo Aufnahmen**

In die Auswertung der Befunde der konfokalen LSM gingen diejenigen Bilder ein, welche nach der Betrachtung der automatisch erstellten Bildserien von 3x64 Bildern pro Aufnahme und Untersuchungsort als aussagekräftig archiviert worden waren (siehe 3.2.). Die Bewertung der von uns zur Bildbeschreibung definierten Parameter erfolgte zeitlich getrennt von der in vivo Diagnostik mit dem RLSM, da zum Zeitpunkt der Versuche die Vorgehensweise für die Beschreibung der konfokalen Darstellungen noch nicht festgelegt war. Letzteres erfolgte erst nach der Übersichtsbetrachtung des gesamten Bildmaterials.

Bei der Betrachtung der Aufnahmen stellten sich regelmäßige Muster dar, deren Anordnung der Morphologie des konjunktivalen Epithels stark ähnelte. Das Vorkommen anderer Bildinformationen, die nicht oder nur teilweise an den typischen Epithelzellverband der Bindehaut erinnerten, erschwerte das Verständnis der konfokalen Abbildungen und die Zuordnung zu den aus der Lichtmikroskopie bekannten Zellformen und –bestandteilen.

Die Entscheidung über den Informationsgehalt der Epithelabschnitte und auch die Bewertung der fünf Parameter für den Vergleich mit der Lichtmikroskopie erforderten einige Erfahrung. Außerdem war es unverzichtbar bei der Interpretation abweichender Befunde Gründe für störende Artefakte und Unregelmäßigkeiten des Epithels zu finden und so eine Ordnung der Vielfalt der konfokalen Darstellungen einzuleiten.

Hierzu wurden die Bilder unabhängig von Untersuchungsorten und Probanden vor der Erhebung der vergleichenden Parameter mit auffallenden Einzelheiten im Punkt „Sonstiges“ der Bewertungstabelle bezeichnet, so dass zusätzlich zu anatomisch, morphologischen Besonderheiten auch Parallelen erfasst werden konnten, die im Nachhinein anderen Ursachen, z.B. Veränderungen der als identisch angenommenen Aufnahmebedingungen, zuzuordnen wären. Diese Vorgehensweise trug zur beschleunigten Auswahl aussagekräftiger Bilder bei und erleichterte die Definition eines Normalbefundes für die konfokale in vivo Darstellungen des konjunktivalen Epithels.

Aufgrund fehlender Erkenntnisse über das Erscheinungsbild der zu beurteilenden Strukturen (Epithelzellkerne, Muzin, Becher- und Epithelzellen) im konfokalen Bild, war die Definition der

Bildinformationen nötig, die diesen Epithel- und Zellbestandteilen entsprechen. Dies geschah anhand der morphologischen Gesichtspunkte, welche aus etablierten Verfahren, wie der Lichtmikroskopie bekannt waren (siehe 4.2.2.) und die eine zuverlässige Mustererkennung gestatteten.

Im Anschluss an die beschriebene Strukturierung der Befunde beurteilten wir die Parameter und hielten diese in Verbindung mit den Angaben zu Untersuchungsort, Proband und Tiefe der Fokusebene in tabellarischer Form fest (siehe Anhang).

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. IPZ**

#### **4.1.1. Allgemeine Aussagen der IPZ**

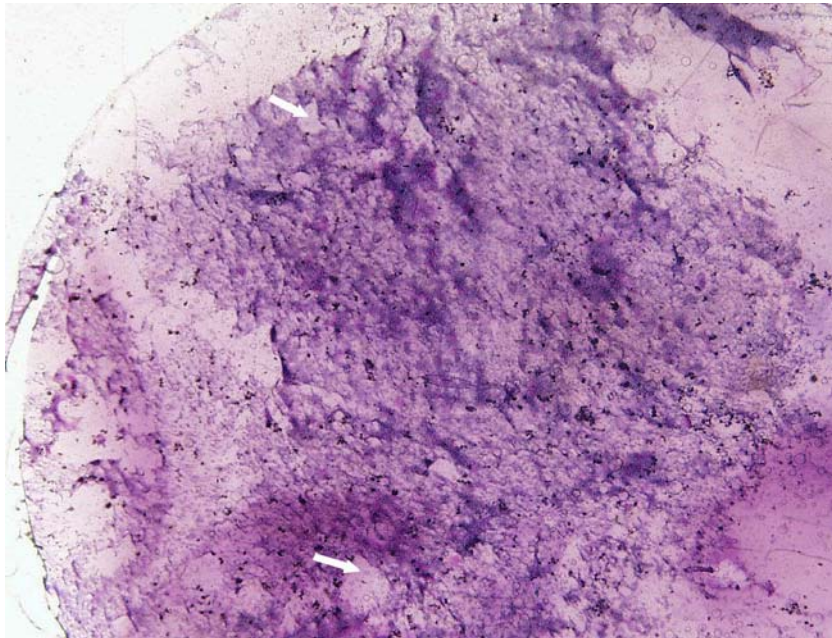
Nach den durchgeführten Untersuchungen lässt sich feststellen, dass die IPZ eine sicher durchzuführende Methode zur Entnahme zytologischen Materials ist. Von insgesamt 110 vorhandenen Proben, kamen nach der Verarbeitung im Rahmen der IPZ 102 zur Auswertung. Acht zytologische Proben konnten, aufgrund unzureichender Materialentnahme (zu wenig, oder keine Zellen) nicht in die vergleichende Auswertung einbezogen werden. Die Trocknung der Augenoberfläche war für die sichere Entnahme von auswertbarem Zellmaterial der wichtigste Faktor, während die anatomische Region des Entnahmeortes für die spätere Auswertbarkeit keine Rolle spielte, da die Positionierung des Celluloseacetatfilters in jedem Fall möglich war. Die Durchführung der Untersuchung konnte durch vorherige Übungen der erforderlichen Augenbewegungen mit den Probanden wesentlich beschleunigt werden. Mehrmalige Entnahmeversuche waren dadurch vermeidbar.

Die Färbung und Aufbereitung des Zellmaterials für die spätere Auswertung mit einem Lichtmikroskop war bei allen Präparaten erfolgreich und es konnten alle zelltragenden Celluloseacetatfilter der Diagnostik zugeführt werden. Bei der Färbungsintensität waren Unterschiede zu beobachten, die jedoch nicht zum Verlust von zytologischen Proben für die vergleichende Auswertung führten.

Unterschiede der Auswertungsergebnisse nach Art der Fixierung des Zellmaterials waren nicht ersichtlich. Bei beiden Verfahren variierte die Qualität und Quantität des dargestellten Zellverbandes. Dies lässt darauf schließen, daß die Fixierung der Proben durch Lufttrocknung ausreichend ist. Die Anwendung eines Alkoholsprays zur sofortigen Fixation ließ keine wesentlichen Vorteile erkennen. Beide Varianten sind also für die Aufbereitung zytologischer Präparate einsetzbar.

Wie in Abb. 7 dargestellt, beurteilten wir die Dichte des Zellverbandes für die Mehrzahl der Präparate mit dem Wert zwei. Charakteristisch für diese Dichte ist das inselartige Auftreten zellfreier

Bereiche zwischen regelmäßigen Epithelzellverbänden. Präparatabschnitte mit übermäßig intensiver Färbung oder dick gepackten Zelllagen, fielen störend bei der Beurteilung auf und gingen mit unscharfer Darstellung in diesen Bereichen einher.

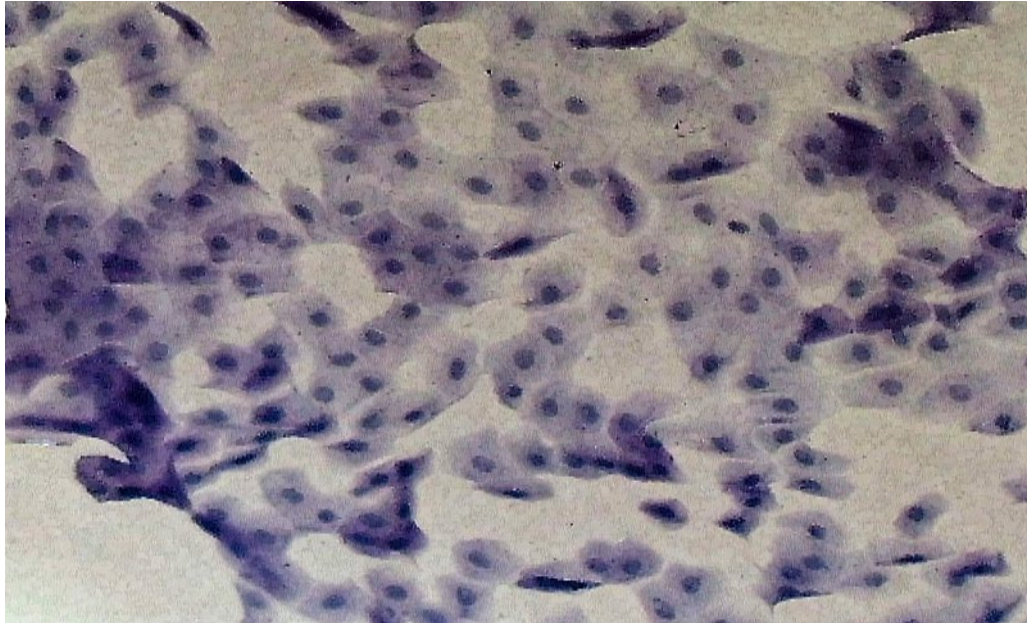


**Abb. 5:** Epithelzellverband durchschnittlicher Dichte, 1-3 Zelllagen auf der semitransparenten Celluloseacetatfiltermembran. Kennzeichnung zellfreier Areale durch Pfeile.  
(Rechtes Auge, 12 Uhr Position, 10 fache Vergrößerung, Lichtmikroskopie, IPZ, PAS-Hämatoxilin)

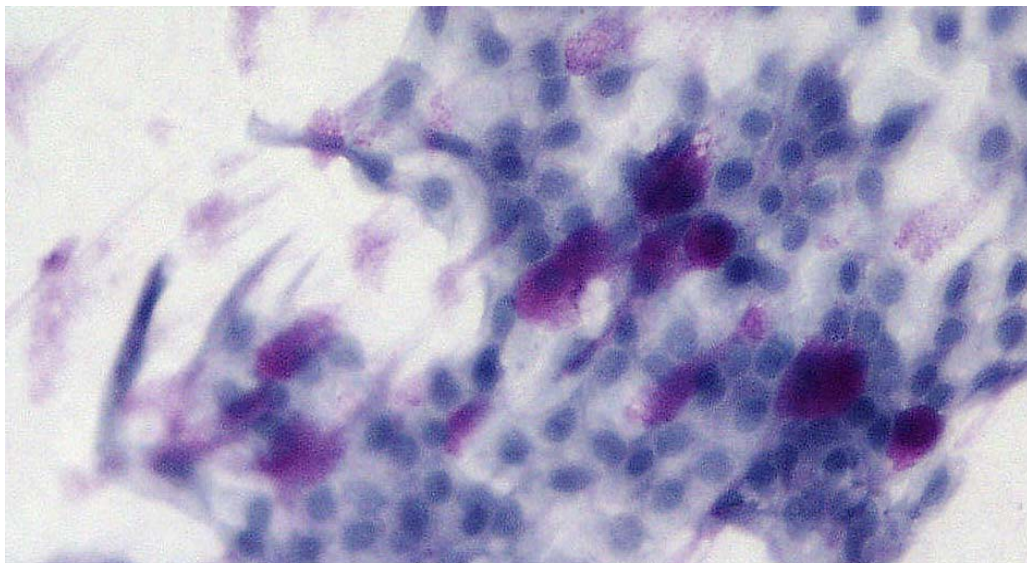
#### **4.1.2. Aussagen zur Morphologie**

In Abhängigkeit vom Entnahmeort betrug die KPR 1:1 bis 1:2 im limbusnahen Bereich der Konjunktiva und 1:4 bis teilweise 1:6 nach temporal. Es fanden sich runde bis ovale Epithelzellkerne, deren Chromatin regelmäßig verteilt war.

Das lichtmikroskopische Bild war von den unterschiedlichen Farbintensitäten der Kompartimente und Epithelbestandteile geprägt, da diese aufgrund ihrer biochemischen Zusammensetzung unterschiedlich starke, basophile Reaktionen aufweisen und sich so gut voneinander unterscheiden lassen. Das Zellplasma imponiert schwach basophil, während die Kerne sich deutlich dunkler hervorheben (PAS positive Glykosaminoglykane).



**Abb. 6:** Temporal entnommene Zellen mit einer KPR von 1:4 bis 1:6 und ovalen Zellkernen, regelmäßige Chromatinverteilung  
(Rechtes Auge, 10 Uhr Position, 600 fache Vergrößerung, Lichtmikroskopie, IPZ, PAS-Hämatoxylin)



**Abb. 7:** Impressionszytologischer Normalbefund des Bindehautepithels (KPR 1:1 bis 1:2, rundlich, ovale Zellkerne und runde bis polygonale Epithelzellen). Freies Muzin (violette Streifung) und Becherzellen.  
(Rechtes Auge, 12 Uhr Position, limbusfern, 600 fache Vergrößerung, Lichtmikroskopie, IPZ, PAS-Hämatoxylin)

Die sekretorischen Becherzellen waren anhand der kräftigen Rotfärbung und des größeren Zelldurchmessers erkennbar und kamen in allen Untersuchungsregionen vor. Es fanden sich einzelne bis gruppenförmige Anordnung von Becherzellen, die sich in den Epithelzellverband einordneten. Die Anzahl der Becherzellen variierte bezogen auf die verschiedenen Untersuchungsorte eines Probanden unwesentlich, im Vergleich identischer Untersuchungsorte unterschiedlicher Probanden ergaben sich teilweise gegensätzliche Befunde. Die Abwesenheit von Becherzellen oder eine geringe Anzahl (Beurteilung 0-1 bei der Auswertung der Präparate), ging immer mit einer geringen Menge freien Muzins im jeweils untersuchten impressionszytologischen Präparat einher.

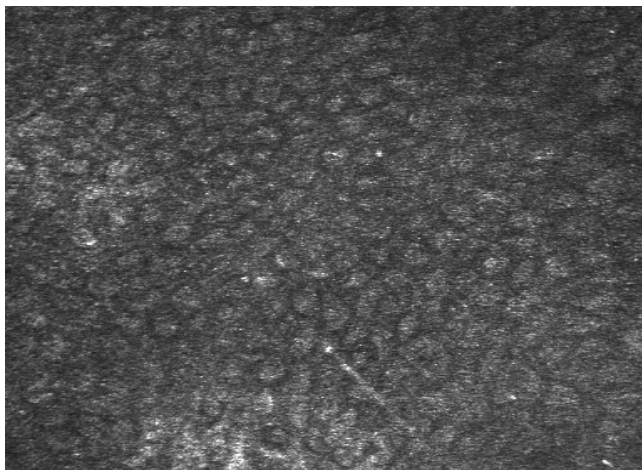
Die Muzinschicht imponierte meist als streifen- oder fleckförmige, rote bis violette Struktur und überlagerte den konjunktivalen Epithelzellverband.

## 4.2. Konfokale LSM

### 4.2.1. Aussagen zum Zellverband

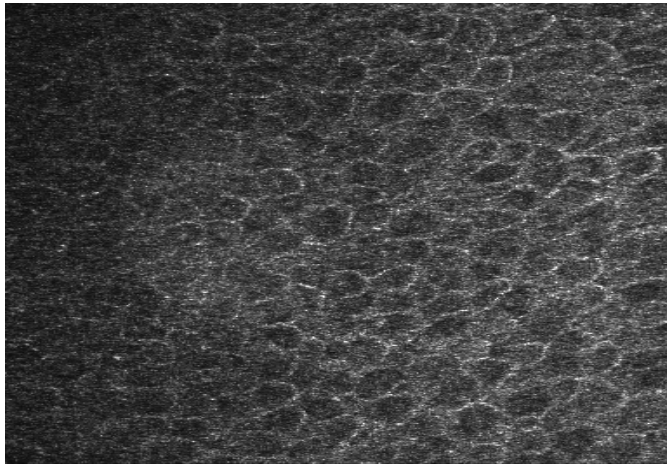
Die Darstellung des konjunktivalen Epithelzellverbandes ist mit dem RLSM möglich und es ist ersichtlich, daß die konfokalen Abbildungen, mit dem impressionszytologischen Erkennungsmuster in der Lichtmikroskopie in der morphologischen Darstellung übereinstimmen. Der Normalbefund des Zellverbandes ist durch hell imponierende Epithelzellen mit dunkleren Zellgrenzen geprägt. Es ergibt sich ein Muster, das für den geschlossenen Zellverband auf der regelmäßigen Verteilung heller Strukturen im Zentrum und dunkler Anteile in der Peripherie beruht.

Bei den durchgeführten Untersuchungen stellten sich die Mehrzahl der Präparate in der genannten Weise im konfokalen Bild dar, es handelt sich bei dieser Visualisierung um den konfokalen Normalbefund des Zellverbandes.



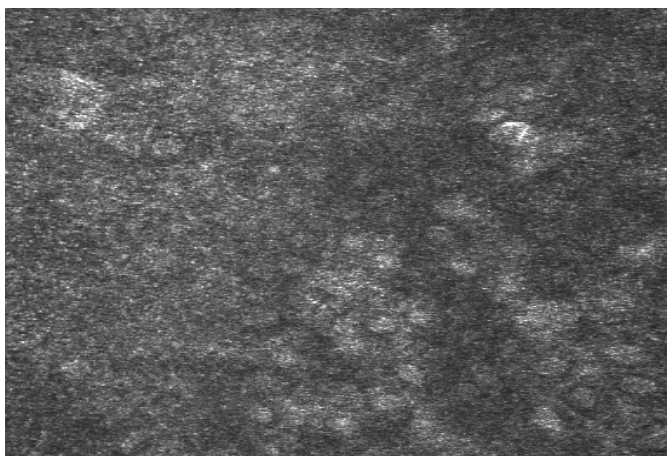
**Abb. 8:** Typisches Muster eines Epithelzellverbandes mit regelmäßiger Helldunkelverteilung im konfokalen Bild (Einzelzellen hell mit dunkleren Zellgrenzen).  
(Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, limbusnah 12 Uhr Position, Epitheloberfläche)

Bei einigen wenigen Probanden erscheint die Helldunkelverteilung des geschlossenen Zellverbandes umgekehrt. Durch diese entgegengesetzte Verteilung heller und dunkler Bildanteile imponiert ein inverses Muster (dunkle Epithelzellen, helle Zellgrenzen) und es entsteht ein anderer Bildeindruck. Bei genauer Betrachtung lassen sich aber auch in solchen konfokalen Aufnahmen die Bestandteile des Zellverbandes nachvollziehen.



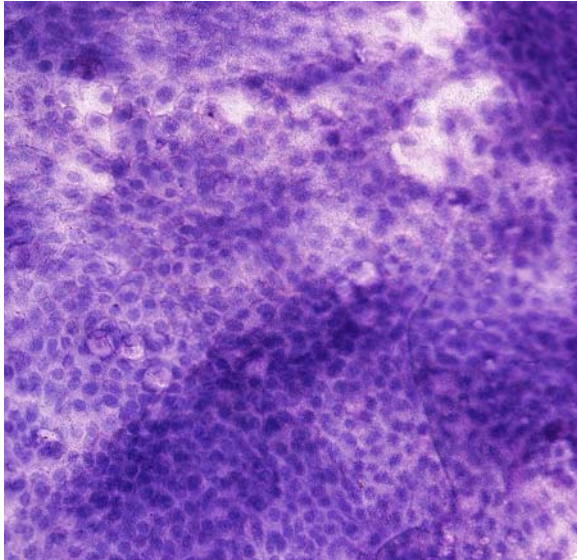
**Abb. 9:** Geschlossener Epithelzellverband, entgegengesetzte Helldunkelverteilung und dadurch entstehendes inverses Muster im konfokalen Bild eines anderen Probanden. Zellgrenzen bzw. Interzellularräume hell dargestellt, Zytoplasma dunkel, kontrastreich.  
(Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, temporal 10 Uhr Position, Epitheloberfläche)

Im konfokalen Bild imponierten nicht oder schwach strukturierte Bereiche des Epithelzellverbandes, bei denen es sich um Lücken im Zellbesatz oder auch kompartmentfreie Areale von Einzelzellen handeln könnte, als unscharf (Bildrauschen). Bei der Auswertung des Bildmaterials konnte keine Häufung dieses Effektes an bestimmten Untersuchungsorten oder -tiefen festgestellt werden. Auffällig ist, dass trotz minderer Qualität oft noch die typischen Grundmuster und Zellformen in den unscharfen Bereichen erkennbar bleiben.



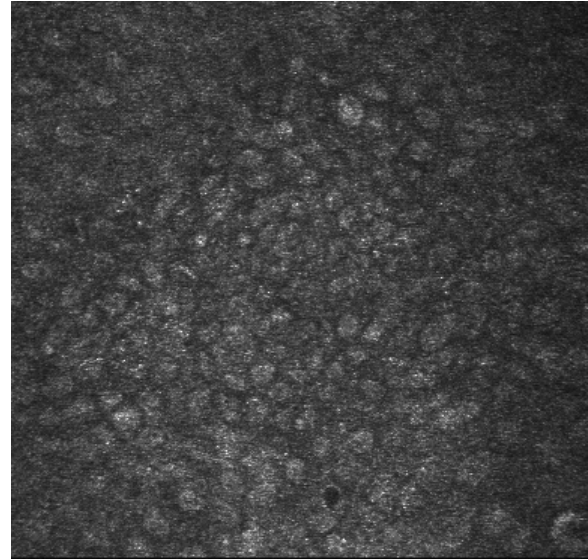
**Abb. 10:** Generalisiertes Bildrauschen im konfokalen Bild eines oberflächlichen Bindehautepithels mit schemenhaft erkennbarem, typischem Epithelzellmuster.  
(Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, limbusnah 12 Uhr Position, Epitheloberfläche)

Die Dichte des Zellverbandes unterscheidet sich ähnlich wie in der IPZ. Die Mehrzahl der konfokalen Abbildungen zeigte einen lockeren bis zusammenhängenden Zellverband (Bewertung mit 2-3) in der visuellen Auswertung.



**Abb. 11a:**

Lichtmikroskopisches in vitro Bild eines impressionszytologischen Präparates, als Beispiel für einen mit 3 bewerteten, dichten Epithelzellverband (Lichtmikroskopie, Konjunktiva, limbusnah 12 Uhr Position, 100 fache Vergrößerung, PAS-Hämatoxin)



**Abb. 11b:**

Konfokales in vivo Bild desselben Patienten (wie in Abb. 11a), als Beispiel für einen dichten Zellverband, der bei der Auswertung der konfokalen Bilder mit 3 bewertet wurde. (Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, limbusnah 12 Uhr Position, Epitheloberfläche)

#### **4.2.2. Aussagen zur Einzelzelle**

Auch bei der Betrachtung einzelner Epithelzellen, traten regelmäßig wiederkehrende Befunde und Einzelphänomene auf. Diese werden in den nachfolgenden, repräsentativen Einzelabbildungen vorgestellt und in ihrer Darstellung beschrieben.

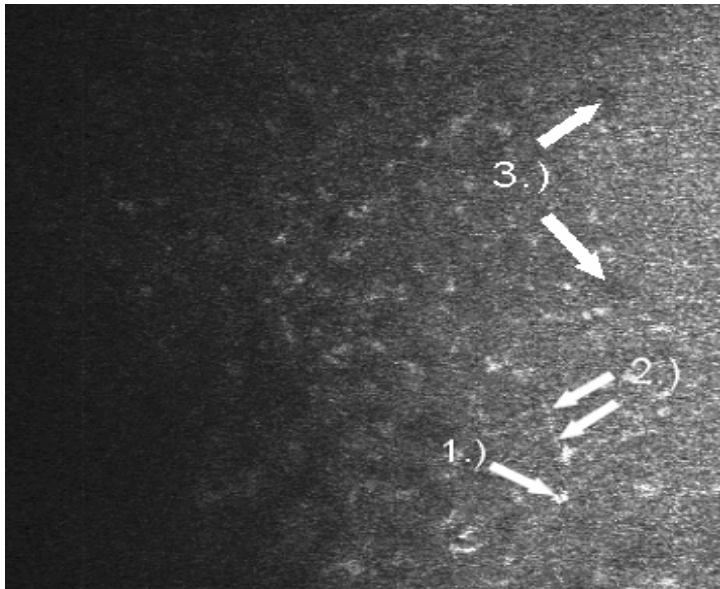
Aufgrund vergleichbarer Erkennungsmuster von konfokaler in vivo Mikroskopie und IPZ, konnten die folgenden Zuordnungen für eine Auswertung der konfokalen Aufnahmen vorgeschlagen werden:

| <b>Morphologische Struktur der Konjunktiva</b> |                                   | <b>Lichtmikroskopisches Bild</b>  | <b>in vivo Bild des RLSM</b>   |
|--|-----------------------------------|---|--|
| a.) freies Muzin                               |                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- streifen-, punkt- oder fleckförmig, PAS positive Granula, Clusterbildung</li> <li>- diffus ausgebreitete, rötlich gefärbte Strukturen</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- helle, diffuse Reflektoren</li> <li>- durch unregelmäßige Begrenzung von ebenfalls hellen Kerngrenzen abgrenzbar</li> </ul>   |
| b.) Becherzellen                               |                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- runde bis ovale Form</li> <li>- PAS positive Glycosaminoglykane im Zytoplasma</li> <li>- PAS- Hämatoxylin Färbung kräftige Rotfärbung</li> <li>- größer als nicht sekretorische Epithelzellen</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- dunkel, scharf begrenzt, rund bis oval, variable Größe</li> <li>- deutlich größer als nicht sekretorische Epithelzellen</li> <li>- Zellbegrenzungen unterschiedlich mächtig</li> <li>- unterschiedlich dargestellte Binnenstrukturen</li> </ul> |
| c.) Epithelzelle                               | Kern                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>- unterschiedlich kontrastreiches, bläuliches Kolorit</li> <li>- runde bis ovale Form, KPR 1:1 - 1:2</li> <li>- körnige Binnenstruktur durch Chromatingranula</li> </ul>                                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- helle, runde bis leicht ovale Strukturen</li> <li>- KPR 1:1 - 1:2</li> <li>- Teilweise schwer von Interzellularräumen abgrenzbar</li> </ul>   |
|  | Zytoplasma                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>- schwach blau bis rötlich</li> <li>- feine, PAS positive Muzingranula</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- kontrastarme Struktur</li> <li>- meist von (variierenden) Helldunkelverteilungen der Zellkerne abgrenzbar</li> </ul>  |
|  | Zellmembran/<br>Interzellularräum | <ul style="list-style-type: none"> <li>- zarte, linienförmige Struktur</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- markante Linien aus hellen oder dunklen Bildpunkten</li> <li>- teilweise von Zytoplasma abgrenzbar</li> </ul>   |

**Tab. 1.:** Vergleich der zellulären Strukturen des Bindehautepithels und deren Erkennungsmuster in Lichtmikroskopie und konfokaler LSM.

#### a.) Freies Muzin

Die Darstellung freien Muzins im konfokalen Bild reicht von diffus ausgebreiteten, hellen Pixeln bis zu unregelmäßigen Linien. Die Morphologie der als freies Muzin identifizierten, hellen Bildpunkte kann mit der Streifenbildung im lichtmikroskopischen Bild assoziiert werden, welche PAS positive Substanzen beinhaltet. Muzingranula waren in den konfokalen in vivo Aufnahmen gut identifizierbar, während die Diagnose freien Muzins in Streifen- oder Fleckform nicht eindeutig möglich war. Die Ähnlichkeit einiger heller Bildbestandteile mit der Muzinstreifung impressionszytologischer Präparate, legt die Interpretation als freies Muzin in Form von Streifen oder Flecken nahe (siehe Abb. 12). Im rechten Bildanteil erinnern die zunehmenden Helligkeitswerte an das unter 4.2.1. beschriebene Rauschen.



**Abb. 12:** Unvollständiger Epithelzellverband im konfokalen Bild. Deutlich helligkeitsintensive Überlagerung der rechten Bildhälfte in Form von punktuellen Anhäufungen (1.) und Streifen (2.), welche freiem Muzin entsprechen könnten. Vergleichsweise große, kontrastreiche Areale stellen Becherzellen dar (3.).

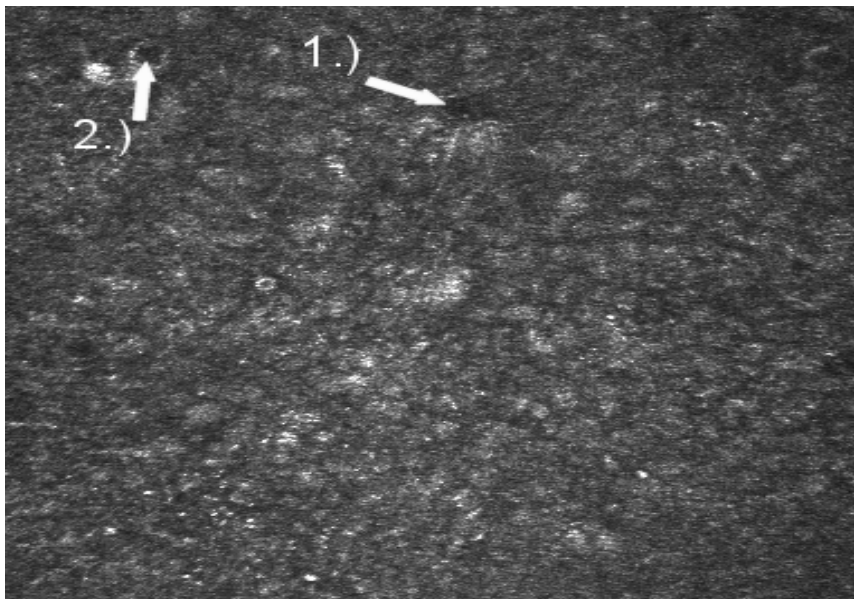
(Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva limbusfern, 12 Uhr Position, Tiefe: 4µm)

#### b.) Becherzellen

Bei unseren Untersuchungen fanden sich unterschiedliche Darstellungen, die mit den Vorkenntnissen über Größe, Form und spezifische Inhaltsstoffe von Becherzellen aus der Lichtmikroskopie, als konfokales Bild dieser sekretorischen Epithelzellen interpretiert wurden.

In der Mehrzahl kamen morphologische Muster, die dem Normalbefund entsprachen zur Darstellung. Das häufigste und immer wiederkehrende Merkmal war der Größenunterschied zwischen sekretorischen Becherzellen und den im geschlossenen Verband dargestellten nicht sekretorischen Epithelzellen.

Es traten Unterschiede bei der Helligkeit und Mächtigkeit der Zellbegrenzungen sowie der Binnenstrukturen auf. Wie in anderen Abbildungen und für z.B. Epithelzellen beschrieben, kommen sowohl helle als auch dunkle Bildpunkte für die Grenzen und den sekretorischen Inhalt der Becherzellen zur Darstellung.



**Abb. 13:** Unterschiedliche Darstellung zweier Becherzellen innerhalb eines geschlossenen Verbands nicht sekretorischer Epithelzellen.

Dunkles, kontrastarmes Erkennungsmuster (1.), helle Zellgrenze mit kontrastarmer Binnenstruktur (2.).

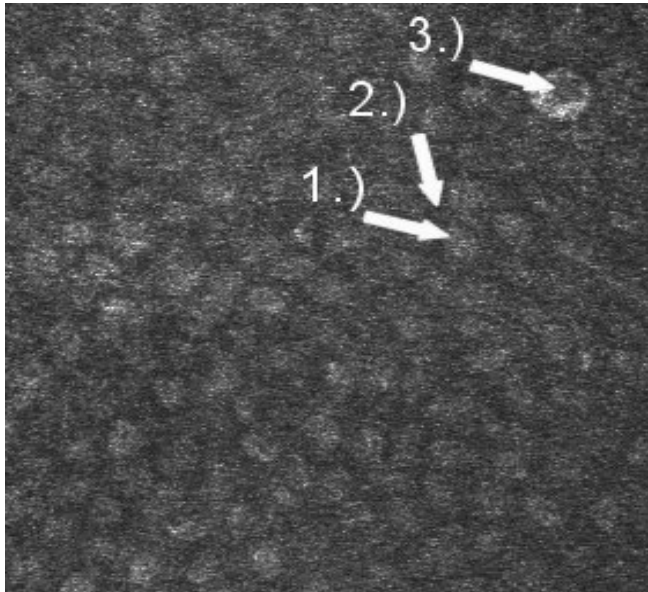
(Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, limbusnah 12 Uhr Position, Epitheloberfläche)

#### c.) Epithelzellen und Zellkerne

Die Epithelzellen sind im konfokalen Bild eindeutig erkennbar. Die Größe der Epithelzellen bildet die Grundlage für das jeweils sichtbare Muster. Innerhalb des Zellkörpers imponieren die Epithelzellkerne als helle, runde bis ovale Struktur. Die Unterscheidung des Zellkerns ist aufgrund der unterschiedlichen Helligkeitswerte weitgehend möglich. Das Zellplasma ist dunkel dargestellt. Eine Abgrenzung der Zellgrenzen (Zellmembran) vom Plasma war nicht immer eindeutig möglich.

Die KPR wurde überwiegend mit 1:1 bis 1:2 beurteilt, wobei teilweise Variationen auftraten (siehe 4.2.3.). Diese Merkmale des konfokalen Bildes der Epithelzellen und ihrer Bestandteile stellen den konfokalen Normalbefund dar.

Abweichend von diesen Abbildungsmustern der genannten Strukturen kamen in einzelnen Fällen auch bei den Epithelzellen und ihren Bestandteilen inverse Muster zur Darstellung, bei denen sich die Helligkeitswerte des beschriebenen konfokalen Normalbefundes umkehrten.

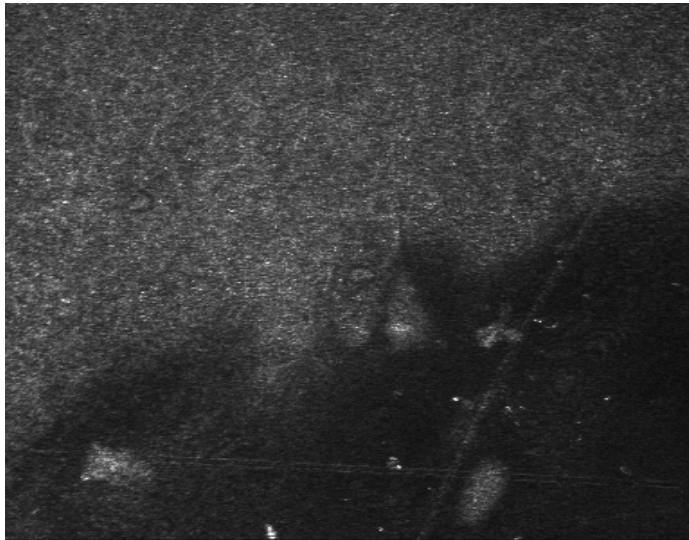


**Abb. 14:** Typisches Epithelzellmuster des Bindegewebsepithels im konfokalen Bild. Der Zellkern als hell dargestellte, ovale Struktur (1.) ist umgeben vom kontrastreich, dunkel imponierenden Zytoplasma der Epithelzelle (2.), von dem die Zellgrenzen nicht eindeutig zu unterscheiden sind. Im Zellverband zeigt sich eine deutlich größere sekretorische Becherzelle (3.). (Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, temporal 10 Uhr Position, Tiefe 13  $\mu\text{m}$ )

#### **4.2.3. Topographische Ergebnisse**

Für den Vergleich der konfokalen LSM mit der Referenzmethode, versuchten wir entsprechend der vorhandenen lichtmikroskopischen Präparate, konfokale Bilder aller Untersuchungsorte anzufertigen. Der Ansatz Darstellungen der beiden visualisierenden Methoden von allen Probanden und den entsprechenden Entnahmeorten anzufertigen, konnte nicht einheitlich verwirklicht werden, da sich bei einigen Probanden die in vivo Untersuchung mit dem RLSM nicht durchführen ließ. Die

Untersuchung des Entnahmeortes „C“ (Konjunktiva des Unterlides = 6 Uhr Position), war mit dem externen z Scan Adapter nicht durchführbar, da dieser aufgrund seiner Größe dort nicht plan aufliegend positioniert werden konnte und die Bildinformationen auch bei eingehender Betrachtung nicht auswertbar waren (siehe Abb. 16).



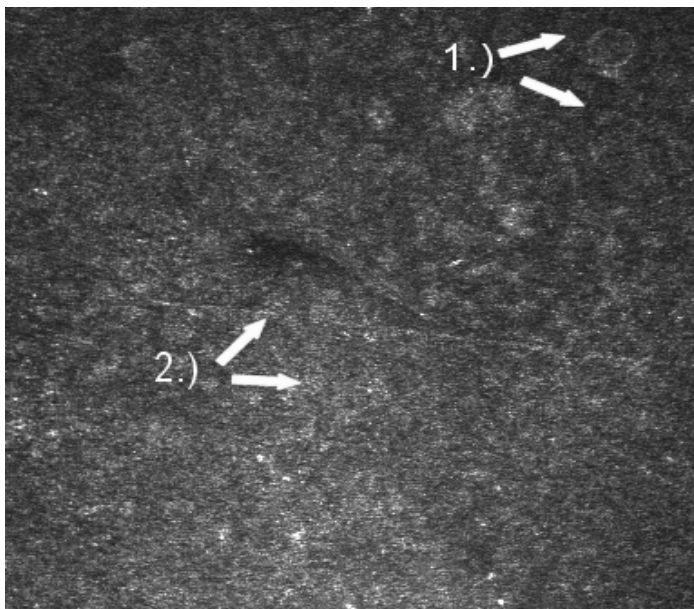
**Abb. 15:** Nicht auswertbarer, konfokaler Befund des Untersuchungsortes „C“.  
(Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, 6 Uhr Position, Epitheloberfläche)

Aufgrund der deutlich variierenden Abbildungsqualität der konfokalen in vivo Untersuchung war eine Vorauswahl der zu archivierenden Abbildungen notwendig. Diese Schwankungen betrafen alle Untersuchungsregionen.

Die Betrachtung des konfokal gewonnenen Bildmaterials verschiedener Untersuchungsorte erbrachte topographisch, spezifische Ergebnisse. So konnten Unterschiede der KPR der dargestellten, nicht sekretorischen Epithelzellen im Vergleich der Abbildungen aus verschiedenen untersuchten Bindehautregionen erkannt werden. Dies gilt insbesondere für den Vergleich der KPR von Zellen der Untersuchungsorte A (limbusfern, 12 Uhr Position) und D (temporal, 10 Uhr Position). Hier ließ sich analog zum lichtmikroskopischen Normalbefund eine Verschiebung der KPR von durchschnittlich 1:2 an Position A auf 1:4 bis teilweise 1:6 am Untersuchungsort D feststellen. Bei der Auswertung beobachteten wir jedoch auch identische Werte für beide Untersuchungsorte, so dass die genannten Differenzen der KPR nicht bei allen Proben auftraten.

Der Vergleich des Bildmaterials identischer Bindehautareale aus unterschiedlich tiefen Epithelschichten, erbrachte durchweg heterogene Ergebnisse der Abbildungsqualität. Die beschriebenen, qualitativen Unterschiede bei der Darstellung von Zellkernen, -grenzen und -plasmata traten so zahlreich auf, das die Zuordnung zu den jeweiligen konjunktivalen Arealen oder einzelnen Patienten ohne weitergehende Untersuchungen der Bindehautmorphologie im konfokalen Bild im Rahmen dieser Studie nicht erfolgen kann. Morphologisch konstante Zelltypen und -bestandteile unterschieden sich wesentlich in ihren Helligkeitswerten.

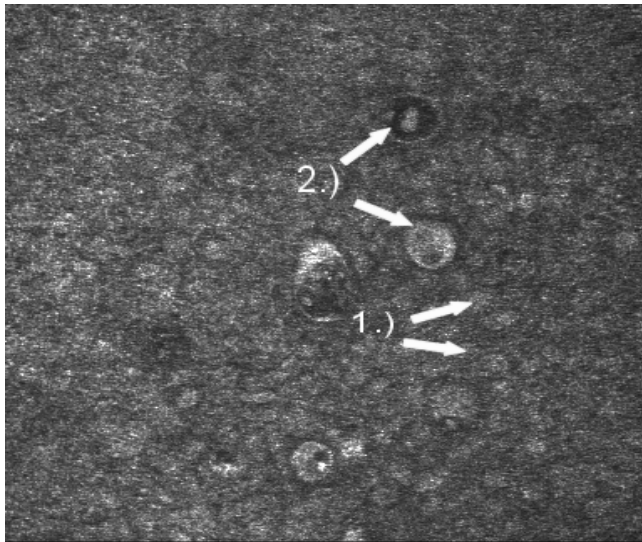
Zur Veranschaulichung dieses Phänomens dienen die Abb. 16 und 17, bei denen es sich um Darstellungen des Bindehautepithels handelt, die den Untersuchungsort A eines Probanden in verschiedenen Tiefenschichten zeigen. Die beschriebenen Differenzen der Bildhelligkeit sind gut sichtbar und beeinflussen den Ersteindruck der dargestellten Strukturen wesentlich. Bei näherer Betrachtung der Abb. 16 fällt auf, dass die helleren Bereiche morphologisch keine Gemeinsamkeiten mit Epithelbestandteilen der Konjunktiva aufweisen (1.). Im Gegensatz dazu imponieren am Rande der Abbildung Bereiche, die weniger lichtintensiv dargestellt sind (2.) und somit nicht oder nicht ausreichend an das optische System angekoppelt sind.



**Abb. 16:** Dunkle Bereiche (mangelhafte, optische Ankopplung) mit angedeuteter Darstellung einer Becherzelle (1.). Unstrukturierte helle Areale (2.), mit unzureichender Darstellung des Epithelzellverbandes.

(Konfokale LSM, in vivo Bild, limbusnah 12 Uhr Position, Epitheloberfläche)

Die Abb. 17 unterscheidet sich von den beschriebenen Inhalten der Oberflächendarstellung in den genannten Punkten wesentlich. So ist der Epithelverband anhand des Helligkeitsmusters typisch strukturiert dargestellt und es lassen sich anhand der KPR auch Rückschlüsse auf die Topographie der Abbildung schließen. Zusätzlich sind Becherzellen dargestellt, welche sich in charakteristischer Weise vom restlichen Epithelzellverband abheben.



**Abb. 17:** Erkennungsmuster konjunktivaler, nicht sekretorischer Epithelzellen mit typischer KPR von 1:1 – 1:2 (1.).

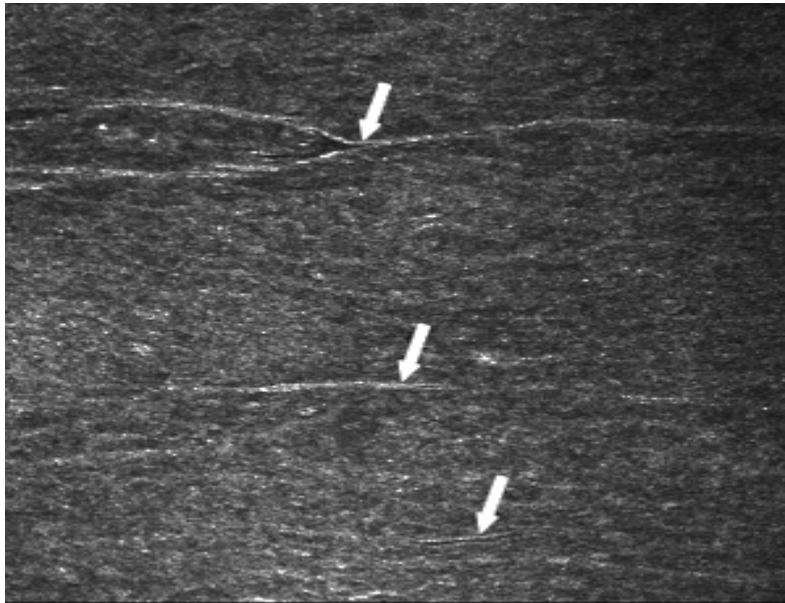
Anhand der Helldunkelverteilung erkennbare, deutlich größere Becherzellen (2.).

(Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, limbusfern 12 Uhr Position, Tiefe: 16µm)

Die Befunde tieferer Epithelschichten wiesen in einer großen Anzahl zwar auswertbare Bestandteile des Zellverbandes auf, waren jedoch nicht durch analoge Häufigkeit der sichtbaren Strukturen mit den Abbildungen des entsprechenden Untersuchungsortes in der oberflächlichen Darstellung vergleichbar.

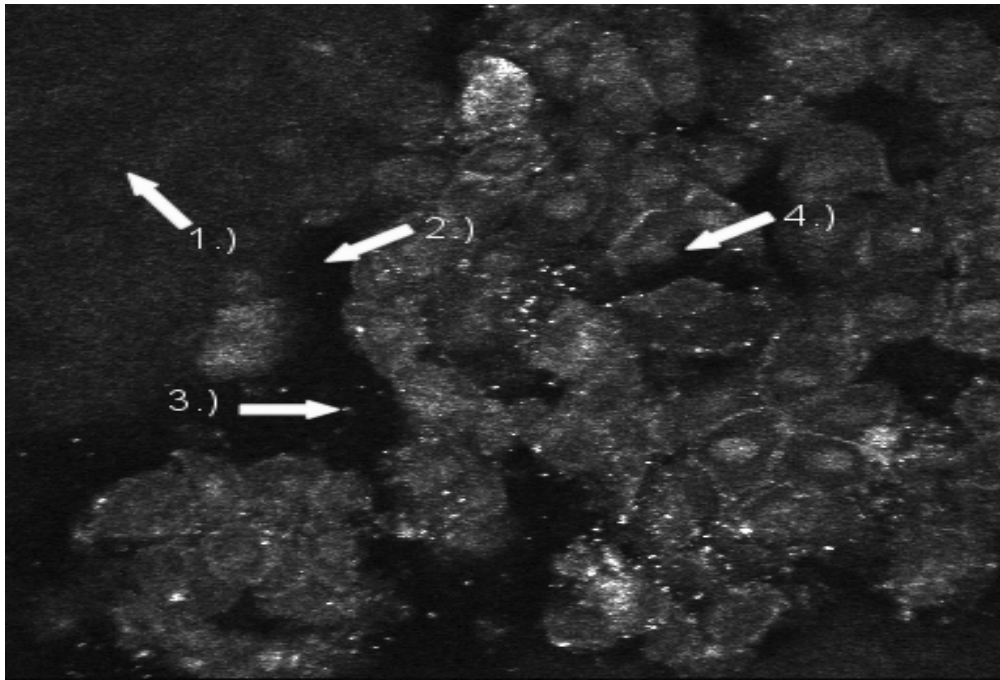
#### 4.2.4. Wesentliche Einzelbefunde

Die Betrachtung der in vivo Bilder des RLSM ergab, neben regelmäßig beobachteten Strukturen, auch schwer zuordnungsfähige Befunde. Hierbei handelt es sich um Abbildungen, die in den beurteilten Parametern vom Großteil des restlichen Bildmaterials abzuweichen scheinen und deswegen einer speziellen Betrachtung unterzogen werden müssen.



**Abb.18:** Oberflächliche Epithelzellen kommen unscharf zur Darstellung. Die Aufnahme ist durch mehrere, helle Doppellinien bestimmt, die konjunktivale Falten entsprechen.  
(Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, temporal 10 Uhr Position, Epitheloberfläche)

Die Abbildung 18 zeigt einen von der Morphologie nicht ideal scharf abgebildeten Zellverband. Die Bewertung der dargestellten Strukturen ist dennoch gut möglich, da die Helldunkelverteilung typisch ist und ihre Größenverhältnisse zueinander anderen, besser interpretierbaren Beispielbildern entsprechen. Durch die Helligkeitswerte bilden sich gut differenzierbare Zellgrenzen und Interzellularräume ab. Die Pfeile markieren helle, querverlaufende Doppellinien, welche Bindehautfalten entsprechen dürften. Einzelne größere Zellkörper mit dunkleren Bildpunkten sind sekretorischen Zellen zuzuordnen.

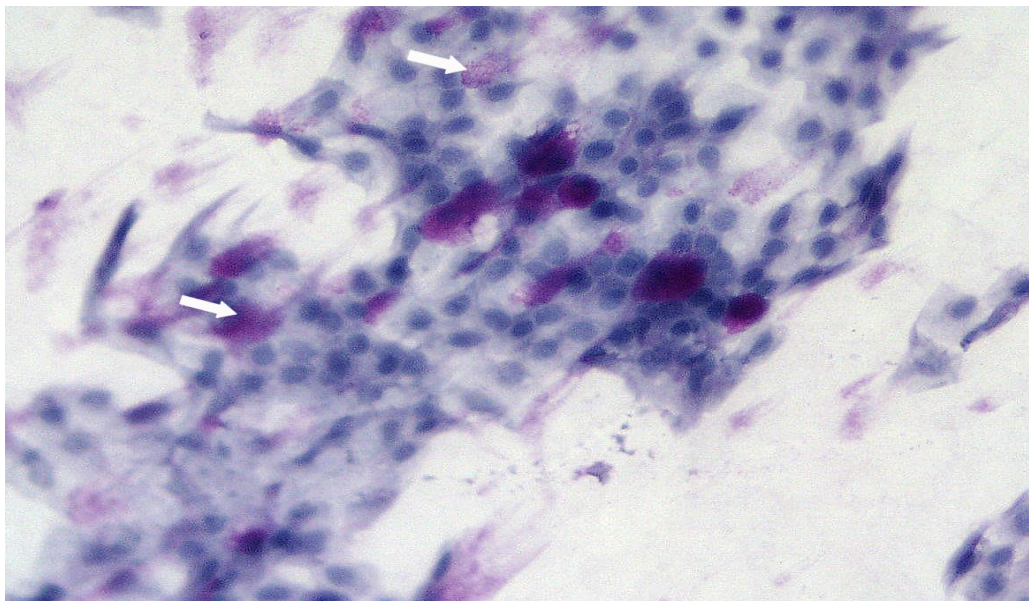


**Abb.19:** Lockerer Epithelzellverband mit groß dargestellten Epithelzellen. Angedeutete, regelmäßige Zellformation im oberen, linken Bildbereich (1.). Eine optisch dunkle Zone isoliert diesen Teil der Aufnahme und beinhaltet hell imponierende Muzingranula (3.). Weitere optisch dunkle Bildareale (4.), welche innerhalb der Zellformation für einen heterogenen Bildeindruck verantwortlich sind.  
(Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, limbusnah 12 Uhr Position, Epitheloberfläche)

Diese Einzelaufnahme zeigt einen lockeren Epithelzellverband der Bindehautoberfläche im lidspaltnahen Bereich (Locus B), und demonstriert morphologisch eine gute Korrelation zur Lichtmikroskopie. Dargestellt sind große Einzelzellen, in denen sich in Form heller Bildpunkte sichtbare runde bis ovale Zellkernstrukturen erkennen und anhand verschiedener Grauwerte vom Plasma unterscheiden lassen. Man erkennt homogene, granuläre Binnenstrukturen der Kerne. Die KPR beträgt durchschnittlich 1:4. Die Zellgrenzen der hexagonalen Zellkörper sind anhand heller Linien aus lichtstarken Einzelpunkten, teilweise durch konfluierende, helle Bildpunkte erkennbar. Bei Vergrößerung der Interzellularräume resultiert eine Doppellinie mit geringerer Intensität der Hellwerte. Im oberen linken Viertel deutet sich ein regelmäßiger(er) Epithelverband an ( 1.), der durch eine optisch dunkle Zone (2.) vom restlichen Zellverband abgetrennt scheint. Dieser Bereich wird von wenigen, hellen Bildpunkten (3.) durchbrochen, bei welchen es sich um freie Muzingranula handeln könnte. Da sich diese Strukturen in der gesamten Aufnahme finden lassen, ist eine

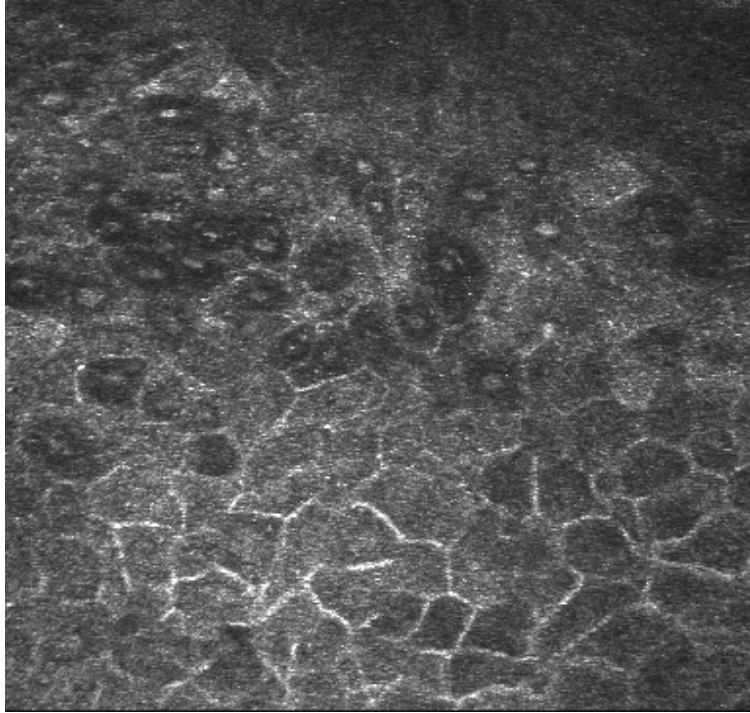
Zuordnung der hellen, diffus vorkommenden Bildpunkte zu den Muzingranula naheliegend, da solche Darstellungen des Muzins aus lichtmikroskopischen Befunden in ähnlicher Form bekannt sind (siehe Abb. 20).

Die Epithelzellen in der rechten Bildhälfte der Abb. 19 erscheinen größer. Außerdem sind die Zellbestandteile kontrastreicher und schärfer abgebildet. Hier ist der sonst regelmäßige Zellverband ebenfalls durch dunkle, zellfreie Bereiche (4.) unterbrochen. Die Begrenzung dieser Areale zum Zellverband sind teilweise unregelmäßig und entsprechen nicht immer dem Verlauf der Zellgrenzen. Da es sich bei der betrachteten Struktur um oberflächliche Konjunktiva handelt, ist anzunehmen, dass die zellfreien Areale aus der nicht flächenhaften Anlagerung des Epithels an die Plexiglasscheibe des z Scan Adapters resultieren und somit eine unvollständige Abbildung vorliegt, die einen lockeren Epithelverband vortäuscht. Andererseits entspricht die KPR nicht der schemenhaften Darstellung der Zellen im oberen, linken Bildquadranten (1.).



**Abb. 20:** Darstellung freier Muzingranula (durch weiße Pfeile markiert) im lichtmikroskopischen Bild.

(Lichtmikroskopie, 600- fache Vergrößerung, Färbung PAS Hämatoxylin, IPZ)

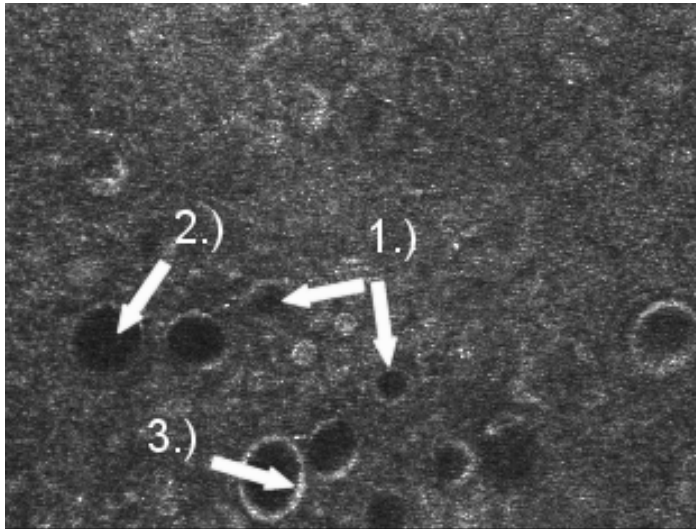


**Abb. 21:** Veränderung der Helldunkelverteilung der Zellstrukturen innerhalb derselben Aufnahme. Dunkles Zytoplasma, heller imponierende Kerne im oberen Abbildungsteil und inverses Muster im unteren Bereich.  
(Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, temporal 10 Uhr Position, Tiefe: 15  $\mu\text{m}$ )

Abbildung 21 zeigt einen Epithelzellverband mit geschlossenen Interzellularräumen. Dies wird durch intensive Hellwerte der unmittelbar aneinander grenzenden Zellwandstrukturen der einzelnen Zellen erkennbar. Die KPR beträgt 1:2 bis 1:4. Die Zellkerne sind rund bis oval geformt und heben sich in den Zellen mit einem nur durch schwache Grauwerte imponierenden Zytoplasma gut ab. Der geschlossene Zellverband zeigt sowohl helle, als auch dunkle Epithelzellen in einem Verband.

Dieses Bild vereint zwei bisher getrennt voneinander beobachtete Darstellungsformen des Epithelzellverbandes im konfokalen Bild. Es ist eindeutig erkennbar, dass sich die bereits beschriebene Helldunkelverteilung innerhalb dieser Aufnahme verändert und von oben nach unten umkehrt.

So sind die Epithelzellen im oberen Teil des Bildes mit hellen Zellkernen und dunklem Zytoplasma dargestellt (was durch die große Anzahl der konfokalen Bilder mit dieser Zelldarstellung bisher als typisch erachtet wurde), während die Epithelzellen im unteren Bildbereich die entgegengesetzte Verteilung heller und dunkler Strukturen aufweisen.

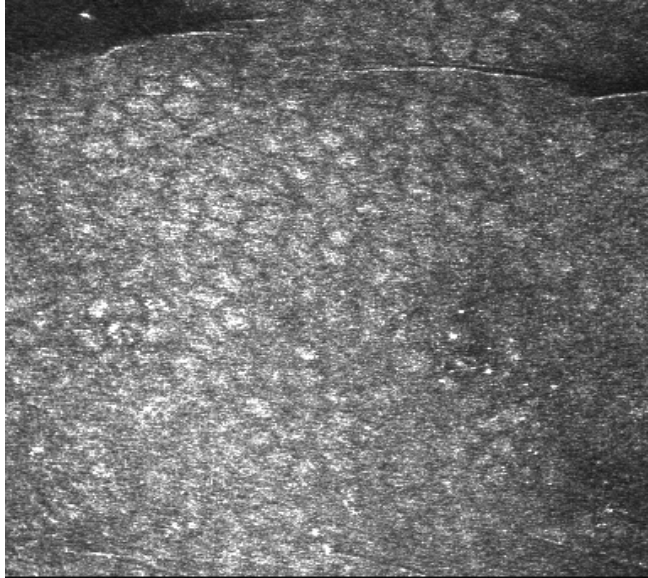


**Abb. 22:** Epithelzellverband mit deutlich größeren Becherzellen (1.) mit dunkler Binnenstruktur (2.) und kontrastreicher Zellbegrenzung (3.).

(Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, limbusfern 12 Uhr Position, Tiefe: 10µm)

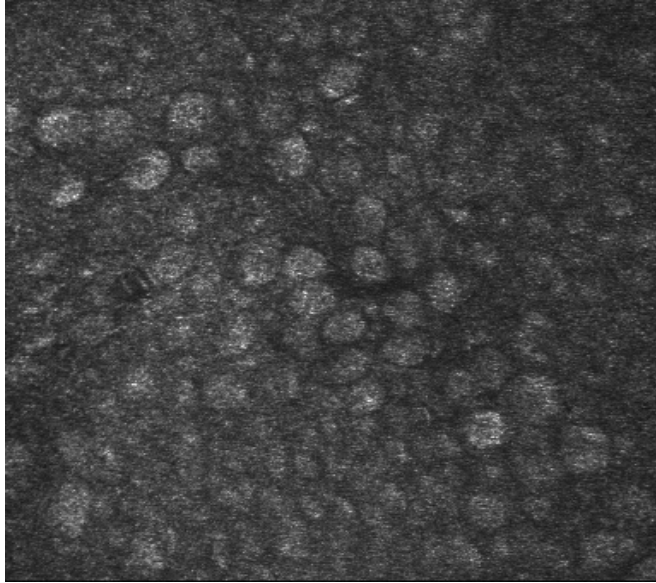
In diesem Ausschnitt eines konfokalen in vivo Bildes (Abb. 22) ist ein dichter und geschlossener Epithelzellverband sichtbar, dessen Zellen bei sorgfältiger Betrachtung, mit ihren Kernen erkennbar sind. Neben den Epithelzellen imponieren überdeutlich große, runde morphologische Strukturen (1.), die sekretorischen Zellen (Becherzellen) zuzuordnen sind. Die Binnenstruktur (2.) der Becherzellen ist homogen schwarz.

Dementsprechend kontrastreich hebt sich die Zellwand (3.) aus zahlreichen hellen Bildpunkten ab. Die konfluierenden hellen Punkte (entsprechend der Becherzellwandung) imponieren besonders kräftig. Dies entspricht der lichtmikroskopischen Darstellung einer im Vergleich zu nicht sekretorischen Epithelzellen breiteren Zellwand der Becherzelle.



**Abb. 23:** Dichter Zellverband aus nicht sekretorischen Epithelzellen mit Faltenbildung im oberen Bereich der Aufnahme und zahlreich auftretenden hell imponierenden Muzingranula.  
(Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, limbusnah 12 Uhr Position, Epitheloberfläche)

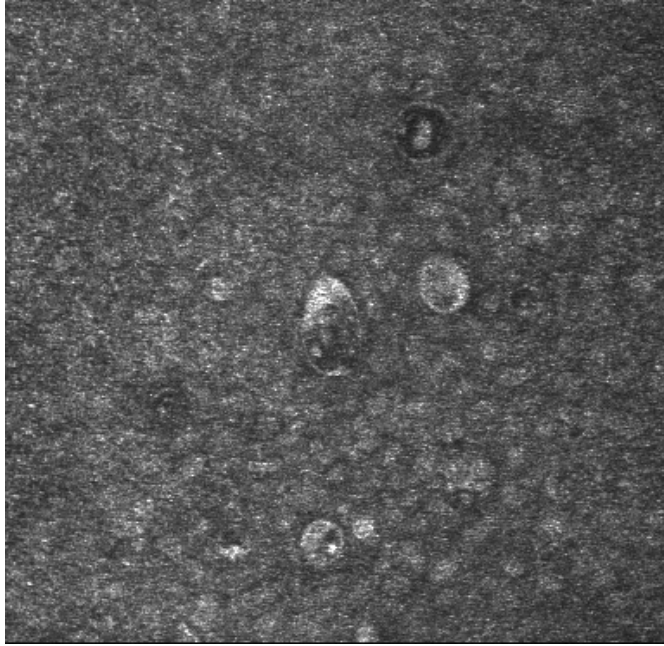
Diese Aufnahme (Abb. 23) zeigt einen geschlossenen Epithelzellverband und durch helle Bildpunkte dargestellte Kerne der nicht sekretorischen Epithelzellen. Das Zytoplasma und die Zellgrenzen zeigen deutlich schwächere Grauwerte und sind entsprechend schlechter differenzierbar. Horizontal verlaufende helle Doppellinien entsprechen Bindehautfalten, in deren Verlauf die bildgebende Darstellung des Verbandes teilweise abreißt. Die angrenzenden Zellkörper befinden sich offensichtlich in einer anderen Darstellungsebene. Im Zellverband werden punkt-, fleck- und teilweise strichförmige helle Reflektoren sichtbar, die Muzingranula oder eventuell Streifen aus Muzin entsprechen dürften.



**Abb. 24:** Untypisches Epithelzellmuster durch teilweise sehr groß dargestellte Zellkerne mit unscharfen umgebenden Strukturen, welche auf Bildverzerrungen innerhalb der Aufnahme hinweisen könnten.

(Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, temporal 10 Uhr Position, Tiefe: 14 $\mu$ m)

Diese konfokale Aufnahme zeigt große, lichtintensive und strukturierte Kerne, welche für die Entstehung eines Helldunkelmusters sorgen. Dieses unterscheidet sich von anderen, bereits demonstrierten Darstellungen des Epithelverbandes. Die Umgebung der hier groß imponierenden Kerne wird durch lichtschwache und dunkle Bereiche gebildet, welche nicht identisch scharf abgebildet erscheinen, wie die Nuclei.



**Abb. 25:** Einzelaufnahme mit kontrastarmer Darstellung des Epithelzellverbandes, aber morphologisch deutlich abgrenzbaren, sekretorischen Becherzellen.  
(Konfokale LSM, in vivo Bild, Konjunktiva, limbusfern 12 Uhr Position, Tiefe: 16  $\mu\text{m}$ )

Darstellung unterschiedlicher Becherzellstrukturen in der konfokalen Mikroskopie. Im geschlossenen Epithelzellverband, der wegen des höheren Graurauschens wenig differenziert erscheint, finden sich auffallende runde bis deutlich ovale morphologische Strukturen. Auf Grund der Größe und Form sind sie sekretorischen Zellen (Becherzellen) zuzuordnen. Zwei dieser Zellen lassen betonte, aus hellen Bildpunkten bestehende Zellgrenzen erkennen, die der breiten Zellwand sekretorischer Becherzellen zugeordnet werden können. Der Inhalt der oberen Becherzelle imponiert durch schwache Grauwerte. Kontrastreich hebt sich eine hochovale Struktur aus hellen Reflektoren ab, die vermutlich einem Zellkern entspricht. Die anderen beiden Becherzellen lassen eine inhomogene Binnenstruktur erkennen. Neben Abschnitten mit dunklen Reflektoren zeigen sich im Zytoplasma auch Areale mit intensiven hellen Bildpunkten.

#### **4.3. Vergleichende Beurteilung der Lichtmikroskopie und der konfokalen LSM**

Die Untersuchungen mit beiden verwendeten Methoden, war an den einzelnen Bestandteilen der Konjunktiva unterschiedlich gut möglich. Durch die einfache Verfahrensweise der IPZ gab es nur einzelne Ausfälle, die auf mangelnde Erfahrung mit der Methode am Anfang der Untersuchung zurückzuführen waren, während sich bei der konfokalen LSM aufgrund technischer Gegebenheiten der Untersuchungsort C (6 Uhr Position) nicht darstellen ließ. Die Compliance der Probanden (unter Tropfanästhesie) war bei beiden Methoden gleich gut. Die Zeit für die Durchführung der Untersuchung am Auge, war bei der IPZ kürzer. Betrachtet man jedoch die gesamte Zeitspanne bis zum Vorliegen auswertbaren Bildmaterials, kann mit der konfokalen LSM schneller ein Ergebnis erzielt werden. Ein eindeutiger Vorteil der in vivo Methode ist die Bewertung des abgebildeten Bindehautareals vor Ort und die Möglichkeit gezielt weitere Untersuchungen durchführen zu können.

Die Morphologie des konjunktivalen Epithelverbandes war in der konfokalen LSM und der lichtmikroskopischen Darstellung ähnlich. Es stellte sich ein zusammenhängender Zellverband dar, der durch deutlich sichtbare Zellgrenzen eindeutig als Bindehautepithel erkennbar war. Die Abbildung erfolgte (bei artefaktfreien Einzelbildern) ausreichend scharf und ließ die Interpretation der Zellen und Kompartimente durch Helldunkelkontraste zu.

Die Bewertung der wesentlichen Parameter des konjunktivalen Epithels in konfokaler LSM und Lichtmikroskopie ergab gleiche bzw. ähnliche Ergebnisse. Diese Kriterien sind:

- Epithelzellform (rund bis oval)
- Epithelzellverband (in beiden Methoden flächenhaft darstellbar)
- KPR der Epithelzellen (überwiegend 1:1 - 1:2, teilweise 1:4 - 1:6)
- Vorkommen von sekretorischen Becherzellen (Färbung in Lichtmikroskopie, Größenunterschied zu nicht sekretorischen Epithelzellen in der konfokalen LSM)
- Freies Muzin (in konfokaler LSM meist als Granula)

Die Häufung nahezu identisch oder ähnlich erhobener Bewertungen der einzelnen Parameter können als Grundlage für die Definition des konjunktivalen Normalbefundes in der konfokalen Aufnahmetechnik gewertet werden.

## 5. Diskussion

Die IPZ ist zur Entnahme und Aufbereitung zytologischer Proben ein gut geeignetes Verfahren. Die flächenhafte Abbildung des Epithelzellverbandes gelingt mit der IPZ sicher und es können nach geeigneter Aufbereitung alle wesentlichen Bestandteile des Bindehautepithels (Epithelzellen mit Zellkernen, Becherzellen, freies Muzin) abgebildet werden. Weiterhin ist die Beurteilung der Morphologie dieser Bestandteile und deren Größenverhältnis zueinander möglich. Diese Ergebnisse bestätigen bekannte Veröffentlichungen (Götz et al., 1986; Reddy et al., 1991; Tseng et al., 2001; Simon et al., 2002; Murube und Rivas, 2003). Die wichtigste Voraussetzung für die Anhaftung ausreichender Zellzahlen, ist die Entfernung des Tränenfilmes von der Augenoberfläche (Schill, 2003). Die Fixierung der entnommenen Präparate wurde jeweils mit einem industriell gefertigten Fixierspray (Fa. Merck) und mittels Lufttrocknung durchgeführt. Nach unseren Untersuchungen konnte die Aussage bestätigt werden, nach der beide Methoden für die Herstellung aussagekräftiger Präparate geeignet sind (Götz, 1986). Die Inspektion impressionszytologischer Präparate mit dem Lichtmikroskop ergab für die von uns untersuchten, augengesunden Probanden den zytomorphologischen Normalbefund. Untersuchungen von 100 gesunden Probanden (Tost, 1995) ergaben bei 8% zytomorphologische Veränderungen. Das in den eigenen Untersuchungen keine Abweichungen vom Normalbefund zu beobachten waren, erklärt sich aus der sorgfältigen Auswahl augengesunder Probanden und der Vermeidung systemischer Arzneimittelgaben (z.B. Betablocker), die den Tränenfilm beeinträchtigen können. Ein weiterer Aspekt könnte in der Tatsache zu suchen sein, das die analysierte Probandengruppe mit  $n = 23$  Probanden deutlich kleiner war. Die beschriebene KPR der Epithelzellen von 1:1 - 1:2 (Nelson et al., 1983), war auch in dieser Untersuchung für die Mehrzahl der Einzelzellen sichtbar. Die Verschiebung dieses Parameters für den temporalen Quadranten der Epitheloberfläche war nachvollziehbar.

Wir beobachteten temporal teilweise eine KPR bis 1:6, die sich von anderen Angaben (Saini et al., 1990), welche von einer maximalen KPR von 1:4 ausgehen, unterscheidet. Methodisch bedingte Artefakte, insbesondere Zelldeformationen im Randbereich der Präparate, die mit Rissen des Verbandes vergesellschaftet waren (Schill, 2003), waren sichtbar. Zusätzlich zu diesen in der

Literatur beschriebenen Artefakten durch Aufbereitung und Fixation der Präparate, fiel in unserer Studie die Bildung feiner Bläschen auf, die gerade in der Übersichtsvergrößerung störend wirkten.

Anhand der aufgeführten Gemeinsamkeiten dieser Studie mit Ergebnissen anderer Autoren, kann festgestellt werden, dass die IPZ ein aussagekräftiges Verfahren für die Darstellung geschlossener Zellverbände des Bindehautepithels ist und sich die Flächendarstellung des Epithels für den Vergleich mit konfokalen in vivo Bildern eignet.

Die Darstellungen des Bindehautepithels mit dem RLSM wiesen schon zu Beginn der Untersuchungen Gemeinsamkeiten mit der Morphologie des Epithelzellmusters der IPZ auf. Die Auswertung des Bildmaterials gab Anlaß den Normalbefund der Konjunktiva anhand typischer Darstellungen der epithelialen Bestandteile zu definieren (siehe 4.2.). Zur Unterscheidung der einzelnen Epithelbestandteile wurde deren Vorkommen in vivo in Relation zu den Erkenntnissen aus der Beurteilung der lichtmikroskopischen Präparate gesetzt. Bei Betrachtung der Zellen und Zellkerne ergaben sich interpretierbare, der Lichtmikroskopie morphologisch ähnliche Befunde. Bisher fehlen in der Literatur Erkenntnisse anderer Untersucher, um die eigenen Ergebnisse zum konfokalen Erscheinungsbild des Bindehautepithels vergleichen zu können.

Bei der Interpretation der konfokalen Abbildungen des Bindehautepithels fielen störende Effekte, wie z.B. unscharfe, kontrastarme Bereiche im Epithelzellverband auf. Da die Darstellung eine oberflächliche Schicht des Zellverbandes zeigt, wären Blendungseffekte durch die als Nullebene fungierende Plexiglasscheibe als Auslöser möglich. Die Ursachen könnten in Anlehnung an andere bildgebende Verfahren (z.B. Ultraschall) aber auch in etwaigem „Bildrauschen“ zu suchen sein. Die Qualität einiger Aufnahmen ist durch das generalisierte Auftreten dieses Effektes deutlich eingeschränkt. Hier geht das Bildrauschen auch über nicht strukturierte Bereiche hinaus. Es ist anzunehmen, dass Probleme der optischen Ankopplung des Auges mittels Tränenersatzmittel und Augenbewegungen der Probanden während der Untersuchung, in diesen Fällen zusätzliche Gründe dieser Beeinträchtigungen waren. Die Unschärfe des Bildes resultiert bei nicht erwünschten Bewegungen des Auges während des Untersuchungsvorgangs aus der Verschiebung von

Bildpunkten innerhalb der Fokusebene während der Abtastung durch den Laser. Die Darstellung einer derartig gestörten Abbildung erfolgt verfremdet, weil das errechnete Bild alle Punkte zeigt, die Licht aus der gewählten Ebene reflektieren. Die Ebene ist im Raum durch ihren Abstand von der Lichtquelle definiert. Ihre Bestandteile werden aber bei Bewegungen des Untersuchungsobjektes in diesem Abstand verschoben und durch andere Strukturen überlagert, die höher oder tiefer gelegenen Schichten zugehörig sind. Zum Zeitpunkt der Bildentstehung sind diese Strukturen Bestandteil der dargestellten Ebene, reflektieren Licht und werden als visuelle Information mit in die Abbildung der gewählten Tiefe einbezogen.

Die verminderte Abbildungsqualität könnte auch auf eine minimal veränderte z Koordinate (unter  $0,1\mu\text{m}$ ) des entsprechenden Bildanteils zurückzuführen sein. Der unscharfe Bereich würde sich unter diesen Umständen in der Tiefe einer einzelnen z Scan Schicht von  $1\mu\text{m}$  Dicke befinden.

Für die Interpretation konfokale in vivo Darstellungen könnte der Nachweis und die Eliminierung dieser störenden Faktoren eine wesentliche Verbesserung des Bildverständnisses ergeben. Durch technische Modifikationen (z.B. bei der Einstellung der Nullebene) der Untersuchungsmethode, könnte die Konstanz des Informationsgehaltes der Abbildungen verbessert und die Variation der Darstellungsqualität eingeschränkt werden.

Auch die Morphologie der sekretorischen Becherzellen im konfokalen Bild konnte anhand der vergleichenden Studie definiert werden (siehe 4.2.). Die Darstellungen dieser Epithelbestandteile ergab aber nicht durchweg einheitliche Befunde. Es fielen Variationen der Binnenstrukturen und auch der Zellbegrenzungen auf. Auch die Größe im Verhältnis zu den nicht sekretorischen Epithelzellen variierte teilweise. Diese Erkenntnis unterscheidet sich von der bekannten einheitlichen Morphologie der Becherzellen in der Lichtmikroskopie (Adams und Dilly, 1989; Nelson und Cameron, 1980). Da es sich um in vivo Aufnahmen handelt, können Artefakte durch eine Fixation ausgeschlossen werden. Allerdings muß die Möglichkeit störender Auflagerungen auf der Bindehautoberfläche als Erklärung für wechselnde Befunde in Betracht gezogen werden.

Gründe für die Heterogenität der konfokalen Helldunkelverteilungen von Becherzellen, könnten in der Abbildung unterschiedlicher Kompartimente in einer Aufnahme zu suchen sein. So können in

einem Bild beispielsweise die Zellmembran einer Becherzelle und das Zytoplasma einer weiteren abgebildet sein, da beide Strukturen in der Fokusebene liegen, wodurch sich Unterschiede in der Darstellung ergeben. Die bisher nicht definierte in vivo Morphologie von Becherzellen in der Tiefe des Epithels (im Querschnitt dargestellt), stellt ebenfalls eine Möglichkeit für abweichende Befunde dar. Ergebnisse der Hornhautdiagnostik (Hahnel et al., 2000) ergaben neue Erkenntnisse über die Mikroarchitektur des Korneaepithels und die Epithelzellmorphologie in vivo. Ähnliche Ergebnisse wären für die morphologische Untersuchung des konjunktivalen Epithels und seiner zellulären Bestandteile denkbar.

Der Muzingehalt von Becherzellen wäre ein weiteres Kriterium für wechselnde Helldunkelverteilungen im konfokalen Bild. Durch genaue Kenntnis des konfokalen Normalbefundes könnte die Definition unterschiedlicher Sezernierungszustände einzelner Becherzellen möglich werden und eventuell Aufschluß über Störungen der Muzinsekretion auf zellulärer Ebene geben.

Freies Muzin konnte sicher in Form von Granula beobachtet werden. Streifen und fleckförmige Ansammlungen freien Muzins, wie sie aus der IPZ und lichtmikroskopischen Darstellungen des Bindhautepithels bekannt sind (Tost, 1995), beobachteten wir in der LSM nicht in analoger Form. In den konfokalen Abbildungen stellten sich diffus ausgebreitete Grauwerte dar, die den Epithelzellverband überlagerten, diesen aber schemenhaft erkennen ließen („Bildrauschen“). Bei diesen als Artefakt definierten Grauwerten könnte es sich ebenfalls um freies Muzin handeln, das aber keine typische Form (Flecken, Streifen) erkennen lässt.

Die Anwendung des RLSM war für die Untersuchung der von uns gewählten Bindehautabschnitte mit Ausnahmen möglich. Lediglich im unteren Fornixbereich verhinderte die Größe des z Scan Objektivadapters und die notwendige (aber offensichtlich für die Probanden schwer durchzuführende) Aufwärtsbewegung der Augen eine erfolgreiche Darstellung der Konjunktiva. Bei der in vivo Untersuchung der übrigen Bindehautregionen stellten diese Faktoren keine Probleme dar. Für die überwiegende Mehrzahl der konfokalen Abbildungen, gelang die Gewinnung

aussagekräftiger Aufnahmen. Die Abbildungen waren überwiegend kontrastreich und im gesamten Bildbereich gut ausgeleuchtet. Diese Beobachtungen stimmen mit bekannten Merkmalen des RLSM-Bildes der Kornea überein (Stave, 2002).

Um vergleichbare Ergebnisse von den verschiedenen Probanden zu erhalten, wurden ähnliche Tiefen in der konfokalen Untersuchung der Bindehautareale angestrebt. Die Vorgaben ließen sich nicht bei allen Probanden genau auf den Mikrometer einhalten. Minimale Augenbewegungen waren ein problematischer und nicht vollständig zu eliminierender Störfaktor, der die exakte Tiefenzuordnung in den jeweiligen Bereichen erheblich erschwerte. Eine automatische Tiefeneinstellung des Gerätes könnte hier Verbesserungen bei der in vivo Diagnostik erbringen. Die heterogenen Abbildungen identischer Bindehautregionen, die in unterschiedlichen Tiefen abgebildet wurden, lassen sich durch die Ergebnisse dieser Untersuchung nicht erklären. Im Rahmen der Bildinterpretation konnten keine Gemeinsamkeiten der einzelnen Untersuchungstiefen in einem untersuchten Abschnitt festgestellt werden.

Die unterschiedliche Darstellung der Zellbegrenzungen und Interzellularräume (Helldunkelverteilung) ist in mehreren Abbildungen der konfokalen Untersuchung beobachtet worden. Durch die Veränderung der Helligkeitswerte dieser Zellstrukturen entstehen auch differente Muster des Epithelzellverbandes. Über die Ursachen dieser sehr auffälligen Differenz können aufgrund fehlenden Vergleichsmaterials nur Vermutungen angestellt werden. Ursache für die unregelmäßigen Befunde könnten Artefakte oder Störungen des optischen Systems sein. Unterschiede der Ausleuchtung oder der Anordnung von Bildbestandteilen können Differenzen bei der Interpretation des Bildmaterials verursachen. Solche differierenden Interpretationsergebnisse können durch unterschiedliche Untersucher (Interobservervariabilität) oder auch bei mehrfacher Beschreibung einer Abbildung durch einen Untersucher entstehen (Intraobservervariabilität) (Kirchner, 2000).

Die vergleichende Betrachtung verschiedener Bildserien, die identische Bindehautareale in exakt derselben Tiefe zeigen, gibt Anlaß dazu, solche anfänglich interessant wirkenden Befunde als Artefakte zu interpretieren.

## **6. Zusammenfassung**

Durch zytologische Untersuchung der Konjunktiva können verschiedene Bindehauterkrankungen anhand morphologischer Zellveränderungen erkannt werden. Als klinisch einsetzbare Methode für die Bindehautzytologie hat sich die IPZ bewährt. Mit ihr ist es möglich bereits geringfügige Abweichungen vom morphologischen Normalbefund in Form von Mikroveränderungen einzelner Epithelzellen zu erfassen.

Die konfokale LSM zeigt in der in vivo Darstellung der Kornea gute Ergebnisse. Die Möglichkeit der in vivo Diagnostik und damit der unveränderten Abbildung der Zellmorphologie macht die Methode auch für den Einsatz in der konjunktivalen Diagnostik interessant und könnte zu verbesserten Ergebnissen bei der Erkennung degenerativer Bindehauterkrankungen führen.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der morphologische Normalbefund der menschlichen Bindehaut im konfokalen in vivo Bild erfasst und analog zu den IPZ Präparaten derselben Probanden einer vergleichenden Musterbeschreibung unterzogen. Zu diesem Zweck wurden impressionszytologische Präparate von 23 augengesunden Probanden entnommen und lichtmikroskopisch untersucht. Zuvor wurden konfokale in vivo Abbildungen der entsprechenden Bindehautareale mit dem RLSM angefertigt. Das gewonnene zytologische Material der IPZ und die Abbildungen des RLSM wurden auf Dichte des Epithelverbandes, Größe der Epithelzellkerne, KPR, freies Muzin und Anzahl der Becherzellen untersucht. Außerdem erfolgte der Vergleich oberflächlicher in vivo Aufnahmen des RLSM mit ebenfalls konfokalen Abbildungen aus tieferen Schichten der Konjunktiva. Dadurch sollten Ergebnisse für die eventuell mögliche Darstellung und Diagnostik der gesamten Bindehaut erarbeitet werden.

Anhand der beobachteten Strukturmuster konnte der morphologische Normalbefund wesentlicher Bestandteile der Konjunktiva im konfokalen LSM definiert werden. Epitheliale Zellen, Zellkerne und KPR stellten sich analog zur IPZ dar. Auch das flächenhafte Epithelzellmuster der IPZ konnte in den konfokalen Abbildungen nachvollzogen werden.

Die sekretorischen Becherzellen wurden anhand ihres Größenunterschiedes zu den Epithelzellen und durch vergleichbare Häufigkeitswerte identifiziert. Die Darstellung einzelner Becherzellen im konfokalen Bild unterschied sich durch heterogene Befunde der Binnenstrukturen und Helligkeitswerte der Zellbegrenzungen. Auch die Helligkeitswerte der Interzellularräume des Epithelzellverbandes imponierten nicht immer einheitlich. In der konventionellen IPZ einheitlich, leicht basophil darstellbare Zellgrenzen waren in der konfokalen in vivo Mikroskopie anhand von Helligkeitswerten, in anderen Abschnitten auch in Form dunklerer Strukturen zu identifizieren.

Die vergleichende Betrachtung konfokaler Abbildungen aus unterschiedlichen Epitheltiefen erbrachte überwiegend heterogene Befunde, so dass eine Zuordnung zu den entsprechenden Oberflächenaufnahmen nicht erfolgen konnte.

Die konfokale LSM ermöglicht die in vivo Darstellung des Bindehautepithels und kommt als alternatives Diagnoseverfahren zur Beurteilung von Bindehauterkrankungen in Betracht. Durch die vorliegende Studie konnte der morphologische Normalbefund des Bindehautepithels im konfokalen in vivo Bild des RLSM definiert und damit die Voraussetzung für in vivo Untersuchungen einer pathologisch veränderten, humanen Konjunktiva mit der konfokalen LSM erarbeitet werden.

7. Anhang

7.1. Tabellen

7.1.1. Lichtmikroskopische Beurteilung der impressionszytologisch gewonnenen Präparate

| Präparat Nr. | freies Muzin | Becherzellen | Zellverband | KPR                           | Kerngröße |
|--------------|--------------|--------------|-------------|-------------------------------|-----------|
| 1a           | 3            | 3            | 2           | 1:2                           | 2         |
| 1b           | 3            | 3            | 2           | 1:2                           | 2         |
| 1c           | 3            | 2            | 2           | 1:2                           | 2         |
| 2b           | 2            | 1            | 1           | 1:2 - 1:3                     | 1         |
| 2a           | 3            | 2            | 2           | 1:2                           | 2         |
| 2c           | 3            | 2            | 2           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 3a           | 2            | 1            | 2           | 1:3                           | 2         |
| 3b           | 1            | 1            | 2           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 3c           | 2            | 2            | 2           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 3a (fix)     | 2            | 1            | 3           | 1:2                           | 2         |
| 3c (fix)     | 2            | 2            | 2           | 1:2                           | 2         |
| 4a           | 1            | 1            | 2           | 1:2 - 1:3                     | 2 - 3     |
| 4b           | 1            | 0!           | 2           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 4c           | 1            | 1            | 2           | 1:2                           | 2         |
| 4a (fix)     | 2            | 0!           | 1           | 1:2                           | 2         |
| 4b (fix)     | 1            | 1            | 1           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 4c (fix)     | 2            | 1            | 2           | 1:2                           | 2         |
| 5a fix       | 2            | 1            | 1           | 1:3                           | 2         |
| 5b fix       | 2            | 1            | 2           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 5c fix       | 1            | 1            | 2           | 1:3 - 1:4                     | 2         |
| 5a           | 1            | 1            | 2           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 5b           | 2            | 1            | 2           | 1:3                           | 2         |
| 5c           | 1            | 0            | 1           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 6b           | 2            | 1            | 2           | 1:2                           | 2 - 3     |
| 6c           | 1            | 1            | 2           | 1:3                           | 2         |
| 6a fix       | 1            | 0            | 1           | -                             | -         |
| 6b fix       | 2            | 1            | 1           | 1:2                           | 2 - 3     |
| 6c fix       | 2            | 1            | 1           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 7a fix       | 2            | 1            | 2           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 7b fix       | 2            | 1            | 2           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 7c fix       | 3            | 1            | 1           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 7a           | 2            | 1            | 2           | 1:2                           | 2         |
| 7b           | 1            | 1            | 2           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 7c           | 2            | 1            | 2           | 1:2                           | 2         |
| 8a fix       | 3            | 3            | 2           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 8b fix       | 2            | 1            | 1           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 8c fix       | 2 - 3        | 1            | 1           | 1:4<br>teilweise<br>1:6 - 1:8 | 2         |
| 8a           | 3            | 2            | 2           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 8b           | 3            | 2            | 2           | 1:3                           | 2         |
| 8c           | 2            | 1            | 1           | 1:3                           | 2         |
| 9a           | 2            | 1            | 2           | 1:3                           | 1 - 2     |
| 9b           | 2            | 2            | 3           | 1:2 - 1:3                     | 2         |
| 9c           | 2            | 1            | 2           | 1:2 - 1:3                     | 2         |

| Präparat Nr. | freies Muzin | Becherzellen | Zellverband | KPR       | Kerngröße |
|--------------|--------------|--------------|-------------|-----------|-----------|
| 9a fix       | 2            | 1            | 2           | 1:2       | 2 - 3     |
| 9b fix       | 2            | 1            | 2           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 9c fix       | 2            | 1            | 2           | 1:3       | 2         |
| 10a fix      | 1            | 0            | 2           | 1:2       | 1 - 2     |
| 10b fix      | 1            | 1            | 2           | 1:2       | 2         |
| 10c fix      | 1            | 1            | 2           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 10d fix      | 1            | 0            | 1           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 11a          | 1            | 0            | 1           | 1:3       | 2         |
| 11b          | 2            | 2            | 2           | 1:3       | 2         |
| 11c          | 1            | 1            | 2           | 1:4       | 2         |
| 11d          | 1            | 2            | 3           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 12a fix      | 1            | 1            | 2 - 3       | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 12b fix      | 1            | 1            | 2           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 12c fix      | 1            | 2            | 2           | 1:3 - 1:4 | 2         |
| 12d fix      | 2            | 2            | 3           | 1:3       | 2         |
| 13a          | 2            | 1            | 2           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 13b          | 2            | 2            | 2           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 13c          | 2            | 1            | 2           | 1:3       | 2         |
| 13d          | 2            | 1            | 2           | 1:3       | 2         |
| 14a fix      | 1            | 2            | 3           | 1:2       | 2         |
| 14b fix      | 1            | 1            | 2           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 14c fix      | 1            | 1            | 2           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 14d fix      | 2            | 1            | 2           | 1:3       | 2         |
| 15a          | 3            | 3            | 2           | 1:2       | 2         |
| 15b          | 3            | 2            | 2           | 1:3       | 2         |
| 15c          | 2            | 1 - 2        | 2           | 1:3 - 1:4 | 2         |
| 15d          | 3            | 2            | 2           | 1:3       | 2         |
| 16a fix      | 2 - 3        | 2            | 2           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 16b fix      | 2            | 2            | 2           | 1:3       | 2         |
| 16c fix      | 1            | 1            | 2           | 1:4 - 1:6 | 1 - 2     |
| 16d fix      | 2            | 2            | 2           | 1:3       | 2         |
| 17a          | 1            | 1            | 2           | 1:3 - 1:6 | 2         |
| 17b          | 1            | 1            | 2           | 1:4       | 1 - 2     |
| 17c          | 1            | 1            | 1           | 1:2 - 1:3 | 1 - 2     |
| 17d          | 2            | 1            | 1           | 1:2       | 2 - 3     |
| 18a fix      | 2            | 2            | 2           | 1:2       | 2 - 3     |
| 18b fix      | 2            | 3            | 3           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 18c fix      | 2            | 2            | 2           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 18d fix      | 2            | 2            | 2           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 19a          | 2            | 3            | 2 - 3       | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 19b          | 2            | 3            | 2           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 19c          | 3            | 3            | 2           | 1:2 - 1:3 | 1 - 2     |
| 19d          | 2            | 2            | 2           | 1:3       | 2         |
| 20a fix      | 2            | 2            | 2           | 1:2 - 1:3 | 2         |
| 20b fix      | 2            | 2            | 2           | 1:3       | 2         |
| 20c fix      | 2 - 3        | 2            | 3           | 1:3 - 1:5 | 2         |
| 21a          | 1-2          | 2            | 2           | 1 :2      | 2         |
| 21b          | 1-2          | 2            | 2           | 1 :2      | 2         |
| 21c          | 2            | 1-2          | 1-2         | 1 :3-1 :2 | 2         |
| 21d          | 2            | 2            | 2           | 1 :4-1 :5 | 2         |
| 22a fix      | 2            | 2            | 2           |           | 2         |
| 22b fix      | 1            | 2            | 1           |           | 1         |

| Präparat Nr. | freies Muzin | Becherzellen | Zellverband | KPR       | Kerngröße |
|--------------|--------------|--------------|-------------|-----------|-----------|
| 22c fix      | 2            | 2            | 2           |           | 2         |
| 22d fix      | 1-2          | 2            | 2           | 1 :3-1 :4 | 2         |
| 23a          | 2            | 2-3          | 2           | 1 :2-1:4  | 1         |
| 23b          | 2-3          | 2            | 2           | 1 :2-1 :3 | 1-2       |
| 23c          | 2            | 2            | 2           | 1 :3      | 2         |
| 23d          | 2-3          | 2            | 2           | 1 :3-1 :4 | 1-2       |

### 7.1.2. Tabellarische Bewertung der konfokalen in vivo Bilder

In die Beurteilung wurden alle vorhandenen und zuordnungsfähigen Bilder einbezogen. Die Nr. steht speziell für ein betrachtetes Beispielbild, wenn es mehrere Bilder von einem Entnahmeort und einer Tiefe gab. Sind unter einem Ort und einer Tiefe mehrere Nr. aufgeführt, so gab es Unterschiede bei der Bildqualität oder den gezeigten Strukturen der Abbildungen eines Untersuchungsortes. Alle Bewertungen wurden von ein und dem selben Untersucher vorgenommen.

| Präparatenummer und Untersuchungsort   | Freies Muzin | Becherzellen | Zellverband | Kern Plasma Relation | Kerngröße         | Bemerkungen                         |
|--|--------------|--------------|-------------|----------------------|-------------------|-------------------------------------|
| Nr.4                                   |              |              |             |                      |                   |                                     |
| 4a.) superfizial<br>Nr. 4230           | 2            | 1-2          | 2           | 1:1                  | 1-2               | Falte im verband                    |
| 4a.) basal<br>Nr. 5214                 | 3            | 1            | 3           | 1:2                  | 2                 |                                     |
| 4b.) superfizial<br>Nr.1028<br>Nr.2004 | 2<br>1       | 1<br>2       | 2<br>1      | 1:1<br>1:1 1:2       | 3<br>1            | Große Becherzellen                  |
| 4b.) basal                             | 2            | 3            | 3           | 1:1                  | 2                 | Muzinstreifen                       |
| Nr.5                                   |              |              |             |                      |                   |                                     |
| 5a.) superfizial<br>Nr. 3012           | 0-1          | 1            | 2           | 1:1-1:3              | 3                 | Große Zellkerne                     |
| 5a.) basal<br>Nr. 5200                 | 3            | 2            | 3           | 1:2                  | 1                 |                                     |
| 5b.) superfizial<br>Nr.1000            | 0-1          | 2-3          | 2           | 1:2-1:3              | 2                 | Spalt                               |
| Nr.1030                                | 2            | 2-3          | 1-2         | 1:3                  | 1                 | Artefakt zentral                    |
| Nr.1104                                | 1            | 0            | 1-2         | 1:3-1:4              | 1                 |                                     |
| 5b.) basal<br>Nr. 2017                 | 1            | 0            | 2           | nicht beurteilbar    | nicht beurteilbar | Unscharf                            |
| Nr.6                                   |              |              |             |                      |                   |                                     |
| 6a.) superfizial<br>Nr. 3014           | 1            | 0            | 3           | 1:1                  | 3                 |                                     |
| 6a.) superfizial<br>Nr. 7001           | 2-3          | 3            | 2           | nicht beurteilbar    | nicht beurteilbar | Nur teilweise Kontakt zur Nullebene |
| 6a.) basal<br>Nr. 5231                 | 2            | 2-3          | 1-2         | nicht beurteilbar    | nicht beurteilbar | viele Becherzellen                  |
| 6b.) superfizial<br>Nr. 2002           | 2            | 1            | 1-2         | nicht beurteilbar    | 1-2               |                                     |
| 6b.) basal                             | 1-2          | 1            | 2           | 1:1-1:2              | 2-3               | Weißer Artefakte                    |

| Präparatenummer und Untersuchungsort | Freies Muzin | Becherzellen | Zellverband | Kern Plasma Relation | Kerngröße         | Bemerkungen                 |
|--------------------------------------|--------------|--------------|-------------|----------------------|-------------------|-----------------------------|
| Nr.7                                 |              |              |             |                      |                   |                             |
| 7a.) superfizial<br>Nr. 3208         | 1            | 2            | 3           | 1:2                  |                   |                             |
| 7a.) basal<br>Nr. 4223               | 1            | 0            | 3           | 1:1-1:2              | 2                 |                             |
| 7b.) superfizial<br>Nr.1130          | 3            | 1            | 3           | nicht beurteilbar    | 1-2               |                             |
| Nr.8                                 |              |              |             |                      |                   |                             |
| 8b.) superfizial<br>Nr.1001          | 2            | 1-2          | 2           | 1:2-1:3              | 2                 |                             |
| 8b.) basal<br>Nr. 2000               | 1-2          | 2-3          | 2           | 1:1-1:2              | 1-2               |                             |
| Nr.9                                 |              |              |             |                      |                   |                             |
| 9a.) superfizial<br>Nr. 3003         | 2-3          | 1            | 3           | 1:1                  | 2                 | Ungleichmäßige Ausleuchtung |
| Nr. 3221                             | 2            | 1            | 2           | 1:2                  | 2                 |                             |
| Nr. 3226                             | 2-3          | 1-2          | 2-3         | 1:2                  | 2                 |                             |
| 9a.) basal<br>Nr. 4127               | 2-3          | 3            | 3           | 1:2                  | 1-2               |                             |
| Nr.10                                |              |              |             |                      |                   |                             |
| 10a.) superfizial<br>Nr.6014         | 1-2          | 2            | 3           | 1:3-1:4              | 2-3               |                             |
| 10a.) basal<br>Nr.5010               | 1            | 0            | 3           | 1:1                  | 3                 |                             |
| 10b.) superfizial<br>Nr. 4113        | 0            | 1            | 3           | 1:1-1:2              | 2-3               |                             |
| 10b.) basal<br>Nr. 3001              | 1            | 2            | 2           | 1:1                  | 2-3               | diagonale Falte             |
| 10d.) basal<br>Nr. 2005              | 2-3          | 2            | 2           | nicht beurteilbar    | nicht beurteilbar |                             |
| Nr.11                                |              |              |             |                      |                   |                             |
| 11a.) superfizial<br>Nr. 1227        | 2            | 1            | 3           | 1:1                  | 2-3               |                             |
| 11a.) basal<br>Nr. 2019              | 3            | 2            | 2-3         | 1:2-1:1              | 2-3               |                             |
| Nr. 2119                             | 2            | 1            | 1-2         | 1:1                  | 3                 |                             |
| 11b.) superfizial<br>Nr. 3012        | 2            | 1            | 3           | 1:1                  | 2-3               |                             |
| 11b.) basal<br>Nr. 4001              | 1            | 1-2          | 2           | 1:2                  | 2                 |                             |
| Nr.40023                             | 1            | 0            | 1           | 1:1-1:4              | 1-3               |                             |
| 11d.) superfizial<br>Nr. 5020        | 2-3          | 3            | 1           | 1:2-1:3              | 2                 |                             |

| Präparatenummer und Untersuchungsort | Freies Muzin | Becherzellen | Zellverband | Kern Plasma Relation | Kerngröße | Bemerkungen         |
|--------------------------------------|--------------|--------------|-------------|----------------------|-----------|---------------------|
| 11d.)superfizial<br>Nr. 5121         | 3            | 2-3          | 1           | nicht beurteilbar    | 0         |                     |
| 11d.) basal<br>Nr.002                | 1            | 1            | 1-2         | 1:2                  | 2         |                     |
| Nr.12                                |              |              |             |                      |           |                     |
| 12b.) superfizial<br>Nr.3015         | 1-2          | 1            | 2           | 1:1-1:2              | 2         |                     |
| 12d.) superfizial<br>Nr. 1001        | 2            | 2            | 1           | 1:3                  | 2         |                     |
| Nr. 1231                             | 1            | 1-2          | 1           | 1:2                  | 1-2       |                     |
| 12d.) basal<br>Nr. 2005              | 2            | 3            | 2           | nicht beurteilbar    | 1-2       |                     |
| Nr.14                                |              |              |             |                      |           |                     |
| 14a.) superfizial<br>Nr. 1000        | 1            | 1-2          | 3           | 1:2                  | 1         | Weiße Artefakte     |
| Nr.1025                              | 1            | 1            | 3           | 1:2-1:3              | 2         |                     |
| 14a.) basal<br>Nr.2019               | 2            | 1            | 1           | 1:2                  | 1         | Rauschen            |
| 14b.) superfizial<br>Nr.3001         | 1            | 2            | 2           | 1:2                  | 2         |                     |
| 14d.) superfizial<br>Nr. 4000        | 2            | 1-2          | 1           | 1:2                  | 1-2       | Falte               |
| Nr.4108                              | 1-2          | 2            | 2           | 1:2                  | 2         |                     |
| Nr.4200                              | 2            | 1-2          | 2           | 1:3                  | 1-2       |                     |
| 14d.) basal<br>Nr.5000               | 1-2          | 2            | 3           | 1:1-1:2              | 2-3       |                     |
| Nr. 5028                             | 1            | 2            | 2           | 1:1-1:2              | 3         |                     |
| Nr.17                                |              |              |             |                      |           |                     |
| 17a.) superfizial<br>Nr. 6000        | 2            | 2            | 2           | 1:2                  | 2         |                     |
| 17a.) basal<br>Nr.5012               | 3            | 2-3          | 2           | 1:1                  | 2-3       |                     |
| Nr. 5001                             | 3            | 2-3          | 2           | 1:2                  | 2         |                     |
| 17b.) superfizial<br>Nr. 4001        | 2            | 2            | 2           | 1:1-1:2              | 2-3       |                     |
| 17b.) basal<br>Nr. 3027              | 3            | 1-2          | 2           | 1:1                  | 2-3       |                     |
| Nr. 3120                             | 3            | 1            | 2           | 1:1/1:2              | 2-3       |                     |
| 17d.) superfizial<br>Nr. 2227        | 1            | 2            | 2           | 1:2                  | 2-3       | Falten<br>Artefakte |
| Nr. 2000                             | 1            | 2            | 2           | 1:1-1:2              | 2-3       |                     |
| 17d.) basal<br>Nr.1206               | 2            | 3            | 1           | 1:2                  | 2         |                     |

| Präparatenummer und Untersuchungsort | Freies Muzin | Becherzellen | Zellverband | Kern Plasma Relation | Kerngröße            | Bemerkungen  |
|--------------------------------------|--------------|--------------|-------------|----------------------|----------------------|--|
| Nr.18                                |              |              |             |                      |                      |  |
| 18a.) superfizial<br>Nr. 6024        | 2-3          | 3            | 1           | 1:3                  | 1                    |  |
| Nr.6116                              | 2            | 2            | 1-2         | 1:2                  | 1-2                  |  |
| 18a.) basal<br>Nr.5202               | 2            | 2            | 1           | 1:2                  | 2                    |  |
| 18b.) superfizial<br>Nr.4012         | 1-2          | 2            | 2           | 1:2                  | 2                    |  |
| Nr. 4021                             | 2            | 1-2          | 2           | 1:1-1:2              | 2-3                  |  |
| 18b.) basal<br>Nr.3112               | 1-2          | 2            | 2           | 1:2                  | 2                    |  |
| 18d.)superfizial<br>Nr. 2104         | 1            | 1            | 2           | 1:1-1:2              | 2-3                  |  |
| 18d.) basal<br>Nr.1004               | 2            | 2            | 1           | 1:2                  | 1                    | Rauschen   |
| Nr. 19                               |              |              |             |                      |                      |  |
| 19a.) superfizial<br>Nr. 6000        | 1-2          | 1            | 1           | 1:2                  | 1                    | Rauschen,<br>diagonaler<br>Artefakt                  |
| 19a.) basal<br>Nr. 5208              | 2            | 1            | 3           | 1:1-1:2              | 2                    | helles Bild,<br>inverse<br>Helldunkel-<br>verteilung |
| 19b.) superfizial<br>Nr.4116         | 0            | 1            | 3           | 1:1                  | 3                    | große Zellkerne                                      |
| 19b.) basal<br>Nr. 3000              | 2            | 2            | 2           | 1:1                  | 2                    |  |
| 19d.) superfizial<br>Nr. 2005        | 1            | 1            | 3           | 1:1                  | 3                    |  |
| 19d.) basal<br>Nr.1108               | 1            | 1            | 3           | 1:1-1:2              | 3                    | Verzerrung der<br>Kerne im<br>Bildzentrum            |
| Nr.21                                |              |              |             |                      |                      |  |
| 21a.) superfizial<br>Nr. 0000        | 2            | 1            | 1           | nicht beurteilbar    | nicht<br>beurteilbar | Artefakte durch<br>Nullebene                         |
| 21a.) basal<br>Nr. 1010              | 2            | 2-3          | 1-2         | 1:1                  | 2                    |  |
| 21b.) superfizial<br>Nr. 4012        | 2            | 2-3          | 2           | 1:2                  | 2                    | hohe<br>Helligkeitswerte                             |
| 21b.) basal<br>Nr.3003               | 1            | 2            | 1-2         | 1:2                  | 1-2                  | niedrige<br>Helligkeitswerte                         |
| Nr.23                                |              |              |             |                      |                      |  |
| 23a.) superfizial<br>Nr. 014         | 1            | 1            | 2-3         | 1:1                  | 3                    |  |
| 23a.) basal<br>Nr.103                | 2            | 2            | 1           | nicht beurteilbar    | nicht<br>beurteilbar | inverse<br>Helldunkel-<br>verteilung                 |

| Präparatenummer<br>und<br>Untersuchungsort | Freies<br>Muzin | Becher-<br>zellen | Zell-<br>verband | Kern Plasma<br>Relation | Kern-<br>größe       | Bemerkungen            |
|--|-----------------|-------------------|------------------|-------------------------|----------------------|------------------------|
| 23b.) superfizial<br>Nr. 0025              | 1               | 1-2               | 2                | 1:1                     | 2                    |                        |
| 23b.) basal<br>Nr. 12023                   | 1               | 1                 | 3                | 1:1                     | 2-3                  |                        |
| 23d.) superfizial<br>Nr. 0014              | 1-2             | 0                 | 1                | nicht beurteilbar       | nicht<br>beurteilbar | Artefakte,<br>Rauschen |
| 23d.) basal<br>Nr. 12128                   | 2               | 2                 | 2                | 1:2-1:4                 | 2                    |                        |

## 7.2. Literaturverzeichnis

1. Abdel-Khalek LM, Williamson J, Lee WR (1978): Morphological changes in the human conjunctival epithelium. In the normal elderly population. *Br J Ophthalmol* 62(11): 792-799.
2. Adams GG, Dilly PN (1989): Differential staining of ocular goblet cells. *Eye* 3(Pt 6): 840-844.
3. Adar S, Kanpolat A, Surucu S, Ucakhan OO (1997): Conjunctival impression cytology in patients wearing contact lenses. *Cornea* 16(3): 289-294.
4. Albietz JM (2001): Conjunctival histologic findings of dry eye and non-dry eye contact lens wearing subjects. *Clao J* 27(1): 35-40.
5. Auran JD, Starr MB, Koester CJ, La Bombardi VJ (1994): In vivo scanning slit confocal microscopy of Acanthamoeba keratitis. A case report. *Cornea* 13(2): 183-185.
6. Breitbach R (1990): Die Blepharitis/ Meibomitis – als Ursache für das Sicca Syndrom. *Augenärztliche Fortbildung* 13: 49-55.
7. Breitbach R, Spitznas M (1988): Ultrastructure of the paralimbal and juxtacarcular human conjunctiva. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 226(6): 567-575.
8. Cavanagh HD, El-Agha MS, Petroll WM, Jester JV (2000): Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. *Cornea* 19(5): 712-722.
9. Cavanagh HD, Petroll WM, Alizadeh H, He YG, McCulley JP, Jester JV (1993): Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology* 100(10): 1444-1454.
10. Chew SJ, Beuerman RW, Assouline M, Kaufman HE, Barron BA, Hill JM (1992): Early diagnosis of infectious keratitis with in vivo real time confocal microscopy. *Clao J* 18(3): 197-201.
11. de Rojas MV, Rodriguez MT, Ces Blanco JA, Salorio MS (1993): Impression cytology in patients with keratoconjunctivitis sicca. *Cytopathology* 4(6): 347-355.
12. Dursun D, Wang M, Monroy D, Lokeshwar L, Stern ME, Pflugfelder SC (2002): A mouse model of keratoconjunctivitis sicca. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(3): 632-638.

13. Espejo F, Montero J, Salguero M, Moreno M, Montero J (1989): Conjunctival impression cytology in keratoconjunctivitis sicca. Arch Soc Esp Oftalmol 56: 251-255.
14. Ganghofer A (1991): Veränderungen der Proteinzusammensetzung im Tränensekret der Glandula lacrimalis sowie Veränderungen der Epithelzellen und des Gehaltes an Gobletzellen in der Bindehaut bei Mucoviszidosepatienten. Aachen, RWTH, Fachbereich Medizin Dissertation.
15. Ganghofer A, Sommer HJ, Skopnik H, Stolze HH (1992): Tränentests und Bindehautzytologie bei Kindern mit Mukoviszidose. In: Berneaud-Kötz, G (Hrsg): Sitzungsberichte der 154. Versammlung des Vereins Rheinisch-Westfälischer Augenärzte. Zimmermann, Balve: 125-129.
16. Götz ML, Jaeger W, Kruse FE (1986): Impression cytology as a noninvasive method of conjunctival biopsy and its results. Klin Monatsbl Augenheilkd 188(1): 23-28.
17. Hahnel C, Somodi S, Weiss DG, Guthoff RF (2000): The keratocyte network of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. Cornea 19(2): 185-93.
18. Hanuschik W, Figols J, Cervós-Navarro J (1991): Diagnostische Möglichkeiten der Konjunktivalbiopsie. Zentralbl Pathol 137: 305-315.
19. Jalbert I, Stapleton F, Papas E, Sweeney DF, Coroneo M (2003): In vivo confocal microscopy of the human cornea. Br J Ophthalmol 87(2): 225-236.
20. Kessing SV (1968): Mucos gland system of the conjunctiva. A qualitativ normal anatomic study. Acta Ophthalmol (Copenh) , (Suppl), 95: 9-131.
21. Kessing SV (1969): Epithelial cysts in the conjunctiva. Acta ophthalmol 47: 642-654
22. Kim JW (1997): Conjunctival impression cytology of the filtering bleb. Korean J Ophthalmol 11(1): 25-31.
23. Kirchner T (2000): Der Pathologe als Musterfinder-Perspektiven der morphologischen Krankheitssicht. Pathologe 21:281-284.
24. Knappe S, Stave J, Guthoff RF (2004): Epidemic keratoconjunctivitis. In vivo representation of corneal histopathological structures with the confocal Rostocker laser scanning microscope (RLSM). Ophthalmologie 20: 20.

25. Knop E, Brewitt H (1992): Morphologie des Konjunktiva-Epithels bei Gesunden und bei Kontaktlinsenträgern. Eine licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung. *Contactologie* 14D: 108-120.
26. Knop N, Knop E (2000): Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(6): 1270-1279.
27. Lütjen Drecoll E, Steuhl P, Arnhold WH (1982): Morphologische Besonderheiten der Conjunctiva bulbi. In: Marquardt, R. (Hrsg.) *Chronische Conjunctivitis. Trockenes Auge.* Springer-Verlag. Wien: 25-34.
28. Marcon GB, Fregona IA, Masetto M, Tognon MS, Ciuccio N, Secchi AG (1989a): La citologia congiuntivale per impressione. *Reperti patologici. Boll Ocul* 68: 383-388.
29. Marcon GB, Fregona IA, Tognon MS, Turrini B, Revelli P, Secchi AG (1989b): La citologia congiuntivale per impressione. *Reperti normali. Boll Ocul* 68: 379-382.
30. Marner K (1980): "snake-like" appearance of nuclear chromatin in conjunctival cells from patients with keratoconjunctivitis sicca. *Acta Ophthalmol* 58: 849-853.
31. Marquardt R (1992): *Benetzungstörungen des vorderen Augenabschnittes.* Wissenschaftsverlag Wellingsbüttel GmbH: 15-42.
32. Marquardt R, Wenz FH (1979): Histologische Untersuchungen zur Becherzellzahl der menschlichen Bindehaut. *Klin Mbl Augenheilk* 175: 692-696.
33. Masters BR, Bohnke M (2001). Confocal microscopy of the human cornea in vivo. *Int Ophthalmol* 23(4-6): 199-206.
34. Minsky M (1962): *Microscopy apparatus.* US Patent 3 013467.
35. Murube J, Rivas L (2003): Impression cytology on conjunctiva and cornea in dry eye patients establishes a correlation between squamous metaplasia and dry eye clinical severity. *Eur J Ophthalmol* 13(2): 115-127.
36. Nelson JD, Cameron JD (1980): Clinical Evaluation of conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19.
37. Nelson JD, Havener VR, Cameron JD (1983): Cellulose acetate impressions of the ocular surface. Dry eye states. *Arch Ophthalmol* 101(12): 1869-1872.

38. Nelson JD, Wright JC (1984): Conjunctival goblet cell densities in ocular surface disease. *Arch Ophthalmol* 102: 1049-1051.
39. Paschides CA, Petroustos G, Psilas K (1991): Correlation of conjunctival impression cytology results with lacrimal function and age. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 69(4): 422-425.
40. Reddy M, Reddy PR, Reddy SC (1991): Conjunctival impression cytology in dry eye states. *Indian J Ophthalmol* 39(1): 22-24.
41. Rivas L, Oroza MA, Perez-Esteban A, Murube-del-Castillo J (1992): Morphological changes in ocular surface in dry eyes and other disorders by impression cytology. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 230: 329-334.
42. Rivas L, Oroza MA, Sanz AI, Chen Z, Shalaby O, Murube J (1998): The association of conjunctival snake-like chromatin with keratoconjunctivitis SICCA. *Eur J Ophthalmol* 8(4): 217-223.
43. Rivas L, Oroza MA, Perez-Esteban A, Murube-del-Castillo J (1991): Topographical distribution of the ocular surface cells by the use of impression cytology. *Acta Ophthalmol* 69: 371-376.
44. Rohen JW, Steuhl P (1982). Specialized cell types and their regional distribution in the conjunctival epithelium of the cynomolgus monkey. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 218: 59-63.
45. Rohen JW, Lütjen Drecoll E (1991): Funktionelle Morphologie der Bindehaut. In: Marquardt R, Lemp MA (Hrsg.) *Das trockene Auge in Klinik und Praxis*. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York: 35-63.
46. Saini JS, Rajwanshi A, Dhar S (1990): Clinicopathological correlation of hard contact lens related changes in tarsal conjunctiva by impression cytology. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 68(1): 65-70.
47. Sanderson TL, Pustai W, Shelley L, Gelender H (1980): Cytologic evaluation of ocular lesions. *Acta Cytologica* 24: 391-400.
48. Schill C (2003): Zytologische Untersuchungen der Konjunktiva vor und nach augendrucksenkender Therapie. Dissertation, Medizin Fakultät d Universität Greifswald: 40-46.
49. Schumann GB, O` Dowd GJ, Spinnler PA (1980): Eye cytology. *Lab Med* 11: 533-540.

50. Simon P, Jaison SG, Chopra SK, Jacob S (2002): Conjunctival impression cytology in contact lens wearers. *Indian J Ophthalmol* 50(4): 301-306.
51. Stave J, Slowik Ch, Somodi S, Hahnel Ch, Grümmer G, Guthoff R (1998): Keratozytendichte der In-vivo-Kornea. Automatische Messung mit einem modifizierten konfokalen Mikroskop MICROPHTHAL®. *Klin Mbl Augenheilk* 1 (213): 38–44.
52. Stave J, Torens S, Käppel K, Guthoff R (2001): Digitale konfokale Laser Scanning Mikroskopie in-vivo der Keratozyten mit einem modifizierten Heidelberg Retina Tomographen (HRT 1). 99. Jahrestagung der DOG 29.9.-2.10.01 Berlin.
53. Stave J, Zinser G, Grümmer G, Guthoff R (2002): Der modifizierte Heidelberg-Retina-Tomograph HRT. Erste Ergebnisse einer In-vivo-Darstellung von kornealen Strukturen. *Der Ophthalmologe* Band 99 Nr 4: 276 - 280.
54. Steuhl KP, Knorr M (1990): Das zweite, schleimbildende System der Konjunktiva. Ultrastrukturelle Befunde. *Fortschr Ophthalmol* 87: 492-496.
55. Steuh KP, Knorr M, Frohn A, Thiel HJ (1991): Über den Einfluss antiglaukomatöser Augentropfen auf die Zelldifferenzierung der Konjunktiva. *Fortschr Ophthalmol* 88: 865-869.
56. Steuhl P, Rohen JW (1984): Cellular structure of the conjunctival epithelium of rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 221: 265-271.
57. Streeten BW, Streeten EA (1985): "Blue-body" epithelial cell inclusions in conjunctivitis. *Ophthalmology* 92: 575-579.
58. Tost F (1995): Möglichkeiten und Grenzen der Impressionszytologie der Bindehaut. Habilitation, medizin Fakultät d Universität Halle: 72-79.
59. Tost F, Lehnigk U, Maile S, Fabian M, Giebel J (2004): Molekulare Aspekte der Alterung des normalen Bindehautepithels Zur Bedeutung apoptoseassoziiertes Gene. Springer-Verlag Heidelberg.
60. Tseng SH, Chen YT, Cheng HC, Huang FC, Lee SC, Chen FK (2001): Impression cytology study of conjunctival epithelial phenotypes on the healing ocular surface after pterygium excision. *Cornea* 20 (3): 244-250.

61. Vanathi M, Tandon R, Sharma N, Titiyal JS, Pandey RM, Vajpayee RB (2003): In-vivo slit scanning confocal microscopy of normal corneas in Indian eyes. *Indian J Ophthalmol* 51 (3): 225-230.
62. Winchester K, Mathers WD, Sutphin JE, Daley TE (1995): Diagnosis of Acanthamoeba keratitis in vivo with confocal microscopy. *Cornea* 14 (1): 10-17.

#### 7.4. Lebenslauf

Robert Rath

|                         |  |
|-------------------------|--|
| 1977                    | Geboren in Rostock   |
| 1984                    | Einschulung in die polytechnische Oberschule<br>Lüdersdorf/ Meckl.                         |
| 1991                    | Schulwechsel an das Goethe-Gymnasium<br>Schönberg  |
| Mai 1996                | Abitur   |
| Juli 1996               | Grundwehrdienst in Roth (Mittelfranken) und<br>Elmenhorst/ Ostsee                          |
| Januar bis Oktober 1997 | Offizierausbildung mit Stationierungen in<br>Bayreuth, Fürstenfeldbruck, München und Husum |
| Oktober 1997            | Beginn des Zahnmedizinstudiums an der Ernst-<br>Moritz- Arndt- Universität Greifswald      |
| Mai 2003                | Erfolgreiches Ablegen des Staatsexamens und<br>Erlangen der Approbation als Zahnarzt       |
| 13.05.2003              | Ernennung zum Stabsarzt  |
| 27.05.2003-30.9.2004    | Tätigkeit als Truppenzahnarzt im<br>Standortsanitätszentrum Eggesin/ Karpin                |
| seit 1.10.2004          | Leiter Zahnarztgruppe des<br>Standortsanitätszentrums Basepohl                             |

Unterschrift:

### **7.5. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, daß ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und daß eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum

Unterschrift

## **7.6. Danksagung**

Für die Bereitstellung der erforderlichen Geräte, möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. R. Guthoff und Prof. Dr. rer. nat. J. Stave (Augenlinik der Universität Rostock) bedanken.

Dem Institut für Anatomie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Direktor: Herr Prof. Dr. med. J. Fanghänel, möchte ich für die Überlassung der mikroskopischen Einrichtung danken. Für die Hilfe bei der Endfassung dieser Arbeit danke ich PD Dr. Giebel.

Weiterhin geht mein Dank an meinen Doktorvater Herrn Prof. F. Tost (Universitäts-Augenlinik Greifswald). Prof. Tost hat durch seine fürsorgliche und motivierende Unterstützung die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht. Trotz zahlreicher Verpflichtungen und intensiver, zeitlicher Belastungen, stand er mir jederzeit als kompetenter Ansprechpartner zur Verfügung. Für die unerwartet freundliche und von Statusdenken freie Zusammenarbeit gebührt ihm mein Respekt und Dank.

Für die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit und während meines Studiums danke ich meiner Mutter und meiner Schwester, die immer für mich da waren. Durch viele Gespräche und die Gewissheit ihrer Anteilnahme an Erfolg und Misserfolg in meinem Leben, gaben sie mir die Kraft schwierige Situationen und Ungerechtigkeiten zu überwinden. Ihnen widme ich diese Arbeit.

Meiner Freundin, Frl. Christine Kirchhoff, danke ich für ihre Unterstützung, ihr Verständnis und für ihr großes Herz, in das sie mich geschlossen hat. Ich freue mich auf die Zeit, in der wir nach den Mühen des Lernens, Erfolg und Glück teilen werden.

Bedanken möchte ich mich bei meinem militärischen Vorgesetzten Herrn Oberfeldarzt Dipl. Stom. N. Schulz, der mir durch sein persönliches Engagement und die stetige, uneigennützig Anleitende Mentor und Vorbild war. Oberfeldarzt Schulz motivierte mich in schwierigen Situationen und trug durch konstruktive Gespräche und seine wissenschaftlich versierte Meinung maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit bei.

Frau Miraß, Augenlinik der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, danke ich für ihre freundliche Unterstützung bei den erforderlichen Laborarbeiten.

Für die Hilfe in technischen Fragen und bei der Umsetzung der Ergebnisse in ein adäquates, computergestütztes Layout bedanke ich mich bei Herrn Hauptgefreiten M. Böhme.