

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universität Rostock
Direktor: Professor Dr. med. R. Guthoff

**Untersuchungen zur Mikrostruktur der Cornea verticillata bei Morbus
Fabry und Vergleich zur medikamentös induzierten Form der Cornea
verticillata mittels konfokaler In-vivo-Mikroskopie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Karen Falke,
geb. in Nordhausen,
aus Rostock

Rostock, Januar 2009

Dekan: Prof. Emil C. Reisinger

Dekan: Prof. Emil C. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Guthoff
2. Gutachter: PD Dr. med. S. Pitz
3. Gutachter: Prof. Dr. med. H. Wilhelm

Tag der Verteidigung: 22.12.2009

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Cornea verticillata	1
1.2.	Ursachen einer Cornea verticillata	2
1.2.1	Morbus Fabry	2
1.2.2.	Medikamentös induzierte Cornea verticillata	5
1.3	Problemstellung	7
2.	PATIENTEN UND METHODEN	8
2.1.	Patienten	8
2.1.1.	Normalprobanden	8
2.1.2.	Patienten mit Morbus Fabry	10
2.1.3.	Patienten mit Amiodarontherapie	14
2.2.	Methodik	16
2.2.1.	Augenärztliche Untersuchungen und Spaltlampenmikroskopie	16
2.2.2.	Konfokale Laser-Scanning In-vivo-Mikroskopie	18
2.2.3.	3-dimensionale Rekonstruktion	21
3.	ERGEBNISSE	23
3.1.	Spaltlampenmikroskopische Ergebnisse	23
3.1.1.	Spaltlampenmikroskopie bei Fabrypatienten und Prävalenz der Cornea verticillata	23
3.1.2.	Spaltlampenmikroskopie bei Amiodaronpatienten	27
3.2.	Konfokalmikroskopischer Befund der Hornhaut eines Normalprobanden	28
3.3.	Konfokalmikroskopische Befunde der Hornhaut bei Morbus Fabry	32
3.3.1.	Epithel	32
3.3.2.	Stroma	35
3.3.3.	Endothel	37

3.3.4.	Konfokalmikroskopische Stadieneinteilung der basalepithelialen Veränderungen	38
3.3.5.	3-dimensionale Rekonstruktion der Hornhautveränderungen	41
3.4.	Konfokalmikroskopische Befunde in der Bindehaut von Fabrypatienten	42
3.4.1.	Bulbäre Konjunktiva	42
3.4.2.	Tarsale Konjunktiva	44
3.5.	Verlaufsbeobachtung der Hornhautveränderungen unter Enzymsubstitutionstherapie (Replagal)	47
3.6.	Konfokalmikroskopische Morphologie der Hornhaut- und Bindehautveränderungen von Patienten unter Amiodarontherapie	50
3.6.1.	Cornea	50
3.6.2.	3-dimensionale Rekonstruktion	53
3.6.3.	Konjunktiva	54
3.6.4.	Verlaufsbeobachtung von Amiodaronpatienten	55
4.	DISKUSSION	58
4.1.	Spaltlampenmikroskopie - Vergleich der Cornea verticillata bei Morbus Fabry mit der Amiodaron induzierten Form	58
4.1.1.	Frühdiagnostik	58
4.1.2.	Spaltlampenmikroskopische Stadieneinteilung	61
4.2.	Konfokale In-vivo-Mikroskopie bei Fabry- und Amiodaronpatienten	62
4.2.1.	Diskussion der epithelialen Befunde	62
4.2.2.	Diskussion der stromalen Befunde	65
4.2.3.	Diskussion der konfokalmikroskopischen Schweregrade	67
4.2.4.	Auswertung der 3-dimensionalen Rekonstruktionen	68
4.2.5.	Diskussion der konjunktivalen Befunde	69
4.3.	Fabry- und Amiodaronpatienten im zeitlichen Verlauf	71
5.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	73

6.	LITERATURZEICHNIS	76
7.	THESEN	86
8.	LEBENS LAUF	88
9.	VERÖFFENTLICHUNGEN	89
10.	EIDESSTAATLICHE ERKLÄRUNG	90
11.	DANKSAGUNG	91

1. EINLEITUNG

1.1. Cornea verticillata

Der Begriff „Cornea verticillata“ stammt aus dem Lateinischen und bedeutet so viel wie „Hornhautwirbel“. An der Spaltlampe erscheint uns das Bild von grau-braunen Ablagerungen im Hornhautepithel, die symmetrisch und beidseits auftreten und sich wirbelförmig von einem zentralen Punkt unterhalb der Pupille nach außen drehen (Grüber 1946, Lang 2004). Erstmals beschrieben wurde sie von Fleischer (Fleischer 1910), der die Dystrophie bei 16 Frauen und 5 Männern nachweisen konnte. Am Anfang zog man nur die Möglichkeit der erworbenen Störung in Betracht, doch erstmals auffällig wurde ein Zusammenhang mit Vererbung bei dem Fall einer Mutter und deren Tochter, die beide das Phänomen des Hornhautwirbels aufwiesen (Lutz 1930). 1953 wurden in weiteren Studien ausführlichere Stammbäume erstellt (Grüber 1953). 1966 beschrieb Denden 3 Möglichkeiten zur Entstehung der Cornea verticillata: spontan (idiopathisch), als eigenständiges Krankheitsbild oder von außen ausgelöst (medikamentös) (Denden 1966). Der Theorie von Bron (Bron 1973) zufolge entsteht die von außen ausgelöste Form aufgrund von Reepithelisierungsprozessen (z.B. nach epithelialer Abrasio) als Abbild des Zellflusses von der Peripherie ins Zentrum („zentripetaler Epitheldrift“ bei Reparatur von zugrunde gegangenen Epithelzellen). Francois brachte die Cornea verticillata 1969 mit der X-chromosomal lokalisierten Stoffwechselerkrankung Morbus Fabry in Verbindung (Francois 1969).

Heute spricht man vor allem von 2 Ursachen in Zusammenhang mit der Cornea verticillata (Lang 2004): Sie ist typisch für die Einnahme von amphiphilen Medikamenten, vor allem Amiodaron und Chloroquin. Im Weiteren tritt sie in Zusammenhang mit dem X-chromosomal rezessiv vererbten Morbus Fabry auf. Die unterschiedlichen Ursachen einer Cornea verticillata führen klinisch zu dem gleichem nach außen sichtbaren Phänomen. Eine Beeinflussung der Sehstärke in diesem Zusammenhang ist nicht bekannt (Heydenreich 1975).

1.2. Ursachen einer Cornea verticillata

1.2.1. Morbus Fabry

Der Morbus Fabry (Synonym: Morbus Fabry-Anderson, Angiokeratoma corporis diffusum) gehört in die Gruppe der lysosomalen Speicherkrankheiten und wird X-chromosomal rezessiv (Xq22.1) vererbt (Wanner et al. 2005). Die Prävalenz liegt bei rund 1 pro 100.000 Lebendgeborenen (Grau et al. 2003). Erstmals wurde er 1898 gleichzeitig von 2 Dermatologen beschrieben, die unabhängig voneinander in Deutschland und England arbeiteten (Fabry 2002): Johannes Fabry (1860-1930) und William Anderson (1842-1900). Der X-chromosomal rezessive Erbgang bedingt die unterschiedliche Ausprägung der Krankheit bei Männern und Frauen. Man spricht von männlichen hemizygoten und weiblichen heterozygoten Merkmalsträgern. Dennoch kann es zum Auftreten grenzwertig reduzierter biochemischer Aktivität bei Frauen, bzw. späterer oder milderer Manifestationen kommen. Dies wird mit der Lyon-Hypothese (randomisierte X-Inaktivierung) begründet, derzufolge Frauen ein genetisches Mosaik darstellen (Lyon 1961, 1998). Das Chromosom wird in einigen Körperzellen an- und in anderen ausgeschaltet. Häufig beobachtet bei Frauen werden auch typische Fabry-Symptome bei nur geringfügig eingeschränkter bis normaler Enzymaktivität (Gupta et al. 2005). Man spricht von „symptomatischen Carriern“ (Lyon 1961, Lyon 1988).

Bei Morbus Fabry liegt eine Störung des Sphingolipidstoffwechsels vor. Sphingolipide sind u.a. Hauptbestandteile von Zellmembranen. Aufgrund eines X-chromosomalen Gendefektes wird das Enzym Alpha-Galactosidase A nur unvollständig oder gar nicht synthetisiert. In der Folge kommt es zur Akkumulation des Sphingolipidabbauprodukts Globotriasylceramid (Gb₃) im Plasma und in Zelllysosomen (Itoh et al. 1993, Ohshima et al. 1997) (Abb.1). Insbesondere betroffen sind die Endothelzellen fast aller Organe, in der glatten Gefäßmuskulatur, den Kapillarperizyten, den Hautfibrozyten und den Lymphozyten (Font und Fine 1972, Yanoff und Fine 1975). Einlagerungen von Gb₃ stellen sich auch als lamellare Einschlusskörperchen oder „zebra bodies“ in Kardiomyozyten dar (Strotmann et al. 2005). In späteren Phasen finden sich sogar Glycosphingolipide im proximalen Tubulus, interstitiellen Histozyten und Fibrozyten der Niere wieder (Desnick et al. 2002).

Folge dieser Akkumulationen im gesamten Körper sind Ischämien in Nieren, Herz und Gehirn (Rolfs et al. 2005, Witschel und Meyer 1968). Daneben finden sich auch Symptome wie gastrointestinale Beschwerden, vestibulocochleäre Störungen, Hypo- bzw. Anhidrose, Wärmeintoleranz, Thrombosen, Varizen und muskuloskelettale Beteiligung. Erste Symptome sind aber meist periodische Schmerzattacken in den Extremitäten, makulo-papulöse, blaurot bis schwärzliche Haut- und Schleimhautveränderungen, so genannte Angiokeratome und die Cornea verticillata, welche bereits im Kindesalter auftreten kann (Grau et al. 2003, Mehta et al. 2004, Ries et al. 2003, Senn et al. 1995).

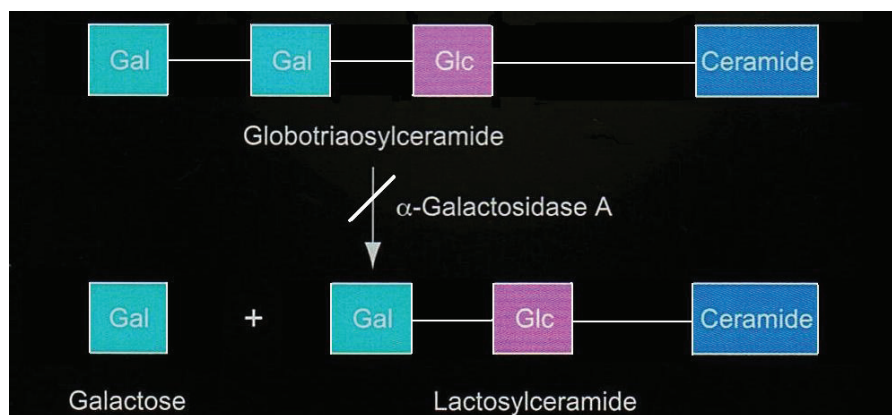


Abb. 1: Enzymdefekt bei Morbus Fabry

Okuläre Manifestationen, die im Rahmen des Morbus Fabry auftreten, sind verschiedener Art, aber nicht immer eindeutig. Hinweisendes diagnostisches Zeichen für eine Erkrankung ist das Vorhandensein einer Cornea verticillata. In der Literatur finden sich zum Teil widersprüchliche Angaben, was die Prävalenz der Cornea verticillata bei Morbus Fabry betrifft, wobei jeweils zwischen männlichen hemizygoten und weiblichen hetrozygoten Merkmalsträgern unterschieden wird. Nguyen et al. (Nguyen et al. 2005) kamen bei ihren Untersuchungen zu einem Wert von 94,1% bei Männern und 71,9% bei Frauen, Sher et al. (Sher et al. 1979) hingegen erhielten einen Wert von 94,5% bei Männern und 88% bei Frauen. Orssaud et al. (Orssaud et al. 2003) fanden die Erscheinung bei 43,7% der Männer und Spaeth et al. (Spaeth et al. 1965) bei 91,6% der Männer.

Weniger spezifische okuläre Befunde sind die so genannte Fabry-Cataract (Cataracta subcapsularis anterior und posterior) und vaskulären Anomalien, wie konjunktivale und retinale Gefäßschlängelungen und Dilatationen (Andersen et al. 1994, Nguyen et al. 2005,

Ohkubo et al.1988, Orssaud et al. 2003, Sher et al. 1979, Sodi et al 2006, Spaeth et al.1965). Abe et al. (Abe et al. 1992) beschrieben den Fall einer 21 Jahre alten weiblichen Patientin, die aufgrund von ischämischen Ödemen im Bereich der Ciliararterien rechtseitig komplett erblindete. Solche Erscheinungen stellen allerdings wohl eher eine Ausnahme dar. Bisher sind nur 3 weitere Fälle von ischämisch optischer Neuropathie in der Literatur beschrieben worden: 1959 von Calmette et al., 1978 von Sher et al. und 1981 von Tuppurainen et al. . Franceschetti stellt diese in sekundären Zusammenhang mit den Gefäßläsionen (Franceschetti1976).

Ein Zusammenhang zwischen spaltlampenmikroskopischen okulären Manifestationen (Cornea verticillata) und kardialen sowie renalen Manifestationen besteht nicht (Fumex-Boizard et al. 2005).

Eine mögliche Therapieform wurde bereits 1973 diskutiert (Brady et al. 1973). Es erscheint logisch und hocheffektiv die fehlende Alpha-Galactosidase zu ersetzen, was zu diesem Zeitpunkt aufgrund unzureichender Mengen des Enzyms jedoch nicht möglich war. Im Jahr 2001 gelang die künstliche Herstellung des Enzyms aus kultivierten, genetisch veränderten, menschlichen Fibroblasten. Der Nutzen von Agalsidase alfa bzw. beta – Substitutionen (Replagal® Shire GmbH, Köln, Deutschland; Fabrazym® Genzyme GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) konnte in verschiedenen Studien u.a. anhand von EKG- und Kreatinin-Clearance-Veränderungen sowie Biopsien nachgewiesen werden (Eng et al 2001, Lee et al. 2003, Schiffmann et al. 2001). Eine solche Möglichkeit existiert in Bezug auf die Augenveränderungen beim Morbus Fabry bisher noch nicht.

Eine eher in Zukunft zu diskutierende Therapiemöglichkeit besteht in der sogenannten Gentherapie. Man entwickelte eine Kopie des Alpha-Galactosidase A Gens und verwendete einen mit diesem Gen versehenes Retrovirus zur Übertragung auf humane Fibroblasten und immortalisierte B-Zellen (Medin et al. 1996). Eine erfolgreiche Transduktion in Knochenmarkszellen von Probanden mit Morbus Fabry konnte durch Takenaka et al. (Takenaka et al. 1999) demonstriert werden.

1.2.2 Medikamentös induzierte Cornea verticillata

Für die medikamentös induzierte Cornea verticillata sind vor allem 2 Substanzen verantwortlich: Zum einen Amiodaron (= Antiarrhythmikum) und zum anderen Chloroquin (= Malariamittel, Antirheumatikum) (Goldblum und Garweg 1998). Es gibt aber auch andere Medikamente, die in Zusammenhang mit Lipideinschlüssen genannt werden müssen. Sie alle haben die physikalisch chemische Eigenschaft gemeinsam, dass sie kationisch und amphiphil sind (Abb.2). Dazu gehören Amiodaquin (bei Malaria, Systemische Lupus erythematodes, Arthritis), Benoquin/Hydroquinon (zur Behandlung der Vitiligo), Tilorone (antineoplastisch) und Gentamicin (Aminoglycosidantibiotikum) (D'Amico und Kenyon 1981).

Amphiphile Medikamente werden aus der Tränendrüse sezerniert, gelangen so oder auch auf dem Blutweg ins Epithel und können frei in Lysosomen penetrieren (Pollak 1999, Russel et al. 1984). Der Prozess, dem die Ablagerungserscheinungen in der Hornhaut zugrunde liegen, ist auf die veränderte Oberflächenladung der Phospholipidzellen zurückzuführen (Bangham und Dawson 1959). Phospholipase A2 ist für die Hydrolyse von Phospholipiden verantwortlich. Voraussetzung dafür ist deren negative Oberflächenladung. Wird diese nun durch Anlagerung von anorganischen Kationen z.B. Amiodaron neutralisiert oder protonisiert, kann der Prozess nicht von statten gehen. Die Lipid-Medikament-Komplexe können nicht durch die Phospholipase A2 angegriffen werden. Folge ist die bereits genannte Akkumulation dieser Phospholipide (Seiler et al. 1977, Lüllmann et al. 1978).

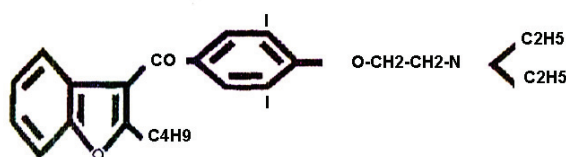


Abb. 2: Ultrastruktur von Amiodaron

Demzufolge ist durch Absetzen des Medikaments dieser Vorgang umzukehren. Die medikamentenassoziierte Cornea verticillata ist somit potentiell reversibel innerhalb einer Zeitspanne von 3 bis zu 20 Monaten (Dolan et al. 1985, Ingram et al. 1982). Bis zum Erscheinen von ersten Anzeichen einer Cornea verticillata gibt es unterschiedliche Angaben. In Bezug auf Amiodaron sprechen D' Amico und Kenyon (D'Amico und Kenyon 1981) von

nur 2 Wochen, während Francois (Francois 1969) von 4 bis 6 Monaten berichtet. Ebenfalls wird ein Zusammenhang zwischen Auftreten der Cornea verticillata und Dosierung des Medikamentes angenommen (D'Amico und Kenyon 1981).

Amiodaron ist ein antiarrhythmisch wirksames Medikament, welches die Kaliumkanäle in den Myokardzellen blockiert und somit zu einer Verlängerung der Refraktärzeit führt. Die häufigsten Nebenwirkungen sind: Lungenfibrose, Schilddrüsenfunktionsstörung, Leberzirrhose/Hepatitis, erhöhte Lichtempfindlichkeit (UVA) und Medikamenteninteraktionen (Green et al. 1983, Harris et al. 1983, Hyatt et al. 1988, Kerin et al. 1989, Reader et al. 1985, Vrobel et al. 1989). Die Prävalenz der Cornea verticillata unter Amiodarontherapie liegt zwischen 70% und 100% (Mantjarvi et al. 1998). Gleichzeitig können diese cornealen Veränderungen Marker für eine präklinische Toxizität sein. Sie gehören in den Formenkreis der arzneimittelbedingten Lipidosen (Lüllman et al. 1978). Flach et al. (Flach et al. 1983) beschrieb des weiteren anteriore, subkapsuläre Linsentrübungen, die bei der Hälfte der von ihm untersuchen mit Amiodaron behandelten Patienten aufgetreten sind und nicht in der Kontrollgruppe beobachtet werden konnten.

Auch die medikamenteninduzierte Form der Cornea verticillata hat keinen Einfluss auf das visuelle Leistungsvermögen, obwohl von manchen Patienten (10%) Verschwommenheitserscheinungen, vermehrte Blendempfindlichkeit, Halos und Chromatopsie beschrieben wurden (Pollak 1999, Wilson et al. 1980).

1.3. Problemstellung

Inhalt dieser Arbeit ist der Vergleich der konfokalen In-vivo-Mikroskopie mit der konventionellen Spaltlampenmikroskopie bei der Morbus Fabry- und medikamenten-induzierten Cornea verticillata. Zusätzlich werden Hornhautbefunde von Normalprobanden hinzugezogen und alle 3 Befundkonstellationen vergleichend diskutiert. Dabei werden auch in der Literatur beschriebene histologische und elektronenmikroskopische Methodiken berücksichtigt.

Die konfokalmikroskopischen Befunde sollen hinsichtlich ihrer Struktur, ihres Verteilungsmusters und ihrer Häufigkeit ausgewertet und diskutiert werden. Hierfür wird auch die Möglichkeit einer 3-dimensionalen Rekonstruktion der Hornhaut mit Darstellung der Infiltration der einzelnen Hornhautabschnitte verwendet.

Zusätzlich werden Veränderungen der bulbären und tarsalen Konjunktiva in Bezug auf Morbus Fabry und Therapie mit Amiodaron konfokalmikroskopisch untersucht.

Klinisch wird geprüft werden, ob fabrybedingte Hornhautveränderungen konfokalmikroskopisch darstellbar sind, noch bevor man sie mit der Spaltlampenmikroskopie erfassen kann. Somit wäre eine Möglichkeit der, für die Patienten sehr wichtigen, Früherkennung des Morbus Fabry gegeben.

Um die Wirkung der Enzyersatztherapie bei Morbus Fabry zu belegen, stehen in den verschiedenen betroffenen Fachgebieten unterschiedliche Methodiken zur Verfügung. Eine solche Methode, um die Augenveränderungen bei Morbus Fabry unter Enzyersatztherapie zu beobachten, existiert bisher noch nicht. Daher soll diskutiert werden, ob dies mit Hilfe der konfokalen In-vivo-Mikroskopie möglich ist, d.h. kann sich die Cornea verticillata zurückbilden und wie gestaltet sich das entsprechende morphologische Korrelat. Somit soll die Aussagefähigkeit sowie klinische Anwendbarkeit der konfokalen Mikroskopie unter Betrachtung der Morbus Fabry assoziierten und der Amiodaron bedingten Cornea verticillata geprüft werden.

2. PATIENTEN UND METHODEN

2.1. Patienten

Die Studie wurde durch die Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock bewilligt. Die Untersuchungen entsprechen den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki. Insgesamt 52 Patienten nahmen an der Studie teil. Die Untersuchungen erfolgten nach einer ausführlichen Aufklärung. Normalprobanden sowie Fabry- und Amiodaronpatienten haben ein Aufklärungs- und Einwilligungsformular unterschrieben.

2.1.1. Normalprobanden

Zur Erhebung eines konfokalmikroskopischen Normalbefundes wurden 12 Augen von 10 Normalprobanden untersucht. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte auf freiwilliger Basis. Folgende Einschlusskriterien wurden festgelegt:

1. Innerhalb der letzten Jahre keinerlei Medikation, die Einfluss auf die Hornhaut und somit auf die Untersuchung nehmen konnte (Mindestzeitspanne nach Absetzen der Medikation wurde auf 2 Jahre (Dolan et al. 1985) festgelegt).
2. Keine Hornhauterkrankungen- bzw. Operationen im Bereich des betreffenden Auges.
3. Variable Altersverteilung der Probanden (vergleichend zu den Fabrypatienten).

Insgesamt beinhaltete die Studie Personen im Alter von 21 bis 83 Jahren (Durchschnittsalter 50 Jahre +/- 21 Jahre) (Tab. 1).

Tab. 1: Angaben zu den Normalprobanden

Patienten	Geschlecht	Alter [Jahren]	Untersuchte Augen
N1	w	21	RA
N2	w	25	RA
N3	w	40	RA
N4	w	71	RA
N5	w	73	RA
N6	m	31	RA/LA
N7	m	41	RA
N8	m	43	RA
N9	m	72	LA
N10	m	83	RA/LA

w... weiblich

m... männlich

RA... rechtes Auge

LA... linkes Auge

2.1.2 Patienten mit Morbus Fabry

In dieser Gruppe wurden insgesamt 36 Augen von 30 molekulargenetisch gesicherten Fabrypatienten betrachtet (Tab. 2). Die Rekrutierung der Patienten erfolgte in Zusammenarbeit mit der Neurologischen Universitätsklinik Rostock. Die dortige Fabry-Ambulanz überwies die bei ihnen diagnostizierten oder in Behandlung stehenden Patienten im Rahmen eines Screeningprogramms an die Universitätsaugenklinik Rostock. 21 der 30 Fabrypatienten waren weibliche heterozygote Merkmalsträger und 9 davon männlich hemizygot. Folgende Einschlusskriterien waren Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie:

1. Molekulargenetisch gesicherter Morbus Fabry.
2. Bis zu 2 Jahren vor der Untersuchung keine Einnahme von Hornhautveränderungen hervorrufenden Medikamenten.
3. Keine zusätzlichen Hornhauterkrankungen oder die Hornhautstruktur beeinflussende Zustände (Z.n. Operation etc.).

17 der 30 Patienten (56,7%) erhielten zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Enzym-substitutionstherapie. Dazu gehörten 12 Frauen und 5 Männer. Es trat ein Fall von Unverträglichkeitserscheinungen nach 7 Monaten Enzymersatztherapie auf. Diese äußerten sich in Form von geschwollenen Extremitäten. Die Patientin wurde im gleichen Monat nach Beendigung der Therapie untersucht. In 5 Fällen lag eine erstgradige Verwandtschaft zwischen den untersuchten Personen vor (Mutter und Tochter bzw. Sohn). In einem Fall von zweitgradiger Verwandtschaft handelte es sich um Onkel und Neffe.

Tab. 2: Übersicht der untersuchten Fabrypatienten

Patient	Ge- schlecht	Alter [Jahren]	Untersuchte Augen	Enzym- substitution	Verwandtschafts- grad
F1	w	19	-	+	Tochter von F8
F2	w	28	LA/RA	+	
F3	w	34	RA	-	
F4	w	34	RA/LA	+	
F5	w	39	RA	-	
F6	w	43	-	+	Mutter von F21
F7	w	45	LA	+	
F8	w	45	LA	+	Mutter von F1
F9	w	45	LA	-	
F10	w	46	RA	-	Tochter von F18
F11	w	48	LA	+	
F12	w	49	LA/RA	+	Mutter von F22
F13	w	50	RA	-	
F14	w	50	LA/RA	-	
F15	w	50	LA	+	
F16	w	52	RA	-	Tochter von F20
F17	w	54	LA/RA	Abgebrochen	
F18	w	63	LA/RA	+	
F19	w	64	RA	+	Mutter von F9
F20	w	65	LA/RA	+	
F21	w	75	RA	-	Mutter von F15
F22	m	20	-	+	Sohn von F6
F23	m	22	RA	-	Sohn von F11
F24	m	26	LA	+	Neffe von F28
F25	m	40	LA/RA	+	
F26	m	42	RA	-	
F27	m	42	RA	+	

F28	m	50	LA/RA	+	
F29	m	51	LA	-	Onkel von F23
F30	m	62	RA	-	

w... weiblich m... männlich RA... rechtes Auge LA... linkes Auge
 -... keine Enzymsubstitution zum Zeitpunkt der Untersuchung
 +... Enzymsubstitution zum Zeitpunkt der Untersuchung

5 Patienten (F11, F12, F19, F20, F28) wurden mehrfach im Zeitraum von einem halben Jahr bis zu 2 Jahren untersucht und im Verlauf beobachtet.

Die unterschiedlichen extraokulären Manifestationen variierten von Patient zu Patient sehr stark und werden in Abb. 3 zusammengefasst. Herzbeschwerden äußerten sich in Form von Herzgeräuschen, Herzinsuffizienz und Myokardinfarkt. Eine Nierenbeteiligung ging von grenzwertigen Nierenwerten bis hin zu Niereninsuffizienz. Unspezifischere sonstige Symptome die in den Kreis der neurologischen Beteiligung gerechnet wurden, waren: cerebrale Durchblutungsstörung, Aphasie, Tremor, Amaurosis fugax, Gleichgewichtsstörung, Schwindelattacken, Kopfschmerzen, Hemiparese, Ptosis, eingeschränkte Konzentrations- und Leistungsfähigkeit, Starre des Beines. Symptome wie gestörtes Kälte- oder Wärmeempfinden sowie Fieberschübe wurden unter dem Punkt Temperaturregulationsstörung zusammengefasst. 4 Patienten (13,3%) erwiesen sich als beschwerdefrei. Bei allen 4 Patienten handelte es sich um Frauen.

Die Altersverteilung lag zwischen 19 und 75 Jahren (Durchschnittsalter 45,1 Jahre +/- 14 Jahre).

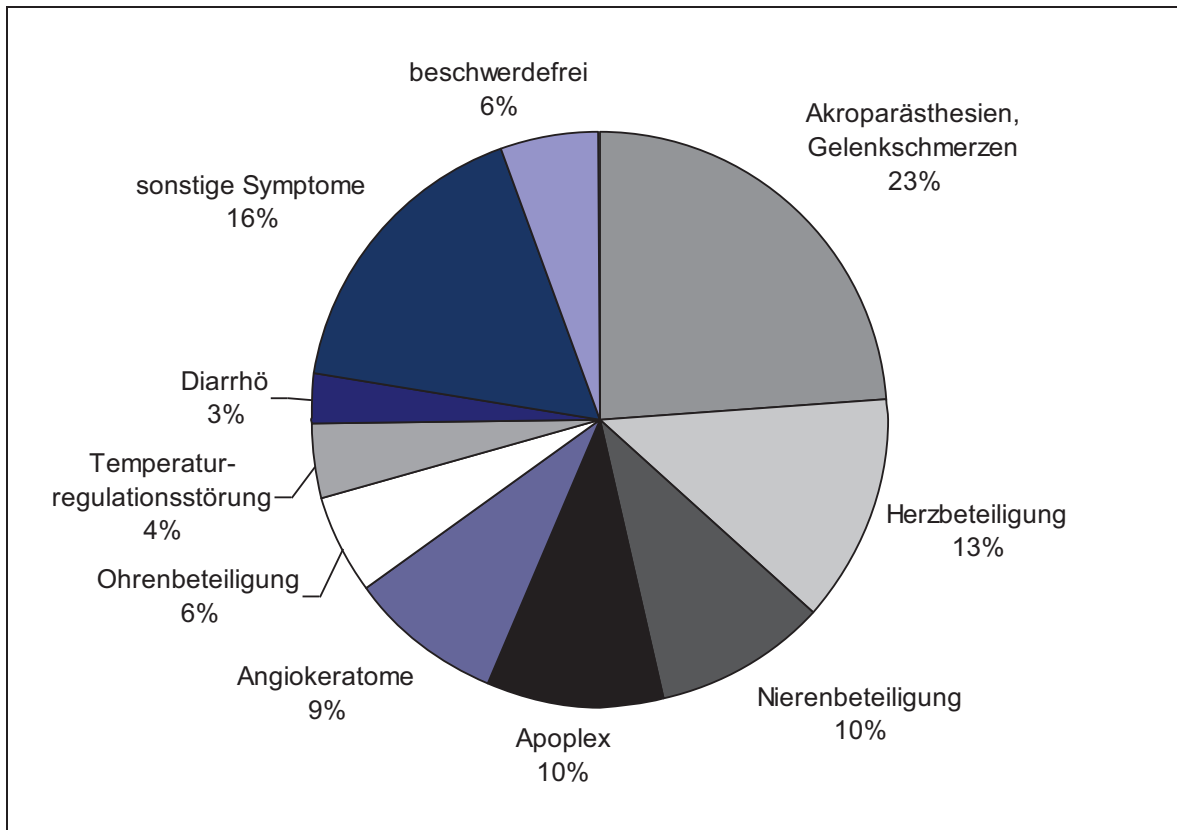


Abb.3: Häufigkeitsverteilung der extraokulären Manifestationen bei den untersuchten Fabrypatienten

2.1.2. Patienten mit Amiodarontherapie

In dieser Gruppe wurden insgesamt 18 Augen von 12 Patienten, 6 Frauen und 6 Männer, untersucht (Tab. 3). Folgende Einschlusskriterien wurden festgelegt:

1. Einnahme eines Amiodaronpräparats.
2. Vorhandensein einer, unter der Amiodaroneinnahme entstandenen, Cornea verticillata bei Ausschluss anderer Ursachen (Morbus Fabry).
3. Keine Hornhauterkrankungen bzw. Hornhautdestruktion hervorrufende Zustände.

Der Zeitraum der Amiodaroneinnahme zum Zeitpunkt der Untersuchung erstreckte sich von einem Tag nach Beginn der Medikation bis zu 20 Jahren. 2 Patienten wurden nach Beendigung der Einnahme untersucht. 2 Patienten wurden 2mal im zeitlichen Verlauf untersucht: einmal während sowie nach der Medikation und einmal einen Tag nach Beginn der Einnahme sowie 4 Wochen später. Die Altersverteilung lag zwischen 50 und 76 Jahren (Durchschnittsalter 65,7 Jahre +/- 8 Jahre).

Tab. 3: Angaben zu den Patienten mit Amiodaron-Therapie

Patient	Ge- schlecht	Alter [Jahren]	Unter- suchte Augen	Amiodaron- einnahme seit	Zeitraum der Einnahme	Zeitpunkt der Untersuchung
A1	w	56	RA	08/2006	12 Monate	07/2007
A2	w	66	RA	06/2007	1 Monat	06/07 + 07/07
A3	w	67	RA	06/2005	11 Monate	04/2006
A4	w	68	LA	05/2004	27 Monate	08/2006
A5	w	70	RA/LA	07/2005	10 Monate	04/2006
A6	w	74	RA/LA	09/01-03/04	29 Monate	06/2006
A7	m	50	RA	11/2006	0,2 Monate	11/2006
A8	m	55	RA/LA	11/05-03/06	5 Monate	04/2006
A9	m	66	RA/LA	12/2004	28 Monate	04/2006
A10	m	70	RA	1986	20 Jahre	11/2006
A11	m	70	RA/LA	04/04-04/05	13 Monate	11/04 + 04/06
A12	m	76	RA/LA	08/2002	38 Monate	10/2005

w... weiblich

m... männlich

RA... rechtes Auge

LA... linkes Auge

2.2. Methodik

2.2.1. Augenärztliche Untersuchungen und Spaltlampenmikroskopie

Die Spaltlampe erzeugt senkrecht zur Hornhautoberfläche einen optischen Schnitt, der eine bis zu 50fache Vergrößerung des Augenvorderabschnittes ermöglicht (Gullstrand 1911, Kampik und Grehn 2003, Straub et al. 1995). Bei der Untersuchung von Normalprobanden, Fabry- und Amiodaronpatienten wurde zu jedem Patienten eine Allgemein- und Augenanamnese erhoben sowie eine Visusprüfung vorgenommen. Die spaltlampenmikroskopische Untersuchung der Normalprobanden diente der Absicherung des Augenbefundes zur Vermeidung von Fehleinschätzungen. Die Fabrypatienten wurden zunächst auf das Vorhandensein einer Cornea verticillata geprüft. Weiterhin wurde die bulbäre Konjunktiva auf ampullenförmige Gefäßektasien („conjunctival sludging“ nach Orssaud et al. 2003) untersucht. Bei positivem Hornhaut- bzw. Bindehautbefund erfolgte eine Fotodokumentation. Der Augenhintergrund wurde vorwiegend zentral beurteilt bei Verzicht auf medikamentöse Mydriasis. Schließlich erfolgte die Zuordnung der Cornea verticillata von Fabry- und Amiodaronpatienten in das von Orlando et al. 1984 erstellte Gradingssystem. Orlando beschreibt 4 Stadien einer Cornea verticillata. Die frühesten Veränderungen, die auf das Vorliegen einer Cornea verticillata hinweisen, stellen sich demnach als linear angeordneter, gold-brauner Nebel oder Schatten im unteren Bereich des Pupillarrandes dar (Abb.4). Im Stadium 2 zeigen sich ausgehend von dieser Veränderung streifige Auswüchse oder auch sogenannte „cat’s whiskers“(Abb.5). Im Stadium 3 schließlich breiten sich diese feinen Ausläufer bis in das Zentrum der Hornhaut aus und bilden die charakteristische Wirbelform (Abb.8). Bei zusätzlichem Vorliegen von gold-braunen, irregulär angeordneten Sprenkeln entlang des Wirbels spricht man vom Stadium 4. Orlando setzte diese Stadien in Zusammenhang mit dem Zeitraum der Einnahme. So steigt das Stadium der Cornea verticillata mit zunehmender Einnahmedauer, wobei nicht jeder Proband das Stadium 3 erreicht und einige sich auch nach einem Jahr auf Stadium 2 festsetzen.



Abb. 4: Stadium 1 nach Orlando bei einer 63jährigen Patientin.

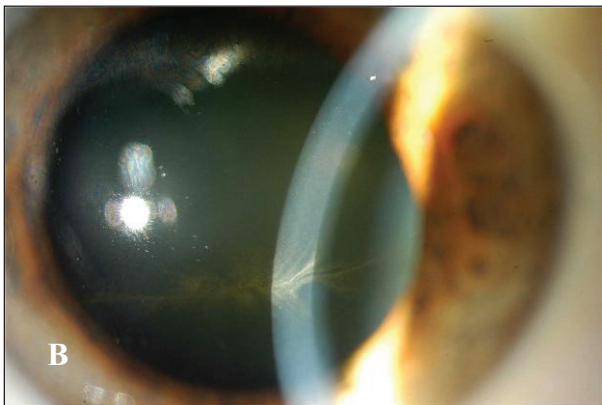


Abb. 5: Stadium 2 nach Orlando bei einer 74jährigen Patientin.

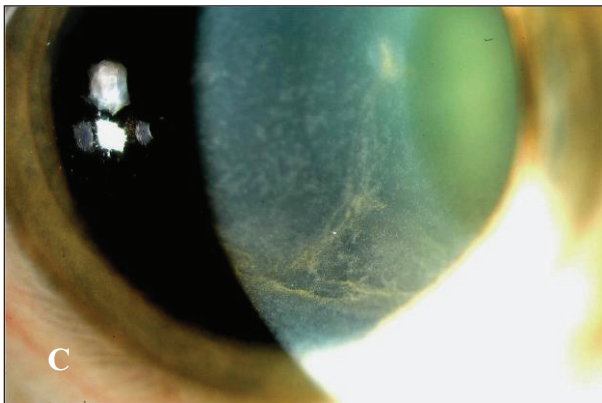


Abb. 6: Stadium 3 nach Orlando bei einem 70jährigen Patienten. Ein Stadium 4 fand sich im Patientengut dieser Studie nicht.

2.2.2. Konfokale Laser-scanning In-Vivo-Mikroskopie

Gegen Ende der 80er Jahre des 19. Jahrhunderts wurde mit der Entwicklung der ersten In-vivo konfokalen Laser scanning Mikroskope eine hoch auflösende dreidimensionale Darstellung des Augenhintergrundes auf mikrostruktureller Ebene möglich (Scheuerle und Schmidt 2004; Webb 1999).

Das Prinzip der Laser Scanning Ophthalmoskopie basiert auf der Konfokalität (Objekte mit dem gleichen Brennpunkt) des untersuchten Objektes. Zwischen einer Lichtquelle und einer Detektorfläche wird Laserlicht reflektiert und nur ein Objekt innerhalb der fokalen Ebene kann wiedergegeben werden (Guthoff et al. 2006).

Spalt-Scanning Techniken erlaubten in einem non-contact Verfahren die Abbildung cornealer Mikrostrukturen mit einer Schichtdicke von ca. $29\mu\text{m}$ (Confo-Scan 3). Um die ungleichmäßige Bildausleuchtung und die damit verbundenen Streueffekte dieser Methodiken zu umgehen, entstand in der Weiterentwicklung ein hochauflösendes Laser-Scanning-Mikroskop, das RLSM (Rostocker Laser-Scanning-Mikroskop) (Stave et. al 2002) (Abb.7).

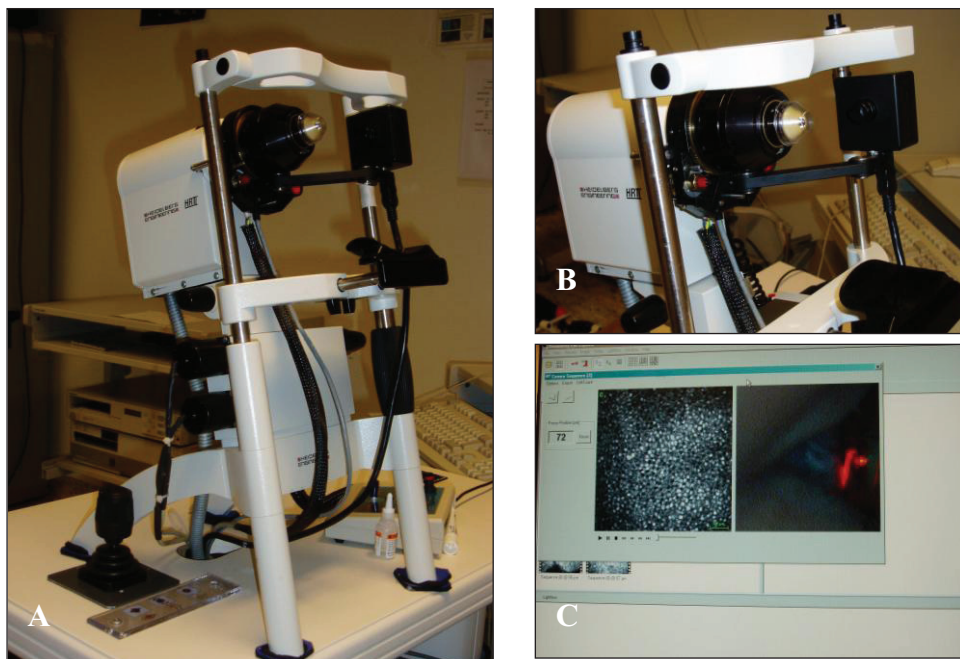


Abb. 7: A: Rostocker Laser-Scanning-Mikroskop (RLSM). B: Heidelberg-Retina-Tomograph (HRT II), Rostocker Cornea Modul (RCM) und Videokontrollsystem. C: Einzelbild einer Videosequenzaufnahme

Grundgerät für diese Weiterentwicklung war der Heidelberg Retino Tomograph (HRT). Durch den Einsatz eines Objektivadapters (Rostocker Cornea Modul/RCM) mit externem Z-Scan kann eine 400-800fache Gesamtvergrößerung der cornealen Zellstrukturen mit einer gleichmäßigen Bildausleuchtung und einem Auflösungsvermögen von ca. 7-8µm erreicht werden. Mit Hilfe der Z-Scan-Vorrichtung wird der Laserfokus definiert durch die Cornea verschoben und ermöglicht somit eine genaue Tiefenanalyse. Entsprechend der Fragestellung stehen verschiedene Immersionsobjektive zur Patientenuntersuchung zur Verfügung. Eine neben dem Objektivadapter angebrachte Kamera ermöglicht die Wiedergabe des Untersuchungsganges und damit verbunden die Kontrolle der korrekten Lokalisation des Immersionsobjektives auf dem gewünschten Augenabschnitt.

Die konfokalmikroskopische Untersuchung mit dem RLSM von Cornea, bulbärer und tarsaler Konjunktiva erfolgte bei allen Normalprobanden, Fabry- und Amiodaronpatienten dieser Studie nach dem folgenden Schema. Zur Untersuchung unseres Patientengutes verwendeten wir das Wasserimmersionsobjektives von Zeiss (63x/0.95 W, 670 nm, ∞/0; Zeiss, Jena). Zunächst wurde das zu untersuchende Auge durch Tropfanästhesie mit Proparacain 0,5% Augentropfen (Ursapharm, Saarbrücken, Deutschland) betäubt, da für dieses Verfahren ein Kontakt zwischen Patientenhornhaut und Modul nötig ist. Um die Distanz zwischen Hornhaut und Mikroskop zu überbrücken, wird eine PMMA-Kappe verwendet. Die Ankopplung zwischen cornealer Oberfläche und Hornhautmesskappe gelingt mit einer dünnen Gleitschicht aus Vidisic Gel (Bausch & Lomb/Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland), das einen ähnlichen Brechungsindex wie die Hornhaut aufweist und somit eine homogene Immersion zwischen den Strukturen darstellt.

Das HRT II/RCM liefert Bildausschnitte mit einer Größe von 400 x 400 µm. Die Befunddokumentation erfolgte über die Speicherung ausgewählter Videosequenzen. Dies ermöglichte eine detaillierte Auswertung der Einzelbilder zu einem späteren Zeitpunkt.

Analog zu dem spaltlampenmikroskopischen Gradingssystem der Cornea verticillata erfolgte eine Zuordnung der konfokalmikroskopischen Befunde in eine Stadienteilung nach Schweregraden. Jeder Fabry- und Amiodaronpatient wurde entsprechend dieser Einteilung bewertet.

Die Aufnahmen erfolgten in der zentralen Cornea (inneres Hornhautdrittel), sowie aus peripheren Hornhautbezirken (ein Sechstel der Hornhautoberfläche, etwa 1 mm vom Limbus). In jedem Bereich wurde eine Videosequenz von 100 Bildern erstellt in den Arealen bei 12.00,

3.00, 6.00 und 9.00 Uhr. Die Bilder mit einer maximalen Anzahl von Veränderungen galten dabei als repräsentativ. Für Verlaufsuntersuchungen wurden die Bilder wie folgt ausgewertet: Wenn in 50,0% der Bilder eine Änderung der Gradeinteilung um 2 Grade vorlag, wurden diese Befunde als repräsentativ für das gesamte Areal angesehen und von einer Änderung ausgegangen. Wenn in 75,0% der cornealen Bezirke (zentral oder peripher) eine Änderung zum Vorbefund aufgezeigt werden konnte, wurde von einer generellen Befundveränderung gesprochen.

Als Alternative für Verlaufsuntersuchungen wurde versucht, bei 8 der 30 Fabrypatienten das Wirbelzentrum des subepithelialen Nervenplexus als individuellen Referenzpunkt für Verlaufskontrollen zu nutzen (Patel und McGee 2005). Es wurden alle Hornhautschichten bis zur Tiefe des Endothels erfasst und aus jeder Schicht repräsentative Bilder ausgewählt (Eckard et al. 2006). Zusätzlich erfolgte bei allen 3 Patientenkollektiven wenn möglich eine konfokalmikroskopische Untersuchung der bulbären und tarsalen Konjunktiva, wobei auch hier charakteristische Bilder aus festgelegten Bezirken gewählt wurden (Abb.8).

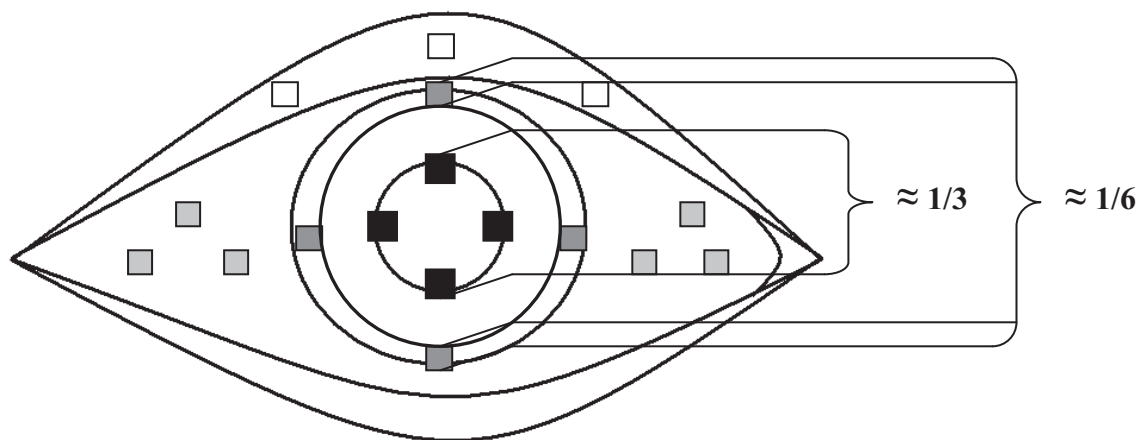


Abb. 8: ■ Aufnahmen der zentralen Hornhaut (3.00, 6.00, 9.00 und 12.00 Uhr)
 ■ Aufnahmen der peripheren Hornhaut (3.00, 6.00, 9.00 und 12.00 Uhr)
 ■ Aufnahmen der bulbären Konjunktiva (obere Bindehautregion 12.00 Uhr, mittlere Bindehautregion 3.00 und 9.00 Uhr)
 □ Aufnahmen der tarsalen Konjunktiva (nasal, medial, temporal)

2.2.3. 3-dimensionale Rekonstruktion

Um ein Verständnis über die Morphologie der cornealen Architektur zu erhalten und einen Überblick über die Lokalisation der pathologischen Veränderungen zu erstellen, wurde das Mittel der 3-dimensionalen Rekonstruktion der konfokalmikroskopischen Bilder genutzt. Da oft nur ein begrenzter Abschnitt der Hornhaut betrachtet werden kann, dient die 3-dimensionale Rekonstruktion dazu, diesen Einblick zu vergrößern und das räumliche Vorstellungsvermögen zu erweitern (Guthoff et al. 2005, Zhivov et al. 2008) (Abb.9).

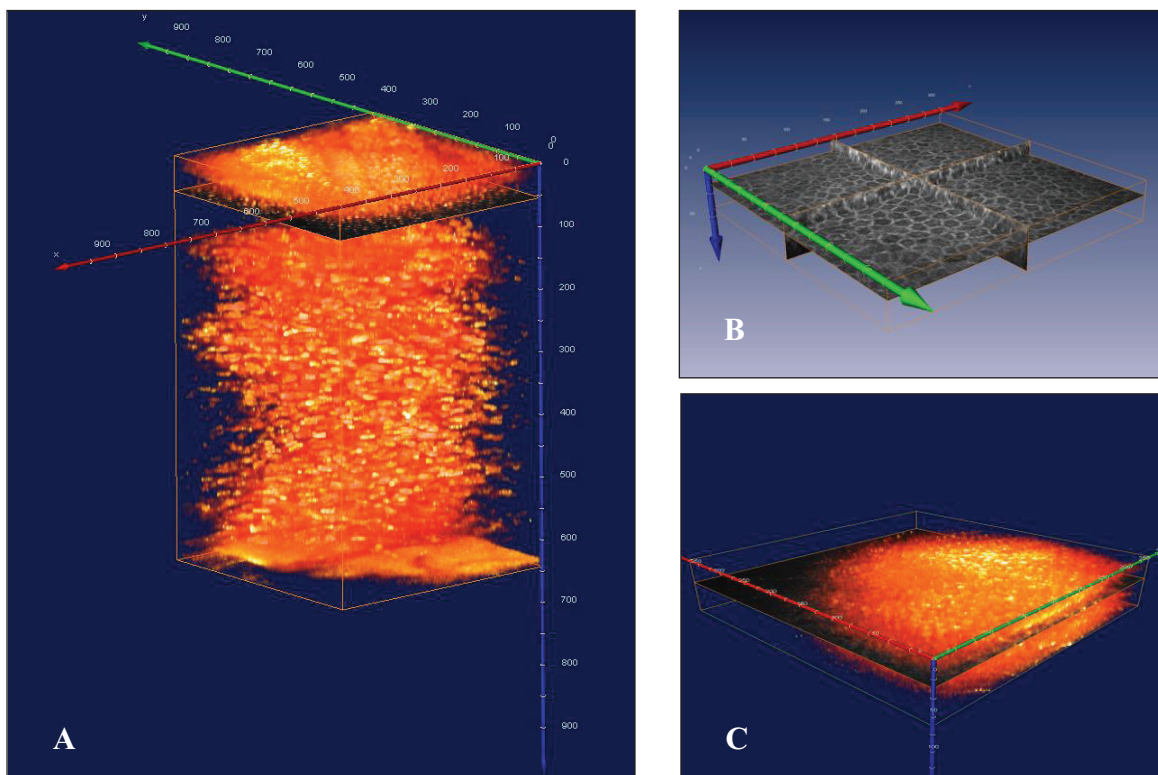


Abb.9: A: 3-dimensionale Rekonstruktion der gesamten Cornea. B+C: 3-dimensionale Rekonstruktion der cornealen Epithelschicht.

Grundlage bildet der im vorherigen Kapitel erläuterte Untersuchungsgang mittels des RLSM. Voraussetzung für die Erstellung eines 3-dimensionalen Hornhautmodells ist die gerätetypische Funktion eines Tiefenscans (sogenannten Z-Scans). Beim automatischen Durchfahren eines Hornhautvolumens (bis zur individuellen maximalen Hornhauttiefe) entlang der Z-Achse erfolgt die eingestellte Bildaquisition (z.B. bis zu 30 Bilder pro

Sekunde). Eine solche gelingt aber auch durch das Zusammensetzen manuell tiefengesteuerter Bildsequenzen. Das vorläufige Produkt sind 2-dimensionale Bildserien. Diese werden unter Verwendung des Programms ImageJ (NIH, Bethesda/Maryland, USA) konvertiert und durch das Programm Amira 3.1 (TGS, San Diego/Kalifornien, USA) zum 3-dimensionalen Modell rekonstruiert (Zhivov et al. 2006). Mit Hilfe dieses Programms werden Artefakte, Unschärfeerscheinungen oder Verwackelungen eliminiert und alle Bilder so modifiziert, dass sie in einem 3-dimensionalen Block zusammengefasst werden können. Zusätzlich können verschiedene Videos erstellt sowie Distanzen und Oberflächenbeschaffenheiten angegeben oder optische Schnitte gelegt werden.

3. ERGEBNISSE

3.1. Spaltlampenmikroskopische Ergebnisse

3.1.1. Spaltlampenmikroskopie bei Fabrypatienten und Prävalenz der Cornea verticillata

30 molekulargenetisch gesicherte Fabrypatienten konnten spaltlampenmikroskopisch untersucht werden. Insgesamt zeigte sich das spaltlampenmikroskopische Bild einer Cornea verticillata bei 16 der 30 Fabrypatienten (53,3%). Bei den 21 weiblichen Patienten trat das Phänomen 10mal (47,6%) auf. Bei den 9 männlichen Patienten fand sich die Cornea verticillata 6mal (66,7%) (Abb.10). In 4 Fällen von erstgradiger Verwandtschaft in unserem Patientengut konnte das Vorliegen einer Cornea verticillata sowohl bei der erkrankten Mutter als auch bei ihrem betroffenen Kind festgehalten werden. In einem weiteren Fall zeigten weder Mutter noch Tochter okuläre Manifestationen. Bei Verwandtschaft zweiten Grades (Onkel, Neffe) fand sich das Phänomen wiederum bei beiden Betroffenen. Nur 2 Patienten (6,7%) wiesen in der Konkunktiva bulbi Gefäßektasien (conjunctival sludging) auf. Bei beiden Patienten handelte es sich um Raucher. Retinale Veränderungen sowie eine Fabry-Cataract konnten bei keinem Patienten beobachtet werden (Tab. 4).

Tab. 4: Ophthalmologische Manifestationen bei 30 Fabrypatienten

Patient	Alter [Jahre]	Geschlecht	Grad der Cornea verticillata (Orlando)	Gefäßver- änderungen (bulbäre Konjunktiva)	Gefäßver- änderungen (Retina)	Fabry- Cataract
F1	19	w	I	-	-	-
F2	28	w	-	-	-	-
F3	34	w	-	-	-	-
F4	34	w	I	-	-	-
F5	39	w	-	-	-	-
F6	43	w	II	-	-	-
F7	45	w	-	-	-	-
F8	45	w	II	-	-	-
F9	45	w	III	-	-	-
F10	46	w	III	-	-	-
F11	48	w	-	-	-	-
F12	49	w	II	-	-	-
F13	50	w	-	-	-	-
F14	50	w	-	-	-	-
F15	50	w	-	-	-	-
F16	52	w	-	-	-	-
F17	54	w	-	-	-	-
F18	63	w	III	-	-	-
F19	64	w	III	-	-	-
F20	65	w	II	-	-	-
F21	75	w	-	-	-	-
F22	20	m	II	-	-	-
F23	22	m	II	+	-	-
F24	26	m	II	-	-	-
F25	40	m	III	-	-	-

F26	42	m	-	-	-	-
F27	42	m	-	-	-	-
F28	50	m	III	+	-	-
F29	51	m	II	-	-	-
F30	62	m	-	-	-	-

w... weiblich

m... männlich

+... Symptom vorhanden

-... Symptom nicht vorhanden

Ein Zusammenhang zwischen den extraokulären Symptomen des Morbus Fabry und der Cornea verticillata ließ sich nicht feststellen. Symptomfreie Patienten hatten zum Teil eine deutliche Cornea verticillata, während Patienten mit starken Beschwerden (Schlaganfälle, Niereninsuffizienz etc.) ophthalmologisch unauffällig waren.

Entsprechend der Stadien der Cornea verticillata nach Orlando et al. 1984 wurden die 10 weiblichen Fabrypatienten und die 6 männlichen Fabrypatienten mit Cornea verticillata den verschiedenen Schweregraden zugeordnet. Diese Stadieneinteilung bezieht sich zwar bloß auf die Amiodaron induzierte Form der Cornea verticillata, konnte aber auch auf die Fabrypatienten dieser Studie übertragen werden, da keine äußerlichen Unterschiede bestanden. Bei den 10 Frauen fand sich 2mal (20,0%) das Stadium 1, 4mal (40,0%) das Stadium 2 und 4mal (40,0%) das Stadium 3. Bei den 6 Männern trat das Stadium 1 gar nicht auf. Dafür lag 4mal (66,7%) das Stadium 2 und 2mal (33,3%) das Stadium 3 vor. Diese Werte werden noch einmal in Abb. 10 veranschaulicht.

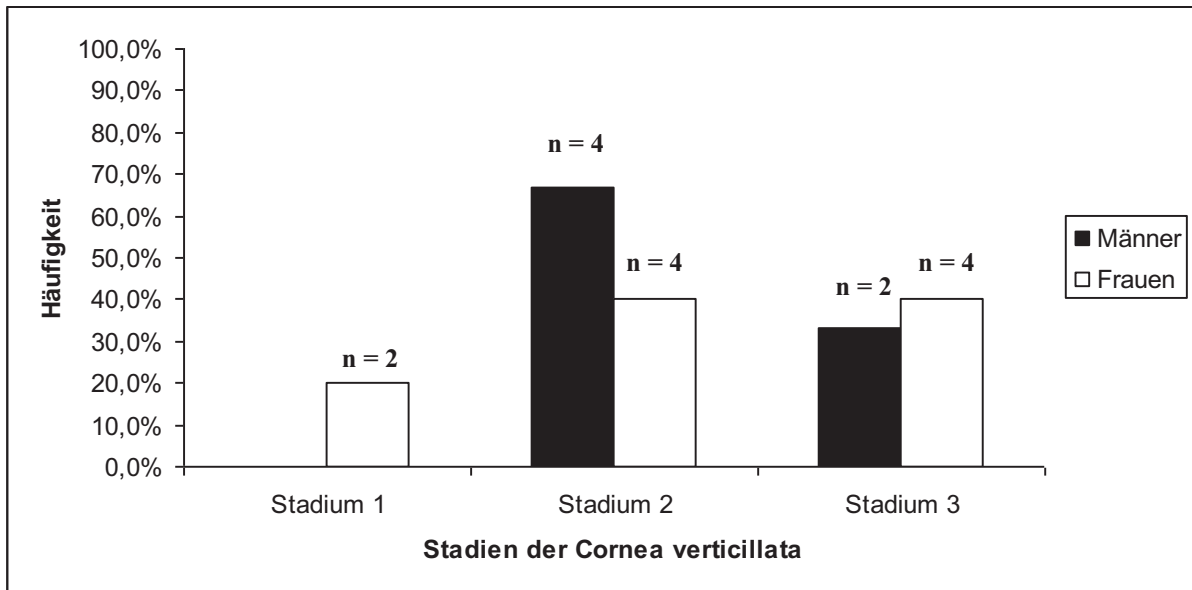


Abb. 10: Häufigkeitsverteilung der Stadien der Cornea verticillata nach Orlando et al. bei weiblichen und männlichen Fabrypatienten

3.1.2. Spaltlampenmikroskopie bei Amiodaronpatienten

11 von 12 Amiodaronpatienten (91,7%) hatten eine spaltlampenmikroskopisch nachweisbare Cornea verticillata. Ein Patient wies eine Woche nach Beginn der Einnahme des Medikamentes spaltlampenmikroskopisch keine Veränderungen auf, wobei sich konfokalmikroskopisch pathologische Befunde ergaben. Deshalb wird auf diesen Patienten hier nicht eingegangen werden. Die genauen Zeiträume der Bildung und Rückbildung cornealer Veränderungen sollen in einem folgenden Kapitel diskutiert werden.

Eine Unterscheidung in männliche und weibliche Patienten erfolgte nicht, da es sich nicht um eine X-chromosomale Krankheit, sondern um einen medikamenteninduzierten Prozess handelt. Dieser weist zwar interindividuelle, aber keine geschlechtsspezifischen Unterschiede auf.

Auch hier erfolgte eine Zuordnung der Spaltlampenbefunde in das Stadiensystem von Orlando. 2 von 11 Amiodaronpatienten (18,2%) zeigten das Stadium 1. 2 weitere Patienten (18,2%) zeigten das Stadium 2. Bei 7 Patienten (63,6%) lag das Stadium 3 vor (Abb. 11).

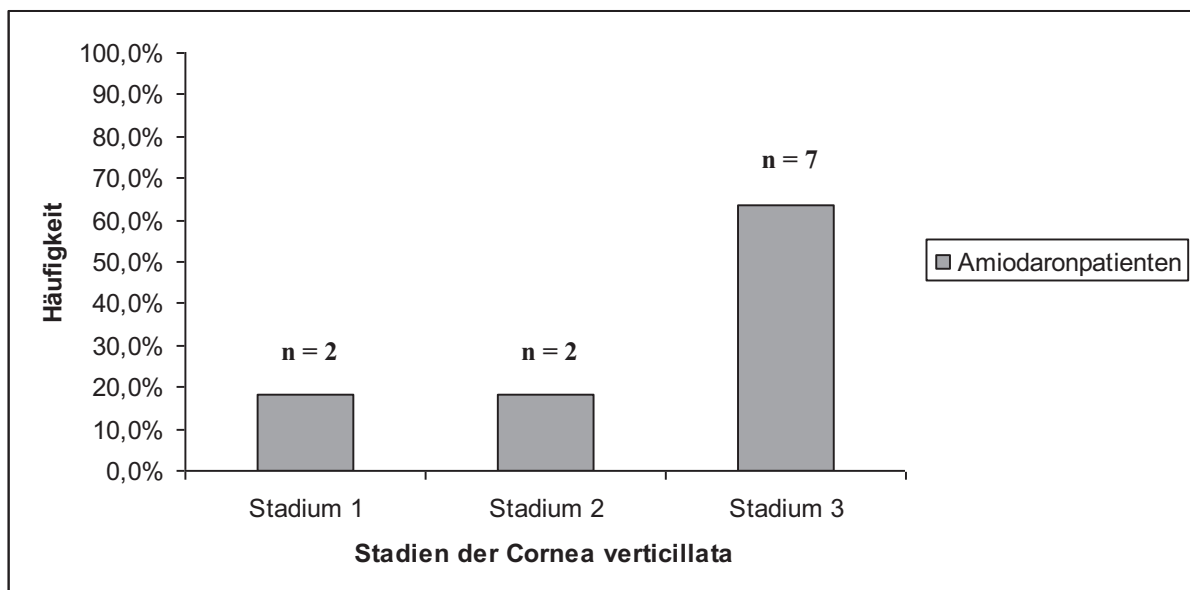


Abb. 11: Häufigkeitsverteilung der Stadien der Cornea verticillata nach Orlando bei Amiodaronpatienten

3.2. Konfokalmikroskopischer Befund der Hornhaut eines Normalprobanden

Die Hornhaut wird typischerweise in Epithel, Stroma und Endothel gegliedert (Abb.12). Das Epithel besteht aus mehrschichtig unverhorntem Plattenepithel und ist etwa 70µm dick. Es wird weiterhin unterteilt in Superficialschicht, Intermediärschicht und Basalzellschicht. Die Superficialzellen werden in kontinuierlichen Umbauprozessen abgestoßen und durch die Intermediärzellen ersetzt. Die Grenze zwischen Epithel und Stroma bildet die Bowman-Membran. Diese ist ca. 8-14µm dick, zellfrei und besteht aus sehr dünnen kollagenen Fibrillen und proteoglycanreicher Grundsubstanz. Das Stroma selbst bildet mit ungefähr 500µm nahezu 90% des gesamten Hornhautvolumens. In der Grundsubstanz aus lamellenartig angeordneten Kollagenfibrillen und Glycosaminglycanen befinden sich die verzweigte spezialisierte Fibroblasten mit ihren Ausläufern, die Keratozyten. Eine Unterteilung erfolgt in anteriores, mittleres und posteriores Stroma. Daran schließt sich, getrennt durch die Descement-Membran (ca. 5-10µm dick), das Endothel, eine einlagige Zellschicht, mit 4-6µm Dicke an. Es ist nicht regenerationsfähig und Defekte werden durch Zellvergrößerung und Migration gedeckt (Kühnel 2002, Lang 2004).

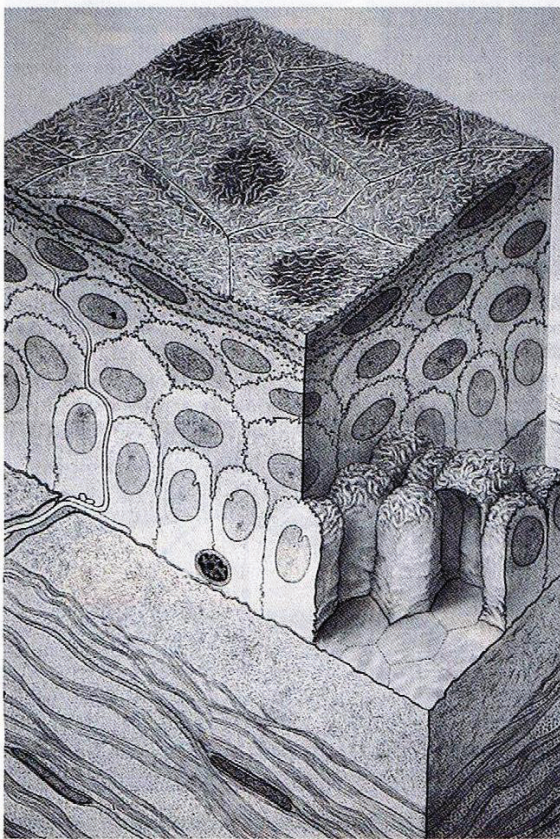


Abb.12: Schematische Darstellung der oberen Hornhautabschnitte. Von oben nach unten: Superficialschicht mit Mikrovilli, Intermediärschicht, Basalschicht, Bowman-Membran und anteriores Stroma (aus Guthoff et al. 1999)

Mit dem RLSM können nahezu alle Schichten detailliert wiedergegeben werden (Abb.13).

Von den Superficialzellen (Durchmesser ca. $50\mu\text{m}$) sieht man vor allem das Zytoplasma und den Zellkern. Sie zeigen sich in teils unterschiedlicher Reflektivität, was durch die Zellabstoßungsprozesse bedingt ist.

Die Intermediärzellen (Durchmesser ca. $20\mu\text{m}$) werden aufgrund ihrer polygonalen Form auch als Flügelzellen bezeichnet und sind eher regelmäßig angeordnet. Im Gegensatz zu den Superficialzellen sind deutliche Zellgrenzen erkennbar, während die Zellen selbst sich aufgrund ihrer niedrigeren Reflektivität dunkel darstellen. Ihr Kern ist meist nicht zu erkennen.

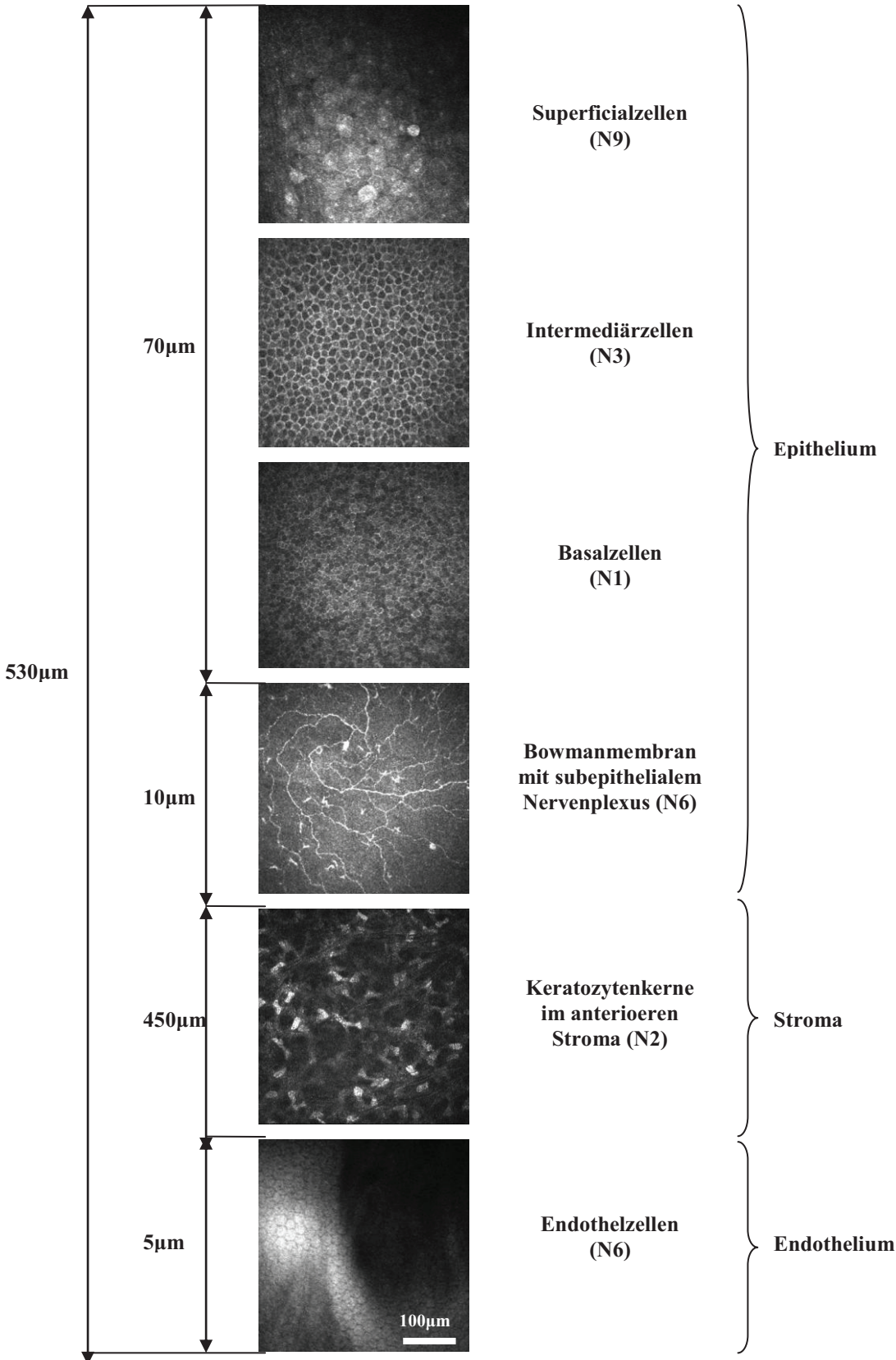
Die Basalzellen (Durchmesser ca. $10\mu\text{m}$) werden durch ein heterotrophes, „buntes“ Zellbild gekennzeichnet. Die Zellen sind im Vergleich zu den Intermediärzellen weniger scharf begrenzt, man kann jedoch einen schmalen weißen Randsaum erkennen. Die Zelldichte ist sehr hoch. Das bunte Zellbild ist durch die unterschiedliche Reflektivität der Zellen bedingt.

Da die Bowman-Membran zellfrei ist, erscheint sie als strukturlose schwarze Fläche. Zu erkennen ist die Ebene der Grenzmembran an den, durch sie hindurchlaufenden, Nervenfasern des basalen epithelialen sowie subepithelialen Nervenplexus, die zum Teil von Langerhanszellen umgeben sind (Abb. 13). Die komplexen epithelialen und stromalen Verzweigungen gehen aus dem Nervus ophthalmicus hervor und innervieren in Form von 30-60 nicht myelinisierten Ziliarnerven die Hornhaut. Mit Hilfe des konfokalen Mikroskops können sie in vivo untersucht werden. Sie verändern sich in ihrem Verlauf vom Stroma bis ins Epithel. Im tiefen Stroma konnten keine Nervenfasern nachgewiesen werden. Ab dem mittleren Stroma lassen sich erste Fasern in der Dicke von $2-10\mu\text{m}$ darstellen. Ihr Aussehen ähnelt dem von Haarschäften und sie weisen eine glatte Oberfläche auf. Sie erreichen die Bowman-Membran auf unterschiedliche Weise: direkt, sie penetrierend oder sich vor ihr verzweigend. Die Verzweigungen bilden dann die wirbelförmige Struktur des subepithelialen Nervenplexus. Ein fester Punkt auf der Hornhaut, den man bei jedem Menschen wieder finden kann und im Fall der Fabry-Diagnostik vielleicht sogar als Bezugspunkt dienen könnte. Nach Penetration der Bowman-Membran knicken die stromalen Nerven rechtwinklig ab und weisen einen Verlauf parallel zur Grenzmembran auf. Man spricht jetzt von ihnen als basaler epithelialer Plexus und ihre Struktur, die zuvor glatt begrenzt war, wirkt jetzt „perlschnurartig“, granulär. Oft finden sich im Bereich der Nervenfasern Y-förmige Langerhanszellen. Ihre Anzahl ist individuell sehr unterschiedlich.

Im Stroma selbst bilden die irregulär geformten Kerne der Keratozyten neben den Nervenfasern die einzigen hyperreflektierenden Strukturen. Sie stellen Streulichtquellen für das konfokale Mikroskop dar. Die Keratozyten selbst, ihr Zytoplasma und ihre verzweigten Ausläufer sind nicht zu erkennen. Ihre Dichte variiert in den einzelnen Stromabschnitten und nimmt von anterior nach posterior ab.

An das Stroma schließt sich das Endothel an. Die Descementmembran kann nicht dargestellt werden. Die Endothelzellen (Durchmesser ca. 20 μ m) sind hier deutlich zu erkennen. Ihre polygonale Form lässt sich aufgrund ihres hellen Zytoplasmas und der dunklen Zellgrenzen gut darstellen. Sie sind regelmäßig angeordnet, aber nicht immer sichtbar.

Abb. 13: Schematische Darstellung der cornealen Zellschichten mit Hilfe des RLSM



3.3 Konfokalmikroskopische Befunde der Hornhaut bei Morbus Fabry

3.3.1. Epithel

27 der Fabrypatienten wurden konfokalmikroskopisch untersucht. Bei den 3 verbleibenden Patienten (F1, F6, F22) konnte die Untersuchung aus Gründen der Compliance nicht durchgeführt werden. Diese Patienten werden aus den konfokalmikroskopischen Betrachtungen ausgeschlossen, gingen allerdings in die Prävalenzbetrachtungen und spaltlampenmikroskopischen Ergebnisse ein.

Ist die für den Morbus Fabry typische ophthalmologische Manifestation der Cornea verticillata spaltlampenmikroskopisch nicht nachweisbar, zeigt sich konfokalmikroskopisch die Epithelmorphologie eines Normalprobanden. Bei Vorliegen einer Cornea verticillata treten im superficialen und intermediären Hornhautepithel ebenfalls keine Unterschiede zum Normalprobandengut auf.

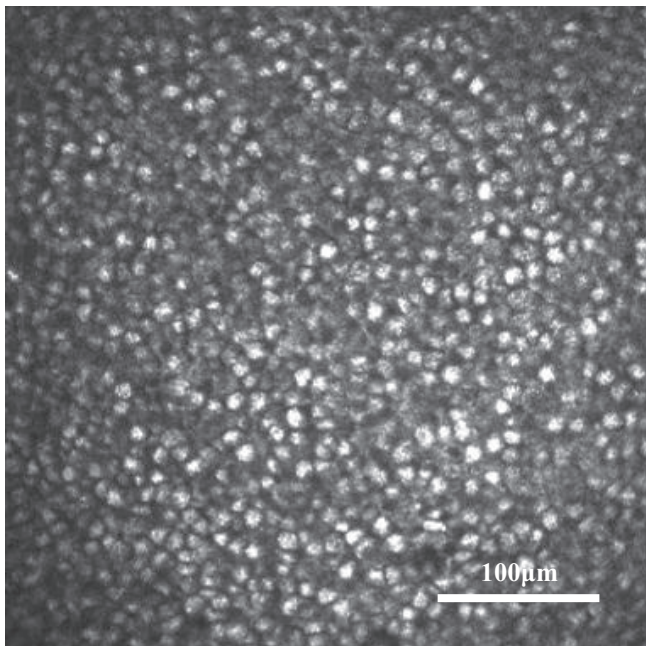


Abb.14: Basalzellen eines 22jährigen Fabrypatienten (F23).

Die Basalzellschicht ist Hauptträger der mikrostrukturellen Veränderungen. Die Einlagerungen des Stoffwechselabbauproduktes Gb₃ verursachen die enorme Reflektivität der Basalzellen, wodurch sie uns gleichmäßig hell oder weiß erscheinen, während die umliegenden Strukturen dunkel wirken. Die Einlagerungen können in unterschiedlicher

Intensität vorkommen. Sind die Einlagerungen flächig über den Bildausschnitt verteilt, kann vergleichend das Bild eines Sternenhimmels herangezogen werden (Abb. 14).

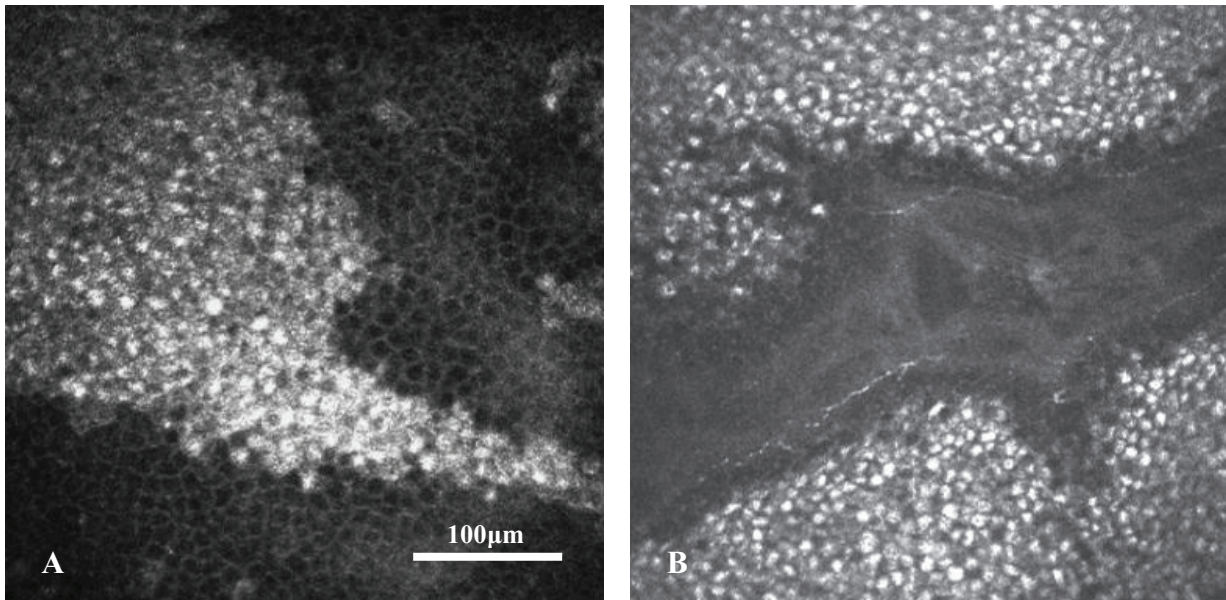


Abb.15: A: Inselförmige, hyperreflektive Basalzelleinlagerungen mit durchscheinenden Intermediärzellen einer 46jährigen Fabrypatientin (F10). B: Durchscheinende Bowman-Membran bei einem 26jährigem Fabrypatienten (F24).

Zum Teil treten Inseln von hyperreflektiven Zellen auf dunklem Hintergrund oder zwischen Intermediärzellen hervor. In diesem Hintergrund können auch Teile der Bowman-Membran bzw. Nervenfasern durchscheinen, wodurch sich ein unruhiges, verwaschenes Zellbild ergibt (Abb. 15).

Eine Unterscheidung zwischen weiblichen heterozygoten und männlichen hemizygoten Merkmalsträgern fällt schwer. Zum Teil treten eine gut abgrenzbare und eine unscharf begrenzte, eher verschwommene Einlagerungsform auf. Bei Männern liegt vorwiegend eine gut abgrenzbare Form vor (66,7%), bei Frauen hingegen die unscharf begrenzte Form (80%). (Abb. 16) Mittels des Fisher's exact test konnte keine Signifikanz dieser Ergebnisse nachgewiesen werden ($p=1,00$).

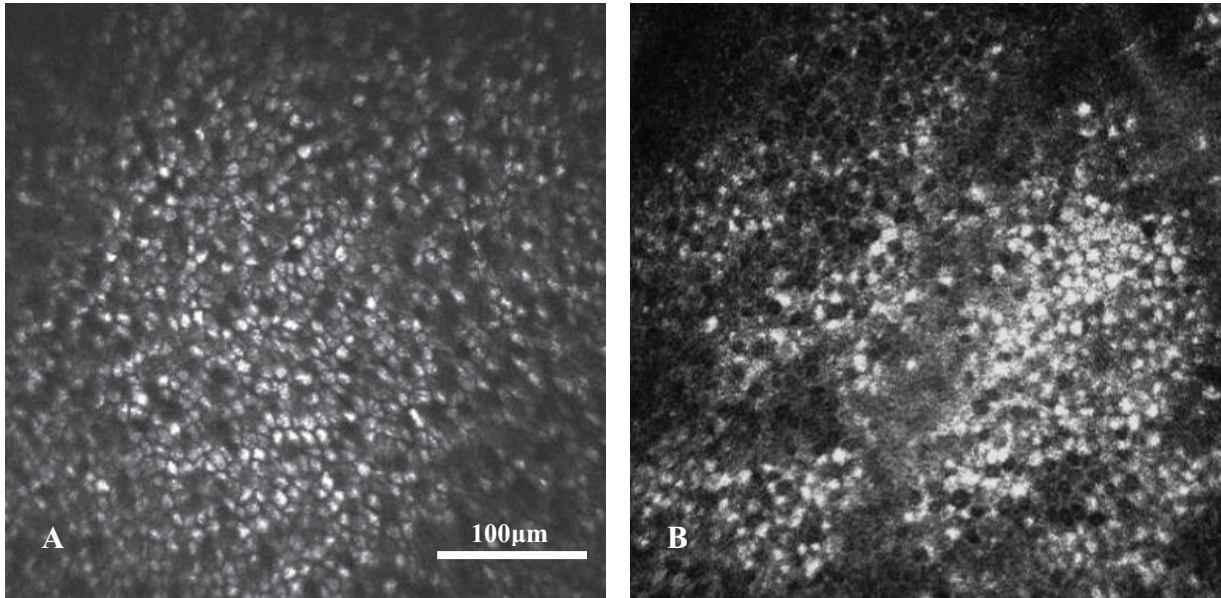


Abb. 16: A: Scharf begrenzte Einlagerungsform bei einem männlich hemizygoten Merkmalsträger (F27). B: Unscharf, verwaschene Ablagerungsform bei einer weiblich heterozygoten Merkmalsträgerin (F18).

3.3.2. Stroma

Stromale Veränderungen traten bei insgesamt 11 der 27 konfokalmikroskopisch untersuchten Fabrypatienten (40,7%) auf, darunter bei 9 der 19 Frauen (47,4%) und bei 4 der 8 Männer (50,0%). Nur 3 dieser 9 betroffenen Frauen (33,3%) wiesen das spaltlampenmikroskopische Bild einer Cornea verticillata auf und 2 der 4 (50,0%) Männer. Stromale Veränderungen imponieren als um die Keratozytenkerne liegende, weiße Punkte. Sie lassen sich keiner bestimmten Struktur zuordnen und zeigen Schwankungen in ihrer Intensität. Diese microdots finden sich ebenfalls im Normalprobandengut (insgesamt 40% der Normalprobanden: Männer 3/5, Frauen 1/5). Alle diese Patienten waren bis auf eine Ausnahme (43-jähriger, männlicher Proband) über 70 Jahre alt. Anamnestisch waren keine Augenerkrankungen bekannt. Im vorderen Stroma (Abb.17), in welchem sich eine hohe Dichte an Keratozytenkernen zeigt, erscheinen auch die microdots in ihrer stärksten Ausprägung. Es reicht bis in einer Tiefe von ca. 150µm. Das mittlere Stroma (Abb.18) nimmt den größten Volumenanteil ein. Hier sind vereinzelt noch microdots zu finden. Die Zahl der kleinen Akkumulationen verliert sich mit zunehmender Tiefe. Im posterioren Stroma (Abb.19), das an die Descemet-Membran grenzt, kommen keine microdots mehr zur Darstellung. Es beginnt ab einer Tiefe von ca. 380 bis 400µm. Die tieferen stromalen Abschnitte zeigen eine normale Zelldichte, Reflektivität und Morphologie.

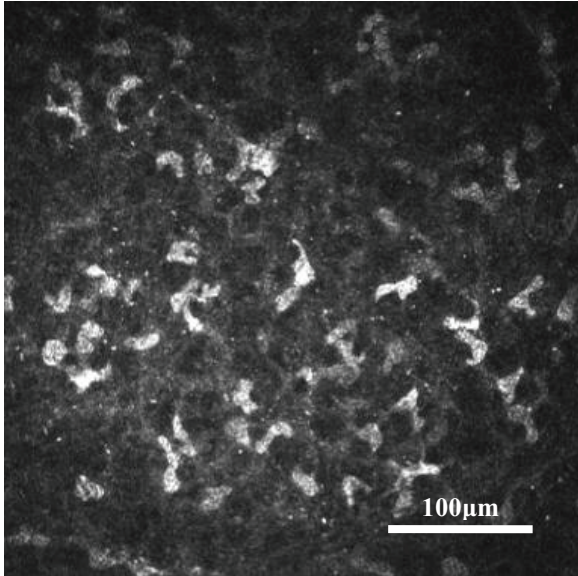


Abb. 17: Hyperreflektive Keratoytenkerne im anterioren Stroma einer 52jährigen Fabrypatientin (F16). Zwischen den Kernen finden sich Akkumulationen von microdots.

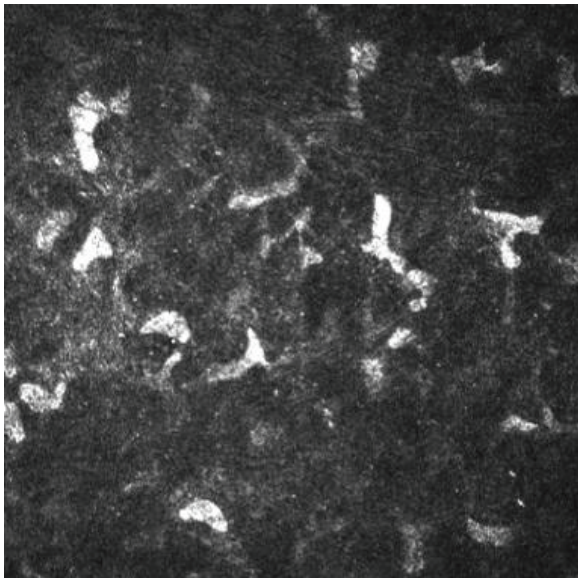


Abb. 18: Keratozytenkerne im mittleren Stroma einer 54jährigen Fabrypatientin (F17). Die Akkumulationen von microdots verlieren sich zunehmend.

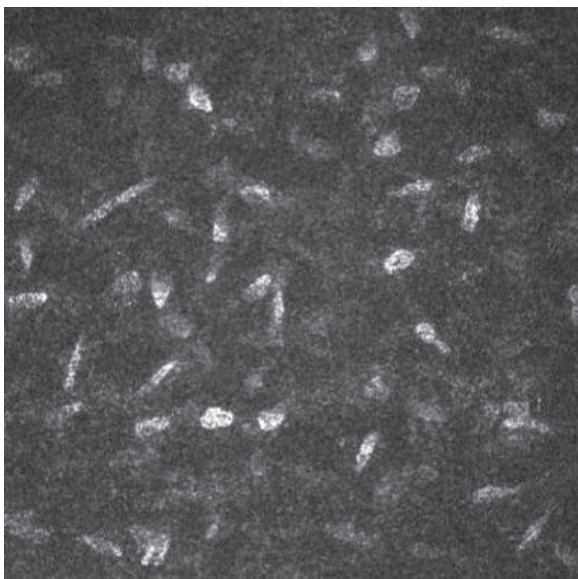


Abb. 19: Posteriores Stroma mit normaler Zelldichte, Reflektivität und Morphologie der gleichen Patientin. Keine microdots mehr vorhanden.

3.3.3. Endothel

Im Endothel wurden keine pathognomonischen Veränderungen gefunden (Abb.20). Sowohl bei der Morbus Fabry assoziierten als auch bei der Amiodaron induzierten Form der Cornea verticillata zeigte sich eine normale Reflektivität und Zellmorphologie. Generelle Veränderungen, die abgesehen von der Cornea verticillata, auf einen Morbus Fabry hinweisen könnten, existieren im Endothel nicht. Das Endothel, als am tiefsten lokalisierte Schicht der Hornhaut ist nicht regenerationsfähig und seine Bedeutung liegt vor allem in der Transparenz der Hornhaut, die u.a. auf der Regulierung des Wassergehalts im Stroma beruht. Die Endothelzelldichte nimmt mit zunehmendem Alter ab, wodurch dessen Funktion altersbedingt eingeschränkt wird und Hornhautepithel- und Stroma ödematös werden können.

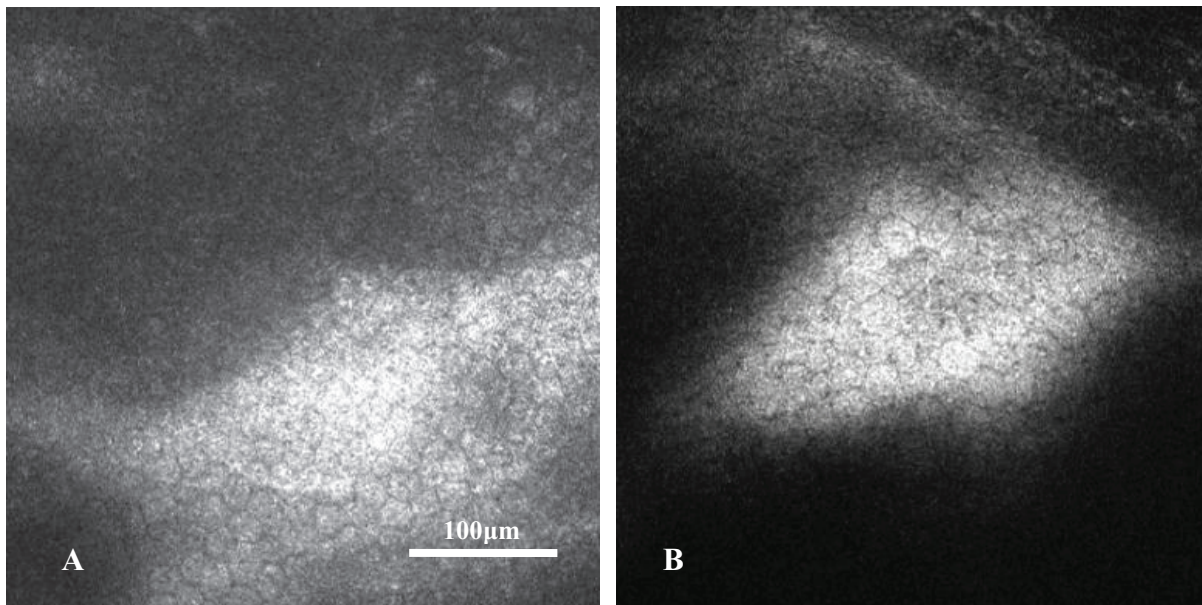


Abb. 20: A: Endothelzellen eines 22jährigen Fabrypatientens (F23) mit altersentsprechender Zelldichte- und Morphologie. B: Endothelzellen einer 52jährigen Fabrypatientin (F16). Endothelzelldichte hat im Vergleich abgenommen. Dabei handelt es sich um einen physiologischen Vorgang.

3.3.4. Konfokalmikroskopische Stadieneinteilung der basalepithelialen Veränderungen

Entsprechend der spaltlampenmikroskopischen Stadieneinteilung nach Orlando wurde in dieser Studie eine Stadieneinteilung der konfokalmikroskopischen Schweregrade der Veränderungen in der Basalzellschicht erstellt. Diese ist Hauptträger der Cornea verticillata assoziierten Manifestationen auf mikrostruktureller Ebene und eignet sich daher am besten. Die Bilder wurden nach dem unter 2.2.2 erläuterten Prinzip erstellt (siehe auch Abb.8). Das Stadium, welches in 50,0% der Bilder in 75,0% der untersuchten Areale auftrat, wurde als repräsentativ angesehen.

Konfokalmikroskopisch lässt sich ein Grad 0 bis 4 der Cornea verticillata unterscheiden (Abb.21-25). Grad 0 beschreibt den physiologischen Zustand. Es finden sich normale Basalzellen ohne hyperreflektive Veränderungen. Um die Stadien unterscheiden zu können, wurden die einzelnen Befunde Prozentwerten zugeordnet. Grad 1: < 25% hyperreflektive Zellen. Grad 2: 25-50% hyperreflektive Zellen. Grad 3: 50-75% hyperreflektive Zellen. Im Grad 4 ist eine massive Einlagerungsintensität erreicht und nahezu jede Zelle erscheint hyperreflektiv (>75% hyperreflektive Zellen).

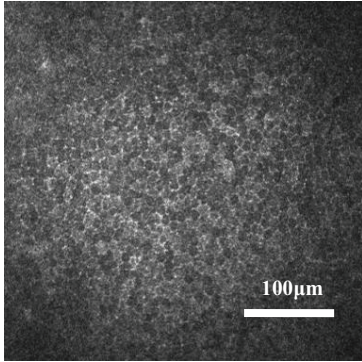


Abb. 21: Grad 0. Keine Cornea verticillata. Normale Basalzellen.

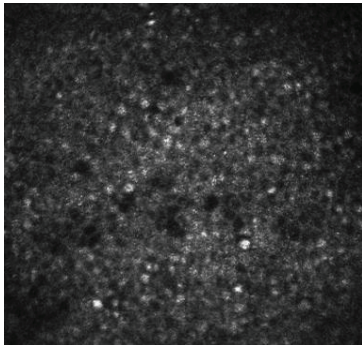


Abb. 22: Grad 1. Vereinzelte hyperreflektive Zellen in der Basalzellschicht.
Anteil hyperreflektiver Zellen < 25%

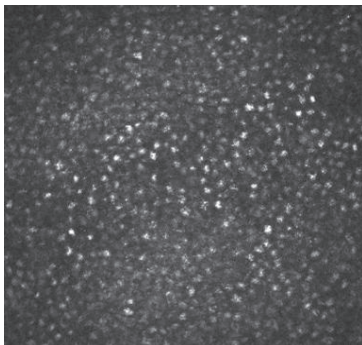


Abb. 23: Grad 2. Vermehrt hyperreflektive Zellen in der Basalzellschicht.
Anteil hyperreflektiver Zellen 25-50%

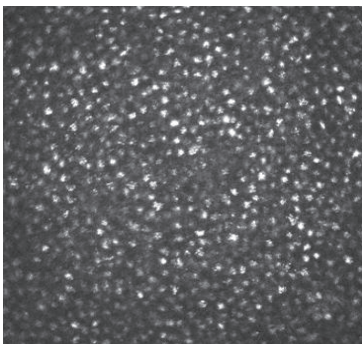


Abb. 24: Grad 3. Starke Akkumulation von hyperreflektiven Zellen in der Basalzellschicht.
Anteil hyperreflektiver Zellen 50-75%

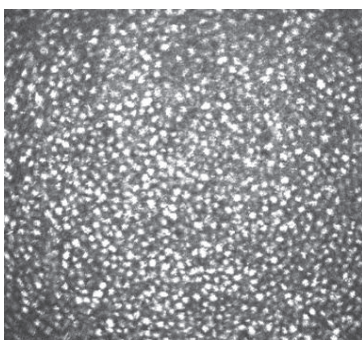


Abb. 25: Grad 4. Massive Einlagerungsintensität.
Anteil hyperreflektiver Zellen > 75%

Auch hier erfolgte eine Zuordnung der weiblichen und männlichen Fabrypatienten in die erstellte Stadieneinteilung. Grad 0 entspricht der Anzahl von Patienten ohne Cornea verticillata, denn in diesem Fall fanden sich auch keine konfokalmikroskopischen Veränderungen. Bei den 8 konfokalmikroskopisch untersuchten Frauen mit Cornea verticillata fand sich 2mal ein Grad 1 (25,0%), 2mal ein Grad 2 (25,0%) und 4mal ein Grad 3 (50,0%). Bei den 5 konfokalmikroskopisch untersuchten Männern mit Cornea verticillata trat der Grad 1 und 2 gar nicht auf. Es lag 4mal ein Grad 3 (80,0%) und einmal ein Grad 4 (20,0%) vor (Abb.26).

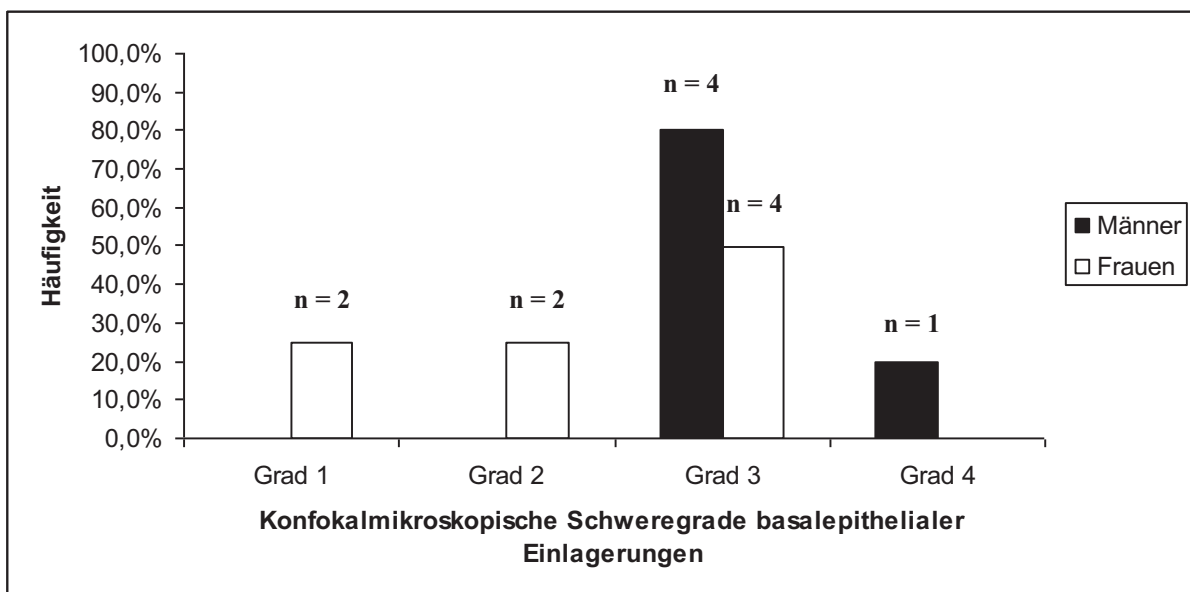


Abb. 26: Häufigkeitsverteilung der Schweregrade basalepithelialer Einlagerungen bei männlichen und weiblichen Fabrypatienten.

3.3.5. 3-dimensionale Rekonstruktion der Hornhautveränderungen

Die 3-dimensionale Rekonstruktion der Hornhaut von Fabrypatienten ermöglicht eine Einschätzung der Tiefenlokalisierung von cornealen Veränderungen und liefert eine Zusammenfassung der Befunde. Wie aus Abb. 27 ersichtlich, sind die hyperreflektiven Einlagerungen auf die Ebene der Basalzellschicht in einer Tiefe von ca. 40-70 μm begrenzt. Das sich daran anschließende anteriore Stroma erstreckt sich bis in eine Tiefe von ungefähr 150 μm . Hier werden vereinzelte, zwischen dem Keratozytennetzwerk liegende microdots sichtbar, die sich bis in posteriore Stroma hinein (Tiefe ca. 450 μm) verlieren. Diese sind nicht immer vorhanden und treten zum Teil auch bei Abwesenheit von basalepithelialen Hyperreflektivitäten auf. Das Endothel, welches frei von fabryspezifischen Veränderungen ist, deutet sich als dünne Schicht hell reflektierender Zellen am Boden der 3-dimensionalen Rekonstruktion an.

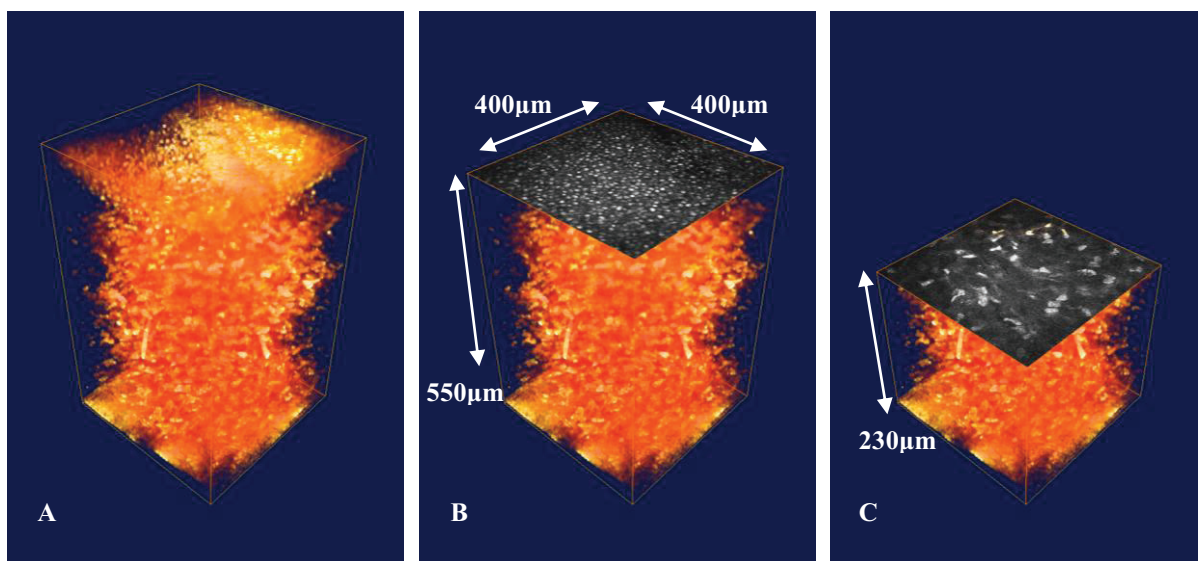


Abb. 27: A: 3-dimensionale Rekonstruktion der Hornhaut eines Fabrypatienten. B: 3-dimensionale Rekonstruktion mit Schnittebene im Bereich der basalepithelialen Einlagerungen. C: Schnittebene im Bereich des zentralen Stromas.

3.4. Konfokalmikroskopische Befunde in der Bindehaut von Fabrypatienten

3.4.1. Bulbäre Konjunktiva

Die bulbäre Konjunktiva ist eine gefäßführende, transparente Schleimhautschicht, die am Limbus corneae haftet und die Sklera leicht verschieblich überzieht. Sie stellt unter anderem eine Gleitschicht dar und dient dem Schutz und der Abwehr von Krankheitserregern. Sie besteht aus mehrschichtigem Plattenepithel, in welchem einige sekretorische Zellen (Becherzellen) zur Darstellung kommen. Im tiefer gelegenen Anteil der bulbären Bindehaut befindet sich die Lamina propria aus gitterartig angeordneten Bindegewebsfasern. Unter Verwendung des RLSM sind keine Unterschiede zum Normalprobandengut in der bulbären Konjunktiva von Fabrypatienten zu finden. Die Untersuchungen erfolgten nach dem in Abb. 8 dargestellten Prinzip. Es sind dunkler erscheinende Zellkörper und helle Zellgrenzen zu erkennen. Zum Teil kommen auch die Zellkerne als helle Punkte zur Darstellung (Abb.28). Hierbei muss auf die Abgrenzung zu pathognomonisch hyperreflektiven Zellen geachtet werden. Die Differenzierung von sekretorischen Zellen gelingt anhand deren Größe und ovaler Form. Sie sind deutlich größer als Epithelzellen und weisen eine variable Binnenstruktur mit Hell-dunkel-Muster auf. Sehr gut zu erkennen sind kleine Blutgefäße, die in Längs- und auch Querrichtung abgebildet werden können. Zwischen den dunklen, geschichteten Zellwänden sieht man in der Videosequenzaufnahme kleine, helle Blutzellen fließen (Abb.29). Dabei kann es sich um Erythrozyten (Durchmesser 7µm) oder Leukozytenformen (Granulozyten <10µm, Monozyten ca. 20µm, Makrophagen 12-15µm, Lymphozyten 10-12µm) handeln. Im tieferen Abschnitt der bulbären Konjunktiva kommen deutlich die hellen Bindegewebsfasern auf dunklem Untergrund der Lamina propria zur Darstellung (Abb.30).

In der bulbären Konjunktiva von Fabrypatienten fanden sich keine Unterschiede zum Normalprobandengut. Es traten keine pathognomonischen Veränderungen auf.

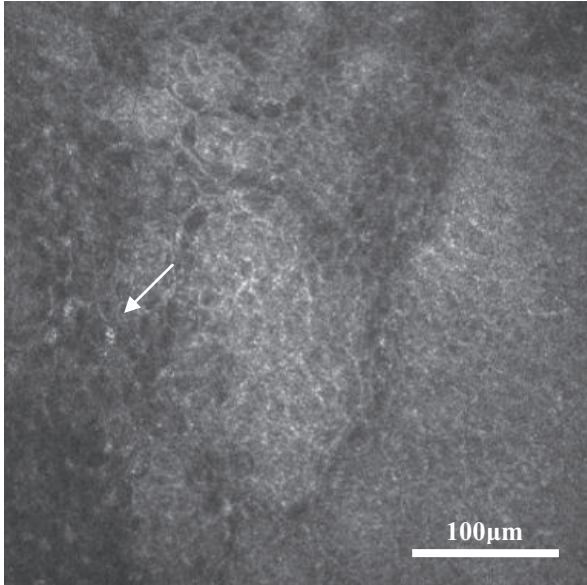


Abb. 28: Konjunktivale Epithelzellen mit zum Teil hyperreflektiven Zellkernen eines 51jährigen Fabrypatientens (F29) (Pfeil).

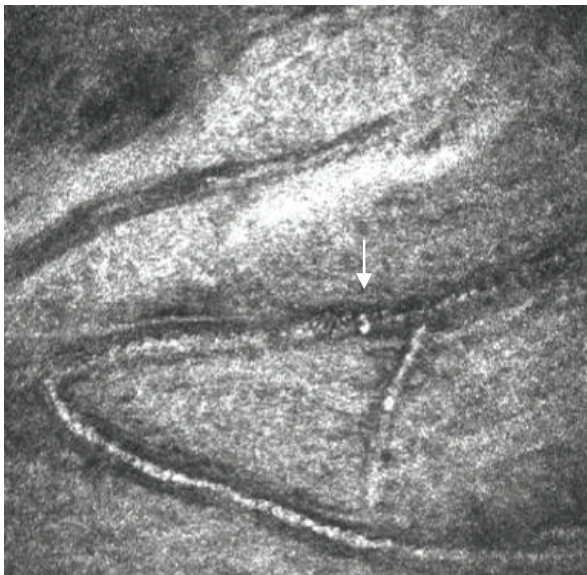


Abb. 29: Bindehautgefäß einer 63jährigen Fabrypatientin (F18). In dessen Lumen ist vermutlich ein Monozyt (anhand des Zelldurchmessers von ca. 20µm) zu erkennen (Pfeil).

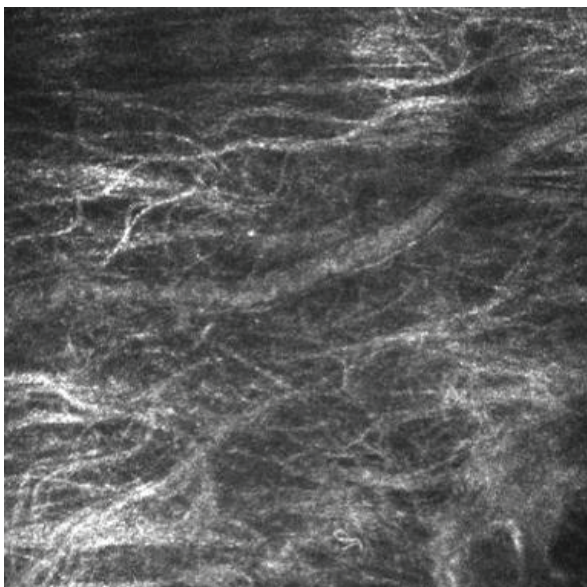


Abb. 30: Bindegewebslamellen der Lamina propria einer 64jährigen Fabrypatientin (F19).

3.4.2. Tarsale Konjunktiva

Die tarsale Konjunktiva bedeckt die Innenseite der Lider und ist fest mit ihnen verbunden. Sie geht an der konjunktivalen Fornix in die bulbäre Konjunktiva über. Der Konjunktivalsack, der sich aus beiden Schleimhautoberflächen ergibt, ist für den reibungslosen Ablauf des Lidschlusses und der Augenbewegungen verantwortlich. Die Konjunktiven tragen somit wesentlich zur Befeuchtung der Augenoberfläche und Stabilisierung des Tränenfilms bei. Dies dient der Aufrechterhaltung der Hornhautfunktionalität.

Im Gegensatz zur bulbären Konjunktiva besteht sie aus 2 bis 3 Schichten Zylinderepithel, einer aus Papillen aufgebauten Lamina propria und einem dichten, subkonjunktivalen Bindegewebe, welches fest mit dem Tarsus verbunden ist. Bei den konfokalmikroskopischen Untersuchungen, die nach dem unter Abb. 8 dargestellten Prinzip erfolgten, fanden sich zum Teil Unterschiede zwischen Normalprobanden und Fabrypatienten. Normalstrukturiertes Epithel der tarsalen Konjunktiva stellt sich uneinheitlich dar. Klare Zellgrenzen sind nicht zu erkennen und daher finden sich auch keine Zellkörper und Kerne. Oft ergibt sich daraus ein unruhiges Bild aus hyperreflektiven Zellen (wahrscheinlich Becherzellen und Lymphozyten), einer zum Teil durchscheinenden Lamina propria mit vielen kleinen Blut- und Lymphgefäßen und Bindehautpapillen mit Lymphfollikeln (Abb.31).

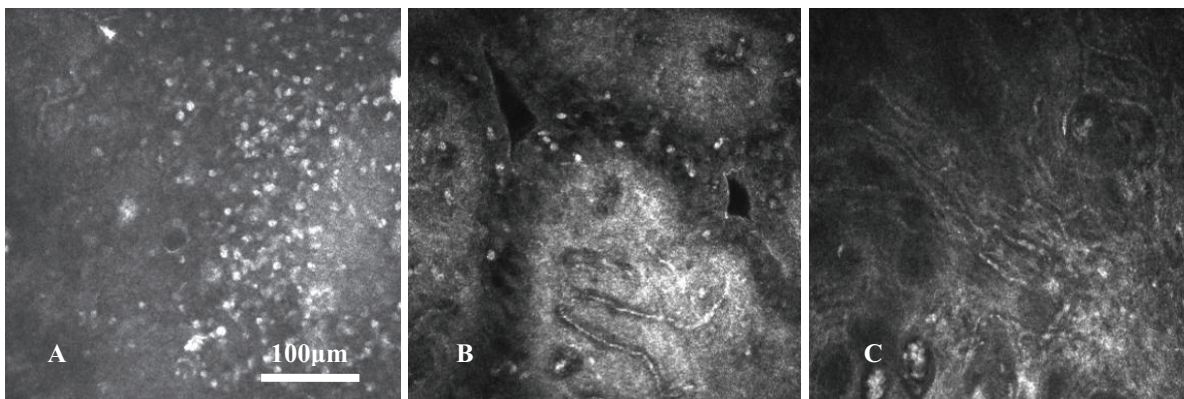


Abb. 31: A: Normalstrukturiertes Epithel der tarsalen Konjunktiva einer 45jährigen Fabrypatientin (F7) mit Lymphozyten. B: Normalstrukturiertes Epithel einer 34jährigen Fabrypatientin (F3) mit Bindehautpapillen und Blutgefäßen. C: Subkonjunktivales Bindegewebe der gleichen Patientin mit Kapillarnetz. Ebenfalls ohne Auffälligkeiten.

Der dunkle Hintergrund mit Akkumulationen von zahlreichen hyperreflektiven Zellen erinnert an die morphologischen Veränderungen im basalen Epithel von Fabrypatienten mit Cornea verticillata. Auf eine Abgrenzung zwischen physiologischen und pathologischen Befunden muss genau geachtet werden, aber sie ist nicht immer möglich.

Bei insgesamt 18 von 27 konfokalmikroskopisch untersuchten Fabrypatienten (66,7%) erfolgte eine Mituntersuchung der tarsalen Konjunktiva (5 der 8 Männer (62,5%) und 13 der 19 Frauen (68,4%)). Bei 3 der 5 Männer (60,0%) fanden sich auffällige konjunktivale Befunde, aber bei nur 3 von 13 Frauen (23,1%). Alle 3 Männer mit Veränderungen in der tarsalen Konjunktiva wiesen spaltlampenmikroskopisch eine Cornea verticillata auf und 2 der 3 Frauen.

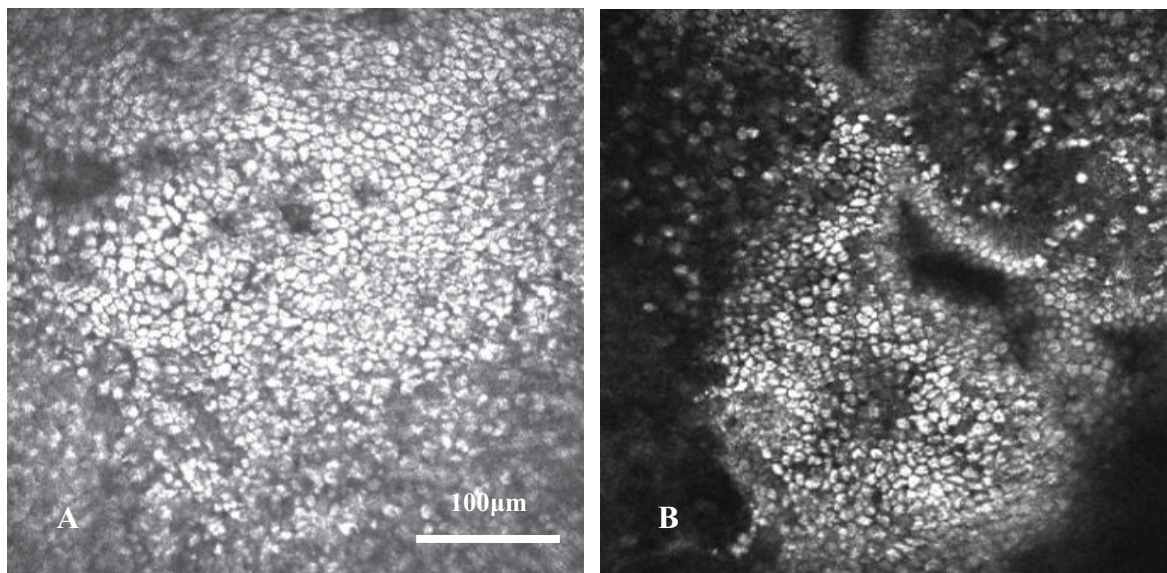


Abb. 32: A: Auffällige Befunde in der tarsalen Konjunktiva eines 22jährigen Fabrypatienten (F23). B: Ebenfalls Auffälligkeiten bei einer 46jährigen Fabrypatientin (F10).

Diese Veränderungen äußerten sich insbesondere qualitativ. Da in der tarsalen Bindehaut auch physiologischerweise hyperreflektive Zellen (Lymphozyten) auftreten, ist das Aussehen dieser Zellen zur Unterscheidung zwischen interindividuellen Variabilitäten und pathologischen Veränderungen ausschlaggebend. In der Konjunktiva von Fabrypatienten scheinen die Streulichtquellen das Innere von Epithelzellen auszufüllen und liegen weniger extrazellulär und ungeordnet. Die zur Darstellung kommenden hellen Zellen ordnen sich eng nebeneinander im Zellverband und treten an einer Stelle des Bildausschnittes gesondert

hervor, während das umliegende Gewebe eine normale Struktur aufweist. Durch diese dichte Anordnung erscheint die Anzahl der sichtbaren Hyperreflektivitäten stark vermehrt (Abb.32). Diese epithelzellartigen Anordnungen von Hyperreflektivitäten fanden sich, in nicht ganz so starker Ausprägung, auch bei 2 von 10 Normalprobanden (20%). Je eine Frau (N1) und ein Mann (N8) ohne bekannte Augen- oder Systemerkrankungen (Abb.33).

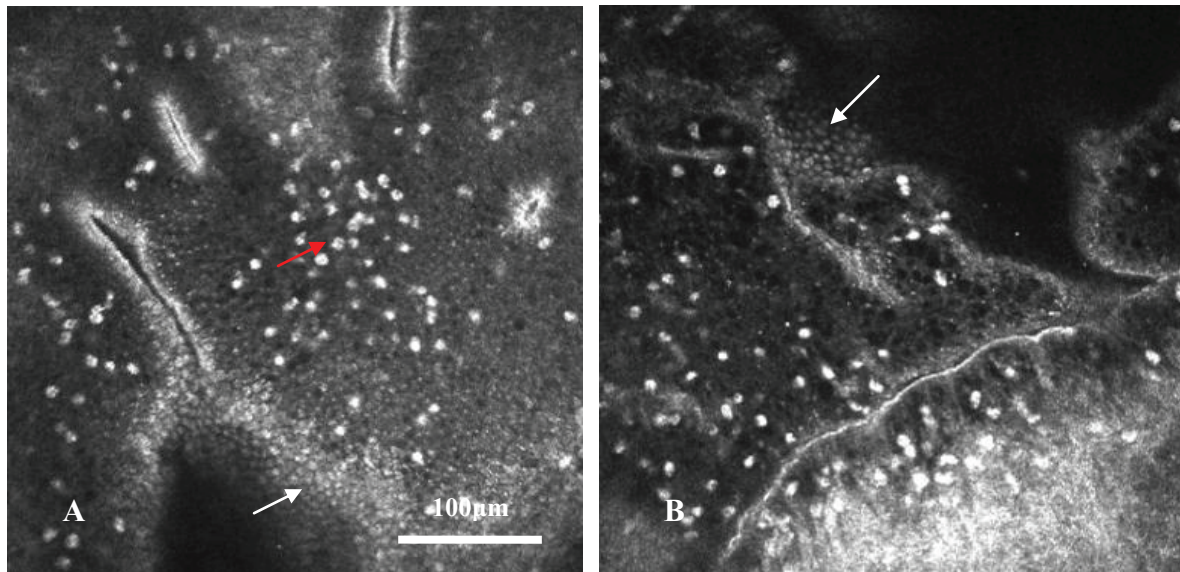


Abb. 33: A: Hyperreflektive Epithelzellnester (weißer Pfeil) neben physiologischerweise vorkommenden Lymphozyten (roter Pfeil) in der tarsalen Konjunktiva eines 43jährigen Normalprobanden (N9). B: Ähnliche Auffälligkeiten (Pfeil) bei einer 21jährigen Normalprobandin (N1).

3.5. Verlaufsbeobachtung der Hornhautveränderungen unter Enzymsubstitutions-therapie (Replagal)

Um die Wirkung der seit 2001 erhältlichen Enzyersatztherapie (ERT) für Fabrypatienten auf den Augenbefund zu untersuchen, wurden 5 Fabrypatienten, 4 Frauen und einen Mann, mit Cornea verticillata im zeitlichen Verlauf betrachtet. Dazu kam einerseits die Spaltlampenmikroskopie und andererseits das RLSM zur Anwendung. Die bis dahin bestehende Behandlungsdauer wurde dokumentiert. Des Weiteren fand einer Befragung aller Patienten nach ihrem subjektiven Wohlbefinden statt. Diese Aussagen stimmten nicht mit dem Augenbefund überein (Tab. 5).

Tab. 5: Verlaufskontrolle von Fabrypatienten

Patient	Beginn ERT	1. Unter-suchung	2. Unter-suchung	ERT-Dauer	Subjektives Empfinden	KFM-Befund
F8 (w)	2/07	11/06	6/07	5 Monate	Keine Verbesserung	-
F12 (w)	12/05	4/05	5/07	18 Monate	Immer noch Schmerzen	+
F19 (w)	2/07	11/06	6/07	5 Monate	Subj. Beschwerden-besserung	-
F20 (w)	8/01	6/06	5/07	69 Monate	Subj. Beschwerden-besserung	-
F28 (m)	8/01	6/06	5/07	69 Monate	Immer noch Schmerzen	-

w... weiblich

m... männlich

-... keine Veränderung im KFM-Befund

+... Veränderung im KFM-Befund

Da auf der gesamten Hornhautoberfläche dieselbe Stelle konfokalmikroskopisch oft nicht 2mal aufzufinden ist, wurde die Festlegung eines individuellen Referenzpunktes für Verlaufskontrollen nötig. Als solcher kam das Zentrum des subepithelialen Nervenplexus in Frage. Durch seine charakteristische Wirbelform ist er bei jedem Patienten aufzufinden. Bei 10 Patienten (N6, F2, F3, F4, F13, F17, F18, A1, A3, A4) wurde die konfokalmikroskopische Untersuchung unter diesem Schwerpunkt durchgeführt. Folgende Probleme ergaben sich dabei: Das Wirbelzentrum zu finden, setzt eine hohe Patientencompliance voraus, da die Blickrichtung während der Untersuchung möglichst wenig verändert werden sollte. Gerade bei älteren Patienten ist das oft nicht möglich. Zusätzlich stellte sich heraus, dass an der Stelle des Nervenwirbels in der Ebene der Basalzellschicht nicht immer aussagekräftige Veränderungen vorlagen und sich dieser Punkt daher nicht in jedem Fall für Verlaufskontrollen eignete.

Als alternative Methode zur Auswertung von Langzeituntersuchungen kam die Entnahme von Stichproben in Frage. Dieses Vorgehen wurde auf Seite 20 ausführlich erläutert (siehe auch Abb. 8).

Unter Verwendung dieser Methodik wurde der Hornhautbefund der 5 Fabrypatienten im zeitlichen Verlauf beobachtet und dokumentiert. Zuvor erfolgte wieder eine spaltlampenmikroskopische Untersuchung, um auch eine Veränderung im makroskopischen Erscheinungsbild der Cornea verticillata zu überprüfen. Hier wurde das System nach Orlando verwendet. Bei den 2 Patienten (F8, F19), die vor Beginn der Enzyersatztherapie und 4 Monate danach untersucht wurden, zeigten sich keine Veränderungen zum Vorbefund. Auch bei den 2 Patienten (F20, F28) nach 69 Monaten Therapie konnte kein Regressionsprozess festgehalten werden. Nur bei Patientin F12 deutete sich eine Veränderung der konfokalmikroskopischen Einschlüsse nach eineinhalb Jahren Enzyersatztherapie an (Abb. 34, 35). Bei 3.00 und 9.00 Uhr im Bereich der zentralen Cornea zeigte sich eine Regressionstendenz von einem Grad in etwa der Hälfte der Bilder. Eine Veränderung von 2 Graden fand sich nur bei 6.00 Uhr im Bereich der zentralen Cornea in 40% der Bilder. Spaltlampenmikroskopisch änderte das Bild der Cornea verticillata sich nicht.

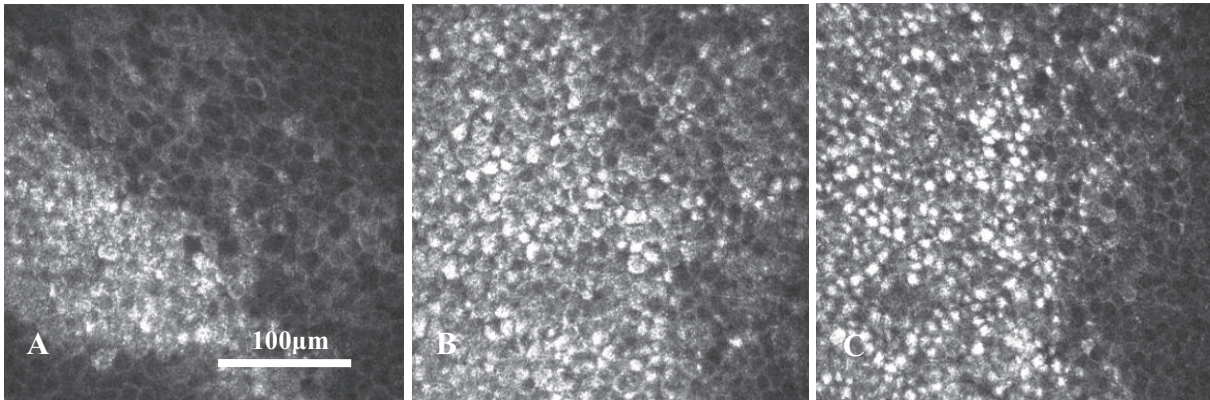


Abb. 34: Stichproben aus dem Vorbefund von Patientin F12. A: Grad II bei 3.00 Uhr zentrale Cornea. B: Grad III bei 9.00 Uhr zentrale Cornea. C: Grad III bei 6.00 Uhr zentrale Cornea.

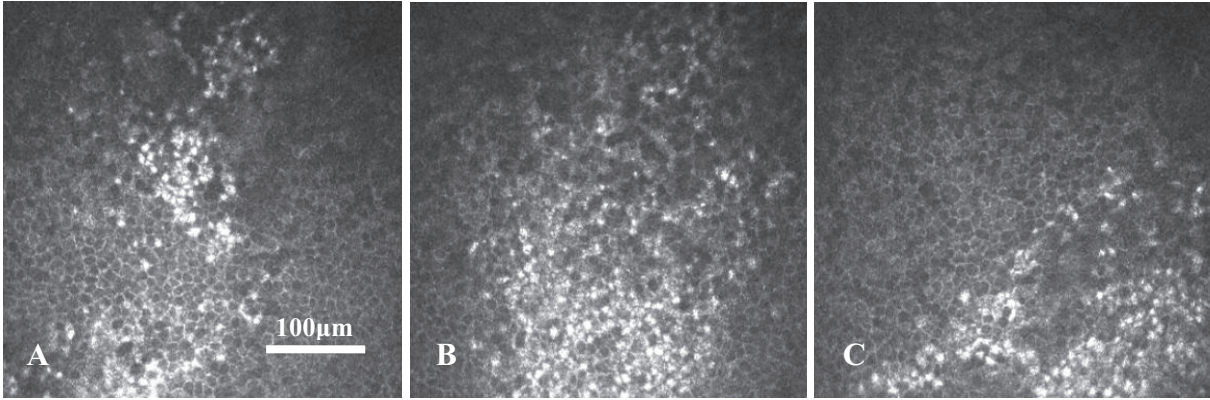


Abb. 35: Stichproben ca. 2 Jahre später nach 1 ½ Jahren ERT. A: Grad I bei 3.00 Uhr zentrale Cornea. B: Grad II bei 9.00 Uhr zentrale Cornea. C: Grad I bei 6.00 Uhr zentrale Cornea.

3.6. Konfokalmikroskopische Morphologie der Hornhaut- und Bindehautveränderungen von Patienten unter Amiodarontherapie

3.6.1. Cornea

Konfokalmikroskopisch konnten bei allen 12 Amiodaronpatienten Einschlüsse in der Basalzellschicht gefunden werden. Die morphologischen Befunde entsprachen denen der Fabrypatienten und auch die Infiltration der einzelnen Schichten war identisch. So stellte sich die Basalzellschicht ebenfalls als Hauptträger struktureller Veränderungen dar.

Bei den Amiodaronpatienten lag immer die flächige Einlagerungsform vor, aber auch hier fanden sich unterschiedliche Intensitäten, die sich der Schweregradeinteilung zuordnen lassen. Nach der konfokalmikroskopischen Stadieneinteilung ergab sich 2mal ein Grad 1 (16,7%), einmal ein Grad 2 (8,3%), 8mal ein Grad 3 (66,7%) und einmal ein Grad 4 (8,3%) (Abb.36).

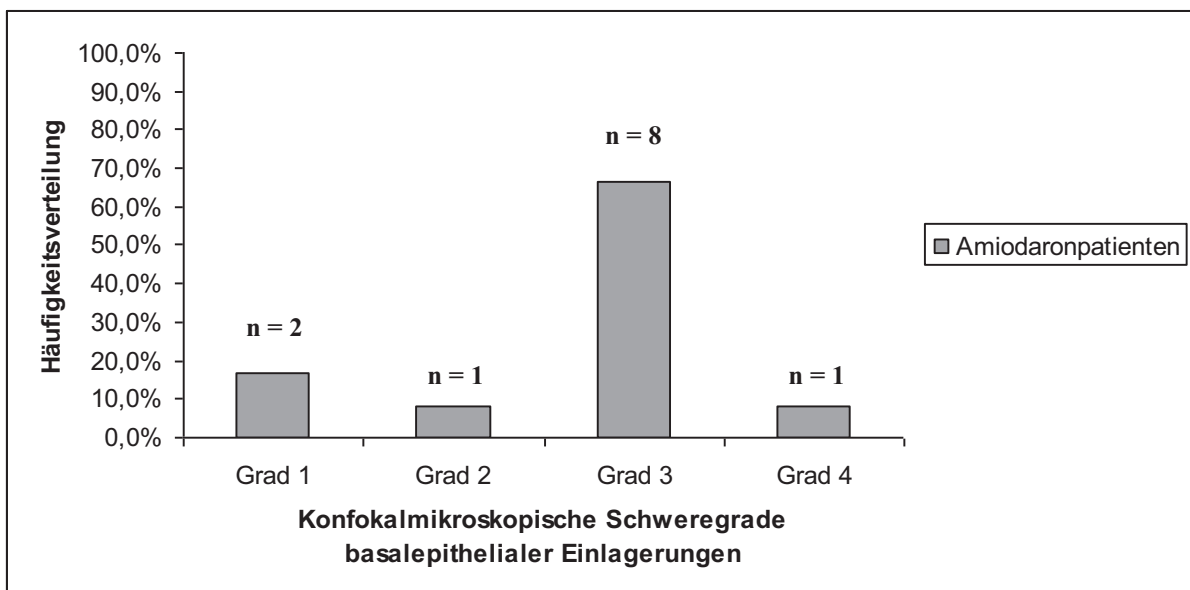


Abb. 36: Häufigkeitsverteilung der Schweregrade basalepithelialer Einlagerungen bei Amiodaronpatienten.

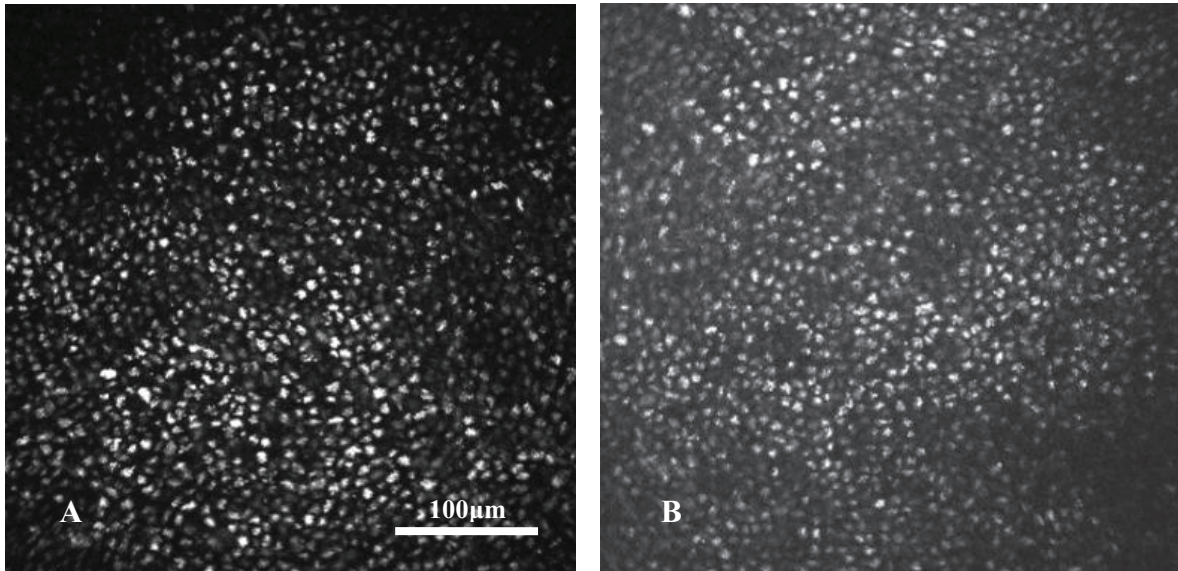


Abb. 37: A: Basalzellen einer 70jährigen Amiodaronpatientin (A5) nach 10 Monaten Medikation (Grad III). B: Basalzellen eines 66jährigen Amiodaronpatienten (A9) nach 28 Monaten Medikation (Grad III).

Die hyperreflektiven Basalzelleinschlüsse bei Amiodaronpatienten traten weder in einer streifen- noch inselförmiger Anordnung auf. Insgesamt zeigte sich ein sehr gleichmäßiges Bild mit einheitlich über den Ausschnitt verteilten Hyperreflektivitäten.

Eine Unterscheidung zwischen weiblichen und männlichen Patienten war nicht möglich. (Abb.37)

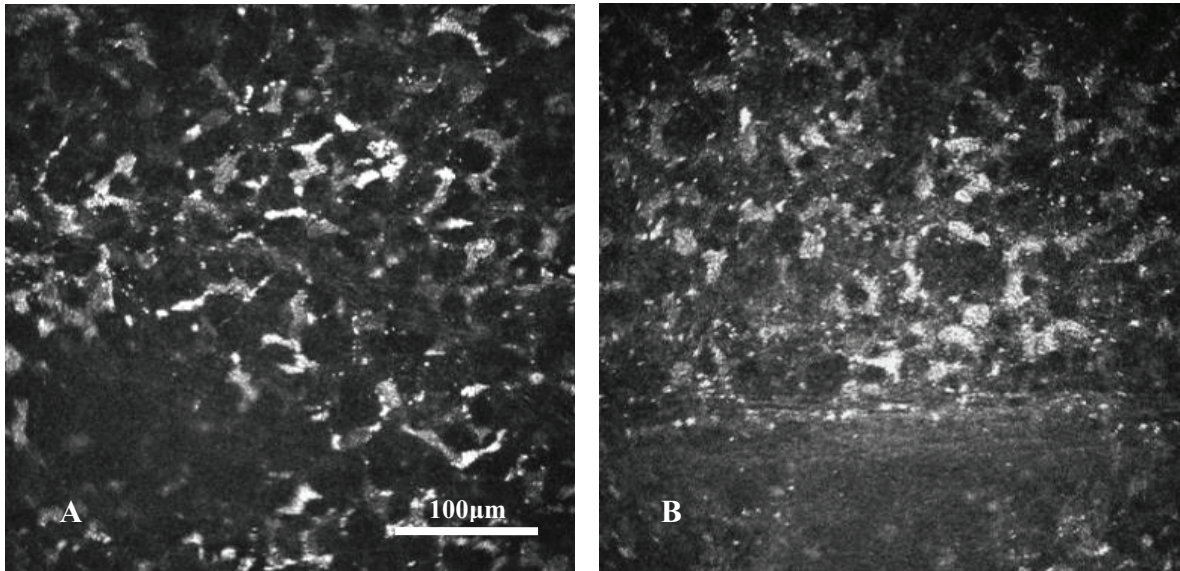


Abb. 38: A: Anteriores Stroma eines 70jährigen Amiodaronpatienten (A10) nach 20 Jahren Medikation mit massiven Akkumulationen von microdots. B: Anteriores Stroma einer 68jährigen Amiodaronpatientin (A4) nach 27 Monaten Medikation. Auch hier auffallend dicht microdots.

Im anterioren Stroma fanden sich im Vergleich zu Fabrypatienten auffallend gehäuft und sehr dicht microdots (Abb.38). Insgesamt zeigte sich diese Veränderung bei 9 von 12 Patienten (75,0%), wobei 2 Patienten eine eher schwächere Ausprägung aufwiesen, die als grenzwertig eingestuft werden muss. Bei den anderen 7 Patienten waren die Veränderungen eindeutig und die Akkumulationen von microdots fielen durch ihre massive Ausprägung sofort auf. Die tieferen Abschnitte des Stromas und des Endothels entsprachen auch bei Amiodaronpatienten dem Normalbefund.

3.6.2. 3-dimensionale Rekonstruktion

Die 3-dimensionale Rekonstruktion der Hornhaut eines Amiodaronpatienten erfolgte bis in die Ebene des anterioren Stromas und umfasst somit die Schichten, welche für den Morbus Fabry sprechende Veränderungen aufwiesen. Dadurch erhält man einen flacheren 3-dimensionalen Block. Die wichtigsten Befunde zeigen sich zum Einen in der Basalzellschicht in Form von Basalzellhyperreflektivitäten und zum Anderen im anterioren Stroma in Form von massiven Akkumulationen von microdots. Wird eine schräge Ebene durch den erstellten 3-dimensionalen Quader gelegt, erhält man einen Querschnitt dieser Schichtstrukturen, in dem beide Veränderungen zu erkennen sind (Abb.39). Hierbei liegt die konfokale Ebene demzufolge nicht oberflächenparallel sondern gekippt.

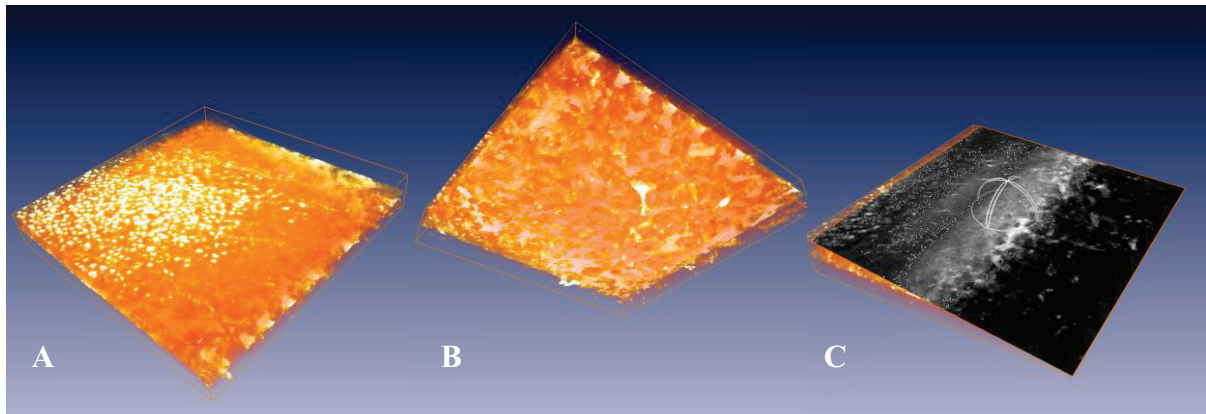


Abb. 39: A: 3-dimensionale Rekonstruktion der Hornhaut eines Amiodaronpatienten mit Darstellung der Basalzellschicht. B: Blick von unten auf das anteriore Stroma. C: Durch Einfügen einer schrägen Ebene erhält man eine Übersicht über beide Schichten.

3.6.3. Konjunktiva

In der bulbären Konjunktiva traten, so wie bei Fabrypatienten, keinerlei Veränderungen auf (Abb.40). In der tarsalen Konjunktiva fanden sich wiederum Hyperreflektivitäten. Diese wiesen morphologisch größere Ähnlichkeit zu den extrazellulären, als Lymphozyten klassifizierten Zellstrukturen von Normalprobanden auf (Abb.41). Massive Vermehrungen von hyperreflektiven epithelzellartigen Akkumulationen, wie bei Fabrypatienten (Abb.32), fanden sich nicht. Sowohl die bulbäre Konjunktiva als auch die tarsale Konjunktiva von Amiodaronpatienten waren unauffällig.

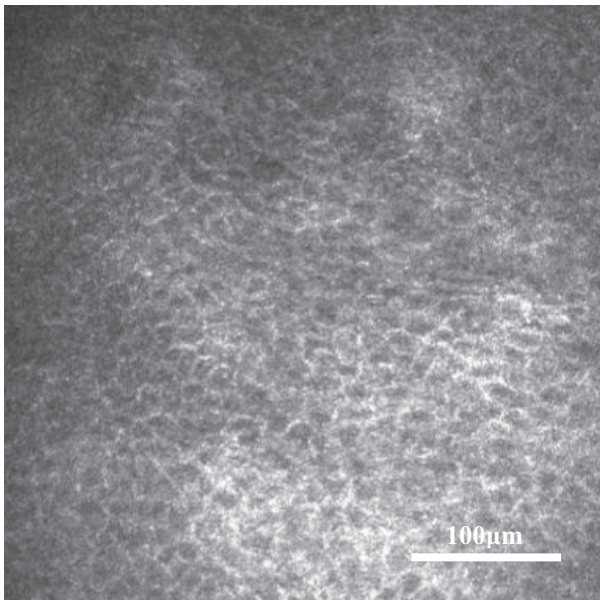


Abb. 40: Epithelzellen in der bulbären Konjunktiva einer 56jährigen Amiodaronpatientin (A1).

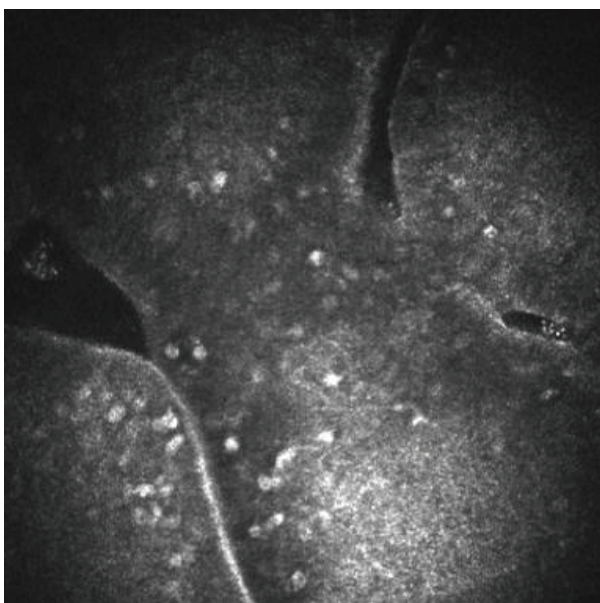


Abb. 41: Epithel der tarsalen Konjunktiva einer 66jährigen Amiodaronpatientin (A2) mit hyperreflektiven Zellen (wahrscheinlich Lymphozyten).

3.6.4. Verlaufsbeobachtung von Amiodaronpatienten

5 Amiodaronpatienten wurden nicht nur während, sondern zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Medikation untersucht, um die Veränderungen des Augenbefundes als arzneimittelbedingte Nebenwirkung zu dokumentieren. Es ging um die Zeiträume von einer Woche bis einem Monat nach Beginn der Einnahme, sowie ein Monat, ein Jahr und 2 Jahre nach Beendigung der Einnahme. Dabei kam es bei den unterschiedlichen Patienten auch zu individuell unterschiedlichen Ergebnissen (Tab. 6).

Generell lässt sich sagen, dass mit steigender Einnahmedauer sowohl das Stadium der Cornea verticillata als auch der konfokalmikroskopische Schweregrad zunimmt. 2 Patienten (A2, A11) wurden im zeitlichen Verlauf beobachtet, um die Zeitspanne bis zum Erscheinen und Verschwinden dieser Veränderungen festzustellen.

Tab. 6: Veränderungen des Augenbefundes zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Medikation

Patient	Einnahmezeitraum	Status	Orlando-Staging		KFM-Grading	
			1.US	2.US	1. US	2. US
A2 (w)	1 Monat	2x untersucht, zu Beginn der Einnahme und 4 Wochen später	0	I	0	II
A6 (w)	29 Monate	1x untersucht, 2 Jahre und 3 Monate nach Beendigung der Einnahme	I		I	
A7 (m)	0,2 Monate	1x untersucht, eine Woche nach Beginn der Einnahme	0		I	
A8 (m)	5 Monate	1x untersucht, 1 Monat nach Beendigung der Einnahme	III		III	
A11 (m)	13 Monate	2x untersucht, während der Einnahme und 1 Jahr nach Beendigung der Einnahme	III	0	III	0

w... weiblich

m... männlich

US... Untersuchung

Der Fall von Patient A7 stellt aufgrund des sehr frühen Auftretens von morphologischen Veränderungen und insbesondere der fehlenden Übereinstimmung mit dem spaltlampenmikroskopischen Befund eine Ausnahme dar und soll deshalb gesondert diskutiert werden (Abb.42). Patient A7 nahm erst seit einer Woche ein Amiodaronpräparat ein und wies spaltlampenmikroskopisch noch keine Cornea verticillata auf. Konfokalmikroskopisch fanden sich jedoch bereits beginnende basalepitheliale Einschlüsse.

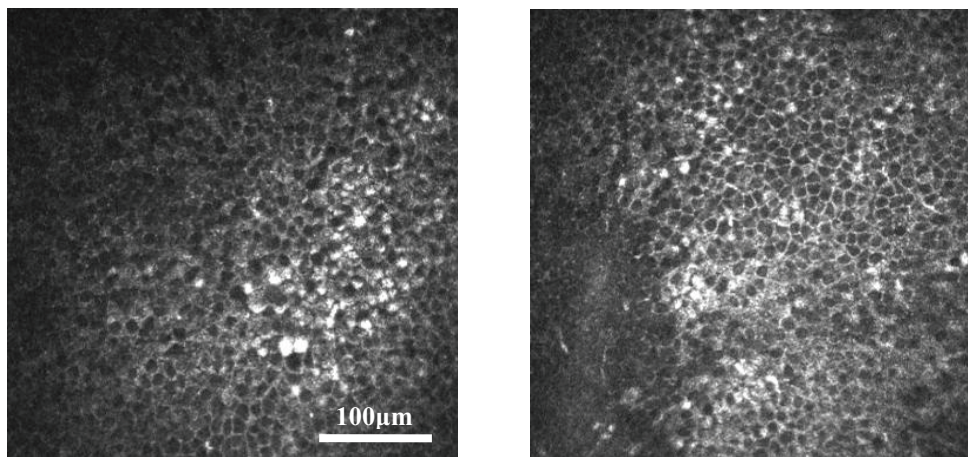


Abb. 42: Basalepitheliale Befunde von Patient A7 eine Woche nach Einnahmebeginn.

Patientin A2 und Patient A11 wurden 2mal untersucht und im zeitlichen Verlauf beobachtet. Patientin A2 wurde eine Woche und einen Monat nach Beginn der Einnahme spaltlampen- und konfokalmikroskopisch untersucht. Während sich nach einer Woche keinerlei Veränderungen am Augenbefund zeigten, fand sich 4 Wochen später spaltlampenmikroskopisch eine Cornea verticillata Stadium 1 und es traten hyperreflektive Basalzelleinschlüsse Grad 2 auf. Bei Patient A11 lag zur Erstuntersuchung während der Medikation eine spaltlampen- und konfokalmikroskopisch gut ausgeprägte Cornea verticillata vor. Eineinhalb Jahre nach Absetzen der Medikation ließ sich eine vollständige Remission der basalepithelialen Einschlüsse sowie der spaltlampenmikroskopischen Cornea verticillata nachweisen (Abb.43 A,B). Nur im Bereich des anterioren Stromas waren noch mircodots vorhanden (Abb.43 C,D).

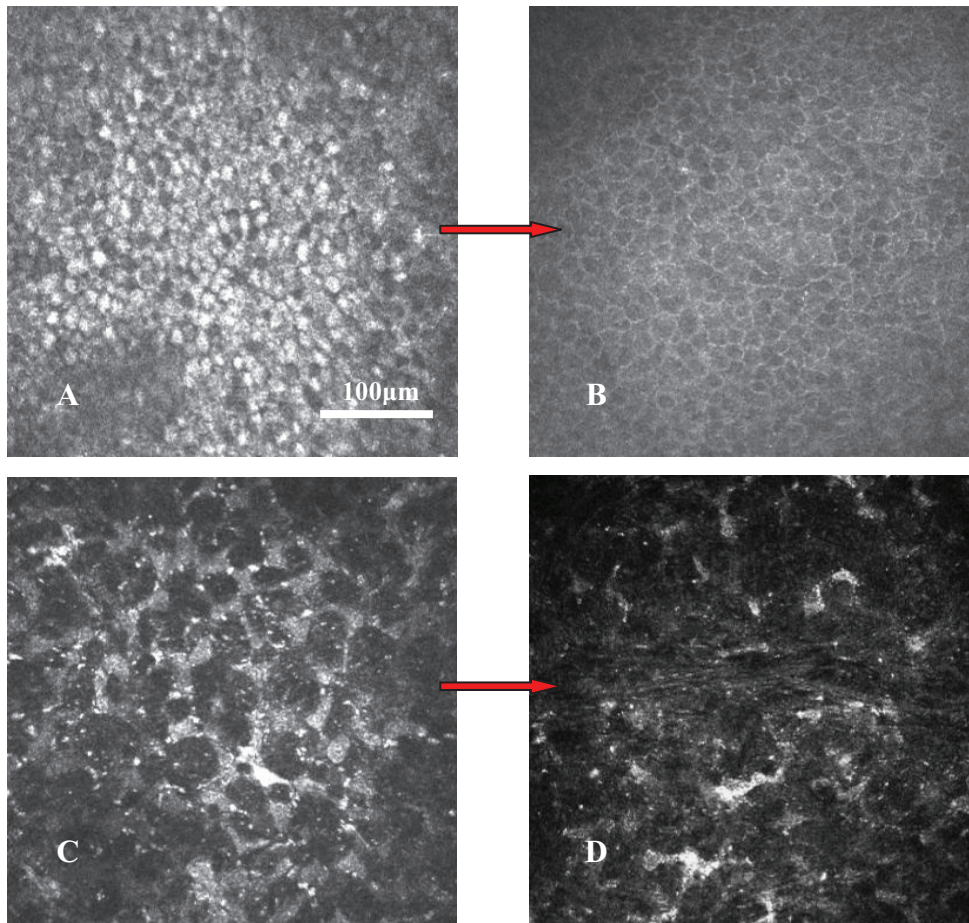


Abb 43: A: Basalepithelialer Befund von Patient A11 während Amiodaroneinnahme. B: Befund 1 ½ Jahre nach Beendigung der Einnahme. C: Anteriores Stroma zum Zeitpunkt der Einnahme. D: Eineinhalb Jahre nach Absetzen des Medikaments immer noch vereinzelte microdots im Stroma.

Patient A8 wurde einen Monat und Patientin A6 ungefähr 2 Jahre nach Absetzen des Medikaments untersucht. Beide Patienten hatten zu diesem Zeitpunkt noch spaltlampen- und konfokalmikroskopische Veränderungen. Während bei Patient A8 noch eine voll ausgeprägte Cornea verticillata Stadium 3 nach Orlando vorlag (auch basalepitheliale Einlagerungen Grad 3), wies Patientin A6 spaltlampenmikroskopisch nur eine schwach angedeutete Cornea verticillata auf und im basalen Epithel vereinzelte Hyperreflektivitäten. Beide Patienten zeigten keine Stromaveränderungen.

4. DISKUSSION

4.1. Spaltlampenmikroskopie – Vergleich der Cornea verticillata bei Morbus Fabry mit der Amiodaron induzierten Form

4.1.1. Frühdiagnostik

Die medikamentös induzierte Cornea verticillata entspricht sowohl makroskopisch als auch auf mikrostruktureller Ebene den gefundenen Veränderungen bei Morbus Fabry, es liegt jedoch ein anderer Pathomechanismus zugrunde (Whitley et al. 1983). Dieser Pathomechanismus, der vor allem auf intrazellulären Vorgängen beruht, führt zu der Fragestellung, ob Cornea verticillata assoziierte Veränderungen zellmorphologisch bereits früher zu erkennen sind als unter Verwendung der Spaltlampenmikroskopie.

Mastropasqua et al. (Mastropasqua et al. 2006) beschrieben den Fall einer 20jährigen Fabrypatientin, bei welcher vor der spaltlampenmikroskopischen Ausbildung einer Cornea verticillata bereits beginnende basalepitheliale Einlagerungen konfokalmikroskopisch sichtbar waren. Der Zeitpunkt der Ausbildung einer Cornea verticillata ist schwer zu bestimmen. Bisher ergab sich nur einmal die Möglichkeit, die Hornhaut eines 22 Wochen alten Fötus einer Fabrypatientin mit Cornea verticillata biochemisch und histopathologisch zu untersuchen (Tsutsumi et al. 1984). Es stellte sich heraus, dass dieser bereits eine, im Vergleich zum Durchschnitt, niedrigere Alpha-Galactosidaseaktivität aufwies und intrazytoplasmatische „lamellar bodies“ in den cornealen Epithelzellen vorlagen. Demzufolge bestünde die Möglichkeit einer sehr frühen Diagnostik bereits im Kindesalter unter Verwendung des RLSM. Bei den Fabrypatienten dieser Studie konnte allerdings eine deutliche Übereinstimmung des spaltlampen- und konfokalmikroskopischen Befundes nachgewiesen werden. Der jüngste spaltlampen- und konfokalmikroskopisch untersuchte Fabrypatient war 22 Jahre alt. Eine Diskrepanz zwischen beiden Befunden fand sich bei ihm und den anderen Fabrypatienten nicht. Die enge Verknüpfung zwischen spaltlampenmikroskopischer Cornea verticillata und Basalzelleinschlüssen konnte bis auf einen Fall auch bei den Amiodaronpatienten nachgewiesen werden. In diesem Fall erfolgte die Untersuchung nach einwöchigem Therapiebeginn ohne sichtbare Cornea verticillata. Konfokalmikroskopisch war allerdings ein Grad 1 der basalepithelialen Einschlüsse

nachweisbar. Erste Veränderungen nach einer so kurzen Zeitspanne wurden zuvor noch nicht beschrieben. In der Literatur wird von frühestens 2 Wochen nach Beginn der Einnahme bis zum Erscheinen spaltlampenmikroskopischer Veränderungen berichtet (D'Amico und Kenyon 1981). Diese Befunde belegen die Möglichkeit, sehr frühe, auf Ebene der Mikromorphologie stattfindende Vorgänge mittels des RLSM festzuhalten. Demzufolge kann bei Amiodaronpatienten der genaue Zeitpunkt der Entstehung von okulären Veränderungen bei konsequenten und regelmäßigen sowohl spaltlampenmikroskopischen als auch konfokalmikroskopischen Untersuchungen bestimmt und eine Diskrepanz eindeutig nachgewiesen werden. Anhand dieser Ergebnisse könnte man auch Rückschlüsse auf die Frühdiagnostik von Fabrypatienten mittels des RLSM ziehen. Bei dieser Zahl von Patienten war es nicht möglich, präspaltlampenmikroskopische Befunde bei Fabrypatienten mittels des RLSM festzuhalten. Hier ist die Indikation für weitere Untersuchungen sowohl von Fabry- als auch von Amiodaronpatienten zu stellen, um mit höheren Patientenzahlen eindeutigere Aussagen zu erreichen.

Betrachtet man die große Prävalenz und gute Sensitivität der Cornea verticillata bei Morbus Fabry, kann der Augenarzt dennoch ein nicht zu unterschätzendes Bindeglied in der Diagnostikkette sein (Hauser et al. 2004, Konrad et al. 1984). Insbesondere in der Frühdiagnostik spielt die Cornea verticillata eine wichtige Rolle, da sie zu den ersten auftretenden Manifestationen neben Angiokeratomen und Akroparästhesien gerechnet wird. In dem Patientengut dieser Studie wurden 26,7% der Fabrypatienten erstmals anhand der Cornea verticillata auffällig, u.a. bereits im Alter von 14 Jahren (Patientin F1) (Abb. 44). Nur 3,3% der Patienten wurden aufgrund von schlechten Nierenwerten diagnostiziert und 6,7% fielen beim Kinderarzt wegen der Schmerzen in Händen und Füßen auf. Der Hauptanteil wurde durch neurologische Fachärzte diagnostiziert (63,3%). Häufig werden Patienten erst aufgrund der schwerwiegenden Krankheitsfolgen, wie des cerebralen Insults, auffällig. Eine endgültige Sicherung ist allerdings nur auf dem Weg der Enzymaktivitätsbestimmung im Serum und mit Hilfe des Gentests zu erreichen (Ishii et al. 2007, Young et al. 2005).

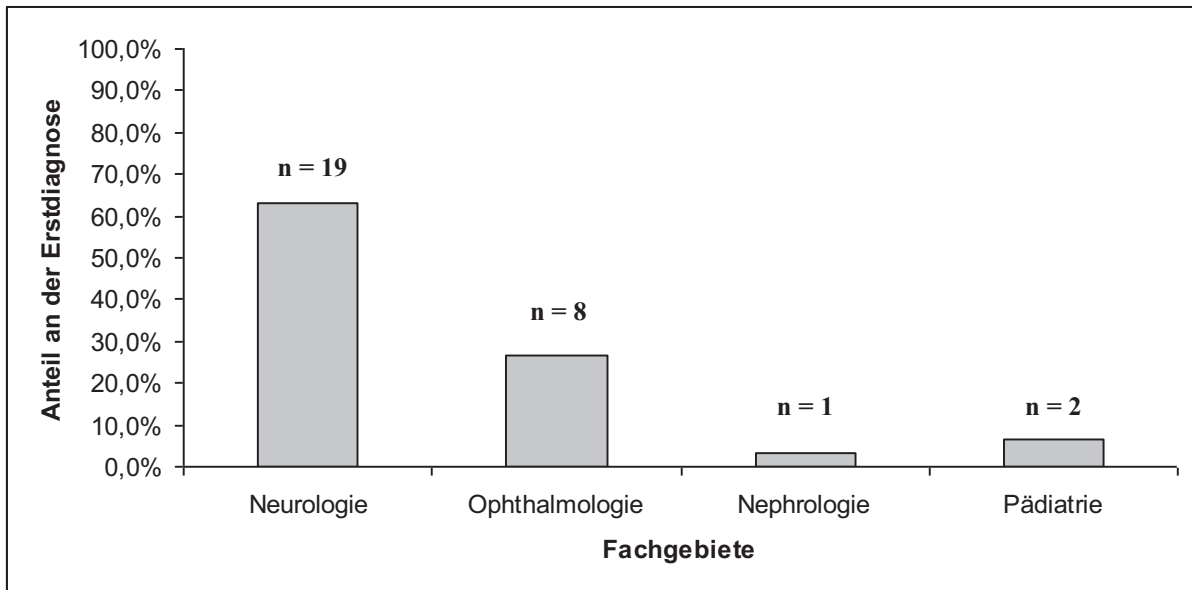


Abb. 44: Anteil der einzelnen Fachgebiete an der Erstdiagnostik des Morbus Fabry.

Die konfokale Mikroskopie kann ein wichtiges Bindeglied in der Diagnostikkette sein, um den spaltlampenmikroskopischen Augenbefund zu sichern. Das anerkannte Mittel der ersten Wahl ist nach wie vor die Spaltlampe. Bisher hat die Methodik der In-vivo-Mikroskopie noch keine Anwendung in der Früherkennung des Morbus Fabry gefunden. Dennoch lassen sich mit ihrer Hilfe bereits frühe Veränderungen sehr gut und genau nachweisen. Diese können als sensitiv angesehen werden und besitzen daher eine hohe Aussagekraft.

4.1.2. Spaltlampenmikroskopische Stadienteilung

Francois (Francois 1969) beschreibt in seinen Studien ein unterschiedliches spaltlampenmikroskopisches Erscheinungsbild zwischen der Fabry assoziierten und der Amiodaron induzierten Cornea verticillata. Die Beobachtung konnte in dieser Studie nicht bestätigt werden. Daher ließen sich die Schweregrade auf die untersuchten Fabrypatienten übertragen. Mit zunehmendem Einnahmezeitraum von Amiodaron steigt auch der Grad der Cornea verticillata (Orlando et al 1984, Ucakhan et al. 2005). Zum Teil ergaben sich Prävalenzen von 100,0% für diese arzneimittelbedingte Nebenwirkung (Klinge et al. 1984, Rosenbaum et al. 1976). Auch in dieser Studie konnten höhere Schweregrade nach langer Einnahmedauer von Amiodaron gefunden werden. Bei Fabrypatienten trat dagegen eine völlig unregelmäßige Verteilung der Stadien auf, die nicht mit der Krankheitsdauer bzw. mit dem Alter übereinstimmte. Die Ausprägung der Cornea verticillata war sehr variabel und interindividuell unterschiedlich. Bei den weiblichen Fabrypatienten fanden sich alle 3 Grade, während bei den männlichen Merkmalsträgern der erste Grad nicht vorkam. Demzufolge waren die Erscheinungsformen der Cornea verticillata bei Männern etwas stärker ausgeprägt als bei Frauen.

Die Prävalenz der Cornea verticillata betrug in dieser Studie 47,6% bei weiblichen und 66,7% bei männlichen Fabrypatienten bei einer Gesamtpatientenzahl von 30 Patienten. Orssaud et al. (2003) bestimmten eine Prävalenz von 43,7% (männliche Fabrypatienten) und verfügten über 32 Patienten. Diese Zahlen sind im Vergleich mit anderen Studien eher niedrig: Sher et al. 1979: 71,9% der Frauen und 94,1% der Männern; Sodi et al. 2006: 76,9% der Frauen und 73,1% der Männer. Beide Autorengruppen konnten sich auf eine große Anzahl von Patienten beziehen (62 und 173). Somit kann in Abhängigkeit von der Größe des Patientenkollektivs eine Prävalenz zwischen 40,0% und 90,0% bestimmt werden.

4.2. Konfokale In-vivo-Mikroskopie bei Fabry- und Amiodaronpatienten

4.2.1. Diskussion der epithelialen Befunde

Mittels der konfokalen In-vivo-Mikroskopie stellt sich die Basalzellschicht des cornealen Epithels als Hauptträger mikrostruktureller Veränderungen dar. Bei den Fabrypatienten dieser Studie wurden nur dann konfokalmikroskopisch sichtbare Veränderungen gefunden, wenn makroskopisch ebenso eine Cornea verticillata vorlag. Diese Aussage traf, bis auf eine Ausnahme, auch auf alle Amiodaronpatienten zu. So kann vor allem die Zellmorphologie der Basalschicht Aufschluss über die Prozesse zur Bildung und Rückbildung der Cornea verticillata geben.

Auch bei Mastropasqua et al. (Mastropasqua et al. 2006) zeigten sich vergleichbare Ergebnisse in Zusammenhang mit der konfokalen In-vivo-Mikroskopie von Fabrypatienten. Die Autoren hoben aber insbesondere das unterschiedliche morphologische Erscheinungsbild von weiblichen heterozygoten und männlichen hemizygoten Fabrypatienten hervor. Demnach finde sich bei weiblichen Patienten eine sogenannte „fine diffusion“ reflektiver Substanz auf Ebene der Superficialzellen, Basalzellen und Bowman-Membran, während die Einlagerungsform der Männer als klar abgegrenzte, intrazelluläre, hyperreflektive Substanz beschrieben wurde. Zusätzlich traten Inhomogenitäten und Unregelmäßigkeiten in der Basalmembranstruktur auf.

Ein geschlechtsspezifischer Unterschied fand sich teilweise auch in dieser Studie, während Basalmembrandefekte nicht gefunden werden konnten. Bildunregelmäßigkeiten mit Basalmembranstrukturen zwischen hyperreflektiven Zellinseln wurden auf durchscheinende epitheliale Strukturen bzw. auf sich überlagernde Schichten aufgrund der Aufnahmetechnik zurückgeführt.

Mit histologischen Methodiken und der Elektronenmikroskopie konnten solche Veränderungen in einzelnen Fällen in-vitro beschrieben werden. Weingeist und Blodi (Weingeist und Blodi 1971) sowie Francois et al. (Francois et al. 1978) fanden lichtmikroskopisch Basalmembranunterbrechungen und elektronenmikroskopisch intrazelluläre Einschlusskörperchen. Macrae et al. (Macrae et al. 1985) führten ebenfalls Studien zu den strukturellen Veränderungen bei Morbus Fabry assoziierteter Cornea verticillata durch. Lichtmikroskopisch fanden sie dunkle Ablagerungen über das gesamte Hornhautepithel

verteilt. Auf Ebene der Bowman-Membran konnten sie keine pathologischen Befunde nachweisen. Elektronenmikroskopisch wurden die gefundenen Ablagerungen genauer klassifiziert. Sie waren im extranukleären Zytoplasma lokalisiert und bestanden aus lamellären myelinähnlichen Stapeln, die zum Teil von einer einschichtigen Membran umgeben waren. Das erinnert stark an die Beschreibungen von lamellären Myeloidkörpern in den Nierenglomeruli von Fabrypatienten (Elleder 2003). Hirano et al. (Hirano et al. 2001) führte Untersuchungen an der Hornhaut einer 67jährigen verstorbenen Fabrypatientin durch. Mittels histologischer Techniken zeigten die Autoren eine verdickte Schicht im Bereich der Bowman-Membran und subepithelial positiv angefärbte Ablagerungserscheinungen. Elektronenmikroskopisch konnten sie Verdickungen und Verdopplungen im Bereich der Bowmanmembran nachweisen.

Chew et al. (Chew et al. 1982) führten elektronenmikroskopische Studien mit Patienten unter Amiodarontherapie durch. 35 von 37 (94,6%) Patienten entwickelten dabei eine Cornea verticillata. Im cornealen Epithel dieser Patienten fanden sich in allen Schichten membranumgebene „lamellar bodies“, die im Cytoplasmas lokalisiert waren. Die Bowman-Membran zeigte einen regulären Befund ohne morphologische Veränderungen.

Konfokalmikroskopische Untersuchungen zur Amiodaron induzierten Cornea verticillata erbrachten folgende Ergebnisse (Ciancaglini et al. 2001): Hochreflektive, intrazelluläre Einschlüsse fanden sich insbesondere im Bereich der cornealen Basalzellen, gingen mit steigendem Schweregrad der Cornea verticillata aber auch auf die Superficialzellen über. Der subepitheliale Nervenplexus war bei allen Patienten der Studie ebenfalls von hyperreflektiven Einschlüssen umgeben, während die Bowman-Membran nicht von Veränderungen betroffen war.

Auf Ebene des subepithelialen Nervenplexus konnten in dieser Studie weder bei Amiodaron- noch bei Fabrypatienten morphologische Auffälligkeiten festgehalten werden. Hierbei muss auf die Abgrenzung zu Langerhanszellen geachtet werden, welche ebenfalls hyperreflektiv sind und physiologischer Weise bei ungefähr 31,3% gesunder Probanden auf der Ebene des subepithelialen Plexus gefunden werden können (Zhivov et al. 2005). Die Anzahl dieser Immunzellen ist meist bei Kontaktlinsenträgern (sowohl weiche als auch harte Kontaktlinsen) erhöht, steht aber nicht in Verbindung mit dem Morbus Fabry. Die hyperreflektiven Einlagerungen der Basalzellschicht bei Morbus Fabry blieben in dieser Studie auf das Epithel begrenzt.

Im Vergleich zu in-vitro Techniken erlaubt die konfokale In-vivo-Mikroskopie mittels des RLSM die Betrachtung einer großen Anzahl von unterschiedlichen Patienten in hochauflösender Bildqualität. Lichtmikroskopische Verfahren können die Lokalisation und Struktur der Veränderungen nicht ausreichend genau erfassen. Oft konnte nur ein einzelner Fall betrachtet werden und die Hornhäute der bereits verstorbenen Probanden wiesen Leichen- und Fixationsartefakte auf. Elektronenmikroskopie ist ein weiteres, sehr aufwendiges in-vitro Verfahren, welches Ergebnisse in guter Bildqualität und starker Vergrößerung liefert. Die elektronenmikroskopisch beschriebenen lamellären Strukturen können mittels konfokalmikroskopischer Techniken nicht erfasst werden. Das RLSM erlaubt hingegen die Unterscheidung verschiedener Hornhautzelltypen sowie die Differenzierung von Leukozytenformen (Granulozyten $<10\mu\text{m}$, Monozyten ca. $20\mu\text{m}$, Makrophagen $12-15\mu\text{m}$, Lymphozyten $10-12\mu\text{m}$) (Zhivov et al. 2008). Bakterielle Erreger und ebenso die Struktur der Lamellenkörperchen in der Hornhaut von Fabrypatienten liegen unterhalb des Auflösungsvermögens der RLSM. Der große Vorteil der konfokalen Mikroskopie mittels des RLSM liegt allerdings in der Möglichkeit, Patienten in-vivo, somit in großer Zahl und dennoch guter Bildqualität zu untersuchen. Somit ist sie eine unkomplizierte und schnelle Alternative sowohl zu Licht- als auch in gewissen Grenzen zu Elektronenmikroskopie.

4.2.2. Diskussion der stromalen Befunde

Veränderungen im anterioren Stroma (microdots) traten bei 47,4% der weiblichen und 50% der männlichen Fälle von molekulargenetisch gesichertem Morbus Fabry auf. Nur bei 3 der 9 Frauen (33,3%) und 2 der 4 Männer (50,0%) mit microdots fand sich auch gleichzeitig eine Cornea verticillata. Das heißt, die im Stroma gefundenen Veränderungen sind keine Manifestation der, für den Morbus Fabry typischen, Cornea verticillata. Sie können ein weiteres Produkt der überall im Körper vorkommenden Lipideinschlüsse sein, aber auch eine andere Ursache haben.

Bei Amiodaronpatienten traten microdots sehr viel häufiger und in stärkerer Intensität als bei Fabrypatienten auf (9 von 12 Amiodaronpatienten, 75,0%). Alle Probanden hatten eine Cornea verticillata und wiesen basalepitheliale hyperreflektive Zelleinschlüsse auf. Auch hier kommt die Akkumulation von Lipidmaterial als Pathomechanismus in Frage.

Stromale Veränderungen wurden bereits in früheren Studien beschrieben, insbesondere im Zusammenhang mit der chloroquininduzierten Cornea verticillata (Slowik et al. 1997). In der elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Chew et al. (Chew et al. 1982) wurden vorwiegend granuläre, zum Teil aber auch lamelläre, von einer Membran umgebene Einschlusskörperchen in den stromalen Keratozyten von Amiodaronpatienten gefunden. Diese entsprechen morphologisch den Veränderungen bei Einnahme von Chloroquin und Vorliegen eines Morbus Fabry. Libert et al. (Libert et al. 1976) fanden bei Fabrypatienten Abnormalitäten im anterioren Stroma und führte diese ebenfalls auf die Einlagerung von Lipidmaterial zurück.

Konfokalmikroskopisch beschrieben Ciancaglini et al. (Ciancaglini et al. 2001) und Mastropasqua et al. (Mastropasqua et al. 2006) das Auftreten von microdots sowohl unter Amiodarontherapie als auch im Zusammenhang mit Morbus Fabry. Ciancaglini fand microdots im anterioren Stroma von 5 aus 9 Amiodaronpatienten. Im posterioren Stroma seien sie nicht mehr vorhanden. Zusätzlich war die Keratozytendichte im anterioren Stroma vermindert. Mastropasqua konnte nur bei einem Fabrypatienten Veränderungen im Stroma feststellen. Diese wurden von den Autoren als diffuse Akkumulation von hyperreflektiver, extrazellulärer Substanz beschrieben. Bei dem gleichen Patienten sei auch eine niedrige Keratozytendichte festzustellen.

In dieser Studie fanden sich microdots nicht nur im Stroma von Fabry- und Amiodaronpatienten, sondern auch bei 4 Normalprobanden (N4, N8, N9, N10). Dort allerdings in deutlich geringerer Intensität als bei Amiodaronpatienten. Insbesondere das Tragen von Kontaktlinsen (sowohl weiche [SCL] als auch harte [HCL] Kontaktlinsen) über eine lange Zeit ruft die gleichen Veränderungen hervor (Bastion und Mohamad 2006 [SCL], Böhnke und Masters 1997 [SCL], Elfron 2007 [SCL], Trittibach et al. 2004 [HCL]). Hier findet man microdots über die gesamte Tiefe des Stromas, wobei weder deren Dichte abnimmt noch deren Struktur sich ändert. Trittibach (Trittibach et al. 2004) führt diese Veränderungen auf die Einlagerung von Lipofuscin ähnlichem Material durch das Tragen der Kontaktlinsen zurück. Ursache dafür ist der chronische Sauerstoffmangel und die daraus folgende Ansäuerung sowie chronische Schädigung des Gewebes (Kaufman et al. 1996 [SCL]). Die Keratozytendichte ändert sich im Vergleich zu Normalprobanden unter dem Sauerstoffmangel nicht (Patel et al. 2002). Allerdings kommt es zur Streulichtzunahme und Zelldichtenabnahme im Endothel (Nagel et al. 1996). Es ist als ein immunstimulierender Prozess anzusehen (Zhivov et al. 2007 [SCL, HCL]).

Eine weitere Ursache für eine chronische Gewebsschädigung können inflammatorische Prozesse am Auge sein, hervorgerufen durch das sogenannte „trockene Auge“ (Benitez del Castillo et al. 2004, Jacobi et al. 2006). Hier nimmt die gesamte Dicke der Hornhaut ab, insbesondere die des Epithels und auch hyperreflektive Muster sowie Veränderungen im Stroma werden gefunden (Erdelyi et al. 2007).

Das Auftreten von microdots ist demzufolge, im Gegensatz zu den Basalzelleinschlüssen, nicht als spezifisches Kriterium zur Diagnostik eines Morbus Fabry anzusehen. Vielleicht könnte allerdings deren Intensität ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal sein, denn in so starker Ausprägung wie bei einigen Fabrypatienten und fast allen Amiodaronpatienten wurden sie bei keinem der Normalprobanden unserer Studie gefunden. Fehlen basalepitheliale Einlagerungen, müssen beim Auffinden von microdots im anterioren Stroma ergänzende Verfahren angewendet bzw. anamnestisch die Fabry typische Symptomatik ausgeschlossen werden.

4.2.3. Diskussion der konfokalmikroskopischen Schweregrade

Die konfokalmikroskopischen Schweregrade der basalepithelialen Einlagerungen lassen sich gut auf die spaltlampenmikroskopischen Stadien übertragen (Abb.45, 46). Sowohl bei Fabry- als auch bei Amiodaronpatienten entsprechen hohe spaltlampenmikroskopische Werte auf der einen Seite, auch hohen konfokalmikroskopischen Werten auf der anderen. Somit konnte ein konfokalmikroskopisches Gradingssystem erstellt werden, das sowohl zur Einschätzung von frühen Diagnosen als auch zur Bestimmung von Verlaufsuntersuchungen verwendet werden kann und mit dem Erscheinungsbild der spaltlampenmikroskopischen Cornea verticillata in Verbindung steht.

(Für die Abb. 44 und 45 wurden F1, F6, F22 [siehe Seite 32] und A7 [Diskrepanz zwischen spaltlampen- und konfokalmikroskopischem Befund]) aus Darstellungsgründen nicht berücksichtigt)

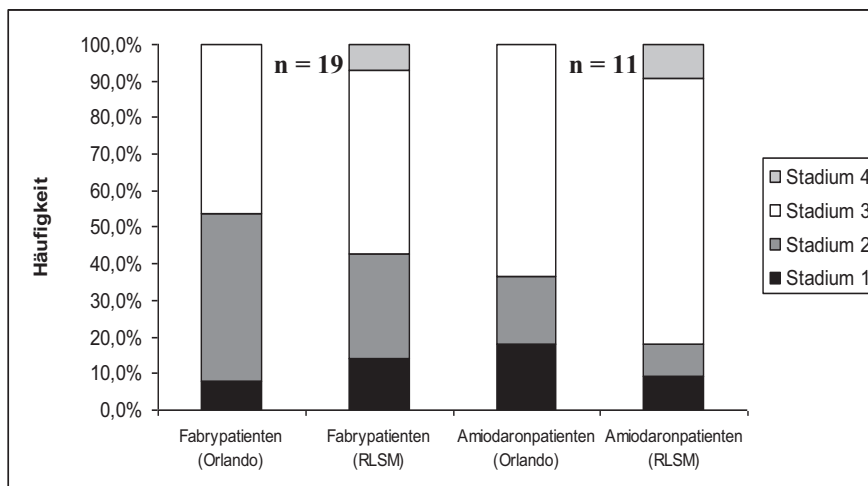


Abb. 45:
Spaltlampen- u. konfokalmikroskopische Schweregrade im Vergleich bei Fabry- u. Amiodaronpatienten.

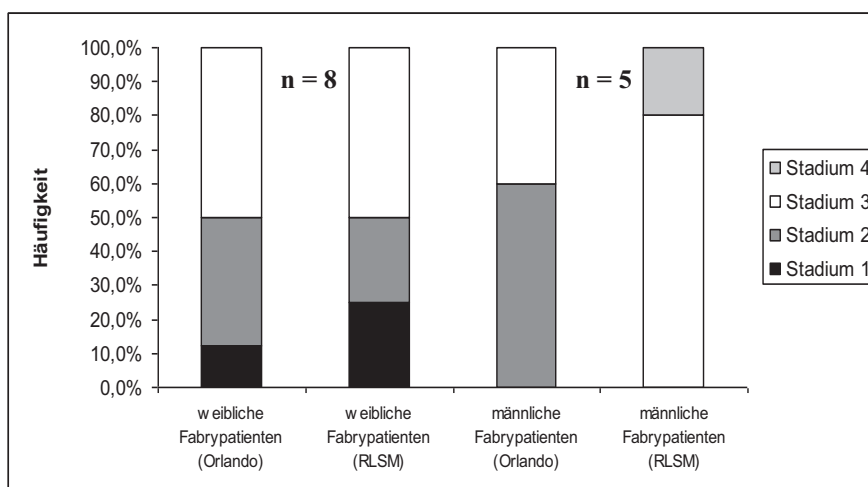


Abb. 46:
Spaltlampen- u. konfokalmikroskopische Schweregrade im Vergleich bei weiblichen u. männlichen Fabrypatienten

4.2.4. Auswertung der 3-dimensionalen Rekonstruktion

Die Möglichkeit der 3-dimensionalen Rekonstruktion wurde insbesondere zur Darstellung der Architektur und des räumlichen Verlaufs cornealer Nerven genutzt, aber auch zur Evaluation der Wundheilungsvorgänge nach Eingriffen wie zum Beispiel Lasik (Stachs et al. 2006, Tervo und Molainen 2003). Ebenso fand diese Methode Anwendung zur Auswertung von Keratozytendichtemessungen (Hahnel et al. 2000). Im Fall des Morbus Fabry lässt sich noch einmal veranschaulichen, dass die typischen und regelhaft auffindbaren, pathognomonischen Veränderungen insbesondere in der oberflächlichen Schicht der Hornhaut, bzw. der Basalzellschicht, lokalisiert sind. Die Akkumulationen von microdots finden sich vor allem im Bereich des anterioren Stromas und verlieren sich mit zunehmender Tiefe. Durch Umbau- und Erneuerungsvorgänge unter der Enzyersatztherapie für den Morbus Fabry bzw. durch Absetzen der Medikation bei Amiodaroneinnahme könnte sich ein von anterior nach posterior fortschreitender Regressionsprozess darstellen lassen. Aufgrund von Zelldichtemessungen konnte man feststellen, dass das Epithel der Hornhaut als oberflächlichste Schicht ständigen Wachstumsprozessen sowohl in horizontaler als auch in axialer Ausdehnung ausgesetzt ist (Eckard et al. 2006). Daher werden Veränderungen zuerst in dieser Schicht auffällig werden. Zusammenfassend dient die 3-dimensionale konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie der Tiefenlokalisation cornealer Strukturen und kann dazu beitragen, die Umbauvorgänge in den einzelnen Schichten zu visualisieren.

4.2.5. Diskussion der konjunktivalen Befunde

A) Bulbäre Konjunktiva

In der bulbären Konjunktiva beschrieben sowohl Mastropasqua et al. (Mastropasqua et al. 2006) als auch Macrae et al. (Macrae et al. 1985) und McCulloch et al. (McCulloch et al. 1984) bei Fabrypatienten deutliche Hyperreflektivitäten, die denen in der Cornea entsprechen. Solche Veränderungen traten in dieser Studie nicht auf. Becherzellen und Zellkerne können Streulichtquellen darstellen und als hyperreflektive Bildpunkte imponieren (Rath et al. 2006). Es kommen zum Teil Unterschiede im Hell-Dunkel-Erkennungsmuster identischer Strukturen vor. Besonders große Variationen von hypo- und hyperreflektiven Elementen finden sich in der Binnenstruktur von Becherzellen, aber auch das Zytoplasma kleinere Epithelzellen kann höher reflektiv erscheinen.

B) Tarsale Konjunktiva

Die von Mastropasqua (Mastropasqua et al. 2006) in der tarsalen Konjunktiva beschriebenen hyperreflektiven, punktförmigen Einschlüsse konnten gefunden werden. Sie unterscheiden sich jedoch nicht eindeutig von Hyperreflektivitäten, die in der tarsalen Konjunktiva von Normalprobanden nachgewiesen werden konnten. N. Knop und E. Knop (N. Knop und E. Knop 2000, 2005) bringen diese Hyperreflektivitäten mit Immunzellen in Verbindung, die sich sowohl in den Tränendrüsen, in der Tränenflüssigkeit als auch in der Konjunktiva befinden und als „eye-associated lymphoid tissue“ (EALT) zusammengefasst werden. Sie sind Teil des Immunsystems und verteilen sich beim Lidschluss über das Auge zum Schutz vor pathologischen Keimen. In der palpebralen und tarsalen Konjunktiva konnten die, mittels des RLSM gefundenen, Zellen als Lymphozyten (Durchmesser 10-12µm) klassifiziert werden (Zhivov et al. 2008).

Messmer et al. (Messmer et al. 2006) führten konfokalmikroskopische Untersuchungen zu Entzündungszuständen der Konjunktiven durch. Die Autoren bestätigten die Infiltration der tarsalen Konjunktiva mit hyperreflektiven Zellen auch im physiologischen Zustand. Das gesamte Stroma war von runden hyperreflektiven Zellen, die von ihnen ebenfalls als Lymphozyten klassifiziert wurden, übersät. Bei Vorliegen einer Konjunktivitis sei ein signifikanter Anstieg dieser inflammatorischen Infiltrate zu beobachten.

Kobayashi et al. (Kobayashi et al. 2005) konnten in ihren Studien zum konfokalmikroskopischen Aufbau der Konjunktiven bei 4 Normalprobanden sowohl in der bulbären Konjunktiva als auch in der tarsalen Konjunktiva hyperreflektive Zellen nachweisen. Die von ihm in der tarsalen Bindehaut gefundenen hellen Zellen, traten auch in unserem Normalprobandengut auf (Abb.33). Demzufolge handelt es sich bei diesen Strukturen um normale Plattenepithelzellen, die im Vergleich zur bulbären Konjunktiva kleiner und kompakter angeordnet sind. Diese Ergebnisse stimmen mit unseren überein.

Welche Zellstrukturen mit Hilfe des RLSM in der tarsalen Konjunktiva von Fabrypatienten nachgewiesen werden konnten, ist also nicht eindeutig geklärt. Eine konfokalmikroskopische Abgrenzung zwischen pathologischen Einschlüssen bei Morbus Fabry und diesen Immunzellen ist nicht immer möglich. Bei den 3 weiblichen und 3 männlichen Fabrypatienten mit auffälligem tarsal konjunktivalen Befund kann dennoch eine Verbindung zu den pathologischen Lipideinschlüssen beim Morbus Fabry nicht ausgeschlossen werden. Als spezifisches Merkmal zur Diagnosestellung genügen diese Veränderungen alleine allerdings nicht. Ähnlich wie bei den microdots im anterioren Stroma muss die Diagnose durch das Auffinden weiterer Symptome gesichert werden.

4.3. Fabry- und Amiodaronpatienten im zeitlichen Verlauf

Die Verlaufsbeobachtung von Fabry- und Amiodaronpatienten soll Aufschluss darüber geben, ob eine Rückbildung der Cornea verticillata sowie der konfokalmikroskopischen Befunde möglich ist und wie sich diese gestaltet. Von besonderem Interesse ist diese Fragestellung aufgrund der seit 2001 erhältlichen Enzymersatztherapie für Fabrypatienten. Entsprechend der vielfältigen Symptomatik des Morbus Fabry wendeten die involvierten Fachgebiete verschiedene Methodiken an, um die Wirkung der Therapie zu belegen. Anhand der Werteskala im Schmerzfragebogen BPI (Brief Pain Inventory) wurde eine Verbesserung der neuropathischen Schmerzsymptomatik nachgewiesen (Guffon und Fouilhoux 2004, Hilz et al. 2004, Hoffmann et al. 2005). Es zeigte sich ebenso eine Verbesserung der Hirndurchblutung (Moore et al. 2001, 2002). Schiffmann et al. (Schiffmann et al. 2001) wiesen dies bei der Niere anhand der Kreatinin-Clearance nach. Am Herzen konnte eine verringerte Masse des linken Ventrikels sowie reduzierte Dicke des Kammerseptums beobachtet werden (Bähler et al. 2003, Beck et al. 2004, Kampmann et al. 2008, Komamura et al. 2004, Spinelli et al. 2004, Weidemann et al. 2003). Anhand von Hautbiopsien zeigte sich eine Verringerung der Akkumulation von Gb₃ (Eng et al. 2001, Eto et al. 2005, Thurberg et al. 2004).

Eine Veränderung des Augenbefundes konnte nur bei einem von 5 im Verlauf beobachteten Fabrypatienten festgehalten werden. Diese Patientin (F12) erhielt seit eineinhalb Jahren die Enzymsubstitutionstherapie. Mit Hilfe des RLSM zeigte sich, dass die Einlagerungsintensität im direkten Vergleich zum Vorbefund abgenommen hatte. Das spaltlampenmikroskopische Erscheinungsbild gab hingegen keinen Anhalt über stattgefundene Veränderungen. Allerdings sind Unterschiede von einem Grad im Bereich der konfokalmikroskopischen Schweregradeinteilung im Vergleich zum Vorbefund nicht aussagekräftig genug. Nur bei einer deutlichen Reduktion von mindestens 2 Schweregraden in 75% der cornealen Bezirke (zentral oder peripher) oder einer kompletten Rückbildung kann eine Veränderung im Vergleich zum Vorbefund belegt werden. Dies war bei Patientin F12 nicht möglich.

Das völlige Verschwinden der Cornea verticillata wurde bisher nur bei Amiodaronpatienten beobachtet (D'Amico und Kenyon 1981, Francois 1969, Klingele et al. 1984, Russel et al. 1984, Seiler et al. 1977). Es wird von einer Zeitspanne von einigen Monaten nach Therapieende bis zum Verschwinden einer Cornea verticillata ausgegangen. Bei einem Patienten dieser Studie betrug der Zeitraum eineinhalb Jahre nach Absetzen der

Amiodarontherapie. Es bildeten sich sowohl die spaltlampenmikroskopische Cornea verticillata als auch die konfokalmikroskopischen Basalzelleinschlüsse zurück. Die microdots im anterioren Stroma können anhand unserer bisherigen Ergebnisse nicht zur Entscheidung über einen Rückbildungsprozess herangezogen werden.

Bangham und Dawson wiesen 1959 erstmals nach, dass der Pathomechanismus der Cornea verticillata durch amphiphile Medikamente wie Amiodaron getriggert wird (Bangham und Dawson 1959). Ein Absetzen des Medikaments kehrt diesen Vorgang um. Bei der Entstehung der Cornea verticillata bei Morbus Fabry kommt es aufgrund der Inaktivität der Alpha-Galactosidase, einem weiteren wichtigen Enzym des Phospholipidstoffwechsels, zur Anreicherung von Gb₃ in den Lysosomen von Zellen. Ob auch dieser Vorgang durch Ersatz des defekten Enzyms (Enzymsubstitutionstherapie) reversibel ist, konnte bisher noch nicht endgültig bewiesen werden (Morris et al. 2003). Dennoch ist mit Hilfe des RLSM eine Möglichkeit entstanden, diesen Prozess auf mikrostruktureller Ebene weiter zu verfolgen.

5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

1910 beschrieb B. Fleischer zum ersten Mal die in Wirbelform auftretende Hornhautdystrophie *Cornea verticillata*. 1969 wurde sie von Francois mit der erblichen Stoffwechselerkrankung Morbus Fabry in Verbindung gebracht. Der Morbus Fabry ist eine multifaktorielle Erkrankung, die oft erst zu spät diagnostiziert wird und tödliche Folgen haben kann. Zusätzlich leiden diese Patienten unter starken Schmerzen in den Extremitäten, welche durch die Schädigung peripherer Nerven entstehen und oft eine langwierige Schmerzanamnese mit Konsultation unterschiedlicher Ärzte nach sich ziehen. Aber eben diese oft verkannten anderen Symptome können dazu beitragen, den Morbus Fabry rechtzeitig zu erkennen und ihn, der seit 2001 erhältlichen, Enzymersatztherapie zuzuführen. Neben gastrointestinalen Beschwerden, Hypo- oder Anhidrose und Angiokeratomen ist die *Cornea verticillata* eine der sensitivsten Frühmanifestationen. Hierbei muss allerdings die Differentialdiagnostik berücksichtigt werden. Sehr oft findet man die *Cornea verticillata* nämlich bei Einnahme amphiphiler Medikamente. Ein Hauptvertreter: das Antiarrhythmikum Amiodaron.

Mit Hilfe des RLSM wurde die Mikrostruktur der *Cornea verticillata* unterschiedlicher Genese in einem hochauflösenden Verfahren, in-vivo und nicht invasiv untersucht.

Die Basalzellschicht des cornealen Epithels stellte sich sowohl bei der Morbus Fabry assoziierten als auch bei der Amiodaron induzierten *Cornea verticillata* als Hauptträger der mikrostrukturellen Veränderungen heraus. Bedingt durch die Einlagerung von Lipidmaterial nimmt die Streulichtintensität der Basalzellen enorm zu und es zeigt sich das Bild von hyperreflektiven Zellen auf dunklem Grund – der sogenannte Sternenhimmel. Diese Veränderungen ließen sich entsprechend der Einlagerungsintensität einem Gradingssystem zuordnen. Das System konnte auch auf die spaltlampenmikroskopische Stadieneinteilung übertragen werden. Es fand Anwendung in den folgenden Verlaufsbeobachtungen und gab Aufschluss über die Bildung und Rückbildung cornealer Veränderungen.

Im Bereich des anterioren Stromas traten nadelstichartige, kleine weiße Hyperreflektivitäten auf, sogenannte microdots. Besonders dicht und in hoher Intensität kamen sie im Zusammenhang mit der Einnahme von Amiodaron zur Darstellung. Sie zeigten keine Assoziation mit der spaltlampenmikroskopischen *Cornea verticillata* und den

Basalzelleinschlüssen, fanden sich zum Teil aber auch bei Normalprobanden und stellen daher kein spezifisches Diagnosekriterium dar.

Eine anschließende 3-dimensionale Rekonstruktion der konfokalmikroskopischen Hornhautbefunde erlaubte die Tiefenlokalisierung und Übersichtsdarstellung der Ergebnisse.

Während bei allen untersuchten Fabry- und Amiodaronpatienten die bulbäre Konjunktiva unauffällig blieb, zeigte sich in der tarsalen Konjunktiva eine starke Zunahme der Epithelzellhyperreflektivität. Neben einer großen Anzahl von hyperreflektiven Lymphozyten und auch physiologischerweise zum Teil vermehrt reflektierenden Epithelzellen, fiel eine Abgrenzung zum Normalprobandengut schwer und der Befund kann nicht als diagnostisches Kriterium gewertet werden.

Unter Verwendung der gewonnenen Ergebnisse wurden Fabry- und Amiodaronpatienten im zeitlichen Verlauf betrachtet. Von großem Interesse waren diese Untersuchungen zum Einen, um eine Diagnose des Morbus Fabry anhand cornealer Zellbefunde bei entsprechenden Symptomen zu objektivieren und zum Anderen um eine bisher noch nicht nachweisbare Wirkung der Enzyersatztherapie des Morbus Fabry auf das Auge zu belegen. Mit Hilfe des RLSM entsteht die Möglichkeit, Vorgänge auf Ebene der Mikromorphologie festzuhalten und es erscheint logisch, dass damit sehr frühe Veränderungen erfasst werden können.

Bei dieser Anzahl an Fabrypatienten trat keine Diskrepanz zwischen spaltlampenmikroskopischen- und konfokalmikroskopischen Befunden auf. Hinweise auf eine mögliche Frühdiagnostik fanden sich bei einem Amiodaronpatienten. In diesem Fall traten präspaltlampenmikroskopische Befunde auf, die mittels des RLSM nachgewiesen werden konnten.

Bei der zeitlichen Untersuchung von Fabrypatienten unter Enzyersatztherapie zeigte einer von 5 im Verlauf beobachteten Patienten eine Änderung im Augenbefund. Diese konnte nur mittels des RLSM erfasst werden und war zu gering, um einen generellen Regressionsprozess zu belegen.

Bei Amiodaronpatienten fand eine vollständige Rückbildung der spaltlampenmikroskopischen Cornea verticillata und auch der Basalzelleinschlüsse eineinhalb Jahre nach Absetzen der Medikation statt.

Anhand dieser Studie konnten Ergebnisse gewonnen werden, die sowohl auf eine erweiterte bzw. frühere Diagnostik des Morbus Fabry als auch auf eine mögliche Verlaufsbeobachtung unter Enzyersatztherapie mittels des RLSM hinweisen. Es ist daher unbedingt erforderlich,

weitere Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Patienten über einen längeren Zeitraum zur endgültigen Klärung der Problematik durchzuführen.

Die konfokale Laser-Scanning In-vivo-Mikroskopie ist eine hervorragende Methode, um Veränderungen auf Ebene der Zellmorphologie zu untersuchen. Sie bietet die Möglichkeit mikrostrukturelle Vorgänge genau aufzuschlüsseln sowie deren Verlauf zu beobachten und zu dokumentieren. Die Manifestationen insbesondere auf Ebene der Basalzellschicht, aber vielleicht auch des Stromas und der Konjunktiven könnten eventuell Aufschluss darüber geben, ob eine Frühdiagnostik von Fabrypatienten anhand des Augenbefundes möglich ist und die neu entwickelte Enzymersatztherapie Wirkung zeigt, ohne dafür aufwendige Biopsien entnehmen zu müssen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abe H, Sakai T, Sawaguchi S, Hasegawa S, Takagi M, Yoshizawa T, Usui T, Horikawa Y. Ischemic optic neuropathy in a female carrier with Fabry's disease. *Ophthalmologica*. 1992; 205(2):83-8

Andersen M, Dahl H, Fledelius H, Nielsen N. Central artery occlusion in a patient with Fabry's disease documented by scanning laser ophthalmoscopy. *Acta ophthalmologica*. 1994; 72: 635-638

Bähner F, Kampmann C, Whybra C, Miebach E, Wiethoff CM, Beck M. Enzyme replacement therapy in heterozygous females with Fabry disease: results of a phase IIIB study. *J Inher Metab Dis*. 2003; 26: 617-27

Bangham AD, Dawson RMC. The relation between the activity of a lecithinase and the electro-phoretic charge of the substrate. *Biochem. J*. 1959; 72: 486

Bastion ML, Mohamad MH. Study of the factors associated with the prevalence of white dots in the corneas of regular soft contact lens users from Asian country. *Eye Contact Lens*. 2006; 32(5): 223-7

Beck M, Ricci R, Widmer U, Dehout F, de Lorenzo AG, Kampmann C, Linhart A, Sunder-Plassmann G, Houge G, Ramaswami U, Gal A, Mehta A. Fabry disease: overall effects of agalsidase alfa treatment. *Eur J Clin Invest*. 2004; 34: 838-44

Benitez del Castillo JM, Wasfy MA, Fernandez C, Garcia-Sanchez J. An in vivo confocal masked study on corneal epithelium and subbasal nerves in patients with dry eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45 (9): 3030-5

Böhnke M, Masters BR. Long-term contact lens wear induces a corneal degeneration with microdot deposits in the corneal stroma. *Ophthalmology*. 1997; 104(11): 1887-96

Brady RO, Tallman JF, Johnson WG, Gal AE, Leahy WR, Quirk JM et al. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified ceramidtrihexosidase in Fabry's disease. *N Engl J Med*. 1973; 289: 9-14

Bron AJ. Vortex patterns of the corneal epithelium. *Trans Ophthalmol Soc UK*. 1973; 93: 455-472

Calmette L, Deodati F, Cupre A, Bec P. Manifestations oculaires du syndrome de Fabry. *Bull Soc Ophthalmol*. 1959; 6 : 513-517

Chew E, Ghosh M, McCulloch C. Amiodarone-induced cornea verticillata. *Can J Ophthalmol*. 1982;17(3):96-9

Ciancaglini M, MD, Carpineto P, MD, Zuppari E, MD, Nubile M, MD, Doronzo E, MD, Mastropasque L, MD. In Vivo Confocal Microscopy of Patients With Amiodarone-induced Keratopathy. *Cornea*. 2001; 20(4): 368-373

D'Amico DJ, Kenyon KR. Drug-induced lipidoses of the cornea and conjunctiva. *Int. Ophthalmol.* 1981; 4 (1-2): 67-76

Denden A. Über die Erbllichkeit der Dystrophia cornea verticillata. *Albrecht v. Graefes Arch. klin. exp. Ophthalmol.* 1966; 169: 264-271

Desnick RJ, Banikazemi M, Wasserstein M. Enzyme replacement therapy for Fabry disease, an inherited nephropathy. *Clinical Nephrology*. 2002; Vol. 57 – No.1: 1-8

Dolan BJ, Flach AJ, Peterson JS. Amiodarone keratopathy and lens opacities. *J Am Optom Assoc.* 1985; 54: 468-70

Eckard A, MD, Stave J, MD, Guthoff RF, MD. In Vivo Investigations of the Corneal Epithelium With the Confocal Rostock Laser Scanning Microscope (RLSM). *Cornea*. 2006; Vol. 25, No. 2: 127-131

Elfron N. Contact lens-induced changes in the anterior eye as observed in vivo with the confocal microscope. *Prog Retin Eye Res.* 2007; 26(4): 398-436

Eng CM, Banikazemi M, Gordon RE, Goldman M, Phelps R, Kim L, Gass A, Winston J, Dikman S, Fallon JT, Brodie S, Stacy CB, Mehta D, Parson R, Norton K, O'Callaghan M, Desnick RJ. A phase 1/2 clinical trial of enzyme replacement in fabry disease: pharmacokinetic, substrate clearance, and safety studies. *Am J Hum Genet.* 2001; 68: 711-22

Erdelyi B, Kraak R, Zhivov A, Guthoff R, Nemeth J. In vivo confocal laser scanning microscopy of the cornea in dry eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2007; 245: 39-44

Elleder M. Sequelae of storage in Fabry disease – pathology and comparison with other lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr Suppl.* 2003; 92: 46-53

Eto Y, Ohashi T, Utsunomiya Y, Fujiwara M, Mizuno A, Inui K, Sakai N, Kitagawa T, Suzuki Y, Mochizuki S, Kawakami M, Hosoya T, Owada M, Sakuraba H, Saito H. Enzyme replacement therapy in Japanese Fabry disease patients : The results of a phase 2 bridging study. *J Inher Metab Dis.* 2005; 28: 575-83

Fabry H. Angiokeratoma corporis diffusum – Fabry disease: historical review from the original description to the introduction of enzyme replacement therapy. *Acta Paediatr.* 2002; Suppl 439: 3-5

Flach AJ, Dolan BJ, Sudduth B, Weddell J. Amiodarone-induced lens opacities. *Arch Ophthalmol.* 1983; 101(10):1554-6

Fleischer B. Über eine eigenartige bisher nicht bekannte Hornhauttrübung. *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthalmol.* 1910; 77: 136-40

- Font RL, Fine BS. Ocular pathology in Fabry's disease. Histochemical and electron microscopic observation. *Am J Ophthalmol.* 1972; 73: 419-430
- Franceschetti A. Fabry's disease: Ocular manifestations; in Bergsma D, Bron AJ, Cottlier E (eds.). *The Eye and Inborn Errors in Metabolism.* National Foundation, March of Dimes, Original Articles Series. New York, Liss. 1976; Vol. 12: pp 195-208
- Francois J. Cornea verticillata. *Docum. Ophthal. (Den Haag).* 1969; 27: 235-250
- Francois J, Hanssens M, Teuchy H. Corneal Ultrastructural Changes in Fabry's Disease. *Ophthalmologica.* 1978; Basel 176: 313-330
- Fumex-Boizard L, Chocat P, Fouilhoux A, Guffon N, Denis P. Relation entre les manifestations ophtalmologiques et les atteintes gènèrales chez dix patients atteints de la maladie de Fabry. *J Fr. Ophtalmol.* 2005; 28,1: 45-50
- Goldblum D, Garweg JG. Amiodarone-induced cornea verticillata. *Postgrad Med J.* 1998; 74(877): 642
- Grau AJ, Schwaninger M, Goebel HH, Beck M. Morbus Fabry: Eine lysosomale Stoffwechselerkrankung mit neuen therapeutischen Möglichkeiten. *Nervenarzt.* 2003; 74: 489-496
- Green HL, Graham EL, Werner JA, Sears GK, Gross BW, Gorham JP, Kudenchuk PJ, Trobaugh GB. Toxic and therapeutic effects of amiodarone in the treatment of cardiac arrhythmias. *J Am Coll Cardiol.* 1983; 2:1114-28
- Grüber M. Cornea verticillata. *Ophthalmologica (Basel).* 1946; 111: 120-123
- Grüber M. Beitrag zur Kenntnis der Morphologie der familiären Hornhautdegeneration. *Ophthalmologica (Basel).* 1953; 125: 380-389
- Guffon N, Fouilhoux A. Clinical benefit in Fabry patients given enzyme replacement therapy-a case series. *J Inherit Metab Dis.* 2004; 27: 221-7
- Gullstrand A. Demonstration der Nernst-Spaltlampe. *Ber Dtsch ophthalmol Ges.* 1911; 37: 374-367
- Gupta S, Ries M, Kotsopoulos S, Schiffmann R. The Relationship of Vascular Glycolipid Storage to Clinical Manifestations of Fabry Disease, A Cross-Sectional Study of a Large Cohort of Clinically Affected Heterozygous Women. *Medicine.* 2005; Volume 84, Number 5: 261-268
- Guthoff RF, Baudouin C, Stave J. *Atlas of Confocal Laser Scanning In-vivo Microscopy in Ophthalmology.* Springer, Berlin Heidelberg New York. 2006
- Guthoff RF, Pauleikhoff D, Hingst V. *Bildgebende Diagnostik in der Augenheilkunde.* Enke Verlag. 1999

Guthoff RF, MD, Wiens H, Hahnel C, PhD, Wree A, MD. Epithelial Innervation of Human Cornea, A Three-Dimensional Study Using Confocal Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Cornea*. 2005; Vol. 24, No. 5, 608-613

Hahnel C, PhD, Somodi S, MD, Weiss DG, PhD, Guthoff RF, MD. The Keratocyte Network of Human Cornea: A Three-Dimensional Study Using Confocal Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Cornea*. 2000; 19(2): 185-93

Harris L, McKenna WJ, Rowland E, Krikler DM. Side effects and possible contraindications of amiodarone use. *Am Heart J*. 1983; 106: 916-22

Hauser AC, Lorenz M, Voigtländer T, Födinger M, Sunder-Plassmann G. Results of an Ophthalmic Screening Programme for Identification of Cases with Anderson-Fabry Disease. *Ophthalmologica*. 2004; 218: 207-209

Heydenreich A. *Innere Erkrankungen und Auge*. Georg Thieme Leipzig. 1975

Hilz MJ, Brys M, Marthol H, Stemper B, Dütsch M. Enzyme replacement therapy improves function of C-, Delta-, and Abeta-nerve fibers in Fabry neuropathy. *Neurology*. 2004; 62: 1066-72

Hoffmann B, Garcia de Lorenzo A, Mehta A, Beck M, Widmer U, Ricci R. Effects of enzyme replacement therapy on pain and health related quality of life in patients with Fabry disease: data from FOS (Fabry Outcome Survey). *J Med Genet*. 2005; 42: 247-52

Hirano K, Murata K, Miyagawa A, Terasaki H, Saigusa J, Nagasaka T, Kobayashi M. Histopathologic findings of cornea verticillata in a woman heterozygous for Fabry's disease. *Cornea*. 2001; 20(2): 233-6

Hyatt RH, Sinha B, Vallon A, Bailey RJ, Martin A. Non cardiac side-effects of long term oral amiodarone in the elderly. *Age Ageing*. 1988; 17: 116-22

Ingram DV, Jaggarao NSV, Chamberlain DA. Ocular changes resulting from therapy with amiodarone. *Br J Ophthalmol*. 1982; 66: 676-9

Ishii S, Chang H, Kawaski K, Yasudo K, Wu H, Garman SC, Fan J. Mutant α -galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem J*. 2007; 406: 285-295

Itoh K, Kotani M, Tai T, Suzuki H, Utsunomiya T, Inoue H, Yamada H, Sakuraba H, Suzuki Y. Immunofluorescence imaging diagnosis of Fabry heterozygotes using confocal laser scanning microscopy. *Clin Genet*. 1993; 44(6):302-6

Jacobi C, Dietrich T, Cursiefen C, Kruse FE. The dry eye. Current concepts on classification, diagnostics, and pathogenesis. *Ophthalmologie*. 2006; 103 (1): 9-17

Kampik A, Grehn F. *Augenärztliche Diagnostik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 2003

- Kampmann C, Linhart A, Baehner F, Palecek T, Wiethoff CM, Miebach E, Whybra C, Gal A, Bultas J, Beck M. Onset and progression of the Anderson-Fabry disease related cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2008; 28;130(3):367-73
- Kaufman SC, Hamano H, Beuerman RW, Lared JA, Thompson HW. Transient corneal stromal and endothelial changes following soft contact lens wear: a study with confocal microscopy. *CLAO J.* 1996; 22(2): 127-32
- Kerin NZ, Aragon E, Fritel K, Frumin H, Rubenfire M. Long-term efficacy and toxicity of high- and low-dose amiodarone regimens. *J Clin Pharmacol.* 1989; 29:418-23
- Klinge TG, Alves LE, Rose EP. Amiodarone keratopathy. *Ann Ophthalmol.* 1984; 16(12):1172-6
- Knop E, Knop N. The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. *J. Anat.* 2005; 206: pp271-285
- Knop N, Knop E. Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue in the Human Eye. *IOVS.* 2000; Vol. 41, No. 6: 1270-1279
- Kobayashi A, Yoshita T, Sugiyama K. In Vivo Findings of the Bulbar/Palpebral Conjunctiva and Presumed Meibomian Glands by Laser Scanning Confocal Microscopy. *Cornea.* 2005; 24(8): 985-88
- Konrad G, Kohlschutter A, Aust W. Significance of early ophthalmologic detection of Fabry disease. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 1984; 185(6):535-8
- Komamura K, Higashi M, Yamada N. Improvement of cardiac hypertrophy and ventricular function in a man with Fabry disease by treatment with recombinant alpha-galactosidase A. *Heart.* 2004; 90: 617
- Kühnel W. Taschenatlas der Zytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 2002; 11. Aufl.: 464-70
- Lang GK. Augenheilkunde, Verstehen-Lernen-Anwenden. Georg Thieme Verlag Stuttgart. 2004
- Lee K, Jin X, Zhang K, Copertino L, Andrews L, Baker-Malcom J, Geagan L, Qui H, Seiger K, Barngrover D, McPherson J, Edmunds T. A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. *Glycobiology.* 2003; 13 (4): 305-313
- Libert J, MD, Tondeur M, MD, Van Hoof F, MD. The Use of Conjunctival Biopsy and Enzyme Analysis in Tears for Diagnosis of Homozygotes and Heterozygotes With Fabry Disease. *Birth defects Original Article Series.* 1976; 12 (3): 221-239

- Lüllmann H, Lüllmann-Rauch R, Wassermann O. Lipidosis induced by amphiphilic cationic drugs. *Biochem Pharmacol.* 1978; 27(8):1103-8
- Lutz A. Über wirbelförmige Trübung beider Hornhäute bei Mutter und Tochter. (Ein Beitrag zur Lehre von der normalen Säftestörung in der Cornea). *Albrecht v. Graefes Arch. Ophthalmol.* 1930; 128: 704-720
- Lyon MF. Gene action in the X-Chromosom of the mouse. *Nature.* 1961; 190: 372-3
- Lyon MF. X-chromosome inactivation: a repeat hypothesis. *Cytogenetic Cell Genet.* 1998; 80: 133-7
- Macrae WG, Ghosh M, McCulloch C. Corneal Changes in Fabry's disease: A clinico-pathologic case report of a heterozygote. *Ophthalmic Paediatrics and Genetics.* 1985; 5 (3): 185-190
- Mantjarvi M, Tuppurainen K, Ikaheimo K. Ocular side effects of amiodarone. *Surv Ophthalmol.* 1998; 42: 360-6
- Mastropasqua L, MD, Nubile M, MD, Lanzini M, MD, Carpineto P, MD, Toto L, MD, Ciancaglini M, MD. Corneal and Conjunctival Manifestation in Fabry Disease: In Vivo Confocal Microscopy Study. *Am J Ophthalmol.* 2006; 141: 709-718
- McCulloch C, MD, Gosh M, MD. Ultrastructural changes in the cornea and conjunctiva of a heterozygous woman with Fabry's disease. *Can J Ophthalmol.* 1984; Vol 19, No. 4: 192-198
- Medin JA, Tudor M, Simovitch R, Quirk JM, Jacobson S, Murray GJ, Brady RO. Correction in trans for Fabry disease: expression, secretion and uptake of α -galactosidase A in patient-derived cells driven by a high-titer recombinant retroviral vector. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93: 7917-22
- Mehta A, Ricci R, Widmer U, Dehout F, Garcia de Lorenzo A, Kampmann C, Linhart A, Sunder-Plassmann G, Ries M, Beck M. Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest.* 2004; 34: 236-42
- Messmer E, Mackert M, Zapp D, Kampik A. In Vivo Confocal Microscopy of Normal Conjunctiva and Conjunctivitis. *Cornea.* 2006; 25 (7): 781-8
- Moore DF, Altarescu G, Ling GS, Jeffries N, Frei KP, Weibel T, Charria-Ortiz G, Ferri R, Arai AE, Brady RO, Schiffmann R. Elevated cerebral blood flow velocities in Fabry disease with reversal after enzyme replacement. *Stroke.* 2002; 33: 325-31
- Moore DF, Scott LT, Gladwin MT, Altarescu G, Kaneski C, Suzuki K, Pease-Fye M, Ferri R, Brady O, Herscovitch P, Schiffmann R. Regional cerebral hyperperfusion and nitric oxide pathway dysregulation in Fabry disease: reversible by enzyme replacement therapy. *Circulation.* 2001; 104: 1506-12

- Morris S, Tranos P, Evans S, Mehta AB, Davey C. Ocular manifestation of Fabry disease: effect of enzyme replacement therapy. *Acta Paediatr Suppl.* 2003; 443: 110-115
- Nagel S, Wiegand W, Thaer AA, Geyer OC. Light scattering study of the cornea in contact lens patients. In vivo studies using confocal slit scanning microscopy. *Ophthalmologe.* 1996; 93(3): 252-6
- Nguyen TT, Gin T, Nicholls K, Low M, Galanos J, Crawford A. Ophthalmological manifestations of Fabry disease: a survey of patients at the Royal Melbourne Fabry Disease Treatment Centre. *Clin Experiment Ophthalmol.* 2005; 33 (2): 164-168
- Ohkubo H. Several Functional and Fluorescein Fundus Angiographic Findings in Fabry's Disease. *Ophthalmologica, Basel.* 1988; 196: 132-136
- Ohshima T, Murray G, Swaim WD, Longenecker G, Quirk JM, Cardarelli CO, Sugimoto Y, Pastan I, Gottesman MM; Brady RO, Kulkarni AB. α -Galactosidase A deficient mice: A model of Fabry disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; Vol. 94, pp. 2540-2544
- Orlando RG, MD, Dangel ME, MD, Schaal SF, MD. Clinical Experiences and Grading of Amiodaron Kera-topathy. *Ophthalmology.* 1984; Volume 91 Number 10: 1184-7
- Orssaud C, Dufier JL, Germain DP. Ocular manifestation in Fabry disease: a survey of 32 hemizygous male patients. *Ophthalmic Genetics.* 2003; Vol. 24 No. 3: pp. 129-139
- Patel DV, McGhee CN. Mapping of the normal human corneal sub-basal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005; 46(12):4485-8
- Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Confocal microscopy in vivo in corneas of long-term contact lens wearers. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002; 43(4): 995-1003
- Pollak PT. Clinical organ toxicity of antiarrhythmic compounds: ocular and pulmonary manifestations. *Am J Cardiol.* 1999; 84:37-45
- Rath R, Stave J, Guthoff RF, Giebel J, Tost F. In-vivo-Darstellung des Bindehautepithels, Eine vergleichende morphologische Untersuchung mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie und Impressionszytologie. *Ophthalmologe.* 2006; 103: 401-405
- Reader EA, Podrid PF, Lown B. Side effects and complications of amiodarone therapy. *Am Heart J.* 1985; 109: 975-83
- Ries M, Ramaswami U, Parini R, Lindblad A, Whybra C, Willers I, Gal A, Beck M. The early clinical phenotype of Fabry disease: a study on 35 European children and adolescents. *Eur J Pediatr.* 2003; 162: 767-772
- Rolfs A, Böttcher T, Zschesche M, Morris P, Winchester B, Bauer P, Walter U, Mix E, Lühr M, Harzer K, Strauss U, Pahnke J, Grossmann A, Benecke R. Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. *Lancet.* 2005; 366: 1794-96

- Rosenbaum MB, Chiale PA, Halpern MA et al. Clinical efficacy of amiodarone as an antiarrhythmic agent. *Am J Cardiol.* 1976; 38: 934-944
- Russel T, Grutzmacher R, Coster D. Patterns of superficial keratopathy. *Australian Journal of Ophthalmology.* 1984; 12: 301-316
- Scheuerle AF, Schmidt E. *Atlas of Laser Scanning Ophthalmoscopy.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag. 2004
- Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA III, Sabnis S, Moore DF, Weibel T et al. Enzyme replacement therapy in Fabry disease. A randomized controlled trial. *JAMA.* 2001; 285: 2743-9
- Seiler KU, Thiel HJ, Wassermann O. Die Chloroqhinkeratopathie als Beispiel einer arzneimittelinduzierten Phospholipidosis (Zugleich ein Beitrag zur Pathogenese der Cornea verticillata). *Klin. Mbl. Augenheilkd.* 1977; 170: 64-73
- Senn B, Capone A, Spina G, Emmenegger M. Fabry disease, an ophthalmic-neuro-dermatocardi-nephrologic problem. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 1995; 206(5):369-70
- Sher NA, Reiff W, Letson RD, Kesnick RJ. Central retinal artery occlusion complicating Fabry's disease. *Arch Ophthalmol.* 1978; 96: 815-817
- Sher NA, MD, Letson RD, MD, Desnick RJ, MD, PhD. The ocular Manifestation in Fabry's Disease. *Arch Ophthalmol.* 1979; 97: 671-676
- Slowik C, Somodi S, von Gruben C, Richter A, Guthoff R. Erfassung morphologischer Hornhautveränderungen infolge Chloroqhinterapie mit Hilfe der konfokalen In-vivo-Mikroskopie. *Ophthalmologe.* 1997; 94: 147-151
- Sodi A, Ioannidis AS, Mehta A, Davey C, Beck M, Pitz S. Ocular manifestations of Fabry's disease: data from the Fabry Outcome Survey. *Br J Ophthalmol.* 2006; 91(2):210-4
- Spaeth GL, Frost P. Fabry's disease: Ist ocular manifestation. *Arch Ophthalmol.* 1965; 74: 760-769
- Spinelli L, Pisani A, Sabbatini M, Petretta M, Andreucci MV, Procaccini D, Lo Surdo N, Federico S, Cianciaruso B. Enzyme replacement therapy with agalsidase beta improves cardiac involvement in Fabry's disease. *Clin Genet.* 2004; 66: 158-65
- Stachs O, Knappe S, Zhivov A, Kraak R, Stave J, Guthoff RF. 3D-konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie der kornealen epithelialen Nervenstruktur. *Klin Monatsbl Augenheilkd.* 2006; 223: 583-588
- Stave J, Zinser G, Grümmer G, Guthoff R. Der modifizierte Heidelberg-Retina-Tomograph HRT, Erste Ergebnisse einer In-vivo-Darstellung von kornealen Strukturen. *Ophthalmologe.* 2002; 99: 276-280

Straub W, Kroll P, Kuchle HJ. Augenärztliche Untersuchungsmethoden. Enke Verlag. 1995

Strotmann J, Weidemann F, Breunig F, Knoll A, Wanner C, Ertl G. Morbus Fabry of the heart. Why should cardiologists care? *Z Kardiol.* 2005; 94: 557-563

Takenaka T, Hendrickson CS, Tworek DM, Tudor M, Schiffmann R, Brady RO, Medin JA. Enzymatic and functional correction along with long-term enzyme secretion from transduced bone marrow hematopoietic stem/progenitor and stromal cells derived from patients with Fabry disease. *Exp Hematol.* 1999; 27: 1149-59

Tervo T, Moilanen J. In vivo confocal microscopy for evaluation of wound healing following corneal refractive surgery. *Prog Retin Eye Res.* 2003; 22(3):339-58

Trittibach P, Cadez R, Eschmann R, Sarra GM, Boehnke M, Frueh BE. Determination of microdot stromal degenerations within corneas of long-term contact lens wearers by confocal microscopy. *Eye Contact Lens.* 2004; 30(3): 127-31

Tsutsumi A, Yukio U, Kanai T, Tsutsumi O, Satoh K, Sakamo S. Corneal Findings in a Foetus with Fabry's Disease. *Acta ophthalmologica.* 1984; 62: 923-931

Tuppurainen K, Collan Y, Rantanen T, Hollmen A. Fabry's disease and cornea verticillata. A report of 3 cases. *Acta ophthalmol (Copenh).* 1981; 59: 647-682.

Thurberg BL, Randolph Byers H, Granter SR, Phelps RG, Gordon RE, O'Callaghan M. Monitoring the 3-years efficacy of enzyme replacement therapy in fabry disease by repeated skin biopsies. *J Invest Dermatol.* 2004; 122: 900-8

Ucakhan OO, Kanpolat A, Ylmaz N, Ozkan M. Amiodarone keratopathy: an in vivo confocal microscopy study. *Eye Contact Lens.* 2005; 31(4):148-57

Vrobel TR, Miller PE, Mostow ND, Rakita L. A general overview of amiodarone toxicity : its prevention, detection, and managment. *Prog Cardiovasc Dis.* 1989; 31: 393-426

Wanner C, Breunig F, Schaefer RM. Empfehlungen für das Management von Patienten mit Morbus Fabry und Nierenbeteiligung. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten.* 2005; 34 (9): 412-422

Webb RH. Theoretical basis of confocal microscopy. *Methods Enzymol.* 1999; 307:3-20

Weidemann F, Breunig F, Beer M, Sandstede J, Turschner O, Voelker W, Ertl G, Knoll A, Wanner C, Strotmann JM. Improvement of a cardiac function during enyzme replacement therapy in patients with Fabry disease: a prospective strain rate imaging study. *Circulation.* 2003; 108: 1299-301

Weingeist TA, Blodi FC. Fabry's disease: ocular findings in a female carrier. A light and electron microscopy study. *Arch Ophthalmol.* 1971; 85(2):169-76

Whitley CB, Tsai MY, Heger JJ, Prystowsky EN, Zipes DP. Amiodarone phenocopy of Fabry's keratopathy. JAMA.1983; 249(16):2177-8

Wilson FM, Schmitt TE, Grayson M. Amiodarone-induced cornea verticillata. Ann Ophthalmol. 1980; 12: 657-660

Witschel H, Meyer W. Der Morbus Fabry als Beispiel einer erblichen Lipoidspeicherkrankheit, Neuere Gesichtspunkte zur Pathogenese, Klinik, Morphologie. Klin Wochenschr. 1968; 46, Heft 2: 72-76

Yanoff M, Fine BS. Ocular Pathology. Harper and Row, Hagerstown/Maryland. 1975; 293-295

Young E, Mills K, Morris P, Vellodi A, Lee P, Waldek S, Winchester B. Is Globotriacylglyceride a useful biomarker in Fabry disease?. Acta Paediatrica. 2005; 94 (447): 51-54

Zhivov A, MD, Stachs O, PhD, Kraak R, MD, Stave J, PhD, Guthoff RF, MD. In Vivo Confocal Microscopy of the Ocular Surface. The Ocular Surface. 2006; Vol.4 No.2: 81-93

Zhivov A, Stachs O, Kraak R, Guthoff R. Zelluläre Lasermikroskopie zur Detektion von Infiltraten und Ulzera der Hornhaut. Klin Monatsbl Augenheilkd. 2008; 225: 86-90

Zhivov A, Stachs O, Stave J, Guthoff RF. In-vivo Three-Dimensional Confocal Laser Scanning Microscopy of Corneal Surface and Epithelium. Br J Ophthalmol. 2008. [Epub ahead of print]

Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R . In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium.Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2005; 243(10):1056-61

Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R. In vivo confocal microscopic evaluation of langerhans cell density and distribution in the corneal epithelium of healthy volunteers and contact lens wearers. Cornea. 2007; 26(1): 47-54

7. THESEN

1. In dieser Studie trat die Cornea verticillata bei 10 von 21 weiblichen (47,6%) und bei 6 von 9 männlichen (66,7%) Fabrypatienten auf und ist somit nicht nur eine der frühesten, sondern auch eine der häufigsten Symptome des Morbus Fabry. Seit 2001 existiert eine Therapie für diese X-chromosomale Erkrankung, an der Patienten bereits im Alter von 30 Jahren aufgrund von Schlaganfällen oder Herzinfarkten versterben können. Die Frage der Frühdiagnostik und auch der Wirkung der Enzymersatztherapie ist daher von großer Bedeutung.

2. Mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning In-vivo-Mikroskopie konnte die Cornea verticillata unterschiedlicher Genese im Vergleich mit der konventionellen Spaltlampenmikroskopie sehr gut dargestellt werden. Das Rostocker Laser Scanning Mikroskop (RLSM) liefert eine 400-800fache Gesamtvergrößerung und ermöglicht somit die nicht invasive Beurteilung der cornealen Zellmorphologie.

3. Es wurden alle mit dem RLSM erfassbaren Schichten der Hornhaut sowie zusätzlich die bulbäre und tarsale Konjunktiva beurteilt. Aus den gewonnenen Ergebnissen konnte im weiteren Verlauf mit Hilfe eines gerätetypischen Z-Scans eine 3-dimensionale Rekonstruktion der Hornhaut erfolgen.

4. Insgesamt nahmen 52 Patienten an dieser Studie teil: 30 Fabrypatienten, 12 Probanden, die unter Amiodarontherapie eine Cornea verticillata entwickelten sowie 10 Normalprobanden. Jeweils 5 Fabry- und Amiodaronpatienten wurden im zeitlichen Verlauf untersucht.

5. 26,7 % der Fabrypatienten dieser Studie wurden erstmals anhand der Cornea verticillata durch die spaltlampenmikroskopische Untersuchung beim Augenarzt auffällig. Es ergibt sich die Frage, ob eine noch breitere Erfassung von Fabrypatienten auch ohne Cornea verticillata anhand mikrostruktureller Veränderungen durch das RLSM erfolgen kann

6. Sowohl bei Fabry- als auch Amiodaronpatienten stellte die Basalzellschicht den Hauptträger mikrostruktureller Veränderungen bei Vorliegen einer Cornea verticillata dar. Dort fanden sich typischerweise hyperreflektive Zellen auf dunklem Grund. Die Superficialzell-

schicht, die Intermediärzellschicht, die Nervenfasern, die tiefen Anteile des Stromas, das Endothel sowie die bulbäre Konjunktiva zeigten keine Veränderungen im Vergleich zum Normalprobandengut.

7. Erstmals erfolgte eine Zuordnung der basalepithelialen Einlagerungen in ein Grading-system nach Schweregraden, das sich gut auf die vorhandene spaltlampenmikroskopische Stadieneinteilung der Cornea verticillata übertragen ließ.

8. Veränderungen im Stroma und in der tarsalen Konjunktiva von Fabrypatienten sowie ausgeprägte Ansammlungen von microdots im Stroma bei Amiodaronpatienten zeigten keine hundertprozentige Übereinstimmung mit dem Auftreten einer Cornea verticillata und fanden sich zum Teil auch bei Normalprobanden. Sie sind kein spezifisches Diagnosekriterium.

9. Bei den Fabrypatienten dieser Studie wurden nur dann basalepitheliale Einlagerungen gefunden, wenn auch spaltlampenmikroskopisch eine Cornea verticillata vorlag. Hinweise für eine Frühdiagnostik fanden sich bei Amiodaronpatienten eine Woche nach Beginn der Medikamenteneinnahme: Mittels der RLSM wurden mikrostrukturelle Veränderungen festgehalten, bevor sich spaltlampenmikroskopisch ein auffälliger Befund zeigte.

10. Anhand der Verlaufsuntersuchungen von Fabrypatienten konnte nur mittels des RLSM eine dezente Rückbildung von Augenveränderungen unter Enzymersatztherapie erfasst werden, wobei eine generelle Regressionstendenz nicht nachgewiesen wurde.

11. Bei Amiodaronpatienten wurde eineinhalb Jahre nach Absetzen der Medikation eine vollständige Remission der basalepithelialen Einlagerungen und der spaltlampenmikroskopischen Cornea verticillata beobachtet. Hierbei handelt es sich also um einen potentiell reversiblen Prozess.

12. Anhand dieser Studie konnten Ergebnisse gewonnen werden, die sowohl auf eine Frühdiagnostik als auch auf eine Verlaufsbeobachtung des Morbus Fabry mittels des RLSM hinweisen. Es ist daher unbedingt erforderlich, weitere Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Patienten über einen längeren Zeitraum durchzuführen.

8. LEBENSLAUF

Name	Karen Falke
Geburtsdatum	31. Dezember 1984
Geburtsort	Nordhausen
Familienstand	ledig

Schulausbildung

1991 – 1992	Grundschule Nordhausen
1992 – 1993	Primarschule der Gemeinde Teufen AR (Schweiz)
1993 – 1995	Grundschule Torgau
1995 – 2003	Joe – Polowsky – Gymnasium Torgau

Schulabschluss

2003	Abitur
------	--------

Hochschulstudium

2003 – 2009	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
2005	Erstes Staatsexamen
2008 – 2009	Praktisches Jahr
	- Universitätsaugenklinik Rostock
	- Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock
	- Chirurgische Universitätsklinik Rostock
2009	voraussichtlich Zweites Staatsexamen und Approbation

9. VERÖFFENTLICHUNGEN

Falke K, Büttner A, Schittkowski M, Stachs O, Kraak R, Zhivov, Rolfs A, Guthoff R. The microstructure of cornea verticillata in Fabry disease and amiodarone-induced keratopathy: a confocal laser-scanning microscopy study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2008 Oct 18. [Epub ahead of print]

Präsentationen im Rahmen von Kongressen und Fortbildungen

Falke K, Guthoff R. Fabry and the eye. International Postgraduate Course on Fabry disease and Neuroscienc, Berlin, Deutschland, 22.-23.02.2008

Falke K, Guthoff R. M. Fabry – die Bedeutung des Auges zur Frühdiagnose des M. Fabry. Fortbildungsveranstaltung: M. Fabry: eine Erkrankung aus allen medizinischen Fachdisziplinen – Chancen der gezielten Therapie, Rostock, Deutschland, 28.11.2007

Falke K, Büttner A, Schittkowski M, Stachs O, Rolfs A, Guthoff R. Ultrastrukturelle Untersuchung der Kornea und Konjunktiva bei Patienten mit M. Fabry mittels konfokaler In-vivo-Mikroskopie. 105. DOG-Kongress, Berlin, Deutschland, 20.-23.09.2007

Falke K, Büttner A, Schittkowski M, Stachs O, Rolfs A, Guthoff R. Vergleich der Cornea verticillata bei M. Fabry und Amiodaronkeratopathie in der konfokalen Mikroskopie. 56. Tagung der Vereinigung Norddeutscher Augenärzte, Kiel, Deutschland, 08.-09.06.2007

10. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich diese der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Promotion vorgelegte Arbeit unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. F. Guthoff selbstständig durchgeführt und keine anderen als die in der Dissertationsschrift angeführten Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Rostock, den 23.01.2009

Karen Falke

11. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mich bei der Durchführung meiner Arbeit unterstützt haben.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. R. Guthoff, danke ich für die Vergabe des Dissertationsthemas, die hervorragende Betreuung, die ich durch ihn erhalten habe und für die Unterstützung, die er mir jederzeit zukommen ließ.

Herrn Prof. Dr. A. Rolfs danke ich für die Anregung zu diesem Thema und die gute Zusammenarbeit sowie der Fabry-Ambulanz der neurologischen Universitätsklinik Rostock für die Überweisung der Patienten.

Ich danke auch Dr. O. Stachs, dessen Hilfe bei dem Verstehen der Technik der konfokalen In-vivo-Mikroskopie und dessen kreative 3-dimensionalen Bearbeitungen einen wichtigen Anteil zur Vervollständigung dieser Arbeit beitrugen.

Besonderer Dank gilt Dr. Zhivov, Dr. Schittkowski und Dr. Büttner für ihre freundliche Unterstützung bei der Überarbeitung und Verbesserung der wissenschaftlichen Ausarbeitung. Ich verdanke Ihnen auch die Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen und dem Erlernen der Methode.

Weiterhin danke ich dem ganzen Team der Universitätsaugenklinik Rostock, die mir den Arbeitsplatz zur Verfügung stellten und sich auch gerne Zeit für mich nahmen.

Am Schluss möchte ich meiner Familie danken, die immer alles für mich getan hat und auf jedem Weg an meiner Seite steht.