

Aus der Augenklinik und Poliklinik (Direktor: Prof. Dr. R. F. Guthoff)

und dem

Institut für Anatomie (Direktor: Prof. Dr. A. Wree)

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Konfokale In-Vivo Untersuchungen der menschlichen Augenlider und
der Meibomschen Drüsen

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Benjamin Bermaoui,

geb. am 24. September 1980 in Peine,

aus Rostock

Rostock, 2011

Dekan: Prof. Dr.med. Emil Christian Reisinger

Dekan: Prof. Dr.med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Guthoff (Rostock)

2. Gutachter: Prof. Dr. med. A. Wree (Rostock)

3. Gutachter: Prof. Dr. med. K. H. Emmerich (Darmstadt)

Datum der Einreichung: 12.07.2011

Datum der Verteidigung: 24.01.2012

Für meine Eltern und meine beiden Brüder.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	II
1 Einleitung	1
1.1 Einleitung	1
1.2 Anatomie	3
1.2.1 Die Augenlider	3
1.2.1.1 Entwicklung der Augenlider.....	4
1.2.1.2 Aufbau der Augenlider	6
1.2.1.3 Der Tarsus.....	8
1.2.1.4 Die Konjunktiva	9
1.2.1.5 Die Oberfläche der Konjunktiva.....	12
1.2.1.6 Die Lidkante	15
1.2.2 Die Meibomschen Drüsen	17
1.2.2.1 Einleitung.....	17
1.2.2.2 Morphologie der Meibomschen Drüsen	19
1.2.3 Der Tränenfilm	21
1.3 Grundlagen der Mikroskopie.....	23
1.3.1 Einleitung	23
1.3.2 Lichtmikroskopie.....	25
1.3.3 Konfokale Mikroskopie.....	26
1.3.3.1 Entstehung und heutiger Stand	26
1.3.3.2 Prinzip.....	29
1.3.3.3 Bildgenese	31
1.3.3.4 Klinische Anwendungen.....	33
2 Probanden und Methoden	35
2.1 Konfokale Laser Mikroskopie.....	35
2.1.1 Heidelberg Retina Tomograph	35
2.1.2 Das Rostocker Cornea Modul.....	37
2.1.3 Auflösung und numerische Apertur	39
2.2 In-vivo Untersuchungen	41
2.2.1 Probanden	41
2.2.1.1 Aufklärung und Dokumentation.....	41
2.2.1.2 Untersuchungsorte	42
2.2.2 Ablauf	43
2.2.2.1 Vorbereitung des Equipments	43

2.3	Extrakorporale Vitaluntersuchungen.....	47
2.3.1	Material.....	47
2.3.2	Transport.....	48
2.3.3	Untersuchung.....	48
2.4	Lichtmikroskopische Histologie.....	49
2.4.1	Materialgewinnung, Schnitt und Färbung.....	49
2.4.2	Sichtung, Dokumentation und Auswertung.....	50
3	Ergebnisse.....	51
3.1	Konfokale in-vivo Untersuchungen.....	51
3.1.1	Oberlid.....	51
3.1.2	Unterlid.....	55
3.1.3	Lidkante.....	56
3.1.4	Ventrale Lidkante.....	57
3.1.5	Dorsale Lidkante.....	59
3.1.6	Orifizien.....	61
3.1.7	Wimpern.....	63
3.1.8	Mukokutane Übergangszone.....	65
3.2	Extrakorporale konfokale Untersuchungen.....	67
3.2.1	Meibomsche Drüsen.....	67
3.2.2	3D Rekonstruktionen.....	71
3.3	Histologie.....	75
3.3.1	Exemplarische Bilder.....	75
3.3.2	Tiefenanalyse der Conjunctiva Tarsi.....	77
3.4	Vergleich klassische Histologie - Konfokalmikroskopie.....	79
4	Diskussion.....	84
5	Literaturverzeichnis.....	90
6	Anhang.....	96

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Entwicklung der Augenlider.....	4
Abbildung 2 – Übersicht über den Aufbau der Augenlider.....	6
Abbildung 3 – Zoneneinteilung der Konjunktiva nach Kessing	13
Abbildung 4 – Querschnitt eines Augenlides	15
Abbildung 5 – Heinrich Meibom.....	17
Abbildung 6 – Aufsicht auf die Augenlider von innen	19
Abbildung 7 – Strahlengang eines Lichtmikroskopes.....	25
Abbildung 8 – Prinzip der konfokalen Mikroskopie.....	27
Abbildung 9 – Vereinfachte Darstellung eines Konfokalmikroskopes	29
Abbildung 10 – Übersicht des Aufbau	35
Abbildung 11 – HRT II mit RCM	37
Abbildung 12 – Strahlengang des HRT II mit vorgesetztem RCM	38
Abbildung 13 – Übersicht des Arbeitsplatzes	43
Abbildung 14 – TomoCap	44
Abbildung 15 – Augenlid in Sagittalaufsicht	47
Abbildung 16 – Schnittführungen des histologischen Materials.....	49
Abbildung 17 – Oberflächennahe Konfokalbilder der Conjunctiva Tarsi	51
Abbildung 18 – Becherzellen im Epithelverband.....	52
Abbildung 19 – Exemplarische Schräganschnitte der Oberlidkonjunktiva.....	52
Abbildung 20 – Beispiel einer Dickenbestimmung anhand eines Queranschnittes	53

Abbildung 21 – Stromale Gewebeanschnitte	53
Abbildung 22 – Unterlidkonjunktiva.....	55
Abbildung 23 – Tiefenanalyse der ventralen Lidkante	57
Abbildung 24 – Übergang Epidermis zur Dermis	58
Abbildung 25 – Tiefenanalyse der dorsalen Lidkante.....	59
Abbildung 26 – Tiefenanalyse der Orifizen der Meibomschen Drüsen.....	61
Abbildung 27 – Orifizen der Meibomschen Drüse mit sichtbaren Sekretrückständen	62
Abbildung 28 – Tiefenanalyse der Wimpernregion	63
Abbildung 29 – Detailaufnahme einer Wimper	64
Abbildung 30 – Detailaufnahme der mukokutanen Übergangszone.....	65
Abbildung 31 – Bilder der mukokutanen Übergangszone bei vier verschiedenen Probanden..	65
Abbildung 32 – Meibomsche Vesikel im Tränengel.....	67
Abbildung 33 – Fettgewebe.....	68
Abbildung 34 – Stränge gestreifter Muskulatur	68
Abbildung 35 – Meibomsche Drüsen mit umliegenden Stromaanteilen.....	69
Abbildung 36 – Exemplarischer Ausschnitt der Meibomschen Drüsen.....	70
Abbildung 37 – Oberflächennahe Aufnahme der Oberlidkonjunktiva	71
Abbildung 38 – Gleiches Aufnahmegebiet wie Abb. 37 – 45! m tiefer im Gewebe.....	72
Abbildung 39 – 3D Rekonstruktion des extravital untersuchten Tarsalgewebes.....	73
Abbildung 40 – 3D Rekonstruktion des extravital untersuchten Tarsalgewebes.....	74
Abbildung 41 – Exemplarisches Bild der konjunktivalen Oberfläche	75
Abbildung 42 – Exemplarisches Bild mit Taschenbildung der Konjunktiva.....	76

Abbildung 43 – Exemplarisches Bild mit obliquem Anschnitt einer Henle Krypte	76
Abbildung 44 – Tiefenanalyse I – Querschnitt eines Oberlides mit Mikrometerskala	77
Abbildung 45 – Tiefenanalyse II – Meibomsche Drüsen.....	78
Abbildung 46 – Vergleich der Henle Krypten.....	79
Abbildung 47 – Oberflächennahe Schnittführungen an der Unterlidkante	80
Abbildung 48 – Unterlidkante: Schnittführung in circa 20! m Tiefe	80
Abbildung 49 – Unterlidkante: Schnittführung in circa 35! m Tiefe	81
Abbildung 50 – Ausführungsgang einer Meibomschen Drüse	81
Abbildung 51 – Querschnitt eines Wimpernhhaarfollikels	82
Abbildung 52 – Fettgewebe des Augenlides	82

1 Einleitung

Im Juni 2007 erschien in der US-Amerikanischen Zeitschrift „Smithonian“ ein Artikel des Sicherheitsexperten Gregory Treverton. Unter dem Titel „Risks and Riddles“ schlug er eine grundsätzliche Einteilung von Problemen in Puzzle und Rätsel (Mysteries) vor, für deren Lösung je unterschiedliche Herangehensweisen notwendig seien.

Während bei einem Puzzle bereits sämtliche zur Lösung nötigen Informationen vorlägen und darüber hinaus die Existenz einer Lösung vorausgesetzt werden dürfe, erforderten Rätsel die Suche nach weiteren Informationsstücken und blieben solange unlösbar, bis diese gefunden seien. ^[1, 2]

1.1 Einleitung

Die Grundlage zum Verständnis pathologischer Veränderungen stellt immer der physiologische Normalzustand dar, gegen den sich eine Krankheit als Kontrast abzeichnet.

Entsprechend erfordern neue Diagnoseverfahren ein Maß an Basisarbeit mit dem der Normalsitus erfasst wird.

Im Bereich der Augenlider steht mit der Spaltlampe eine Untersuchungsmethode zur Verfügung, die es ermöglicht Bilder des lebenden Gewebes darzustellen ohne vorher präparativ in dieses eingreifen zu müssen. Vergrößerung und Auflösungsvermögen sind jedoch begrenzt, so dass es mit dieser Technik nicht möglich ist Einblick in den zellulären Verband zu nehmen.

Werden stärkere Vergrößerungen benötigt um Details in Augenschein zu nehmen, ist dies nur auf Kosten der Struktur möglich. Der Gewebeblock muss entnommen und für die Darstellung vorbereitet werden, was in seiner Entnahme aus dem lebenden Umfeld und so mit seiner Zerstörung einhergeht.

Derzeit stellt die Konfokalmikroskopie die einzige Option dar, hochauflösende Bilder des lebenden Gewebes zu akquirieren. Zu Beginn war die Anwendung des Verfahrens ausschließlich auf die semitransparente Kornea beschränkt, später wurde es möglich auch nicht transparente Strukturen zur Darstellung zu bringen.

Die klinische Nutzung wurde durch eine ungleichmäßige Objektausleuchtung sowie Unschärfen im Randbereich eingeschränkt. Ursache hierfür waren die Quecksilber- oder Halogenlampen, die als Lichtquelle dienten.

Die Entwicklung des *Rostocker Cornea Moduls* (RCM) ermöglichte es diese Limitierung zu überwinden, indem es den laserbasierten Heidelberg Retina Tomographen II (HRT II) als Basis verwendete und zu einem vollwertigen Konfokalmikroskop aufwertete. Durch den Vorsatz des Linsensystems wurde ermöglicht es Strukturen dazustellen, die sich direkt vor dem Objektiv befinden.

Diese Arbeit soll einen Überblick über die Lidkante und Konjunktiva in konfokalmikroskopischer in-vivo Darstellung bieten. Aufgezeigte Strukturen sollen mit klassisch-histologischem Bildgut verglichen und in Einklang gebracht werden und somit als Referenz für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Zusätzlich zu den Untersuchungen am Probanden, sollen frische Operationspräparate genutzt werden um eine Aufsicht auf die Strukturen des Augenlides in sagittaler Sicht zu ermöglichen. Ziel ist es so die Meibomschen Drüsen aufzuzeigen, welche aufgrund ihrer Lage jenseits der Erreichbarkeit der gegenwärtigen Technik liegen.

Diese Studie versteht sich als Teil oben genannter Vorarbeit und soll als Puzzlestück auf dem Weg zur non-invasiven in-vivo Histologie okulärer Pathologien dienen.

1.2 Anatomie

1.2.1 Die Augenlider

Die Wichtigkeit der Augenlider für ein funktionierendes visuelles System ist nicht zu unterschätzen. Ohne intakte Lidstrukturen drohen Austrocknung und Verunreinigung der Hornhaut. ^[3]

Mit jedem Schlag verteilen die Lider die Tränenflüssigkeit auf dem Bulbus und sichern so seine erleichterte Beweglichkeit; sie reinigen die Oberfläche und transportieren in den Tränen enthaltene Fremdkörper und Zelldetritus in Richtung Punctum Lacrimalis. Durch die Lidbewegungen wird die Tränenpumpe aktiviert und so der Abfluss gesichert. Viele Bestandteile der Tränen werden von Strukturen produziert, die sich in den Lidern befinden. ^[4]

Neben diesen physischen Aufgaben stellt der Verschluss der Lider und die Abschirmung des Auges gegen Helligkeit eine wichtige psychologische Komponente dar. ^[5]

1.2.1.1 Entwicklung der Augenlider

In der siebten bis achten Woche der Embryonalentwicklung bilden sich erste Anlagen der Augenlider als ringförmige Falten um die bisher nackte Sklerokornealanlage. Diese enthalten äußere ektodermale Anteile mit einem mesenchymalem Kern. ^[6]

Die Lidspalte ist rund, sehr weit und offen.

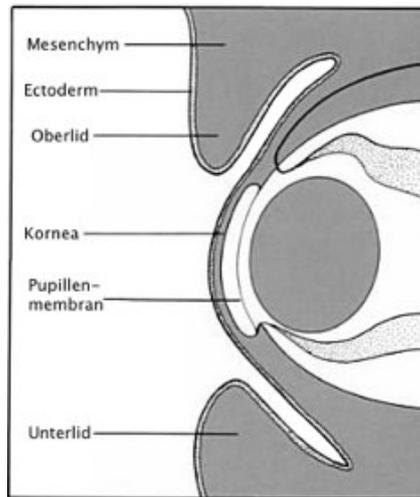


Abbildung 1 – Entwicklung der Augenlider
Schematische Darstellung aus der 7. Entwicklungswoche ^[7]

Da die zentralen Anteile der Lidwülste schnell wachsen, während an den Lidwinkeln das Wachstum stehen bleibt, ergibt sich aus der zuerst runden Öffnung eine Spalte, bevor die Wülste in der zehnten Woche verkleben. Dieses Zusammenwachsen betrifft nur die epithelialen, also die äußersten und innersten Schichten der Lidanlagen. Sie bilden so einen geschlossenen Hautsack vor dem Kornealepithel. ^[8]

Kurz nach Ausbildung dieser "Lidnaht" beginnen in zwei bis drei hintereinander liegenden Reihen die Anlagen der Wimpern einzusprossen. An den Rändern der einzelnen Wimpern entstehen Aussackungen, aus welchen sich die Zeisschen Talgdrüsen entwickeln. In unmittelbarer Nähe der Wimpern beginnen sich die Mollschen Schweißdrüsen zu bilden. ^[9]

Etwa im 6. Monat werden Epithelknospen sichtbar, welche hinter der letzten Wimpernreihe auftreten und die Anlagen der Meibomschen Drüsen darstellen. Diese

wachsen tief in das Bindegewebe des Lides ein und verzweigen sich dort in zahlreiche Seitensprossen.

Durch Zerfall zentraler Zellen werden Kanäle geschaffen, die das Ausführungsgangsystem bilden. Dieser Vorgang ist etwa in der 25. Woche beendet, so dass ab diesem Zeitpunkt von einer Sekretion der Drüsen auszugehen ist. Ab einer gewissen Größe entstehen um diese Anlagen immer dichtere Bindegewebshüllen, welche den später knorpelartigen (jedoch knorpelfreien) Tarsus darstellen. ^[10]

Etwa zur gleichen Zeit setzt die Entwicklung der kleinen Konjunktivaldrüsen (Krause- und Wolfringsche Drüsen) ein.

Die Verbindung der Lider beginnt sich ab der 26. Woche zu lösen. Auf der Außenseite der Lider und über einen Teil der Lidkante hin entwickelt sich normale verhornende Hautstruktur, während sich die Innenseite zur Conjunctiva Palpebrae differenziert. ^[11]

Die Entwicklung der Tränendrüse beginnt als zapfenförmige Wucherungen am Fornix Conjunctivae Superior. Diese Zapfen verzweigen und höhlen sich aus, während sie weiter in das umliegende Mesenchym einwachsen. Aus ihnen bildet sich am Vorderrand der Augenanlage die Glandula Lacrimalis, welche durch die Sehne des M. Levator Palpebrae Superior in einen oberen und unteren Anteil geteilt wird. Die vollständige Ausbildung der Tränen- und Konjunktivaldrüsen wird erst in den ersten 3 Lebensmonaten abgeschlossen.

Neuere Quellen rücken Parallelen der Entwicklung der Meibomschen Drüsen und der Wimpern in den Vordergrund und konstatieren, dass aufgrund der zeitlichen Nähe und des ähnlichen Entwicklungsganges beider Strukturen die Meibomschen Drüsen als „Haare ohne Haarschaft“ betrachtet werden können.

Demnach sei embryonale Anlage der Drüsen selbst mit der Haaranlage äquivalent. Im Detail entsprächen die Drüsenzini den Talgdrüsen der Haarwurzeln und das zentrale Ausführungsgangsystem dem Haarfollikel. ^[12]

1.2.1.2 Aufbau der Augenlider

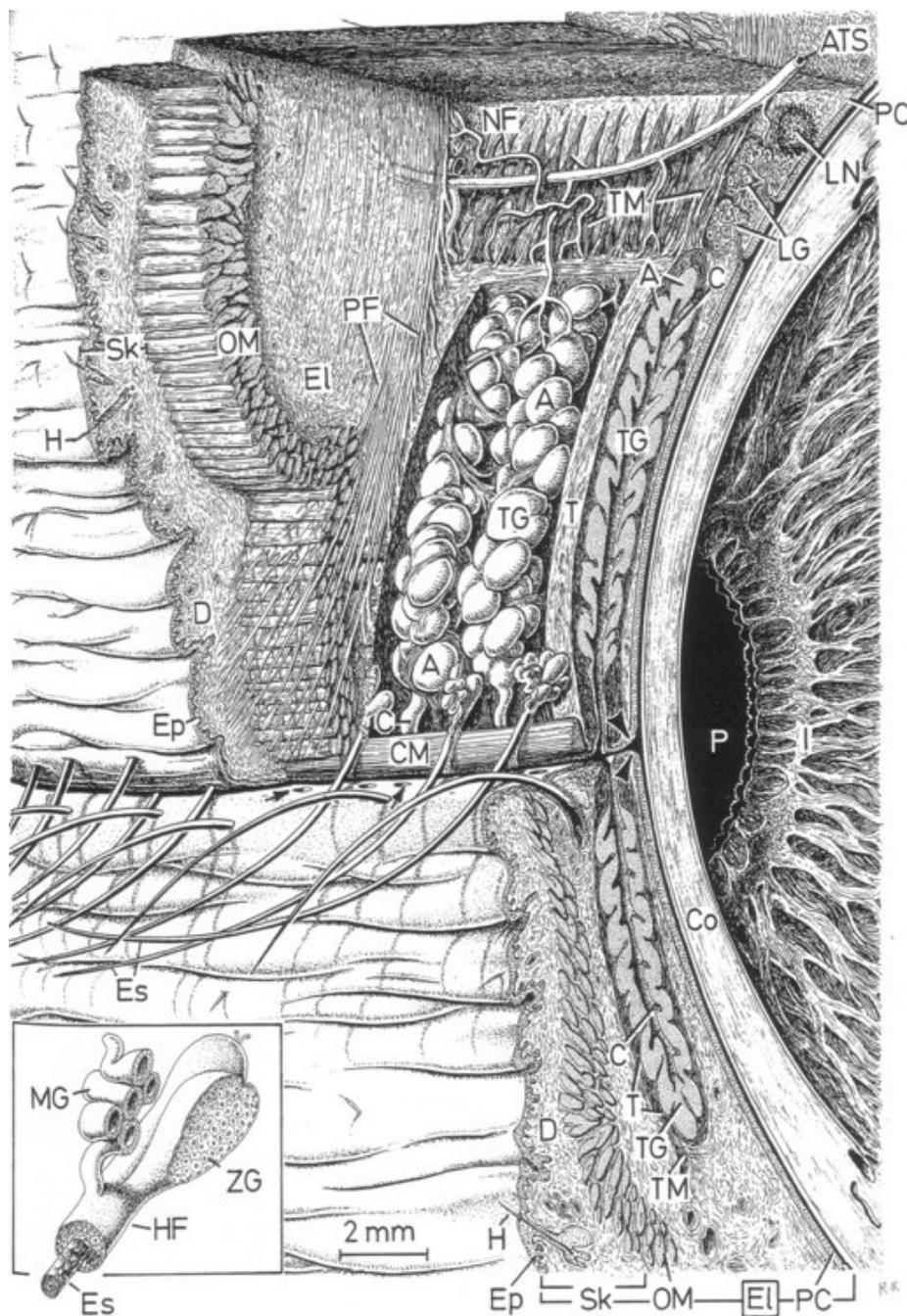


Abbildung 2 – Übersicht über den Aufbau der Augenlider ^[13]

Die Augenlider sind vierschichtig aufgebaut. Über den Tränenfilm mit dem Bulbus Oculi (Co) in Kontakt stehend findet sich die Konjunktiva (PC). Diese dünne Schicht enthält einen Anteil nicht verhornenden Epithels mit versprengten Becherzellen, dem sich in der Tiefe ein gut vaskularisiertes Stroma anschließt.

Dicht mit der Konjunktiva verbunden liegt das tarsale Gewebe (*T*). Diese Schicht aus faserigem Bindegewebe dient als Ansatzpunkt für den Musculus Levator Palpebrae (*PF*) und ist entscheidend für die Formgebung und Stabilität des Lides. ^[14]

Es folgt eine Lage mit muskulärer Basis, die Anteile von 3 Muskeln enthält. Der M. Levator Palpebrae ist an der Öffnung des Lides beteiligt. Er teilt die Tränendrüse in ihrem orbitalen und palpebralen Anteil. Auf seiner Unterseite liegt der zarte Müller Muskel.

Zirkulär im Lid spannt der Musculus Orbicularis Occuli (*OM*) der mit seiner Kontraktion sowohl am willkürlichen Lidschluss als auch an nicht willkürlichen Zwinkerbewegungen beteiligt ist. Teile seiner Fasern bilden den Riolanschen Muskel (*CM*), der die Ausführungsgänge der Meibomschen Drüsen (*TG*) umschlingt. ^[15]

Die äußere Schicht des Lides besteht aus der dünnsten epidermalen Schicht (*EP*) des menschlichen Körpers. Um eine optimale Verschieblichkeit zu sichern, wirft das Gewebe zahlreiche Falten und es findet sich praktisch kein subkutanes Fettgewebe.

1.2.1.3 Der Tarsus

Die Augenlider erhalten einen Großteil ihrer Stabilität aus einer Platte dichten kollagenfaserigen Bindegewebes, die in ihrem Zentrum liegt. ^[3]

In der frontalen Ansicht hat diese Gewebestruktur die Form eines D mit der graden Seite in Richtung Lidspalt, während sie im sagittalen Schnitt eine nach frontal konvexe Form annimmt, die der Rundung des Augapfels folgt.

Die Größe dieser Bindegewebsplatten variiert zwischen Ober- und Unterlid:

Im Oberlid erreicht die Tarsalplatte zentral eine Höhe zwischen 10-15mm und flacht nach lateral auf 2-3mm ab. Die Ausbreitung in der Horizontalen misst circa 25mm nahe des Lidkantenniveaus.

Im unteren Lid fällt die Platte kleiner aus und hat lediglich eine vertikale Ausbreitung von 3-4mm bei gleicher Breite wie im Oberlid.

Die Kanten der Tarsalplatten liegen lotrecht jeweils circa 2mm zur Lidkante entfernt.

Zirkulär vom Rand der Orbita ziehen Fasern des Septum Orbitale in den Tarsus ein und halten ihn in seiner Position. Des Weiteren werden die Tarsalplatten nach medial und lateral durch die Ligamenti Mediale et Laterale Canthi mit der Orbita fixiert.

In der Vorderwand der oberen Tarsalplatten sprossen von kranial Fasern der Aponeurose des Musculus Levator Palpebrae Superius ein und bieten dem Muskel ein Widerlager beim Heben des Lides. ^[4]

1.2.1.4 Die Konjunktiva

Die Konjunktiva ist eine muköse Epithelschicht, welche die Innenseite der Augenlider und den konjunktivalen Sack auskleidet und schließlich auf den Augapfel umschlägt.

Sie endet einerseits auf der Lidkante, wo sie an der Marx Linie in das Epithel des Lides übergeht und andererseits am Rand der Kornea, wo sie auf korneales Epithel trifft. ^[16]

Das konjunktivale Gewebe lässt sich in vier Regionen einteilen:

- Conjunctiva Palpebrae
- Conjunctiva Fornicis
- Conjunctiva Bulbi
- Plica Semilunaris

Die Conjunctiva Palpebrae bildet die Oberfläche der Innenseite der Lider. Sie ist stark vaskularisiert und fest mit den Tarsalplatten verwachsen. Aufgrund ihres dünn-schichtigen Aufbaus schimmern die Meibomschen Drüsen als gelbe, parallele Linien durch sie hindurch. ^[17]

Der fornikale Anteil kleidet den Konjunktivalsack aus. Er ist nur lose mit dem darunterliegenden Gewebe verwachsen und ermöglicht so eine erhöhte Verschieblichkeit bei Bewegungen der Augen.

Den dünnsten Anteil stellt die Conjunctiva Bulbi dar. Als Fortsetzung der Conjunctiva Fornicis liegt sie dem Bulbus dicht auf und ist nahezu transparent. Sie geht nach nasal in die Plica Semilunaris, das sogenannte dritte Augenlid oder Nickhaut über, welche beim Menschen nur rudimentär vorhanden ist. ^[18]

Mikroskopisch besteht die Konjunktiva aus einer Lamina Propria und der darüber liegenden Epithelschicht, die sich je nach Region in Zellform, Anordnung und Schichtdicke unterscheidet.

Funktionell lässt sich der Aufbau auf folgendes Schema vereinfachen:

- Superfizielle Schicht aus, je nach Lokalisation, verschieden geformten Epithelzellen mit eingestreuten Langerhans- und Becherzellen
- Mittelschicht aus Intermediärzellen mit starker Variation der Schichtdicke je nach Lokalisation
- Basalzellschicht mit vereinzelt Melanozyten
- Basalmembran
- Stroma

Dieser Aufbau wird prinzipiell über die gesamte Gewebeausbreitung beibehalten, variiert jedoch erheblich in seiner Morphologie. ^[19]

Die Zellen, die im Bereich der Übergangszone noch flach sind, gewinnen mit größerer Entfernung von der Lidkante an Höhe, was für eine sinkende mechanische Beanspruchung spricht.

Direkt an der mukokutanen Übergangszone der Lidkante trifft das verhornende Epithel der Epidermis auf den dreischichtigen Aufbau der Konjunktiva. An der Oberfläche finden sich wenige Schichten nicht-verhornenden Plattenepithels, gefolgt von einer Mittelschicht aus Stachelzellen, die sich in der Tiefe in ein Zylinderepithel fortsetzt. ^[20]

Im Bereich der Tarsalplatten des Oberlides ändert sich der Aufbau in eine zweischichtige Zusammensetzung aus einer oberen Schicht zylindrischer Zellen mit vertikal oval ausgerichteten Zellkernen, die auf einer Lage flacherer Zellen mit horizontal-ovalen Zellkernen ruht.

Im gesamten Ausbreitungsgebiet der Bindehaut des Unterlides findet sich dagegen ein drei- bis vierschichtiger Aufbau. Oberflächlich finden sich zapfenförmige Zelllagen, gefolgt von Zwischenschichten aus keilförmigen und polygonalen Zellen. Die Basalschicht besteht hier ebenfalls aus Zylinderepithel.

Zum Konjunktivalsack hin gleicht sich der Aufbau des Oberlides dem Unterlid an, indem sich eine Zwischenschicht aus polygonalen Zellen zwischen die bereits vorhandenen Lagen schiebt.

Dieser dreischichtige einheitliche Aufbau bleibt über die gesamte Conjunctiva Bulbi erhalten und geht am Limbus Corneae in den fünfschichtigen Aufbau des Kornealgewebes über. ^[21]

Die Epithelschichten werden durch eine Basalmembran vom darunterliegenden Stroma getrennt. Neben der Fixierungsgrundlage für die Basalzellen übernimmt diese Membran Funktionen der Infektabwehr.

Die Grundsubstanz enthält ein Netzwerk kollagener Fasern und ist mit reichlichen Kapillaren versorgt. Sie beherbergt eine Vielzahl immunokompetenter Zellen und ist somit maßgeblich an Abwehrreaktionen beteiligt. ^[19]

1.2.1.5 Die Oberfläche der Konjunktiva

In der Literatur finden sich unzählige Quellen, die die Oberfläche der Konjunktiva als glatt und eben beschreiben.

Diese Attribute mögen bei makroskopischer Aufsicht korrekt erscheinen, entsprechen jedoch mit zunehmender Vergrößerung des Gebietes nicht mehr den Tatsachen. Bereits in lichtmikroskopischer Aufsicht wird erkennbar, dass das Gebiet von einem System aus Krypten und Furchen durchzogen ist.

Erste und detaillierte Beschreibungen gehen auf den deutschen Anatomen Friedrich Gustav Jacob Henle (* 19. Juli 1809 in Fürth; † 13. Mai 1885 in Göttingen) zurück.

In seinem Werk "*Handbuch der Eingeweidelehre des Menschen*" widersprach Henle allen großen Anatomen seiner Zeit ^[22], in dem er die Struktur der Bindehaut zwar als eben bezeichnete, gleichzeitig jedoch darauf verwies, dass sie von "zahlreichen feinen Öffnungen durchbohrt" sei, die "die Mündungen einfacher blinddarmförmiger Drüsen" darstellten, "welche in der Dicke der Schleimhaut versteckt" lägen. ^[23]

In den darauf folgenden Jahren bestritten mehrere Autoren, allen voran Ludwig Stieda, die Existenz der Henle Drüsen.

Stieda führte Henles Beobachtungen auf eine mangelnde Parallelität seiner Schnitte zur Oberfläche zurück und unterstellte, dass Henle Bindegewebsstränge der Grundsubstanz als Krypten misinterpretiert habe.

Gleichzeitig lieferte Stieda detaillierte Beschreibungen der Oberflächenstruktur der Konjunktiva, die er als von "zahlreichen, die Schleimhaut nach allen Richtungen durchsetzenden, [...] mit blinden Zipfeln endigenden Furchen oder Einschnitten" überzogen beschrieb.

Er folgerte, dass man die durch "Furchen und Einschnitte gebildeten mannigfachen Formen der Schleimhaut als Papillen bezeichnen" könne. ^[24]

Sowohl Henles als auch Stiedas Beobachtungen zum Kryptensystem der Konjunktiva waren lange Zeit Thema heftiger Kontroversen, bis Kessing 1968 detailliertere Studien der Region durchführte.

Kessing teilte die Konjunktiva nach rein histomorphologischen Kriterien in fünf Zonen.

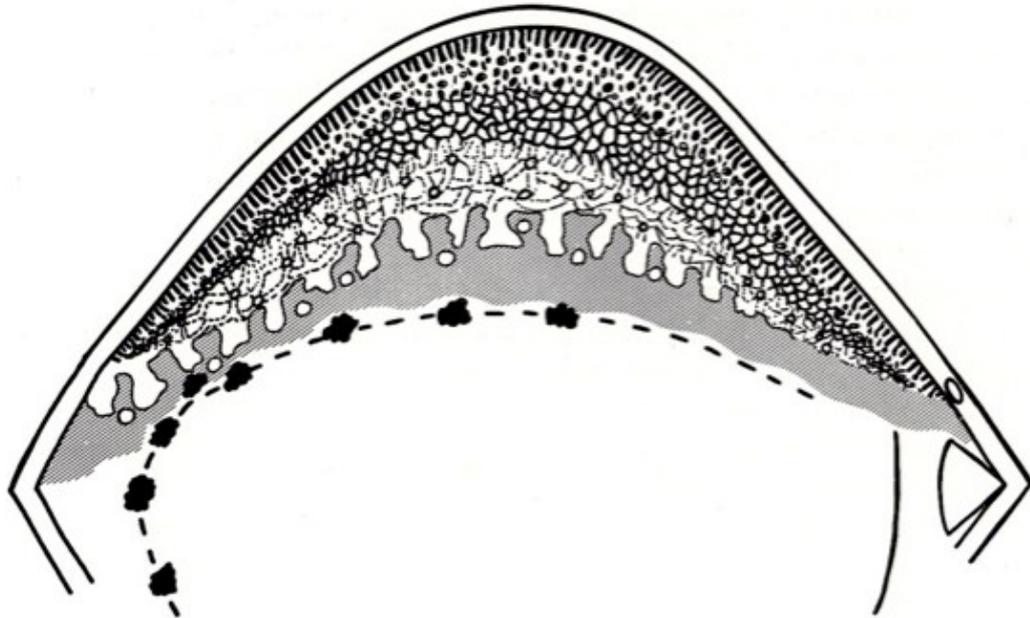


Abbildung 3 – Zoneneinteilung der Konjunktiva nach Kessing ^[25]

Die erste Region, einen 0.5 - 1mm großen Streifen beginnend ab dem Hinterrand der Lidkante, beschrieb er als von "mit senkrecht zur Lidkante verlaufenden Furchen" durchsetzt. Neuere Arbeiten bezeichnen diesen Bereich als "Lidwiper" und sprechen ihm wichtige Funktionen bei der Verteilung des Tränenfilms zu. ^[12]

Das sich nach fornikal anschließende zweite Gebiet sei durch einzeln versprengte, epitheliale Taschen charakterisiert. Diese hätten einen mit einem Durchmesser von 15-30µm und enthielten häufig Becherzellen. Aufgrund dieser Beschreibung liegt die Folgerung nahe, dass es sich um die Henle Krypten handelt.

Im Verlauf des Gewebes würden sich diese Taschen in der dritten Zone allmählich erweitern und konfluieren. Das Bindegewebe bilde Papillen aus, welche vom Epithel beinahe glatt überzogen würden - die Oberfläche erhalte eine höckerige und vernarbte Struktur.

In Zone 4 und 5 wandelten sich die Henle Krypten in ein subepitheliale gelegenes Tunnelsystem, welches durch viele kleine Öffnungen in Verbindung mit der Oberfläche trete. Da dieses Röhrensystem die Kontinuität der subepitheliale Substanz störe, erhalte

die Konjunktiva ein höckeriges Aussehen. Die Gräben zwischen den einzelnen Erhebungen entsprechen den Beobachtungen Stiedas. ^[25]

Die einzelnen Zelltypen, die mit der konjunktivalen Oberfläche in Kontakt stehen, werden von *Steuhl* in seinem Buch "*Ultrastructure of the Conjunctival Epithelium*" nach elektronenmikroskopischen Kriterien in fünf Typen eingeteilt. Den Anteil sekretorisch aktiver Becherzellen an der Gesamtzellpopulation wird mit 10-14% für die konjunktivale Oberfläche angegeben. ^[20]

1.2.1.6 Die Lidkante

Nahezu im rechten Winkel zur Conjunctiva Palpebrae stehend, ist die Lidkante elementar für einen dichten Verschluss der Augenlider. Nach etwa einem Sechstel ihres Verlaufes von medial nach lateral liegt die Papilla Lacrimalis, die den Eingang in das Tränenabflusssystem darstellt.

Nach ventral entspringen zwei bis drei Reihen Wimpern, an deren Austrittsstelle die Öffnungen der Zeis Drüsen liegen. Hierbei handelt es sich um Talgdrüsen, die keinen maßgeblichen Anteil am Tränenfilm haben, sondern durch ihr Sekret die Wimpernhaare geschmeidig und biegsam halten. Um die Wurzeln der Wimpern lagern sich die Mollschen Schweißdrüsen an, die ihr Sekret ebenfalls in den Haarbalg absondern.

In einer Reihe über die Lidkante verteilt liegen die Orifizien der Ausführungsgänge der Meibomschen Drüsen. Im Bereich ihrer Mündung auf der Oberfläche der Lidkante werden die Gänge von sechs Schichten kubischer Zellen ausgekleidet, die zum Lumen hin verhornen und in das Gewebe hinein auf einer Basalmembran liegen. Weiter in der Tiefe weisen sie eine vierschichtige Wandstruktur auf. [21]

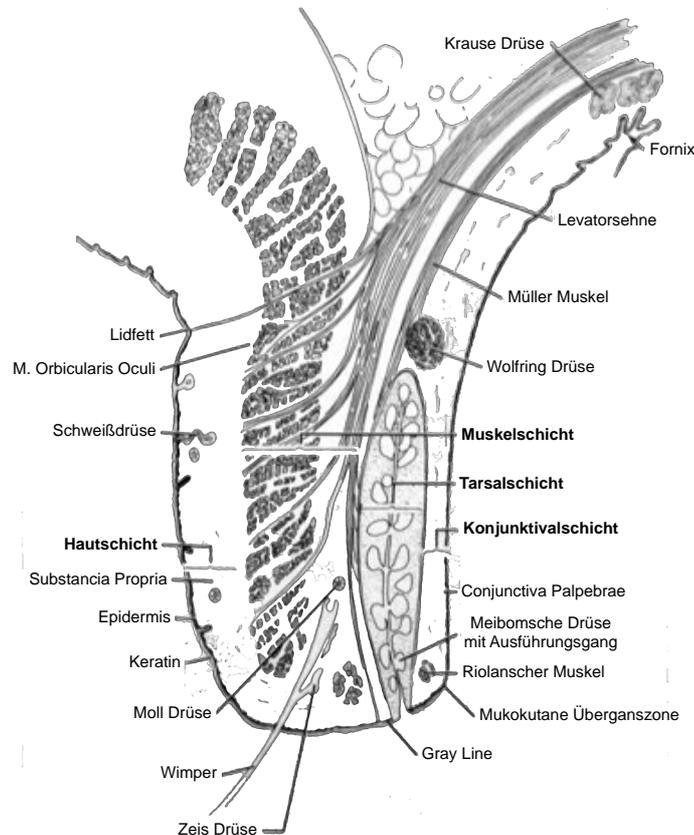


Abbildung 4 – Querschnitt eines Augenlides [18]

Auf der Oberfläche der Lidkante finden sich zwei Linien:

Auf dem hinteren Drittel der Lidkante, jedoch ventral der Öffnungen der Meibomschen Drüsen, ist eine graue Linie erkennbar. Sie wird mit dem darunter verlaufenden Riolschen Muskel in Verbindung gebracht und stellt eine wichtige chirurgische Orientierungsmarke dar, da sie die Grenze zwischen Tarsalschicht und Muskellage des Augenlides markiert. ^[26, 27]

Dorsal der Orifizien, mitunter sogar im Bereich der Conjunctiva Palpebrae, liegt die mukokutane Übergangszone, also die Stelle, an der die Schleimhaut der Bindehaut auf die Epidermis der Lidkante trifft. ^[28]

Dieser Bereich lässt sich mit verschiedenen Farbstoffen, wie Bengal Rosa oder Lissamin Grün intravital markieren und wurde 1926 das erste Mal von Marx beschrieben. Die genutzten Farbstoffe haben die gemeinsame Eigenschaft Zellen anzufärben, die in Degeneration begriffen sind, bereits abstarben oder muköse Proteine aufweisen. ^[29]

Die Marx Linie selbst liegt auf dem Boden des Tränenflusses, welcher als 0,3mm breite Vertiefung über die Lidkante läuft und die Tränen in Richtung Punctum Lacrimalis kanalisiert. ^[30 - 32]

Im Rahmen verschiedener pathologischer Veränderungen kann die Lage der Marx Linie beziehungsweise der mukokutanen Übergangszone, verschoben sein.

Verlagerungen nach ventral in den Bereich der Öffnungen der Meibomschen Drüsen finden sich im Rahmen der Meibomitis, unregelmäßige Verläufe der Linie bei Patienten mit Blepharitiden und Conjunctividen. Abgesehen von der geografischen Herkunft der untersuchten Personen scheinen physiologisch unveränderbare Faktoren wie Alter und Geschlecht keinen Einfluss auf die Lage zu haben. ^[33]

1.2.2 Die Meibomschen Drüsen

1.2.2.1 Einleitung



Abbildung 5 – Heinrich Meibom ^[21]

Heinrich Meibom wurde 1638 in Lübeck als Sohn des Stadtarztes Johann Heinrich Meibom (*1590 - †1655) geboren. Er studierte in Helmstedt, Groningen und Leyden und unternahm Forschungsreisen durch Westeuropa. 1633 promovierte er an der französischen Universität in Angers, schrieb diverse medizinische Veröffentlichungen, bevor er 1661 seine Professur für Medizin an der Universität Helmstedt antrat. Ab 1678 wurde er zusätzlich zum Professor für Geschichte und Poesie berufen und behielt alle Ämter bis zu seinem Tode im Jahr 1700 inne.

Meibom veröffentlichte 57 medizinische Aufsätze und schrieb zahlreiche Gedichte, die er 1668 mit gesammelten Werken seines Großvaters herausgab.

Sein Sohn Brandanus Meibom (*1678 - †1740) wurde Professor für Pathologie, Botanik und Medizin. ^[34]

Die Entdeckung der Meibomschen Drüsen wird häufig ihrem Namensgeber zugeschrieben, jedoch belegen bereits Schriften aus der Zeit um Galen (*129 - †199) das Wissen um ihre Existenz. ^[21]

Weitere Beschreibungen aus dem Jahr 1609 gehen auf den italienischen Anatom Julius Casserius (*1561 - †1616) zurück, bevor Heinrich Meibom sich 1666 in seinem Werk "*De vasis palpebrarum novis epistolae*" ausführlich diesen Strukturen widmete und erste detaillierte Beschreibungen lieferte.

1.2.2.2 Morphologie der Meibomschen Drüsen

In das Gewebe der Tarsalplatten eingebettet liegen hoch spezialisierte Talgdrüsen, die beinahe die gesamte Dicke des Tarsus in Anspruch nehmen. Im Gegenteil zu den gewöhnlichen Talgdrüsen des menschlichen Körpers findet sich jedoch keine Assoziation zu Haarfollikeln. ^[12]

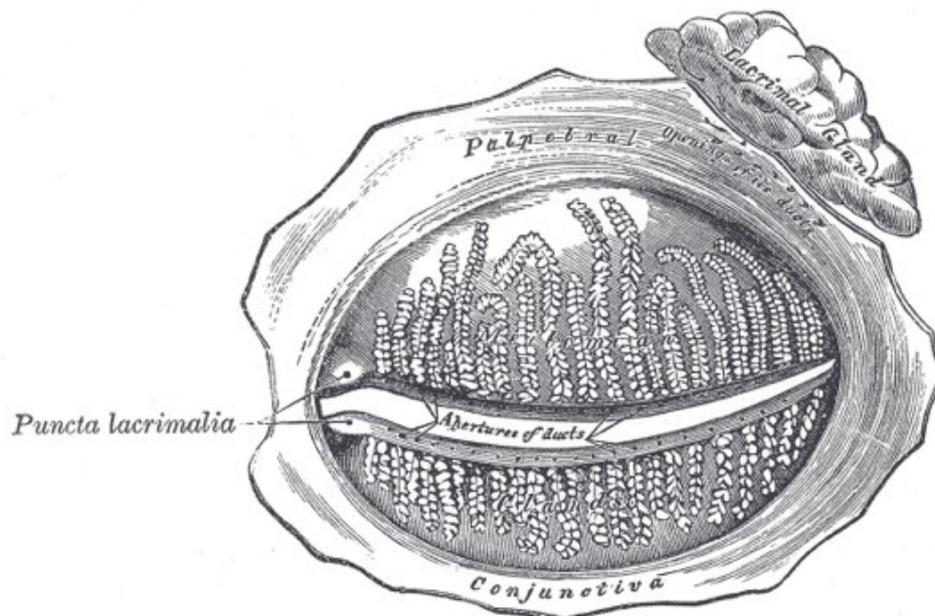


Abbildung 6 – Aufsicht auf die Augenlider von innen ^[4]

Zueinander weitgehend parallel als Drüsenschläuche angeordnet, befinden sich im menschlichen Oberlid 20 – 40 solcher Drüsen, die in nicht kommunizierenden Ausführungsgängen lotrecht auf der Lidkante enden. Im Unterlid sind es 15 - 20 dieser Strukturen. Im Durchschnitt beansprucht ihre vertikale Ausbreitung im Oberlid 5.5mm, im Unterlid etwa 2mm. ^[4, 35]

Der Aufbau der Drüsen und ihres Ausführungsgangsystems lässt sich mit den Dolden von Weintrauben vergleichen: Auf der Lidkante endet ein zentraler Ductus. Von diesem Gang aus verzweigen sich weitere Ductuli, an deren Ende schließlich die Azini der Drüsen liegen. ^[36]

Mikroskopisch wird erkennbar, dass die Gänge und ihre Verästelungen durch eine Basalmembran stabilisiert werden und von einer Schicht aus polyedrischen Zellen ausgekleidet sind. Nähert man sich dem Orifizium des Ausführungsganges, wandelt sich

das Gewebe in ein verhorntes Plattenepithel mit ausgeprägtem Stratum Granulosum. Die Zellen lagern sich mehrschichtig und enthalten zahlreiche Keratohyalin granula. ^[5]

Die Azini, welche je nach Quelle auch als Endstücke, Alveoli oder Säckchen beschrieben sind, weisen peripher eine Schicht kleiner rundlicher Basalzellen mit hoher Teilungsrate auf, welche von Bindegewebe umgeben sind und einer Basalmembran aufliegen. Nach zentral ändert sich die Zellform über kubisch hin zu polygonal, Größe und Anzahl der Lipidvakuolen nehmen zu. ^[37]

Der Differenzierungsprozess der Drüsenzellen findet also von außen nach innen statt und endet in der sogenannten Desintegrationszone, in der die letalen oder hypermaturen Meibozysten im Rahmen des holokrinen Sekretionsprozesses zerfallen. ^[21, 38]

Die Sekretion selbst kann über hormonale und neuronale Signale getriggert werden: Rund um die Drüsenazini enden zahlreiche cholinerge und VIPerge Nervenfasern, so dass eine teilweise parasymphatische Innervation über den siebten Hirnnerv naheliegt. ^[39]

Weitere Quellen beschreiben einen stimulierenden Effekt auf die Talgsekretion durch Androgene wie Testosteron und sprechen Östrogenen und Antiandrogenen eine Hemmung des Vorganges zu. ^[39 - 41]

Der Vorgang der Sekretion selbst wird von Bron ^[42] auf folgenden Ablauf vereinfacht: Auf Grund eines der genannten Stimuli zerfallen Drüsenzellen im Azinulumen und setzen somit ihr Sekret frei. Dieses gelangt in das angrenzende Ausführungsgangsystem, welches in seiner Struktur elastisch ist.

Wird durch weitere Sekretion (wie zum Beispiel bei geschlossenen Augen im Schlaf) oder die Muskelpumpe, welche beim Blinzeln aktiviert wird, ein kritischer Druck überschritten, entleert sich der Inhalt des Gangsystems als "Jet" auf die Lidkante. Jeder Drüsenschlauch hat also einen eigenen kritischen Wert, der bei jedem Lidschlag überschritten werden kann.

Untersuchungen Norns, der einzelne Drüsenschläuche auf ihren Fettsäureinhalt anfärbte und beobachtete, dass jeweils nur 44% der Tubuli anfärbbar sind, belegen diese Theorie. Des Weiteren deuten neuere Veröffentlichungen darauf hin, dass abhängig von der horizontalen Lage des Drüsenstranges im Lid eine spezifische Grundaktivität vorliegt. ^{[32,}

1.2.3 Der Tränenfilm

In seiner Gesamtheit erfüllt der Tränenfilm fünf Aufgaben:

- Ausfüllung kleiner Oberflächendefekte der Kornea zur Schaffung einer perfekt-homogenen optischen Oberfläche
- Schaffung eines Gleitfilmes zur erleichterten Bewegung der Augen und ihrer Lider
- Entfernung von Fremdkörpern und Zelldetritus in Richtung Caruncula
- Versorgung der Kornea mit Sauerstoff, Glucose und weiteren Nährstoffen
- Erfüllung immunologischer und antiinfektiöser Aufgaben

Zur Umsetzung dieser Funktionen ist eine konstante Homöostase des Tränenfilms notwendig, die zwar interindividuell variiert, auf den einzelnen bezogen jedoch in engem Rahmen reguliert ist. Diese findet sich im Aufbau des Tränenfilms wieder.

Während neuere Autoren eine fünfschichtige Untergliederung des Tränenfilms vorgeschlagen haben ^[44], beschreibt die Mehrheit der Quellen den Aufbau des Tränenfilmes als trilaminär. ^[45]

Die oberste, also ventralste Schicht, besteht aus Lipiden und ist circa 0,1 µm stark. Ihr folgt eine 6-10 µm dicke wässrige Schicht mit antibakteriell aktiven Enzymen und Proteinen. Zu innerst liegt eine Schleimschicht, welche Kornea und Konjunktiva überzieht. Sie wird von den einzeln versprengt in der Konjunktiva oder in ihrem Kryptensystem liegenden Becherzellen gebildet und hat nach neueren Untersuchungen eine Dicke von bis zu 1 µm. ^[15, 46]

Auf ihr ruht mit der mittleren Schicht der Hauptanteil des Tränenfilms, der von der Glandula Lacrimalis und den akzessorischen Tränendrüsen (Krause- und Wolfringsche Drüsen) gebildet wird.

Elektrolyte und Wasser stellen den Großteil dieser Schicht dar. Des Weiteren finden sich die Proteine IgA, Lactoferrin sowie Lysozym, welche der Infektabwehr dienen.

Als dritte Schicht liegt das Sekret der Meibomschen Drüsen auf. Die sogenannten Meibomschen Lipide, die auch als Meibum bezeichnet werden, bestehen größtenteils aus

Wachs- und Cholesterolestern und haben nur wenig polare Anteile. Bei Körpertemperatur sind alle Anteile flüssig. ^[47, 48]

Aufgaben dieser Fettschicht bestehen in der Bildung einer hydrophoben Barriere gegen die Umwelt, einer Veränderung der Oberflächenspannung, die einen Austritt der Tränen über die Lidkante auf die äußeren Teile der Lider verhindert, sowie einem wasserdichten Verschluss der Lider während des Schlafes. Des Weiteren werden dieser Schicht ein Verhindern von Verdunstung sowie eine Alteration der Brechkraft zugeschrieben. ^[48, 49]

1.3 Grundlagen der Mikroskopie

1.3.1 Einleitung

Einen Erfinder des ersten Lichtmikroskopes zu benennen ist nicht möglich. Während verschiedene Quellen Galileo Galilei mit der Entwicklung seines Occholino als Erfinder nennen, schreiben andere dem holländischen Brillenmacher Hans Jansen und seinem Sohn die Schaffung dieses technologischen Meilensteines zu.

Heutzutage ist es durch unzählige Neuerungen der Optik sowie des Herstellungsprozesses möglich mit der Lichtmikroskopie eine maximale Auflösung von einem halben Mikrometer zu erreichen.

Eine wesentlich höhere Auflösung bietet die Elektronenmikroskopie: Hiermit gelingt es Strukturen mit einer Auflösung von drei Wasserstoffionen darzustellen.

Diese Technik beruht im Wesentlichen auf der Forschung von Hans Busch, dem es 1926 gelang die erste magnetische Linse herzustellen.

Ernst Ruska baute 1931 mit Max Knoll das erste Elektronenmikroskop und erhielt für diese Arbeit über 50 Jahre später den Nobelpreis für Physik.

Voraussetzung beider Methoden ist die präexaminate Behandlung des zu untersuchenden Materials, was in der Regel mit seiner Zerstörung einhergeht.

1911 entwickelte Gullstrand mit seiner Spaltlampe eine völlig neue Untersuchungsmöglichkeit mit der es durch die Weiterentwicklungen zum *specular microscope* durch Maurice (später Lang, Sandström und Leibowitz) 1968 zum ersten Mal gelang lebende Zellen, nämlich das korneale Endothel, in situ detailreich darzustellen.

Anfangs waren Vergrößerungen von 40x möglich, durch die Arbeiten von Bourne und Kaufman wurde bald der Faktor 200x erreicht. Nach wie vor ist es mit dieser Methode nur möglich die oberflächliche Zelllage darzustellen und nicht die darunter liegenden Strukturen oder gar eine Visualisierung auf subzellulärem Niveau.

Bereits 1957 hatte der amerikanische Forscher Marvin Minsky ein Patent für eine neue Technik eingereicht, die er dazu nutzen wollte Übersichten neuronaler Netzwerke zu erstellen.

Das Prinzip, welches er Scanning Microscopy (genauer *double focussing stage scanning microscopy*) nannte, basierte auf dem Grundkonzept der Elimination von Streulicht durch Linsen und Blenden. Schritt für Schritt wurde jeweils ein Punkt des Objekts auf seine Reflexionsstärke abgetastet und durch Verschiebung des Untersuchungsobjektes in diesem Scanning-Vorgang zu einem Gesamtbild zusammengesetzt.

Aufgrund des Mangels an ausreichend starken Lichtquellen, Defiziten der Feinmechanik und des Standes der Technik im Bereich der elektronischen Datenverarbeitung, stieß die Weiterentwicklung der konfokalen Mikroskopie aber bald an ihre Grenzen und seine Erfindung geriet in Vergessenheit. ^[50]

1.3.2 Lichtmikroskopie

Wie in allen Formen der Mikroskopie ist hier das Ziel, ein Objekt oder eine Struktur derart zu vergrößern, dass Details die unterhalb des Auflösungsvermögens des menschlichen Auges liegen, sichtbar werden.

Bei der klassischen Durchlichtmikroskopie lassen sich Substrate nur nativ untersuchen, wenn sie von Natur aus eine vertikale Ausbreitung von maximal 100 μm nicht überschreiten.

Größere Objektvolumina müssen vorpräpariert, also gebettet, geschnitten, gefärbt und auf einen Objektträger aufgebracht werden.

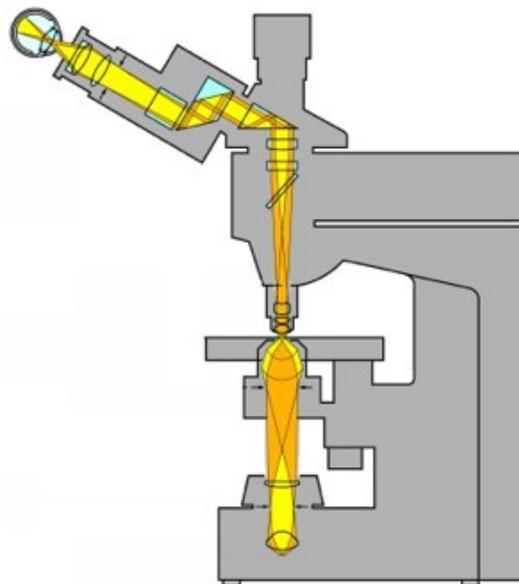


Abbildung 7 – Strahlengang eines Lichtmikroskops ^[125]

Objektträger samt Objekt werden in orthogonalem Winkel von einem Lichtstrahl aus der Lichtquelle durchdrungen, welcher im Kondensator gebündelt wird.

Das durchdringende Licht wird in einem System aus Sammellinsen, dem Objektiv, gebündelt. Es entsteht ein vergrößertes reelles Bild des Untersuchungsobjektes. Dieses

Bild wird durch ein weiteres Linsensystem, nämlich des Okulars, in ein virtuelles vergrößertes Bild auf die Netzhaut des Anwenders projiziert.

1.3.3 Konfokale Mikroskopie

1.3.3.1 Entstehung und heutiger Stand

Petran und Hadravsky stellten 1968 beinahe zeitgleich zu Maurice *specular microscope* mit der Entwicklung des ersten Tandem-Scanning Reflected Light Microscopes, eine Technik, die auf den Arbeiten Minskys basierte vor.

Diese neue Möglichkeit der Darstellung von Zellen innerhalb ihres natürlichen Zellverbandes, setzte keine Aufbereitung des entsprechenden Gewebes voraus und war weiterhin nicht nur auf das lichtdurchlässige Gewebe der Kornea beschränkt. ^[51]

Kernstück ihrer Entwicklung war der Einsatz der sogenannten Nipkow Scheibe, einer dünnen rotierenden Kupferscheibe, in die mehrere Zehntausend mikrometergroße Öffnungen eingebracht waren. Die spiegelbildliche Anordnung dieser Öffnungen auf beiden Hälften der Scheibe stellte eine effektive Methode zur Filterung von Streulicht dar, da ein Lichtstrahl das Okular nur erreichen konnte, wenn sowohl auf seinem Weg von der Lichtquelle zum Objekt als auch auf dem Rückweg vom Objekt zum Okular eine entsprechende Öffnung in der Scheibe vorhanden war.

Als Lichtquelle diente den beiden Entwickler durch Linsen gebündeltes Sonnenlicht. ^[52]

Der Name „*konfokal*“ Mikroskopie wurde erst 1979 von Brakenhoff eingeführt und leitet sich vom lateinischen „*con...*“ zusammen/mit sowie „*focus*“ lateinisch Brennpunkt ab, da sowohl die Quelle des Anregungslichtes als auch der Detektor in der gleichen Fokalebene arbeiten. ^[53]

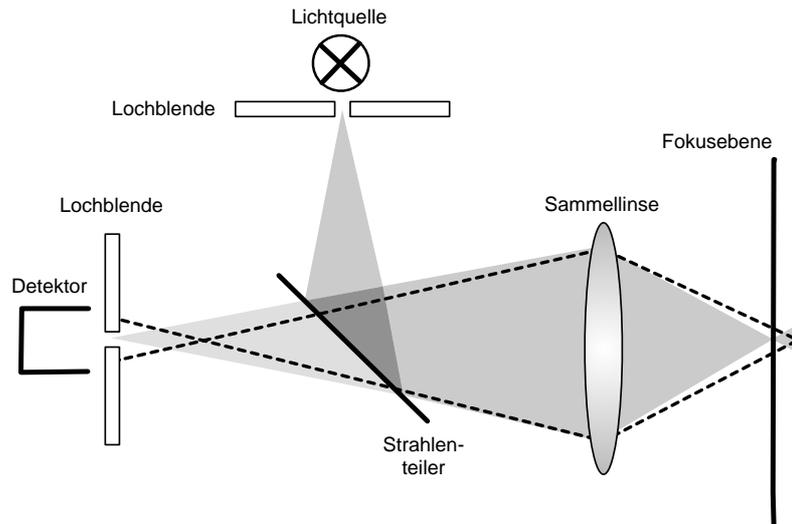


Abbildung 8 – Prinzip der konfokalen Mikroskopie (eigene Darstellung)

Vorteil der Anordnung von Anregungs- und Detektionsfokus in konfokaler, also sich überlagernder Weise ist, dass Streulicht, welches die Bildqualität beeinflussen würde in doppelter Weise abgeschwächt wird: Objekte außerhalb der Fokusebene werden zum einen weniger stark durch das Anregungslicht bestrahlt und zum anderen durch die Lochscheibe, die sich als Filter vor dem Detektor befindet, in hohem Maße von der endgültigen Bildgebung abgeschirmt. ^[54]

Jedoch gelingt es mit dieser Methode immer nur einen Punkt des zu untersuchenden Objektes abzutasten, was zur Folge hat, dass größere Substrate durch einen Scanning-Vorgang erfasst werden müssen.

Dafür ist es möglich bei dieser Abrasterung eines Probematerials oder Gewebes eine dritte Achse, die z-Achse, mit einzubeziehen und ein Objekt somit dreidimensional zu visualisieren. ^[55]

Dieser Vorteil unterscheidet die konfokale Mikroskopie grundlegend von allen anderen Techniken.

Durch die Bestimmung dieser dritten Ebene lassen sich mit spezieller 3D-Rekonstruktions-Software, wie zum Beispiel *Osirix*, Blocksätze eines Materials zusammenfügen und somit komplette 3D-Modelle zum Beispiel eines Gewebes erstellen.

Die heutzutage kommerziell erhältlichen Konfokalmikroskope unterscheiden sich hauptsächlich in der Lichtquelle, nämlich in Weißlicht- und Lasergeräte.

Weißlicht-Konfokalmikroskope, wie zum Beispiel das Nidek Confoscan III arbeiten mit einer Halogen- oder Hochdruck-Quecksilberlampe und bieten Vergrößerungen im Bereich 100x bis 500x und erreichen eine Auflösung von 1,5-6 μ m. Wesentlicher Nachteil dieser Geräte stellt die schlechte Ausleuchtung der Randbereiche eines jeden Ausschnittes dar, der eine Beurteilung dort liegender Strukturen erschwert beziehungsweise unmöglich macht. ^[56]

Das für diese Studie wurde der Heidelberg Retina Tomograph II (HRT II) gewählt, ein Konfokalmikroskop, welches mit einer Laserlichtdiode im Wellenlängenbereich von 670nm arbeitet. Durch auswechselbare Objektive ist eine Variation des Arbeitsbereiches von 250 - 500 μ m Seitenlänge bei einer Auflösung von 1 μ m möglich. Der HRT II liefert eine maximal 800fache Vergrößerung. ^[57]

1.3.3.2 Prinzip

Der Vorteil der Konfokalmikroskopie liegt in der Option ein dreidimensionales Objekt in beliebig viele parallel zur Oberfläche liegende Schichten zu teilen. Diese zweidimensionalen Bilder (x- und y-Achse) erhalten als zusätzliche Information einen z-Wert, der die Tiefe wiedergibt, in der sie entstanden sind.

Mit Hilfe elektronischer Datenverarbeitung lassen sich die zweidimensionalen Daten (Pixel) unter Einbeziehung des z-Wertes in dreidimensionale Voxel (Englisch: volumetric Pixel) umwandeln. Diese wiederum ermöglichen, die gewonnen Bilddaten in Form von dreidimensionalen Blocksätzen darzustellen.

Konfokale Laser Scanning Mikroskope arbeiten nach dem in Abbildung 9 dargestellten Prinzip:

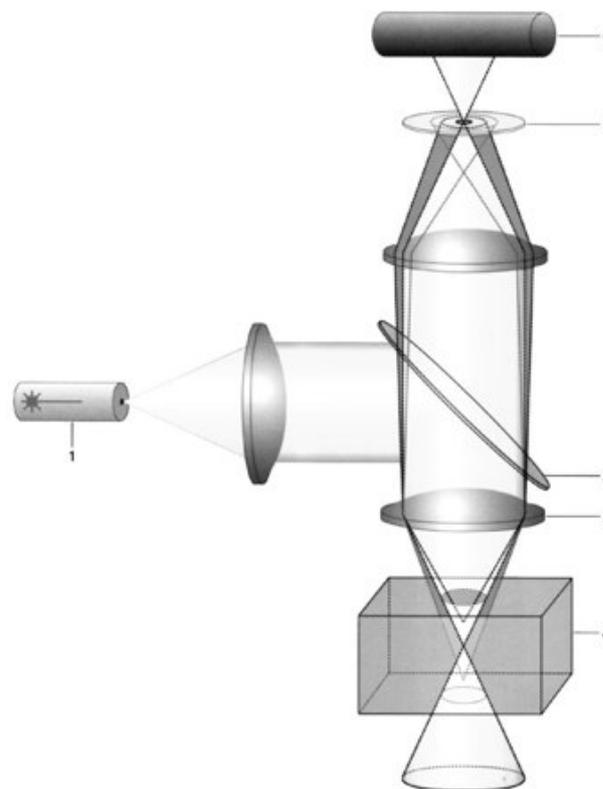


Abbildung 9 – Vereinfachte Darstellung eines Konfokalmikroskopes ^[58]

Eine Laserquelle (1) erzeugt einen Lichtstrahl, welcher durch ein vorgeschaltetes Linsensystem weiter gebündelt wird. Über einen halbtransparenten Spiegel (2) wird dieser Strahl in Richtung des Untersuchungsobjektes (4) umgelenkt. Die Besonderheit des halbtransparenten optischen Elementes besteht in seiner Eigenschaft, horizontal

einfallendes Licht in die Vertikale zu spiegeln, während vertikale Lichtsignale nicht in ihrem Verlauf geändert werden.

Durch das Objektiv (3) wird der Strahl erneut gebündelt, trifft auf das Untersuchungsobjekt (4) und regt in seinem Fokus einen kleinen Bereich des Objektes an, der das Lichtsignal zum Teil zurückspiegelt. Durch die mehrfache Bündelung des Anregungssignals wird zwar nur ein kleines Volumen angeregt, jedoch erfahren auch angrenzende Bereiche des Objektes eine Anregung und reflektieren das Signal.

Sämtliche Lichtimpulse, die das zu untersuchende Objekt in Richtung Sammellinse (3) zurückwirft passieren den halbtransparenten Spiegel und eine weitere Sammellinse, bevor sie auf die Lochblende (5) treffen. Die Lochblende ist auf die Fokusebene eingestellt und lässt somit nur diejenigen Lichtstrahlen zum Detektor (6), die ihren Brennpunkt im Bereich der Blendenöffnung haben.

Durch Variation des Fokuspunktes im Untersuchungsobjekt in x- und y- Richtung bei gleicher Tiefe des z-Wertes entsteht eine Fokusebene, welche digital zu einem Schnittbild zusammengesetzt wird.

1.3.3.3 Bildgenese

Da in der Konfokalmikroskopie das Untersuchungsobjekt nicht durchleuchtet wird, kann für die Bildgebung nur das Licht verwendet werden, das vom Untersuchungsobjekt in Richtung des Detektors zurückgeworfen wird.

Die von der Punktlichtquelle emittierten Lichtwellen interagieren auf verschiedene und komplexe Weisen mit untersuchtem Objekt und seinen Mikrostrukturen. Dabei können die Lichtwellen reflektiert, abgelenkt, zerstreut, gebündelt, polarisiert oder in ihrer Phase verschoben werden. ^[59]

Führt man sich den Scanning-Prozess in der konfokalen Bildgebung vor Augen, wird erkennbar, dass jeder einzelne Punkt, der vom Laserlicht angeregt wird, mit einer unterschiedlichen Intensität an zurückgeworfenem Licht reagiert.

Diese unterschiedlichen Signalstärken an verschiedenen Bereichen eines Bildes ergeben in ihrer Gesamtheit den Kontrast.

Wie viele Lichtwellen von einem Objekt reflektiert werden, steht in engem Zusammenhang mit seinem Brechungsindex, seiner Oberflächenstruktur und der Tiefe im Gewebe, in der sich die Fokalebene befindet. ^[60]

Je größer die Differenz zweier Brechungsindices desto stärker die Reflexion des Areal. Zellwände, die aus Lipiden bestehen, reflektieren zum Beispiel im Vergleich zum angrenzenden Zytoplasma unterschiedlich, da ihr Refraktionsindex ($n = 1.45$) über dem des Zytoplasmas ($n = 1.37$) liegt. ^[61]

Bei Organellen innerhalb der Zellen ist neben den Brechungswerten auch die Größe der Bestandteile entscheidend. Je größer das Organell desto höher der Anteil des zurückgeworfenen Lichtes. ^[62]

Stärkste Reflexionen ergehen von glatten Oberflächen, während bei raueren Strukturen, wie zum Beispiel Zellen mit Mikrovillobesatz, der Winkel in dem die Strukturen zur Fokalebene stehen, von entscheidender Rolle für die Reflexion ist.

Weiterhin entscheidend ist die Tiefe des Untersuchungsortes im Gewebe. Sämtliche optischen Phänomene betreffen den Strahlengang aufgrund des konfokalen Aufbaus in doppelter Weise. Die Lichtwellen können sowohl auf dem Weg von der Lichtquelle zum

Fokuspunkt als auch auf dem Weg zurück vom reflektierenden Objekt zum Detektor in ihrer Qualität beeinträchtigt werden.

1.3.3.4 Klinische Anwendungen

Die ersten Einsätze der konfokalen Bildgebung waren aufgrund der Größe der einzusetzenden Instrumente und des fehlenden Bedienerkomforts der Nutzung in Laboratorien der Physik und der Materialkunde vorbehalten. ^[63]

Aktuell gewinnt die Methode an starkem Interesse; so hat sich allein im Bereich der Ophthalmologie die Zahl der wissenschaftlichen Veröffentlichungen in den letzten 5 Jahren verdoppelt. Während eine Suche auf der Website *pubmed.com* nach dem Terminus "*Confocal Microscopy AND Eye*" im Jahr 2005 noch um die 1.500 Treffer lieferte, liegen die Zahlen im laufenden aktuellen Jahr 2010 bei beinahe 3.000 Ergebnissen.

Die Nutzung konfokaler Scanning Mikroskopie in klinischer Forschung begann in der Mikrobiologie ^[64, 65], verbreitete sich über die Ophthalmologie mit in-vitro Experimenten von Lemp und Delly ^[66] und fand Anwendung in der Materialkunde der Zahnmedizin ^[67, 68]. Es folgten Veröffentlichungen der Pathologie ^[69, 70] und der Gynäkologie ^[71].

Ergebnisse erster in-vivo Untersuchungen wurden 1990 von Cavanagh an der Kornea durchgeführt ^[72, 73] gefolgt von Untersuchungen an Fundus und Nervus Opticus ^[74].

Die Option einer in-vivo Diagnostik fand früh Zuspruch im Bereich der Dermatologie ^[75, 76] und wurde in der Ophthalmologie bei zur Erkennung infektiöser Keratitiden ^[77] und fortgeschrittener Endotheldysplasien ^[78] eingesetzt. Es entstanden Überlegungen, im Tiermodell diese neue Methode zur Beurteilung des Heilungsprozesses der Hornhaut nach chirurgischen Eingriffen zu nutzen. ^[79]

Gegenwärtig erfährt die konfokale Mikroskopie als Methode zur Darstellung physiologischer und pathologischer Zustände in der klinischen Forschung starken Zuspruch.

Allein in der Augenheilkunde wird sie zur Diagnostik zahlloser Alterationen des Sehorgans verwandt. Es finden sich unter anderem Anwendungen zur präzisen Messung der Hornhautdicke unter Einbezug der Zelldichte der einzelnen Schichten, zur Erkennung von Benetzungstörungen des Tränenfilms (sog. *dry spots*), zur Beurteilung des Einflusses des Kontaktlinsentrags auf die Hornhaut, zur Diagnostik infektiöser Erkrankungen, zur Visualisierung der nervalen Versorgung der Kornea sowie der Darstellung des Heilungsprozesses nach refraktiver Chirurgie. ^[80 - 83]

Die Amerikanische Gesellschaft für Augenheilkunde empfiehlt die Anwendung der Technik bei Diagnosesicherung der Acanthamoeben Keratitis. ^[84]

2 Probanden und Methoden

2.1 Konfokale Laser Mikroskopie

2.1.1 Heidelberg Retina Tomograph

Bei dem für die Studie gewählten Gerät handelt es sich um einen Heidelberg Retina Tomograph II mit vorgeschaltetem Rostocker Cornea Modul. Die Apparatur ist über eine separat steril verpackte PMMA Kunststoff Kappe (TomoCap, Fa. Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland) und einer Brücke aus Tränengel (Vidisic®, Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland) an das Untersuchungsobjekt gekoppelt.

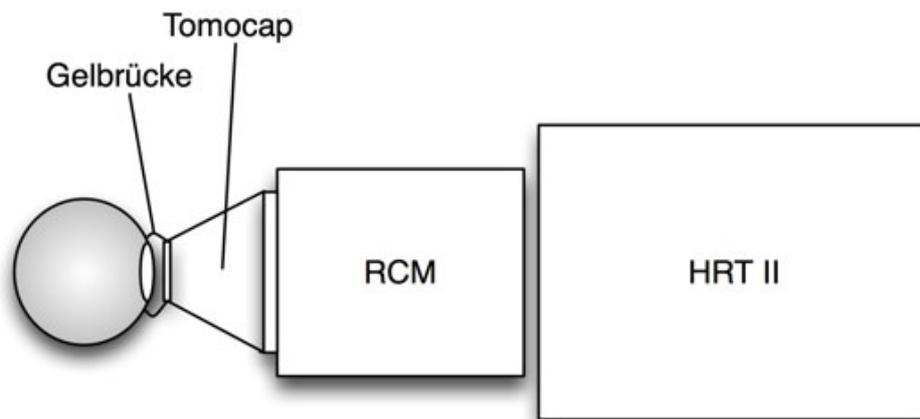


Abbildung 10 – Übersicht des Aufbaus (eigene Darstellung)

Als Punktlichtquelle nutzt der Heidelberg Retina Tomograph II einen Diodenlaser im Wellenlängenbereich von 670nm. Durch zwei Blendensysteme, sowohl an der Lichtquelle als auch vor dem Detektor, gelingt es, den Anteil an Streulicht zu minimieren und so ein Maximum an Bildqualität zu schaffen.

Grundlage für die Entstehung der Bilder ist der Einsatz eines computergesteuerten hydraulischen Scanners (Nikon Hydraulic Manipulator, Tokyo, Japan), welcher den Objektausschnitt linienweise abrastert und die Informationen an ein Computersystem weitergibt.

Das Gerät verfügt über einen internen Tiefenscan, den z-Scan, der es aufgrund einer computergesteuerten Hydraulik ermöglicht, eine Bildserie mit definierten Abständen der Bildebenen durchzuführen. Hierbei wird das Gewebe schrittweise in die Tiefe abgerastert und die Ergebnisse als Videodatei oder Einzelbilder abgespeichert. Normale Einstellungen für den Vorgang umfassen eine Scantiefe von 80! m mit 40 Einzelbildern über eine Dauer von 6 Sekunden. Der z-Scan ist die Basis für eine anschließende 3D Rekonstruktion des untersuchten Objektes.

Der Kontakt mit dem Untersuchungsobjekt wird über eine 0.5mm dicke Kappe aus glasähnlichem thermoplastischen Kunststoff hergestellt. Die steril verpackte PMMA TomoCap besitzt eine glatte Oberfläche und wird über eine Doppelgelbrücke sowohl nach innen mit dem System als auch nach extern mit dem Untersuchungsobjekt verbunden. Da es sich um einen medizinischen Einwegartikel handelt, wird eine Keimübertragung von Patient zu Patient verhindert.

Weiterer Vorteil des Aufbaus mit Carbomer-Gelbrücke besteht darin, dass kein Druck auf das Gewebe ausgeübt wird. Da Kompression im Gewebe vermieden wird, entsprechen die Information über die Tiefe und Schichtdicken im Volumen den in-vivo Konditionen.

Der Heidelberg Retina Tomograph wird an einem Windows-basierten PC System betrieben, auf dem auch die Ausgabe des Bildmaterials erfolgt. Für die Kombination HRT II / RCM steht mit dem Heidelberg Eye Explorer 2.0 eine Software zur Verfügung, die das Management der Bild- und Patientendaten übernimmt. Neben den Eingaben der Patientenstammdaten und erweiterter patientenbezogener Informationen, lassen sich verschiedene Modi für die Aufnahme wählen. Es stehen die Optionen Einzelbilder, Serienbilder oder Bildstapel zur Verfügung.

2.1.2 Das Rostocker Cornea Modul

Aufgrund der technischen Limitierung konfokaler Weißlichtmikroskope entstanden an der Universität Rostock Überlegungen, einen laserbasierten Retinatographen zu modifizieren, um ihn für Untersuchungen der vorderen Augenabschnitte einsetzen zu können.

Zur Visualisierung der hinteren Augenabschnitte, insbesondere der Innervation der Netzhaut, nutzen Retinatographen die Kornea und die Augenlinse als Brechungsmedien. Um ventralere Abschnitte darzustellen, musste also ein Linsensystem vorgeschaltet werden.



Abbildung 11 – HRT II mit RCM

Dies wurde in Form des Rostocker Cornea Moduls (RCM, J.Stave, utility model no. 296 19 361.5, lizenziert für die Firma Heidelberg Engineering GmbH) umgesetzt, welches auf der Basis eines Heidelberg Retina Tomographen II (HRT II, Fa. Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland) arbeitet.

Der Einsatz eines Wasserimmersionsobjektives (Carl Zeiss, 63fach, numerische Apertur 0.9, 670nm) als Frontlinse im Rostocker Cornea Modul ermöglicht es die Fokusebene

näher an das Objektiv zu projizieren. Die Verwendung spezieller, auf die Wellenlänge des Lasers angepasster, anti-reflektierender Beschichtungen der Linsen reduziert den Anteil an Brechungsartefakten.

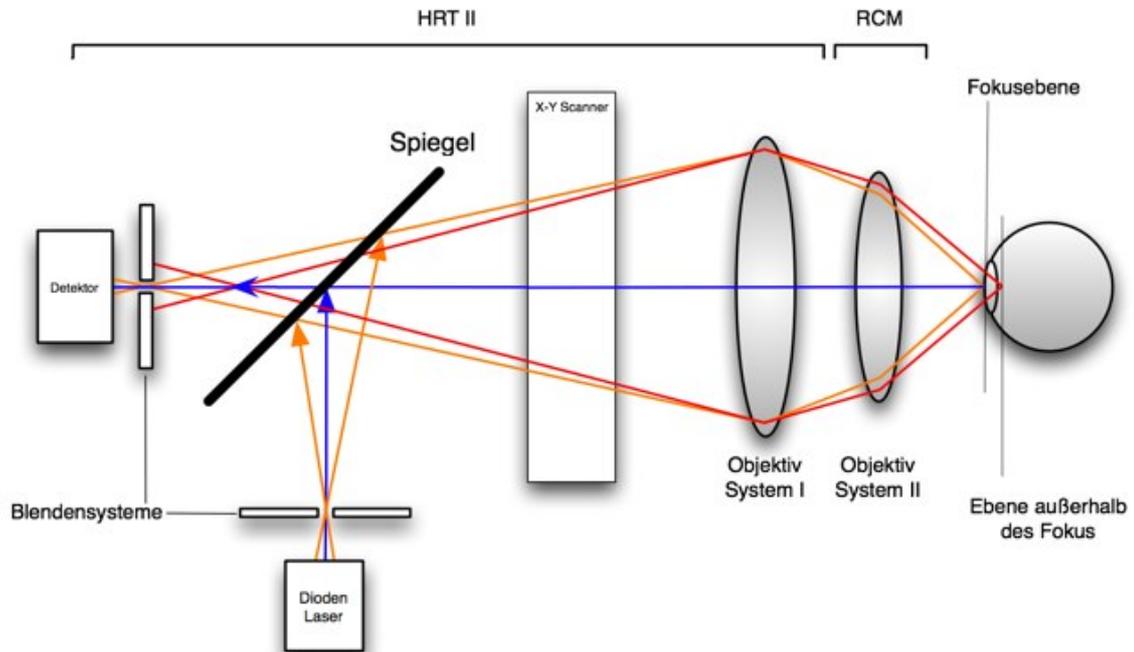


Abbildung 12 – Strahlengang des HRT II mit vorgeschaltetem RCM
(Eigene Darstellung nach J. Stave)

Mit Hilfe einer zusätzlich einsetzbaren Linse zwischen HRT II und RCM Vorsatz besteht die Möglichkeit verschiedene Arbeitsfeldgrößen zu nutzen. In Abhängigkeit von Mikroskop- und Zusatzlinse stehen verschiedene, definierte Feldgrößen von 250! m x 250! m bis 500! m x 500 ! m zur Verfügung. ^[60]

Durch das RCM erfährt der Heilberg Retina Tomograph eine Aufwertung zu einem vollwertigen Laserkonfokalmikroskop, welches sowohl die Untersuchung der hinteren Augenabschnitte als auch der Hornhaut ermöglicht und gleichzeitig eine hohe Bildqualität bei gleichmäßiger Ausleuchtung des gesamten Bildausschnittes bietet. ^[85]

2.1.3 Auflösung und numerische Apertur

Das Auflösungsvermögen eines Mikroskops beschreibt den minimalen Diskriminationsabstand zweier Punkte, also den Abstand, bei welchem diese noch als Einzelelemente identifiziert werden können.

Wellenlänge und Intensität des Lichteinfalls in das Objektiv beeinflussen das Auflösungsvermögen. Der Lichteinfall wiederum hängt vom Lichtsammelvermögen des Objektivs und somit von dessen Öffnungswinkel ab.

Da sowohl das Lichtsammelvermögen des Objektivs als auch die Brechungsindices der Medien zwischen Frontlinse und Untersuchungsobjekt Einfluss auf die erreichbare Auflösung haben, wird die numerische Apertur angegeben.

$$NA = n (\sin \#)$$

NA - numerische Apertur

n - Refraktionsindex des Mediums zwischen Frontlinse und Objekt

- halber Objektivöffnungswinkel

Die Auflösung eines Mikroskops lässt sich also unter Berücksichtigung der numerischen Apertur und der Wellenlänge des verwendeten Lichtes in folgender Gleichung ausdrücken:

$$R = 0,61 \lambda / NA$$

R - Auflösung

NA - numerische Apertur

λ - Wellenlänge des Lichtes

Diese Gleichung stellt sich im Bezug auf das verwendete Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss 63/0.95 W, 670 nm, Jena, Deutschland) wie folgt dar:

$$R = 0,61 \cdot 0,670 / 0.95 = 0,430 \text{ ! m}$$

Zur Bestimmung der numerischen Apertur liegen als Zwischenmedien die Refraktionsindices der Kappe (TomoCap, Fa. Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland; Refraktionsindex $n = 1,490$) und des künstlichen Tränengels (Vidisic, Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland; Refraktionsindex $n = 1,350$ (Wasser $n = 1,330$)) zugrunde.

Die bewusste Wahl der Zwischenmedien aufgrund ihrer Brechungswerte erhöhen die numerische Apertur und tragen so zu einer verbesserten Auflösung des Gesamtaufbaus bei.

2.2 In-vivo Untersuchungen

2.2.1 Probanden

An den Untersuchungen der Augenlider, die mit Hilfe des Heidelberg Retina Tomograph II und des Rostocker Cornea Moduls durchgeführt wurden, nahmen 61 gesunde Probanden im Alter von 20 bis 59 Jahre teil. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden analoge Bereiche der Lidregion zur Darstellung gebracht.

2.2.1.1 Aufklärung und Dokumentation

Sämtliche durchgeführten Untersuchungen an Probanden entsprachen den *Ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen* des Weltärztebundes in seiner Deklaration von Helsinki.

Das Protokoll der Studie wurde der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock vorgelegt und von ihr bestätigt.

Vor den Untersuchungen wurden die Probanden über die angewandte Technik, den Untersuchungsablauf und mögliche Risiken aufgeklärt. Die Risikoaufklärung umfasste Informationen über mögliche allergische Reaktionen auf die eingesetzte Medikation, das potentielle Risiko okulärer Infektionen, sowie über eventuelle Irritationen der Augenlider und der angrenzenden Hornhaut durch mechanische Reizungen.

In Form eines Fragebogens wurden Daten über Geschlecht und Alter, die Verwendung von Kontaktlinsen, Allergien und sonstige bekannte okuläre Erkrankungen erfasst. (siehe Datenblatt im Anhang)

2.2.1.2 Untersuchungsorte

Jeder Proband wurde an drei zuvor definierten Lidregionen untersucht. Diese Regionen wiesen bis auf die Ausnahme einer Probandin keinerlei makroskopisch erkennbare Alterationen auf.

Am ektropionierten Oberlid wurde das Mikroskop im mittleren Bereich der horizontalen Ausbreitung circa 1cm unterhalb der Lidkante aufgesetzt und die angrenzenden Bereiche in konfokaler Bildgebung erfasst. Hierbei wurden sämtliche Tiefen bis zur technisch bedingten Obergrenze in Form von Bild und Videoserien erfasst. Im gleichen Arbeitsgang wurde Bildmaterial der Oberlidkante gewonnen.

Im Bereich des heruntergezogenen Unterlides wurde ebenfalls ein zentraler Bereich der Bindehaut dargestellt und anschließend die Lidkante in ihren mittleren Anteilen untersucht.

2.2.2 Ablauf

2.2.2.1 Vorbereitung des Equipments

Der Untersuchungsablauf lässt sich nach Abschluss der Aufklärung in die folgenden 4 Teilschritte untergliedern:

1. Vorbereitung der EDV
2. Vorbereitung des HRTII/RCM
3. Medikamentenapplikation beim Patienten
4. Durchführung der Untersuchung

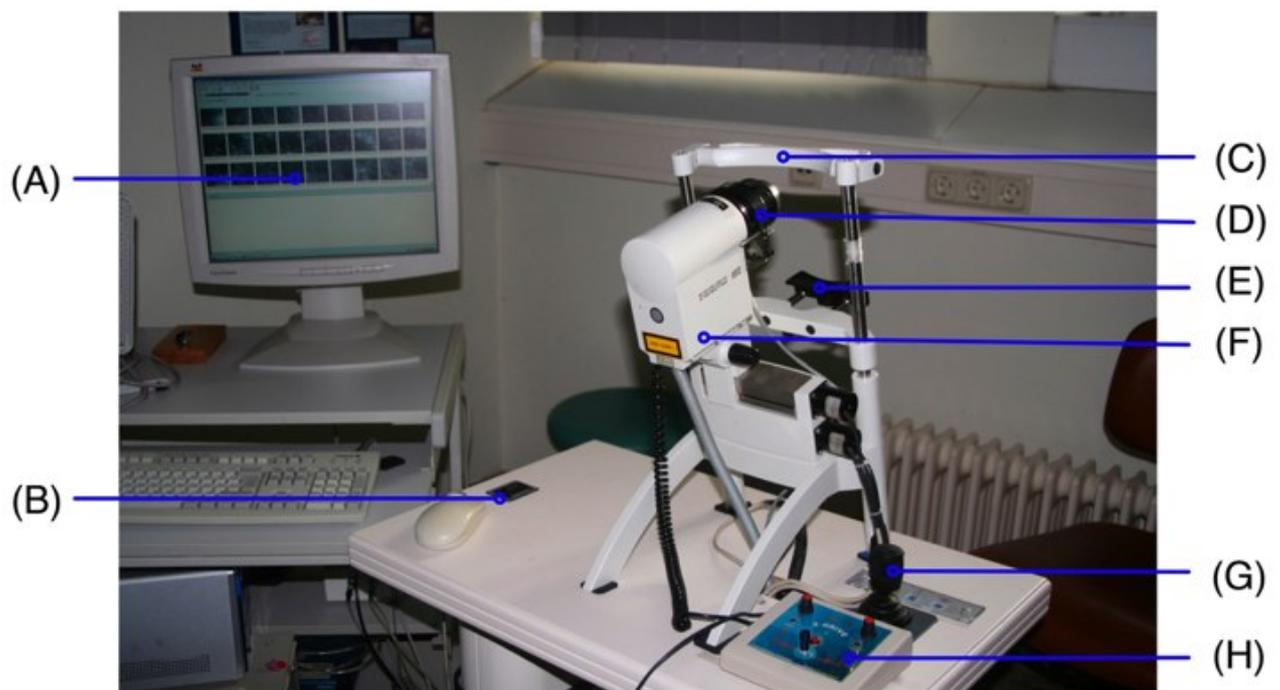


Abbildung 13 – Übersicht des Arbeitsplatzes

- (A) PC System mit Heidelberg Eye Explorer 2.0
- (B) Schalter zur hydraulischen Regulation der Tischhöhe
- (C) Stirnstütze
- (D) Rostocker Cornea Modul
- (E) Kinnstütze
- (F) Heidelberg Retina Tomograph II
- (G) Joystick zur Steuerung in vertikaler und horizontaler Richtung mit Bildauslöseknopf
- (H) Steuerungselement zur Fokussierung und Nutzung des z-Scan

Nach dem Start des Programms Heidelberg Eye Explorer 2.0 wurden in der Software Daten für einen neuen Patienten eingetragen. Neben den Patientenstammdaten wurden Informationen über das untersuchte Auge, die untersuchte Region, der Name der Studie sowie die verwendete Feldgröße des Arbeitsfeldes gesichert.

Die Vorbereitung des Konfokalmikroskops umfasste die Desinfektion der Kinn- und Stirnstütze auf der Patientenseite, das Aufsetzen der PMMA Kunststoffkappe, sowie eine Vorjustierung des Rostocker Cornea Moduls.

Vor dem Aufsetzen der Kunststoffkappe wurde zuerst die Frontlinse des RCM mit einer alkoholbasierten Desinfektionslösung gereinigt, um sicherzustellen, dass keinerlei Gelrückstände oder sonstige Verunreinigungen die Bildqualität limitieren könnten. Das HRT II wurde in die hinterste Position gefahren. Somit konnten ungewollte Berührungen der TomoCap während der Anpassung der Stützen verhindert werden.



Abbildung 14 – TomoCap

Anschließend wurde zur optischen Kopplung an die TomoCap ein dünner Film des Carbomer Tränengels auf die Linse aufgetragen, wobei besonderes Augenmerk auf die Vermeidung von Luftblasen im Gel gelegt wurde. Im Falle einer blasenfreien Gelschicht wurde die sterile TomoCap aus ihrer Verpackung entnommen und auf das Objektiv gesetzt.

Auf der äußeren Frontseite der Kappe wurde nun ebenfalls Gel aufgebracht und ein steriler Baumwolltupfer vorgehalten. Durch Benutzung des Steuerelements wurde eine

Vorfokussierung auf die Gewebestruktur des Tupfers vorgenommen, die die folgenden Untersuchungen zur Fokussuche am Patienten beschleunigte und die Justierung der Tiefenanzeige erleichterte.

Zur Examination der Probanden wurden diese auf einen höhenverstellbaren Drehhocker vor den Untersuchungstisch gesetzt. Durch Anpassung der Tischhöhe und der Höhe des Hockers wurde eine angenehme Sitzposition eingestellt. Stirn- und Kinnstütze wurden auf das Probandengesicht angeglichen, um die Auflageflächen zu optimieren und so Bewegungen während der Untersuchung zu minimieren.

Vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen erhielten die Probanden jeweils 2-3 Tropfen eines Lokalanästhetikums (Proparacain-POS 0.5% – Ursapharm/Saarbrücken) in beide Augen. Nach einer kurzen Einwirkzeit wurde eine kleine Menge des Tränengels appliziert und ein Oberlid mit Hilfe eines Glasspatels ektropioniert. Mit ektropioniertem Lid wurde der Proband in die Untersuchungsposition gebracht und erneut der stabile Halt an den Stützen gesichert.

Anknüpfend wurde die Laserlichtquelle per Tastendruck am Computer aktiviert und das Objektiv an das Bindehautgewebe vorgefahren. Sobald erste Bilder auf dem Monitor erschienen, wurde die Apparatur unter visueller Kontrolle und mit Hilfe des hydraulischen Feintriebs so positioniert, dass die Kopplung zur Konjunktiva über die Gelbrücke und nicht durch direkten Druck auf das Gewebe bestand.

Bei korrekter Position und guter Bildqualität wurde das Mikroskop auf die Schleimhautoberfläche fokussiert und die Tiefenanzeige auf 0! m geeicht. Es wurden Bilder und Videodateien aller Tiefen der Analyseregion gesichert, die mit der Technik visualisiert werden konnten. Des Weiteren wurden exemplarische Areale per internem z-Scan als Blocksatz für die spätere Rekonstruktion gesichert. Darauf folgend wurde der Untersuchungsbereich in Richtung Lidkante, bei ektropioniertem Lid, also nach kranial verschoben und auf gleiche Weise Bildmaterial akquiriert.

Zur Untersuchung am Unterlid wurde im Computer ein neues Verzeichnis für die Bilder angelegt, die Positionen der Apparatur angepasst und das Unterlid an den Wimpern heruntergezogen und mit einem Wattetupfer fixiert. In manchen Fällen konnte der Proband sein Unterlid selbst mit dem Finger in der adäquaten Stellung halten. Auch hier wurden

nach beschriebenem Vorgehen ein definierter Bereich abgescannt und das entsprechende Material zur späteren Auswertung in digitaler Form abgelegt.

2.3 Extrakorporale Vitaluntersuchungen

2.3.1 Material

Um die Strukturen in der Tiefe der Lidregion klarer zuordnen zu können, wurde neben den oberflächenparallelen in-vivo Untersuchungen eine konfokale Darstellung in sagittaler Ebene gewählt. Hierfür wurden Patienten mit tumorösen Alterationen im Bereich der Augenlider in die Studie einbezogen.

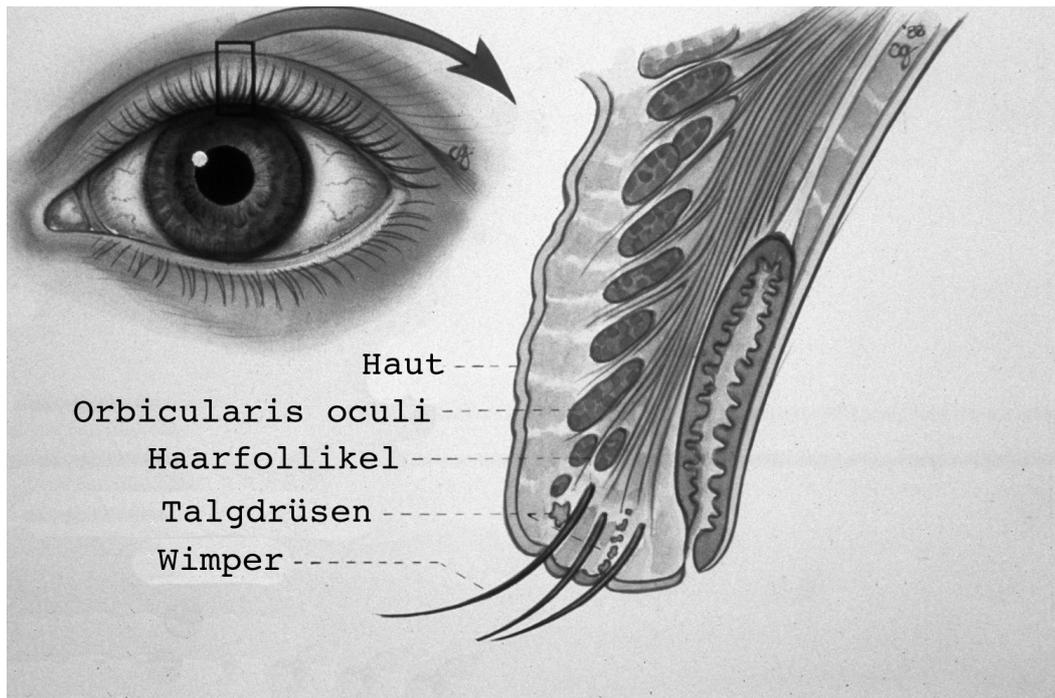


Abbildung 15 – Augenlid in Sagittalaufsicht ^[86]

Die 6 Patienten wurden vor ihrer Operation und nach der Aufklärung über Ablauf und Risiken, in eingangs beschriebenem Ablauf untersucht. Für die sagittale Darstellung wurden die Operationspräparate der Tumorentfernungen verwandt.

2.3.2 Transport

Die Exzidate wurden unmittelbar nach ihrer Entfernung zwischen zwei mit 0.9%iger Kochsalzlösung befeuchtete Gaze-Kompressen mit glatter Oberfläche gelegt und in einem sterilen Gefäß ins Labor zur konfokalen Analyse verbracht.

Der Zeitraum zwischen Entnahme und Untersuchung betrug durchschnittlich 5 Minuten, so dass zum Untersuchungszeitpunkt nur von marginalen Veränderungen des Gewebes im Vergleich zu intravitalem Konditionen auszugehen ist.

2.3.3 Untersuchung

Die Vorbereitung für die Untersuchungen wurde nach dem in Kapitel 2.2.2.1 beschriebenen Schema durchgeführt. Zusätzlich wurde der Heidelberg Retina Tomograph mit einem Einweg-Operationstuch abgeklebt, um eine Kontamination durch das Operationspräparat auszuschließen.

Das Exzidat wurde mit Hilfe einer anatomischen Pinzette, beziehungsweise in direkt manueller Fixierung vor der Kappe des Rostocker Cornea Moduls, in Position gebracht und an folgenden Stellen untersucht:

- sagittale Schnittkante
- konjunktivale Innenseite
- Lidkantenbereich

Nach der Examination wurde das Präparat in die entsprechende Transportlösung gelegt und in die Pathologie weitergeleitet.

Der Arbeitsplatz wurde desinfiziert, die Einmalutensilien entsorgt und die gewonnenen Daten ordnungsgemäß im Computersystem gesichert.

2.4 Lichtmikroskopische Histologie

2.4.1 Materialgewinnung, Schnitt und Färbung

Zur Schaffung einer Vergleichsebene für die konfokale Bildgebung wurden insgesamt sieben Augenlider von Körperspendern des *Anatomischen Instituts der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock* verwandt.

Die Lider wurden im histologischen Labor des Anatomischen Instituts für die lichtmikroskopischen Untersuchungen vorbereitet. Dafür wurden die in Formalin gelagerten Gewebeproben in folgenden Arbeitsschritten behandelt:

- Entwässerung des Präparates in einer aufsteigenden Alkoholreihe
- Einbettung des Gewebes in Paraffin
- Schneiden des zu untersuchenden Bereiches am Mikrotom
- Histologische Färbung mit Hämatoxylin-Eosin-Lösung
- Eindecken durch Auflegen eines Deckglases auf den Objektträger

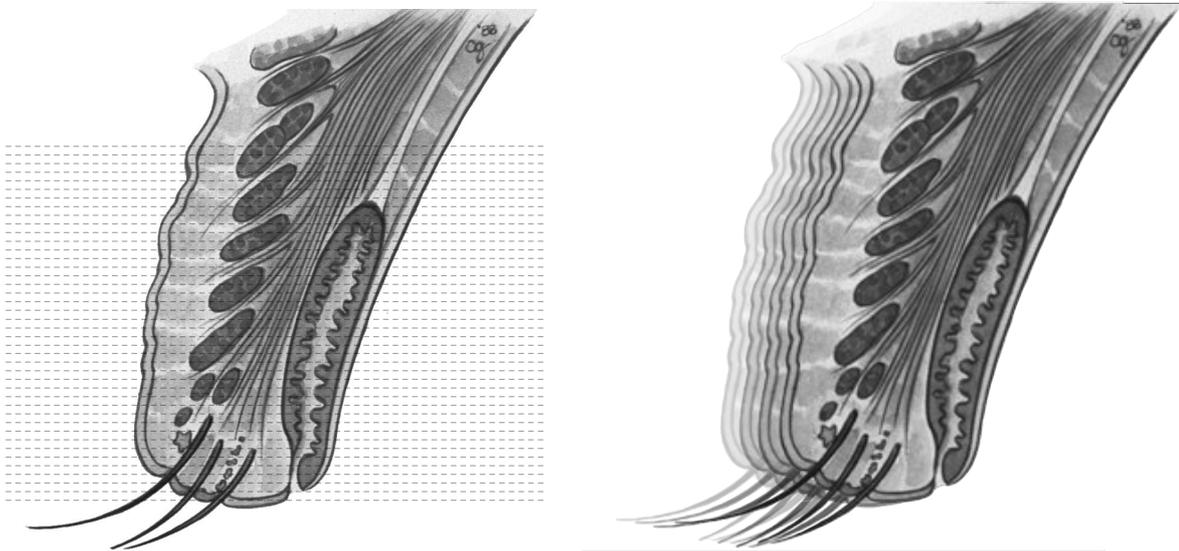


Abbildung 16 – Schnittführungen des histologischen Materials ^[86]

Um eine höhere Analogie der Schnittbilder zu den Darstellungen der konfokalen Untersuchungen zu erzielen wurden aus vier Präparaten Schnitte gefertigt, die parallel zur Lidkante verliefen. Die anderen drei wurden in sagittaler Schnittführung aufbereitet, also

in medio-lateraler Richtung geschnitten, so dass sie sich mit dem extravitem Bildgut deckten.

2.4.2 Sichtung, Dokumentation und Auswertung

Die auf beschriebene Weise präparierten Gewebeschnitte wurden an einem Carl Zeiss Jena Mikroskop mit aufgesetzter Nikon Digitalkamera untersucht. Exemplarische Bilder wichtiger Regionen wurden in verschiedenen Vergrößerungen mit Hilfe der Digitalfotografie festgehalten. Durch die Verwendung eines Objekt-Mikrometers wurde eine präzise Bestimmung der Größenverhältnisse der abgebildeten Strukturen möglich, sowie, je nach Schnittführung, eine Orientierung in der Gewebetiefe.

Die ausgewerteten Schnittserien wurden tabellarisch ausgewertet und mit dem vorhandenen konfokalen Bildgut verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Konfokale in-vivo Untersuchungen

3.1.1 Oberlid

Die bei den Untersuchungen des ektropionierten Oberlides gewonnenen Bilder zeigten heterogeneres Bildgut als die anderen untersuchten Regionen.

Aufgrund der Reliefstruktur der tarsalen Konjunktiva war es selten möglich eine oberflächenparallele Ankopplung zur TomoCap zu realisieren, so dass in der Mehrzahl der aufgenommenen Bilder Schräganschnitte mit verschiedenen Tiefen in einem Ausschnitt resultierten.

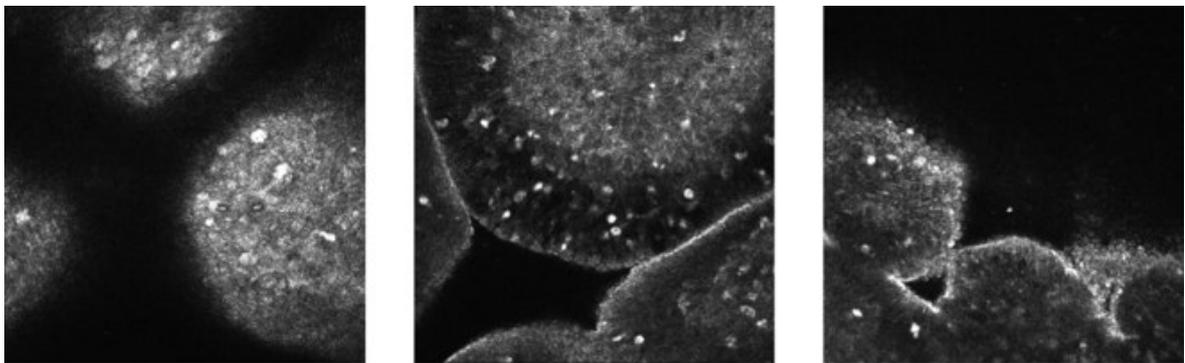


Abbildung 17 – Oberflächennahe Konfokalbilder der Conjunctiva Tarsi

Oberflächliche Gewebeschichten zeigten sich als Verband aus homogenen, kleinen Zellen mit teils hyperreflektiven, teils fehlenden Zellkernen. Das Phänomen, dass nicht jede Zelle einen Kern erkennen ließ, ist über die Zellform erklärbar, da jede Zelle von mehreren Schnittbildern erfasst wird, der Kern jedoch nur in wenigen Ebene präsent ist. Mitunter fanden sich größere, dunklere Zellen mit homogenem Zytoplasma und randständigem Zellkern eingestreut, welche aufgrund ihrer Größe und Verteilung als Becherzellen identifiziert werden konnten. Die durchschnittliche Zellgröße der Becherzellen lag bei etwa 20 μ m.

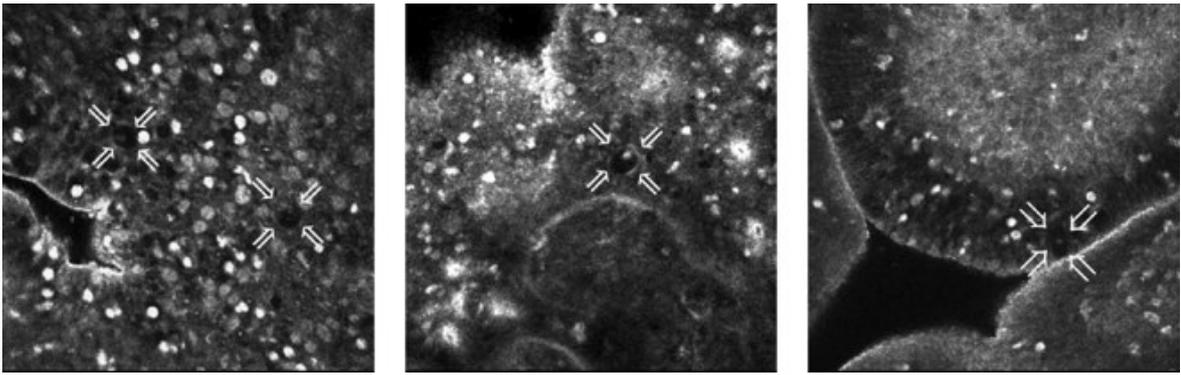


Abbildung 18 – Becherzellen im Epithelverband
(links und mittig: oberflächenparallel, rechts: oberflächenparalleler Anschnitt einer konjunktivalen Erhabenheit - Pfeile markieren Becherzellen)

Die Größenanalyse des Epithels erbrachte durchschnittliche Zellgrößen von 10! m mit ermittelten Werten der Zellkerne von 5! m.

Aufgrund des besonderen Situs des zu analysierenden Gewebes und der reproduzierbaren Schräganschnitte war eine Tiefenermittlung in diesem Gewebe nicht nur über die z-Achse, also durch Übereinanderlagern von Schnittbildern möglich, sondern konnte näherungsweise direkt aus den Schnitten in-vivo ermittelt werden.

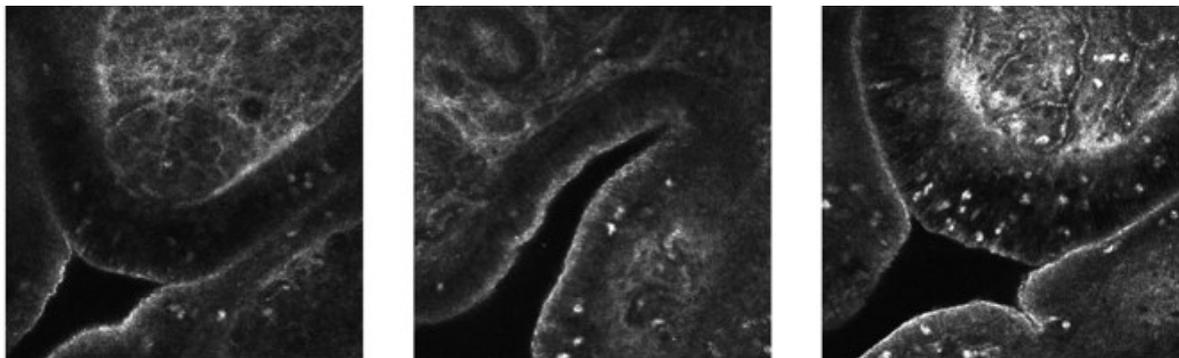


Abbildung 19 – Exemplarische Schräganschnitte der Oberlidkonjunktiva

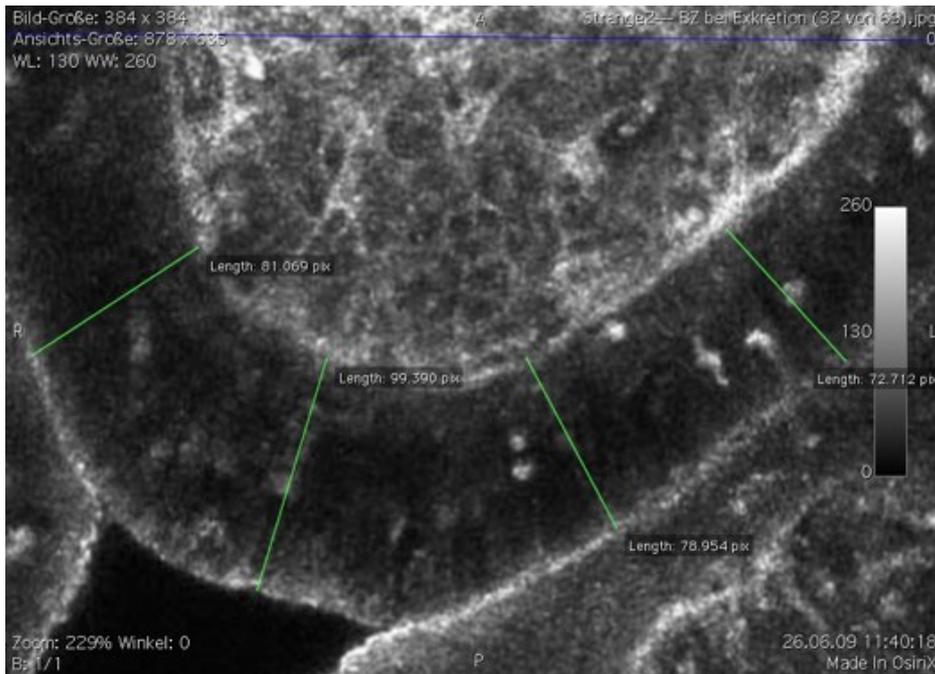


Abbildung 20 – Beispiel einer Dickenbestimmung anhand eines Queranschnittes
(Umrechnungsfaktor Pixel (pix) in μm : $\times 0.718$)

Die Bestimmung der Epitheldicken erbrachte Werte von durchschnittlich $53 \mu\text{m}$ für die Conjunctiva Tarsi des zentralen Oberlides.

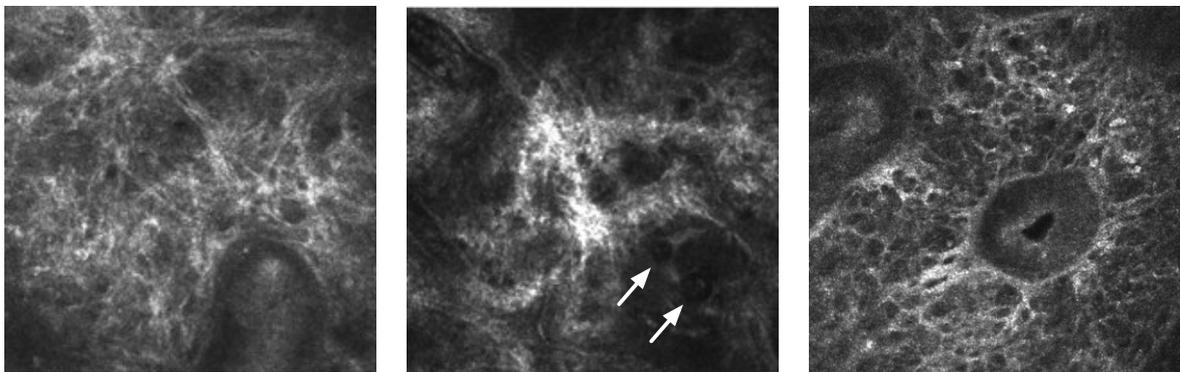


Abbildung 21 – Stromale Gewebeanschnitte
(links: Faserstränge, mittig: Gefäßanschnitte, Pfeile markieren auf- und absteigendes Gefäß, rechts: faseriges Gewebe mit dunklerer Henle Krypte)

Unterhalb der zelligen Deckschicht der Konjunktiva begann das zellfreie, faserreiche Stromalgewebe. Dieses zeigte sich von zahlreichen sich schlängelnden Gefäßen mit erkennbarem Blutfluss durchzogen. In oberflächenparallelen Schnittbildern waren oft Doppellumina erkennbar, die von Gefäßen rührten, die zur Oberfläche der Konjunktiva auf- und wieder in die Tiefe absteigen.

Ein Großteil der Bilder enthielt Anschnitte von in die Tiefe ziehenden, blind endenden Gewebstaschen, den Henle Krypten. Die Krypten wiesen die gleiche Wandstruktur des Oberflächenepithels auf. Die genannten Strukturen waren bis in eine Tiefe von 105! m verfolgbar, bevor das Bildgut aufgrund technischer Limitierungen einen zu hohen Rauschanteil aufwies und nicht mehr nutzbar war.

3.1.2 Unterlid

Die zur Darstellung gebrachten Bilder der konjunktivalen Unterlidregion zeigten Ähnlichkeiten mit dem vom Oberlid gewonnen Material. Dennoch war es aufgrund der anatomischen Gegebenheiten bei dem Großteil der Probanden nicht möglich die Konjunktiva zu betrachten, da das Unterlid nach dem Ektropionieren schneller wieder in den physiologischen Zustand zurückwechselte. Entsprechend stand nur ein sekundenlanges Intervall für Aufnahmen des Gebietes zur Verfügung. Da selbst in diesem Zeitraum keine vollständige Bewegungslosigkeit bestand, waren die Bilder oft verzerrt oder nicht optimal fokussiert.

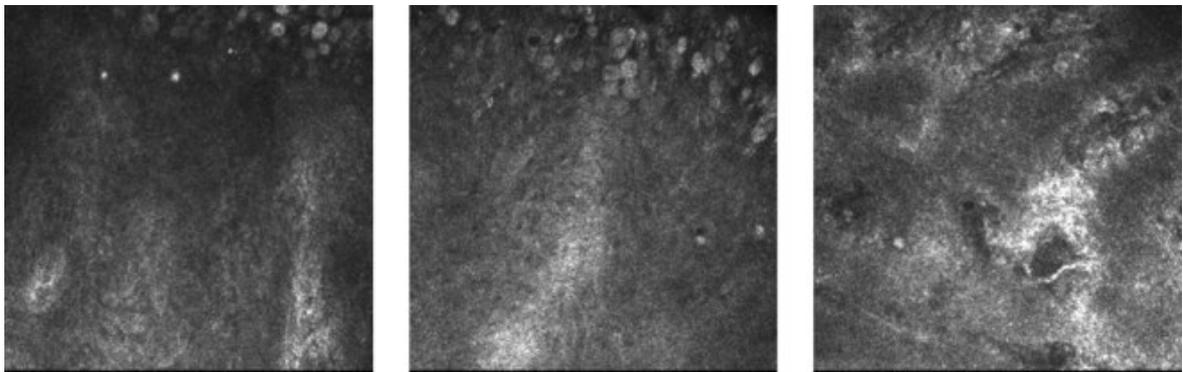


Abbildung 22 – Unterlidkonjunktiva
(links/mittig: am oberen Bildrand sind typische Anschnitte des Epithels erkennbar,
rechts: darunterliegendes gefäßreiches Stroma)

Gut hingegen gelang eine Darstellung der Lidkantenregion.

3.1.3 Lidkante

In-vivo gewonnene Bilder der Lidkantenregion brachten bei allen Probanden ähnliche Ergebnisse.

Zum ventralen Rand der Lidkante präsentierten sich die Haarfollikel der Wimpern mit den angehängten Zeis Drüsen.

In circa 800-1.200 μ m Abstand vom ventralen Rand der Lidkante fanden sich, in einer Reihe gelegen, die Ausführungsgänge der Meibomschen Drüsen. Diese wiesen als leicht ovale Öffnungen einen Durchmesser von circa 65 x 60 μ m auf.

Hinter der Reihe von Ausführungsgängen kurz vor dem dorsalen Ende der Lidkante zeigte sich bei einem Teil der Probanden eine scharf gezogene Linie, die den Übergang des Lidkantenepithels auf die konjunktivale Schleimhaut markierte. Die Zellen konjunktival dieser Linie zeigten je nach Tiefe teils inverse Reflexionseigenschaften zu dem Gewebe des Lidkantenepithels. Sie wiesen wenig reflektierendes Zellplasma und stark reflektierende Zellgrenzen und Zellkerne auf.

3.1.4 Ventrale Lidkante

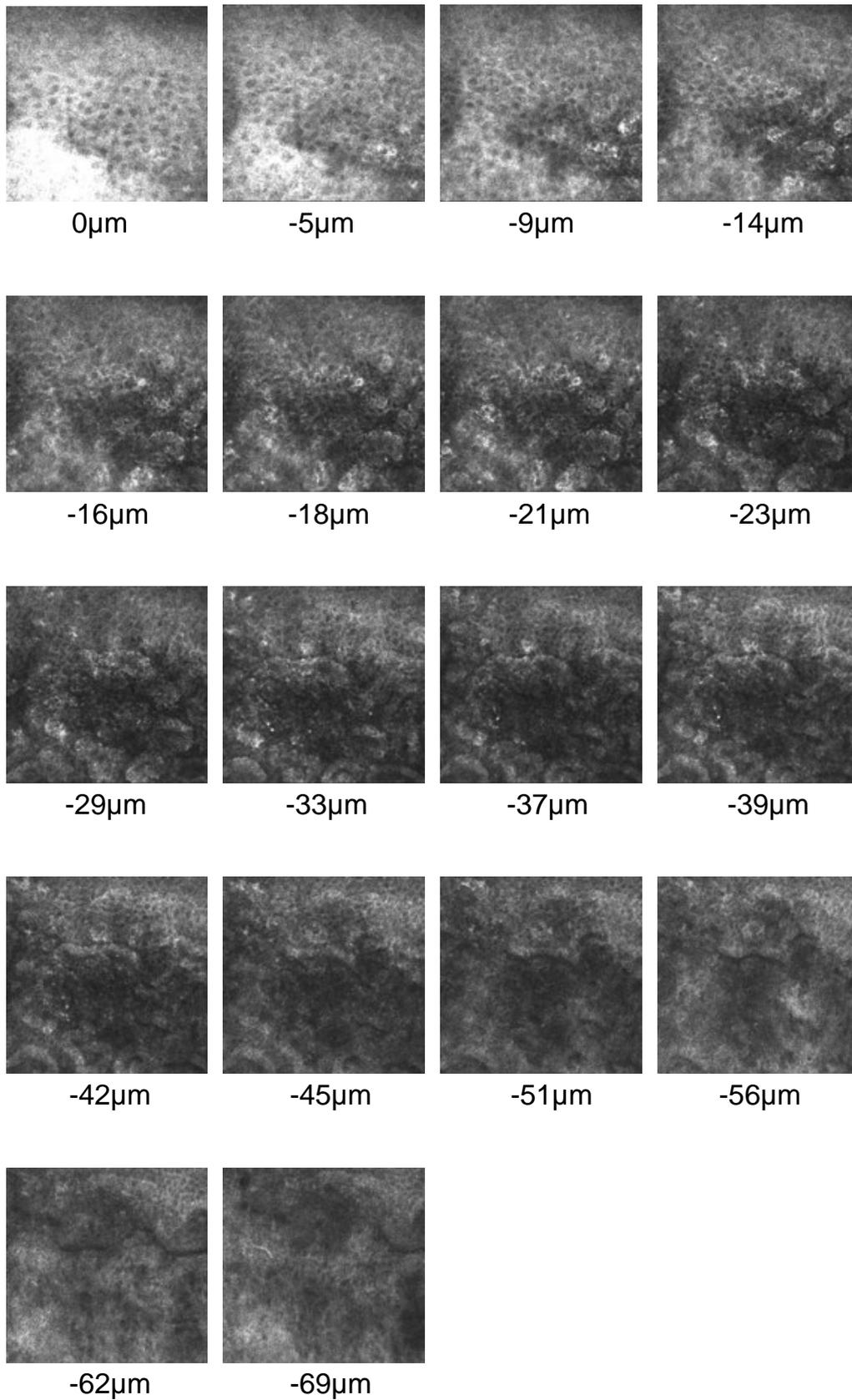


Abbildung 23 – Tiefenanalyse der ventralen Lidkante

Oberflächlich stellte sich eine einheitlich geschlossene Epithelstruktur mit Zellgrößen von durchschnittlich $18\ \mu\text{m}$ bei Kerndurchmessern von $10\ \mu\text{m}$ dar. Das Plasma der Zellen zeigte hyperreflektive Eigenschaften, visualisierte sich also als "hell", während die Zellkerne weniger stark und die Zellgrenzen minimal stärker auf das Anregungslicht reagierten.

Ab einer Tiefe von durchschnittlich $22\ \mu\text{m}$ änderte sich das Gewebebild und erste Durchbrüche tiefer liegender Gewebeschichten wurden erkennbar. Diese Durchbrüche wiesen an ihrer Oberfläche hyperreflektive Flecken auf, bei denen es sich um das Melanin der Stratum Basale handeln könnte.

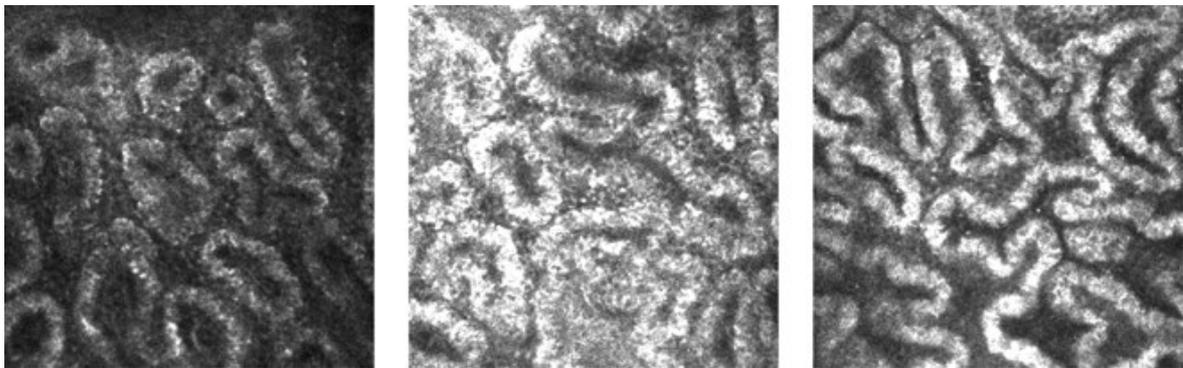


Abbildung 24 – Übergang Epidermis zur Dermis

Innerhalb des weiteren Verlaufes in die Tiefe öffneten sich die Durchbrüche schrittweise und gaben Einblick auf die darunterliegenden subepithelialen Strukturen frei. Durch den Wechsel epidermaler und dermaler Anteile entstanden Schnittbilder mit tubulärem Aussehen.

Die gemessenen Zellgrößen waren deutlich kleiner und lagen gemittelt bei $12\ \mu\text{m}$ mit Kerngrößen von $5\ \mu\text{m}$.

Ab einer Tiefe von durchschnittlich $63\ \mu\text{m}$ waren die Bildausschnitte zellfrei und enthielten Anschnitte von Gefäßen mit laufendem Blutfluss, so dass von einer Schnittebene unterhalb der Basalmembran auszugehen ist.

3.1.5 Dorsale Lidkante

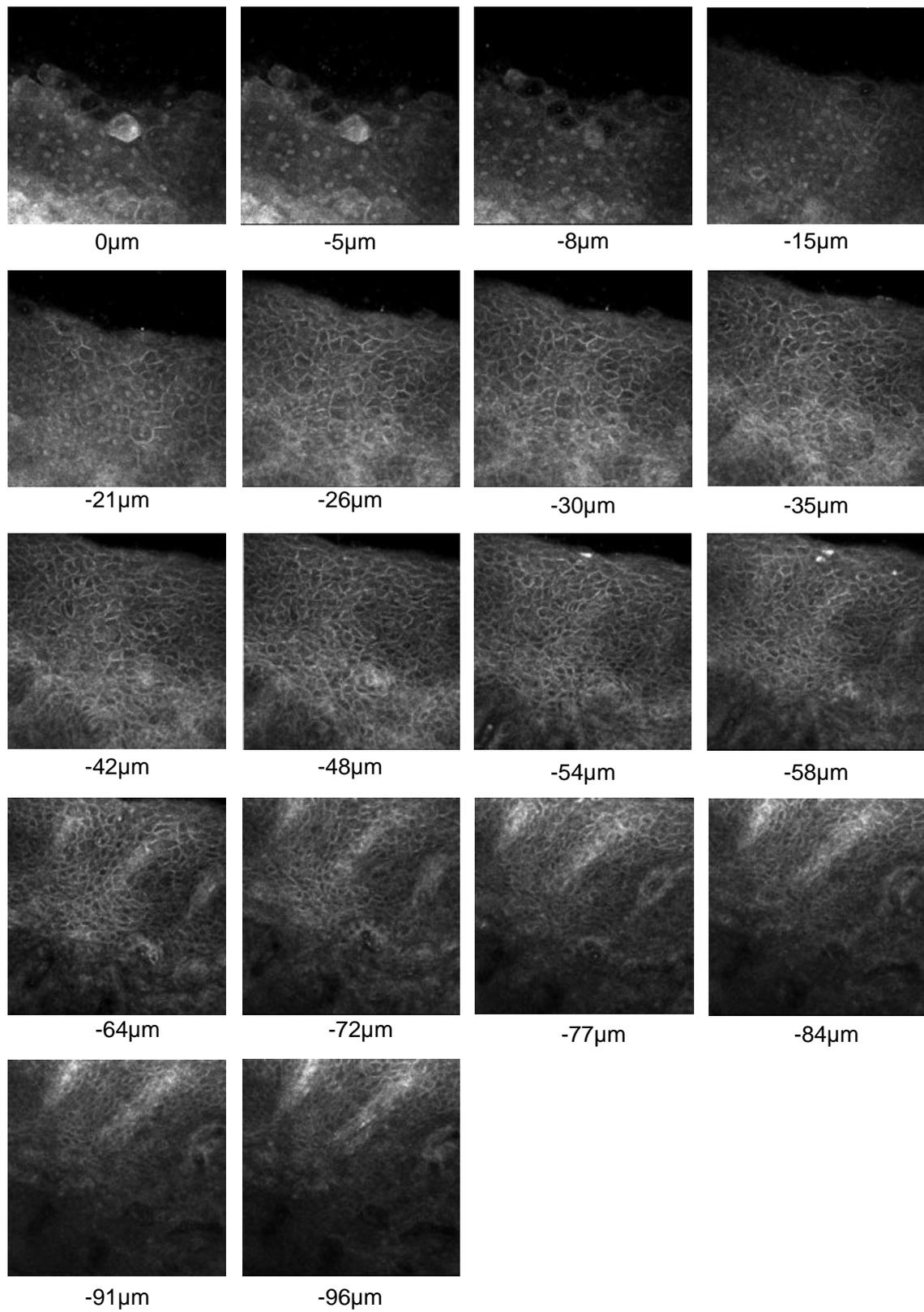


Abbildung 25 – Tiefenanalyse der dorsalen Lidkante

Die Ergebnisse der Untersuchungen der dorsalen Lidkante lieferten einheitliche Ergebnisse bei den untersuchten Personen.

Oberflächlich fand sich eine einzelne Zellschicht aus großen flachen Zellen, die zum Teil Lücken in der Gewebestruktur aufwiesen, welche vermutlich aus einem Abschilferungsprozess rühren. Der mittlere Durchmesser der Zellen lag bei 41,5 μ m mit Kerngrößen von 12,5 μ m. Es zeigten sich inhomogene Reflexionscharakteristika mit hellen bis mittleren Raten für das Zytoplasma, sowie schwächere Reflexionen für den Randbereich des Nukleus mit zentraler Hyperreflexion. Zellgrenzen waren durchgehend erkennbar.

Von durchschnittlich 15 bis 45 μ m Gewebetiefe zeigten sich Zellschichten mit stark reflektierenden Kernen und geringeren Reflexionen im zytoplasmatischen Bereich. Da sich Reflexionswerte der Zellgrenzen in Teilen mit denen des Zytoplasmas deckten, war eine genaue Messung der Zellen nicht an jeder Stelle des Gewebes möglich.

Ermittelte Größenangaben lagen bei 30 μ m Zytoplasmadurchmesser und 10 μ m für die Nuclei.

Leicht tiefere Schichten wiesen gleiche Reflexionsmerkmale auf, wobei die Zellgrenzen besser vom umliegenden Zytoplasma differenzierbar waren. Die Gewebeschichtung war bis in Tiefen von 90 μ m verfolgbar. Mit größerer Tiefe kam es zu einer graduellen Größenabnahme der Zellen auf 17 μ m und ihrer Kernstruktur auf Werte um 5 μ m.

In darunterliegenden Schichten ließen sich keine zellulären Strukturen zuordnen, Anschnitte von Gefäßen mit laufendem Blutstrom wurden erkennbar.

3.1.6 Orifizien

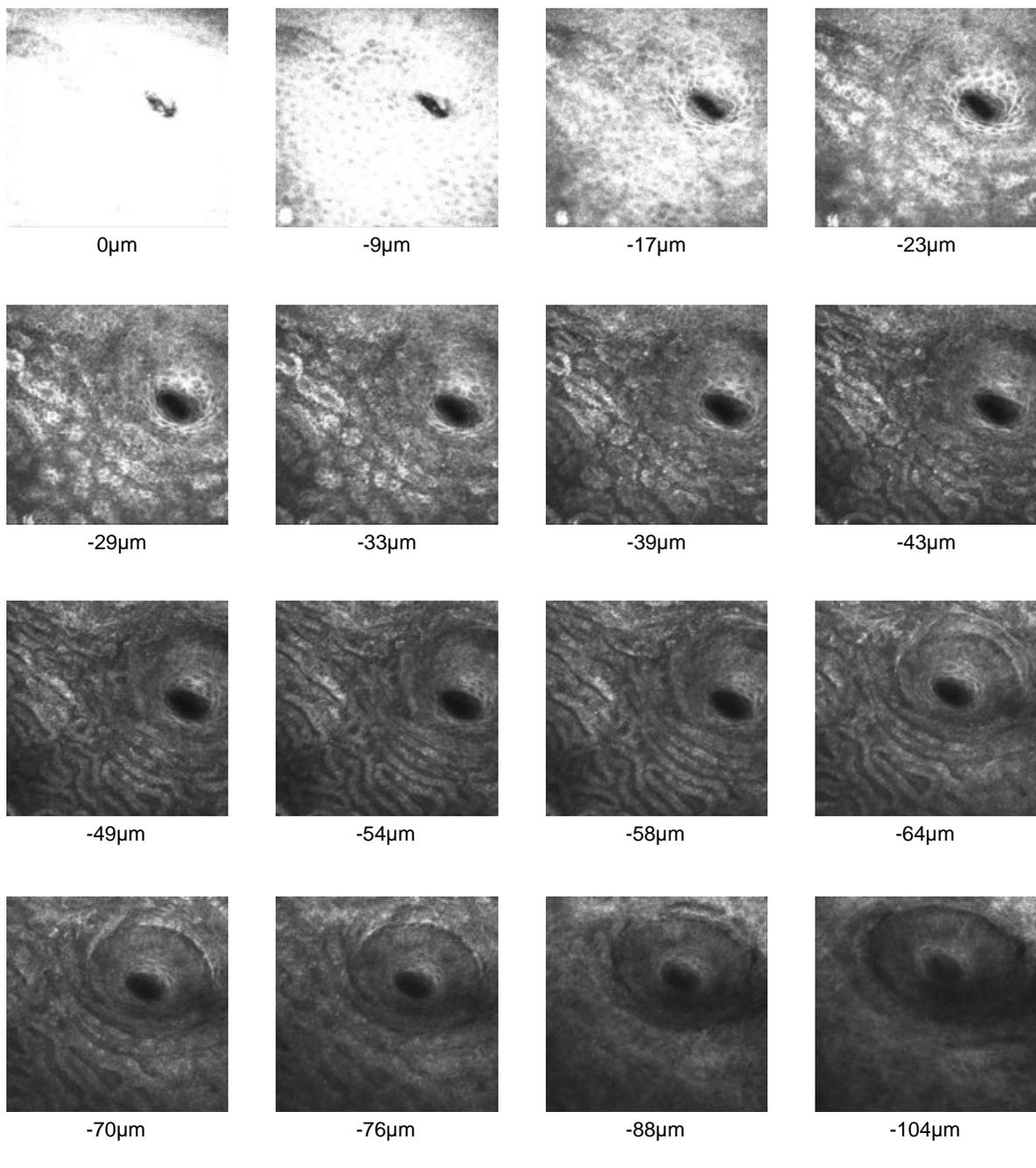


Abbildung 26 – Tiefenanalyse der Orifizien der Meibomschen Drüsen

Die Öffnungen der Ausführungsgänge der Meibomschen Drüsen waren über den Verlauf der Lidkante als nicht reflektierende teils runde, teils ovale Strukturen mit einem Durchmesser von durchschnittlich 65 x 60 µm verfolgbar.

Die Wände der Ausführungsgänge waren oberflächennah ringförmig mit mehreren Schichten Zellen ausgekleidet. Die innerste Schicht, die dem Lumen angrenzte, wies eine

inhomogene Oberfläche auf, die an verhornende Epithelien erinnert. Nach zentrifugal folgten mehrere Lagen weniger stark reflektierender Gewebeschichten, die auf einem hyperreflektierenden Ring endeten. Nach weiter zentrifugal schloss sich oberflächlich das Lidkantenepithel an. In Tiefen von circa 20 – 60! m zeigten sich die Verzahnungen der Epithelschichten mit dem Stroma, während ab einer Tiefe von durchschnittlich 63! m stromale, zellfreie Anteile folgten.

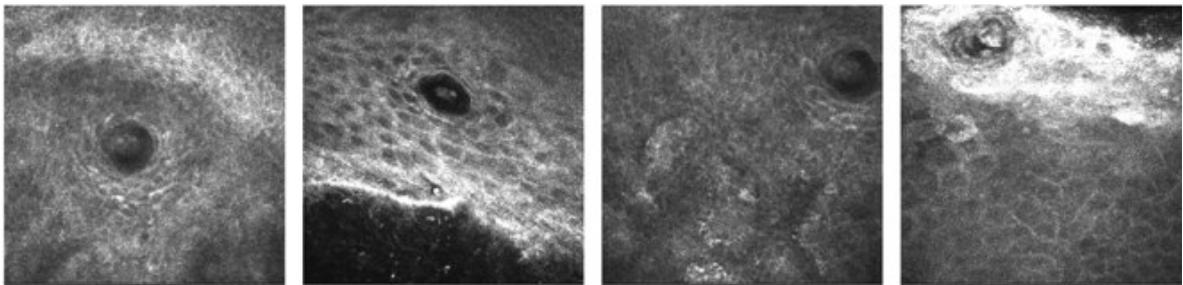


Abbildung 27 – Orifizien der Meibomschen Drüse mit sichtbaren Sekretrückständen

Die Öffnungen stellten sich bei den Probanden als nicht reflektierende, also dunkel bis schwarze Areale dar. Mitunter befanden sich jedoch mittelstark reflektierende ungeformte Strukturen innerhalb dieser Öffnungen, die auf Sekretrückstände schließen lassen.

3.1.7 Wimpern

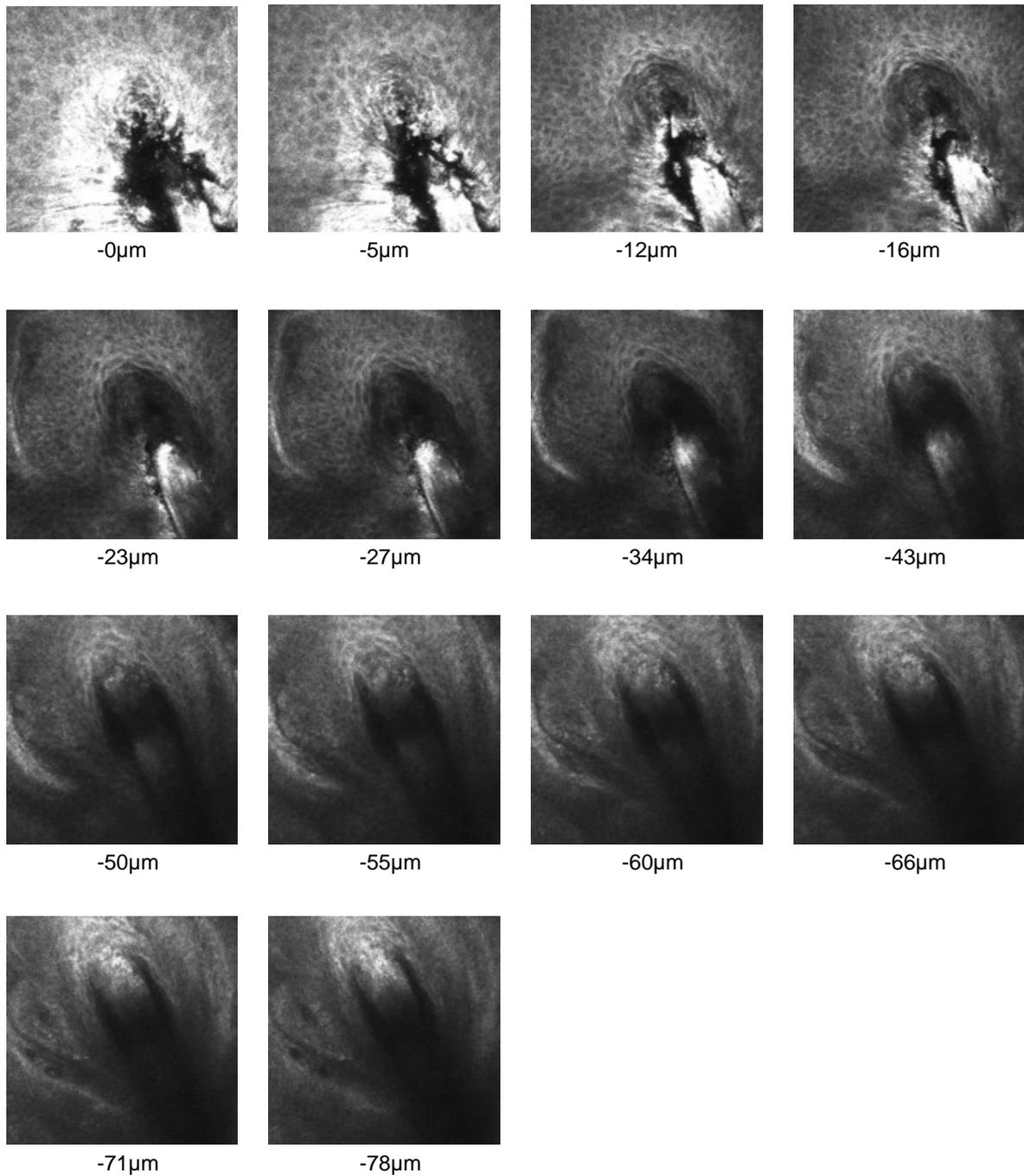


Abbildung 28 – Tiefenanalyse der Wimpernregion

Nahe des ventralen Endes der Lidkante waren teils ein-, teils mehrreihig die Haarschäfte und Haarfollikel der Wimpern erkennbar. Oberflächlich stellte sich eine geschlossene Epitheldecke mit den genannten Merkmalen des ventralen Lidkantenepithels dar, welche in Form der äußeren Wurzelscheide auf die Innenseite des Haarfollikels umschlug.

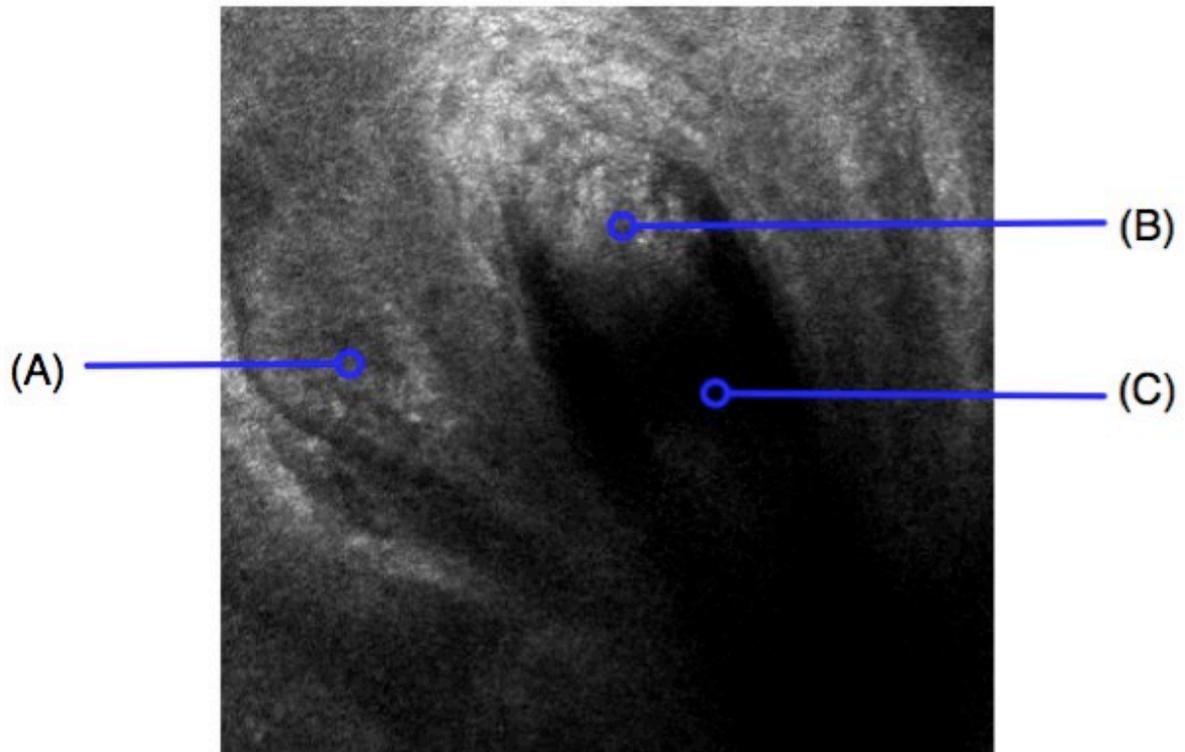


Abbildung 29 – Detailaufnahme einer Wimper

Im Verlauf in die Tiefe wurde weitere Strukturen der Haarwurzel sowie die angelagerten Zeis Drüsen (A) erkennbar. Ermittelte Größenwerte ergaben einen Durchmesser des Wimpernhaares (C) von durchschnittlich 100! m bei seinem Durchtritt an die Oberfläche, für die Zeis Drüse wurde ein Durchmesser von 85! m und eine Länge von 250! m inklusive Ausführungsgang ermittelt. Um die Talgdrüse waren zum Teil Gefäßanschnitte erkennbar, während die Basis der Haarwurzel zum Teil punktförmige hyperreflektive Anteile enthielt, die auf Melanin (B) hinweisen.

3.1.8 Mukokutane Übergangszone

Zum dorsalen Ende der Lidkante ließ sich bei einem Teil der Probanden eine scharf gezogene Linie mit medio-lateralem Verlauf zur Darstellung bringen.

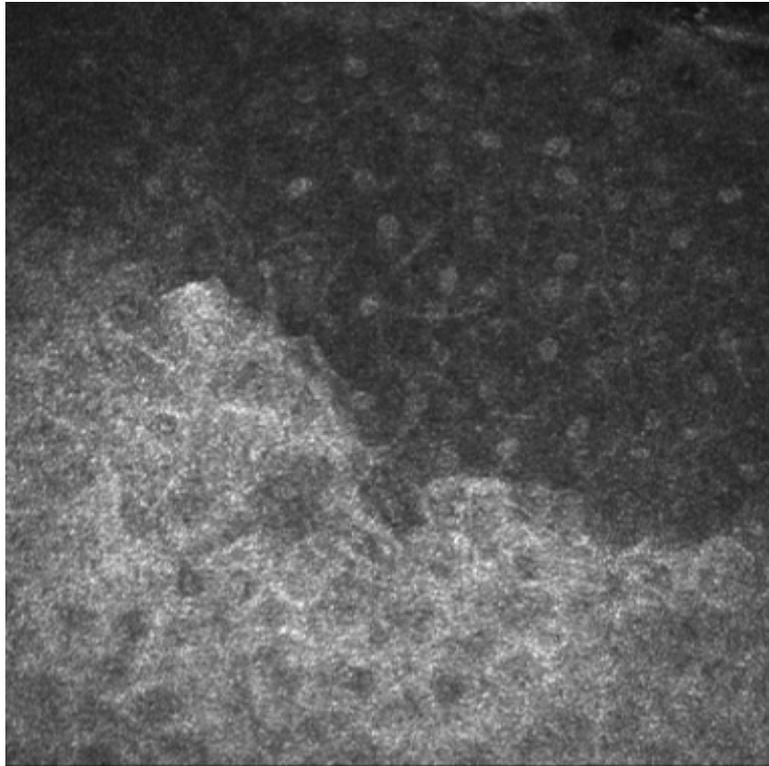


Abbildung 30 – Detailaufnahme der mukokutanen Übergangszone

Wurde das Anregungslicht in einer Ebene nahe der oberflächlichen Epithelschichten fokussiert, stellten sich vor dieser Grenzlinie die Zellen des Epithelverbandes der ventralen Lidkante dar. Hinter der Linie befand sich Zellgut mit umgekehrten Reflexionseigenschaften, welches somit den Zellen der dorsalen Lidkante entsprach.

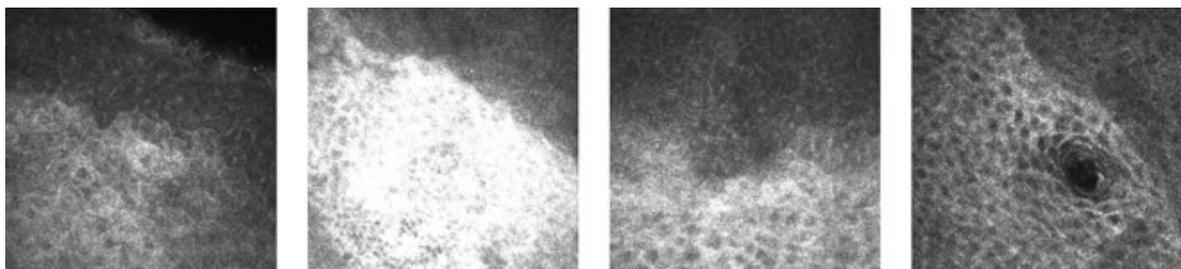


Abbildung 31 – Bilder der mukokutanen Übergangszone bei vier verschiedenen Probanden

Die Darstellung der Region gestaltete sich als schwierig, da der nahezu rechtwinklige Umbruch der Lidkante auf die Konjunktiva ein Aufreißen der Gelbrücke begünstigte und gleichzeitig aufgrund der hohen Reflexions- und Kontrastunterschiede innerhalb eines Sichtfeldes den automatischen Weißabgleich störte.

3.2 Extrakorporale konfokale Untersuchungen

3.2.1 Meibomsche Drüsen

Die Ergebnisse der durchgeführten extrakorporalen in-vivo Untersuchungen entsprachen für die Lidkante und die Konjunktiva denen der vitalen in-vivo Untersuchung.

Es fiel von vornherein auf, dass das Bild durch punktförmige hyperreflektive Strukturen gestört war, welche bei keiner vorherigen Untersuchung aufgefallen waren. Hierbei wird es sich um Vesikel der Meibomschen Drüsen handeln, deren Zellwände bei der Exzision zerstört wurden und die so auf dem künstlichen Tränengel trieben.

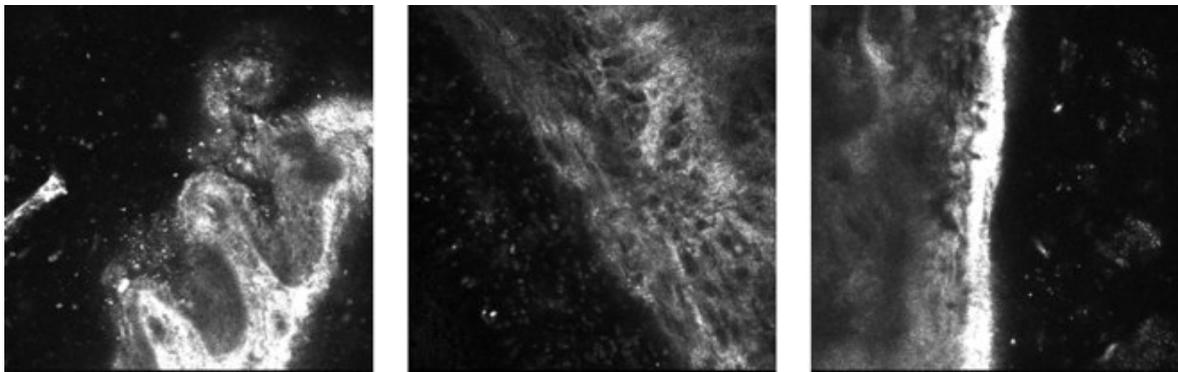


Abbildung 32 – Meibomsche Vesikel im Tränengel

Ferner nahm die Qualität und vor allem Schärfe der aufgenommenen Bilder nach einem Zeitraum von circa 30 Minuten ab Entnahme graduell ab, was auf eine Ödementstehung im entnommenen Gewebe hindeuten könnte.

Die untersuchten Gewebeexzidate zeigten bei sagittaler Aufsicht neben den bekannten Strukturen Anschnitte dreier Gewebetypen. Diese waren bei den in-vivo Untersuchungen nicht darstellbar: Fettgewebe, Muskelgewebe sowie Anschnitte von Drüsenazini, welche aufgrund ihrer Lage den Meibomschen Drüsen zugeordnet werden konnten.

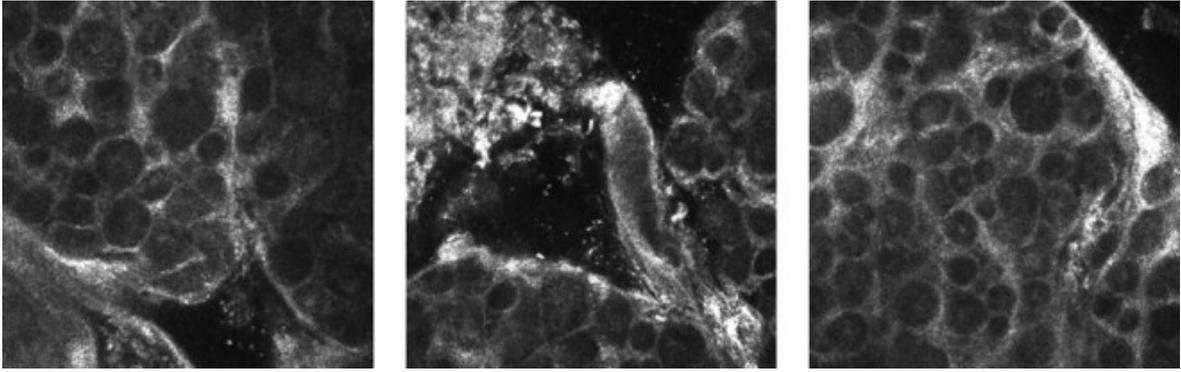


Abbildung 33 – Fettgewebe

Das Fettgewebe zeigte sich als Anhäufung rundlicher, homogener Aggregate, die von zellfreiem Gewebe umlaufen wurden. Das Anregungslicht wurde zu niedrigen Stärken reflektiert. Teilweise fand sich randständig ein hyperreflektiver Fleck, der als Zellkern interpretiert wurde. Gemessene Zellgrößen lagen zwischen 25 und 70! m.

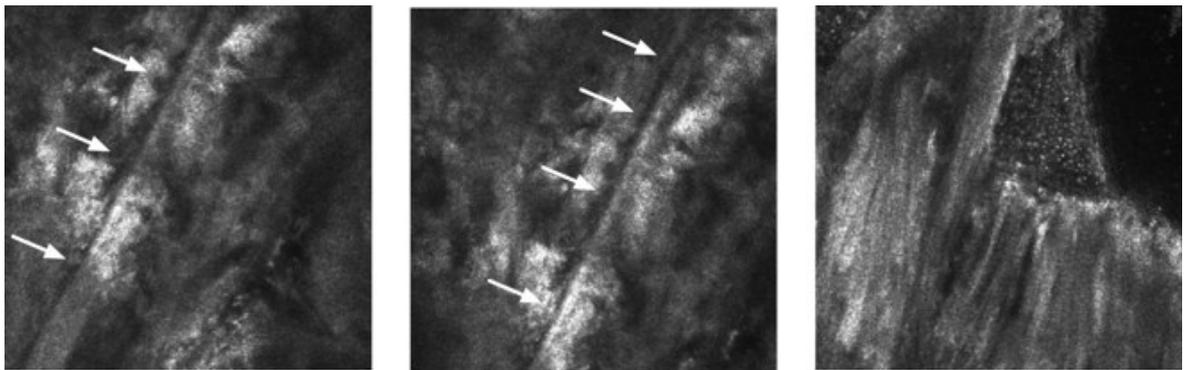


Abbildung 34 – Stränge gestreifter Muskulatur

links/mittig: Pfeile markieren Muskelfasern, *rechts*: Muskelfasern zum Teil mit Meibomsektret belegt

Die angeschnittenen Muskelstränge, welche dem Verlauf nach am ehesten dem M. Levator Palpebrae zugehörig sind, jedoch auch vom M. Orbicularis Oculi stammen könnten, zeigten sich als straffe Bündel parallel verlaufender Fasern mit mittelstarken bis schwachen Reflexionseigenschaften. Zellkerne waren nicht erkennbar.

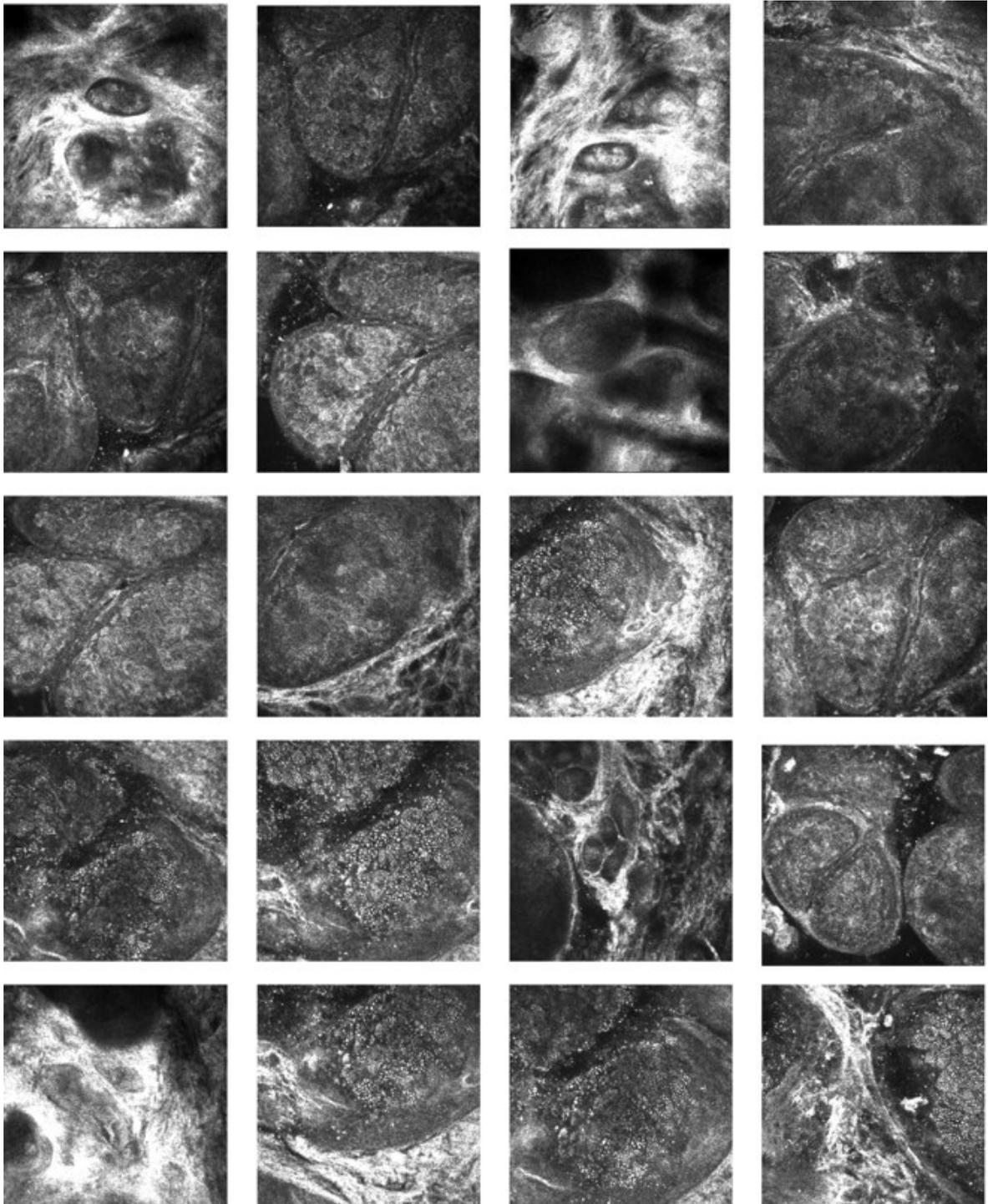


Abbildung 35 – Meibomsche Drüsen mit umliegenden Stromaanteilen

Innerhalb bindegewebiger Stränge eingelagert befanden sich die Meibomschen Drüsen. Die Drüsenazini waren durch eine schwach reflektierende Schicht zum umliegenden Gewebe abgegrenzt. Die Meibozysten warfen ebenfalls mittelstark Licht zurück, enthielten jedoch durchweg hyperreflektive Vesikel, die es ermöglichten, die Drüsenazini klar von allen anderen beschriebenen Strukturen zu differenzieren.

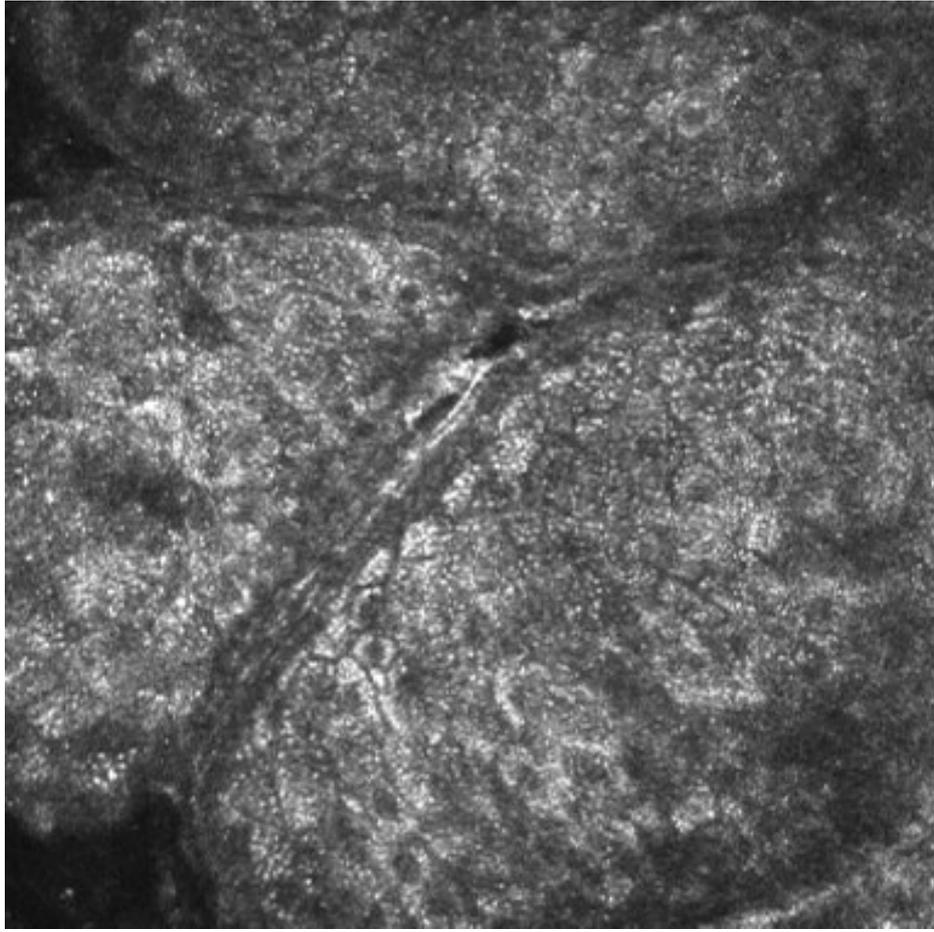


Abbildung 36 – Exemplarischer Ausschnitt der Meibomschen Drüsen

Zellgrenzen und interzellulare Substanz waren zum Teil erkennbar und erbrachten so gemittelte Werte von $15\ \mu\text{m}$ für die Zellen der Azini, wobei von peripher nach zentral eine Größenzunahme erkennbar war. Die Größe der Azini selbst variierte von kleinen Anschnitten um $50\ \mu\text{m}$ bis zu bildfüllenden Bereichen, die damit über $300\ \mu\text{m}$ Durchmesser okkupieren.

3.2.2 3D Rekonstruktionen

Repräsentative Bilder exemplarischer Regionen wurden mit Hilfe von 3D Rekonstruktionsprogrammen erstellt. Bis auf die farbigen Bilder, welche mit Hilfe des kommerziellen Programms *Amira 3D* erstellt wurden, sind alle weiteren mit dem kostenlos erhältlichen Programm *Osirix* erstellt, welches für den Radiologiebereich entwickelt wurde.

Dreidimensionale Rekonstruktionen der tarsalen Bindehaut konnten die Lage und den Verlauf der Henle Krypten aufzeigen und so verdeutlichen, dass diese als kleine rundliche Öffnungen mit der konjunktivalen Oberfläche in Verbindung standen und bis in eine Tiefe von 40-60! m im Gewebe verfolgbar waren.

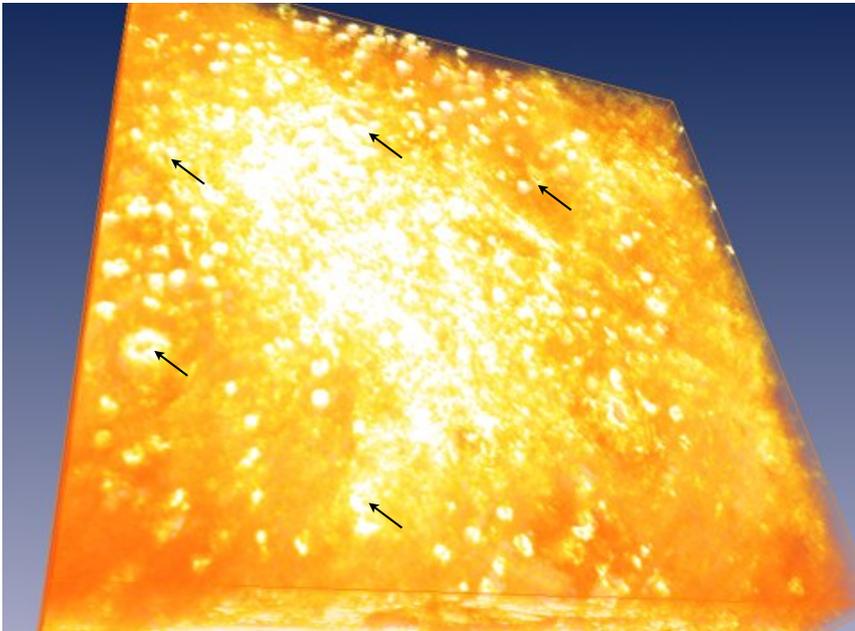


Abbildung 37 – Oberflächennahe Aufnahme der Oberlidkonjunktiva
Schwarze Pfeile markieren Eingänge in die Henle Krypten



Abbildung 38 – Gleiches Aufnahmegebiet wie Abb. 37 – 45! m tiefer im Gewebe. Die Krypten sind an gleicher Position erkennbar.

Rekonstruktionen extravitaler Darstellungen der Meibomschen Drüsen konnten deren Ausbreitung im Gewebe visualisieren. In der dreidimensionalen Ansicht wurden der Vergleich der Drüsen mit den Dolden einer Weintraube, sowie die sehr unterschiedlichen Ausbreitungsgrößen erneut verdeutlicht und die räumliche Verortung im tarsalen Gewebe aufgezeigt.

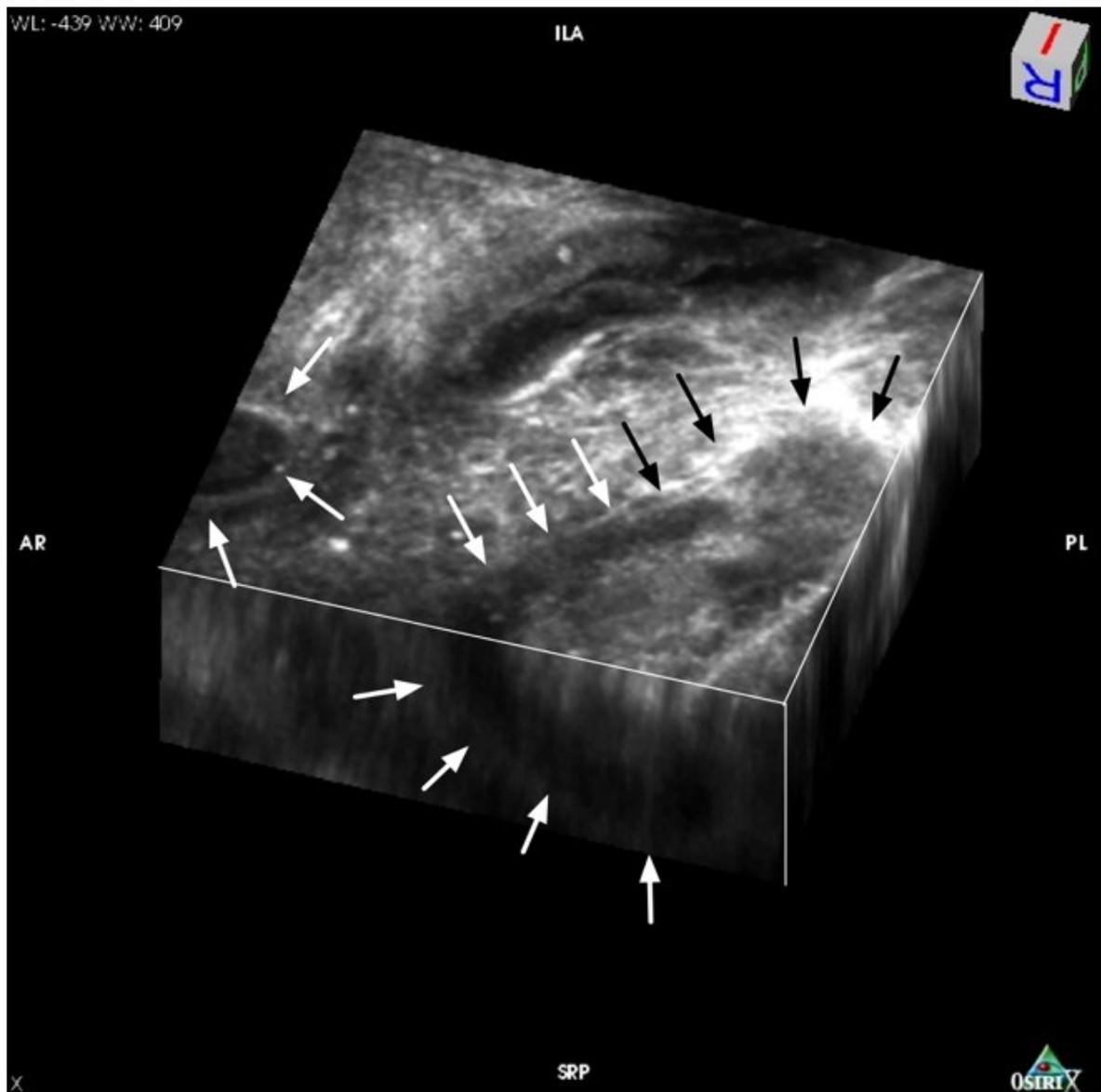


Abbildung 39 – 3D Rekonstruktion des extravital untersuchten Tarsalgewebes
Pfeile markieren die Lage der Meibomschen Drüsen

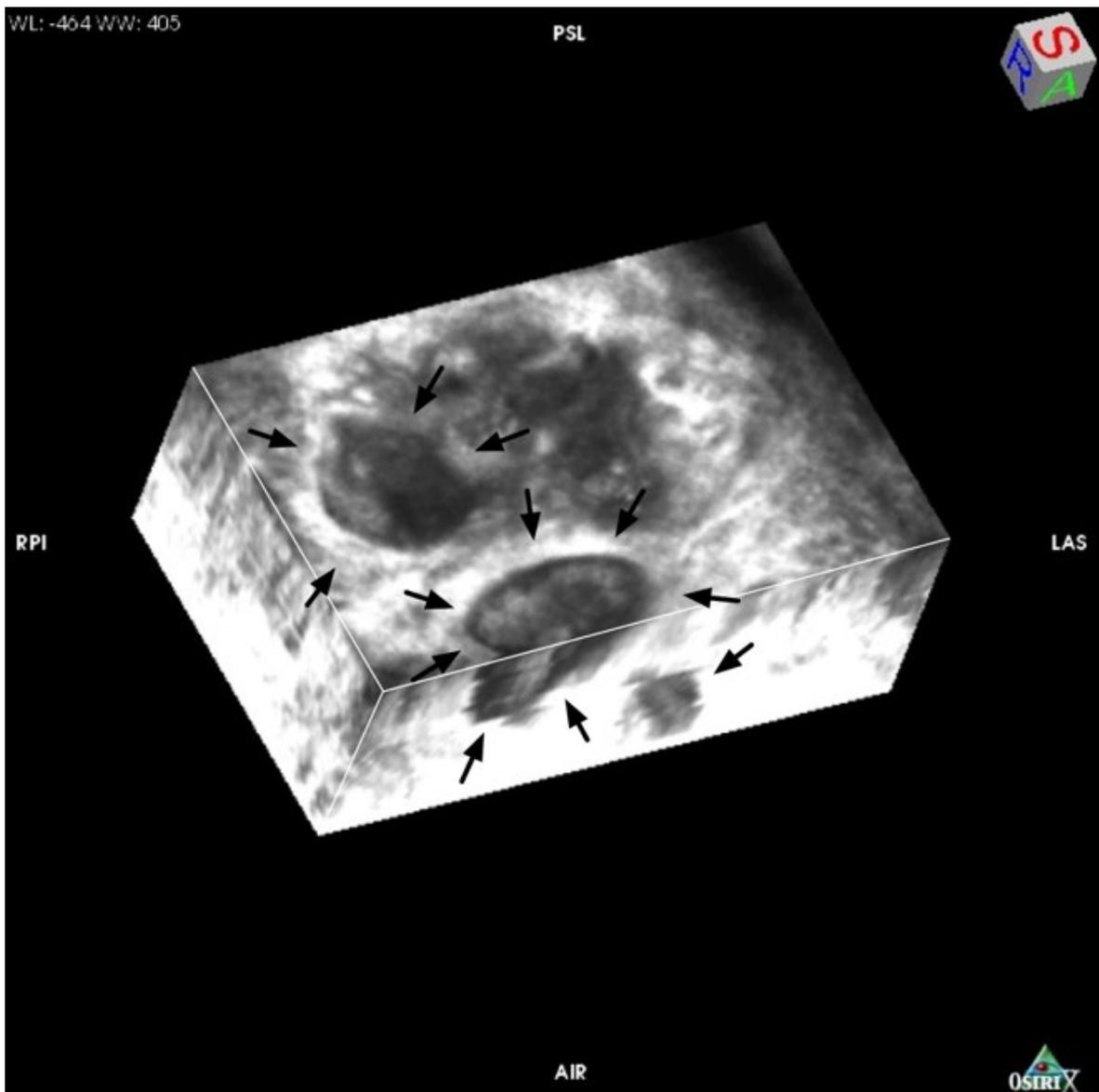


Abbildung 40 – 3D Rekonstruktion des extravital untersuchten Tarsalgewebes
Pfeile markieren die Lage der Meibomschen Drüsen

3.3 Histologie

3.3.1 Exemplarische Bilder

Bildgut der tarsalen Konjunktiva zeigte inhomogene Gewebestärken. Teilweise fand sich eine ein- bis vierlagige Schicht oberflächlicher Deckzellen mit dunklen Zellkernen, an die sich in der Tiefe wenige Lagen Zellen anlagerten. Andere Stellen wiesen mehrschichtiges Epithel auf.

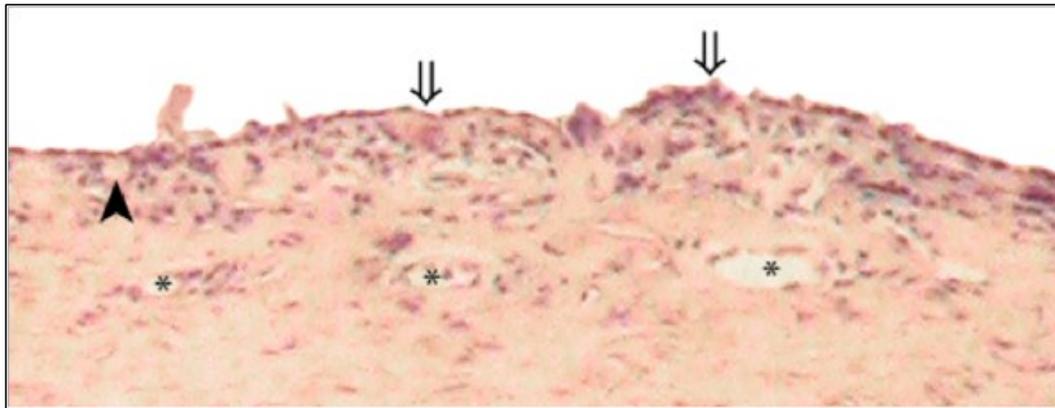


Abbildung 41 – Exemplarisches Bild der konjunktivalen Oberfläche

Legende: ! Becherzelle, " welliger Verlauf der konjunktivalen Oberfläche, # Gefäßanschnitte

Vereinzelt waren in den Gewebeverband Becherzellen eingestreut. Ab einer Tiefe von 40 - 60 µm zeigen sich Anschnitte von Gefäßlumina.

Insgesamt zeigt die konjunktivale Oberfläche einen welligen Verlauf.

Mitunter finden sich Einstülpungen des Epithels, bei denen es sich um die von Henle beschriebenen Krypten handelt.

Die Differenzierung der Krypten zu oberflächennah gelegenen Gefäßen gelingt über die Wandstruktur: Die Zellen der Gefäßwände stellen sich als durchgängig flach dar und verfügen über einen abgeplatteten Zellkern, während die Auskleidung der Henle Krypten weitgehend der Oberflächenstruktur der Konjunktiva entspricht.

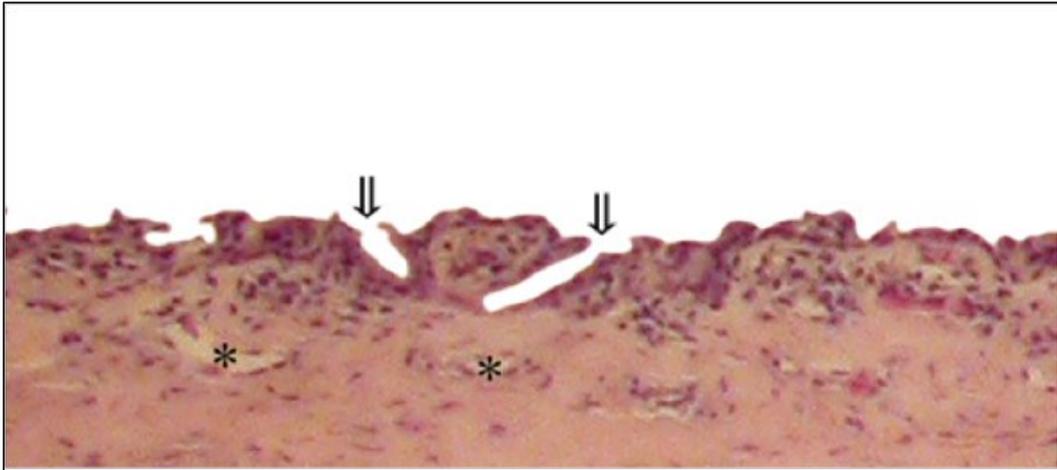


Abbildung 42 – Exemplarisches Bild mit Taschenbildung der Konjunktiva
Legende: " Taschenartige Einstülpungen (Henle Krypten), # Gefäßanschnitte

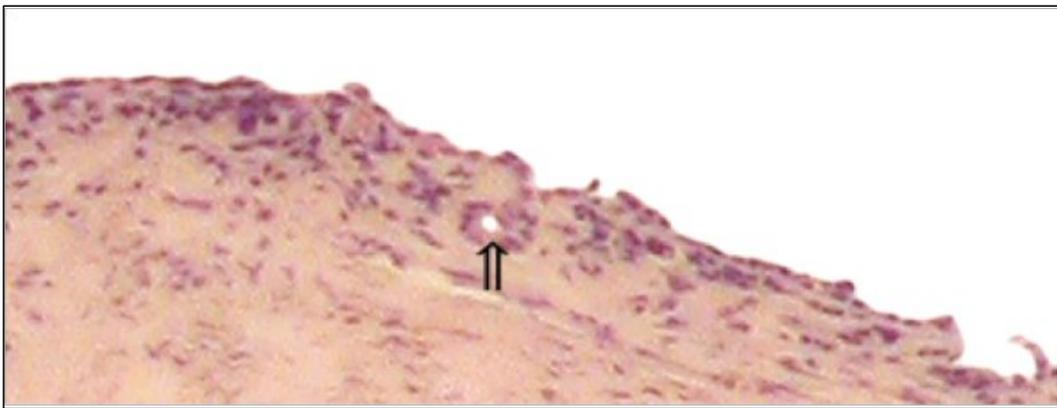


Abbildung 43 – Exemplarisches Bild mit obliquem Anschnitt einer Henle Krypte
Legende: ⇓ Taschenartige Einstülpung (Henle Krypte)

3.3.2 Tiefenanalyse der Conjunctiva Tarsi

Um die genaue Position der Meibomschen Drüsen im tarsalen Gewebe verorten zu können, wurden zur Lidkante oberflächenparallele histologische Schnittbilder gefertigt. Mit Hilfe einer Mikrometerskala konnten exakte Distanzangaben ermittelt werden, die eine durchschnittliche Tiefe der Drüsen von 190 μ m gemessen ab Oberfläche der Conjunctiva Tarsi ergab.

Da der genutzte Versuchsaufbau mit der verwandten Laserlichtquelle nur bis durchschnittlich 105 μ m Gewebetiefe auswertbares Bildmaterial lieferte, war eine in-vivo Visualisierung der Meibomschen Drüsen nicht möglich.

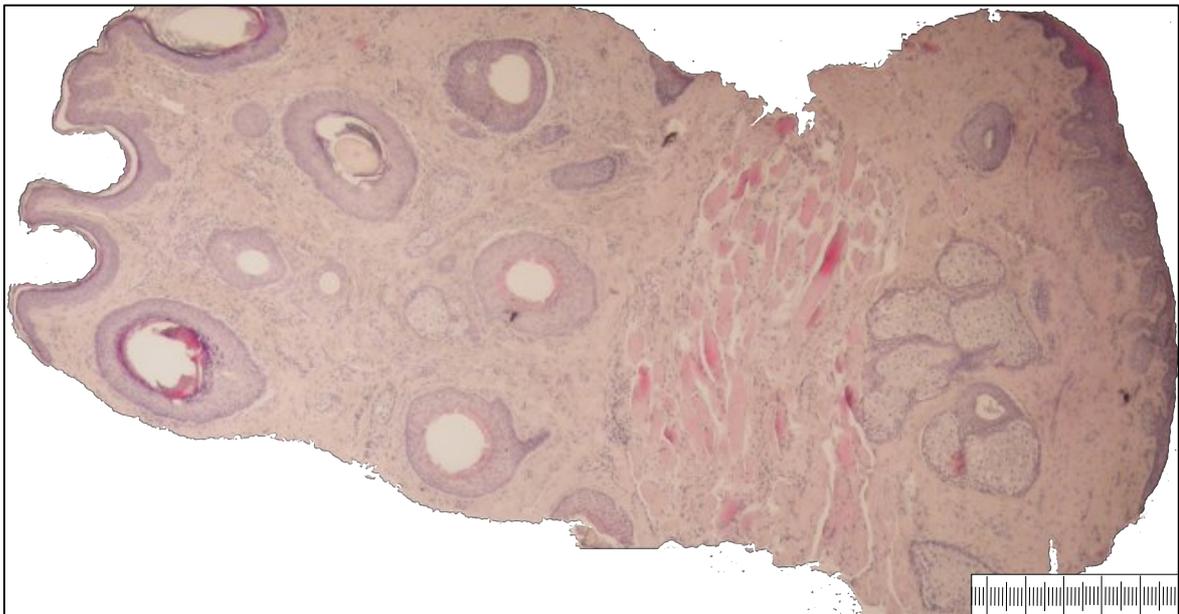


Abbildung 44 – Tiefenanalyse I – Querschnitt eines Oberlides mit Mikrometerskala

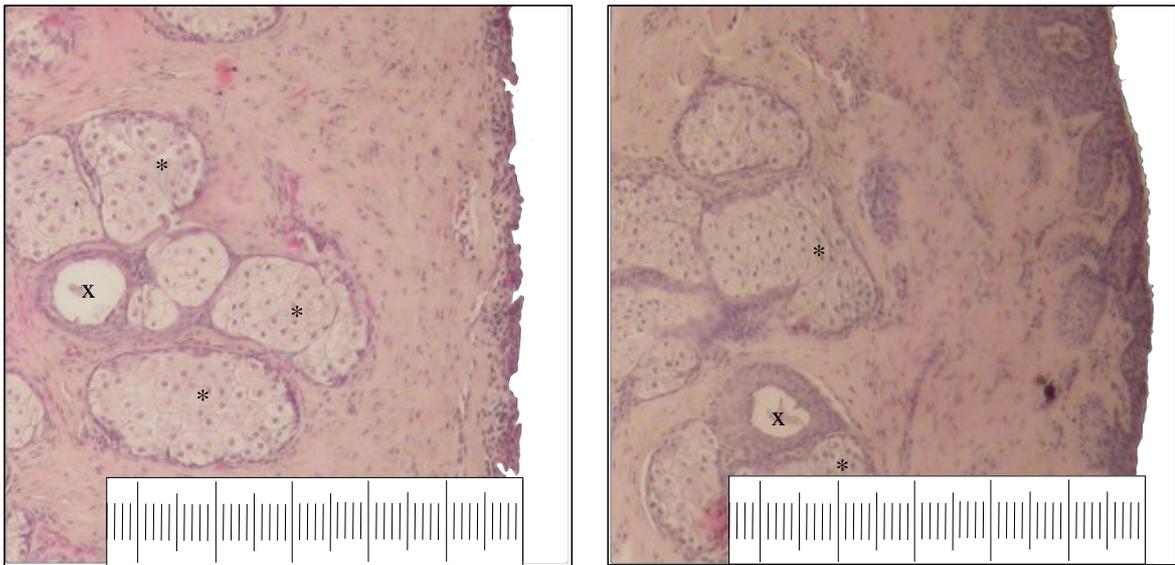


Abbildung 45 – Tiefenanalyse II – Meibomsche Drüsen
(* markiert Drüsenzini, x markiert Ductus)

3.4 Vergleich klassische Histologie - Konfokalmikroskopie

Sowohl die intravitralen als auch die extravitalen Konfokalbilder zeigten sich deckungsgleich mit dem klassisch histologisch erzeugten Bildmaterial.

In den histologischen Präparaten des Oberlides war der wellige Verlauf der konjunktivalen Oberfläche, welcher die konfokale Darstellung erschwerte, bereits in geringen Vergrößerungen erkennbar. Die in Kapitel 3.1 ermittelten Angaben für die Epitheldicke entsprachen den histologischen Auswertungen. Des Weiteren waren die Henle Krypten in beiden Darstellungsmethoden identifizierbar und kongruent. Becherzellen fanden sich jedoch nicht vermehrt in den taschenartigen Einstülpungen.

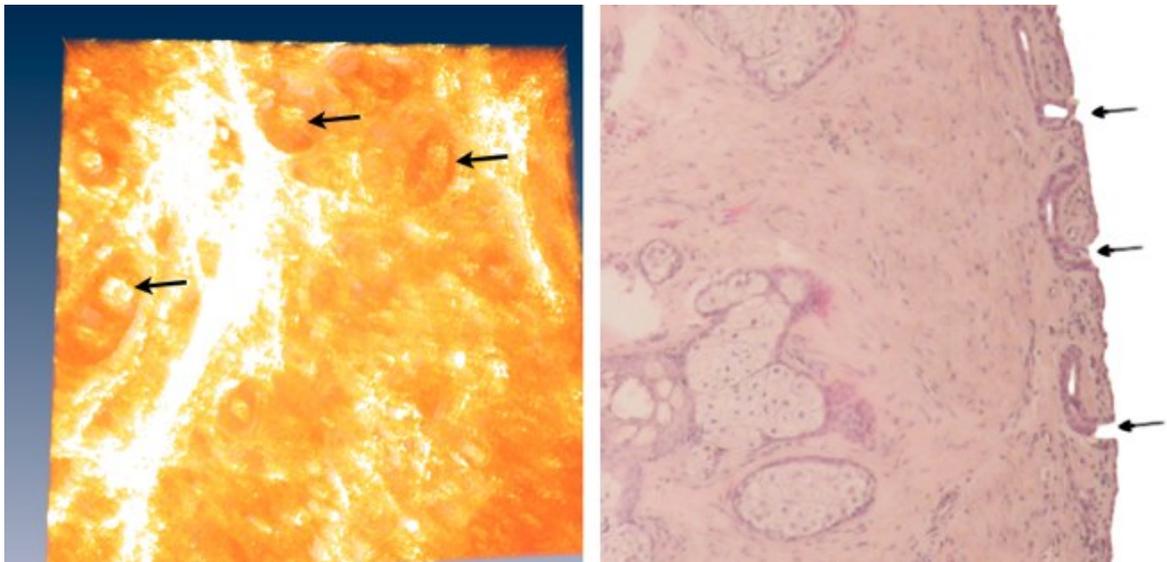


Abbildung 46 – Vergleich der Henle Krypten

Links: Zur Konjunktiva Tarsi parallel geführte 3D Rekonstruktion; *Rechts:* Histologische Darstellung in sagittaler Schnittführung.

Im Bereich der Lidkante des Unterlides fanden sich ebenfalls durchgehende Übereinstimmungen.

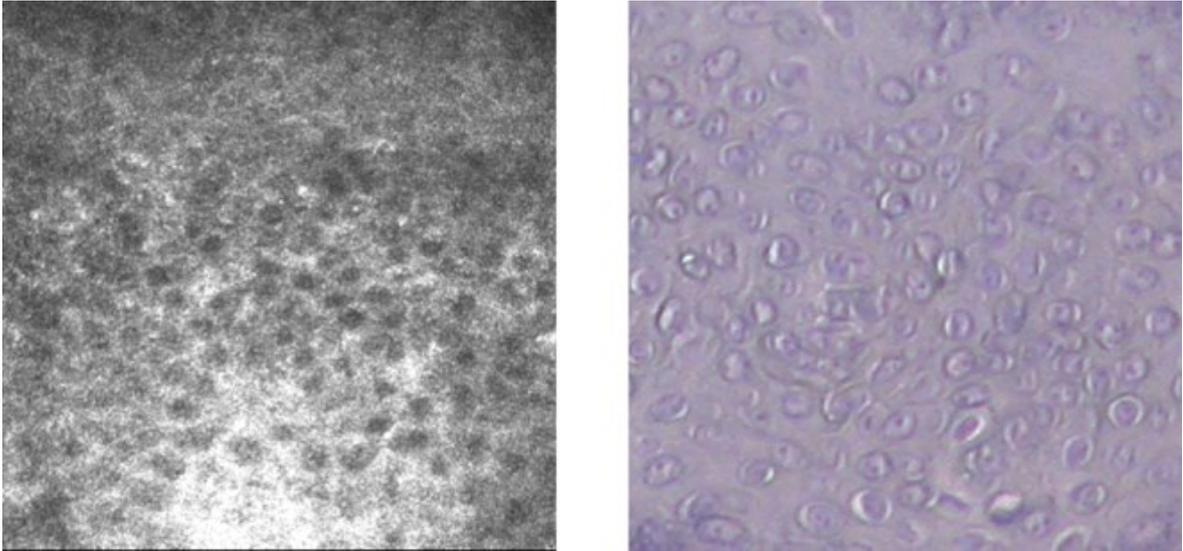


Abbildung 47 – Oberflächennahe Schnittführungen an der Unterlidkante

Die geschlossene Schicht epithelialer Deckzellen brach zu Gunsten des darunterliegenden Stromas erst wolkenförmig auf und zeigte ab Tiefen von 40 - 60! m die typischen schlangenlinienförmigen Muster. Zellgrößen und Tiefenangaben beider Methoden entsprachen einander.

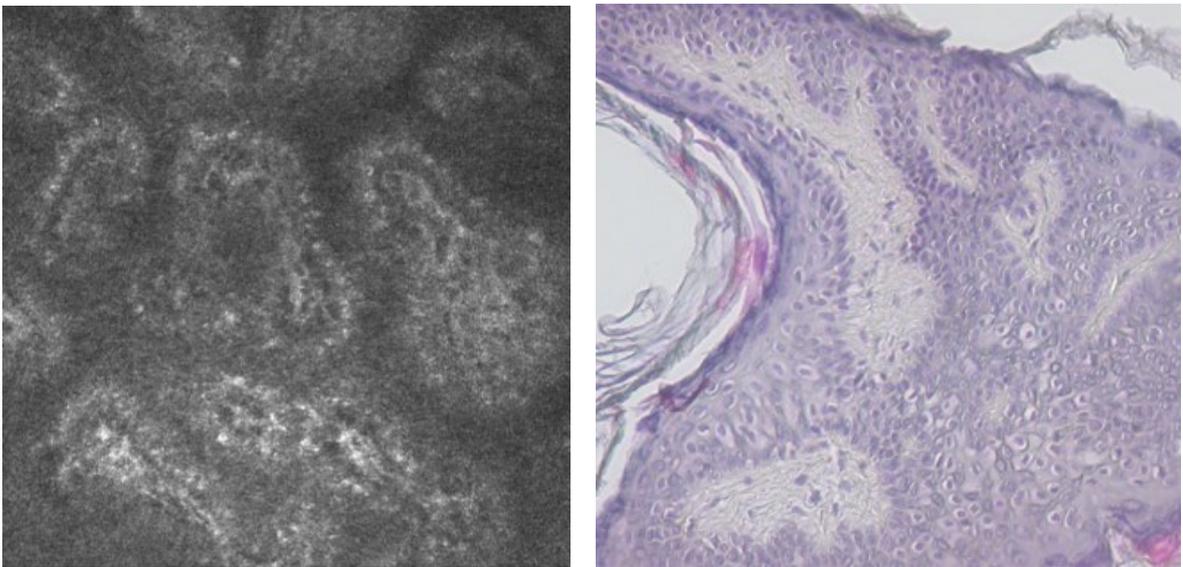


Abbildung 48 – Unterlidkante: Schnittführung in circa 20! m Tiefe

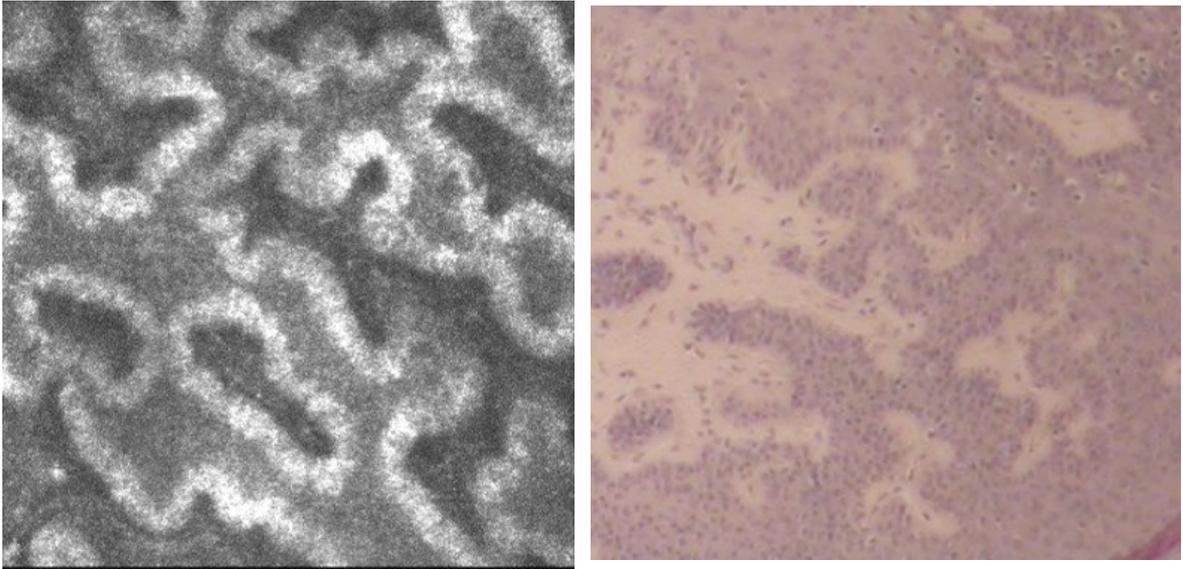


Abbildung 49 – Unterlidkante: Schnittführung in circa 35! m Tiefe

Die Orifizen der Drüsen auf der Lidkante wiesen ebenfalls ein hohes Maß an Gleichheiten auf. Größe, Form und Lage sowie die Zusammensetzung der Randepithelien deckten sich. Der in der Konfokalmikroskopie sichtbare hyperreflektive Ring, welcher als Basalmembran interpretiert wurde, fand sich in der lichtmikroskopischen Aufsicht jedoch nicht.

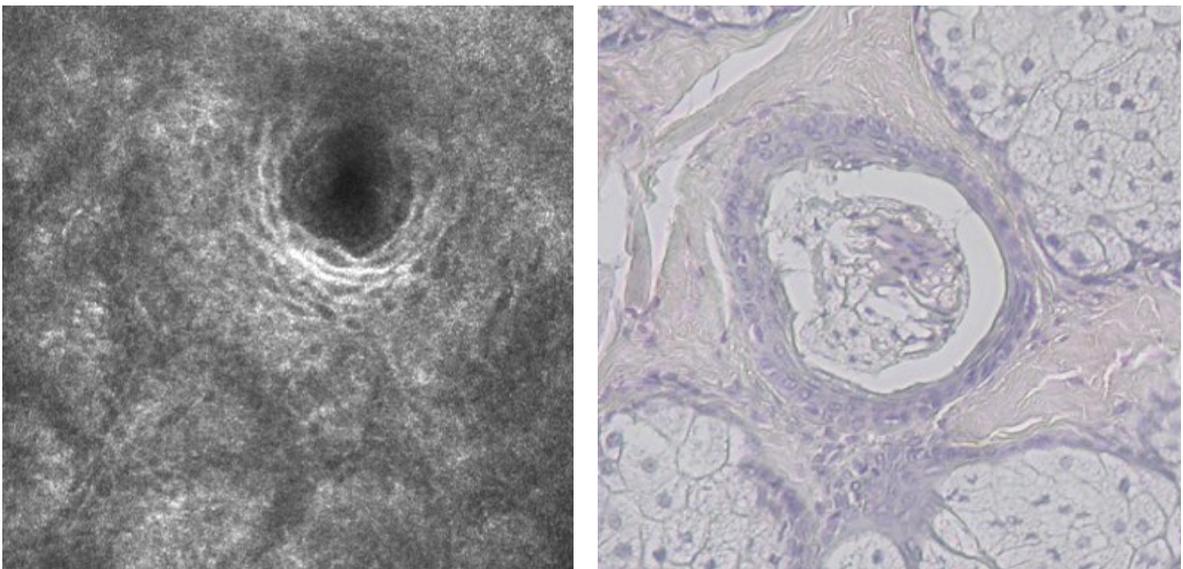


Abbildung 50 – Ausführungsgang einer Meibomschen Drüse

Die Region der Wimpern wies durchgehende Übereinstimmungen in beiden Methoden auf. Haarschaft, Wurzelscheiden, Papillenbereich und anhängende Talgdrüse konnten eindeutig zugewiesen werden.

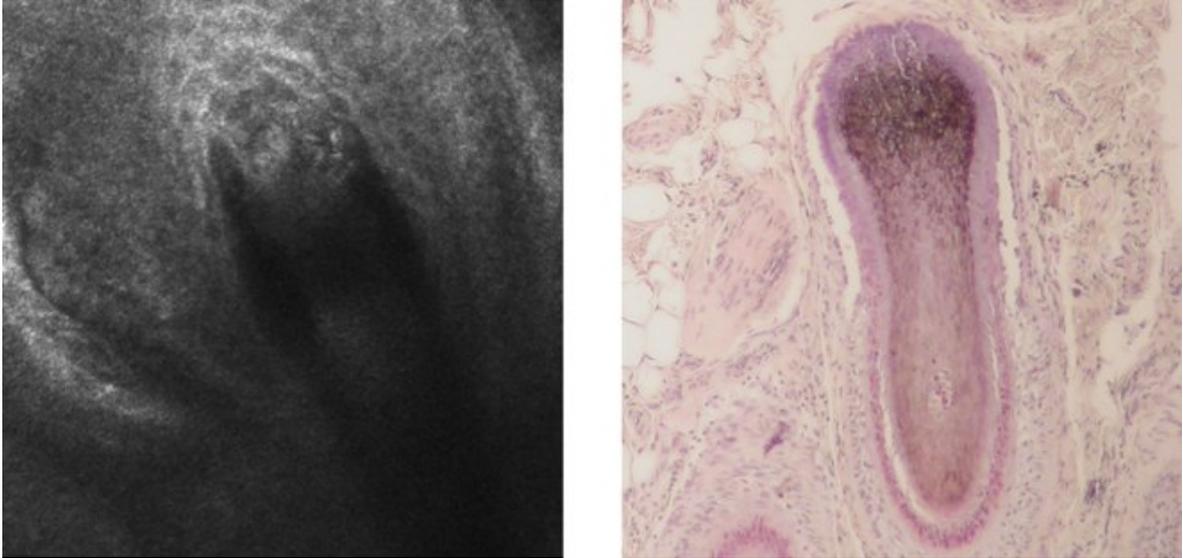


Abbildung 51 – Querschnitt eines Wimpernhaarfollikels

Das in der extrakorporalen Vitaldarstellung veranschaulichte Fettgewebe wies einen hohen Ähnlichkeitsgrad zu den klassisch histologisch visualisierten Strukturen auf. So stellten sich die Fettzellen als univakuoläre Adipozyten mit vergleichbaren Zellgrößen dar.

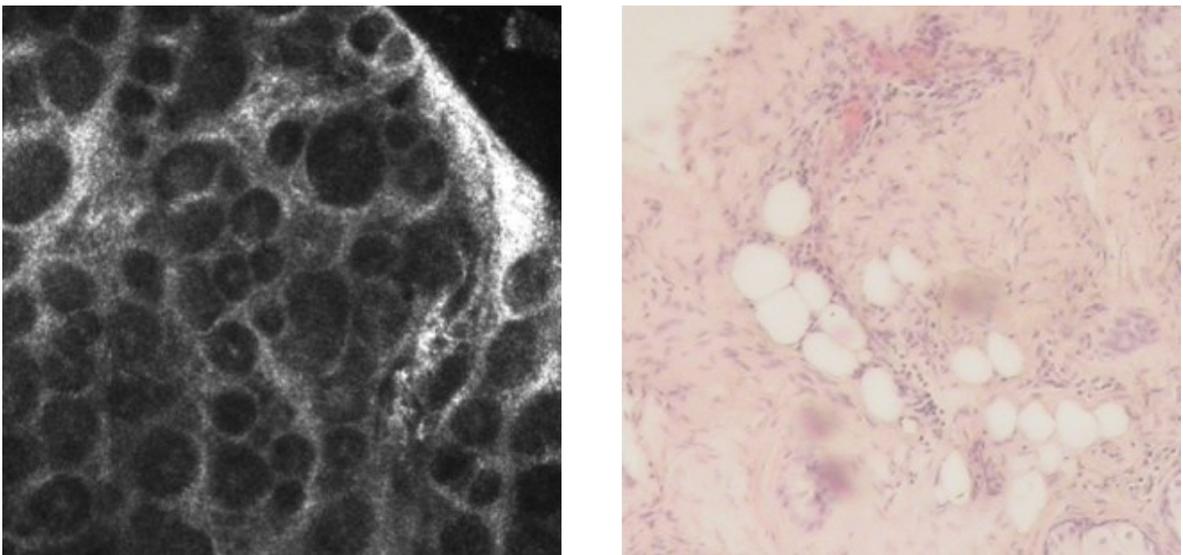


Abbildung 52 – Fettgewebe des Augenlides

Ebenfalls klar zuweisbar waren die Meibomschen Drüsen in beiden Methoden, mit der Ausnahme, dass die konfokale Darstellung ausschließlich extravital gelang.

Die in der Konfokalbildgebung auffälligen hyperreflektiven Vesikel fehlten in der lichtmikroskopischen Darstellung, was auf den Präparationsprozess und die anschließende mikrotomgestützte Schnittführung zurückzuführen sein wird. Stattdessen zeigte sich durchgehend ein intrazelluläres feines Netz, welches die vermeintlich verlorenen Vesikel umschlossen haben wird.

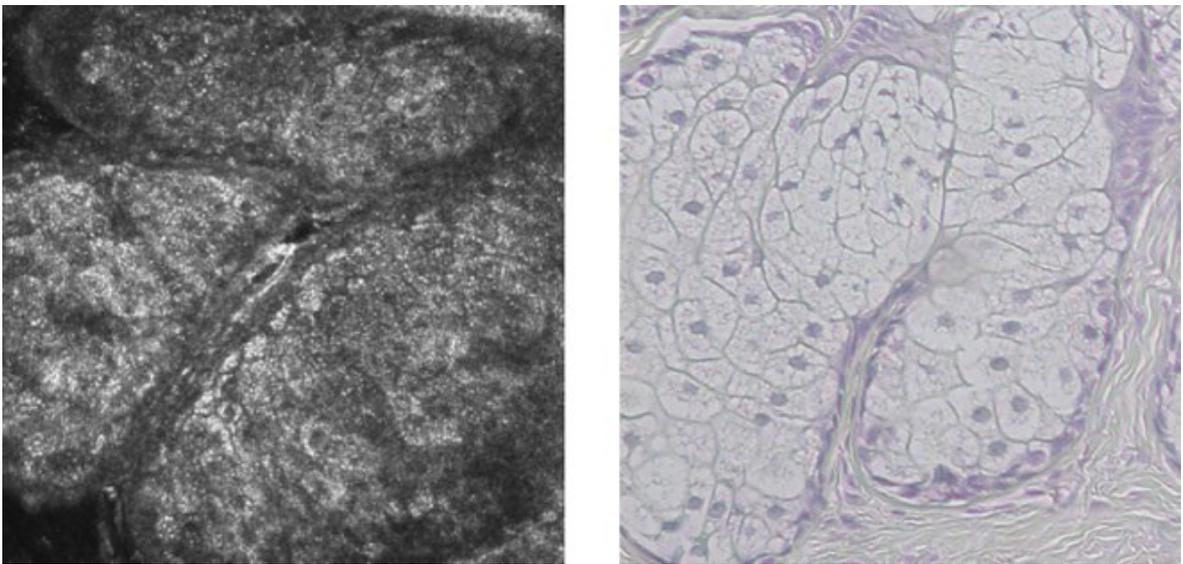


Abbildung 53 – Vergleich der Meibomschen Drüsen

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, einen Überblick über jene Strukturen des menschlichen Augnlides zu geben, welche in einer konfokalen in-vivo Darstellung erreicht werden können.

Das gewählte Konfokalmikroskop, der Heidelberg Retina Tomograph II mit vorgesetztem Rostocker Cornea Modul, ermöglicht die Visualisierung nicht transparenter Strukturen mit einer Eindringtiefe die je nach Zusammensetzung des Gewebes am Untersuchungsort variiert.

Da bisher wenige Referenzen für konfokales Bildgut zur Verfügung stehen, wurde sich der klassischen Histologie bedient, um die Interpretation zu erleichtern und gleichzeitig die Limitation der Technik aufzeigen zu können.

Im Bereich des Oberlides zeigten sich Übereinstimmungen zur Histologie was die Zellgrößen, die Beschaffenheit der Oberfläche und die Henle Krypten anbetraf. Die Zoneneinteilung Kessings konnte insofern wiedergefunden werden, als die höckrige Struktur der Conjunctiva tarsi hin zur Lidkante abflachte und sich vermehrt Henle Krypten fanden. Ob weiter kranial ein „Netzwerk kommunizierender Röhren“ zu finden ist, konnte nicht gezeigt werden, da die entsprechende Region des Augnlides durch Ektropionieren nicht erreichbar ist.

Ebenfalls fanden sich keine Furchen nahe der Lidkante, die der Lidwiper-Region entsprächen.

Es ist jedoch denkbar, dass durch das Ektropionieren des Oberlides beziehungsweise das Positionieren des Unterlides durch einen Wattetupfer oder den Finger, Lid und Lidkante in einen Spannungszustand versetzt wurden, der die Unebenheiten durch Zug glättete.

Die konfokale Darstellung der Lidkante zeigte durchgehende Übereinstimmungen mit den anderen Untersuchungsverfahren und den Angaben aus der Literatur. Die Auffälligkeit, dass die Grenze zwischen der Schleimhaut der Bindehaut und der Haut der Lidkante nicht bei allen Probanden in gleichem Maße darstellbar war, ist über die beschriebene Interindividualität der Lage und Verläufe der Linie erklärbar.

Ebenso führt die Position der Linie, nahe des dorsalen Winkels der Lidkante, zu drei technischen Begrenzungen des Verfahrens: Durch die Verwendung einer Gelbrücke wird

wenig bis kein Druck auf das Gewebe ausgeübt. Dies ermöglicht einerseits die präzise Messung von Gewebetiefen und Dicken, andererseits wurde das Zurückschlagen des Lides hierdurch erleichtert. Weiterhin wurde der automatische Weißabgleich durch hohe Kontraste innerhalb eines Sichtfeldes gestört. Gerade an der Umbruchkante von Lidkante zu Konjunktiva waren diese Helligkeitsunterschiede am stärksten ausgeprägt. Hinzu kam, dass durch den Umbruch eine Verkleinerung der Auflagefläche zur TomoCap entstand. Dies begünstigte das Aufreißen der Tränengelbrücke und führte so zu einer Unterbrechung der visuellen Ankopplung.

Bei Studienbeginn bestanden Überlegungen die Meibomschen Drüsen in-vivo sichtbar zu machen, um so einen physiologischen Normalsitus in konfokaler Darstellung skizzieren zu können, sowie eventuelle Unterschiede zu okulären Pathologien wie zum Beispiel dem Sjögren Syndrom aufzuzeigen.

Aufgrund der anatomischen Gegebenheiten, allen voran der Tiefenposition, erwies sich diese Annahme jedoch als nicht durchführbar, so dass für die Darstellung der Meibomschen Drüsen eine extrakorporale Darstellung gewählt werden musste.

Die Lage der glandulären Strukturen konnte im histologischen Schnitt mit circa -200! m ab konjunktivaler Oberfläche ermittelt werden. Jedoch ist zu bedenken, dass das aufgearbeitete Material durch den Präparationsprozess mit Artefakten wie Schrumpfung beziehungsweise Quellung durch die Präparationslösungen oder Scherung durch das Mikrotom belastet sein wird. ^[87]

Entsprechend kann eine 1:1 Korrelation nicht ohne Weiteres vorgenommen werden.

In seinem Buch „Histologische Technik“ ermittelt der Autor Hans-Christian Burck für verschiedene Gewebe und Präparationslösungen Änderungen der Fläche und gibt diese nach Fixation, Entwässerung und Einbettung zwischen -18,5% und + 8,5% an. ^[88]

Für die hier angestrebte Überlegung, dass die in-vivo Darstellung der Drüsen mit derzeitiger Technik nicht möglich ist, ist eine Schrumpfung zu vernachlässigen. Schrumpfte das Gewebe durch die Präparation, erhielte man in der Histologie falsch-niedrige Werte, während bei einer in-vivo Untersuchung die Objekte noch tiefer im Gewebe lägen.

Geht man von einer Veränderung der Gewebestrukturen durch Quellung um +10% aus, ist mit dem genutzten Versuchsaufbau die Lage der Drüsen tief im tarsalen Gewebe weiterhin nicht erreichbar.

Dies widerspricht den Arbeiten von Kobayashi ^[89] und Messmer ^[90], welche unabhängig voneinander 2005 erste Beschreibungen der Drüsen in-vivo lieferten.

Vergleicht man das von den Autoren vorgestellte Bildmaterial mit den Ergebnissen dieser Arbeit zeigt sich, dass die von Kobayashi als Drüsen vorgestellten Strukturen den auf- und absteigenden Gefäßen entsprechen, welche zum Teil in den papillären Verzahnungen des Epithels mit dem darunter liegenden Gewebe verlaufen. Entsprechend finden sich durchgehend doppellumige Anschnitte in denen in der konfokalen in-vivo Darstellung ein Blutstrom zu sehen ist.

Diese Bereiche, die bei Messmer als Meibomsche Drüsen gedeutet wurden, entsprechen nach hier vorliegender Interpretation den Henle Krypten, welche im Gegenteil zu den Drüsen in direkter Verbindung mit der konjunktivalen Oberfläche stehen.

Eine dritte im Jahr 2009 erschienene Arbeit des Autors Matsumoto über die Anwendung der Konfokalmikroskopie bei obstruktiver Dysfunktion der Meibomschen Drüsen, beschreibt im Text digitales Bildgut der glandulären Systeme in der Tiefe der Conjunctiva Palpebrae, liefert jedoch keine Bilder die eine Diskussion seiner Veröffentlichung ermöglichten. ^[91]

Die derzeit aktuellste Publikation „*In vivo confocal microscopy of the palpebral conjunctiva and tarsal plate*“ eines australischen Teams um N. Efron beschreibt die konfokal mikroskopische Darstellung der Meibomschen Drüsen mit Zugang über das ektropionierte Oberlid. Die als Meibomsche Drüsen interpretierten Strukturen decken sich jedoch mit den Verzäpfungen des Epitheliums der Lidkante mit dem darunter liegenden Stroma, wie in Kapitel 3.4 beschrieben. Eine Angabe zur Gewebetiefe der akquirierten Bilder ist nicht mit publiziert. ^[92]

Das Autorenpaar Knop, welches sich ebenfalls ausführlich mit den Regionen der Augenlider befasst, rückt in einer mehrteiligen Veröffentlichung Erkrankungen der Meibomschen Drüsen ins Blickfeld. ^[12, 93 - 95]

Sie beschreiben die Dysfunktion der Meibomschen Drüsen, für welche sie die einheitliche Nomenklatur „Meibomian Gland Dysfunction“ kurz „MGD“ und ihre Anerkennung als eigenes Krankheitsbild vorschlagen, als wichtigste Ursache des Formenkreises „Evaporatives Trockenes Auge“ und dessen Folgeerscheinungen. ^[96 - 99]

Auch wenn die Autoren nur indirekt auf die konfokale Darstellung eingehen, lässt sich folgern, dass bereits mit derzeitigem Stand der Technologie ein Teil der pathologischen Alterationen erkennbar ist. Weitere Veränderung, insbesondere solche der Drüsenazini werden erst nach einer Überarbeitung der Technik, hin zu höheren Eindringtiefen, erkennbar sein.

Die Pathogenese der posterioren Blepharitis, im deutschen Sprachraum synonym zur MGD, lässt sich vereinfachend in 4 Phasen gliedern:

- Veränderung der Gangepithelien führt zu einer Dickenzunahme der Wände im Bereich der Orifizien mit konsekutiver Verengung des Lumens
- Sekretstau im Drüsensystem mit Dilation des angeschlossenen Gangsystems
- Atrophie der Drüsenazini
- Funktionsverlust der Drüse - sog. „gland dropout“

Als Folge des Funktionsverlustes entsteht ein Mangel der Meibomschen Sekrete auf der Lidkante und somit dem Tränenfilm. Die Aufrisszeit des Tränenfilmes sinkt und die Evaporationsrate erhöht sich. ^[100, 101]

Bereits in der Krankheitsgenese treten Veränderungen an den Ausführungsgängen in Lidkantennähe auf und auch die Verlegung der Orifizien durch Sekret und Zelldetritus des holokrinen Sekretionsmechanismus (sog. „pouting“) laufen oberflächennah ab. ^[101 - 104]

Somit wird es möglich bereits frühe Phasen der Erkrankung in der laser scanning microscopy aufzuzeigen.

Als Erweiterung zu konventionellen Untersuchungstechniken durch Spaltlampe und Meibographie, besteht so die Möglichkeit auf zellulärer Ebene Schichtdicken der Gangepithelien und Lumina der Ausführungsgänge präzise zu bestimmen und somit Progredienzen oder das Anschlagen einer Therapie zu evaluieren.

Oftmals ist das Krankheitsbild der MGD mit bestehenden Hauterkrankungen wie Psoriasis, Rosacea oder seborrhoischer Dermatitis assoziiert, beziehungsweise setzt sich

aus deren kutanen Manifestationen im Bereich der Lidkante auf die Ausführungsgänge der Drüsen fort. ^[105 - 108]

Ferner beschreibt die Literatur im Rahmen von Entwicklungsstörungen, aber auch bei degenerativen Alterationen im Sinne einer Hyperkeratose die Bildung von Haaren direkt aus den Ausführungsgängen der Meibomschen Drüsen. Somit weist die Lidkante eine zweite Wimpernreihe am inneren Lidkantenende auf (Distichiasis). ^[109]

Auf alle betroffenen Areale bietet die Konfokalmikroskopie Zugriff.

Minderfunktionen der Drüsen, Veränderungen der Gangstrukturen oder der Azini selbst kommen unter anderem iatrogen als Nebenwirkungen von Anti-Androgen-Therapien, postmenopausaler Hormonsubstitution oder Retinoidapplikation vor. Aufgrund der Lage dieser Gebilde in der Tiefe des Tarsus, sind diese durch den gegenwärtigen Stand der Technik nicht zu erreichen. ^[35, 100]

Seit längerem finden sich in der Literatur widersprüchliche Aussagen und kontroverse Diskussionen über die Auswirkung des Tragens von Kontaktlinsen auf die Funktion der Meibomschen Drüsen. Während einige Quellen bei Kontaktlinsenträgern keine signifikante Veränderung der Drüsen und ihrer Anhefte im Vergleich zu Normalprobanden erkennen, deutet eine neuere Studie auf eine massive Abnahme der aktiven Drüsenstruktur hin. In der 2009 erschienenen japanischen Publikation des Autors R. Arita wurde eine Kohorte aus 121 Kontaktlinsenträgern (Durchschnittsalter: 30 Jahre) untersucht. Es zeigte sich, dass die Drüsenaktivität auf das Niveau von 60-69-jährigen Nicht-Kontaktlinsenträgern absank. ^[109 - 112]

Durch das extravital gewonnene Bildgut der Meibomschen Drüsen steht nun jedoch eine Referenz zur Verfügung, die es nach einer Erweiterung der Eindringtiefe ermöglichen wird einen physiologischen Situs gegen Pathologien abzugrenzen.

Neben Erkrankungen der Meibomschen Drüsen spielt sich eine Vielzahl ophthalmologischer und dermatologischer Pathologien im Bereich der Augenlider und der Konjunktiva ab. Die menschlichen Augenlider weisen eine Prädisposition für allergische und toxische Dermatitis auf und stellen einen wichtigen Manifestationsort des malignen Melanoms dar. ^[100]

Die Literatur beschreibt Alterationen der Wimpern (Madarosis) im Rahmen lokaler oder systemischer Erkrankungen sowie als Nebenwirkung von Pharmazeutika. ^[113 - 115]

Ebenso werden Lidkzeme verschiedener Ätiologie und Pathogenese unterschieden, die von systemischen Hauterkrankungen bis hin zu Allergien auf Kosmetika herrühren können. ^[116 - 120]

Ein weiteres großes Feld möglicher Anwendungen stellen Tumoren im Bereich der Lidkante dar. Grundsätzlich sind gutartige Veränderungen im Sinne eines Chalazion oder Hordeolum von malignen Neoplasien abzugrenzen. Hier stehen der Wahrscheinlichkeit des Auftretens nach Basalzellkarzinom, Spinozelluläres Karzinom sowie das Talgdrüsenkarzinom im Vordergrund. ^[100, 121]

Gerade zuletzt genannte Neoplasie tritt, wahrscheinlich aufgrund der verschiedenen Drüsentypen auf kleinem Raum, am häufigsten im Bereich der Augenlider auf. Nach wie vor bleibt das Talgdrüsenkarzinom schwer diagnostizierbar und wird häufig als entzündliche Veränderung verkannt. ^[122 - 124]

5 Literaturverzeichnis

1. Treverton GF: "Risks And Riddles." *Smithsonian Magazine* (2007), Vol. S. 98-102.
2. Gladwell M: "Die Hütchenspieler." *brand eins* (2007), Vol. 8 S. 80-91.
3. Peyman GA, Sanders DR, Goldberg MF: "Principles and practice of ophthalmology." Auflage, S. 3 v.) (xix, 2512, xliv p. Published by Saunders in Philadelphia (1980).
4. Gray H, Standring S, Ellis H et al.: "Gray's anatomy : the anatomical basis of clinical practice." Auflage, S. xx, 1627 p. Published by Elsevier Churchill Livingstone in Edinburgh ; New York (2005).
5. Albert DM, Jakobiec FA: "Principles and practice of ophthalmology." Auflage, S. 6 v. (lviii, 5584, cxxxviii p.). Published by Saunders in Philadelphia (2000).
6. Moore KL, Persaud TVN: "The developing human : clinically oriented embryology." Auflage, S. xi, 493 p. Published by Saunders in Philadelphia (1993).
7. Katowitz JA: "Pediatric oculoplastic surgery." Auflage, S. xix, 694 p. Published by Springer in New York (2002).
8. Patten BM: "Human embryology." Auflage, S. xvii, 798 p. Published by Blakiston in New York, (1953).
9. Clara M: "Entwicklungsgeschichte des Menschen." Auflage, S. XV, 559 S. Published by Quelle und Meyer in Leipzig (1943).
10. Broman I: "Die Entwicklung des Menschen vor der Geburt : ein Leitfaden zum Selbststudium der menschlichen Embryologie." Auflage, S. XII, 351 S. Published by Bergmann in München (1927).
11. Chandler JW: "Erkrankungen des äußeren Auges : Kornea, Konjunktiva, Sklera, Augenlider, Tränensystem." Auflage, S. Published by in (1997).
12. Knop N, Knop E: "[Meibomian glands. Part I: anatomy, embryology and histology of the Meibomian glands]." *Ophthalmologe* (2009), Vol. 106 (10), S. 872-883.
13. Krstic RV: "Human microscopic anatomy : an atlas for students of medicine and biology." Auflage, S. xvi, 616 p. Published by Springer-Verlag in Berlin ; New York (1991).
14. Guthoff RF: "Atlas of Confocal Laser Scanning In-vivo Microscopy in Ophthalmology." Auflage, S. Published by in (2006).
15. Augustin AJ: "Augenheilkunde." Auflage, S. lxx, 1403 p. Published by Springer in Berlin ; New York (2001).
16. Donald C, Hamilton L, Doughty MJ: "A quantitative assessment of the location and width of Marx's line along the marginal zone of the human eyelid." *Optom Vis Sci* (2003), Vol. 80 (8), S. 564-572.
17. Whitnall SE: "The anatomy of the human orbit and accessory organs of vision." Auflage, S. xii p., 1 l., 467, [461] p. Published by Humphrey Milford, Oxford university press in London, New York [etc.] (1932).
18. Apple DJ, Rabb MF: "Ocular pathology : clinical applications and self-assessment." Auflage, S. xiii, 705 p., [741] p. of plates. Published by Mosby in St. Louis (1998).
19. Hoang-Xuan T, Baudouin C, Cruzot-Garcher C: "Inflammatory Diseases of the Conjunctivae." Auflage, S. xx, 297 p. Published by Thieme Medical Publishers in (2001).
20. Steuhl K-P: "Ultrastructure of the conjunctival epithelium." Auflage, S. Published by in (1989).

21. Duke-Elder S, Wybar KC: "The anatomy of the visual system." Auflage, S. xxii, 901 p. Published by Mosby in St. Louis (1961).
22. Frey H: "Handbuch der Histologie u. Histochemie des Menschen : Lehre von den Form- u. Mischungs-Bestandtheilen des Körpers." Auflage, S. Published by in Leipzig, (1867).
23. Henle J: "Handbuch der systematischen Anatomie des Menschen." Auflage, S. 3 v. Published by Vieweg in Braunschweig, (1867).
24. Stieda L: "Ueber den Bau der Augenlidbindehaut des Menschen." *Arch. mikr. Anat.* (1867), Vol. 36 S. 291 - 309.
25. Kessing SV: "Mucous gland system of the conjunctiva. A quantitative normal anatomical study." *Acta Ophthalmol (Copenh)* (1968), Vol. S. Suppl 95:91+.
26. Forrester J, Dick A, McMenamin P et al.: "The eye: basic sciences in practice." Auflage, S. Published by WB Saunders Co in (2002).
27. Galloway N, Amoaku W, Galloway P et al.: "Common eye diseases and their management." Auflage, S. Published by Springer Verlag in (2006).
28. Wulc AE, Dryden RM, Khatchaturian T: "Where is the gray line?", *Arch Ophthalmol* (1987), Vol. 105 (8), S. 1092-1098.
29. Marx E: "Über vitale Färbung des Auges und der Augenlider. II. Chemische Eigentümlichkeiten der Stoffe, welche die Augenlider vital färben.", *Gräfes Archiv. f. Ophthalmol.* (1926), Vol. 116 S. 114-125.
30. Li XM, Hu L, Hu J et al.: "Investigation of dry eye disease and analysis of the pathogenic factors in patients after cataract surgery." *Cornea* (2007), Vol. 26 (9 Suppl 1), S. S16-20.
31. Doughty MJ, Naase T, Donald C et al.: "Visualisation of "Marx's line" along the marginal eyelid conjunctiva of human subjects with lissamine green dye." *Ophthalmic Physiol Opt* (2004), Vol. 24 (1), S. 1-7.
32. Norn M: "Meibomian orifices and Marx's line. Studied by triple vital staining." *Acta Ophthalmol (Copenh)* (1985), Vol. 63 (6), S. 698-700.
33. Yamaguchi M, Kutsuna M, Uno T et al.: "Marx line: fluorescein staining line on the inner lid as indicator of meibomian gland function." *Am J Ophthalmol* (2006), Vol. 141 (4), S. 669-675.
34. http://www.uk-wuerzburg.de/uploads/media/programm_infos_10-10-2008_meibom-symposium.pdf (22.02.2010)
35. Schaumberg DA, Buring JE, Sullivan DA et al.: "Hormone replacement therapy and dry eye syndrome." *JAMA* (2001), Vol. 286 (17), S. 2114-2119.
36. Meckel JF: "Archiv für Anatomie und Physiologie." (1827), Vol. S.
37. Jester JV, Nicolaides N, Smith RE: "Meibomian gland studies: histologic and ultrastructural investigations." *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1981), Vol. 20 (4), S. 537-547.
38. Sirigu P, Shen RL, Pinto da Silva P: "Human meibomian glands: the ultrastructure of acinar cells as viewed by thin section and freeze-fracture transmission electron microscopies." *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1992), Vol. 33 (7), S. 2284-2292.
39. Chung CW, Tigges M, Stone RA: "Peptidergic innervation of the primate meibomian gland." *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1996), Vol. 37 (1), S. 238-245.
40. Perra MT, Lantini MS, Serra A et al.: "Human meibomian glands: a histochemical study for androgen metabolic enzymes." *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1990), Vol. 31 (4), S. 771-775.
41. Seifert P, Spitznas M: "Immunocytochemical and ultrastructural evaluation of the distribution of nervous tissue and neuropeptides in the meibomian gland." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (1996), Vol. 234 (10), S. 648-656.

42. Bron AJ, Tiffany JM: "The meibomian glands and tear film lipids. Structure, function, and control." *Adv Exp Med Biol* (1998), Vol. 438 S. 281-295.
43. Arita R, Itoh K, Inoue K et al.: "Noncontact infrared meibography to document age-related changes of the meibomian glands in a normal population." *Ophthalmology* (2008), Vol. 115 (5), S. 911-915.
44. Tiffany JM: "Tear film stability and contact lens wear." *Journal of The British Contact Lens Association* (1988), Vol. 11 S. 35-38.
45. Korb DR, British Contact Lens Association.: "The tear film : structure, function, and clinical examination." Auflage, S. xi, 200 p. Published by Butterworth-Heinemann in Oxford ; Boston (2002).
46. Holly FJ: "Tear film physiology." *Int Ophthalmol Clin* (1987), Vol. 27 (1), S. 2-6.
47. Nicolaidis N, Kaitaranta JK, Rawdah TN et al.: "Meibomian gland studies: comparison of steer and human lipids." *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1981), Vol. 20 (4), S. 522-536.
48. Mishima S, Maurice DM: "The oily layer of the tear film and evaporation from the corneal surface." *Exp Eye Res* (1961), Vol. 1 S. 39-45.
49. Wolff E: "The muco-cutaneous junction of the lidmargin and the distribution of the tear fluid." *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* (1946), Vol. 66 S. 291-308.
50. Minsky M: "Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope." *Scanning* (1998), Vol. 10 S. 10.
51. Cavanagh HD, El-Agha MS, Petroll WM et al.: "Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century." *Cornea* (2000), Vol. 19 (5), S. 712-722.
52. Petran M, Hadravsky M, Egger D et al.: "Tandem scanning reflected light microscope." *J. Opt. Soc. Amer.* (1968), Vol. 58 S. 661-664.
53. Brakenhoff GJ, Blom P, Barends P: "Confocal scanning microscopy with high-aperture lenses." *J. Microsc.* (1979), Vol. 117 S. 219-232.
54. Sheppard C: "Confocal laser scanning microscopy." Auflage, S. Published by in (1997).
55. Paddock SW: "Confocal microscopy methods and protocols." Auflage, S. xi, 446 p. Published by Humana Press in Totowa, N.J. (1999).
56. Stave J, Zinser G, Grummer G et al.: "[Modified Heidelberg Retinal Tomograph HRT. Initial results of in vivo presentation of corneal structures]." *Ophthalmologe* (2002), Vol. 99 (4), S. 276-280.
57. Zhivov A: In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium of healthy volunteers and contact lense wearers: 78. (2005).
58. http://pages.unibas.ch/zmb/konfokal/Konfokal_TextDemo.htm (01.06.2009)
59. Pawley JB: "Handbook of biological confocal microscopy." Auflage, S. xxviii, 985 p. Published by Springer in New York (2006).
60. Bochert R, Zhivov A, Kraak R et al.: "Contribution to comprehension of image formation in confocal microscopy of cornea with Rostock cornea module." *Br J Ophthalmol* (2005), Vol. 89 (10), S. 1351-1355.
61. Laing RA, Sandstrom MM, Leibowitz HM: "Clinical specular microscopy. II. Qualitative evaluation of corneal endothelial photomicrographs." *Arch Ophthalmol* (1979), Vol. 97 (9), S. 1720-1725.
62. Dunn AK, Smithpeter CL, Welch AJ et al.: "Finite-difference time-domain simulation of light scattering from single cells." *Journal of Biomedical Optics* (1997), Vol. 2 (3), S. 262-366.
63. Amos WB, White JG: "How the confocal laser scanning microscope entered biological research." *Biol Cell* (2003), Vol. 95 (6), S. 335-342.

64. Valkenburg JA, Woldringh CL: "Phase separation between nucleoid and cytoplasm in *Escherichia coli* as defined by immersive refractometry." *J Bacteriol* (1984), Vol. 160 (3), S. 1151-1157.
65. Valkenburg JA, Woldringh CL, Brakenhoff GJ et al.: "Confocal scanning light microscopy of the *Escherichia coli* nucleoid: comparison with phase-contrast and electron microscope images." *J Bacteriol* (1985), Vol. 161 (2), S. 478-483.
66. Lemp MA, Dilly PN, Boyde A: "Tandem-scanning (confocal) microscopy of the full-thickness cornea." *Cornea* (1985), Vol. 4 (4), S. 205-209.
67. Jones SJ, Boyde A: "Scanning microscopic observations on dental caries." *Scanning Microsc* (1987), Vol. 1 (4), S. 1991-2002.
68. Watson TF: "A confocal optical microscope study of the morphology of the tooth/restoration interface using Scotchbond 2 dentin adhesive." *J Dent Res* (1989), Vol. 68 (6), S. 1124-1131.
69. Remy L, Gorvel JP, Jacquier MF et al.: "Confocal microscopy as a tool to reveal the tridimensional organization of intracellular lumens and intercellular cysts in a human colon adenocarcinoma cell line." *Biol Cell* (1990), Vol. 69 (3), S. 129-138.
70. Gardner DL, Oates K: "Impact of confocal scanning optical microscopy on pathological practice." *Br J Hosp Med* (1993), Vol. 49 (3), S. 160-165, 169-170.
71. Boon ME, Kok LP, Sutedja G et al.: "Confocal sectioning of thick, otherwise undiagnosable cell groupings in cervical smears." *Acta Cytol* (1993), Vol. 37 (1), S. 40-48.
72. Cavanagh HD, Jester JV, Essepian J et al.: "Confocal microscopy of the living eye." *Clao J* (1990), Vol. 16 (1), S. 65-73.
73. Eckard A, Stave J, Guthoff RF: "In Vivo Investigations of the Corneal Epithelium With the Confocal Rostock Laser Scanning Microscope (RLSM)." *Cornea* (2006), Vol. 25 (2), S. 127-131.
74. Fitzke FW, Masters BR: "Three-dimensional visualization of confocal sections of in vivo human fundus and optic nerve." *Curr Eye Res* (1993), Vol. 12 (11), S. 1015-1018.
75. Corcuff P, Leveque JL: "In vivo vision of the human skin with the tandem scanning microscope." *Dermatology* (1993), Vol. 186 (1), S. 50-54.
76. Corcuff P, Bertrand C, Leveque JL: "Morphometry of human epidermis in vivo by real-time confocal microscopy." *Arch Dermatol Res* (1993), Vol. 285 (8), S. 475-481.
77. Chew SJ, Beuerman RW, Assouline M et al.: "Early diagnosis of infectious keratitis with in vivo real time confocal microscopy." *CLAO J* (1992), Vol. 18 (3), S. 197-201.
78. Kaufman SC, Beuerman RW, Kaufman HE: "Diagnosis of advanced Fuchs' endothelial dystrophy with the confocal microscope." *Am J Ophthalmol* (1993), Vol. 116 (5), S. 652-653.
79. Jester JV, Petroll WM, Feng W et al.: "Radial keratotomy. 1. The wound healing process and measurement of incisional gape in two animal models using in vivo confocal microscopy." *Invest Ophthalmol Vis Sci* (1992), Vol. 33 (12), S. 3255-3270.
80. Imre L, Resch M, Nagymihaly A: "In vivo confocal corneal microscopy after keratoplasty." *Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft* (2005), Vol. 102 (2), S. 140.
81. Marchini G, Mastropasqua L, Pedrotti E et al.: "Deep Lamellar Keratoplasty by Intracorneal Dissection A Prospective Clinical and Confocal Microscopic Study." *Ophthalmology* (2006), Vol. 113 (8), S. 1289-1300.

82. Mathers WD, Lane JA, Zimmerman MB: "Assessment of the Tear Film with Tandem Scanning Confocal Microscopy." *Cornea* (1997), Vol. 16 (2), S. 162-168.
83. Malik RA, Kallinikos P, Abbott CA et al.: "Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients." *Diabetologia* (2003), Vol. 46 (5), S. 683-688.
84. Kaufman SC, Musch DC, Belin MW et al.: "Confocal microscopy: a report by the American Academy of Ophthalmology." *Ophthalmology* (2004), Vol. 111 (2), S. 396-406.
85. Reinhard T, Larkin DFP: "Cornea and external eye disease." Auflage, S. xix, 232 p. Published by Springer in Berlin ; New York (2008).
86. www.cataract-surgery.info (12.12.2010)
87. Mulisch M: "Romeis - Mikroskopische Technik." Auflage, S. Published by in (2009).
88. Burck H-C: "Histologische Technik : Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis." Auflage, S. Published by in (1988).
89. 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), Vol. 24 (8), S. 985-988.
90. Messmer EM, Torres Suarez E, Mackert MI et al.: "In vivo confocal microscopy in blepharitis." *Klin Monatsbl Augenheilkd* (2005), Vol. 222 (11), S. 894-900.
91. Matsumoto Y, Shigeno Y, Sato EA et al.: "The evaluation of the treatment response in obstructive meibomian gland disease by in vivo laser confocal microscopy." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* (2009), Vol. 247 (6), S. 821-829.
92. Efron N, Al-Dossari M, Pritchard N: "In vivo confocal microscopy of the palpebral conjunctiva and tarsal plate." *Optom Vis Sci* (2009), Vol. 86 (11), S. E1303-1308.
93. Knop E, Knop N: "[Meibomian glands : part IV. Functional interactions in the pathogenesis of meibomian gland dysfunction (MGD)]." *Ophthalmologe* (2009), Vol. 106 (11), S. 980-987.
94. Knop E, Knop N, Brewitt H et al.: "[Meibomian glands : part III. Dysfunction - argument for a discrete disease entity and as an important cause of dry eye]." *Ophthalmologe* (2009), Vol. 106 (11), S. 966-979.
95. Knop E, Knop N, Schirra F: "[Meibomian glands. Part II: physiology, characteristics, distribution and function of meibomian oil]." *Ophthalmologe* (2009), Vol. 106 (10), S. 884-892.
96. Brewitt H, Kaercher T, Rufer F: "[Dry eye and blepharitis]." *Klin Monbl Augenheilkd* (2008), Vol. 225 (2), S. R15-32, quiz R33.
97. Brewitt H, Sistani F: "Dry eye disease: the scale of the problem." *Surv Ophthalmol* (2001), Vol. 45 Suppl 2 S. S199-202.
98. Mathers WD, Binarao G, Petroll M: "Ocular water evaporation and the dry eye. A new measuring device." *Cornea* (1993), Vol. 12 (4), S. 335-340.
99. McCulley JP, Uchiyama E, Aronowicz JD et al.: "Impact of evaporation on aqueous tear loss." *Trans Am Ophthalmol Soc* (2006), Vol. 104 S. 121-128.
100. Kohl E, Hillenkamp J, Landthaler M et al.: "[Skin and eyes]." *Hautarzt* (2009), Vol. 60 (1), S. 63-74; quiz 75.
101. Shimazaki J, Sakata M, Tsubota K: "Ocular surface changes and discomfort in patients with meibomian gland dysfunction." *Arch Ophthalmol* (1995), Vol. 113 (10), S. 1266-1270.
102. Gutgesell VJ, Stern GA, Hood CI: "Histopathology of meibomian gland dysfunction." *Am J Ophthalmol* (1982), Vol. 94 (3), S. 383-387.

103. Mathers WD: "Ocular evaporation in meibomian gland dysfunction and dry eye." *Ophthalmology* (1993), Vol. 100 (3), S. 347-351.
104. Obata H: "Anatomy and histopathology of human meibomian gland." *Cornea* (2002), Vol. 21 (7 Suppl), S. S70-74.
105. Jackson WB: "Blepharitis: current strategies for diagnosis and management." *Can J Ophthalmol* (2008), Vol. 43 (2), S. 170-179.
106. Kaercher T, Brewitt H: "[Blepharitis]." *Ophthalmologe* (2004), Vol. 101 (11), S. 1135-1147; quiz 1148.
107. McCulley JP, Dougherty JM: "Blepharitis associated with acne rosacea and seborrheic dermatitis." *Int Ophthalmol Clin* (1985), Vol. 25 (1), S. 159-172.
108. Foulks GN, Bron AJ: "Meibomian gland dysfunction: a clinical scheme for description, diagnosis, classification, and grading." *Ocul Surf* (2003), Vol. 1 (3), S. 107-126.
109. Arita R, Itoh K, Inoue K et al.: "Contact lens wear is associated with decrease of meibomian glands." *Ophthalmology* (2009), Vol. 116 (3), S. 379-384.
110. Marren SE: "Contact lens wear, use of eye cosmetics, and Meibomian gland dysfunction." *Optom Vis Sci* (1994), Vol. 71 (1), S. 60-62.
111. Molinari JF, Stanek S: "Meibomian gland status and prevalence of giant papillary conjunctivitis in contact lens wearers." *Optometry* (2000), Vol. 71 (7), S. 459-461.
112. Ong BL: "Relation between contact lens wear and Meibomian gland dysfunction." *Optom Vis Sci* (1996), Vol. 73 (3), S. 208-210.
113. Kowing D: "Madarosis and facial alopecia presumed secondary to botulinum a toxin injections." *Optom Vis Sci* (2005), Vol. 82 (7), S. 579-582.
114. Mansour AM: "Adnexal findings in AIDS." *Ophthal Plast Reconstr Surg* (1993), Vol. 9 (4), S. 273-279.
115. Mvogo CE, Bella-Hiag AL, Ellong A et al.: "Ocular complications of leprosy in Cameroon." *Acta Ophthalmol Scand* (2001), Vol. 79 (1), S. 31-33.
116. Amin KA, Belsito DV: "The aetiology of eyelid dermatitis: a 10-year retrospective analysis." *Contact Dermatitis* (2006), Vol. 55 (5), S. 280-285.
117. Ockenfels HM, Seemann U, Goos M: "Contact allergy in patients with periorbital eczema: an analysis of allergens. Data recorded by the Information Network of the Departments of Dermatology." *Dermatology* (1997), Vol. 195 (2), S. 119-124.
118. Reinhard T, Ruzicka T, Sundmacher R: "[Pathogenesis, clinical aspects and therapy of eye involvement in allergy]." *Ophthalmologe* (1999), Vol. 96 (7), S. 473-488.
119. Starr PA, Macdonald A: "Oculocutaneous aspects of rosacea." *Proc R Soc Med* (1969), Vol. 62 (1), S. 9-11.
120. Svensson A, Moller H: "Eyelid dermatitis: the role of atopy and contact allergy." *Contact Dermatitis* (1986), Vol. 15 (3), S. 178-182.
121. Boulos PR, Rubin PA: "Cutaneous melanomas of the eyelid." *Semin Ophthalmol* (2006), Vol. 21 (3), S. 195-206.
122. Buitrago W, Joseph AK: "Sebaceous carcinoma: the great masquerader: emerging concepts in diagnosis and treatment." *Dermatol Ther* (2008), Vol. 21 (6), S. 459-466.
123. Shields JA, Demirci H, Marr BP et al.: "Sebaceous carcinoma of the ocular region: a review." *Surv Ophthalmol* (2005), Vol. 50 (2), S. 103-122.
124. Zurcher M, Hintschich CR, Garner A et al.: "Sebaceous carcinoma of the eyelid: a clinicopathological study." *Br J Ophthalmol* (1998), Vol. 82 (9), S. 1049-1055.
125. <http://www.carlzeiss.de> (22.07.2008)

6 Anhang

Einverständniserklärung

Name: _____

Vorname: _____

Geb.Datum: _____

Hiermit bestätige ich, dass mir die Art und Durchführung der Untersuchung und deren Zweck von Herrn Bermaoui verständlich erklärt worden sind. Im Zusammenhang hiermit wurde ich über Risiken der Untersuchung und mögliche Folgen (*gerötetes Auge, Tränenfluss, allergische Reaktionen auf das Betäubungsmittel bzw. die Kunststoffkappe, selten: Hornhautverletzungen, Bindehautentzündung*) aufgeklärt. Ich hatte Gelegenheit, Fragen zu stellen, die mir alle beantwortet wurden.

Rostock, den _____

Proband

Untersuchungsbogen

Rostock, der

Name:

Vorname:

Geb.Dat.:

 Einverständnis liegt vor**Besonderheiten:**

- Kontaktlinsen
- Allergie
- Sonstiges
- „Alles Normal“

Erkrankung:

- Keratokonjunktivitis vernalis
- Keratokonjunktivitis epidemica
- Unspez. Konjunktivitis
- Trockenes Auge

Notizen (Seit wann? Therapie?)

Spaltlampenbefund (Gefäßinjektion, Follikelschwellung...)

Bindehaut:

Lider:

- Foto (Spaltlampe)
- Tarsale Bindehaut (Oberlid)
- Drüsenöffnungen (Unterlidkante)

Bemerkungen

Thesen

1. Die Konfokalmikroskopie ist geeignet um anatomische Strukturen des menschlichen Augenlides in-vivo zu visualisieren
2. Das Epithel von Lidkante und Tarsus kann reproduzierbar abgebildet werden
3. Die Strukturen der Lidkante, wie Wimpern und die Ausführungsgänge der Meibomschen Drüsen sind in-vivo klar zu differenzieren
4. Durch Verzahnungen der oberflächlichen Gewebeschichten an der Lidkante wird ein Schlangenlinienmuster erzeugt, welches drüsenartig erscheint, jedoch in keinem Zusammenhang mit Drüsenstrukturen der Lidkante steht
5. Die Meibomschen Drüsen sind aufgrund ihrer Lage nicht in-vivo darstellbar
6. An der Conjunctiva Tarsi sind Becherzellen und Mikrostrukturen wie die Henle-Krypten konfokal abgrenzbar
7. Die in der Konfokalmikroskopie dargestellten Bereiche decken sich mit den Erkenntnissen aus der Lichtmikroskopie
8. Die ex-vivo Präparate machen durch die Möglichkeit einer sagittalen Aufsicht den anatomischen Situs in der Konfokalbildung verständlich
9. Die Meibomschen Drüsen lassen sich ex-vivo im Konfokalbild zuordnen
10. Weitere Gewebetypen, wie Muskulatur und Fett sind ex-vivo konfokal erkennbar
11. Die ex-vivo Präparate liefern ebenfalls deckungsgleiche Ergebnisse zwischen Histologie und Konfokalmikroskopie

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die vorgelegte Dissertation wurde bisher weder im Ausland noch im Inland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Rostock, den 12. Juli 2011

Unterschrift