

Aus der
Augenklinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Direktor: Prof. Dr. med. Anselm Kampik

**Konfokale in-vivo Mikroskopie der
Bindehaut**

**Korrelation von Klinik, konfokaler in-vivo Mikroskopie und
Histologie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Marc Mackert

aus

München

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Anselm Kampik

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Carl-Ludwig Schönfeld

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Elisabeth Messmer

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 24. 03. 2011

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Allgemeine Einleitung	1
2. Zielsetzung	3
II. Grundlagen.....	5
1. Die Konjunktiva	5
1.1. Anatomie der Konjunktiva	5
1.2. Erkrankungen der Konjunktiva	9
a) Konjunktivitis	9
b) Degenerative Erkrankungen der Konjunktiva.....	13
c) Tumore der Konjunktiva	15
I. Nicht-melanozytäre Tumore	15
II. Melanozytäre Tumore	17
2. Das konfokale in-vivo Mikroskop.....	20
2.1. Definition und allgemeine Beschreibung	20
2.2. Die geschichtliche Entwicklung	21
2.3. HRT II in Verbindung mit dem RCM	23
III. Patienten, Material und Methoden.....	28
1. Patientenkollektiv	28
2. Klinische, in-vivo konfokale und histologische Untersuchungen.....	34
IV. Ergebnisse.....	38
1. Die Anatomie der Konjunktiva	38
1.1. Normale bulbäre Konjunktiva	38
1.2. Limbus corneae.....	46
1.3. Normale tarsale Konjunktiva und subkonjunktivale Strukturen	47

2. Bindehautentzündungen	49
2.1. Konjunktivitis	49
2.2. Konjunktivales Granulom	54
3. Blepharitis / Meibomitis	55
4. Degenerationen der Konjunktiva.....	56
4.1. Pinguecula und Pterygium.....	56
4.2. Amyloidose.....	60
5. Nicht-pigmentierte Tumore der Konjunktiva.....	61
5.1. Papillom.....	61
5.2. Konjunktivale intraepitheliale Neoplasie (CIN) und Plattenepithelkarzinom.	62
5.3. Lymphom	64
6. Pigmentierte Tumore der Konjunktiva.....	65
6.1. Nävus	65
6.2. Sekundär erworbene Melanose (mit der Hautfarbe assoziierte Melanose) und primär erworbene Melanose ohne Atypie	68
6.3. Primär erworbene Melanose mit Atypie.....	71
6.4. Melanom.....	74
V. Diskussion	77
1. Konfokale in-vivo Mikroskopie	77
2. Anatomie der Konjunktiva	78
3. Konjunktivitis	82
4. Degenerative Erkrankungen der Konjunktiva	84
5. Nicht-pigmentierte Tumore der Konjunktiva.....	86
6. Pigmentierte Tumore der Konjunktiva.....	88
VI. Zusammenfassung	90
VII. Literaturverzeichnis	91
VIII. Publikationen	100

IX. Danksagung..... 101

I. Einleitung

1. Allgemeine Einleitung

Malignome sind die häufigsten Erkrankungen an denen unsere Population erkrankt und trotz der Weiterentwicklung moderner Technologien bleibt sie die zweithäufigste Todesursache (109). Auch die Konjunktiva als wichtiger integrativer Bestandteil der Augenoberfläche ist häufig von Neoplasien betroffen. Es ist eine große Herausforderung für den Ophthalmologen und Pathologen diese als benigne, prä-maligne oder maligne einzustufen (25). Relativ harmlose Veränderungen wie zum Beispiel die primär erworbene Melanose (PAM) ohne Atypie sind klinisch äußerst schwierig von lebensbedrohlichen Erkrankungen wie zum Beispiel dem malignen Melanom zu unterscheiden. Je nach Differenzierung einer solchen Neoplasie ergeben sich für den Patienten unterschiedlichste therapeutische Möglichkeiten. So stehen auf Grund der begrenzten diagnostischen Möglichkeiten neben der Biomikroskopie nur noch eine minimal-invasive Materialentnahme mittels Zytologietechniken oder die operative Probeexzision mit anschließenden histologischen Untersuchungen zur Verfügung. Bis heute sind solche Untersuchungen der Bindehaut nur ex-vivo möglich.

Neben den Tumoren und degenerativen Erkrankungen der Konjunktiva spielen aber auch die Entzündungen der Bindehaut eine große Rolle. Sehr unterschiedliche Ursachen für eine Bindehautentzündung führen zu einem scheinbar ähnlichen klinischen Bild und stellen sich dem praktizierenden Augenarzt differentialdiagnostisch schwierig dar (56). Die diagnostischen Möglichkeiten für diese Entität sind begrenzt und oft bleibt nur die Möglichkeit des Therapieversuchs bei einer Verdachtsdiagnose.

Eine sehr innovative Möglichkeit der in-vivo Mikroskopie stellt das „konfokale in-vivo Mikroskop“ dar. In anderen medizinischen Bereichen wie zum Beispiel der Dermatologie findet diese neue diagnostische Möglichkeit schon Anwendung (66). Auch in der Augenheilkunde haben sich neben Studien zur Anatomie der Cornea (13;62) Erfolge in der Erkennung und Diagnose infektiöser Erkrankungen wie der Akanthamöbenkeratitis (72;87) oder der Pilzkeratitis (24;86;120) ergeben. Wichtige Publikationen sind auch im Bereich der cornealen Wundheilung nach refraktiver Chirurgie oder der penetrierenden Keratoplastik erschienen (86). Zum Zeitpunkt unserer

klinischen Untersuchungen existierte nur eine Veröffentlichung zur konfokalen in-vivo Mikroskopie der humanen Konjunktiva an zwei gesunden Probanden (55).

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es das Applikationsspektrum eines konfokalen in-vivo Mikroskops, des Heidelberg Retina Tomographen (HRT II) in Verbindung mit dem Rostock Cornea Modul (RCM), als neues nicht invasives diagnostisches Mittel an der Konjunktiva zu überprüfen. Die Anatomie, Entzündungen, degenerative Erkrankungen und Tumore der Bindehaut wurden hierfür mit dem HRT II/ RCM untersucht, ihre pathomorphologischen Strukturen im Bild identifiziert und interpretiert. Anschließend sollten die Ergebnisse mit dem klinischen und/oder dem histologischen bzw. immunhistochemischen Bild verglichen werden und die Aussagekraft der mit dem konfokalen Mikroskop gestellten Diagnose retrospektiv überprüft werden.

Im Bereich der Anatomie haben wir uns im Speziellen die Frage gestellt, ob Besonderheiten im anatomischen Aufbau der Bindehaut beziehungsweise Unterschiede zwischen der bulbären und tarsalen Konjunktiva zu erkennen sein würden. Hierbei waren für uns die unterschiedlichen Zellgrößen der einzelnen Zellschichten des Bindehautepithels von Bedeutung gewesen.

Ein weiteres Ziel war es wichtige anatomische Strukturen der Bindehaut, wie zum Beispiel die Becherzellen, die für den Tränenfilm von entscheidender Bedeutung sind, die dendritischen Zellen, die wichtige Vertreter des Immunsystems sind, oder die Meibomdrüsen, die Hauptmanifestationsort für eine Blepharitis sind, zu identifizieren.

Der Limbus corneae interessierte in seinem Aufbau und in der in-vivo Darstellung besonders, da dort das Stammzellreservoir für das Hornhautepithel liegt.

Durch die Möglichkeit der in-vivo Untersuchung wollten wir den Vorteil nutzen Blutfluss und eventuell Lymphgefäße und damit zum Beispiel die Zellmigration direkt zu visualisieren.

Die anatomischen Studien waren insbesondere wichtig, um ein Normalkollektiv zum späteren Vergleich mit pathologischen Befunden zu etablieren.

Anschließend wurden unterschiedliche Formen der Konjunktivitis untersucht, um Entzündungsprozesse unterschiedlicher Genese sicher voneinander abgrenzen zu können. Papillen, die für die allergische Bindehautentzündung typisch sind, Follikel, für die vor allem Chlamydien ursächlich sind, oder Vernarbungen sollten untersucht und beurteilt werden.

Degenerative Erkrankungen der Bindehaut sind oft schwierig von entzündlichen oder nicht-pigmentierten Tumoren zu unterscheiden. Ein weiteres Ziel ist daher die Möglichkeit der Darstellbarkeit von degenerativen Erkrankungen wie beispielsweise das Pterygium und die Pinguecula und die Abgrenzbarkeit vom konjunktivalen Papillom, Plattenepithelkarzinom oder lymphozytären Läsionen zu untersuchen und strukturelle Besonderheiten dieser Entitäten auf zellulärer Ebene in-vivo darzustellen.

Ein großer Teil dieser Arbeit befasst sich mit der Korrelation von in-vivo konfokaler Mikroskopie und Histologie beziehungsweise Immunhistologie bei pigmentierten Bindehauttumoren. Die Unterscheidung dieser Tumore, insbesondere die Festlegung der Diagnose auf ein malignes Melanom, ist therapierelevant. Unsere Intention war es dementsprechend die Charakteristika des Nävus, der Melanosen und des malignem Melanoms darzustellen.

II. Grundlagen

Im Folgenden soll dem Leser ein Einblick in die Anatomie der Bindehaut und die wichtigsten Erkrankungen der Konjunktiva, die mit dem konfokalen Mikroskop untersucht wurden, gegeben werden. Im Anschluss wird näher auf das konfokale in-vivo Mikroskop, seine Idee und geschichtliche Entwicklung bis heute eingegangen.

1. Die Konjunktiva

1.1. Anatomie der Konjunktiva

Die Konjunktiva ist eine dünne, durchsichtige Schleimhaut, welche den Augapfel mit den Lidern verbindet, wie es ihr Name schon vermuten lässt (lateinisch „conjungere“ heißt „verbinden“). Auch wenn die Konjunktiva kontinuierlich ist, wird sie gewöhnlich in drei Regionen aufgeteilt: Conjunctiva tarsi oder palpebrae, Conjunctiva fornices und Conjunctiva bulbi.

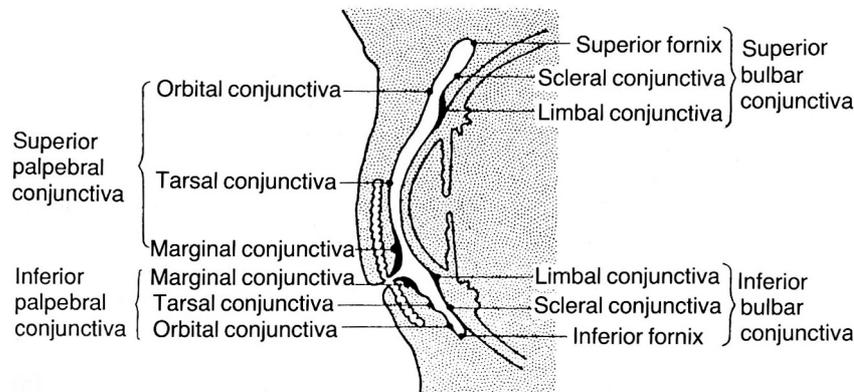


Abb. 1: Schema der Konjunktiva bei geschlossenem Auge im vertikalen Schnitt (10).

Die Conjunctiva tarsi kleidet die Innenseite der Lider im Bereich des oberen und unteren Tarsus aus. Sie beginnt an der mukokutanen Übergangszone der Lidkante im Bereich der Öffnung der Meibom'schen Drüsen und ist durch das mehrschichtige, verhornte Plattenepithel der Lidhaut begrenzt. Die Conjunctiva fornices im Bereich der unteren und oberen Umschlagsfalte ist nur lose mit dem darunter liegendem Bindegewebe verbunden und ermöglicht die freie Beweglichkeit des Bulbus.

Die Conjunctiva bulbi im Bereich des Augapfels ist transparent, liegt der Sklera nur lose auf und ist in Kontakt mit den Sehnen der Musculi recti, welche von einer Faszie, der Tenon-Kapsel, bedeckt werden. Zwischen Konjunktiva und Sklera liegt die lockere Episklera, die oberflächlichste Schicht der Sklera, welche aus dichtem vaskularisiertem Bindegewebe besteht und ohne sichtbare Grenze in die Tenon-Kapsel übergeht. Nach medial wird der Bindehautsack durch die rudimentäre Nickhaut, eine als Plica semilunaris bezeichnete Falte, begrenzt, die in die Karunkel übergeht. Im Bereich der Karunkel besteht eine Übergangszone zur Dermis. Am Limbus befindet sich die Übergangszone zur Hornhaut (79).

Die Bindehaut besteht aus dem Epithel und der darunter liegenden Substantia propria, welche auch Stroma genannt wird.

Die neonatale Konjunktiva ist im Aufbau einheitlich und entsteht, wie die Epidermis der Haut, das Epithel der Cornea und die Linse aus dem Ektoderm. Erst im Laufe der Zeit variiert die Struktur von Region zu Region (4).

Das Bindehautepithel ist ein mehrschichtiges, nicht verhornendes Plattenepithel und enthält schleimbildende Zellen, die so genannten Becherzellen. Es besteht aus einer basalen Schicht von kubischen Zellen, überlagert von einer Schicht so genannter Flügelzellen und einer abgeflachten Oberflächenschicht. Subepithelial liegen dendritische Melanozyten, Langerhanszellen und oft auch Entzündungszellen. Becherzellen befinden sich in der Flügelzell- und Oberflächenschicht, können aber auch im basalen Epithel vorkommen. Die oberste Zellschicht weist kleine filamentäre Ausstülpungen in Form von Mikrovilli und Mikroplicae auf, durch welche sowohl die Zelloberfläche vergrößert also auch die Anhaftung des Tränenfilms verbessert wird.

An der palpebralen mukokutanen Übergangszone geht die Haut abrupt in ein nicht-verhornendes Plattenepithel mit ungefähr fünf Schichten über. Das basale Epithel enthält, wie die Dermis, noch Papillen. Die tiefste Schicht besteht aus Zylinderzellen, gefolgt von einer polyhedralen Zwischenschicht und oberflächlichen niedrigen Plattenepithelzellen. Die Becherzellen erscheinen erst ab der subtarsalen Falte.

Das Epithel der superioren tarsalen Konjunktiva ist nur noch zweireihig und besteht aus einer tiefen Schicht von kubischen Zellen und einer oberflächlichen zylindrischen Zellschicht. Das Epithel der inferior tarsalen Konjunktiva hat drei oder vier Schichten, manchmal auch nur zwei und selten fünf. Die basalen Zellen bleiben kubisch (10).

In Richtung Fornix erweitert sich die Anzahl der Schichten wieder auf drei, indem eine intermediäre Schicht von polyhedralen Zellen hinzukommt.

Die Drüsenanzahl, vor allem der Becherzellen, nimmt vom Fornix zum Limbus hin ab. Schichten von polyhedralen Zellen nehmen zu und die oberflächlichen Zellen erscheinen flacher.

Am Limbus direkt wird das Epithel vielschichtig, ungefähr zehn Zellen tief, und geht in eine papilläre Form über, welche die von Vogt beschriebenen limbalen Palisaden ausmachen. Basale Zellen erscheinen eher klein und sind entweder zylindrisch oder kubisch geformt. Pigmentgranulae sind hier sehr häufig basal anzutreffen. Einige Schichten von polygonalen Zellen, gefolgt von ein oder zwei Schichten Plattenepithel liegen auf (10).

Die Anzahl von konjunktivalen Epithelzellen in den verschiedenen Schichten nimmt interessanterweise mit dem Alter ab (20).

Das Stroma besteht aus einem gut vaskularisiertem Bindegewebe und kann in eine obere und eine untere Schicht eingeteilt werden. Während das Charakteristikum der oberen Schicht eine zelluläre Infiltration, hauptsächlich mit Lymphozyten ist, besteht die untere Schicht aus fibrovaskulärem Bindegewebe, Nerven und Lymphgefäßen. Das hierbei wichtigste Element, das CALT (Conjunctiva assoziiertes lymphatisches Gewebe) besteht aus B-Lymphozyten und zahlenmäßig weitaus häufigeren T-Lymphozyten, welches sich jedoch erst zwei bis drei Monate nach der Geburt entwickelt. Follikel, die B-Lymphozyten enthalten, kommen überwiegend in der Conjunctiva fornices vor. Neben den Lymphozyten finden sich Plasmazellen, Makrophagen, Langerhanszellen, polymorphkernige Granulozyten und Mastzellen in der Substantia propria (79).

Becherzellen sind die Hauptquelle des glykoproteinreichen, apokrin sezernierten Schleims für den Tränenfilm. Sie kommen in größter Dichte im nasal unteren Quadranten vor und am wenigsten im temporalen oberen Fornix- Bereich. An der palpebralen mukokutanen Übergangszone und am Limbus fehlen sie vollständig (52). Sie machen bei Kindern ca. 15% der Oberflächenzellen und 8% der basalen Epithelzellen aus, was einer Verteilung von zehn Zellen pro Millimeter entspricht (111). Sie entstehen aus der basalen Schicht des Epithels und erreichen im Durchschnitt eine Größe von 10-20µm mit einem flachen basalen Nucleus. Sie kommen eigenständig oder

als Verbund in epithelialen Krypten vor, von welchen die netzförmigen Krypten im oberen tarsalen Bereich, die so genannten „Henle-Krypten“, bekannt sind.

Melanozyten kommen an Limbus, Fornix, Plica, Karunkel und an Stellen von Perforation der vorderen Ziliargefäße vor (78). Je nach dermalen Pigmentierung treten sie in den basalen Schichten unterschiedlich häufig auf. Eine mögliche Schutzfunktion für die Stammzellen des Hornhautepithels wird ihnen am Limbusepithel, insbesondere auf dem Boden der Vogt-Palisaden, eingeräumt (79).

Die Dichte der Langerhanszellen nimmt von der tarsalen Bindehaut mit 4,7 Zellen/mm² angefangen, über den Fornix mit 3,1 Zellen/mm² zur bulbären Bindehaut hin mit 1,0 Zellen/mm² ab (112). Ursprünglich 1867 durch Engelmann im basalen Epithel der Cornea beschrieben, wurden sie später auch am Limbus (113) und dem Epithel der Konjunktiva (35) nachgewiesen. Von allen Entzündungszellen treten die Langerhanszellen zahlenmäßig am häufigsten besonders am Limbus auf. Sie gehören zum dendritischen System und haben ihre Funktion in der Antigen Präsentation, in der Lymphokin- und Prostaglandin- Produktion, und der Stimulation von T-Lymphozyten.

1.2. Erkrankungen der Konjunktiva

a) Konjunktivitis

Das typische Zeichen einer Konjunktivitis ist das „rote Auge“. Es kommt durch vermehrte Füllung der Bindehautgefäße zustande und wird als Hyperämie bezeichnet. Die hellroten Bindehautgefäße lassen sich bei einer konjunktivalen Injektion auf der Skleraoberfläche leicht verschieben. Vor allem bei einer bakteriellen Konjunktivitis kommt es zu einer Sekretion. Das Exsudat kann wässrig, schleimig oder eitrig sein (39).

Ein Ödem unterschiedlichen Ausmaßes tritt bei jeder Bindehautentzündung auf. Die Transsudation einer fibrinösen und proteinreichen Flüssigkeit durch die Wände der beschädigten Blutgefäße führt zu einer durchsichtigen Schwellung der Bindehaut und charakterisiert die sogenannte Chemosis.

Typische Follikel sind winzige Lymphknötchen mit umgebender Vaskularisation, die gewöhnlich am unteren Fornix am stärksten ausgeprägt auftreten. Die zwischen 0,5 und 5mm großen Follikel erscheinen klinisch als multiple diskrete, leicht erhabene Veränderungen, die an kleine Reiskörner erinnern. Sie deuten gewöhnlich auf eine virale, durch Chlamydien verursachte oder toxische Genese hin (51).

Papillen dagegen sind polygonale, abgeplattete Knötchen vor allem der oberen palpebralen Bindehaut, die im Zentrum ein feines Gefäßbäumchen aufweisen. Bei starker Ausprägung werden sie als „Pflastersteine“ bezeichnet. Sie sind typisch für eine akute allergische Konjunktivitis, treten aber auch im Rahmen einer Keratoconjunctivitis vernalis und bei Kontaktlinsenträgern auf.

Diese Leitsymptome und klinischen Zeichen können in gewissen Maßen Rückschlüsse auf die Ätiologie zulassen.

Die akute infektiöse Konjunktivitis ist die Augenerkrankung, die von Ärzten für Allgemeinmedizin am häufigsten gesehen wird. Sie wird auf zwei bis drei Prozent aller Konsultationen eingeschätzt (44).

Die akute bakterielle Konjunktivitis tritt häufig auf und heilt gewöhnlich von selbst aus. Als Krankheitserreger sind in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit Staphylokokken, Pneumokokken und Haemophilus influenzae als verantwortlich zu sehen. Seltener sind Infektionen mit Streptokokken, Proteus, Escherichia coli und Gonokokken (51).

Die häufigsten Symptome sind Fremdkörpergefühl, Rötung und Absonderungen, die bei Pneumokokken und Staphylokokken eher mukopurulent und bei Haemophilus influenzae sowie Streptokokken eher dünnflüssig sind (51). Meistens sind beide Augen betroffen. Bei der Untersuchung findet man eine papilläre Hypertrophie, Follikel fehlen (51).

Chlamydia trachomatis ist der Erreger zweier Formen der Konjunktivitis: Die Einschlusskörperchenkonjunktivitis wird durch die Serotypen D bis K hervorgerufen und kommt in Ländern mit guten hygienischen Bedingungen, wie zum Beispiel Mitteleuropa, vor. Das Trachom, auch ägyptische Körnerkrankheit genannt, wird durch die Serotypen A bis C hervorgerufen und kommt nur in Ländern mit schlechten hygienischen Bedingungen vor. Im Kindesalter beginnend, ist sie in diesen Ländern die häufigste Ursache von Blindheit und betrifft ca. vier Prozent der dortigen Bevölkerung. Auf Grund dieser in Europa nur noch ausnahmsweise vorkommenden, sowie meldepflichtigen Form, wird im Folgenden nur noch auf die Infektion mit den Serotypen D bis K eingegangen.

Chlamydia trachomatis D bis K ist eine der am meisten verbreiteten übertragbaren Erreger und verursacht drei bis fünf Millionen Neuerkrankungen jährlich alleine in den USA (65). Die Einschlusskörperchenkonjunktivitis ist eine okulogenitale Infektion. Die Erreger werden meist beim Geschlechtsverkehr übertragen und gelangen über die Hände in das Auge. Eine Infektion in Schwimmbädern ist sehr selten. Die Erkrankung kann mit einer Urethritis oder Zervizitis einhergehen. Bei 30 bis 70 Prozent der Männer mit Urethritis wurde Chlamydia trachomatis nachgewiesen. Komplikationen wie Endometritis, Salpingitis und eine Vielzahl weiterer Komplikationen können auftreten (65). Es finden sich typischerweise große, schillernde Follikel unter dem Oberlid, aber auch die Conjunctiva tarsi des Unterlids ist oft dicht von Follikeln besetzt. An der limbalen Bindehaut entstehen kleine Granulome und feine Gefäße sprossen am oberen Hornhautrand in die äußeren Schichten der Hornhaut ein, man spricht in diesem Fall von einer sogenannte Pannusbildung (40).

Bis zu 20 Prozent der Bevölkerung leiden an Allergien von Haut oder Schleimhaut (97). Oft ist im Laufe der Erkrankung das Auge mitbeteiligt, womit die allergische Konjunktivitis wahrscheinlich eine der am meisten gesehenen Erkrankungen in der allgemeinen Augenarztpraxis ist. Charakteristisch für die gewöhnlicherweise saisonal auftretende Erkrankung sind Juckreiz, Brennen, Rötung, Tränen, Chemosis

und Lidödem, mit denen eine allergische Rhinitis und/oder Sinusitis einhergehen können (29).

Die Heuschnupfenkonjunktivitis ist eine Hypersensitivitätsreaktion vom Typ I gegen bestimmte Pollen und andere pflanzliche Allergene (38);(2).

Bis zu 43 Prozent der Patienten mit atopischer Dermatitis erleiden im Verlauf ihrer Erkrankung eine Augenbeteiligung (32;90). Neben den typischen Hautveränderungen können Asthma, Heuschnupfen, Urtikaria, Migräne und Rhinitis hinzukommen (29). Die atopische Konjunktivitis ist eine schwere, bilaterale, chronische, ganzjährige Entzündung, die zusätzlich von einer chronischen Hypersensitivitätsreaktion vom Typ IV verursacht wird. Neben den relativ unspezifischen Symptomen wie Brennen, Tränenfluss und übermäßiger muköser Absonderung infolge von Becherzellproliferation (27;29;91), steht das Jucken im Vordergrund (2). Klinisch manifestiert sich die atopische Blepharokeratokonjunktivitis mit Hyperämie, papillärer Hypertrophie der oberen tarsalen Konjunktiva, sowie konjunktivaler Vernarbung mit subepithelialer Fibrose, Fornixverstreichung und Symblepharon (7).

Eine sehr ähnliche Erkrankung, mit Erkrankung im Kindesalter, ist die Keratoconjunctivitis vernalis. Charakteristisch für diese Form der Entzündung sind Riesenpapillen der oberen tarsalen Konjunktiva und eine geleeartige Hypertrophie des Limbus. Sie ist meist assoziiert mit intensivem Jucken, Photophobie und muköser Absonderung (11). Während die atopische Konjunktivitis das ganze Jahr über besteht, tritt die Keratoconjunctivitis vernalis vor allem in den Frühlings- bis Sommermonaten auf, wie es der Name vernal (= Frühling) schon zu erkennen gibt. Ein weiterer Unterscheidungspunkt ist das Alter in dem die Erkrankung auftritt. Die Keratoconjunctivitis vernalis ist eine Erkrankung der Kindheit und Jugend, während die atopische Konjunktivitis erst in den späten Teenagerjahren auftritt und oft lebenslang anhält (2).

Weiche Kontaktlinsen können nach längerem Tragen durch Trauma an der Konjunktiva des Oberlids und durch allergische Reaktion auf das Linsenmaterial zu einer sogenannten Riesenpapillenkongjunktivitis führen. Die juckende Entzündungsreaktion führt neben einer vermehrten Becherzellproliferation mit gesteigerter Schleimproduktion vor allem zu riesigen Papillen des Oberlids mit einem Durchmesser von einem Millimeter und mehr (2;9).

Alle Arten einer chronischen Bindehautentzündung können zu einer Fibrose führen. Zu den vernarbenden Konjunktividen zählen Systemerkrankungen wie das Schleimhautpemphigoid, das Stevens-Johnson-Syndrom oder der Lichen planus, die atopische Keratokonjunktivitis im Spätstadium, sowie das Trachom. Das Schleimhautpemphigoid kann in verschiedene Stadien eingeteilt werden. Das Stadium 1 nach Foster, die subkonjunktivale Fibrosierung und Narbenbildung, kann man als feine, weiße Linien unter der Spaltlampe sehen. Ein Fortschreiten in Stadium 2 mit Fornixverkürzung, in Stadium 3 mit Symblepharon und in Stadium 4 mit Ankyloblepharon ist möglich. Alle diese Veränderungen können zu einem trockenen Auge, Entropium oder Trichiasis mit folgender Hornhautvernarbung, Vaskularisation, Superinfektion und Perforation führen. Deshalb ist ein frühzeitiges Erkennen der Ursache und eine darauf zugeschnittene Therapie von entscheidender Bedeutung (23;28;43).

Unter den okulomukokutanen Syndromen spielt dabei das Stevens-Johnson-Syndrom (SJS) eine sehr wichtige Rolle. Obwohl dieses Syndrom gewöhnlicher Weise eine akute, selbst limitierende Erkrankung ist, gibt es in selteneren Fällen auch eine chronische, rezidivierende Form der Entzündung, die lebensbedrohlich werden kann. Neben der Haut können alle Schleimhäute und damit auch nicht selten die Konjunktiva betroffen sein. An der Bindehaut reichen die Symptome von milder Hyperämie bis zur Bildung von Blasen, Pseudomembranen, Ulzerationen und folgender Vernarbung. Beim SJS handelt es sich um ein Immunkomplex Syndrom, das zu einer Vaskulitis oder Perivaskulitis an vorgeschädigten prädisponierten Gefäßen führt. Typischerweise befinden sich eine Ansammlung von Makrophagen und Lymphozyten um die Gefäße, und auch subepithelial sind Lymphozyten- und Plasmazellinfiltrationen zu sehen, wobei neutrophile Granulozyten fehlen. Auslösende Faktoren wie zum Beispiel Infektionen, Medikamente, vor allem Antibiotika, und andere werden diskutiert (30).

Eine weitere Ursache für die vernarbende Konjunktivitis ist der Lichen planus, welcher zu der Gruppe der Autoimmunerkrankungen gezählt wird. Typischerweise manifestiert sich die papulo-squamöse Erkrankung an der Haut, sowie an der Schleimhaut des Mundes und der Genitalien. Selten ist auch die Konjunktiva betroffen, welche sich als entzündliches Korrelat mit Fibrosierung und Vernarbung darstellen kann. Um die geeignete Behandlung einzuleiten, muss diese eher seltene Erkrankung der Bindehaut

von anderen Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel dem Schleimhautpemphigoid abgegrenzt werden (81;114).

b) Degenerative Erkrankungen der Konjunktiva

Die häufigsten Vertreter der degenerativen Erkrankungen sind die Pinguecula und das Pterygium. Obwohl beide histologisch und ätiologisch nahezu identisch sind, gibt es dennoch Unterschiede, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll. Ursächlich für beide Degenerationen werden vor allem UV-B Exposition und andere exogene Faktoren wie Staub, Wind, Luftfeuchtigkeit und eine genetische Prädisposition diskutiert. Menschen also, die sich viel im Freien aufhalten, sind damit häufiger betroffen (95).

Pinguecula:

Eine vermehrt im fortgeschrittenen Lebensalter auftretende Pinguecula imponiert als eine runde, gelbliche und erhabene Gewebsvermehrung, welche typischerweise vor allem am nasalen, aber auch am temporalen Limbus im Lidspaltenbereich auftritt. Histologisch ist das Epithel verdünnt und enthält nur wenige Becherzellen. Die Verdickung des konjunktivalen Stromas wird durch die Fibrose und elastotische Degeneration der bindegewebigen Fasern hervorgerufen. Tränenfilmstörungen können auftreten, doch vorwiegend sind die Beschwerden ästhetischer Natur (49).

Pterygium:

Hierbei handelt es sich um eine vaskularisierte, meist dreieckige Bindehautduplikatur, welche anders als die Pinguecula über den Limbus auf die Hornhautmitte zuwächst und zahlreiche Vaskularisationen beinhalten kann. Die elastotische Degeneration des Kollagens, sowie die fibrovaskuläre Proliferation können rapide zunehmen und zu einer Zerstörung der Bowmanschen Membran, durch Zug an der Hornhaut zu einem Astigmatismus und selten bei Progredienz in Richtung Hornhautmitte zu einer Visusminderung führen. Selten kann das Flügelfell meta- oder dysplastisch werden. Deswegen sind häufig nicht nur der kosmetische Aspekt, sondern viel mehr die

funktionellen Störungen und das Fortschreiten der Erkrankung der Grund für eine operative Entfernung (16;49).

c) Tumore der Konjunktiva

Die zweite große Gruppe an Erkrankungen, die neben den Entzündungen der Bindehaut untersucht wurden, sind die konjunktivalen Tumore. Studien haben gezeigt, dass 53 Prozent der Bindehauttumore zum melanotischen und 47 Prozent zum nicht-melanotischen Typus gehören (102). Da sich diese Einteilung auch bei der konfokalen Mikroskopie bewährt hat, werden im Folgenden diese zwei Subgruppen unterschieden.

I. Nicht-melanozytäre Tumore

1. Epitheliale Tumore

a) Dermoid

Beim konjunktivalen Dermoid handelt es sich um ein sogenanntes Choristom, das heißt um ein versprengtes Gewebe, welches typischerweise temporal inferior nahe dem Limbus auftritt und die bulbäre Bindehaut oder den korneoskleralen Limbus mitbetrifft. Selten erstreckt sich der benigne Tumor bis auf das Hornhautzentrum. Die gut umschriebene, runde, gelb-weißliche und solide Tumormasse besteht aus dermalen sowie aus epithelialen Gewebsanteilen und kann deshalb auch kleine Haare und Hautanhangsgebilde enthalten (104).

b) Papillom

Ein weiterer benigner Bindehauttumor ist das Bindehautpapillom, welches mit dem humanen Papillomavirus vom Subtyp 6, 11 und 16 assoziiert ist (107). Das pinkfarbene und fibrovaskuläre Zottengewebe kann sowohl in einer ungestielten, als auch in einer gestielten Konfiguration erscheinen, und ist primär an der medial inferioren Bulbusbindehaut oder im inferioren Fornix lokalisiert (106).

Zahlreiche feine Gefäße verzweigen sich durch das Stroma bis zu der epithelialen Oberfläche der Läsion. Die bäumchenartigen Wucherungen sind mit akantothischem Plattenepithel ausgekleidet. Größere Läsionen verursachen ein Fremdkörpergefühl, chronische Schleimproduktion, hämorrhagisches Tränen, inkompletten Lidschluss und eine kosmetische Beeinträchtigung (76;104).

Die Mehrzahl dieser Läsionen sind benigne Tumore und nur ein geringer Anteil kann in eine maligne Proliferation übergehen. Zeichen für diese dysplastischen Veränderungen sind vermehrte Keratinisierung, Entzündung der umgebenden Konjunktiva mit Symblepharonbildung und Ausbreitung in die tarsale Bindehaut (15).

Oft kann es nach der Exzision eines Papilloms zu einem Rezidiv kommen. Neben der obligaten „no touch“ Technik während der Exzision und der Kryotherapie (104), stehen bei Rezidiven die Behandlungsansätze mit topischem Interferon alpha-2b (96) und Mitomycin C (42) zur Verfügung.

c) Konjunktivale intraepitheliale Neoplasie (CIN)

Klinisch erscheint diese maligne Läsion des Epithels als eine durchsichtige oder gelatinöse Verdickung der Konjunktiva mit einem variablen Grad an Keratinisierung, die als weißlicher Plaque im Sinne einer Leukoplakie imponiert. Weniger häufig ist eine papillomatöse Form zu sehen. Der Tumor tritt gewöhnlicherweise in der interpalpebralen Region in der Nähe des Limbus auf, kann aber auch an der Bindehaut des Fornix, der Lider oder an der Hornhaut erscheinen. Histopathologisch ist bei der CIN die Dicke des Epithels teilweise, als leichte Dysplasie, oder vollständig, als schwere Dysplasie, betroffen, wobei die Basalmembran nicht durchbrochen wird. Bei einer Dysplasie aller Epithelschichten mit Verlust der normalen Oberflächenschicht spricht man von einem Carcinoma in situ (14;15;60;104;121). Wenn die dysplastischen Zellen durch die Basalmembran der basalen Epithelschicht brechen und die Substantia propria infiltrieren wird die Läsion als Plattenepithelkarzinom klassifiziert. Die klinische Diagnose des Plattenepithelkarzinoms kann sich auf Grund der unterschiedlichen Präsentationsform, von subtilen weißen Punkten im Sinne einer Parakeratose bis hin zu einem Prozess der eine chronische Entzündung imitiert, schwierig darstellen (41;108).

2. Nicht-epitheliale Tumore

a) Das Lymphangiom

Dieser meist nicht auf die Bindehaut begrenzte, sondern diffus und tief orbital reichende Tumor ist eine benigne vaskuläre Läsion und kommt eher selten vor. Klinisch imponiert

das Lymphangiom entweder als flächenhafte, glasige Schwellung oder als Ansammlung kleiner, bläschenförmiger, kavernöser und höckeriger Tumore. Diese multifokale Masse besteht aus vielzähligen Kanälen, die durch ein flaches Endothel ausgekleidet sind und Erythrozyten beinhalten. Auch Entzündungszellen können in den bindegewebigen Septen vorkommen (80;92;104).

b) Lymphom

Die lymphoproliferativen Läsionen am Auge wurden von Coupland et al. mit 46 Prozent orbital und 29 Prozent konjunktival beschrieben. Sie finden sich zu 21 Prozent im Bereich des Augenlids und 4 Prozent an der Karunkel (17). Die lymphoiden Tumore können an der Konjunktiva entweder als isolierte Läsion oder als Manifestation eines systemischen Lymphoms vorkommen. Klinisch erscheint die Läsion als diffuser, leicht erhabener und lachsfarbener Tumor mit einer glasigen, fischlaichartigen und oft follikulären Konsistenz. Das Lymphom befindet sich meistens in der unteren Umschlagsfalte stromal oder tiefer bis hin zur Tenonkapsel. Eine Unterscheidung zwischen gutartig oder bösartig ist klinisch gewöhnlicherweise nicht möglich und bedarf einer Biopsie. Histopathologisch typisch ist eine Proliferation von lymphozytären Zellen monoklonalen Ursprungs. Den größten Teil machen die B-Zell Lymphome vom Non-Hodgkin Typ aus, während T-Zell Lymphome eher selten sind (104).

II. Melanozytäre Tumore

Der relativ große Bereich der melanozytären Bindehauterkrankungen reicht vom benignen, meistens nicht therapiebedürftigen, Nävus und der mit der Hautfarbe assoziierten Pigmentierung bis hin zur primär erworbenen Melanose mit/ ohne Atypie und dem bösartigen Melanom. Die klinische Ähnlichkeit der Läsionen und die manchmal schwierige Interpretation der histopathologischen Befunde führen selbst bei erfahrenen Pathologen und Augenärzten zu Missinterpretationen und zu Über- bzw. Unterbehandlungen.

1. Bindehautnävus

Mit 52 Prozent ist der umschriebene und meist gutartige Nävus der häufigste melanozytäre Tumor (102). Das vorerst unpigmentierte, nicht erkennbare Hamartom wird im ersten oder zweiten Lebensjahrzehnt durch die zunehmende Pigmentierung klinisch erst ersichtlich und kann damit eine Größenzunahme simulieren. Typischerweise sitzt die unterschiedlich stark pigmentierte und leicht erhabene Läsion der interpalpebralen bulbären Bindehaut auf. Neben den an der Spaltlampe sichtbaren kleinen Bindehautzysten setzt sich der Bindehautnävus histopathologisch aus Nestern von benignen Melanozyten zusammen. Diese befinden sich im Stroma, nahe der Basalmembran des Epithels (25;104). Das Risiko einer Entartung in ein malignes Melanom liegt bei weniger als ein Prozent (34;103).

2. Sekundär erworbene Melanose (SAM)

Neben selteneren systemischen Erkrankungen wie dem Morbus Addison und den Pigmentierungen in Folge von Entzündungen oder Infektionen gehört vor allem die mit der Hautfarbe assoziierte Pigmentierung, oder auch „racial pigmentation“ genannt, zu den sekundär erworbenen Melanosen. Diese häufig mit dunkler Hautfarbe assoziierte und braun pigmentierte Veränderung ist gewöhnlicher Weise bilateral am Limbus lokalisiert und erstreckt sich dort meistens über 360 Grad. In Richtung Fornix nimmt diese intraepitheliale Pigmentierung ab. Histopathologisch sind benigne Melanozyten an der Basalmembran des Plattenepithels anzutreffen. Eine Entartung in ein malignes Melanom ist extrem selten, doch sollte eine periodische Beobachtung durchgeführt werden (25;47;104).

3. Primär erworbene Melanose (PAM)

Dieser primär benigne melanozytäre Tumor tritt fast immer einseitig vor allem im mittleren und höheren Lebensalter insbesondere bei hellhäutigen Personen auf. Auch wenn diese klinisch diffus, ungleichmäßige, flache, nicht zystische und unterschiedlich braune Verfärbung der Konjunktiva für lange Zeit stabil bleiben kann, führt die PAM mit Atypie häufig zu einem malignen Melanom. Einzig der Pathologe kann aus Probenbiopsien relativ sicher zwischen einer PAM ohne Atypie, mit einem nahezu gegen

null Prozent gehenden Risiko der Entwicklung in ein malignes Melanom, von einer PAM mit Atypie unterscheiden, welche ein Malignitätsrisiko von fast 50 Prozent hat. Das höchste Risiko für eine Entartung in das lebensbedrohliche maligne Melanom der Bindehaut haben vor allem Tumore mit besonderen histologischen Kriterien: Epitheloide Zellen (75 Prozent Risiko) und eine nicht basale Hyperplasie (90 Prozent Risiko). Eine PAM ohne Atypie sollte lediglich periodisch beobachtet werden, dagegen muss eine intraepitheliale melanozytäre Proliferation mit Atypie komplett exstipiert, engmaschig kontrolliert und eventuell mit Interferon nachbehandelt werden (47;104).

4. Malignes Melanom

Das maligne Melanom der Bindehaut ist eine potenziell tödlich verlaufende Erkrankung, die mit einer Inzidenz von 0,03 – 0,08 Neuerkrankungen pro Jahr pro 100000 Einwohner weißer Hautfarbe glücklicherweise sehr selten ist (64). Das Durchschnittsalter der Patienten liegt bei 52 bis 53 Jahren (26). Shields et al. dokumentierten, dass nur 4% der Bindehautmelanome aus einem Nävus entstehen, jedoch in bis zu 53% eine PAM mit Atypie als Vorläufer des Bindehautmelanoms zu finden ist. Siebenunddreißig Prozent der Melanome entwickeln sich „de novo“ (105).

Die invasiven Melanomknoten können sowohl pigmentiert als auch depigmentiert sein (47).

Prädilektionsstelle für das Bindehautmelanom ist der Limbus corneae, aber auch die bulbäre bzw. palpebrale Konjunktiva und der Fornix. Sehr selten ist eine corneale Beteiligung zu sehen (116).

Histopathologisch besteht das maligne Melanom der Bindehaut aus unterschiedlich pigmentierten malignen Melanozyten im konjunktivalen Stroma und Epithel. Melanome vom Epitheloidzelltyp sind häufiger als vom Spindelzelltyp (61). Es können sich mikroskopisch Anhaltspunkte für die Pathogenese in Form einer PAM oder eines Nävus ergeben (104).

Die 5-Jahres tumorbedingte Mortalitätsrate in Fall-Serien liegt bei 12-19%, während die 10-Jahres Mortalitätsrate bei 23-30% liegt (26;63;84;100).

2. Das konfokale in-vivo Mikroskop

2.1. Definition und allgemeine Beschreibung

Das konfokale Mikroskop ist ein digitales Laser-Raster-Mikroskop, mit dem man Strukturen des vorderen Augenabschnitts, zum Beispiel der Cornea, in-vivo darstellen kann. Mit Hilfe eines Lasers und eines optischen Vorsatzsystems (Objektiv) wird ein Punkt in einem gewünschten Bereich in einer bestimmten Tiefe beleuchtet und die Reflektion dieses Punktes mit demselben Objektiv von einem Detektor registriert. Konfokal hat dabei die Bedeutung, dass die Beleuchtungsseite mit der Detektorseite in einem Fokus liegt. Punkte außerhalb dieses Fokus werden ausgelöscht. Durch das Scannen mehrerer Punkte in einer Ebene können digitale zweidimensionale Bilder mit einer achthundertfachen Vergrößerung und einer Auflösung von bis zu einem μm gemacht werden. Anders als bei der Licht-Mikroskopie mit Schnitten in der Transversalebene erlangt man tomographische Echt-Zeit-Bilder in der Frontalebene mit einer Größe von $0,4 \times 0,4 \text{ mm}$ (x-, y- Achse) und einer Dicke kleiner als zwei μm (z-Achse). Die Informationen werden digital an eine Software Plattform weitergegeben und können dann als Einzelbilder auf dem Bildschirm betrachtet oder in Serien zu einer 3D-Rekonstruktion verwendet werden.

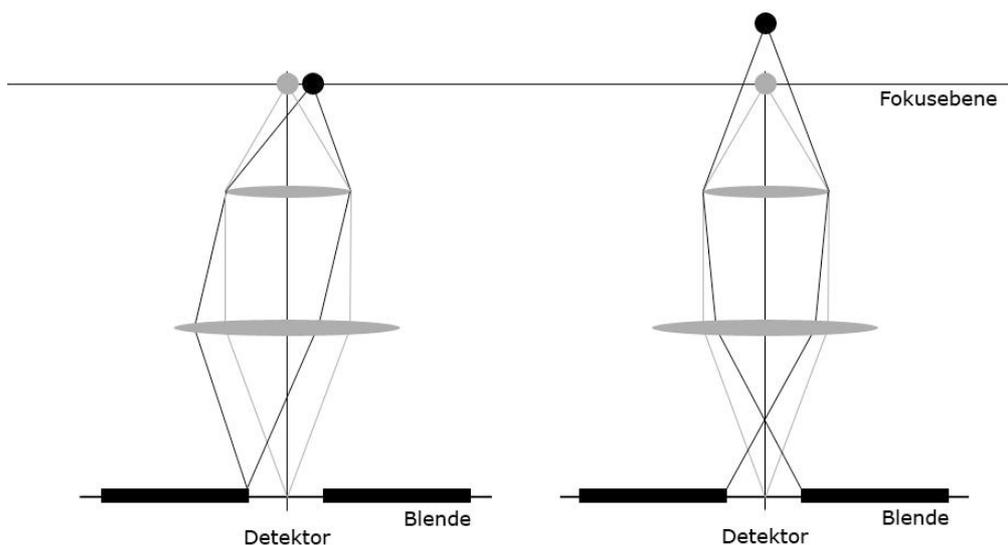


Abb. 2: Schema der Ausfilterung benachbarter Punkte (schwarz) durch das konfokale Blendensystem. Links bei benachbarten Punkten der gleichen Ebene, rechts bei Strahlen aus tieferen Ebenen.

2.2. Die geschichtliche Entwicklung

Das Prinzip der konfokalen Mikroskopie wurde erstmalig 1957 von Marvin Minsky beschrieben (77). Er schlug vor, dass beide, sowohl das Beleuchtungs- als auch das Beobachtungssystem, auf einen einzigen gemeinsamen Punkt fokussiert werden. Dies verbesserte die axiale (z) und laterale (x, y) Auflösung der Mikroskopie entscheidend, indem die Information außerhalb dieses Fokus ausgelöscht wird. Wilson und Sheppard, und Sheppard und Cogswell haben diese theoretische Anwendung formell weiterentwickelt (101;119).

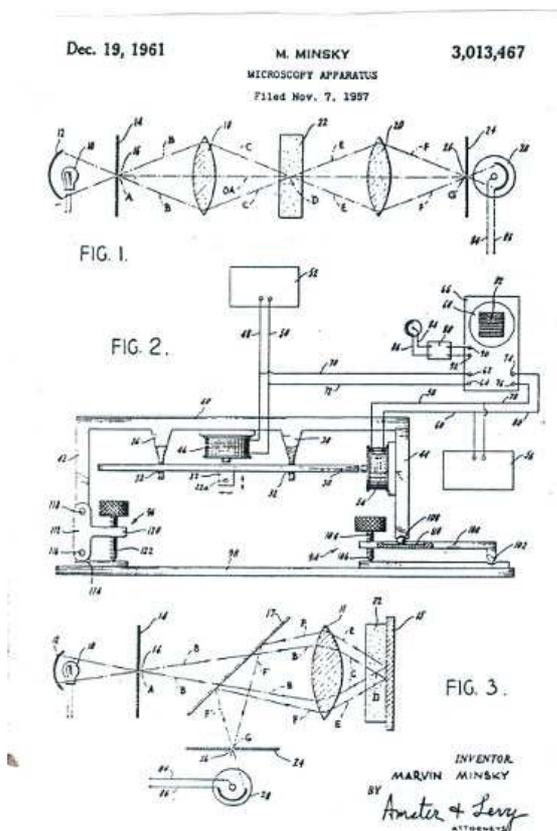


Abb. 3: Zeichnung des konfokalen Mikroskops (Minsky, 1962).

Wegen des sehr begrenzten Ausschnitts ist es notwendig den Fokus-Punkt über die Schichtebene des Gewebes schnell zu scannen, um ein zweidimensionales Echt-Zeit-Bild zu rekonstruieren. Dafür wurden zwei verschiedene Methoden entwickelt.

Petran und Mitarbeiter entwickelten 1968 das „Tandem scanning confocal microscope“, indem sie sich der von Nipkow 1884 erfundenen „Nipkow Disc“ bedienten (85).

Eine Nipkow Disc besteht aus einer Metall Platte mit einer Reihe von Löchern, die in Form einer archimedischen Spirale angeordnet sind. Diese kleinen Löcher ermöglichen viele kleine Punkt-Beleuchtungen und eine schnelle Disc Rotation lässt das Scannen der gesamten Proben-Ebene zu. Auch wenn diese Methode eine hohe axiale und transversale Auflösung erhält, ist ihr Lichtdurchsatz sehr gering, und das Darstellen spezifischer Strukturen wie der basalen Epithelzellen der Cornea nicht möglich.

Das „Scanning slit confocal microscope“ bedient sich dünner optischer Spalten, die ein noch schnelleres Abtasten der Ebene ermöglichen. Baer, Burns, Koester, Svishchev und Thayer entwickelten solche Spalt Licht Designs (6). Auch Maurice, der als erster 1974 konfokale Bilder der gesamten ungefärbten Cornea ex-vivo erhielt, bediente sich für sein „wide field specular microscope“ dieser Spalt-Beleuchtung (73). Auch wenn diese Form des konfokalen Mikroskops einen höheren Licht-Output bringt, ist sie nur in einer Achse wirklich konfokal.

Heutzutage verwendet man vornehmlich das „konfokale Laser-Raster-Mikroskop“, wie es in Abschnitt 2.1. beschrieben wurde. Anstatt einer Halogenen Lichtquelle, wie sie davor verwendet wurde, bedient man sich für eine viel höhere Lichtintensität eines Laserstrahls als Lichtquelle. Vor allem das Problem der ungleichmäßigen Bildausleuchtung besonders im Randbereich wurde mit dieser neuen Methode behoben. Mit ihm war es das erste Mal möglich auch tiefere Strukturen des Auges wie die Linse, die Retina und den Glaskörper zu betrachten (68;69).

Für detaillierte Informationen über die Entwicklung und verschiedenen Anwendungen der konfokalen Mikroskopie sei der Leser hierbei auf einige sehr gute und ausführliche Übersichtsartikel hingewiesen (6;12;31;70;71;86).

2.3. HRT II in Verbindung mit dem RCM

Das HRT II (Heidelberg Retina Tomograph II) ist ein konfokales Laser-scanning-system zur Aufnahme und Analyse von dreidimensionalen Bildern des hinteren Augenabschnittes. Die gewonnenen Daten dienen zur quantitativen Beschreibung der retinalen Topographie und zur Verlaufskontrolle topographischer Veränderungen mit hauptsächlichlicher Anwendung in der Untersuchung glaukomatöser Papillen.

Ziel der Universitäts-Augenklinik Rostock (Prof.J.Stave, Prof.Guthoff) in Zusammenarbeit mit der Heidelberg Engineering GmbH war es den HRT II durch mechanische und elektronische Adaptierung eines computerkontrollierten optischen z-Scan-Vorsatzsystems, gekoppelt mit einem externen Antrieb, in ein konfokales Laser-Scanning-Mikroskop zu erweitern, ohne dabei die Originalfunktion der HRT II einzuschränken. Mit der beschriebenen Gerätekombination ist es möglich alle Strukturen des vorderen Augenabschnitts bis zur Kapselrückwand in brauchbarer Qualität und einer Auflösung von bis zu 1 μm in-vivo abzubilden (110).



Abb. 4: Der Heidelberg Retina Tomograph HRT II mit aufgestecktem Rostock Cornea Module (RCM).

Das HRT II benützt als Lichtquelle einen Dioden Laser der Klasse I mit einer Wellenlänge von 670 nm. Die Laser-Scanning-Kamera, die der zentrale Teil des HRT II ist, beinhaltet neben der Laser Quelle das dreidimensionale Scanning-System, den Licht sensitiven Detektor und das elektronische System. Der Scanning Laser Strahl kommt aus dem Objektiv an der Vorderfläche der Kamera. Eine Refraktion von +12 Dioptrien muss für das Zusatzmodul eingestellt werden.

Das Rostock Cornea Modul (RCM) wird auf die Objektiv Röhre aufgesteckt. Das Cornea Modul besteht aus einer Feldlinse, die den Scan Winkel von 15° auf $\sim 7,5^\circ$ reduziert, und einem eigenem Wasserimmersions-Mikroskop-Objektiv der Firma Zeiss mit einer 63 fachen Vergrößerung, welche den Strahlengang auf die Oberfläche, zum Beispiel die Cornea, fokussiert. Dieses Wasserimmersions-Mikroskop-Objektiv ist notwendig, da eine Eliminierung störender Reflexe von der Oberfläche, sowie eine bessere Tiefenkontrolle erreicht werden kann. Mit dieser Apparatur ist es möglich einen Bereich von $400 \times 400 \mu\text{m}$ mit einer 800 fachen Vergrößerung bis zu einer Auflösung von ca. $1 \mu\text{m}/\text{Pixel}$ darzustellen.

Zwischen die Mikroskop-Linse und der so genannten sterilen Tomo-Cap, einem sterilen Plastikaufsatz aus PPMA, der Kontakt mit der Augenoberfläche hat, wird ein großer Tropfen Kontakt-Gel (VidiscTM, Dr.Mann Pharma) aufgetragen.

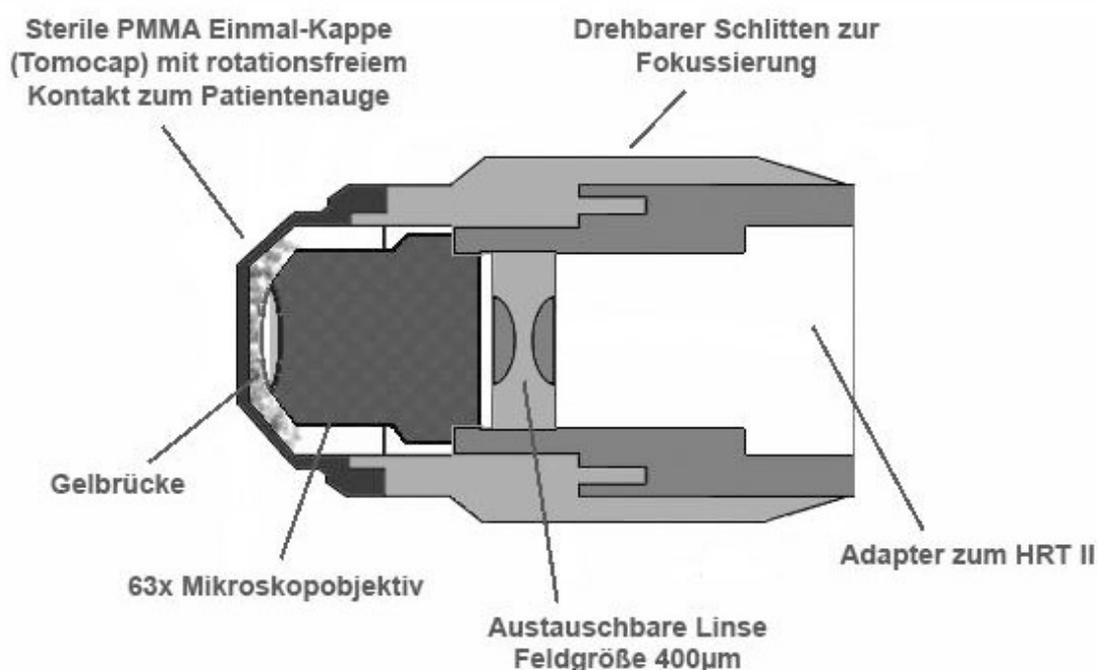


Abb. 5: Schematischer Aufbau des Rostock Cornea Module (RCM).

Zur Kontrolle des zu untersuchenden Auges und der Position des Objektivs in Bezug zur Augenoberfläche ist eine CCD-Kamera (640x480 Pixels) am Gerät angebracht. Der Laser Fokus wird an dem RCM mechanisch auf null, also der absoluten Oberfläche, eingestellt. Die Fokus Tiefen-Information wird über eine externe Elektronik Einheit von dem RCM ebenso an den Rechner gesendet. Der Laser Strahl wird periodisch durch oszillierende Spiegel abgelenkt und ermöglicht so, das ein zweidimensionaler Sektor der Probe sequentiell gescannt wird. Die Menge an reflektiertem Licht an jedem einzelnen Punkt wird durch den Licht sensitiven Detektor gemessen. Reflektiertes oder gestreutes Licht außerhalb der Fokus-Ebene wird stark unterdrückt, so dass ein kontrastreiches zweidimensionales Bild (384x384 Pixels) erzeugt werden kann. Wird nun die Fokus Ebene manuell am RCM verstellt, so ist eine dynamische Betrachtung aller Schichten zum Beispiel der Cornea in der z-Achse bis in eine Tiefe von 1500 μm (= z-Achse) möglich.



Abb. 6: Rostock Cornea Module mit schwenkbarer CCD-Kamera.

Durch Veränderung des Aufnahmemodus von „Section“ in „Volume“ werden automatisch eine Serie von 40 Bildern hintereinander mit einem Ebenenabstand von $\sim 2\mu\text{m}$ aufgenommen und durch den Rechner in ein dreidimensionales Bild umgerechnet.

Beim manuellen Verschieben des Fokus ändert sich der Abstand von Tomo-Cap und Oberfläche nicht, sondern das Objektiv wird durch einen intern hydraulisch betriebenen Miniaturschlitten (MMO-220 A Narishige Einfach-Hydraulik-Mikromanipulator/Japan) in oder gegen die Richtung des Tomo-Cap verschoben und ermöglicht somit eine

Verschiebung der Fokus Ebene in gewünschter Richtung. Also durch externes manuelles Verstellen wird das Objektiv intern bewegt, die Position wird registriert und an den Computer weitergegeben.

So kann am Bildschirm immer die aktuelle Position des Objektivs im Verhältnis zum Auge (durch CCD-Kamera), ein dynamisches Echt-Zeit Bild der 800 fachen Vergrößerung eines bestimmten Gewebe-Ausschnitts, sowie die aktuelle Tiefenangabe in Abhängigkeit zur Oberfläche eingesehen werden.

Alle Bilder können einfach digital archiviert werden und jederzeit wieder eingesehen werden. Unabsichtliche Bewegungen durch Puls, Atmung, Augenbewegungen, Mikrosakkaden etc. waren in den ersten in-vivo Untersuchungen mit Vorläufermodellen ein großer limitierender Faktor und brachten verschwommene und unscharfe Bilder. Dieses Problem wurde zum größten Teil durch sehr schnelle Bildaufnahmen und eine sehr geringe z-Scan Bildaufnahmedauer beseitigt. Ein zweidimensionales Einzelbild braucht 0,024 Sekunden und eine Aufnahmezeit von 6 Sekunden für ein dreidimensionales Bild minimiert diesen Fehler sehr.

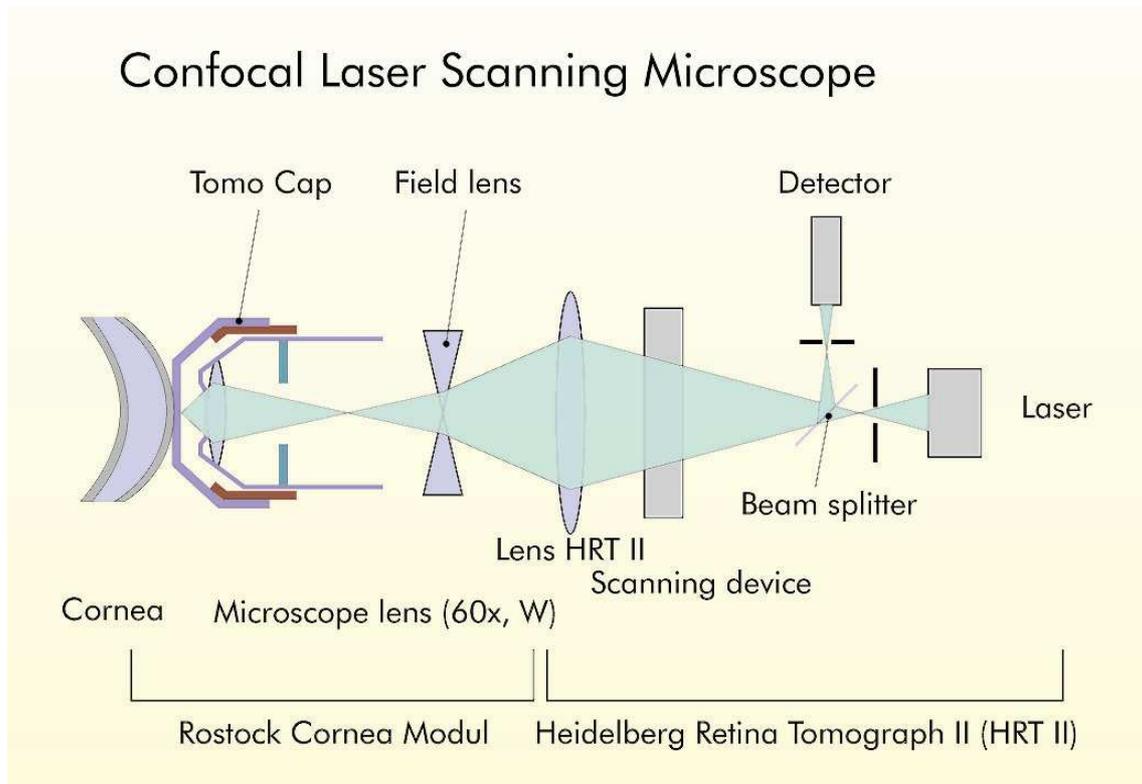


Abb. 7: Schema des Strahlengangs beim Heidelberg Retina Tomographen (HRT II) und Rostock Cornea Module (RCM).

Außer ersten Ergebnissen von Hochauflösenden in-vivo Darstellungen der transparenten Cornea (110), der normalen Bindehaut von zwei Normalprobanden (55) und in-vivo Analysen des Zungenepithels (50) gab es zum Zeitpunkt der Untersuchungen (Dezember 2004) unseres Wissens keine weiteren Untersuchungen mit dem HRT II/RCM.

III. Patienten, Material und Methoden

1. Patientenkollektiv

In der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden im Zeitraum von Februar 2004 bis August 2005 in der Ambulanz Patienten klinisch und in-vivo konfokal mikroskopisch untersucht, die sich mit einer Erkrankung der Bindehaut vorstellten. Für die Untersuchungen der Anatomie der normalen Bindehaut, also der Referenzgruppe, wurden vor allem Probanden und „Bindehaut gesunde“ Patienten herangezogen.

Insgesamt wurden 92 Augen untersucht. Zeigte ein Patient Veränderungen an beiden Augen, so wurden beide Augen untersucht und getrennt voneinander analysiert.

Die normale Bindehaut von 19 gesunden Patientenaugen unterschiedlichen Lebensalters zwischen 25 und 77 Jahren (Median: 32 Jahre, 7 Frauen und 8 Männer), 18 Augen mit Konjunktivitis, 19 degenerative Läsionen und 36 Tumore der Bindehaut wurden mit dem konfokalen Mikroskop untersucht.

Die Bindehautentzündungen unterteilten sich in 5 akut oder chronisch „bakterielle Konjunktivitiden“ (Median: 60 Jahre, 4 Frauen und 1 Mann), 8 Kontaktlinsen oder Atopie assoziierte „papilläre Konjunktivitiden“ (Median: 27 Jahre, 2 Frauen und 5 Männer), 3 „follikuläre Konjunktivitiden“ (Median: 53 Jahre, 3 Frauen), 7 durch Trachom, Stevens-Johnson Syndrom, schwere Atopie oder Lichen planus hervorgerufene „vernarbende Konjunktivitiden“ (Median: 55 Jahre, 2 Frauen und 4 Männer) und ein „konjunktivales Granulom“ nach einer pars-plana Vitrektomie (30 Jahre, männlich).

Degenerative Bindehauterkrankungen umfassten 9 Pingueculae (Median: 62 Jahre, 4 Frauen und 5 Männer), 9 Pterygien (Median: 63 Jahre, 2 Frauen und 7 Männer) und eine Amyloidose (64 Jahre, weiblich).

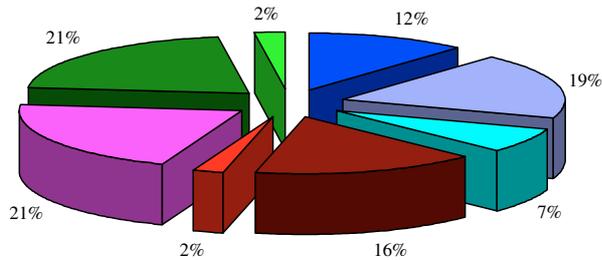
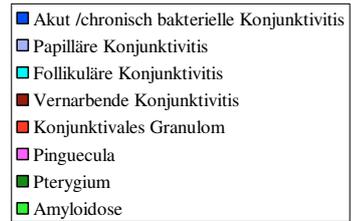


Abb. 8: Konjunktivitis und degenerative Bindehauterkrankungen.

Die pigmentierten Tumore ließen sich in 6 konjunktivale Nävi (Median: 27 Jahre, 3 Frauen und 3 Männer), 6 primär erworbene Melanosen ohne Atypie oder sekundär erworbene Melanosen (Median: 32,5 Jahre, 2 Frauen und 4 Männer), 7 primär erworbene Melanosen mit Atypie (Median: 67 Jahre, 3 Frauen und 4 Männer) und 7 konjunktivale maligne Melanome und 2 intraokulare Aderhaut- und Irismelanome mit extraskleralem Wachstum (Median: 75 Jahre, 6 Frauen und 3 Männer) einteilen.

Die Gruppe der untersuchten nicht pigmentierten Tumore bestand aus 2 Papillomen (Median: 49,5 Jahre, 2 Männer), 3 Plattenepithelkarzinomen (Median: 62 Jahre, 1 Frau und 2 Männer), und 3 Lymphomen (Median: 61 Jahren, 2 Frauen und 1 Mann).

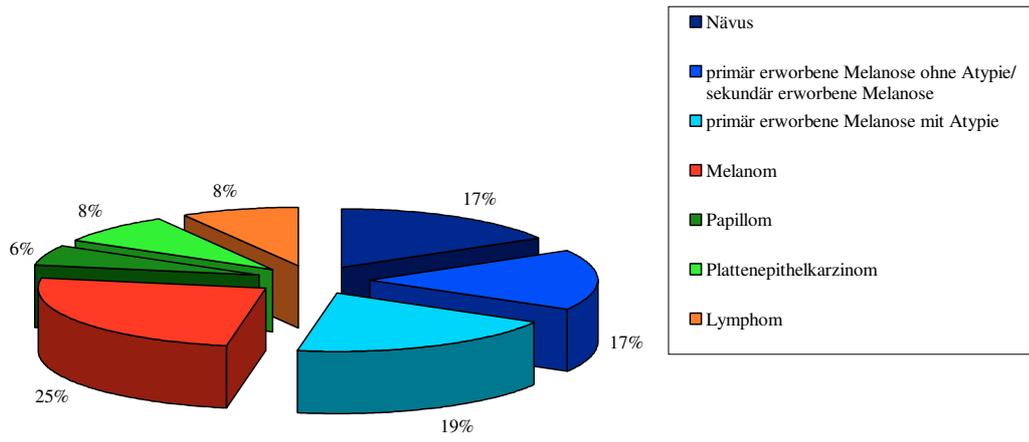


Abb. 9: Pigmentierte und nicht-pigmentierte Bindehauttumore.

Nummer	Geschlecht	Augen	Alter	akute/ chronische bakterielle Konjunktivitis	Papilläre Konjunktivitis (Kontaktlinsen assoziiert oder atopisch)	Follikuläre Konjunktivitis (bakteriell/ Chlamydien)	Vernarbende Konjunktivitis (Trachom/ Stevens-Johnson Syndrom/ schwere Atopie/ Lichen planus)	Granulom
1	m	1	64	1				
2	w	1	66	1				
3	w	1	35	1		1		
4	w	1	53	1		1		
5	w	1	60	1		1	1	
6	m	1	21		1			
7	m	2	27		2			
8	m	1	27		1			
9	m	1	37		1		1	
10	w	1	80		1		1	
11	m	1	27					
12	w	1	51		1			
13	m	2	50					2
14	m	1	55					1
15	m	1	68					1
16	m	1	30					1

Abb. 10: Tabelle der Patienten mit Konjunktivitis.

Nummer	Geschlecht	Augen	Alter	Diagnose
1	w	1	25	Normalproband
2	w	1	26	Normalproband
3	m	1	27	Normalproband
4	m	2	27	Normalproband
5	m	1	29	Normalproband
6	w	1	32	Normalproband
7	w	1	50	Normalproband
8	m	1	66	Normalproband
9	w	1	77	Normalproband
10	w	1	27	Normalproband
11	m	1	27	Normalproband
12	w	1	54	Normalproband
13	m	2	65	Normalproband
14	m	2	66	Normalproband
15	m	2	66	Normalproband

Abb. 11: Tabelle der Normalprobanden.

Nummer	Geschlecht	Augen	Alter	Pinguecula	Pterygium	Amyloidose
1	m	1	33	1		
2	w	1	54	1		
3	w	1	61	1		
4	m	1	62	1		
5	m	1	65	1		
6	m	1	72	1		
7	m	1	34		1	
8	w	1	39		1	
9	m	1	51		1	
10	w	1	57		1	
11	m	1	63		1	
12	m	1	64		1	
13	m	1	64		1	
14	m	1	67		1	
15	m	1	81		1	
16	m	1	65	1		
17	w	1	62	1		
18	w	1	81	1		
19	w	1	64			1

Abb. 12: Tabelle der Patienten mit degenerativen Bindehauterkrankungen.

Nummer	Geschlecht	Auge	Alter	Lymphom	Papillom	OSSN
1	w	1	45	1		
2	m	1	61	1		
3	w	1	93	1		
4	m	1	66		1	
5	m	1	33		1	
6	w	1	51			1
7	m	1	62			1
8	m	1	76			1

Abb. 13: Tabelle der Patienten mit nicht-pigmentierten Bindehauttumoren.

(Abkürzung: OSSN = ocular surface squamous neoplasia = Plattenepithel Neoplasie der Augenoberfläche)

Nummer	Geschlecht	Auge	Alter	Klinische Primärdiagnose	In-vivo konfokale Mikroskopie Diagnose	Histologische Diagnose
1	m	OD	35	PAM	Nävus	Nävus
2	w	OS	19	Nävus	Nävus	Nävus
3	w	OD	22	Nävus	Nävus	Nävus (Compound)
4	m	OD	18	Nävus	Nävus	Nävus
5	m	OD	32	Nävus	Nävus	Nävus
6	w	OD	54	Nävus	Nävus/ PAM mit Atypie	Nävus/ PAM mit Atypie (Compound)
7	w	OD	42	PAM	PAM/ SAM ohne Atypie	PAM/ SAM ohne Atypie
8	w	OS	49	PAM	PAM/ SAM ohne Atypie	PAM/ SAM ohne Atypie
9	m	OD	33	PAM	PAM ohne Atypie	PAM ohne Atypie
10	m	OD	24	PAM	PAM ohne Atypie	PAM ohne Atypie
11	m	OS	32	PAM	PAM/ SAM ohne Atypie	PAM/ SAM ohne Atypie
12	m	OD	30	PAM	PAM/ SAM ohne Atypie	PAM/ SAM ohne Atypie
13	w	OS	48	PAM	PAM mit Atypie	PAM mit Atypie
14	w	OS	67	PAM	PAM mit Atypie	PAM mit Atypie
15	m	OD	38	Nävus	PAM mit Atypie	PAM mit Atypie
16	m	OS	78	PAM	PAM mit Atypie	PAM mit Atypie
17	w	OD	80	PAM	PAM mit Atypie	PAM mit Atypie
18	m	OS	53	Nävus	PAM mit Atypie	PAM mit Atypie
19	m	OD	67	Nävus	PAM mit Atypie	PAM mit Atypie
20	m	OD	74	Melanom	Melanom	Melanom
21	w	OD	85	Melanom	Melanom	Melanom
22	w	OS	65	Melanom	Melanom	Melanom
23	w	OD	69	Melanom	Melanom	Melanom
24	w	OS	91	Melanom	Melanom	Melanom
25	m	OS	40	PAM	PAM mit Atypie	Melanom/ PAM mit Atypie
26	m	OD	77	Melanom	Melanom	Melanom
27	w	OS	75	Melanom	Melanom	Melanom
28	w	OD	80	Melanom	Melanom	Melanom

Abb. 14: Tabelle der Patienten mit pigmentierten Bindehauttumoren.

(Abkürzungen: PAM = primary acquired melanosis; SAM = secondary acquired melanosis; OD = rechtes Auge; OS = linkes Auge; m = männlich; w = weiblich; Alter in Jahren)

2. Klinische, in-vivo konfokale und histologische Untersuchungen

Alle Patienten wurden in der Ambulanz mit der Spaltlampe biomikroskopisch untersucht und eine klinische Verdachtsdiagnose gestellt. (vgl. Grundlagen)

Bei 82 Prozent der Patienten, wurden im nächsten Schritt klinische Photos zur Verlaufkontrolle erstellt.

Jetzt erst kam es zu der eigentlichen Untersuchung mit dem konfokalen Mikroskop. Die Patienten wurden über den Untersuchungsablauf ausführlich aufgeklärt.

Zur in-vivo konfokalen Kontakt-Mikroskopie benutzten wir den Heidelberg-Retina-Tomographen II in Kombination mit dem Rostock Cornea Modul der Firma Heidelberg Engineering. (vgl. Grundlagen)

Sobald die Augenoberfläche des Patienten mit einem Tropfen Lokalanästhetikum, unkonserviertes Oxybuprocainhydrochloride (z.B. Conjucaïn EDO, Dr.Mann Pharma), anästhesiert wurde, wurde über einen Gel-Tropfen, der vorher auf die Augenoberfläche appliziert wurde, Kontakt zwischen der Tomo-Cap und der Patientenoberfläche (Cornea oder Konjunktiva) hergestellt.

Für die Untersuchung der bulbären und tarsalen Bindehaut, sowie der konjunktivalen Läsionen, musste der Kopf des Patienten in der Kopf-Kinn-Stütze so positioniert werden, dass die zu untersuchende Stelle der Bindehaut im 90° Winkel senkrecht zur Tomo-Cap stand. Nur diese Positionierung erlaubte die von uns gewünschten rein konfokalen Bilder, auch wenn schräge Bildaufnahmen als Zusatzinformation wertvolle Querschnitte durch das Gewebe zeigten. Eine zusätzliche Fixationslampe am Gerät gestattete die Feinabstimmung der Augenposition und das Vermeiden von störenden Augenbewegungen. Zur Untersuchung der tarsalen Bindehaut wurde das Ober- oder Unterlid vorher ektropioniert. Zwischen 50 und 699 Bilder, mit einem Durchschnitt von 184 Bildern, wurden bei jeder Untersuchung aufgenommen und im Anschluss analysiert.

Zur Beurteilung der normalen Anatomie der Bindehaut wurden Scans von der superioren und/oder temporalen bulbären, sowie von der tarsalen Konjunktiva des Ober- und/oder Unterlids erstellt.

Um die Struktur der unterschiedlichen Epithelschichten genauer zu untersuchen, wurden die Fläche und der Durchmesser der einzelnen Epithelzellen in den einzelnen Schichten

des konjunktivalen Epithels untersucht. Hierzu bedienten wir uns einer unter <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html> im Internet frei erhältlichen Software „ImageJ“, einem Java Bildbearbeitungsprogramm (Autor: Wayne Rasband, The Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). Diese Analyse wurde bei einer Subgruppe von 3 Patienten mit normaler Bindehaut anhand von 21 Bildern durchgeführt.

Bei den konjunktivalen Entzündungen, degenerativen Erkrankungen und Tumoren wurden Aufnahmen von mehreren unterschiedlichen Bereichen der Läsion gemacht.

Im Verlauf wurden die Bilder verblindet analysiert, die Morphologie studiert und versucht, Strukturen pathomorphologisch zuzuordnen und mit histologischen Beobachtungen zu vergleichen.

Mit dem Vergleich von Normalbefunden und durch die Evaluierung von Kriterien, die sich aus der Histologie ergaben, wurden konfokal mikroskopische Diagnosen gefällt.

Bindehauttumore wurden, wenn klinisch indiziert, exzidiert und histologisch bzw. immunhistochemisch untersucht.

Die vorläufigen konfokal mikroskopischen Diagnosen wurden dann entweder mit der klinischen oder der histologischen Diagnose verglichen und im Sinne ihrer Validität überprüft.

Für die konfokal mikroskopischen Diagnosen von pigmentierten konjunktivalen Tumoren wurden folgende Kriterien aus der Histologie übernommen:

- Anwesenheit von hyperreflektiven Zellen, Granulae und hyperreflektiven Plaques im gesamten Epithel
- Hyperreflektive Zellen, Granulae und Plaques auf das basale Epithel beschränkt
- Nester oder diffuse Ansammlungen von mittelgroßen uniformen hyper- oder hyporeflektiven Zellen im Stroma
- Stromale epitheliale Pseudozysten
- Kleine hyperreflektive dendritische Zellen
- Große hyperreflektive dendritische Zellen
- Stromale Ansammlungen von großen hyper- oder hyporeflektiven Zellen mit einem prominenten Nucleus oder Nucleolus

- Kleine runde Zellinfiltrate
- Große durchblutete Gefäße

In Tumoren mit Nestern oder diffusen Ansammlungen von mittelgroßen uniformen Zellen im Stroma und stromalen Pseudozysten wurde die vermutete Diagnose eines *konjunktivalen Nävus* gestellt.

Läsionen mit hyperreflektiven Zellen im gesamten Epithel und großen dendritischen Zellen wurden als *PAM mit Atypie* diagnostiziert, während Läsionen mit hyperreflektiven Zellen beschränkt auf das basale Epithel und/oder kleinen dendritischen Zellen konfokal mikroskopisch als *PAM ohne Atypie* bezeichnet wurden.

In Anwesenheit von großen Zellen mit prominentem Nucleus oder Nucleolus wurde die vermutliche konfokal mikroskopische Diagnose eines *konjunktivalen Melanoms* gestellt.

Histologische Analysen derselben Läsion, die auch mit dem in-vivo konfokalen Mikroskop untersucht wurden, wurden von folgenden Läsionen durchgeführt: *vernarbende Konjunktivitis* (2 von 7), *konjunktivale Amyloidose* (1 von 1), *Pinguecula* (3 von 9), *Pterygium* (5 von 9), *konjunktivales Papillom* (2 von 2), *konjunktivales Plattenepithelkarzinom* (3 von 3), *konjunktivaler Nävus* (6 von 6), *primär erworbene Melanose ohne Atypie* oder *sekundär erworbene Melanose* (6 von 6), *primär erworbene Melanose mit Atypie* (7 von 7), *Melanom* (9 von 9) und *Lymphom* (3 von 3).

Histologisch wurden alle exzidierten Gewebestücke feingeweblich aufgearbeitet und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Periodic-Acid-Schiff (PAS) gefärbt.

Immunhistochemisch wurden alle pigmentierten Läsionen mit anti-humanen Antikörpern der Firma Dako gegen S-100 (melanozytäre Läsion), HMB-45 (melanozytäre Läsion), Melan-A (Melanozyten), CD-3 (T-Lymphozyten), CD68 (Makrophagen) und Ki-67 (Proliferationsmarker), mit der APAAP-Methode (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase) untersucht.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Microsoft Office Excel 2003 und SPSS Version 12 (Chicago, IL, USA).

Die pigmentierten Bindehauttumore wurden mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie und der Histologie bezüglich der Sensitivität, Spezifität, des positiven und negativen

Vorhersagewertes verglichen. Hierzu wurden folgende allgemein gültige Formeln verwendet:

Sensitivität (Richtig-Positiv-Rate) = $\frac{\text{Richtig positiv}}{\text{Richtig positiv} + \text{Falsch negativ}}$

Spezifität (Richtig-Negativ-Rate) = $\frac{\text{Richtig negativ}}{\text{Richtig negativ} + \text{Falsch positiv}}$

Positiver Vorhersagewert = $\frac{\text{Richtig positiv}}{\text{Richtig positiv} + \text{Falsch positiv}}$

Negativer Vorhersagewert = $\frac{\text{Richtig negativ}}{\text{Richtig negativ} + \text{Falsch negativ}}$

IV. Ergebnisse

1. Die Anatomie der Konjunktiva

1.1. Normale bulbäre Konjunktiva

Die Anatomie der normalen bulbären Bindhaut konnte mit dem konfokalen Mikroskop schichtweise untersucht und beschrieben werden. Im Gegensatz zur transparenten Hornhaut, wo Scantiefen bis zu 800µm möglich sind, konnte aufgrund der hohen Gewebedichte der nicht transparenten Bindehaut hier nur eine Visualisierung bis ca. 200µm Tiefe erreicht werden.

Der Systematik halber wurden diese Schichten immer von außen, also der absoluten Oberfläche, nach innen, in die Tiefe gehend, beschrieben.

Ganz oberflächlich, der Konjunktiva aufliegend, konnte die *Tränenfilmschicht* beobachtet werden. Sie bestand aus einer hyporeflektiven Schicht mit hyperreflektivem Debris und großen, teils zerrissenen bzw. zerfallenen, abgeschilferten Epithelzellen.

Bei Patienten mit Blepharitis konnten zusätzlich isomorphe Rundzellen im Tränenfilm gefunden werden.

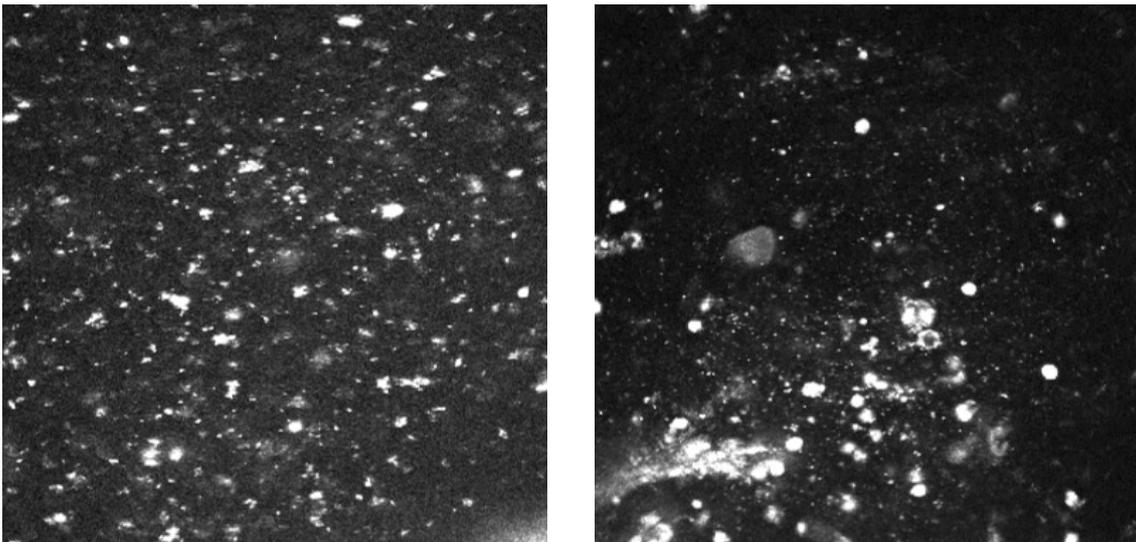


Abb. 15: In-vivo konfokale Mikroskopie des Tränenfilms. Hyperreflektiver Debris, abgeschilferte Epithelzellen und hyperreflektive Rundzellen.

Im Anschluss konnte die *konjunktivale Oberfläche* mit ihren vielen kleinen Falten, die als hyporeflektive Streifen zwischen dem konjunktivalen Oberflächenepithel imponierten, dargestellt werden.

Selten zeigten sich *Mikrozysten* mit einer hyperreflektiven Zystenwand im Bindehautepithel, die teils hyperreflektiven Debris beinhalteten.

Das Epithel der Konjunktiva konnte entsprechend der bekannten Anatomie in oberflächliche, mittlere und basale Zellen eingeteilt werden.

Oberflächliche Epithelzellen stellten sich in drei verschiedenen Formen dar. Entweder als große und hyperreflektiv erscheinende abschilfernde Zellen, als mittelgroße Zellen mit einem hyperreflektivem Nucleus, oder als kleine und hyporeflektive Zellen mit einem winzigen oval geformten pyknotischen Nucleus.

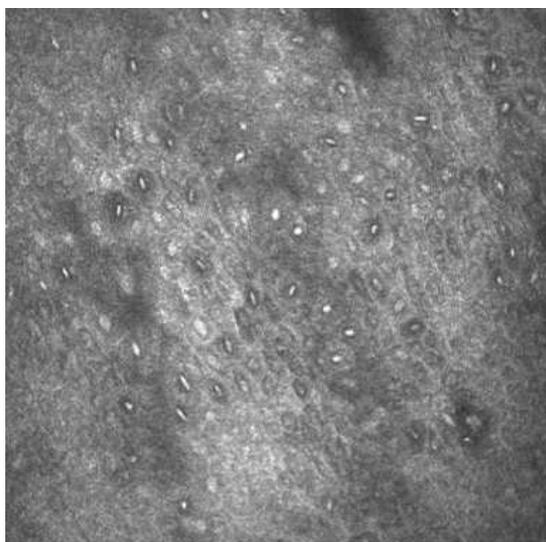
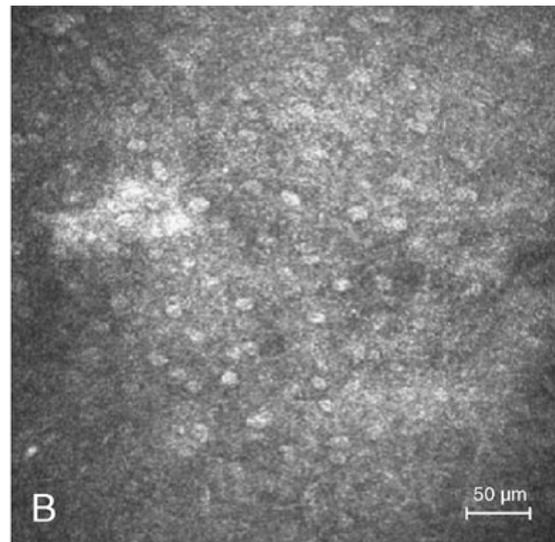
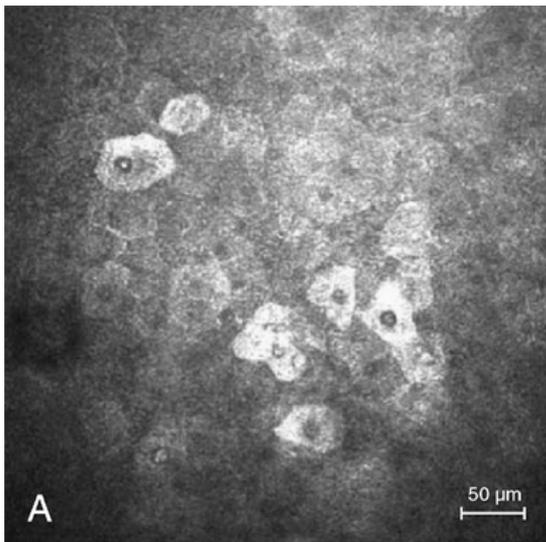


Abb. 16: In-vivo konfokale Mikroskopie der normalen bulbären Konjunktiva. Oberflächliche Epithelzellen.

- a) große, hyperreflektive abschilfernde Zellen.
- b) mittelgroße Zellen mit hyperreflektivem Nucleus.
- c) kleine, hyporeflektive Zellen mit pyknotischem Nucleus.

Bis zu acht Schichten *mittlerer Epithelzellen* (Flügelzellen) folgten dieser Oberflächenschicht mit variablen, polygonalen Formen, hyperreflektiven Zellrändern und einem kaum sichtbaren hyperreflektiven Nucleus.

Die *basalen Epithelzellen* dagegen grenzten sich als hyperreflektive Zellränder ohne sichtbaren Nucleus ab.

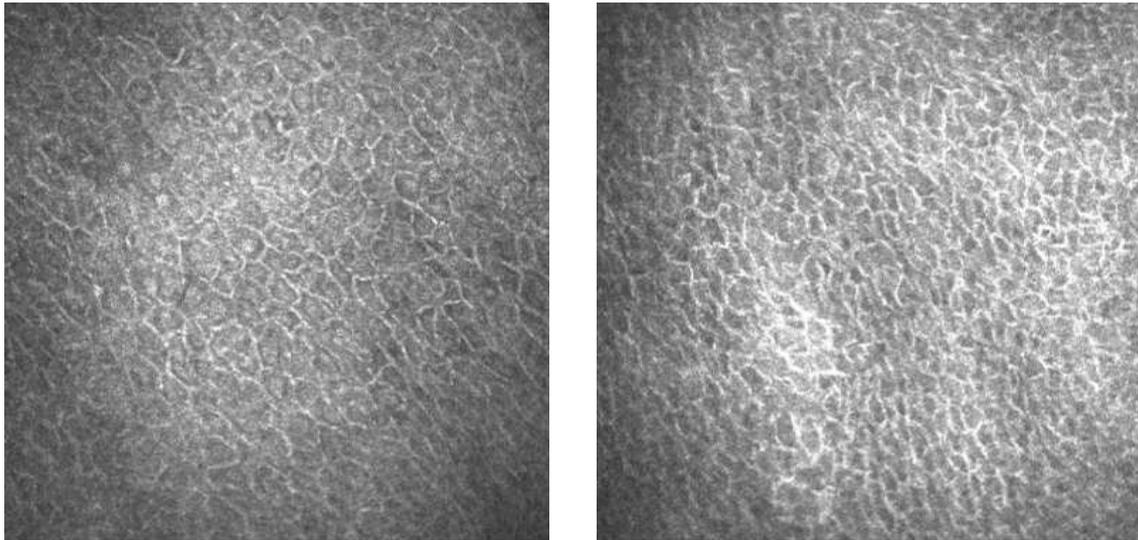


Abb. 17: In-vivo konfokale Mikroskopie der normalen bulbären Konjunktiva.

a) Flügelzellen

b) basale Epithelzellen.

Um die Epithelschichten genauer beurteilen zu können, wurden die einzelnen Zellen hinsichtlich ihrer *Zellfläche* und ihrem *Zelldurchmesser* weiter untersucht. Hierzu bedienen wir uns der in Material und Methoden erwähnten Grafik-Software „Image-J“. Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

Die durchschnittliche Fläche der oberflächlichen großen abschilfernden Epithelzellen betrug $1809,9 \mu\text{m}^2$, der durchschnittliche Zelldurchmesser $62,3 \mu\text{m}$.

Nichtabschilfernde Oberflächenzellen, Zellen der mittleren Epithelschicht und die Basalzellen zeigten dagegen wesentlich kleinere Durchmesser mit einer Durchschnittsfläche von $212,4 \mu\text{m}^2$, $228,0 \mu\text{m}^2$ und $220\mu\text{m}^2$ und einem mittleren Durchmesser der einzelnen Zellen von $21,3 \mu\text{m}$, $22,0 \mu\text{m}$ und $23,1 \mu\text{m}$.

Während die abschilfernden Oberflächenzellen einen fast drei Mal so großen Zelldurchmesser aufwiesen, lagen die nichtabschilfernden oberflächlichen, die mittleren

und die basalen Epithelzellen bezüglich Fläche und Durchmesser in derselben Größenordnung.

Die *Epitheldicke* wurde anhand von 13 gesunden Probanden untersucht und variierte zwischen 20 und 46 μm (\varnothing 32 μm \pm 9,6 μm).

<u>Proband</u>	<u>Volume</u>	<u>Schicht</u>	<u>Fläche</u> (Mittelwert pro Bild)	<u>Fläche</u> (Mittelwert pro Proband)	<u>Durchmesser</u> (Mittelwert pro Bild)	<u>Durchmesser</u> (Mittelwert pro Proband)
1	Volume 1	Superfiziell	159,614	169,949	19,337	19,49175
			156,087		19,01	
		Intermediär	180,284	218,9492	19,75	22,0606
			237,467		22,706	
			218,553		22,61	
		Basal	201,389	210,6665	21,913	22,9195
	Volume 0	Superfiziell	155,219		18,709	
			208,876		20,911	
		Intermediär	243,815		23,84	
			214,627		21,397	
		Basal	219,944		23,926	
2		Desquamierend	2286,241	2286,241	74,901	74,901
3	Volume 0	Superfiziell	253,418	254,937	23,321	23,0595
			256,456		22,798	
		Intermediär	250,434	237,0875	22,784	21,9435
			223,741		21,103	
		Basal	229,275	229,275	23,274	23,274
	Volume 18	Desquamierend	1250,09	1333,5955	49,306	49,683
	Volume 76	Desquamierend	1417,101		50,06	
GESAMT		Superfiziell		212,443		21,275625
		Intermediär		228,01835		22,00205
		Basal		219,97075		23,09675
		Desquamierend		1809,91825		62,292

Abb. 18: Fläche (μm^2) und Durchmesser (μm) der desquamierenden, superfiziellen, intermediären und basalen Epithelzellen.

Im gesamten Bindehautepithel verteilt waren große bis riesige Zellen zu sehen. Diese hyporeflektiven, runden bis oval geformte Zellen mit einem an den peripheren Zellrand gedrängten Nucleus, oder einer Zentralpore, erschienen im Gewebe einzeln, aber manchmal auch im Zellverband. Hier handelt es sich wahrscheinlich um *Becherzellen*.

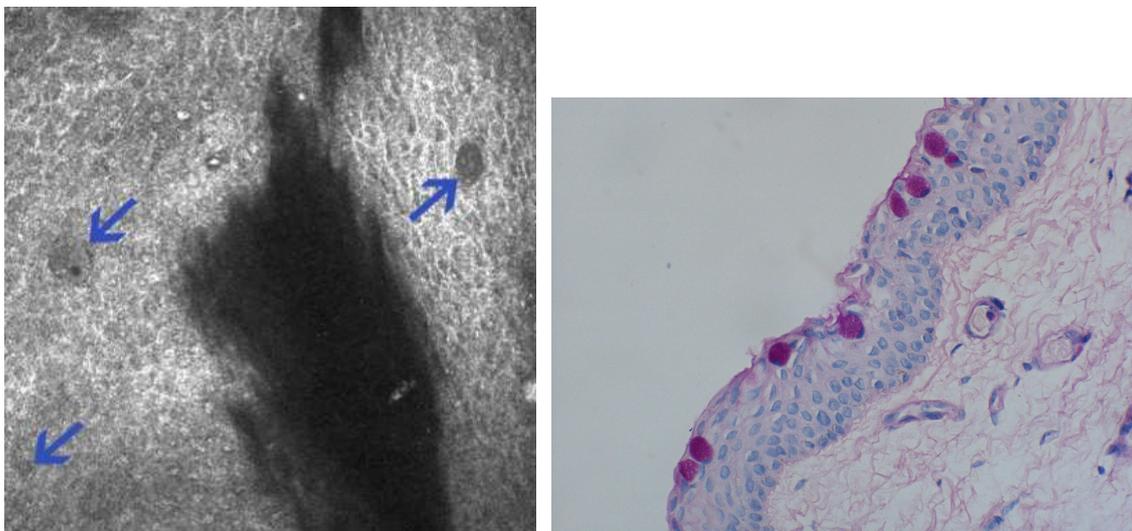


Abb. 19: Becherzellen.

- a) In-vivo konfokale Mikroskopie der normalen bulbären Konjunktiva. Epithel mit vermutlichen Becherzellen.
- b) Histologische Darstellung von Becherzellen, PAS positiv, 40x Vergrößerung.

Regelmäßig konnten in der Basalzellschicht hyperreflektive verzweigte Zellen gesehen werden, die wohl den *dendritischen Zellen* entsprechen. Die Morphologie aus der Immunhistochemie ähnelt diesen Zellen aus der konfokalen in-vivo Mikroskopie sehr (Vergleiche Abbildung 20 und 21).

Subepithelial ließ sich typischerweise ein prominentes hyperreflektives Band mit einer Dicke von 30 bis 85µm darstellen. Die Bandbreite zeigte sich hierbei unabhängig vom Alter der Patienten. Diese, mit der *Basalmembran* vereinbare, Struktur wurde von vielen Fasern inseriert.

Direkt unter der angenommenen Basalmembran zeigten sich viele gut durchblutete *Blutgefäße*. Im Video-Modus war es möglich den Blutstrom in diesen Gefäßen live zu beobachten und sogar eine Migration von Zellen, vermutlich Immunzellen, durch die Gefäßwand hindurch aufzunehmen. Der Fluss der mutmaßlichen Erythrozyten in den

Gefäßen, sowie ein „Rolling“, eine „Adhäsion“ und eine „Transmigration“ wahrscheinlich von Leukozyten konnte somit beobachtet werden.

Das konjunktivale *Stroma* bestand aus einem diffusen Netzwerk aus irregulär angeordneten feinen Fasern. Diese Faserschicht durchsetzten Blutgefäße mit oft enger Verbindung zu zystischen Hohlräumen und einzelnen hyperreflektiven Entzündungszellen.

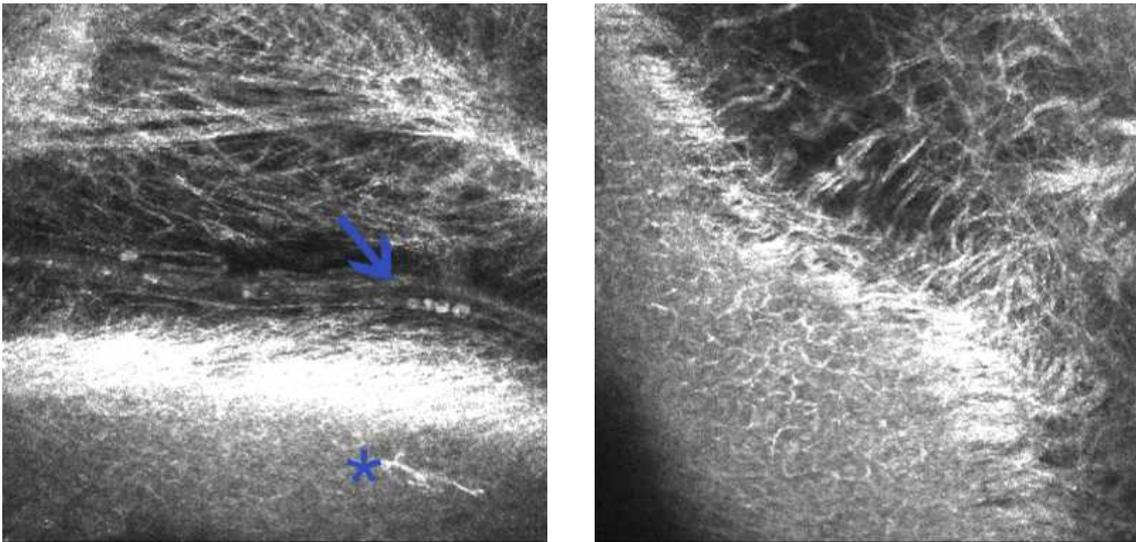


Abb. 20: In-vivo konfokale Mikroskopie der normalen bulbären Konjunktiva.

a) Querschnitt. Dendritische Zellen in der basalen Epithelschicht (*). Hyperreflektive Struktur subepithelial, vereinbar mit der Basalmembran Zone. Fasern des konjunktivalen Stromas mit Blutgefäß, Leukozyten (hyperreflektiv) und Erythrozyten (hyporefektiv) (→).

b) Querschnitt. Konjunktivales Epithel mit darunter liegendem Stroma.

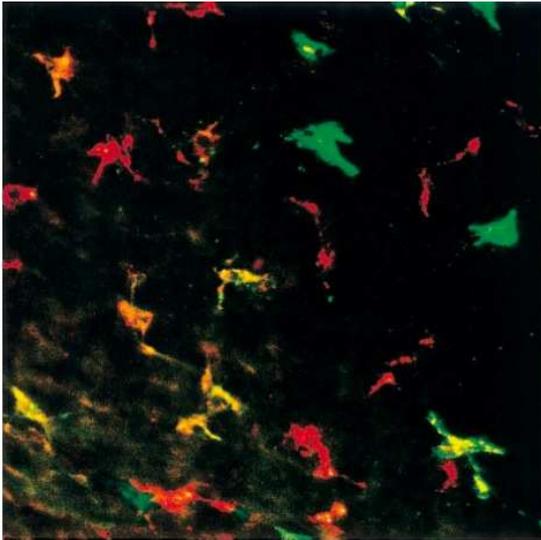


Abb. 21: Immunhistochemische Darstellung von dendritischen Zellen (Langerhanszellen) der humanen Cornea. Doppelfärbung: HLA-DR (grün) für „reife dendritische Zellen“, Langerin (rot) für „unreife Langerhanszellen“, Mischfarbe (gelb) für „reife Langerhanszellen“. 400x Vergrößerung.

Die anatomisch folgende *Episklera* und *Sklera* lagen zu tief, um sie mit dem konfokalen Mikroskop darstellen zu können. Es zeigte sich in dieser Tiefe nur noch ein diffuses Rauschen.

1.2. Limbus corneae

Am Übergang der bulbären Bindehaut zur peripheren Hornhaut befindet sich der sogenannte Limbus corneae. Hier konnten wir die so genannten *Vogt'schen Palisaden* darstellen. Sie sind strahlenförmig zur Hornhaut angeordnet und weisen fingerförmige Einstülpungen des Epithels und Stromas auf. Besonders gut konnten die Palisaden bei dunkel pigmentierten Patienten dargestellt werden, da eine vermehrte Anzahl an kleinen pigmentierten Granulae im Bereich der basalen Epithelzellen bei diesen zu sehen waren. Dadurch grenzten sich die einzelnen Palisaden besonders stark voneinander ab. Zarte dendritische Zellen konnten ebenfalls im Bereich der basalen Epithelzellen gesehen werden. Zwischen den einzelnen Palisaden konnte ein Gefäßsystem aus Arkaden von Blutgefäßen und vermutlichen Lymphgefäßen beobachtet werden.



Abb. 22: Klinisches Bild des inferioren Limbus bei einer dunkelhäutigen Person.

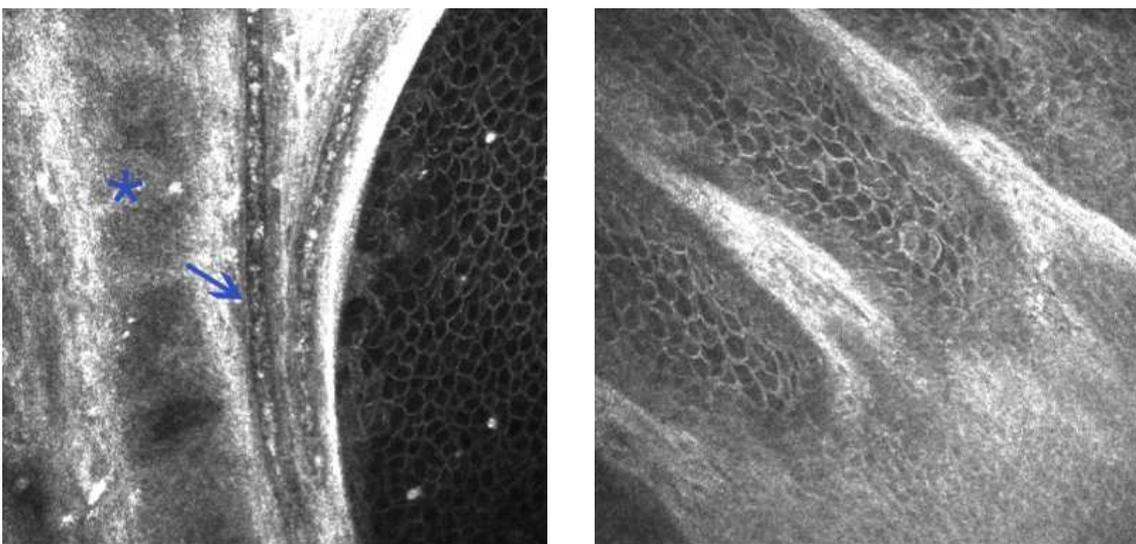


Abb. 23: In-vivo konfokale Mikroskopie des normalen Limbus corneae.

a) Limbus mit Blutgefäßen (→) und vermutlich Lymphbahnen (*). b) Vogt'sche Palisaden.

1.3. Normale tarsale Konjunktiva und subkonjunktivale Strukturen

Die normale tarsale Bindehaut stellte sich als eine zwei- bis dreilagige Epithelschicht bestehend aus kubischen Epithelzellen relativ dünn dar. Es zeigte sich eine mäßig starke Infiltration des Epithels mit Entzündungszellen. Diese vermutlichen Lymphozyten hatten einen runden hyperreflektiven Nucleus.

Des Weiteren konnten wir regelmäßig intraepithelial abgekapselte Mikrozysten mit hyperreflektiven runden Zellinfiltraten beobachten.

Das darunter folgende Stroma war bereits bei Normalpersonen stark von runden hochreflektiven Zellen durchsetzt.

Häufig zeigten sich subepithelial winzige Mikrozysten mit oft beinhaltenden Entzündungszellen.

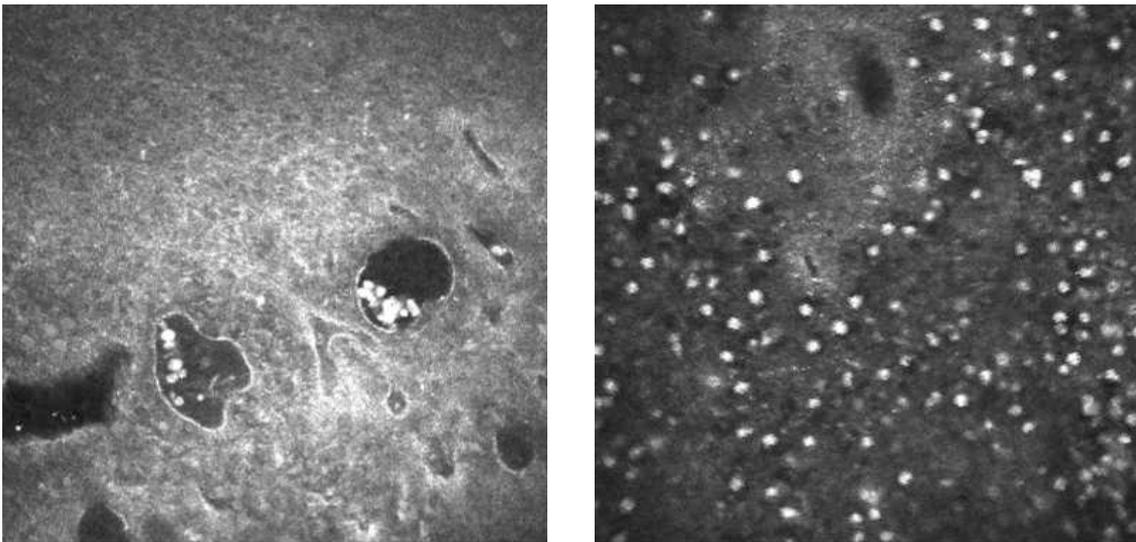


Abb. 24: In-vivo konfokale Mikroskopie der normalen tarsalen Konjunktiva.

- a) Abgekapselte epitheliale Mikrozysten mit runden, hyperreflektiven Zellen.
- b) Subepitheliales Rundzellinfiltrat.

Ab einer Tiefe von 30 μ m im oberen Tarsus und eine Tiefe von ca. 80 μ m im unteren Tarsus erschienen drüsenartige Strukturen, die sich besonders gut in leicht schrägen Aufnahmen zu erkennen waren. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um die *Meibom'schen Drüsen*, spezialisierte Talgdrüsen.

Haarfollikel ließen sich in einer Tiefe von ca. 150 bis 200 μ m darstellen.

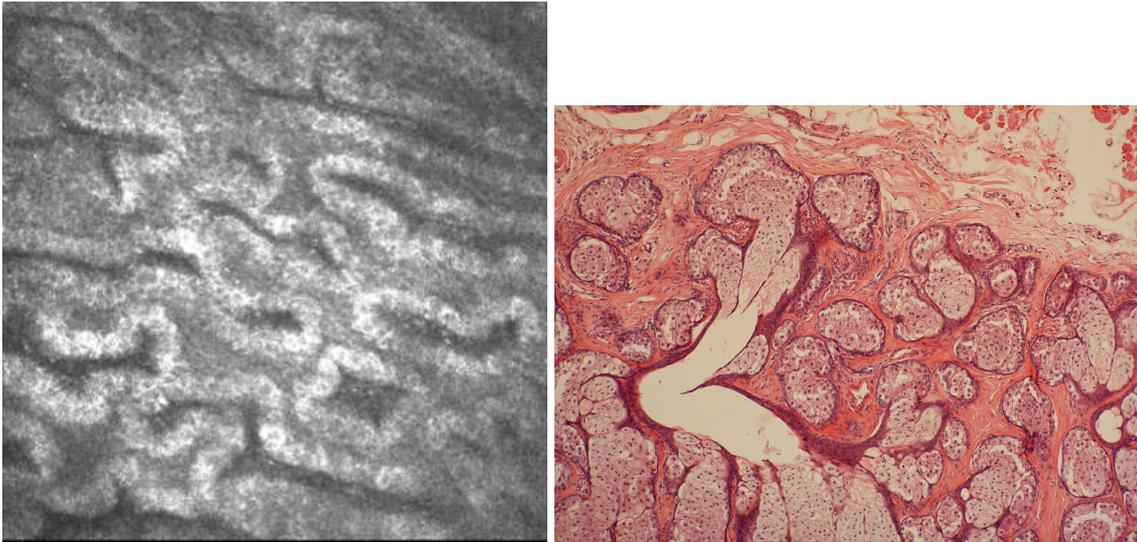


Abb. 25: Tarsale Konjunktiva. Meibomsche Drüsen.

- a) In-vivo konfokale Mikroskopie. Tarsale drüsenartige Strukturen, vereinbar mit Meibomschen Drüsen.
- b) Histologie: Meibomsche Drüsen, HE Färbung.

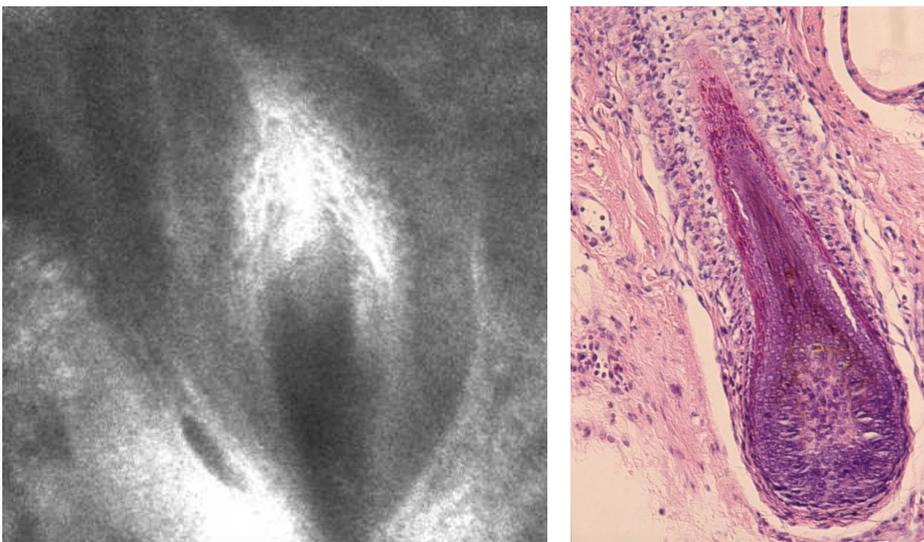


Abb. 26: Haarfollikel.

- a) In-vivo konfokale Mikroskopie des Tarsus mit Haarfollikel.
- b) Histologisches Bild.

2. Bindehautentzündungen

2.1. Konjunktivitis

Eine geringgradige Infiltration durch Entzündungszellen konnten wir bereits in klinisch nicht entzündeter Bindehaut mit dem konfokalen Mikroskop feststellen. Bei einer Konjunktivitis jedoch zeigte sich eine signifikante Zunahme der entzündlichen Infiltrate im Bindehautepithel und -stroma.

Bei der *akuten Konjunktivitis* fand sich konfokal mikroskopisch im Bereich der bulbären Bindehaut eine gemischte zelluläre Infiltration. Diese bestand aus vielen Zellen mit runden, hyperreflektiven Zellkernen, wahrscheinlich Lymphozyten, und Zellen mit multilobulären Nuclei, vereinbar mit neutrophilen Granulozyten.

Das typische Bild einer *chronischen Entzündung* dagegen bestand hauptsächlich aus epithelialen und stromalen Infiltraten mit Rundzellen und großen Zellen mit hyperreflektivem Kern und einem hyporeflektiven perinucleären Halo. Diese Zellen weisen eine gewisse Ähnlichkeit mit Plasmazellen auf.

Das stromale Kollagenetzwerk erschien bei der Konjunktivitis eher plump und enthielt hyperreflektive Ablagerungen, fraglich Zelldebris. Große dendritische Zellen konnten vereinzelt zwischen den entzündlichen Infiltraten entdeckt werden.

Die oben schon erwähnte Transmigration von kleinen hyperreflektiven runden Zellen, welche vermutlich Leukozyten darstellen, durch die Blutgefäße in das entzündliche Stroma konnte bei der Konjunktivitis besonders gut bzw. oft im Video-Modus aufgenommen werden.



Abb. 27: Klinisches Bild einer chronischen Konjunktivitis.

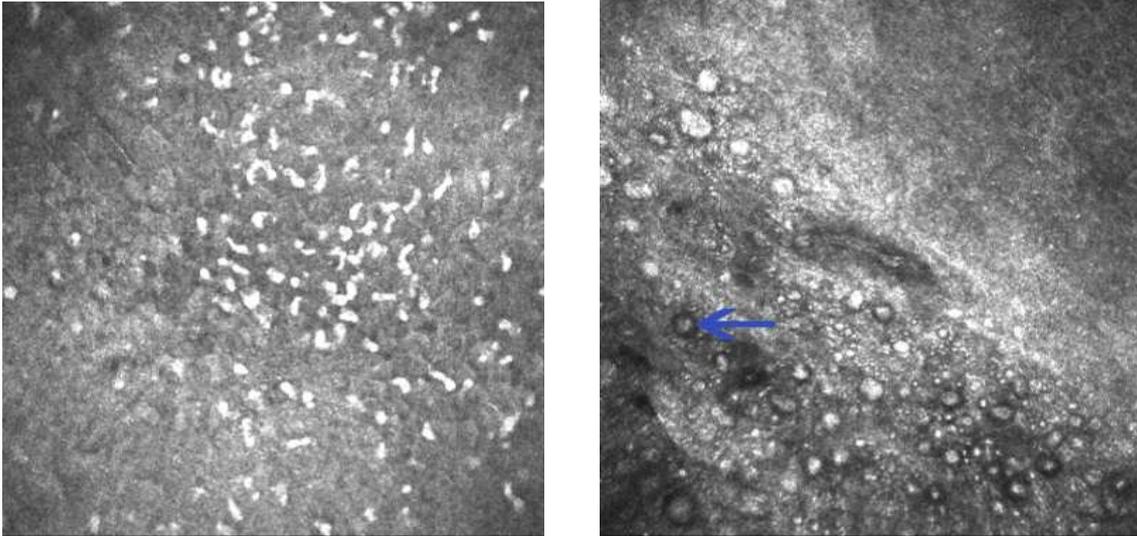


Abb. 28: In-vivo konfokale Mikroskopie bei Konjunktivitis.

- a) Akute Konjunktivitis. Gemischtes Zellinfiltrat bestehend aus runden Zellen und Zellen mit einem multilobulären Nucleus, vermutlich neutrophile Granulozyten.
- b) Chronische Konjunktivitis. Subepitheliale Infiltrate aus runden Zellen und Zellen mit einem hyporeflektiven perinucleären Halo, vermutlich Plasmazellen (→).

Kontaktlinsenträger ohne eine klinisch sichtbare gigantopapilläre Konjunktivitis und Patienten mit einer *atopischen Keratokonjunktivitis* zeigten in der Untersuchung mit dem konfokalen Mikroskop an der tarsalen Bindehaut typische *Papillen*. Diese polygonalen aneinandergereihten Vorwölbungen bestanden aus einem fibrotischem hyperreflektivem Zentrum mit umgebenden Entzündungszellen und einem zentralen Gefäß.

Zur Abgrenzung hierzu konnten wir bei den *follikulären Konjunktivitiden* Knötchen aus hyporeflektiven kleinen runden Zellen ausmachen. Das hyporeflektive Zentrum war von einer hyperreflektiven Kapsel mit umgebenden Gefäßen umschlossen.



Abb. 29: Klinisches Bild der subtarsalen Konjunktiva.

- a) Papillen bei einem Kontaktlinsenträger.
- b) Follikel am tarsalen Unterlid.

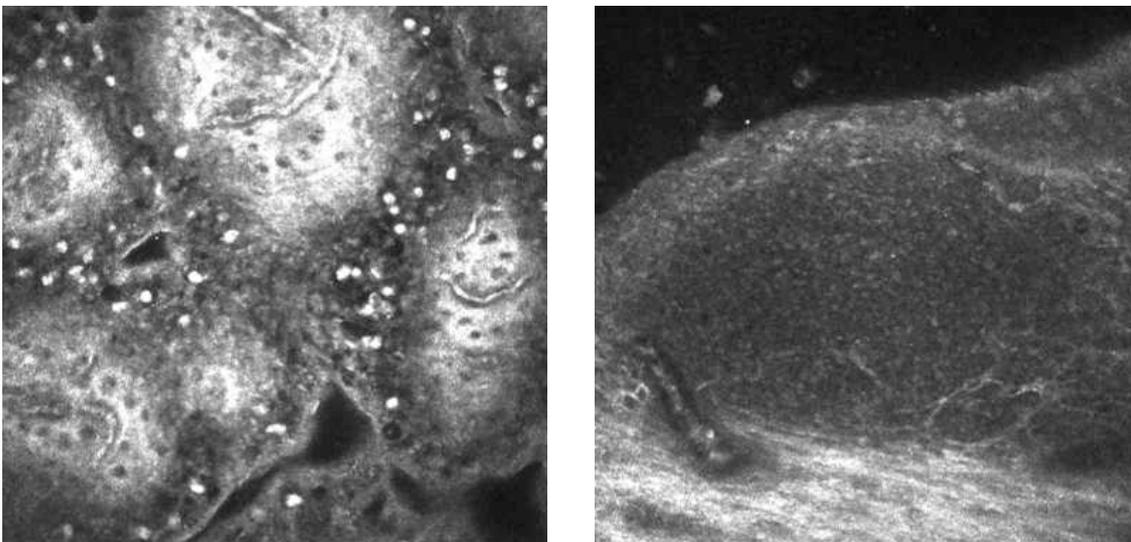


Abb. 30: In-vivo konfokale Mikroskopie bei Konjunktivitis.

- a) Papilläre Konjunktivitis. Tarsale Bindehaut mit polygonalen Vorwölbungen, fibrotischem Zentrum, zentralem Gefäß und umgebenden Entzündungszellen.
- b) Follikuläre Konjunktivitis. Schrägschnitt. Tarsale Bindehaut mit Knötchen, umgeben von Gefäßen und einer hyperreflektiven Kapsel.

Formen der chronische Bindehautentzündung verursacht durch ein Trachom, Stevens-Johnsons Syndrom, konjunktivalen Lichen planus und schwere Formen der atopischen Keratokonjunktivitis stellten sich uns in der konfokalen Mikroskopie als eine *vernarbende Konjunktivitis* dar. Es zeigte sich subepithelial ein hyperreflektives diffuses Fibrosenetzwerk.

Das Zellbild bei aktiver Entzündung bestand neben der gerade erwähnten Fibrose aus einer Infiltration von monomorphen, hyperreflektiven runden Zellen. Die atopische Keratokonjunktivitis dahingegen wies in der konfokalen Mikroskopie tarsale Papillen zusätzlich zur subepithelialen Vernarbung auf.

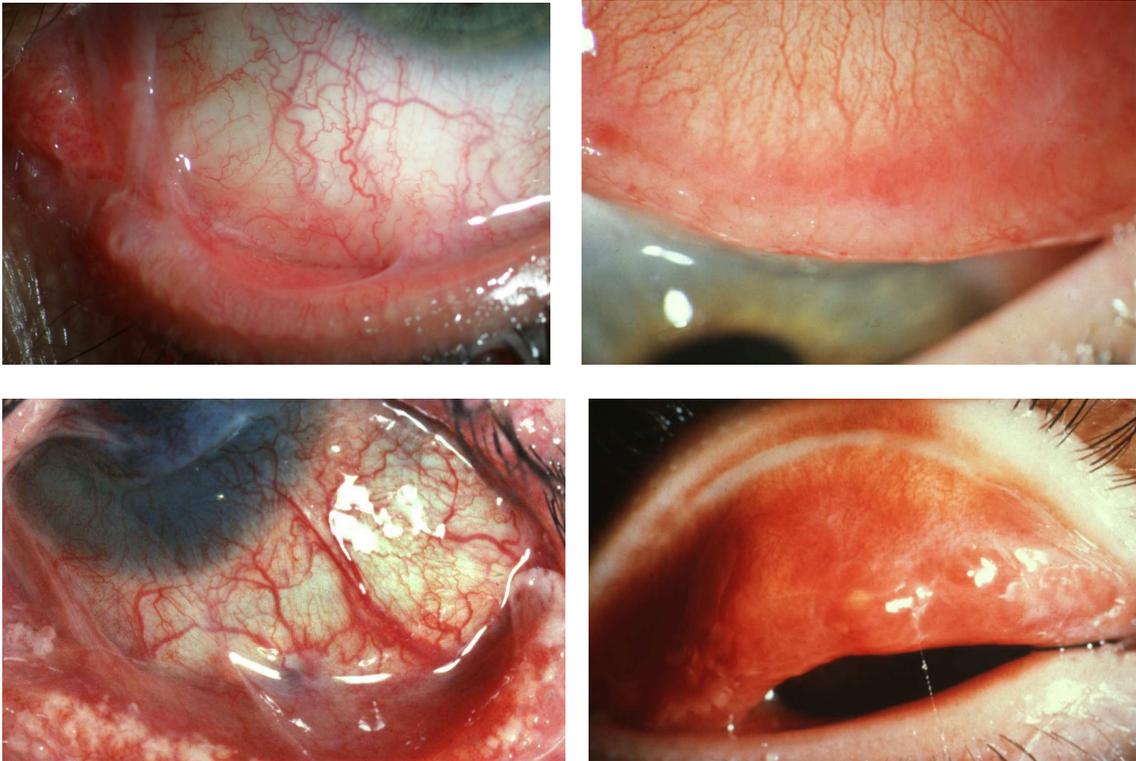


Abb. 31: Klinische Bilder vernarbender Konjunktivitiden.

- a) Lichen planus mit Symblepharonbildung am Unterlid.
- b) Lichen planus mit subtarsaler Vernarbung.
- c) Stevens Johnson Syndrom mit ausgeprägter Symblepharonbildung und Hornhautvaskularisation.
- d) Trachom mit subtarsaler Vernarbung.

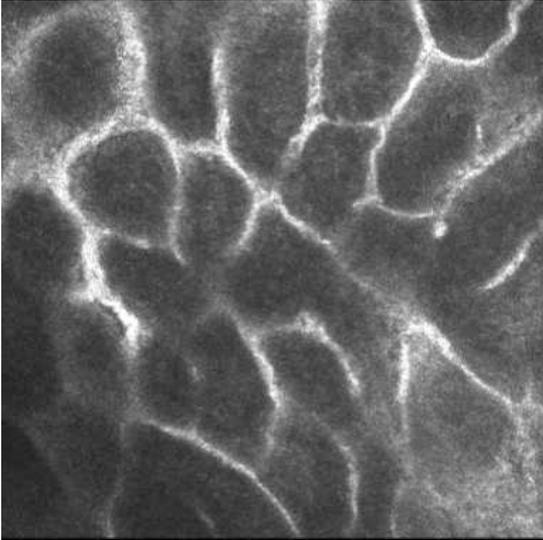


Abb. 32: In-vivo konfokale Mikroskopie bei vernarbender Konjunktivitis (Lichen planus) mit subepitheliale hyperreflektivem Fibrosenetzwerk.

2.2. Konjunktivales Granulom

Wir untersuchten mit dem in-vivo konfokalen Mikroskop ein konjunktivales Granulom. Überraschenderweise stellten sich nur relativ wenige Entzündungszellen und eine mäßige Vaskularisierung des Granuloms dar. Einge kapselt in ein hyperreflektives fibrotisches Gewebe zeigte sich eine wurmförmige Struktur. In früheren in-vitro Experimenten untersuchten wir unterschiedliche chirurgische Fadenmaterialien mit dem konfokalen Mikroskop. Die wurmförmige Struktur in dem von uns untersuchten Granulom zeigte dabei dasselbe Bild, wie die vorher untersuchte Struktur eines Vicryl Fadens. Nach Entfernung des Granuloms berichtete der Chirurg über ein zerbrechliches Gewebestück, welches tatsächlich einen Vicryl Faden ummantelte. Leider wurde kein Material zur histologischen Untersuchung eingesandt.

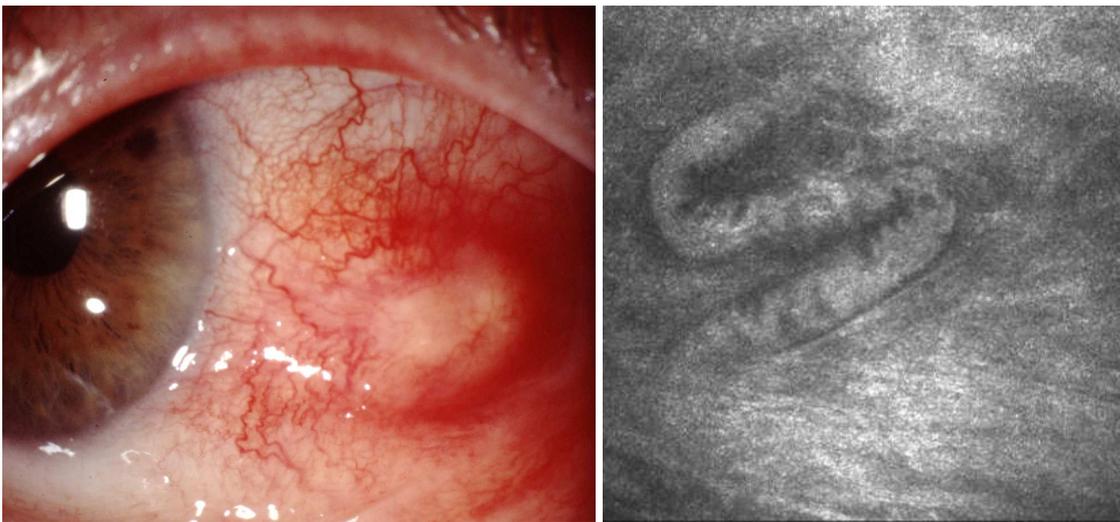


Abb. 33: Konjunktivales Granulom.

- a) Klinisches Bild eines Bindehautgranuloms.
- b) In-vivo konfokale Mikroskopie eines konjunktivalen Fremdkörpergranuloms mit Verdacht auf ein Vicryl-Fadenmaterial.

3. Blepharitis / Meibomitis

Die im Kapitel „subkonjunktivale Strukturen“ beschriebenen Meibom'schen Drüsen waren bei Patienten mit einer Blepharitis bzw. Meibomitis deutlich verändert. Es zeigten sich schwer deformierte Lumina dieser tarsal gelegenen Drüsen und eine Obstruktion der Drüsenlumina mit hyperreflektivem Material. Auch das umgebende Stroma zeigte sich entzündlich verändert.

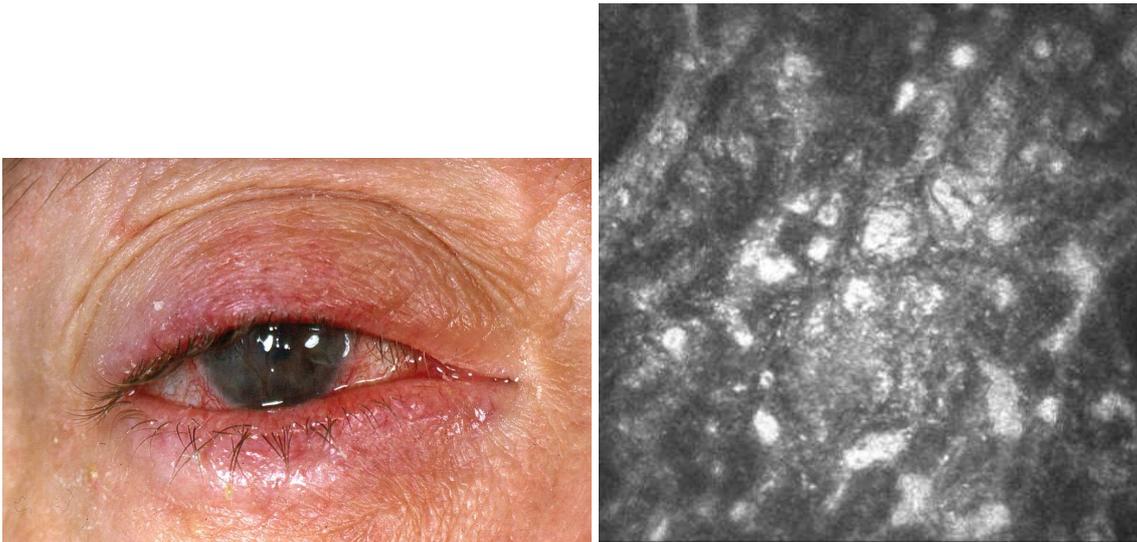


Abb. 34: Meibomitis.

a) Klinisches Bild einer Meibomitis bei Rosazea.

b) In-vivo konfokale Mikroskopie der tarsalen Konjunktiva bei Meibomitis. Der Tarsus zeigt deformierte drüsenartige Strukturen mit obstruierten Lumina.

4. Degenerationen der Konjunktiva

4.1. Pinguecula und Pterygium

Bei der Untersuchung der Pingueculae und Pterygien mit dem konfokalen in-vivo Mikroskop zeigte sich meistens ein *verdünntes Bindehautepithel* mit epithelialen *Mikrozysten*, vielen *pyknotischen Epithelzellen* und hyperreflektiven *abschilfernden Zellen*. Oft waren im Epithel auch große hyporeflektive Zellen mit einem hyporeflektiven *perizentralen Nucleus* - wahrscheinlich Becherzellen - auszumachen. Bei sieben Patienten war das Epithel infiltriert von kleinen *hyperreflektiven runden Zellen*. Bei einem afroamerikanischen Patienten mit pigmentiertem Pterygium stellten sich sehr kleine *hyperreflektive Granulae* in der basalen Epithelschicht des Pterygiums dar.

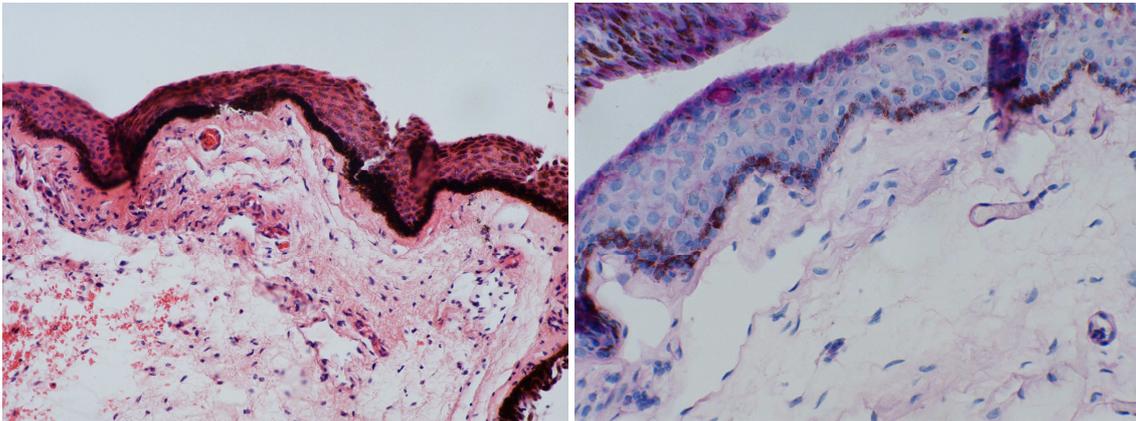


Abb. 35: Pigmentiertes Pterygium.

a) Histologie: HE-Färbung.

b) Histologie: PAS-Färbung.

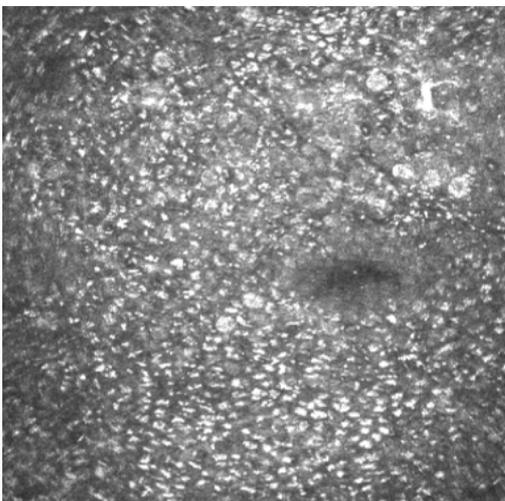


Abb. 36: In-vivo konfokale Mikroskopie eines pigmentierten Pterygiums. Hyperreflektive Granulae in der basalen Epithelschicht.

Das konjunktivale Stroma der Pterygien war *stark vaskularisiert* und wies *kaum Entzündungszellen* auf. Die Gefäße nahmen fast alle eine *gestreckte Konfiguration* ein. Sowohl bei den Pterygien, als auch bei den Pingueculae erschienen die stromalen *Kollagenfasern verdickter und hyperreflektiver* als in der normalen Bindehaut.

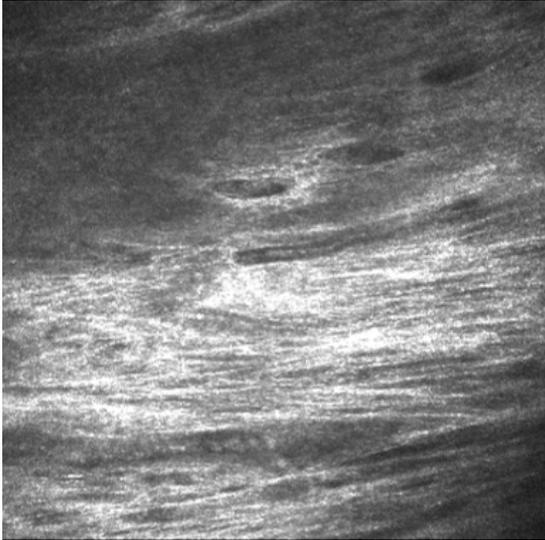


Abb. 37: In-vivo konfokale Mikroskopie eines Pterygiums. Hyperreflektive verdickte kollagene Fasern und gestreckte Gefäße bzw. Gefäßanschnitte.

Bei zwei Pterygien und fünf Pingueculae konnte im Stroma eine *amorphe hyperreflektive Masse* gefunden werden.

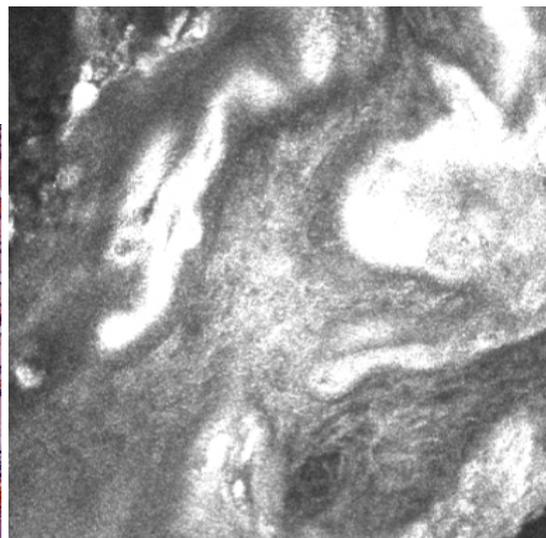
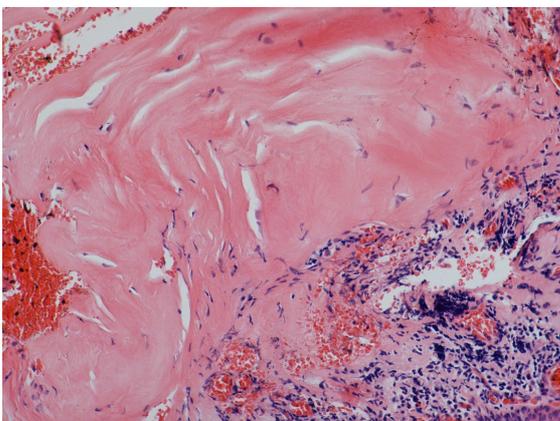


Abb. 38: Pterygium mit amorphem Material.

a) Histologie: HE-Färbung.

b) In-vivo konfokale Mikroskopie: Hyperreflektive amorphe Masse.

Intraepithelial und subepithelial gelegenes, gut abgegrenztes, *hyperreflektives Material* bei zwei Pingueculae ähnelte *Calcium-Ablagerungen*.



Abb. 39: In-vivo konfokale Mikroskopie einer Pinguecula. Hyperreflektive Ablagerung, vermutlich Calcium-Ablagerungen.

Auch *zystische Veränderungen* im Stroma von zwei Pterygien und zwei Pingueculae konnten beobachtet werden.

Histologisch zeigte sich bei den Pterygien und Pingueculae ein nicht-verhornendes mehrschichtiges Plattenepithel. Das Epithel enthielt unterschiedlich große Mengen an Becherzellen. Bei dem oben genannten Patienten, der in der in-vivo konfokalen Mikroskopie kleine hyperreflektive Granulae in der basalen Epithelschicht aufwies, konnten wir histologisch eine vermehrte Pigmentierung der basalen Epithelzellen entsprechend einer mit der Hautfarbe assoziierten sekundär erworbenen Melanose feststellen. Das Bindegewebe von Pterygien und Pingueculae beinhaltete typischer Weise elastotische Degenerationen mit Anhäufungen von amorphem, eosinophilem, hyalinem oder granulär erscheinendem Material.

Diese histologischen Befunde korrelierten sehr gut mit den oben genannten Beobachtungen in der in-vivo konfokalen Mikroskopie.

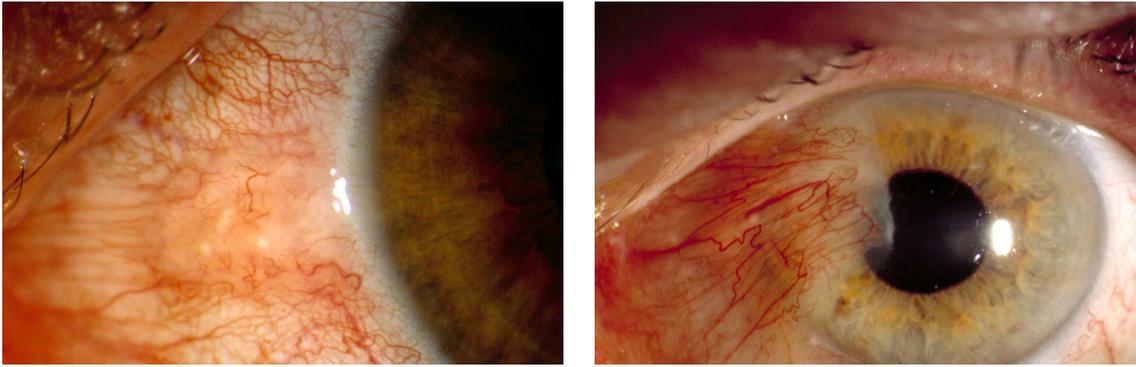


Abb. 40: Klinisches Bild einer Pinguecula (links) und eines Pterygiums (rechts).

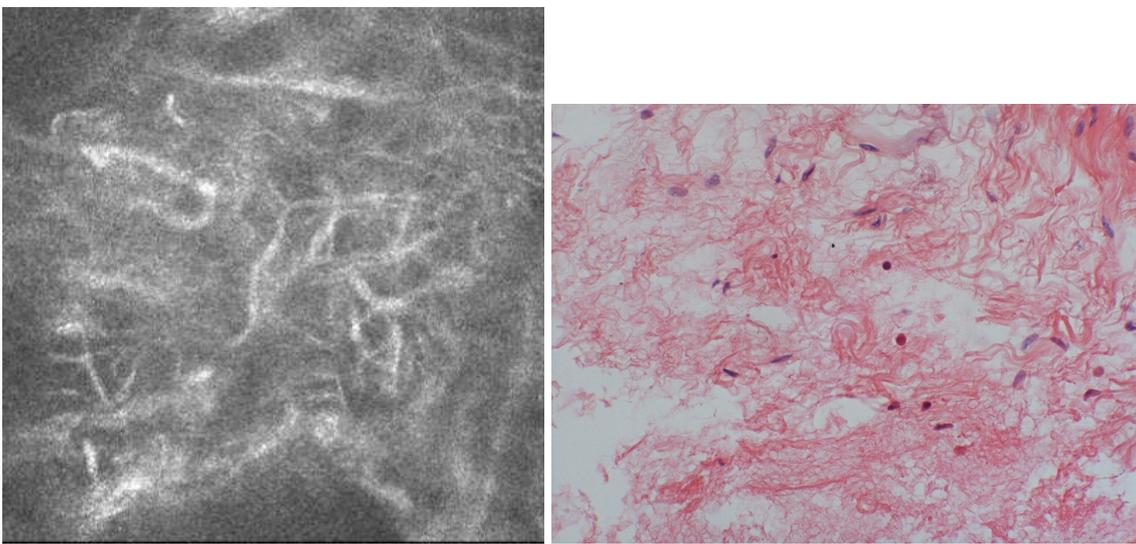


Abb. 41: Pterygium mit elastotischer Degeneration der Bindegewebsfasern.

a) Konfokales Bild.

b) Histologie: HE-Färbung.

4.2. Amyloidose

Die in-vivo konfokale Mikroskopie zeigte eine normale Epithelschichtung der Bindehaut mit einigen epithelialen Mikrozysten und wenigen Entzündungszellen. Das Bindehautstroma ließ große hyperreflektive Bereiche und Banden mit netzartigem Erscheinungsbild erkennen. Wenige hyperreflektive, runde Entzündungszellen waren dazwischen verstreut.

Die histologischen Befunde des Bindehautexzidats zeigen wenig chronische Entzündungszellen sowie ein diffus im Stroma eingelagertes homogenes, eosinophiles Material. Typisch für das Amyloid ist die Anfärbbarkeit mit Kongorot und die grünliche Doppelbrechung im polarisierten Licht.

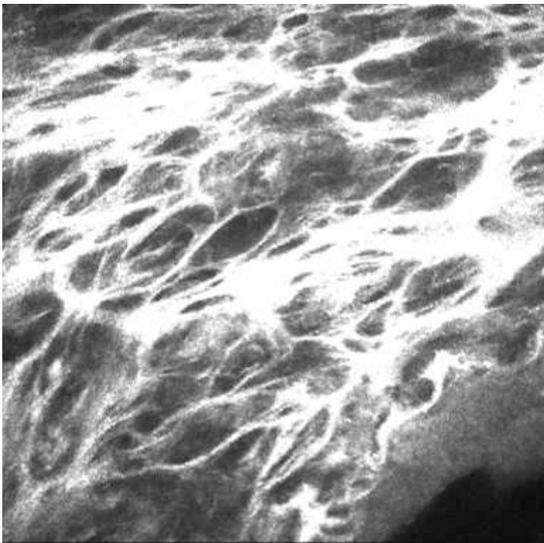


Abb. 42: In-vivo konfokale Mikroskopie einer konjunktivalen Amyloidose. Schrägschnitt. Hyperreflektive netzartige stromale Bänder, vereinbar mit Amyloid Ablagerungen.

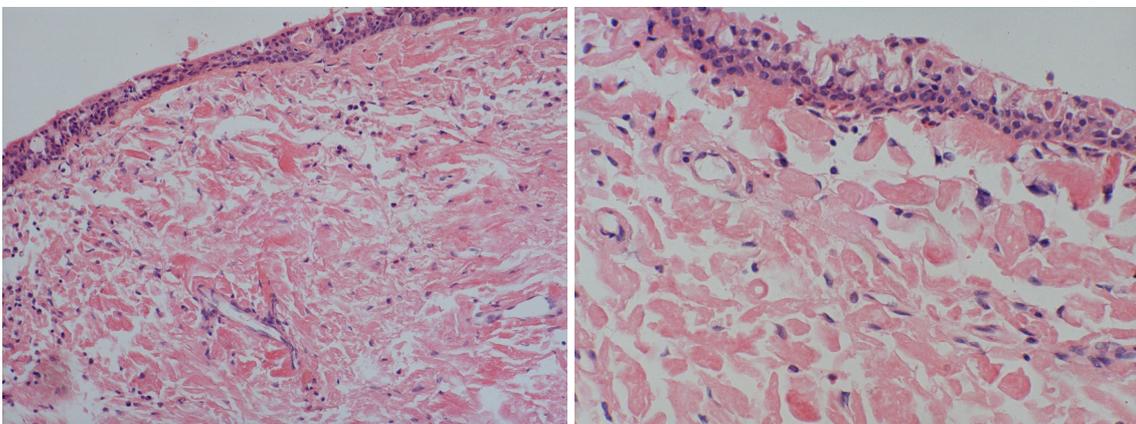


Abb. 43: Amyloidose

a) Histo: HE-Färbung. 20x Vergrößerung.

b) Histo: HE-Färbung. 40x Vergrößerung.

5. Nicht-pigmentierte Tumore der Konjunktiva

5.1. Papillom

Untersuchungen von konjunktivalen Papillomen mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie zeigten vor allem in schrägen Aufnahmen die typische papilläre Oberfläche. Das Zentrum der Papillen bestand aus einem fibrovaskulären stromalen Anteil. Dieser wurde von einem verdickten Epithel, welches multiple epitheliale Mikrozysten beinhaltet und vorwiegend von runden Zellen infiltriert wird, umgeben.

Histopathologische Untersuchungen derselben Läsionen zeigten die charakteristischen fächerartigen Papillen aus fibrovaskulärem Gewebe, welche von variabel dickem Epithel umgeben waren. Sowohl akute als auch chronische Entzündungszellen konnten als Korrelat der infiltrierenden Zellen identifiziert werden. Das nicht-keratinisierte Epithel zeigte eine deutliche Akanthose und enthielt Becherzellen.

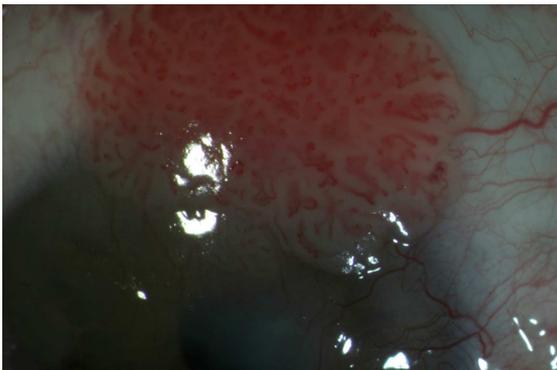


Abb. 44: Klinisches Bild eines Bindehautpapilloms.

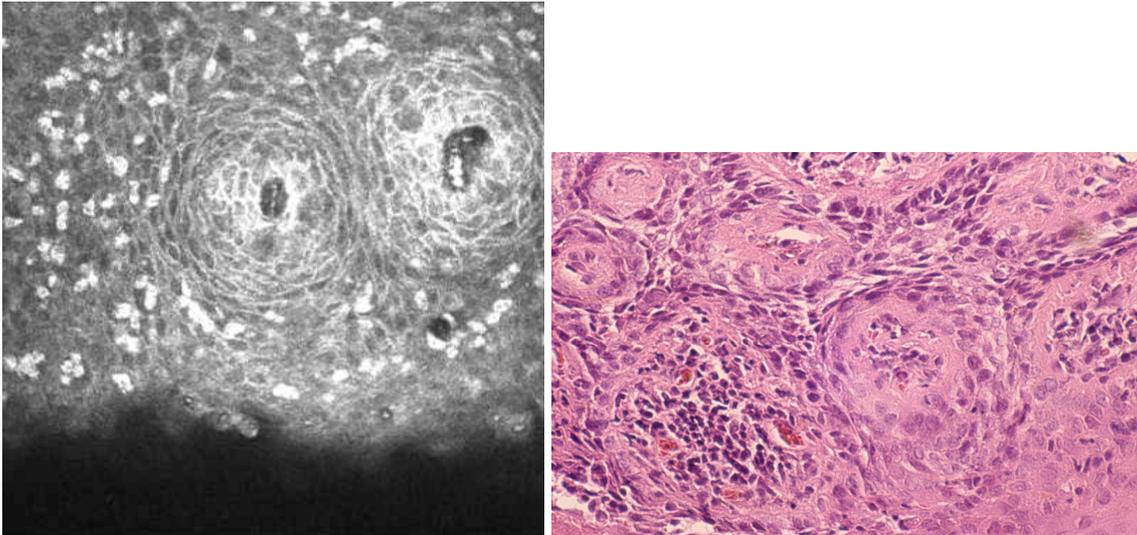


Abb. 45: Konjunktivales Papillom.

- a) In-vivo konfokale Mikroskopie mit fibrovaskulären stromalen Papillen umgeben von runden Zellen und akanthotischem Epithel.
 b) Histologisches Bild desselben konjunktivalen Papilloms.

5.2. Konjunktivale intraepitheliale Neoplasie (CIN) und Plattenepithelkarzinom

Die epitheliale Oberfläche von konjunktivalen intraepithelialen Neoplasien bestand aus abnorm großen hochreflektiven dysplastischen Epithelzellen unterhalb einer hyperreflektiven amorphen Schicht. Diese dysplastischen Epithelzellen enthielten einen prominenten Nucleus und Nucleolus. Das Epithel war mit einer Dicke von bis zu 120 μm ausgesprochen verdickt. Das darunterliegende Stroma erschien hyporeflektiv mit ein paar hyperreflektiven runden Zellen. Details von kollagenen Strukturen konnten nicht ausgemacht werden.

Am besten konnte die konjunktivale intraepitheliale Neoplasie am Limbus und an der angrenzenden Hornhautoberfläche untersucht werden.

Aufgrund der begrenzten Darstellungstiefe der Konjunktiva mit dem konfokalen Mikroskop (bis zu 200 μm) und der starken Keratinisierung war eine Untersuchung des invasiven Wachstums in die Tiefe beim Plattenepithelkarzinom nur begrenzt möglich.

Untersucht man die CIN histologisch so zeigt sich ein akanthotisches Epithel oft mit Hyperkeratose und Parakeratose. Im Epithel findet sich eine deutliche Zell- und Kernpolymorphie mit Einzelzellverhornungen und Hornzystenbildung.

Die oben erwähnte in-vivo konfokal mikroskopische hyperreflektive amorphe Zellschicht entspricht sehr gut der Hyperkeratose.

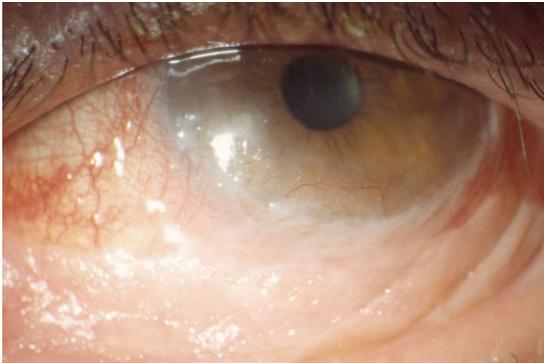


Abb. 46: Klinisches Bild eines konjunktivalen Plattenepithelkarzinoms.

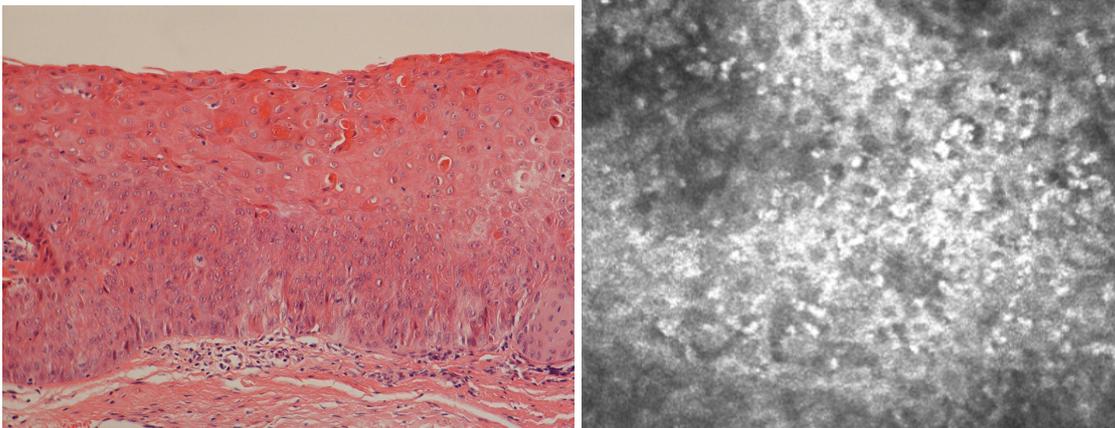


Abb. 47: Konjunktivale intraepitheliale Neoplasie.

a) Histo. HE-Färbung, 20x Vergrößerung.

b) In-vivo konfokale Mikroskopie. Große hyperreflektive dysplastische Zellen mit prominentem Nucleus.

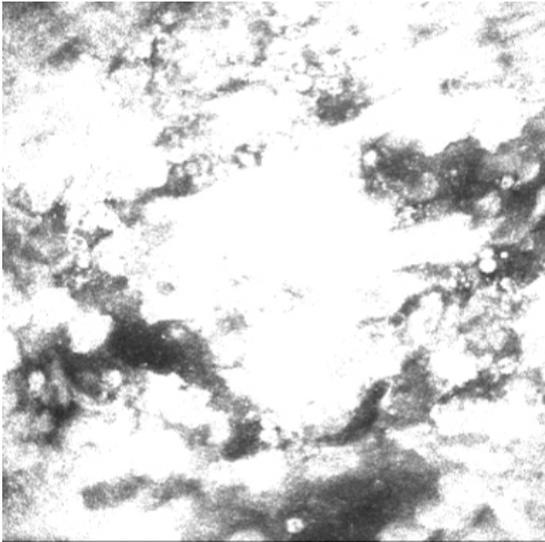


Abb. 48: In-vivo konfokale Mikroskopie. Starke hyperreflektive Keratinisierung bei CIN.

5.3. Lymphom

Der sichtbare Anteil von Lymphomen liegt typischerweise in der bulbären Bindehaut in der Nähe des oberen oder unteren Fornix. Auf Grund ihrer Lokalisation und ihrer tiefen Lage in der Substantia propria konnten die Lymphome mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie nicht dargestellt werden.



Abb. 49: Klinische Bilder eines Lymphoms.

6. Pigmentierte Tumore der Konjunktiva

6.1. Nävus

Die konfokale in-vivo Mikroskopie von konjunktivalen Nävi zeigte bei einem Patienten im konjunktivalen Epithel hyperreflektive, meist runde Zellen und bei einem weiteren Patienten hyperreflektive Plaques. Die übrigen Nävi wiesen ein *normales Epithel* auf.

Subepithelial konnten in 100% der Fälle runde, mittelgroße, hyperreflektive, aber auch hyporeflektive Zellen, die sich diffus oder in *Nestern* ablagerten, dargestellt werden.

Zwischen den Zellen konnten in einigen Bildern große Klumpen von hyperreflektivem Material beobachtet werden.

Bei allen Patienten zeigten sich im konjunktivalen Stroma große *Pseudozysten*, die mit nicht-verhornendem mehrschichtigem Epithel ausgekleidet waren.

Diese Pseudozysten waren teilweise mit monomorphem Material oder zellulärem Debris gefüllt.

Kleine dendritische Zellen waren bei 2 von 6 Nävi im basalen Epithel oder in der Läsion verstreut, auszumachen.

Größere Dendriten zeigten sich in nur einem Nävus, welcher gleichzeitig hyperreflektive Stellen im Epithel enthielt.

Bei zwei Nävi stellten sich subepithelial große, hyperreflektive Zellen ohne sichtbaren Nucleus hauptsächlich als Konglomerate gruppiert dar.

Die mit der konfokalen in-vivo Mikroskopie gestellte Diagnose eines konjunktivalen Nävus bestätigte sich bei allen Läsionen histologisch.

In dem Exzidat eines Patienten, das konfokalmikroskopisch hyperreflektive Zellen im Epithel und Stroma zeigte, fanden sich auch histologisch Nävuszellnester intraepithelial und subepithelial, so dass die Diagnose eines *Compound Nävus* gestellt wurde.

Die Läsionen, die in der konfokalen Mikroskopie hyperreflektive stromale Zellen aufwiesen, zeigten histologisch stark pigmentierte subepitheliale Nävus-Zellen.

Amelanotische Nävus-Zellen konnten in der konfokalen Mikroskopie als hyporeflektive Zellen in der Substantia propria dargestellt werden.

Die Anwesenheit von epithelialen Pseudozysten in der in-vivo konfokalen Mikroskopie korrelierte bei allen Proben histopathologisch sehr gut.

Der Nävus, der konfokalmikroskopisch große dendritische Zellen und eine epitheliale Beteiligung zusätzlich zu den stromalen Nävus Zellnestern und Pseudozysten zeigte, entsprach histologisch einem stromalen Bindehautnävus in Assoziation mit einer primär erworbenen Melanose mit Atypie.

Die großen Konglomerate von hyperreflektiven Zellen, die sich bei zwei Läsionen subepithelial darstellen ließen, erwiesen sich als stark pigmentierte CD-68 positive *Melanophagen*.

Die Sensitivität und Spezifität der in-vivo konfokalen Mikroskopie von konjunktivalen Nävi liegt im Vergleich zur Histologie bei 100%.



Abb. 50: Klinisches Bild eines konjunktivalen Nävus.

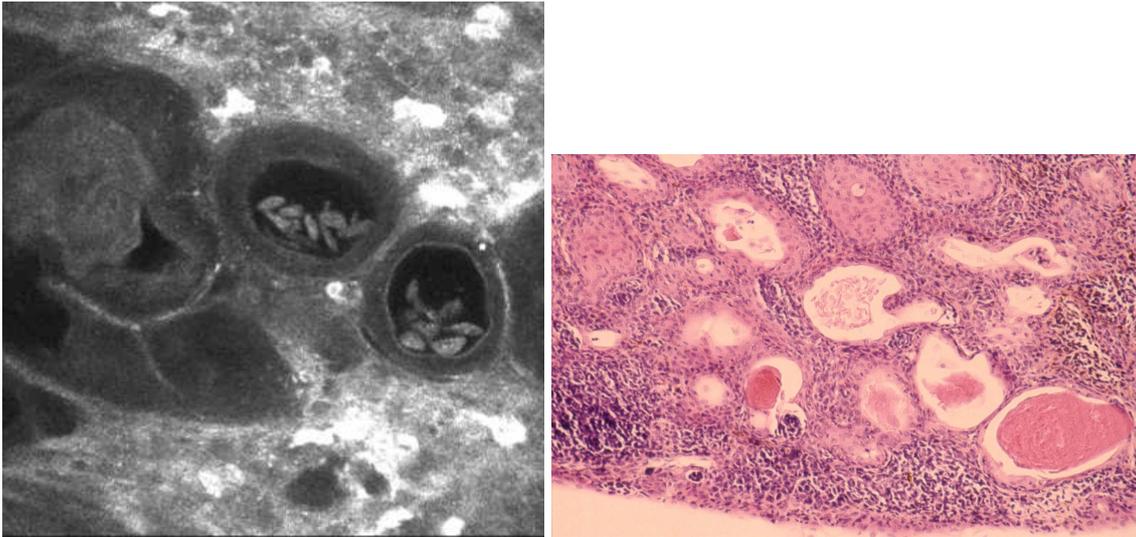


Abb. 51: Konjunktivaler Nävus.

- a) In-vivo konfokale Mikroskopie mit epithelialen Pseudozysten und Nestern aus hyperreflektiven und hyporefektiven mittelgroßen, monomorphen Zellen, vereinbar mit Nävus-Zellen.
- b) Histologisches Bild desselben konjunktivalen Nävus mit den in a) beschriebenen pigmentierten und nicht-pigmentierten stromalen Nävus-Zellen und epithelialen Pseudozysten.

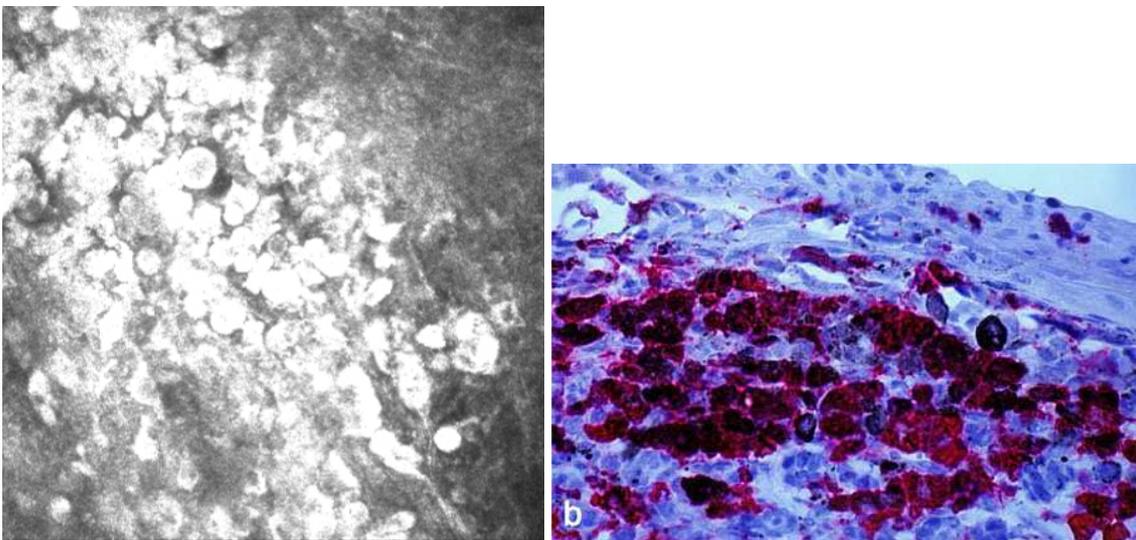


Abb. 52: Konjunktivaler Nävus.

- a) In-vivo konfokale Mikroskopie mit großen hyperreflektiven subepithelialen Zellen ohne prominente Nuclei.
- b) Immunhistochemische Untersuchung der Zellen in a) mit CD-68 positiven Melanophagen.

6.2. Sekundär erworbene Melanose (mit der Hautfarbe assoziierte Melanose) und primär erworbene Melanose ohne Atypie

Konfokale Bilder von Läsionen, die histologisch als „racial melanosis“ oder als „PAM ohne Atypie“ diagnostiziert wurden, wiesen hyperreflektive Zellen oder Granulae im *basalen konjunktivalen Epithel* in 67% der Fälle auf. Dies konnte vor allem in schrägen Aufnahmen dargestellt werden.

Bei den übrigen Tumoren waren die hyperreflektiven Granulae im gesamten Epithel, welches ansonsten normal erschien, verstreut.

Bei diesen hauptsächlich *limbal gelegenen* Veränderungen konnte man die hyperreflektiven pigmentierten Granulae auch im gesamten peripheren cornealen Epithel finden. Das corneale Stroma war jedoch nie mitbetroffen.

Kleine dendritische Zellen konnten bei 100% der Läsionen im limbalen und/oder konjunktivalen basalen Epithel ausfindig gemacht werden.

Die histologische Aufarbeitung derselben Läsionen stellte ein stark pigmentiertes basales konjunktivales Epithel ohne atypische Melanozyten oder eine Beteiligung des übrigen Epithels dar.

Die durch die in-vivo konfokale Mikroskopie gestellten Diagnosen der SAM oder der „PAM ohne Atypie“ korrelierten zu 100% in Sensitivität und Spezifität mit der histologisch gesicherten Diagnose.



Abb. 53: Klinisches Bild einer konjunktivalen „racial melanosis“.

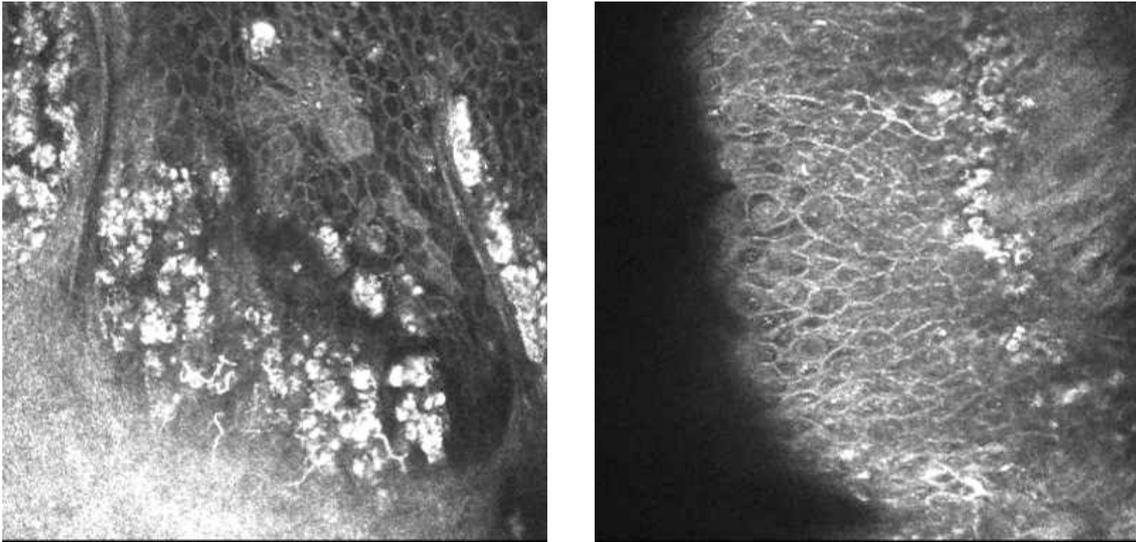


Abb. 54: In-vivo konfokale Mikroskopie der „racial melanosis“.

- a) Hyperreflektive Granulae im basalen limbalen Epithel mit kleinen dendritischen Zellen.
- b) Schrägschnitt. Pigmentierte Veränderungen im basalen konjunktivalen Epithel mit kleinen dendritischen Zellen.

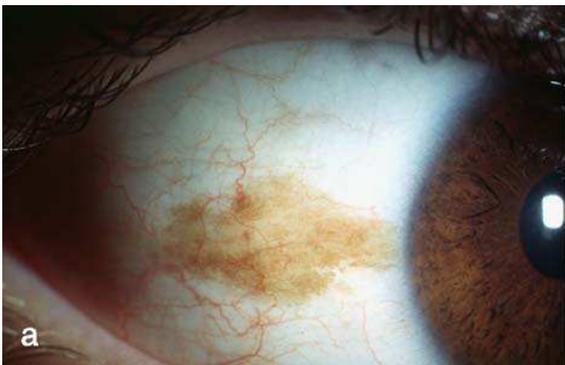


Abb. 55: Klinisches Bild einer primär erworbenen Melanose (PAM) ohne Atypie.

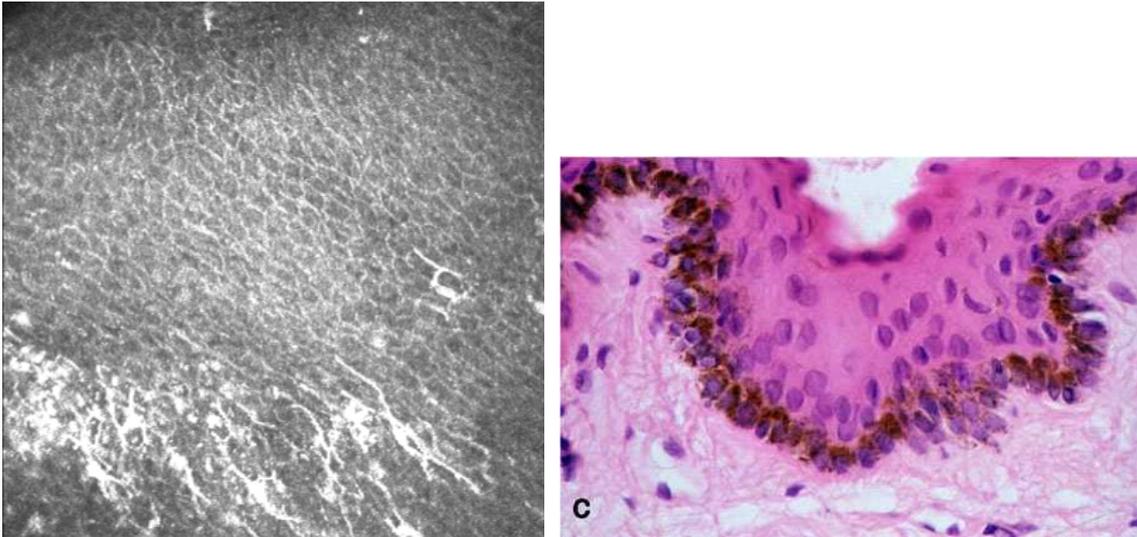


Abb. 56: PAM ohne Atypie.

- a) In-vivo konfokale Mikroskopie mit hyperreflektiven pigmentierten Veränderungen und kleinen dendritischen Zellen hauptsächlich im basalen Epithel. Leichter Schrägschnitt.
- b) Histologisches Bild der Läsion in a) mit pigmentierter Hyperplasie im basalen Epithel.

6.3. Primär erworbene Melanose mit Atypie

Histologisch gesicherte primär erworbene Melanosen mit Atypie zeigten in der konfokalen in-vivo Mikroskopie in 100% der Fälle *hyperreflektive Granulae und Plaques*, die sich *im gesamten Epithel* des Tumors befanden.

Die meisten Läsionen erstreckten sich auch auf das *corneale Epithel*. Die hochreflektiven Granulae waren in den basalen cornealen Epithelzellen zu finden.

Bei allen Läsionen konnte ein *Netzwerk aus riesigen, hyperreflektiven dendritischen Zellen* nachgewiesen werden, welche teilweise plump erschienen.

Diese großen dendritischen Zellen konnten nur in einer weiteren Läsion gefunden werden, welche konfokalmikroskopisch als Nävus eingestuft wurde. In dieser Läsion konnte histologisch ein stromaler Nävus diagnostiziert werden, welcher in einem Bereich auch Eigenschaften einer „PAM mit Atypie“ aufwies.

Bei allen Patienten korrelierten die konfokal mikroskopischen Bilder mit den histopathologischen Befunden sehr gut. Es zeigten sich histologisch atypische Melanozyten im gesamten Epithel.

Immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen *S-100*, *HMB-45* und *Melan-A* bestätigten das Vorhandensein von großen dendritischen Zellen im Epithel der primär erworbenen Melanosen mit Atypie.

Verglichen mit der Histologie wurde die Diagnose „PAM mit Atypie“ bei allen Fällen, bis auf einen, mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie korrekt gestellt. Die Sensitivität der in-vivo konfokalen Mikroskopie in der Diagnose einer „PAM mit Atypie“ liegt damit bei 100%, die Spezifität bei 96%.



Abb. 57: Klinisches Bild einer primär erworbenen Melanose (PAM) mit Atypie.

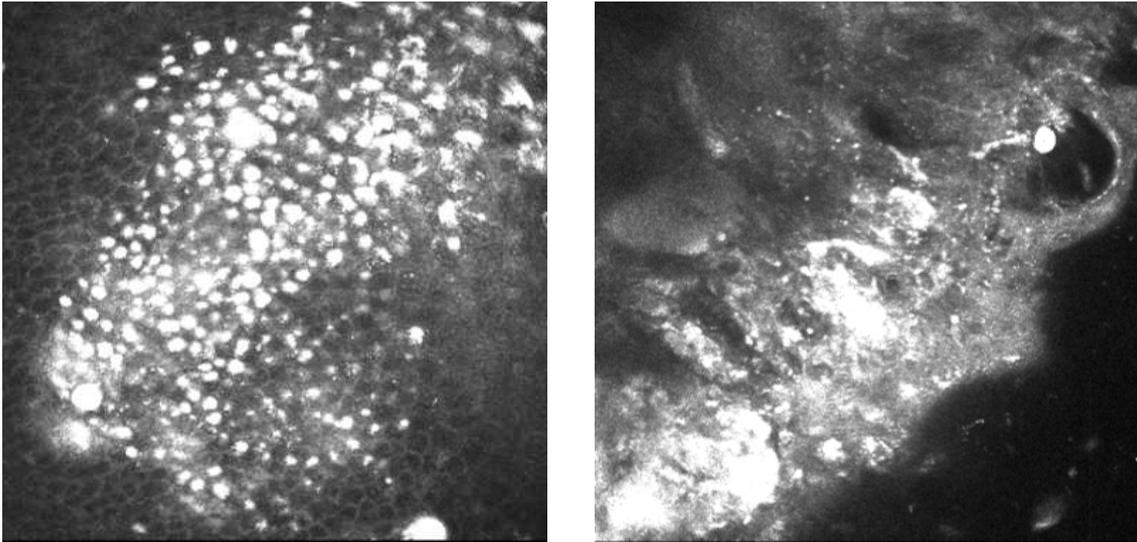


Abb. 58: In-vivo konfokale Mikroskopie einer PAM mit Atypie.

- a) Pigmentierte Granulae breiten sich in die basalen Zellschichten der Cornea aus.
- b) Hochreflektive Zellen, Granulae und Flächen im gesamten konjunktivalen Epithel. Schrägschnitt.

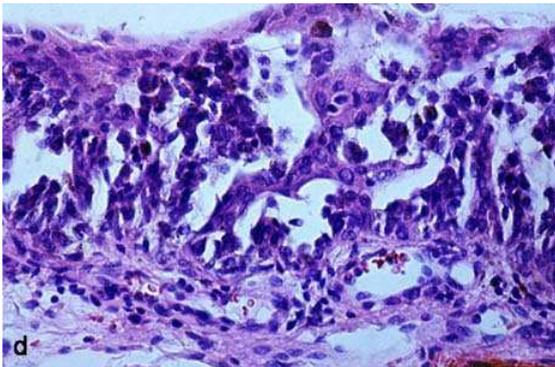


Abb. 59: Histologisches Bild der PAM mit Atypie. Atypische Melanozyten erstrecken sich durch das gesamte konjunktivale Epithel.

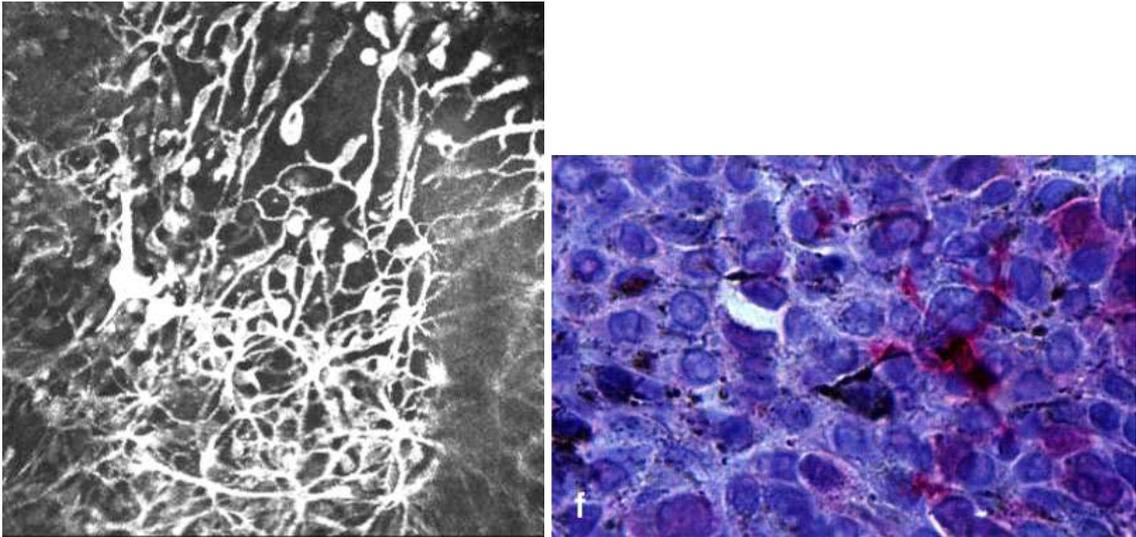


Abb. 60: PAM mit Atypie.

- a) In-vivo konfokale Mikroskopie mit bäumchenartigem Netzwerk aus riesigen dendritischen Zellen.
- b) Immunhistochemische Färbung der Läsion in a) mit Antikörper gegen S-100. Große, positiv färbende dendritische Zellen.

6.4. Melanom

Maligne Melanome der Konjunktiva waren in der Untersuchung mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie mit einer dünnen Epithelschicht bedeckt.

Bei pigmentierten Läsionen konnten hochreflektive Zellen direkt subepithelial dargestellt werden. Detaillierte zelluläre Strukturen konnten jedoch besser in tieferen, weniger reflektiven Scans ausgemacht werden.

Die Läsionen enthielten eine Ansammlung von Zellen mit großen, atypischen hyperreflektiven Nuclei und prominenten hyporeflektiven Nucleoli.

Die Tumore, die später als Spindelzell-Melanome charakterisiert wurden, zeigten etwas kleinere Zellen. Die typische spindelzellartige Form und die faszikuläre Anordnung konnte in der in-vivo konfokalen Mikroskopie jedoch nicht ausgemacht werden.

Die Tumorzellen waren umgeben von kleinen, hochreflektiven runden Zellen, bei denen es sich vermutlich um Entzündungszellen handelte.

Viele große Gefäße ließen sich in der Läsion darstellen.

Bei einem Patienten mit einem Melanom überwogen die Kriterien einer primär erworbenen Melanose mit Atypie, wie riesige hyperreflektive dendritische Zellen, das Zellbild. Es wurde hierbei fälschlicherweise die in-vivo konfokale Diagnose einer „primär erworbenen Melanose mit Atypie“ gestellt.

Histologisch fanden sich 3 Spindelzelltypen, 3 gemischte Zelltypen und ein Epitheloidzelltyp eines konjunktivalen malignen Melanoms.

Die Tumorzellen zeigten eine positive Reaktion auf Antikörper gegen S-100, Melan-A und HMB-45.

Alle Tumore waren infiltriert und umgeben von einer chronischen Entzündungsreaktion und zeigten viele große Tumorgefäße.

Bei dem konjunktivalen Melanom, welches in der in-vivo konfokalen Mikroskopie hauptsächlich die Zeichen einer primär erworbenen Melanose mit Atypie aufwies, zeigte sich histopathologisch sowohl ein malignes Melanom, als auch gleichzeitig eine primär erworbene Melanose mit Atypie.

Ein malignes Melanom der Konjunktiva mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie korrekt zu diagnostizieren liegt bei einer Sensitivität von 89% und einer Spezifität von

100%. Der positive und negative Vorhersagewert für die Diagnose eines konjunktivalen Melanoms liegt bei entsprechend 100% und 95%. Die Fläche unter der ROC (Receiver-Operating-Characteristics) lag bei 96%.

Bei zwei pigmentierten konjunktivalen Läsionen, die mit einem Uvea- oder Iris-Melanom assoziiert waren, zeigten sich in der in-vivo konfokalen Mikroskopie große Tumorzellen mit prominenten Nuclei im konjunktivalen Stroma.

Histologisch bestätigte sich das extrasklerale Wachstum dieser Melanome.

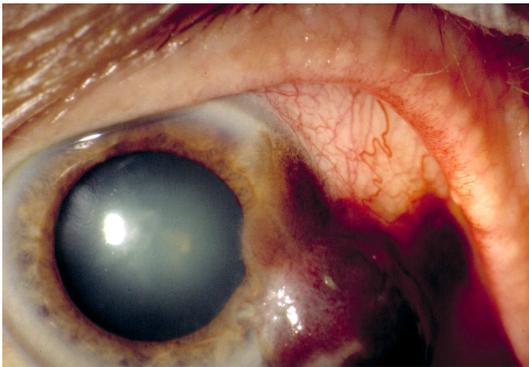


Abb. 61: Klinisches Bild eines konjunktivalen Melanoms.

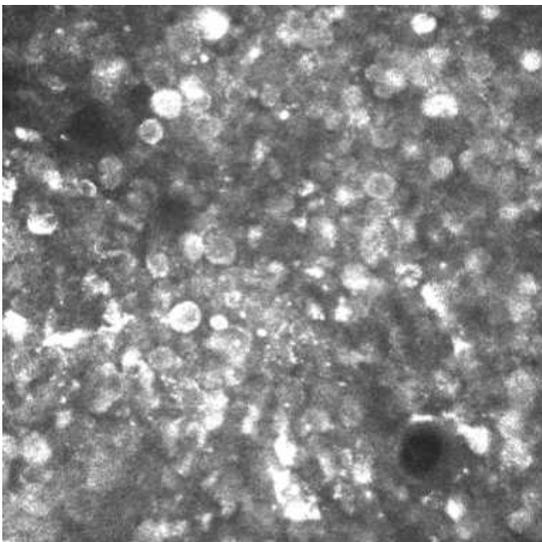


Abb. 62: In-vivo konfokale Mikroskopie eines konjunktivalen Melanoms. Zellen mit großen atypischen hyperreflektiven Nuclei und prominenten hyporeflektiven Nucleoli.

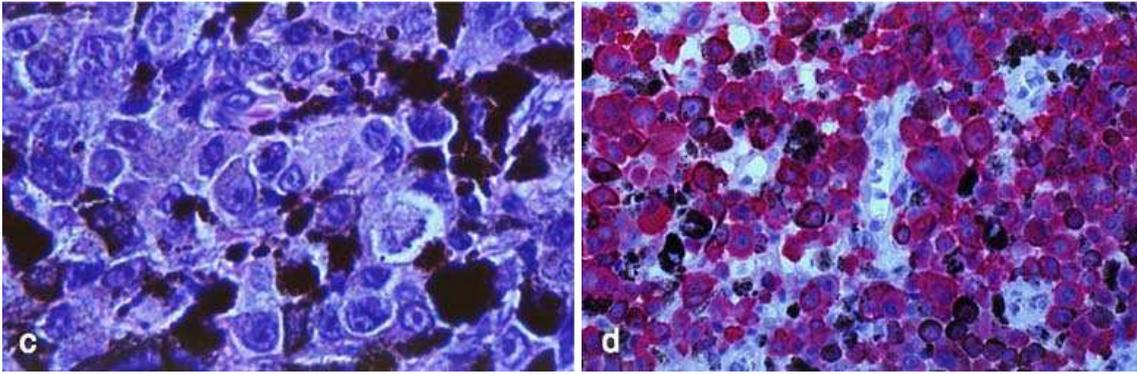


Abb. 63: Konjunktivales Melanom.

- a) Histologisches Bild des konjunktivalen Melanoms vom Epitheloidzelltyp (links).
- b) Immunhistochemisches Bild des konjunktivalen Melanoms mit Tumor Zellen positiv gefärbt gegen HMB-45.

V. Diskussion

1. Konfokale in-vivo Mikroskopie

Die in-vivo konfokale Mikroskopie mit dem HRTII/RCM erlaubt Einblicke in die Anatomie und die Erkrankungen der Bindehaut zu erlangen.

Die Untersuchung ist für den Patienten nicht invasiv und komfortabel. Zur Untersuchung ist nur eine Oberflächenanästhesie nötig. Bei keiner Untersuchung kam es zu einer Verletzung der Bindehaut oder Hornhaut. Erste konfokale Mikroskope waren phototoxisch, so dass sie nur ex-vivo verwendet werden konnten (48). Auf Grund des Dioden Lasers der Klasse I besteht heute keine Gefahr bezüglich der Phototoxizität. Durch das Kontaktverfahren kommt es zu einer Eliminierung störender Reflexe und einer besseren Tiefenkontrolle. Durch schnelle Bildaufnahmen mit einer Aufnahmezeit von 0,024 Sekunden können unscharfe Bilder durch ungewollte Bewegungen, Puls, Atmung oder Mikrosakkaden verhindert werden. Jedoch ist die Untersuchung immer noch stark von der Compliance des Patienten abhängig. So können spezielle Ausschnitte zum Beispiel der tarsalen Bindehaut nur bei einer gleichbleibenden Haltung und konstanten Blickrichtung des Patienten Bilder guter Qualität ergeben. Des Weiteren können nur Ausschnitte der Bindehaut und nicht alle Regionen der Konjunktiva untersucht werden. Für die Zukunft ist ein flexibles Instrument, wie es in der Ultraschallsonographie verwendet wird, zur Untersuchung der gesamten Konjunktiva inklusive der Karunkel wünschenswert.

Mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie besteht zum ersten Mal die Möglichkeit die Konjunktiva in einer hohen Auflösung von bis zu einem Mikrometer in-vivo dynamisch zu untersuchen. Es können auch dreidimensionale Bilder im Live-Modus erstellt werden. Schräge Schnittbilder können sehr hilfreich sein und geben interessante Einblicke in die strukturellen Beziehungen. Anders als bei der Untersuchung der Hornhaut ist die Eindringtiefe aufgrund von Reflexen und vermehrter Dichte auf 200µm begrenzt.

2. Anatomie der Konjunktiva

Mit der konfokalen Mikroskopie können die unterschiedlichen anatomischen Regionen der Konjunktiva in-vivo dargestellt werden.

An der bulbären Bindehaut zum Beispiel zeigt sich konfokalmikroskopisch ein mehrschichtiges, abgeflachtes Plattenepithel, dagegen stellt sich an der tarsalen Bindehaut ein kubisches dünnes Epithel, wie bereits von Steuhl K.P. elektronenmikroskopisch ex-vivo beschrieben (111), dar.

Unsere anatomischen Beobachtungen der normalen bulbären und tarsalen Bindehaut mittels in-vivo konfokaler Mikroskopie wurden später durch Efron N. et al. bestätigt (21;22).

Superfizielle, intermediäre und basale Zellen können unterschieden werden, jedoch besteht im Gegensatz zur Hornhaut und dem Limbus kein signifikanter Unterschied in der Fläche und dem Durchmesser zwischen nicht-desquamierenden Oberflächenzellen, intermediären Zellen und Basalzellen der bulbären Bindehaut.

Im Vergleich zu Messungen von cornealen Epithelzellen mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie, bei der superfizielle Zellen einen Durchmesser von 40 bis 50 μm und Basalzellen 10 bis 20 μm erreichen (6;55;93), erscheinen die konjunktivalen desquamierenden superfiziellen Epithelzellen größer, während die nicht-desquamierenden Oberflächenzellen nur die Hälfte des Durchmessers der cornealen Oberflächenzellen messen.

Die konjunktivalen Basalzellen erlangen den doppelten Zelldurchmesser im Vergleich zu den limbalen Basalzellen, wie von Romano A.C. et al. 2003 bestätigend berichtet wurde (93).

Oberflächenzellen enthalten oft kleine, kondensierte pyknotische Nuclei, die womöglich Zellen mit einem geradlinigem oder „snake like“ nuclearem Chromatin, wie sie von Marner K. beschrieben wurden (67), darstellen. Diese abnormen Zellen lagern sich typischerweise in Clustern zwischen morphologisch normalen Epithelzellen an. Die in-vivo konfokalen Beobachtungen korrelieren gut mit den histologischen Ergebnissen von Marner K. (67). Diese Zellen mit „snake-like“ Chromatin werden bei bis zu 50% der Patienten mit einer Keratokonjunktivitis sicca und zu 25% bei Patienten mit einem Sjögren Syndrom beschrieben (67). In der konfokalen in-vivo Mikroskopie dagegen sieht man diese Zellen auch in vermeintlich normaler Bindehaut. Eine nicht

diagnostizierte subklinische Keratokonjunktivitis sicca könnte verantwortlich für diese Beobachtungen sein. Spezielle Bindehautuntersuchungen an Patienten mit der Diagnose „trockenes Auge“ sollten mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie durchgeführt werden, um diesen Sachverhalt zu klären.

Im gesamten konjunktivalen Epithel finden sich bei den meisten unserer Untersuchungen einzelne Zellen oder Zellverbände von hyporeflektiven Zellen mit entweder einem an den Rand gedrängten Nucleus oder einem zentralen Stoma. Diese Zellen entsprechen der anatomischen Beschreibung von Becherzellen (10;111).

Die von uns beschriebene Darstellung von Becherzellen mit dem in-vivo konfokalen Mikroskop konnte von Rath R. et al. und der Arbeitsgruppe um Baudouin C. mittels Impressionszytologie morphologisch bestätigt werden (19;59;89).

Le Q.H. et al. untersuchten 2010 die Dichte der Becherzellen mittels in-vivo konfokaler Mikroskopie und Impressionszytologie bei Patienten mit Verätzungen. Es zeigte sich eine deutliche Abnahme der Becherzellendichte bei diesen Patienten. Es konnte des weiteren eine gute Korrelation zwischen diesen beiden Untersuchungsmethoden gefunden werden (58).

Des Weiteren zeigen sich bei einigen Patienten große ovale Zellen teils ausgefüllt mit hyporeflektivem Material. Diese Zellen könnten großen Becherzellen mit retiniertem Muzin entsprechen, wie sie von Kessing S.V. als ein Phänomen mit zunehmendem Alter beschrieben wurden (52). Ebenso könnten sie den so genannten hyalinen Körperchen, welche amorphe runde bis ovale Strukturen mit einer 2 bis 3 fachen Größe von Becherzellen sind, ähneln. Sie werden für degenerierte Becherzellen gehalten (1).

Die Tatsache, dass Becherzellen mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie dargestellt werden können ist von besonderer Bedeutung für die in-vivo Diagnose einer Konjunktivalisierung bei Limbusstammzellinsuffizienz.

In Biopsien der Bindehaut können dendritische Zellen im basalen Epithel der Konjunktiva mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden. Die Anzahl dieser dendritischen Zellen im Epithel der Konjunktiva schwankt in der Literatur zwischen 2,5 und 300 Zellen pro Quadratmillimeter, je nach untersuchter Region (94;112). Mit der konfokalen in-vivo Mikroskopie können hyperreflektive dendritische Zellen in der basalen Epithelschicht normaler und erkrankter, bulbärer und tarsaler Bindehaut gezeigt werden. Dendritische Zellen können mit der konfokalen Mikroskopie auch im

Bindehautstroma nachgewiesen werden. Jedoch erscheinen diese Zellen plumper mit großen Dendriten und sind histopathologisch mit einer Entzündungsreaktion assoziiert, wie von Steuhl K.P. et al. beschrieben (112).

Während das mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie untersuchte Epithel der Konjunktiva gut mit den histoanatomischen Beschreibungen einhergeht, lässt sich direkt unter dem Epithel eine hyperreflektive Schicht darstellen, die ungewöhnlich breit ist (30µm bis 85µm Dicke) und nicht mit der dünnen Basalmembran übereinstimmt, wie sie in der anatomischen Literatur beschrieben wird (108). Ein ausgeprägtes Netzwerk aus Fasern inseriert diese Basalmembran und könnte für ihre Hyperreflektivität verantwortlich sein. Dies könnte der Unterschied zwischen dem verdickten Erscheinungsbild der Basalmembran der Konjunktiva und der dünnen cornealen epithelialen Basalmembran und ihrer darunterliegenden hyporeflektiven Bowmanmembran in der konfokalen Mikroskopie sein, wie es von Böhnke M. und Masters B.R. beschrieben wurde (6).

Im Gegensatz zur konfokalen in-vivo Mikroskopie der Hornhaut, bei der die stromalen kollagenen Fasern unter normalen Umständen nicht zu sehen sind (6;48), zeigt sich in der gesunden und erkrankten Bindehaut deutlich ein dichtes hyperreflektives irreguläres Kollagennetzwerk.

Einzelne Fibroblasten können im gesunden Bindehautstroma nicht ausgemacht werden. Diese Zellen sind jedoch, wie von uns gezeigt wurde, bei in-vivo konfokalen Aufnahmen von Sickerkissen nach Glaukomoperationen nachweisbar (75).

Ungewöhnliche hyporeflektive leere zystische Räume, die mit einer hyperreflektiven Struktur ausgekleidet sind, können im gesunden Bindehautstroma beobachtet werden. Diese zystischen Strukturen sind hauptsächlich in enger Verbindung zu Blutgefäßen zu sehen. Es könnte sich um Lymphgefäße handeln. Nach persönlicher Kommunikation diesbezüglich mit Professor Dr. med. C. Cursiefen, Augenklinik des Universitätsklinikums Erlangen, befindet sich eine Studie über die Detektion von cornealen Lymphgefäßen mittels in-vivo konfokaler Mikroskopie von Bock F. et al. in Einreichung.

Der Limbus corneae ist aufgrund seiner Funktion als Stammzellreservoir für das Hornhautepithel von besonderer Bedeutung (36). Am cornealen Rand formieren sich radiär fingerförmige Einstülpungen und Papillen des konjunktivalen Epithels und

Stromas und werden als so genannte Vogt'sche Palisaden bezeichnet (108). Diese limbalen Strukturen können mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie gesehen werden, wie von Kobayashi A. und Sugiyama K. kürzlich am Beispiel von zwei Patienten veröffentlicht (54). Weitere Studien über das Aussehen, die Anzahl und die Tiefe von epithelialen Vogt'schen Palisaden am Limbus bei normalen Individuen und bei Patienten mit limbalen Erkrankungen sind notwendig.

Die Untersuchung der tarsalen Bindehaut mit der konfokalen in-vivo Mikroskopie ermöglicht es tarsal adenoide Strukturen, wahrscheinlich Meibomdrüsen und Wimpernfollikel, zu identifizieren.

3. Konjunktivitis

Besonders interessant ist die Option, Blutgefäße mit ihrem Blutfluss und der Transmigration von Entzündungszellen mit dem konfokalen in-vivo Mikroskop in Echtzeit aufnehmen zu können. Kirveskari J. et al. haben schon früher den Effekt von Hydrokortison auf die Leukozytenmigration in der entzündeten Bindehaut mit einem konfokalen Weißlicht Mikroskop beschrieben (53).

Ferner kann die Zusammensetzung der Entzündungsinfiltrate der Konjunktiva mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie direkt analysiert werden. Allansmith M.R. et al. berichteten über eine Infiltration von Lymphozyten, vornehmlich T-Zellen, in der Substantia propria und dem Epithel normaler Konjunktiva histopathologisch (3). Neutrophile Granulozyten konnten im Epithel und der Submukosa gefunden werden, während Plasmazellen und Mastzellen nur die Substantia propria infiltrierten. Mit der konfokalen in-vivo Mikroskopie können Zellen mit einem hyperreflektiven runden Nucleus im Epithel und Stroma der gesunden Konjunktiva gesehen werden. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um Lymphozyten. Bei einer Entzündung der Konjunktiva ist die zelluläre Infiltration signifikant erhöht. Bei einer akuten Konjunktivitis stellen sich zusätzlich Zellen mit multilobulären Nuclei, vermutlich neutrophile Granulozyten dar. Bei chronischer Konjunktivitis finden sich zusätzlich zu Rundzellinfiltraten größere Zellen mit einem perinucleären Halo, vermutlich Plasmazellen.

Hu Y. et al. analysierten mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie 2007 die konjunktivalen Veränderungen bei 16 Patienten mit einer atopischen Keratokonjunktivitis und untersuchten den Einfluss von topischem Cyclosporin A auf diese Erkrankung. Es zeigte sich entsprechend unseren Ergebnissen eine signifikante Zunahme der Entzündungszellen und ein Vorhandensein von Papillen. Die Anzahl der Entzündungszellen war unter Therapie mit Cyclosporin A Augentropfen deutlich reduziert und es zeigte sich eine Fibrose der papillären Läsionen (45).

Auch Le Q.H. et al. konnten 2010 eine vermehrte Infiltration von Entzündungszellen sowohl epithelial als auch stromal in der bulbären und tarsalen Konjunktiva bei 26 Patienten mit vernaler Keratokonjunktivitis mittels in-vivo konfokaler Mikroskopie nachweisen. Des Weiteren wurde in dieser Publikation eine deutliche Zunahme der dendritischen Zellen in der bulbären und tarsalen Bindehaut und eine Destruktion der Vogt'schen Palisaden bei Patienten mit vernaler Keratokonjunktivitis beschrieben (57).

Sehr hartnäckige Bindehautentzündungen können durch ein Fremdkörpergranulom entstehen. Wir können mit der Untersuchung eines Bindehaut-Fadengranuloms zeigen, dass die konfokale in-vivo Mikroskopie auch hier sehr nützlich in der Ursachensuche sein kann.

Besonders hilfreich ist die Möglichkeit der Differenzierung von papillärer und folliculärer Entzündungsreaktion der tarsalen Konjunktiva. Diese Unterscheidung ist klinisch oft schwierig zu treffen und hat weitreichende therapeutische Konsequenzen.

Typisch für eine vernarbende Konjunktivitis in der in-vivo konfokalen Mikroskopie ist ein hyperreflektives fibrotisches Netz subepithelial. Diese Diagnose kann auch klinisch ohne Probleme gestellt werden.

Wie wir 2005 veröffentlicht haben, können entzündliche Veränderungen des Lidrandes und Obstruktion der Meibomdrüsen, wie sie bei einer Blepharitis/ Meibomitis bzw. Meibomdysfunktion zu finden sind, mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie sichtbar gemacht werden (74).

4. Degenerative Erkrankungen der Konjunktiva

In einer Studie von Grossniklaus H.E. et al. wurden Pterygien bei 94,7% der Patienten klinisch korrekt diagnostiziert, während es bei den Pingueculae nur 48,5% der Fälle waren (41).

Histologische Charakteristika von Pterygien und Pingueculae beinhalten Ansammlungen von eosinophilem granulärem Material, welches aus einer exzessiven Anzahl von Vorläufern elastischer Fasern besteht, und aus elastotischen Fasern, die eine abnormale Reifungsphase in der elastischen Faserproduktion darstellen (5).

In unseren Untersuchungen bestätigt die in-vivo konfokale Mikroskopie die Anwesenheit von veränderten kollagenen Fasern und hyperreflektiven amorphen Material in der Substantia propria bei Pterygien und Pingueculae. Allerdings ist die konfokale in-vivo Mikroskopie meist nicht nötig, um die klinische Diagnose eines Pterygiums oder einer Pinguecula zu verifizieren.

Wang Y. et al. beschrieben kürzlich ebenfalls morphologische Veränderungen und die Verteilung von dendritischen Zellen in Pterygien. Sie fanden Entzündungszellen, vor allem dendritische Zellen, Becherzellen und Mikrozysten im Epithel des Pterygiums. Das Pterygiumstroma stellte sich analog zu unseren Ergebnissen als dichte fibrovaskuläre Struktur mit minimaler Infiltration von Entzündungszellen dar. Die Anzahl dendritischer Zellen in Pterygien war im Vergleich zur normalen bulbären Bindehaut signifikant erhöht (117).

Die konjunktivale Amyloidose tritt meistens sporadisch als eine primär örtlich begrenzte Ablagerung ohne vorangehende oder gleichzeitig bestehende Erkrankung des Auges auf (108). Die in-vivo konfokalen Untersuchungen der Amyloidose sind gut vereinbar mit dem in der Histologie zu sehenden diffus verteilten, eosinophilen, homogenen doppelbrechenden Material im konjunktivalen Stroma.

Auch Bozkurt B. et al. haben kürzlich von einem Patienten mit einer konjunktivalen Amyloidose berichtet (8). Das dichte Amyloid (zum Beispiel in der Computertomographie als hyperdens und im Ultraschall als echodicht beschrieben) wurde in dieser Publikation als hyporeflektiv beschrieben, während wir ein hyperreflektives Netzwerk nachweisen konnten. Die von den Autoren beschriebenen Läsionen mit einer lobulären Anordnung und umgebenden Gefäßen, die vorwiegend in

Schrägschnitten erfasst wurden, könnten auch konjunktivalen Follikeln entsprechen.
Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Patienten sind nötig.

5. Nicht-pigmentierte Tumore der Konjunktiva

Eine epitheliale Dysplasie, ein Carcinoma in situ und ein invasives Plattenepithelkarzinom der Bindehaut sind manchmal klinisch schwierig zu unterscheiden. Das Stellen einer korrekten Diagnose wird auch bei erfahrenen Fachärzten nur auf zirka 40 % geschätzt (60). Zu den gängigsten Fehldiagnosen bei Plattenepithel Neoplasien der Augenoberfläche gehören Pterygien, Papillome, Pingueculae, Dyskeratosen, Nävi und Melanome (60;98). Impressions- oder Exfoliativ-Zytologie wurden für die Diagnose von Plattenepithel Neoplasien als nützlich befunden. Unbefriedigende Proben ohne Zellmaterial, nicht klar definierte zytologische Kriterien für die Diagnose von Plattenepithel Neoplasien, die Notwendigkeit eines erfahrenen Pathologen zur Analyse und dysplastische Läsionen mit Hyperkeratose stellen Grenzen dar (33;82;115). Die konfokale in-vivo Mikroskopie von Plattenepithel Neoplasien kann eine Keratinisierung, Akanthose und dysplastische Epithelbefunde darstellen. Sie erlaubt des Weiteren Untersuchungen an vielen verschiedenen Stellen der Bindehaut, an denen eine Pathologie vermutet wird. Läsionen im Bereich des Limbus sind hierbei mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie am besten zu beurteilen. Auf Grund des hyperreflektiven Keratins bei vielen Epithelläsionen kann jedoch eine Invasion der Läsion in die Substantia propria nicht befriedigend dargestellt werden. Deshalb ist die Bindehautbiopsie weiterhin der Gold-Standard bei Verdacht auf ein (invasives) Plattenepithelkarzinom.

Das konjunktivale Papillom als weiterer häufiger epithelialer Tumor der Bindehaut kann klinisch manchmal nicht von einem Plattenepithelkarzinom unterschieden werden. Nach einer chirurgischen Exzision kann es bei der oft durch HPV-Viren hervorgerufenen Läsion häufig zu Rezidiven kommen, die Bindehautvernarbungen und oft mehrere chirurgische Eingriffe mit sich bringen. Die in-vivo konfokale Mikroskopie spiegelt bei typischen Befunden exakt die histopathologischen Befunde wieder und könnte in Zukunft das Diagnostikum der Wahl darstellen. Allerdings bleibt bei atypischen Läsionen nur die histologische Untersuchung.

2008 beschrieben Pichierri P. et al. ein konjunktivales Lymphom mit Hilfe der in-vivo konfokalen Mikroskopie (88). In dieser Veröffentlichung wurden von rundlichen, hyperreflektiven Infiltraten in der epithelialen und subepithelialen Bindehaut, teils in Follikeln angeordnet, berichtet. Die publizierten Bilder sind nicht sehr überzeugend. Epitheliale und subepitheliale Rundzellularinfiltrate entsprechen eher einer Konjunktivitis

als einer subkonjunktivalen Infiltration lymphozytärer Zellen. Unsere konfokal mikroskopischen Untersuchungen an 3 Lymphomen der Konjunktiva erbringen auf Grund der tiefen Lokalisation der lymphozytären Proliferationen subkonjunktival keine sicheren Ergebnisse.

6. Pigmentierte Tumore der Konjunktiva

Die Melanozyten des Epithels sind verantwortlich für die meisten melanozytären Läsionen der Bindehaut wie Nävi, primäre und sekundäre Melanosen und das maligne Melanom (25). Melanozyten der gewöhnlich erworbenen konjunktivalen Nävi haben eine rundliche polyedrische Form und stellen abnorme, kaum melaninhaltige rundliche und granuläre Melanosomen her. Diese transportieren, entsprechend der rudimentären Eigenschaft ihrer dendritischen Fortsätze, nur nebensächlich Melanin zu den umgebenden Keratinozyten (18;25;37;46). Die Nävuszellen finden sich gewöhnlicherweise in Nestern, welche sich an der epithelialen – subepithelialen Verbindungszone anhäufen. Pigmentierte und insbesondere amelanotische konjunktivale Nävi können mit einer hohen Wahrscheinlichkeit auf Grund ihrer typischen histologischen Charakteristika, wie Nävuszellnester und stromale Pseudozysten, mit der in-vivo konfokalen Mikroskopie diagnostiziert werden. Des Weiteren können Compound-Nävi und subepitheliale Nävi differenziert werden.

Normale Melanozyten, die auf das basale Epithel begrenzt sind, sind sowohl an der „racial melanosis“, als auch an der primär erworbenen Melanose ohne Atypie beteiligt (47).

Atypische dendritische Melanozyten in der Konjunktiva sind verantwortlich für die primär erworbene Melanose mit Atypie und können unterschiedliche Erscheinungsformen annehmen: kleine polyhedrale Zellen mit Dendriten, die nur mit der Elektronenmikroskopie beobachtet werden können; Spindelzellen; große Melanozyten mit komplex verzweigten Dendriten und runde epitheloide Zellen (26;46;47). Die konfokale Mikroskopie erlaubt eindeutig die Differenzierung zwischen erworbener Melanose mit und ohne Atypie. Während normal erscheinende kleine dendritische Zellen Kennzeichen von primär erworbenen Melanosen ohne Atypie und mit der Hautfarbe assoziierte Melanosen sind, bestehen primär erworbene Melanosen mit Atypie typischerweise aus Netzwerken von riesigen, atypischen Melanozyten. Außerdem sind hyperreflektive Granulae und Flecken bei der primär erworbenen Melanose mit Atypie im Gegensatz zur primär erworbenen Melanose ohne Atypie im gesamten konjunktivalen Epithel verstreut. Die konfokale Mikroskopie kann somit in der Diagnose von primär erworbenen Melanose sine pigmento äußerst hilfreich sein.

Die Impressions-Zytologie von primär erworbenen Melanosen mit Atypie und konjunktivalen Melanomen wurde als ein klinisches Monitoring Instrument im follow-up beschrieben (83). Darüber hinaus könnte eine Tränen-Zytologie atypische Melanozyten in fortgeschrittenen Läsionen nachweisen (118). Zytologische Proben könnten irreführend sein, da die Melanozyten, die sich in den tieferen Anteilen des Epithels befinden, nicht berücksichtigt werden und falsch-negative zytologische Befunde zu einer inadäquaten Therapie führen könnten (99).

Jakobiec F.A. und Mitarbeiter differenzierten histologisch vier verschiedene Typen von atypischen Melanozyten, die in einem konjunktivalen Melanom angetroffen werden können: kleine polyhedrale Zellen, Spindelzellen, Ballonzellen und runde epitheloide Zellen (47).

In der konfokalen in-vivo Mikroskopie von konjunktivalen Melanomen zeigen sich große hochreflektive, vermutlich stark pigmentierte, atypische Zellen, mit großen Nuclei und prominenten Nucleoli, Tumorgefäße, und eine umgebende Entzündungsreaktion. Assoziierte primär erworbene Melanosen mit Atypie können mit der konfokalen in-vivo Mikroskopie dargestellt werden. Epitheloid- oder Spindelzell-Typen von Melanomen können jedoch nicht unterschieden werden.

Bei zwei pigmentierten Läsionen, die mit einem uvealen Melanom assoziiert waren, deutet die in-vivo konfokale Mikroskopie auf ein extrasklerales Wachstum der Melanome hin. Dieser Verdacht wurde später histologisch bestätigt.

Die in-vivo konfokale Mikroskopie weist eine hohe Sensitivität und Spezifität bei der Diagnose melanotischer Läsionen der Konjunktiva auf. Grundlage dafür sind die Ergebnisse des Goldstandards der Histologie.

VI. Zusammenfassung

Die konfokale in-vivo Mikroskopie stellt ein neues Untersuchungsverfahren dar, mit dem es möglich ist die Bindehaut des Auges in-vivo im Echtzeit-Modus schnell und sicher auf zellulärer Ebene zu untersuchen.

Die Anatomie der Konjunktiva kann nicht-invasiv untersucht werden, ohne diese durch Einfrieren, Alkoholfixation oder ähnliches zu verändern.

Dabei können die einzelnen Zellschichten der Bindehaut und Strukturen wie Becherzellen, dendritische Zellen, Meibomdrüsen, Wimpernfollikel, konjunktivale Gefäße mit Lymphozytenmigration, Lymphgefäße und der Limbus als Stammzellreservoir für das Hornhautepithel im Live-Modus dargestellt und untersucht werden.

Durch die Unterscheidungsmöglichkeit von Papillen, Follikeln, akuter und chronischer Entzündungsinfiltration, Fremdkörpergranulomen, sowie vernarbender Konjunktivitis stellt das konfokale Mikroskop ein wertvolles Diagnostikum in der Abgrenzung von Entzündungsprozessen unterschiedlichster Genese dar. Die kausale Therapie kann dementsprechend gezielt eingeleitet werden.

In der Differentialdiagnose und Verlaufbeobachtung nicht-pigmentierter und pigmentierter Tumore stellt das konfokale in-vivo Mikroskop eine Zusatzuntersuchung dar.

Es ist möglich die Charakteristika von Nävi, atypischen und nicht atypischen Melanosen vom malignen Melanom abzugrenzen. Beim malignen Melanom und verdächtigen Melanosen sollte auf Grund der Schwere der Erkrankungen jedoch weiterhin der Goldstandard der histologischen Beurteilung des Gewebes durchgeführt werden. Hierbei kann die konfokale in-vivo Mikroskopie als Hilfestellung bei der Durchführung gezielter Biopsien dienen.

Kriterien zur standardisierten Einteilung unterschiedlicher Erkrankungen der Bindehaut wurden aufgestellt.

Diese Arbeit gibt einen Überblick über die Möglichkeiten und Grenzen der in-vivo konfokalen Mikroskopie der Konjunktiva. Weitere gezielte Untersuchungen der einzelnen Entitäten werden zusätzliche wertvolle Einblicke bringen.

VII. Literaturverzeichnis

1. Abdel-Khalek LM, Williamson J, Lee WR. Morphological changes in the human conjunctival epithelium. I. In the normal elderly population. *Br.J.Ophthalmol.* 1978 Nov;62(11):792-9
2. Abelson MB, Allansmith MR. Immunologic Diseases, Ocular Allergies. In: Smolin GM, Thoft RM, editors. *The Cornea*. Kapitel: 6; 2 ed. Boston/Toronto: Little, Brown and Company; 1987. 307-21
3. Allansmith MR, Greiner JV, Baird RS. Number of inflammatory cells in the normal conjunctiva. *Am.J.Ophthalmol.* 1978 Aug;86(2):250-9
4. Apple DJ, Rabb MF. Conjunctiva and eyelids. In *Ocular Pathology - Clinical Applications and Self-Assessment*. Kapitel: 10; 4 ed. St.Louis: CV Mosby; 1991. 454-7
5. Austin P, Jakobiec FA, Iwamoto T. Elastodysplasia and elastodystrophy as the pathologic bases of ocular pterygia and pinguecula. *Ophthalmology* 1983 Jan;90(1):96-109
6. Böhnke M, Masters BR. Confocal microscopy of the cornea. *Prog.Retin.Eye Res.* 1999 Sep;18(5):553-628
7. Bonini S. Atopic keratoconjunctivitis. *Allergy* 2004 Aug;59 Suppl 78:71-3
8. Bozkurt B, Kiratli H, Soylemezoglu F, Irkec M. In vivo confocal microscopy in a patient with conjunctival amyloidosis. *Clin.Experiment.Ophthalmol* 2008 Mar;36(2):173-5
9. Braude LS, Chandler JW. Atopic corneal disease. *Int.Ophthalmol.Clin.* 1984;24(2):145-56
10. Bron AJ, Tripathi RC, Tripathi BJ. The Conjunctiva; The Caruncle; The Plica Semilunaris. In *Wolff's Anatomie of the eye and orbit*. Kapitel: 2.6; 2.7; 2.8; 8 ed. London: Chapman & Hall Medical; 1997. 51-72
11. Buckley RJ. Atopic disease of the cornea. In: Cavanagh HD, editor. *The Cornea: Transactions of the World Congress of the Cornea III*. New York: Raven Press; 1988. 435-7
12. Cavanagh HD, El-Agha MS, Petroll WM, Jester JV. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. *Cornea* 2000 Sep;19(5):712-22
13. Cavanagh HD, Jester JV, Essepian J, Shields W, Lemp MA. Confocal microscopy of the living eye. *CLAO J.* 1990 Jan;16(1):65-73
14. Cha SB, Shields JA, Shields CL, Wang MX. Squamous cell carcinoma of the conjunctiva. *Int.Ophthalmol.Clin.* 1993;33(3):19-24

15. Conlon MR, Alfonso EC, Starck T, Albert DM. Tumors of the Cornea and Conjunctiva. In: Albert, Jakobiec, editors. Principles and Practice of Ophthalmology - Clinical Practice. Kapitel: 15; 1 ed. Philadelphia: WB Saunders Co; 1994. 276-94
16. Coroneo MT, Di GN, Wakefield D. The pathogenesis of pterygia. *Curr.Opin.Ophthalmol.* 1999 Aug;10(4):282-8
17. Coupland SE, Krause L, Delecluse HJ, Anagnostopoulos I, Foss HD, Hummel M, Bornfeld N, Lee WR, Stein H. Lymphoproliferative lesions of the ocular adnexa. Analysis of 112 cases. *Ophthalmology* 1998 Aug;105(8):1430-41
18. Curran RC, McCann BG. The ultrastructure of benign pigmented naevi and melanocarcinomas in man. *J.Pathol.* 1976 Jul;119(3):135-46
19. De Nicola R, Labbé A, Amar N, Dupas B, Baudouin C. In vivo confocal microscopy and ocular surface disease: anatomical-clinical correlations. *J Fr.Ophtalmol.* 2005;28(7):691-8
20. Earley O, Best R, McQuaid M, Gardiner T, Chakravarthy U, Archer DB. Human conjunctival epithelial cell morphology: an in vivo and in vitro study. *Irish Journal of Medical Science* 1991;161(1):31-5
21. Efron N, Al-Dossari M, Pritchard N. In vivo confocal microscopy of the bulbar conjunctiva. *Clin.Experiment.Ophthalmol* 2009 May;37(4):335-44
22. Efron N, Al-Dossari M, Pritchard N. In vivo confocal microscopy of the palpebral conjunctiva and tarsal plate. *Optom.Vis.Sci.* 2009 Nov;86(11):1303-8
23. Faraj HG, Hoang-Xuan T. Chronic cicatrizing conjunctivitis. *Curr.Opin.Ophthalmol.* 2001 Aug;12(4):250-7
24. Florakis GJ, Moazami G, Schubert H, Koester CJ, Auran JD. Scanning slit confocal microscopy of fungal keratitis. *Arch.Ophthalmol.* 1997 Nov;115(11):1461-3
25. Folberg R, Jakobiec FA, Bernardino VB, Iwamoto T. Benign conjunctival melanocytic lesions. Clinicopathologic features. *Ophthalmology* 1989 Apr;96(4):436-61
26. Folberg R, McLean IW, Zimmerman LE. Malignant melanoma of the conjunctiva. *Hum.Pathol.* 1985 Feb;16(2):136-43
27. Foster CS. The eye in skin and mucous membrane disorders. In: Tasman W, Jaeger EA, editors. Duane's clinical ophthalmology. Kapitel: 27; 5 ed. Philadelphia, New York: Lippincott-Raven; 1997. 1-41
28. Foster CS. Conrad Berens Lecture. Chronic cicatricial conjunctivitis. *CLAO J* 2001 Apr;27(2):61-7
29. Foster CS, Calonge M. Atopic keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 1990 Aug;97(8):992-1000

30. Foster CS, Fong LP, Azar D, Kenyon KR. Episodic conjunctival inflammation after Stevens-Johnson syndrome. *Ophthalmology* 1988 Apr;95(4):453-62
31. Furrer P, Mayer JM, Gurny R. Confocal microscopy as a tool for the investigation of the anterior part of the eye. *J Ocul.Pharmacol.Ther.* 1997 Dec;13(6):559-78
32. Garrity JA, Liesegang TJ. Ocular complications of atopic dermatitis. *Can.J Ophthalmol.* 1984 Feb;19(1):21-4
33. Gelender H, Forster RK. Papanicolaou cytology in the diagnosis and management of external ocular tumors. *Arch.Ophthalmol.* 1980 May;98(5):909-12
34. Gerner IL, Norregaard JC, Jensen OA, Prause JU. Conjunctival nevi in Denmark 1960-1980. A 21-year follow-up. *Ugeskr.Laeger* 1998 Jun 15;160(25):3728-31
35. Gillette TE, Chandler JW, Greiner JV. Langerhans cells of the ocular surface. *Ophthalmology* 1982 Jun;89(6):700-11
36. Gipson I, Joyce N, Zieske J. The anatomy and cell biology of the human cornea, limbus, conjunctiva, and adnexa. In: Foster CS, Azar D, Dohlman CH, editors. *Smolin and Thoft's The Cornea*. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams; 2004. 1-35
37. Gottlieb B, Brown AL, Jr., Winkelmann RK. Fine structure of the nevus cell. *Arch.Dermatol.* 1965 Jul;92(1):81-7
38. Grehn F. Nicht-infektiöse Konjunktivitis. In Grehn *Augenheilkunde*. Kapitel: 6.4.3.; 28 ed. Berlin: Springer Verlag; 2003. 97-9
39. Grehn F. Entzündung der Bindehaut (Konjunktivitis): Leitsymptome. In Grehn *Augenheilkunde*. Kapitel: 6.4.1; 28 ed. Berlin: Springer Verlag; 2003. 95-6
40. Grehn F. Infektiöse Konjunktivitis. In Grehn *Augenheilkunde*. Kapitel: 6.4.4; 28 ed. Berlin: Springer Verlag; 2003. 100-6
41. Grossniklaus HE, Green WR, Luckenbach M, Chan CC. Conjunctival lesions in adults. A clinical and histopathologic review. *Cornea* 1987;6(2):78-116
42. Hawkins AS, Yu J, Hamming NA, Rubenstein JB. Treatment of recurrent conjunctival papillomatosis with mitomycin C. *Am.J.Ophthalmol* 1999 Nov;128(5):638-40
43. Heiligenhaus A. Chronische Bindehautentzündung. Available from <http://www.uveitis-zentrum.de/chron%20BH%20Entzuendung.pdf>
44. Hovding G. Acute bacterial conjunctivitis. *Tidsskr.Nor Laegeforen.* 2004 Jun 3;124(11):1518-20
45. Hu Y, Adan ES, Matsumoto Y, Dogru M, Fukagawa K, Takano Y, Tsubota K, Fujishima H. Conjunctival in vivo confocal scanning laser microscopy in patients with atopic keratoconjunctivitis. *Mol.Vis* 2007;13:1379-89

46. Jakobiec FA. The ultrastructure of conjunctival melanocytic tumors. *Trans Am.Ophthalmol.Soc* 1984;82:599-752
47. Jakobiec FA, Folberg R, Iwamoto T. Clinicopathologic characteristics of premalignant and malignant melanocytic lesions of the conjunctiva. *Ophthalmology* 1989 Feb;96(2):147-66
48. Jalbert I, Stapleton F, Papas E, Sweeney DF, Coroneo M. In vivo confocal microscopy of the human cornea. *Br.J.Ophthalmol.* 2003 Feb;87(2):225-36
49. Jaros PA, DeLuise VP. Pingueculae and pterygia. *Surv.Ophthalmol.* 1988 Jul;33(1):41-9
50. Just T, Zeisner C, Stave J, Pau HW. Confocal laser-scanning microscopy to analyse the epithelium of the tongue. *Laryngorhinootologie* 2004 Feb;83(2):108-12
51. Kanski JJ, Spitznas M. Bindehaut. In *Lehrbuch der klinischen Ophthalmologie*. Kapitel: 4; Stuttgart; New York: Thieme Verlag; 1987. 53-74
52. Kessing SV. Mucous gland system of the conjunctiva. A quantitative normal anatomical study. *Acta Ophthalmol.(Copenh)* 1968;46(Suppl 95):9-133
53. Kirveskari J, Helinto M, Moilanen JA, Paavonen T, Tervo TM, Renkonen R. Hydrocortisone reduced in vivo, inflammation-induced slow rolling of leukocytes and their extravasation into human conjunctiva. *Blood* 2002 Sep 15;100(6):2203-7
54. Kobayashi A, Sugiyama K. In vivo corneal confocal microscopic findings of palisades of Vogt and its underlying limbal stroma. *Cornea* 2005 May;24(4):435-7
55. Kobayashi A, Yoshita T, Sugiyama K. In vivo laser and white-light confocal microscopic findings of human conjunctiva. *Ophthalmic Surg.Lasers Imaging* 2004 Nov;35(6):482-4
56. Kruse FE, Cursiefen C, Seitz B, Volcker HE, Naumann GO, Holbach L. Classification of ocular surface disease. Part 1. *Ophthalmologie* 2003 Nov;100(11):899-915
57. Le QH, Hong JX, Zhu WQ, Sun XH, Xu JJ. In vivo laser scanning confocal microscopy of vernal keratoconjunctivitis. *Clin.Experiment.Ophthalmol* 2010 Jul 19;
58. Le QH, Wang WT, Hong JX, Sun XH, Zheng TY, Zhu WQ, Xu JJ. An in vivo confocal microscopy and impression cytology analysis of goblet cells in patients with chemical burns. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(3):1397-400
59. Leduc C, Dupas B, Ott-Benoist AC, Baudouin C. Advantages of the in vivo HRT2 corneal confocal microscope for investigation of the ocular surface epithelia. *J Fr.Ophtalmol.* 2004;27(9-C1):978-86

60. Lee GA, Hirst LW. Ocular surface squamous neoplasia. *Surv.Ophthalmol.* 1995 May;39(6):429-50
61. Lee WR. The Conjunctival Biopsy. In *Ophthalmic Histopathology*. Kapitel: 11; 2nd ed. London: Springer Verlag; 2002. 329-64
62. Lemp MA, Dilly PN, Boyde A. Tandem-scanning (confocal) microscopy of the full-thickness cornea. *Cornea* 1985;4(4):205-9
63. Lommatzsch PK, Lommatzsch RE, Kirsch I, Fuhrmann P. Therapeutic outcome of patients suffering from malignant melanomas of the conjunctiva. *Br.J.Ophthalmol.* 1990 Oct;74(10):615-9
64. Lommatzsch PK, Werschnik C. Malignant conjunctival melanoma. Clinical review with recommendations for diagnosis, therapy and follow-up. *Klin.Monatsbl.Augenheilkd.* 2002 Oct;219(10):710-21
65. Luger A. Epidemiology, clinical aspects and therapy of infections with *Chlamydia trachomatis* serotype D-K. *Wien.Klin.Wochenschr.* 1987 Jan 9;99(1):1-14
66. Marghoob AA, Charles CA, Busam KJ, Rajadhyaksha M, Lee G, Clark-Loeser L, Halpern AC. In vivo confocal scanning laser microscopy of a series of congenital melanocytic nevi suggestive of having developed malignant melanoma. *Arch.Dermatol.* 2005 Nov;141(11):1401-12
67. Marner K. 'Snake-like' appearance of nuclear chromatin in conjunctival epithelial cells from patients with keratoconjunctivitis sicca. *Acta Ophthalmol.(Copenh)* 1980 Oct;58(5):849-53
68. Massig JH, Preissler M, Wegener AR, Gaida G. Real-time confocal laser scan microscope for the examination and diagnosis of the eye in vivo. *Appl.Opt.* 1994;33(4):690-4
69. Masters BR. Three-dimensional microscopic tomographic imaging of the cataract in a human lens in vivo. *Opt.Express.* 1998;3(9):332-8
70. Masters BR, Bohnke M. Confocal microscopy of the human cornea in vivo. *Int.Ophthalmol.* 2001;23(4-6):199-206
71. Masters BR, Bohnke M. Three-dimensional confocal microscopy of the human cornea in vivo. *Ophthalmic Res.* 2001 May;33(3):125-35
72. Mathers WD, Sutphin JE, Folberg R, Meier PA, Wenzel RP, Elgin RG. Outbreak of keratitis presumed to be caused by *Acanthamoeba*. *Am.J.Ophthalmol.* 1996 Feb;121(2):129-42
73. Maurice DM. A scanning slit optical microscope. *Invest Ophthalmol.* 1974 Dec;13(12):1033-7

74. Messmer EM, Torres SE, Mackert MI, Zapp DM, Kampik A. In vivo confocal microscopy in blepharitis. *Klin.Monatsbl.Augenheilkd.* 2005 Nov;222(11):894-900
75. Messmer EM, Zapp DM, Mackert MJ, Thiel M, Kampik A. In vivo confocal microscopy of filtering blebs after trabeculectomy. *Arch.Ophthalmol.* 2006 Aug;124(8):1095-103
76. Migliori ME, Putterman AM. Recurrent conjunctival papilloma causing nasolacrimal duct obstruction. *Am J Ophthalmol.* 1990 Jul 15;110(1):17-22
77. Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 1988;(4):128-38
78. Montagna W. Comparative anatomy and physiology of the skin. *Arch.Dermatol.* 1967 Oct;96(4):357-63
79. Naumann GOH. Anatomie und Histologie. In: Doerr W, Seifert G, editors. *Pathologie des Auges.* Kapitel: A; 2 ed. Berlin: Springer Verlag; 1997. 379-84
80. Naumann GOH. Vaskuläre Tumore. In: Doerr W, Seifert G, editors. *Pathologie des Auges.* Kapitel: G.V.2.; 2. ed. Berlin: Springer Verlag; 1997. 486-9
81. Neumann R, Dutt CJ, Foster CS. Immunohistopathologic features and therapy of conjunctival lichen planus. *Am J Ophthalmol.* 1993 Apr 15;115(4):494-500
82. Nolan GR, Hirst LW, Wright RG, Bancroft BJ. Application of impression cytology to the diagnosis of conjunctival neoplasms. *Diagn.Cytopathol.* 1994;11(3):246-9
83. Paridaens AD, McCartney AC, Curling OM, Lyons CJ, Hungerford JL. Impression cytology of conjunctival melanosis and melanoma. *Br.J.Ophthalmol.* 1992 Apr;76(4):198-201
84. Paridaens AD, Minassian DC, McCartney AC, Hungerford JL. Prognostic factors in primary malignant melanoma of the conjunctiva: a clinicopathological study of 256 cases. *Br.J.Ophthalmol.* 1994 Apr;78(4):252-9
85. Petrán M, Hadravský M, Egger M, Galambos R. Tandem-scanning reflected-light microscope. *J Opt Soc Am* 1968;58:661-4
86. Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Clinical confocal microscopy. *Curr.Opin.Ophthalmol.* 1998 Aug;9(4):59-65
87. Pfister DR, Cameron JD, Krachmer JH, Holland EJ. Confocal microscopy findings of *Acanthamoeba* keratitis. *Am.J.Ophthalmol.* 1996 Feb;121(2):119-28
88. Pichierri P, Martone G, Loffredo A, Traversi C, Polito E. In vivo confocal microscopy in a patient with conjunctival lymphoma. *Clin.Experiment.Ophthalmol* 2008 Jan;36(1):67-9

89. Rath R, Stave J, Guthoff R, Giebel J, Tost F. In vivo imaging of the conjunctival epithelium using confocal laser scanning microscopy. *Ophthalmologe* 2006 May;103(5):401-5
90. Rich LF, Hanifin JM. Ocular complications of atopic dermatitis and other eczemas. *Int.Ophthalmol.Clin.* 1985;25(1):61-76
91. Roat MI, Ohji M, Hunt LE, Thoft RA. Conjunctival epithelial cell hypermitosis and goblet cell hyperplasia in atopic keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol.* 1993 Oct 15;116(4):456-63
92. Rohrbach JM, Wohlrab TM, Kuper K. Lymphangioma of the conjunctiva. *Klin.Monatsbl.Augenheilkd.* 1997 Sep;211(3):211-2
93. Romano AC, Espana EM, Yoo SH, Budak MT, Wolosin JM, Tseng SC. Different cell sizes in human limbal and central corneal basal epithelia measured by confocal microscopy and flow cytometry. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 2003 Dec;44(12):5125-9
94. Sacks E, Rutgers J, Jakobiec FA, Bonetti F, Knowles DM. A comparison of conjunctival and nonocular dendritic cells utilizing new monoclonal antibodies. *Ophthalmology* 1986 Aug;93(8):1089-97
95. Saw SM, Tan D. Pterygium: prevalence, demography and risk factors. *Ophthalmic Epidemiol.* 1999 Sep;6(3):219-28
96. Schechter BA, Rand WJ, Velazquez GE, Williams WD, Starasoler L. Treatment of conjunctival papillomata with topical interferon Alfa-2b. *Am.J.Ophthalmol* 2002 Aug;134(2):268-70
97. Seamone CD, Jackson WB. Immunology of the external eye. In: Tasman W, Jaeger EA, editors. *Duane's clinical ophthalmology.* Kapitel: 2; 4 ed. Philadelphia, New York: Lipincott-Raven; 1997. 1-52
98. Seitz B, Fischer M, Holbach LM, Naumann GO. Differential diagnosis and prognosis of 112 excised epibulbar epithelial tumors. *Klin.Monatsbl.Augenheilkd.* 1995 Oct;207(4):239-46
99. Seregard S. Conjunctival melanoma. *Surv.Ophthalmol.* 1998 Jan;42(4):321-50
100. Seregard S, Kock E. Conjunctival malignant melanoma in Sweden 1969-91. *Acta Ophthalmol.(Copenh)* 1992 Jun;70(3):289-96
101. Sheppard CJ, Cogswell CJ. Optimization of the confocal microscopy system. *Trans R Microsc Soc* 1990;1:231-4
102. Shields CL, Demirci H, Karatza E, Shields JA. Clinical survey of 1643 melanocytic and nonmelanocytic conjunctival tumors. *Ophthalmology* 2004 Sep;111(9):1747-54

103. Shields CL, Fasiuddin A, Mashayekhi A, Shields JA. Conjunctival nevi: clinical features and natural course in 410 consecutive patients. *Arch.Ophthalmol.* 2004 Feb;122(2):167-75
104. Shields CL, Shields JA. Tumors of the conjunctiva and cornea. *Surv.Ophthalmol.* 2004 Jan;49(1):3-24
105. Shields CL, Shields JA, Gunduz K, Cater J, Mercado GV, Gross N, Lally B. Conjunctival melanoma: risk factors for recurrence, exenteration, metastasis, and death in 150 consecutive patients. *Arch.Ophthalmol.* 2000 Nov;118(11):1497-507
106. Sjo N, Heegaard S, Prause JU. Conjunctival papilloma. A histopathologically based retrospective study. *Acta Ophthalmol.Scand.* 2000 Dec;78(6):663-6
107. Sjo NC, Heegaard S, Prause JU, von BC, Lindeberg H. Human papillomavirus in conjunctival papilloma. *Br.J Ophthalmol.* 2001 Jul;85(7):785-7
108. Spencer WH. Conjunctiva. In: Spencer W.H., editor. *Ophthalmic Pathology.* Philadelphia, PA: Saunders; 1985. 109-16
109. Statistisches Bundesamt Deutschland. Gestorbene nach Todesursachen. Available from <http://www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab19.php>
110. Stave J, Zinser G, Grummer G, Guthoff R. Modified Heidelberg Retinal Tomograph HRT. Initial results of in vivo presentation of corneal structures. *Ophthalmologie* 2002 Apr;99(4):276-80
111. Steuhl KP. Ultrastructure of the conjunctival epithelium. *Dev.Ophthalmol.* 1989;19:1-104
112. Steuhl KP, Sitz U, Knorr M, Thanos S, Thiel HJ. Age-dependent distribution of Langerhans cells within human conjunctival epithelium. *Ophthalmologie* 1995 Feb;92(1):21-5
113. Sugiura S, Wakui K, Kondo E. Comparative anatomical and embryological studies on the polygonal cell system in the basal cell layer of the cornea. *Acta Soc Ophthalmol Jap* 1962;66:1010-33
114. Thorne JE, Jabs DA, Nikolskaia OV, Mimouni D, Anhalt GJ, Nousari HC. Lichen planus and cicatrizing conjunctivitis: characterization of five cases. *Am J Ophthalmol.* 2003 Aug;136(2):239-43
115. Tole DM, McKelvie PA, Daniell M. Reliability of impression cytology for the diagnosis of ocular surface squamous neoplasia employing the Biopore membrane. *Br.J.Ophthalmol.* 2001 Feb;85(2):154-8
116. Tuomaala S, Aine E, Saari KM, Kivela T. Corneally displaced malignant conjunctival melanomas. *Ophthalmology* 2002 May;109(5):914-9

117. Wang Y, Zhao F, Zhu W, Xu J, Zheng T, Sun X. In vivo confocal microscopic evaluation of morphologic changes and dendritic cell distribution in pterygium. *Am.J Ophthalmol* 2010 Aug 4;150(5):650-5
118. Weiss JS, Perusse P, Reale F. Tear cytology in conjunctival melanoma. *Am.J.Ophthalmol.* 1991 May 15;111(5):648-9
119. Wilson T, Sheppard CJ. Theory and practice of scanning optical microscopy. Academic Press London 1984;
120. Winchester K, Mathers WD, Sutphin JE. Diagnosis of *Aspergillus* keratitis in vivo with confocal microscopy. *Cornea* 1997 Jan;16(1):27-31
121. Yang J, Foster CS. Squamous cell carcinoma of the conjunctiva. *Int.Ophthalmol.Clin.* 1997;37(4):73-85

VIII. Publikationen

1) In vivo confocal microscopy of normal conjunctiva and conjunctivitis.

Cornea. 2006 Aug; 25(7): 781-8.

Messmer EM, Mackert MJ, Zapp DM, Kampik A.

2) In vivo confocal microscopy of pigmented conjunctival tumors.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2006 Nov; 244(11): 1437-45.

Messmer EM, Mackert MJ, Zapp DM, Kampik A.

3) In vivo confocal microscopy of filtering blebs after trabeculectomy.

Arch Ophthalmol. 2006 Aug; 124(8): 1095-103.

Messmer EM, Zapp DM, Mackert MJ, Thiel M, Kampik A.

4) In vivo confocal microscopy in blepharitis.

Klin Monbl Augenheilkd. 2005 Nov; 222(11): 894-900.

Messmer EM, Torres Suárez E, Mackert MJ, Zapp DM, Kampik A.

IX. Danksagung

Ich bedanke mich bei

Herrn Prof. Dr. med. Anselm Kampik, Direktor der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Überlassung des Doktorarbeitsthemas, sowie die Möglichkeit an seiner Klinik forschen, lehren, lernen und arbeiten zu dürfen.

Frau PD Dr. med. Elisabeth Messmer, Oberärztin an der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die ständige Anleitung, intensive Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit. Mit Ihrer Hilfe war es mir möglich an Kongressen und Meetings im In- und Ausland teilzunehmen. Durch Sie konnte ich bei zahlreichen Veröffentlichungen mitwirken.

den Mitarbeitern der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, insbesondere bei Frau Pressler und Frau Serbin, die mich bei den histologischen Arbeiten tatkräftig unterstützten, als auch bei Frau Merz und Frau Maltzahn, für die Fotodokumentation.

den bereitwilligen Probanden aus dem Freundeskreis, als auch den Kollegen aus der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität.

und insbesondere meinen Eltern Dr. med. Berthold und Hannelore Mackert, die mich psychisch und nutritiv physisch unterstützten.