

Laserinduzierte Hornhautläsionen beim Kaninchen

H. Bahte und B. Rassow

Abteilung für Medizinische Optik (Abteilungsvorsteher: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. B. Rassow) der
Universitäts-Augenklinik Hamburg (Direktor: Prof. Dr. h.c. H. Sauter)

Lesions of the Rabbit Cornea Produced by Laser Light

Summary. Threshold radiant exposure of the cornea of gray rabbits was evaluated for Argon- and YAG-Laser light.

Threshold for the Argonlaser is about 15 kJ/cm^2 (exposure time 200 ms to 2 s, spot size $65 \mu\text{m}$).

For experimental and methodical reasons the value for the YAG-Laser (115 kJ/cm^2) is of limited accuracy.

The healing process of supraliminal lesions of the cornea is observed clinically and histologically up to six weeks following exposure to laser radiation.

Zusammenfassung. Mit einem YAG- und einem Argon-Laser wurden die Hornhäute lebender, grauer Kaninchen bestrahlt, um die Grenzwelligendosis beider Lasertypen für Kaninchenhornhäute zu ermitteln. Es ergab sich für den YAG-Laser mit sehr kurzen Strahlungsimpulsen eine Schwellendosis von 115 kJ/cm^2 . Für den Argon-Laser liegt der entsprechende Wert (bei Bestrahlungszeiten zwischen 200 ms und 2 s) bei 15 kJ/cm^2 . Der erste Wert hat wegen methodischer und experimenteller Schwierigkeiten nur einen orientierenden Wert.

Es wurde weiterhin der Heilungsverlauf überschwelliger Läsionen bis zu 6 Wochen nach Bestrahlung beobachtet.

I. Einleitung

Zur Lichtkoagulation der Netzhaut finden in den letzten Jahren Argon-Lasergeräte im steigenden Maße Anwendung. Ein wesentlicher Vorteil ist dabei, daß dieser Laser sein Licht (Wellenlänge um 500 nm) nur im Wellenlängenbereich der maximalen Transmission der optischen Medien emittiert. Dies bedeutet, daß 90–95 % der auf die Hornhaut auftreffenden Energie die Netzhaut auch erreicht und nur 5–10 % vorher absorbiert wird. Diese geringe Absorption des Argonlaserlichtes kann jedoch, wenn der Strahl auf die vorderen Augenmedien fokussiert ist und somit dort sehr hohe Leistungsdichten erreicht werden, bereits Schädigungen in diesen Schichten hervorrufen.

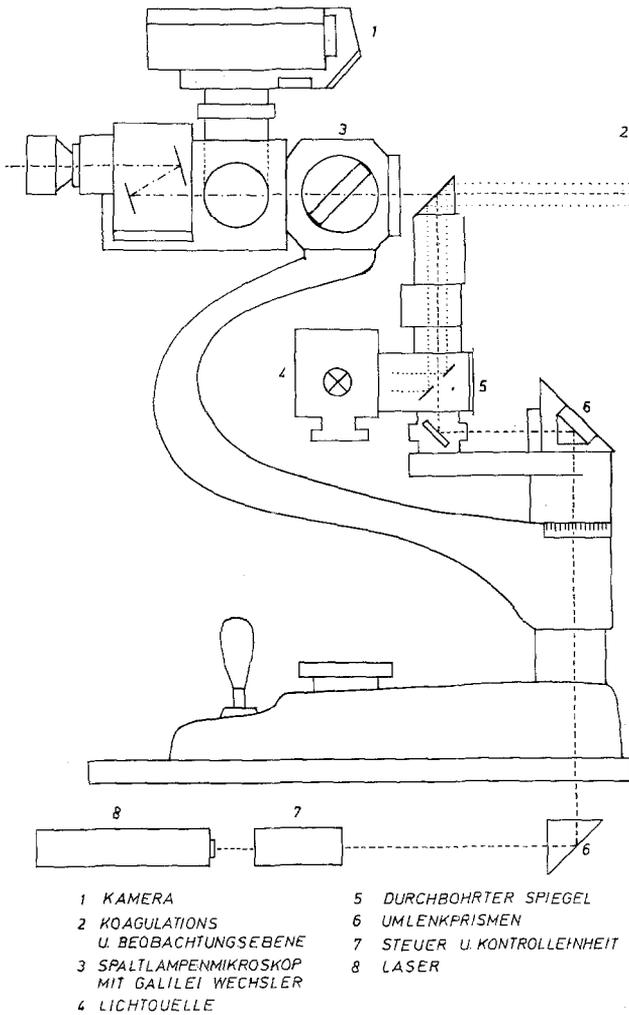


Abb. 1. Argon-Laser: Schematische Darstellung des Laserstrahlverlaufes zwischen Lichtquelle und Koagulationsebene

Der Anteil, der vor der Netzhaut absorbierten Energie steigt schnell auf 80–90 % an, wenn man zu Lasern anderer Wellenlängenbereiche, zu den Infrarot- und Ultraviolettlasern, übergeht. Derartige Lasergeräte werden in steigender Zahl in Wissenschaft und Technik eingesetzt, so daß die Frage nach der Schädigungsschwelle der vorderen okulären Medien von besonderem Interesse wird. Darüber hinaus ist aber auch ein therapeutischer Einsatz der verschiedensten Lasertypen am vorderen Augenabschnitt immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Auch hierfür ist eine Kenntnis der Schädigungsgrenzen in diesem Bereich des Auges Voraussetzung. Untersuchungen in dieser Richtung wurden von Campbell (1968), Fine et al. (1968) und Hallmann et al. (1968) durchgeführt. Ziel unserer Messungen war neben der

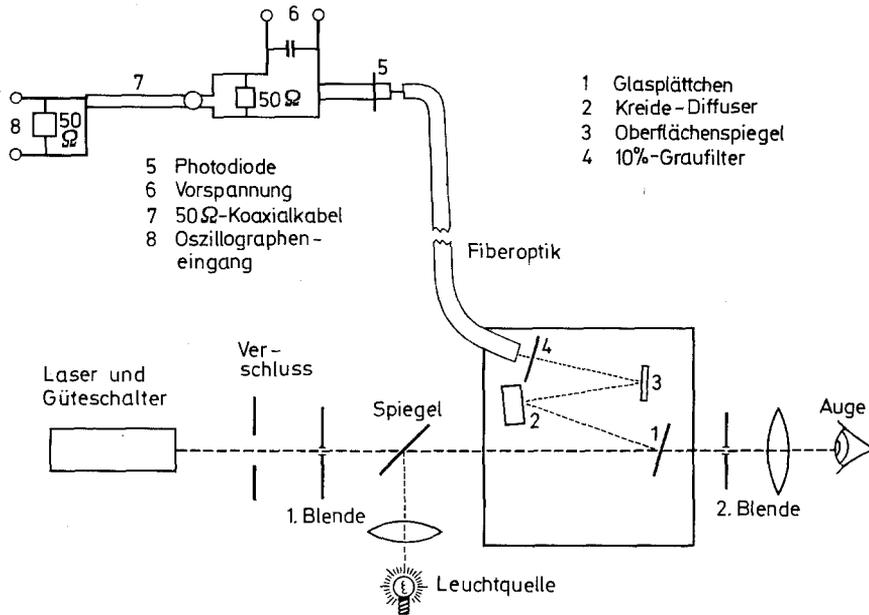


Abb. 2. Prinzipieller Aufbau der YAG-Laserbestrahlungsvorrichtung und die dazugehörige Meßanlage

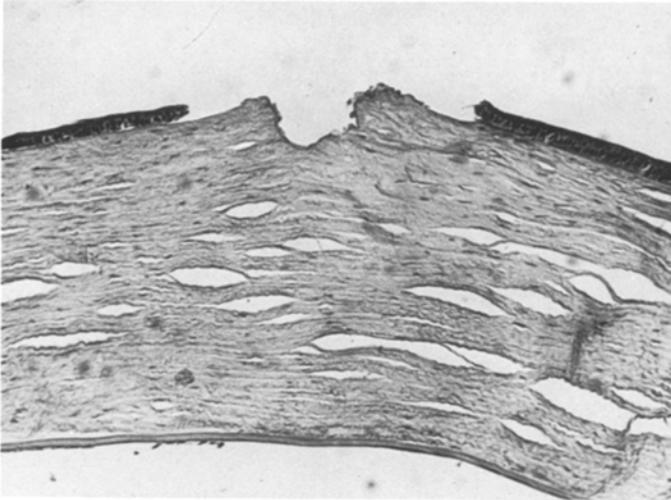
Überprüfung der Schwellendosis der Hornhaut für YAG- und Argonlaserlicht auch die histologische und klinische Kontrolle des Heilungsverlaufs von überschwelligen Läsionen.

II. Methodik

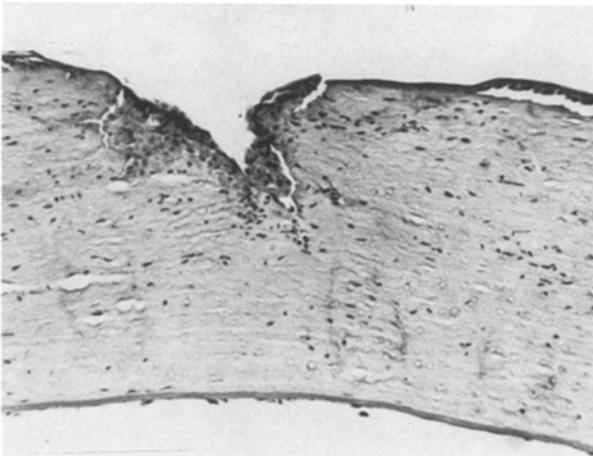
Es wurde ein Argonlaser (Fa. Coherent Radiation, Modell 53), der über bewegliche Spiegel und Prismen an einer Zeiss-Spaltlampe angeschlossen war (Rassow, 1973), verwendet. Bei einem Durchmesser des fokussierten Laserstrahls von etwa $65 \mu\text{m}$ stand eine eingestrahlte Leistung an der Cornea zwischen 100 mW und 5 W zur Verfügung. Durch einen elektromagnetischen Verschluss ließ sich die Bestrahlungszeit zwischen 20 ms und Dauerbestrahlung kontinuierlich einstellen. Den Strahlengang zeigt die Abbildung 1.

Bei dem zweiten Laser handelt es sich um einen YAG-Laser (Siemens SLY 3Q1), dessen Emission im nahen Infrarot (1060 nm) erfolgt. Der Laser arbeitet im Q-switch-Betrieb und hat bei 50 Hz Folgefrequenz und ca. 10–30 ns Impulsdauer eine Impulspitzenleistung von max. 800 W. Durch Verwendung verschiedener Fokussierungslinsen ließen sich Brennpunkte von 120–200 μm Fleckdurchmesser erzeugen (Abb. 2).

Während die Bestrahlungsdaten am Argonlaser recht genau bekannt waren und auf wenige Prozent reproduzierbar eingestellt werden konnten, gab es bei der Messung am YAG-Laser erhebliche methodische Schwierigkeiten, die einerseits in einer Instabilität des Lasers und zum zweiten in der Wellenlänge des Laserlichtes begründet waren. Letztere machte ein exaktes Justieren und Fixieren der zu behandelnden Tiere während der Dauer der Bestrahlungszeit, die für eindeutige Läsionen bis zu



3



4

Abb. 3. YAG-Laser-Läsion in Hornhautoberfläche, 1 Std nach Bestrahlung (680 mW, $f = 1,4$ cm); Epithel fehlt, Stroma aufgequollen, oberflächliche Fasern im Schußbereich unterbrochen. Keine zellige Reaktion. Artifizielle Spalten im Stroma. HE, Vergr. 9,3 X

Abb. 4. YAG-Laserkrater, (5 Tage, 720 mW, $f = 1,4$ cm): Bis zur Mitte der Hornhautdicke reichend und mit einem unregelmäßigen Epithel ausgekleidet. Im Hornhautstroma zeigt sich eine diffuse leukocytäre Infiltration. Das proliferierte Epithel füllt den Stromadefekt z.T. aus und ist peripher davon stark abgeflacht. HE, Vergr. 6,3 x

20 s betrug, recht schwierig. Die Fehlerbreiten der Ergebnisse mit dem YAG-Laser liegen dementsprechend sehr viel höher.

Zur Verwendung kamen graue Kaninchen (Irisfarbe grau-braun) von durchschnittlich 2–3 kg Gewicht, die mit Nembutal i.v. anästhesiert wurden. Während der Bestrahlungszeiten wurde die Hornhaut der Tiere ständig mit physiologischer Kochsalzlösung von Zimmertemperatur gespült, nachdem beobachtet wurde, daß sonst bei längeren Bestrahlungszeiten ein Austrocknungsvorgang einsetzt. Dies zeigt sich darin, daß in den ersten Sekunden keine Reaktionen auftraten und dann plötz-

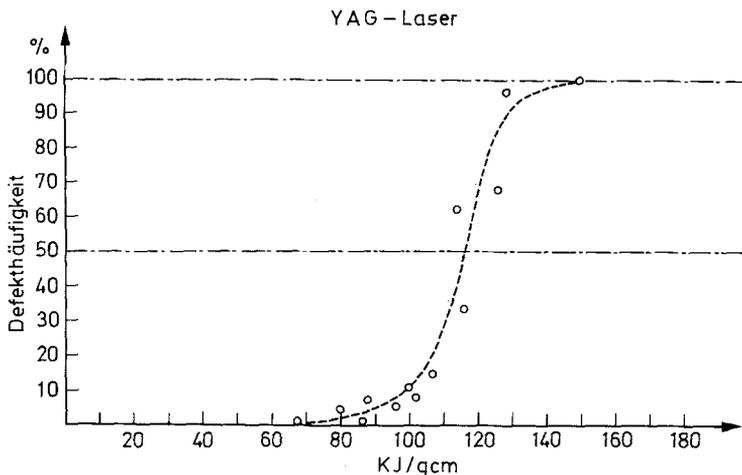


Abb. 5. Graphische Darstellung der prozentualen Defekthäufigkeit in Abhängigkeit von der YAG-Laserenergiedichte

lich innerhalb von wenigen Millisekunden sehr starke Läsionen entstehen. Bei ständiger Spülung wurde diese Vorgänge nicht beobachtet.

Die meisten Tiere wurden sofort nach der Bestrahlung enukleiert, bei den restlichen wurde der Abheilungsprozess bis zu 6 Wochen beobachtet. Das Färben der angefertigten histologischen Schnitte erfolgte nach H.E.

III. Klinische und histologische Ergebnisse

1. YAG-Laser

Lichtmikroskopisch sicher verwertbare Befunde erzielte man mit den zwei kleinsten Brennflecken (110 und 120 μm) unter Verwendung der beiden stärksten Leistungsstufen des Lasers (zeitliche Mittelwerte ca. 600 und 800 mW). Die Einteilung der histologischen Ergebnisse erfolgte entsprechend nach geringgradiger und nach maximaler Bestrahlung. Das histologische Bild ist einheitlich: direkt nach geringgradiger Bestrahlung zeigt sich eine Kondensierung und Abtragung der beiden oberen Epithelschichten. Die Basalzellschicht und Basalmembran können erhalten bleiben. Große Intensitäten erzeugen regelrechte Ulcera mit perifokalen Ödemen. Das Parenchym erscheint verquollen (Abb. 3). Schon nach 12 Std kann das Ödem verschwunden sein, und es beginnt eine vom Rande ausgehende Epithelialisierung des Kraters. Im Stroma erscheint nach 4–5 Tagen eine leucocytäre Infiltration; nach weiteren 2 Tagen mit deutlicher eosinophiler Tüpfelung sind die Leucocyten zum Krater perifokal angeordnet (Abb. 4). Weder eine Vascularisation noch eine veränderte Anfärbbarkeit bei Haematoxilin Eosin konnte beobachtet werden. Nach etwa 14 Tagen am Ende der entzündlichen Phase bilden sich Fibroblasten, welche schließlich zur Narbenbildung in der nunmehr verdickten Hornhaut führen. Von einer manchmal beobachteten Hyperplasie abgesehen, stellt sich das Epithel jetzt wieder unauffällig dar.

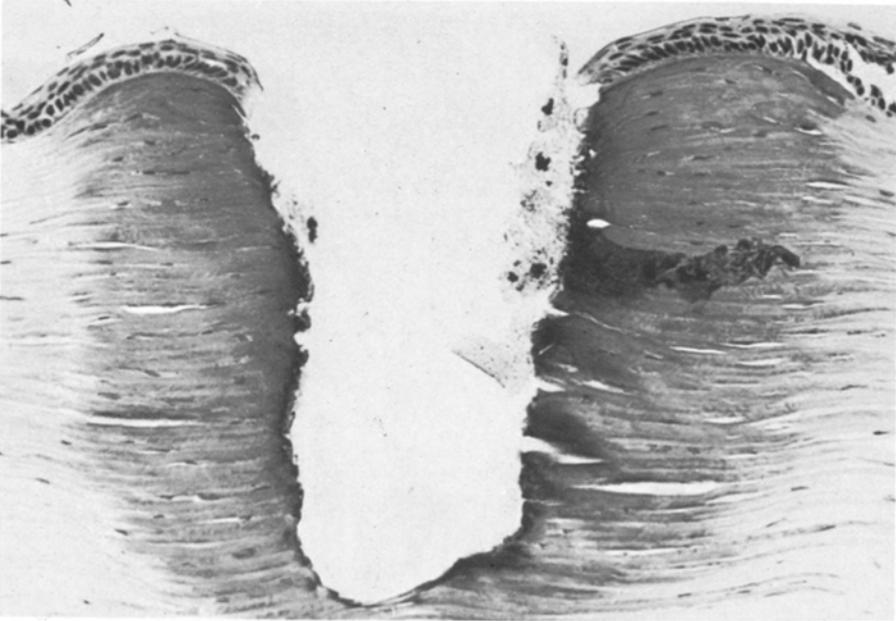
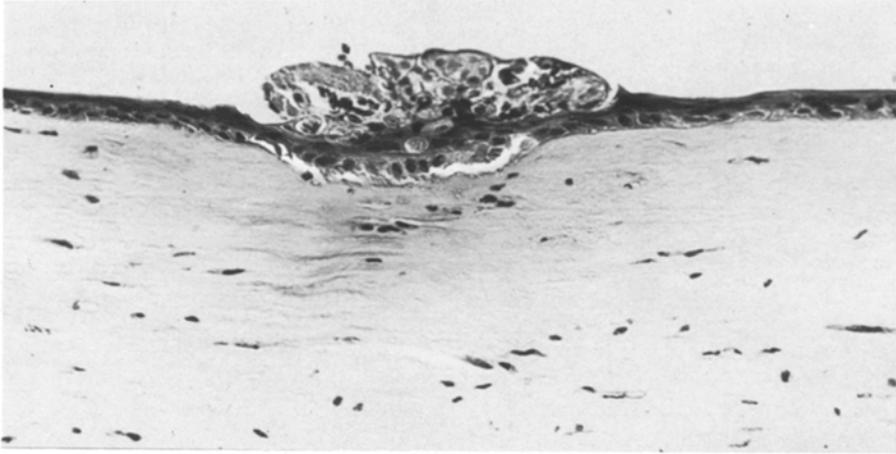


Abb. 6. Schwerer Argonlaser-Epitheldefekt, (24 Std, 1,95 W, 0,2 sec): Das eingedellte komprimierte Stroma hat ortständige Keratocyten verloren. Das Epithel darüber ist ungeordnet proliferiert und weist Zellen auf. HE, Vergr. 16 X

Abb. 7. Argon-Laserkrater, (1 Std, 3,25 W, 1 sec): In das hintere Stroma reichender Argon-Laserkrater. Das anliegende Epithel scheint unverändert; die Kollagenfasern des Stromas wirken in der Nähe des Kraters kondensiert und verbacken. Die unterschiedliche Anfärbung ist zu erkennen. HE, Vergr. 16 X

Die in Abbildung 5 dargestellte Kurve zeigt die Abhängigkeit der prozentualen Häufigkeit aller erkennbaren Defekte (gemessen an der Gesamtzahl der Bestrahlungen) von der Leistungsdichte.

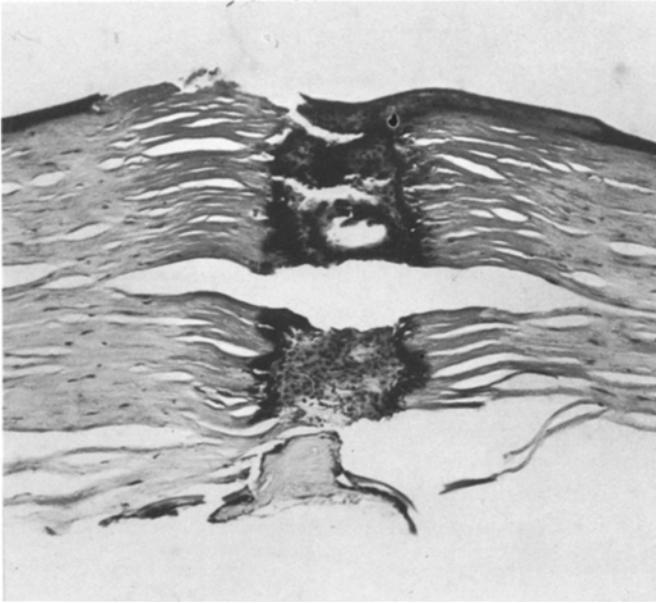


Abb. 8. Hornhautperforation durch den Argonlaser, (3 Tage, 3,25 W, 2 sec): Das verbrannte Epithel ist verdickt und strukturlos; der Defekt ist mit einem Epithelzellenpfropf ganz ausgefüllt; von der vorderen Augenkammer her ist ein fibrinöser Pfropf vorgelagert, der ödematös verbreitert, basophil angefärbt ist und Kerntrümmern enthält. HE, Vergr. 6,3 X

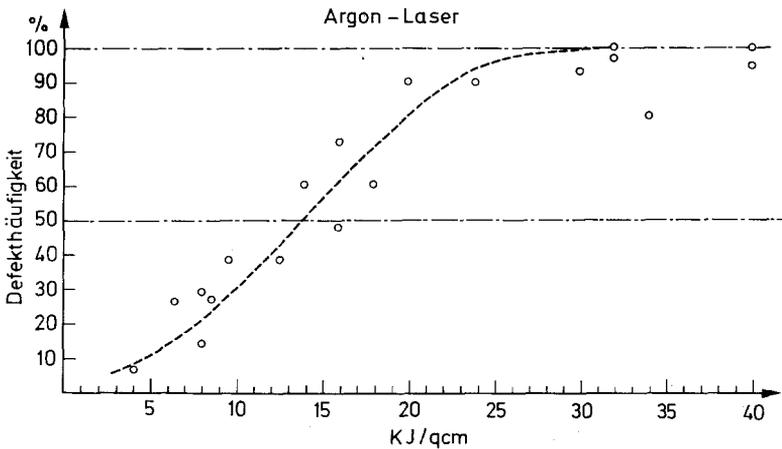


Abb. 9. Graphische Darstellung der prozentualen Defekthäufigkeit in Abhängigkeit von der Argon-Laserenergiedichte

2. Argon-Laser

Gerade über der Läsionsschwelle liegende Energiemengen verursachen Hornhautdefekte, welche nur innerhalb des Hornhautepithels liegen (Abb. 6) und bis zu 6 Tagen beobachtet werden können. Erst eine weit höhere Energie erzeugte Stromadefekte mit einem mikroskopisch zu verfolgenden Heilungsverlauf von über 14 Tagen (Abb. 7). Bei maximaler Laserleistung konnten z.T. Perforationen beobachtet werden, welche spätestens nach 3 Tagen von der vorderen Augenkammer her mit einem Fibrinpfropf verschlossen waren (Abb. 8). Perifokal zeigte sich dann ein starkes Ödem mit Verlust der Doppelbrechung, aber basophiler Anfärbbarkeit der Kollagenfasern. Die Basophilie war noch nach 3 Wochen zu erkennen.

Nekrotisches Epithel färbte sich unter Haematoxilin Eosin eosinrot an und erschien im weiteren Heilungsverlauf z.T. als Epithelsequester. Bestrahlungsulcera im Stroma wurden frühzeitig vom Epithel ausgekleidet und angefüllt. In solchen Fällen konnte im Kraterfundus stark veränderte Epithelzellen gefunden werden. In nur einem geringem Umfang traten eosinrot auffärbbare Leucocyten und junge Fibrocyten auf. Abbildung 9 zeigt die Defekthäufigkeit als Funktion der Leistungsdichte der Strahlung des Argonlasers.

IV. Diskussion

1. Schwellenwerte

Unter Grenzschwelldosis wollen wir diejenige Energiedichte verstehen, bei der mit 50%iger Wahrscheinlichkeit eine makroskopisch sichtbare Läsion innerhalb einer Std hervorgerufen wird. Diese liegen weit über den Werten, welche bei der Netzhautkoagulation verwendet werden. Ursache ist die hohe Transparenz der brechenden Augenmedien für sichtbares Licht. Mit starker Fokussierung des Laserstrahls ist es dennoch möglich, Effekte auf der nicht 100%ig transparenten Kaninchenhornhaut zu erzielen.

YAG-Laser. Bei der Wellenlänge des YAG-Laser von $\lambda = 1,06 \mu\text{m}$ beträgt der Absorptionskoeffizient der Hornhaut 30 % (Geeraets et al., 1968). Die Grenzschwelldosis liegt nach unseren Messungen um 115 kJ/cm^2 (Abb. 5). Diese durch zeitliche Mittelwertbildung erhaltene Zahl ist jedoch nur bedingt mit der Grenzschwelldosis des Argon-Lasers vergleichbar; denn der YAG-Laser gibt seine Energie in Impulsen von 30 nsec Dauer bei einer Folgefrequenz von 50 Hz ab. Der zeitliche Energieverlauf innerhalb eines Impulses war nicht bekannt. Der zeitliche Abstand zweier Impulse beträgt 20 ms und damit verhalten sich Bestrahlungs- zu Pausenzeit wie $1:10^6$. Daher ist trotz der Trägheit von Wärmeausgleichsvorgängen die einfache Addition der Wirkung der einzelnen Impulse unzulässig. Beim Eintreffen eines Impulses ist die Wirkung des vorhergehenden weitgehend abgeklungen. Da, wie oben erläutert, auch erhebliche experimentelle Schwierigkeiten beim YAG-Laser auftraten kann, der angegebene Grenzschwelldosiswert nur orientierenden Charakter haben.

Argon-Laser. Die Absorption in der Hornhaut beträgt für die Wellenlänge des Argon-Lasers 20 % (Geeraets et al., 1968). Der gefundene Grenzschwelldosiswert für Hornhaut-

läsionen an Kaninchen ergibt sich zu 15 kJ/cm^2 (Abb. 9). Diese Werte gelten für kontinuierliche Bestrahlungszeiten von 200 ms bis etwa 2 s. Bei kürzeren Einstrahlzeiten, für die ein gepulster Argon-Laser benötigt würde, ist mit einer höheren Energieschwelle zu rechnen.

2. Überschwellige Laserbestrahlungen

YAG-Laser. Laserbestrahlungen der tierischen Hornhaut wurden bisher meist mit einem CO_2 -Laser vorgenommen (Fine et al., 1968; Geeraets et al., 1969; Leibowitz et al., 1969; Campbell et al., 1968; Peppers et al., 1969). Die Resultate unserer Untersuchung sind am ehesten vergleichbar mit den Ergebnissen an einem gepulstem Erbium-Laser (Lund et al., 1970) und einem Neodym-Laser (Campbell et al., 1968) und sind mit diesen in guter Übereinstimmung.

Als bisher nicht beobachtete Befunde sind zu nennen:

- 1) die nach mehreren Tagen einsetzende Infiltration eosinophil anfärbbarer Granulozyten und
- 2) die fehlende Vascularisation der Hornhautbestrahlungsdefekte.

Argon-Laser. Da Bestrahlungen des Auges mit diesem Lasertyp sich bisher überwiegend auf die Netzhaut konzentrierten, bleibt als vergleichbare Arbeit jene von Hallmann et al. (1968). Er verwendete einen Argon-Laser mit einer Ausgangsleistung von nur 3 mW, mit einem Brennfleckdurchmesser von 0,5 mm und einer Brennweite von 10 cm. Bei einer Bestrahlungszeit bis zu 2 min erreichte er hiermit ödematöse Stromaveränderungen mit dazugehörigen Epitheldefekten.

Demgegenüber waren bei sonst ähnlichen Befunden in der vorliegenden Arbeit ein Basophilie und Verlust der Doppelbrechung der Kollagenfasern im perifokalen Bereich der Läsionen auffällig. Als Ursache könnte die durch starke Hitzeentwicklung hervorgerufene Freisetzung von basophilen Kernbestandteilen herangezogen werden oder das Entstehen von Mucopolysacchariden nach Bestrahlung. Für die letzte Annahme spricht die vergleichbare histologische Anfärbbarkeit von Teilen der Hornhaut, bedingt durch das Auftreten von sauren Mucopolysacchariden bei Arbeitern, welche mit dem Farbstoff Hydrochinon in Kontakt gekommen sind (Naumann, 1966).

Weiterhin ist das Erscheinen von stark veränderten Epithelzellen im Fundus tieferreichender Bestrahlungsdefekte erwähnenswert und, gemessen an den YAG-Laser-Befunden, eine geringgradige, perifokale granulozytäre Infiltration.

Literatur

- Campbell, C.J.: Selected ocular effects from an experimental neodymium laser. Trans. Amer. Opth. Soc. 66, 636–672 (1968)
- Campbell, C.J.; Rittler, M.C., Bredemeier, H., Wallace, R.A.: Ocular effects produced by experimental lasers: II Carbon dioxide laser. Amer. J. Opth. 66, 604–614 (1968)

- Campbell, C.J., Rittler, M.C., Innis, R.E., Shiner, W.H.: Ocular effects produced by experimental laser: III Neodymium laser. *Amer. J. Ophth.* **66**, 614–632 (1968)
- Fine, B.S., Feigen, L., McKeen, D.: Corneal injury threshold to CO₂-laser irradiation. *Amer. J. Ophth.* **66**, 1–14 (1968)
- Geeraets, W.J., Berry, B.S.: Ocular spectral characteristics as related to hazards from laser and other light sources. *Amer. J. Ophth.* **66**, 15–20 (1968)
- Geeraets, W.J., Fine, B.S.: Ocular injury from CO₂-laser irradiation. *Acta Ophthal.* **47**, 80–92 (1969)
- Hallman, V.L., Perkins, E.S., Watts, G.K., Wheeler, C.B.: Laser irradiation of the anterior segment of the eye: I. Rabbit eyes. *Exp. Eye Res.* **7**, 481–486 (1968)
- Lund, D.J. et al.: Ocular hazards of the Q-switched erbiumlaser. *Invest. Ophthal.* **6**, 463–470 (1970)
- Leibowitz, H.M., Peacock, G.R.: Corneal injury produced by CO₂-laser radiation. *Arch. Ophthal.* **81**, 713–721 (1969)
- Naumann, G.: Corneal damage in hydroquinone-workers. *Arch. Ophthal.* **76**, 189–194 (1966)
- Peppers, N.A. et al.: Corneal damage thresholds for CO₂-laser radiation. *Applied Optics* **8**, 377–381 (1969)
- Rassow, B.: Beam guide system of on argon-laser coagulator. *Ophthal. Res.* **5**, 248–252 (1973)

Eingegangen am 22. November 1976