

Elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Einwirkung von Laserstrahlen auf die Netzhaut des Kaninchens

W. Lerche, R. Beeger und B. Rassow

Universitätsaugenklinik Hamburg (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. H. Sautter),
Martinistr. 52, D-2000 Hamburg 20, Bundesrepublik Deutschland

Electron Microscopic Observations on the Effect of Laser Beams on the Retina of the Rabbit

Summary. After laser irradiations, retinas of 13 rabbits were examined by electron microscope. The laser focus was set between 30 min and 140 h or 6 weeks in advance. The anatomical separation between the retina and the connective tissue of the choriocapillary in all the lesions is preserved by an intact Bruch's membrane. Destruction of the pigment epithelium, rod layer, and outer granular layer occurs in the early stages after coagulation. Later the nuclei of the rods show various stages of degeneration with simultaneous increases in the volume of the Müller's cells. The cytoplasm of the Müller's cells penetrates the nuclei of the sensory cells undergoing degeneration. Proliferation of the pigment epithelium begins after about 20 h. The first appearance of macrophages in the retina is visible after 30 h. Between 92 and 140 h in the area of the pigment epithelium, variously differentiated cells, which partly contain pigment granules and lamellary inclusion bodies, form. Some cells or cell groups which are visible might represent histiocytes within the Bruch's membrane 35, 45, 68, and 92 h as well as 6 weeks after coagulation. They partly cross the outer layer of the Bruch's membrane and neighboring connective tissue of the choroid. According to our studies, pigment epithelial cells, choroidal histiocytes, and Müller's cells participate in the phagocytosis.

Zusammenfassung. Untersucht wurden elektronenmikroskopisch die Netzhäute von 13 Kaninchen nach Laserbestrahlung. Die Laserherde waren zwischen 1/2 Std und 140 Std sowie 6 Wochen vorher gesetzt worden. In allen Läsionen bleibt die anatomische Trennung zwischen Retina und dem Gefäßbindegewebe der Chorio-

kapillarisch durch eine intakte Bruchsche Membran gewahrt. In den ersten Stadien nach der Koagulation steht die Gewebszerstörung im Bereich von Pigmentepithel, Stäbchenschicht und äußerer Körnerschicht im Vordergrund. In den späteren Stadien zeigen die Zellkerne der Sinneszellen verschiedene Abbaustufen bei gleichzeitiger Zunahme des Volumens der Müllerschen Stützzellen. Dabei läßt sich das Eindringen von Zytoplasma der Stützzellen in die in Auflösung begriffenen Sinneszellkerne nachweisen. Eine Proliferation des Pigmentepithels beginnt etwa nach 20 Std. Nach 35 Std treten erstmals Makrophagen in der Retina auf. Zwischen 92 und 140 Std bilden sich im Bereich des Pigmentepithels verschieden differenzierte Zellen, die teilweise Pigmentkörnchen und lamellierte Einschlusskörper enthalten. 35, 45, 68 und 92 Std sowie 6 Wochen nach Laserkoagulation sind innerhalb der Bruchschen Membran einzelne Zellen oder Zellgruppen zu beobachten, die als Histiocyten gedeutet werden. Sie durchsetzen teilweise die äußeren Schichten der Bruchschen Membran und das angrenzende Bindegewebe der Aderhaut. An der Phagozytose beteiligen sich nach unseren Untersuchungen sowohl die Pigmentepithelzellen als auch die Histiocyten der Aderhaut und die Müllerschen Stützzellen.

Die Anwendung von Strahlen der Xenon-Bogenlampe (sog. Lichtkoagulation) zur Behandlung von Gefäßerkrankungen der Retina oder zur prophylaktischen Maßnahme gegen eine Netzhautablösung bei degenerativen Veränderungen nimmt in der Augenheilkunde seit Einführung des Lichtkoagulators (Meyer-Schwickerath, 1958) einen festen Platz ein. In den letzten Jahren hat jedoch der Einsatz von Laserstrahlen immer mehr an Bedeutung gewonnen. Die besonderen Vorzüge der Lasergeräte liegen in der sehr genauen Regulierbarkeit des Strahles, in der Wahl feinsten Fleckengrößen zwischen 50 μ und 500 μ sowie in der relativ einfachen Handhabung der Geräte. Darüber hinaus fällt bei der Anwendung von Laserstrahlen die für den Patienten oft unangenehme Lokalanästhesie in Form der retrobulbären Injektion fort.

Über die zerstörende Wirkung von Rubinlaserstrahlen auf die Netzhaut sowie über die Dosierung für den therapeutischen Gebrauch bestehen zahlreiche histopathologische Untersuchungen (Zaret, Ripps, Siegel und Breinin, 1963; Campbell, Rittler und Koester, 1963; Noyori, Campbell, Rittler und Koester, 1964; Geeraets u. Mit., 1965; L'Esperance, 1965; Marshall und Mellerio, 1967, 1970, 1971). Einige elektronenmikroskopische Arbeiten befassen sich auch mit Veränderungen der Ultrastruktur der Kaninchenretina (Fine und Geeraets, 1965; Marshall, 1970; Marshall und Mellerio, 1970; Marshall, Fankhauser, Lotmar und Roulier, 1971; Lerche und Beeger, 1972) und neuerdings auch der menschlichen Netzhaut (Lerche, 1973; Apple, Goldberg und Wyhinny, 1973). Mit den vorhandenen Ergebnissen scheint die klinische Anwendung der Laserkoagulatoren zur Erzielung reproduzierbarer Narben im Bereich der Retina zunächst hinreichend gesichert. Die Umwandlungsprozesse im Verlauf der Narbenbildung weisen aber noch eine Reihe von Problemen auf, die bisher nicht eindeutig geklärt sind. Hierzu zählen die Herkunft und der Verbleib der Makrophagen, der Abtransport des zerstörten Gewebes durch diese Zellen und der Zeitpunkt einer festen Narbenbildung. In der vorliegenden Arbeit sollen diese Fragen genauer verfolgt werden.

Material und Methode

Für die Behandlung der Versuchstiere stand ein Rubin-Impuls-Laser des Typs Siemens CA I zur Verfügung (Impulsfolge: 50 Hz, Impulsdauer: 1 msec, Impulsspitzenleistung: ca. max. 20 W, Wellenlänge des emittierten Lichtes: 694 nm, Brennfleckdurchmesser 0,5 bis 0,01 mm). Die Befestigung des Lasers erfolgte auf einer Zeiss-Spaltlampe (S 100), die zur Beurteilung des vorderen Augenabschnittes und auch mit Hilfe eines Kontaktglases für den Augenhintergrund verwendet wurde. (Fankhauser u. Mitarb., 1968; Zweng und Little, 1970; Rassow, Moghadam, 1972; Rassow, 1972).

Während der Beobachtung des Augenhintergrundes durch die Spaltlampe wurde der Laserstrahl mit Hilfe eines Filters (Absorptionskraft von 99,9 %) so stark abgeschwächt, daß nur ein unschädlicher Zielstrahl die Netzhaut traf. Die mittlere Laserleistung konnte ständig verfolgt und durch einen Regeltransformator zwischen 40 und 400 mW vorgewählt werden.

Zur Untersuchung kamen 14 graue Kaninchen von ca. 3 kg Gewicht. Die einzelnen Läsionen wurden bei den mit Nembutal narkotisierten Tieren unterhalb der Markstrahlen zu einem Feld von ca. 5 x 5 mm angeordnet. Die Dosierung der Strahlenenergie mußte so gewählt werden, daß die Bruchsche Membran als anatomische Grenze erhalten blieb. Einwirkungen aus dem Kreislaufsystem brauchten nicht berücksichtigt zu werden, da die Netzhaut des Kaninchens nicht mit Gefäßen versorgt ist (Francois und Neetens, 1962). Die Stärke der Herde erfolgte nach klinischen Gesichtspunkten, wobei eine möglichst schnelle Weißfärbung des koagulierten Bezirkes ohne Blutung erfolgte. Als Erfahrungswerte ergaben sich 50–90 mW für die Strahlenenergie und 0,1 sec für die Bestrahlungszeit.

Zur Untersuchung standen die mit Laserstrahlen behandelten Kaninchenaugen nach Ablauf von 1/2 Std, 2 1/2 Std, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 62, 92, 116, 140 Std und nach 6 Wochen. Zur Fixierung wurden ca. 100 ml Glutaraldehyd 3%ig in Phosphatpuffer in die Arteria Carotis des narkotisierten Tieres injiziert und die Augen nach Enucleation und Halbierung für weitere 20 min in Glutaraldehyd, danach für 2 Std in 2%igem Osmiumtetroxyd fixiert. Die Gewebsteile des hinteren Bulbusabschnittes wurden in Epon 812 eingebettet. Die Herstellung der Semidünnschnitte und Ultradünnschnitte erfolgte mit dem Mikrotom der Firma Reichert. Nach Kontrastierung der Schnitte mit Bleizitrat und Uranylazetat wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen am Elmiskop II der Firma Siemens angefertigt.

Befunde

1/2 Std nach Laserkoagulation der Kaninchenretina bestehen auf lichtmikroskopischen Schnitten im Bereich der stärksten Energieabsorption erhebliche Gewebsveränderungen, die vor allem die äußere Körnerschicht, die Stäbchenschicht sowie das Pigmentepithel betreffen (Abb. 1). Die Kerne der äußeren Körnerschicht erscheinen verdichtet. Die Stäbcheninnenglieder weisen vermehrt kleine Vakuolen auf. Die Außenglieder verlieren ihre regelmäßige Anordnung. Im Bereich des Pigmentepithels besteht eine Auflockerung der Struktur.

Elektronenmikroskopisch läßt sich die erwähnte Verdichtung der Kerne in der äußeren Körnerschicht in einer Zusammenballung des Chromatins bestätigen (Abb. 2).

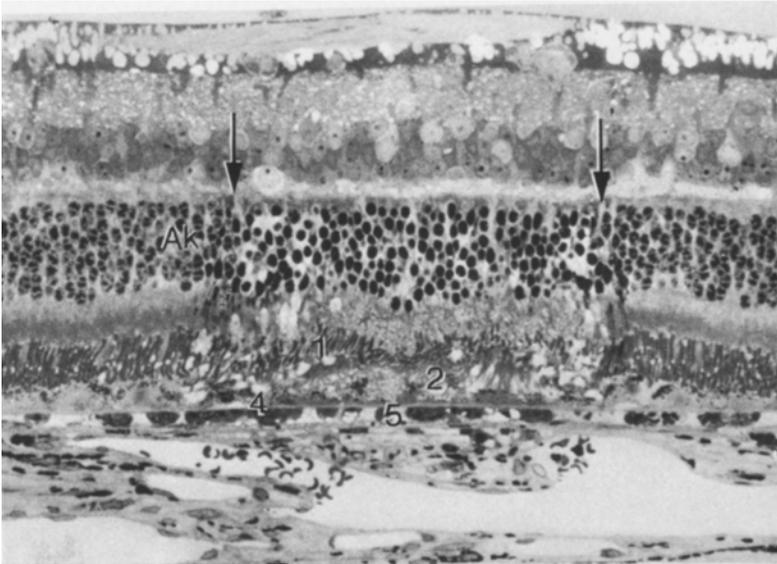


Abb. 1. Kaninchenretina 1/2 Std nach Laserkoagulation x 740. (←) Laserherd, 1 vakuolisch veränderte Stäbchenschicht, 2 aufgelockertes Pigmentepithel, 4 Bruchsche Membran, 5 Chorio-kapillaris AK pyknotisch veränderte äußere Körnerschicht

Die Innenglieder enthalten blasig veränderte Mitochondrien. An den Außengliedern fällt die nicht mehr parallel verlaufende Schichtung der Doppelmembran und deren teilweise Zerstörung auf. Der Kontakt zwischen den Außengliedern und den Fortsätzen der Epithelzellen ist größtenteils verlorengegangen. Größere Vakuolen trennen beide Gewebsteile voneinander. Die Pigmentepithelzellen besitzen kein normal strukturiertes Grundgewebe mehr, ihre Zellbegrenzung fehlt häufig.

2 1/2 Std nach Koagulation nimmt die Verdichtung des Chromatins in den Kernen der äußeren Körnerschicht zu. Die Degeneration der Stäbcheninnenglieder führt zur Bildung größerer Vakuolen. Erste Reaktionen auf die Laserstrahleneinwirkung finden sich nun auch in der Choriokapillaris: einzelne Kapillaren enthalten fädige, elektronendichte Strukturen, bei denen es sich wahrscheinlich um Fibrinansammlungen handelt. Außerdem erscheinen unmittelbar unterhalb der Bruchschen Membran teilweise dicht aneinander gelagerte Zellen mit gelappten Kernen und größeren Granula, die in ihrer Größe den Pigmentgranula entsprechen, in ihrem Aufbau jedoch deutlich inhomogener und weniger elektronendicht sind. Diese Zellen dürften als Leukozyten anzusprechen sein.

15 Std nach Laser-Koagulation nehmen die Veränderungen vor allem in der Rezeptorenschicht zu. Fast alle Mitochondrien der Stäbcheninnenglieder sind zu großen Blasen aufgetrieben und lassen ihre typische Innenstruktur vermissen. Die Begrenzungs-membran der Außenglieder fehlt teilweise. Die ursprünglich regelmäßig geschichteten Lamellensysteme der Außenglieder sind vakuolig verändert. Häufig findet man Membranstrukturen in irregulärer Anordnung (Abb. 3). In diesem Stadium lassen sich erstmals licht- und elektronenmikroskopisch dunkel erscheinende Granula im Bereich

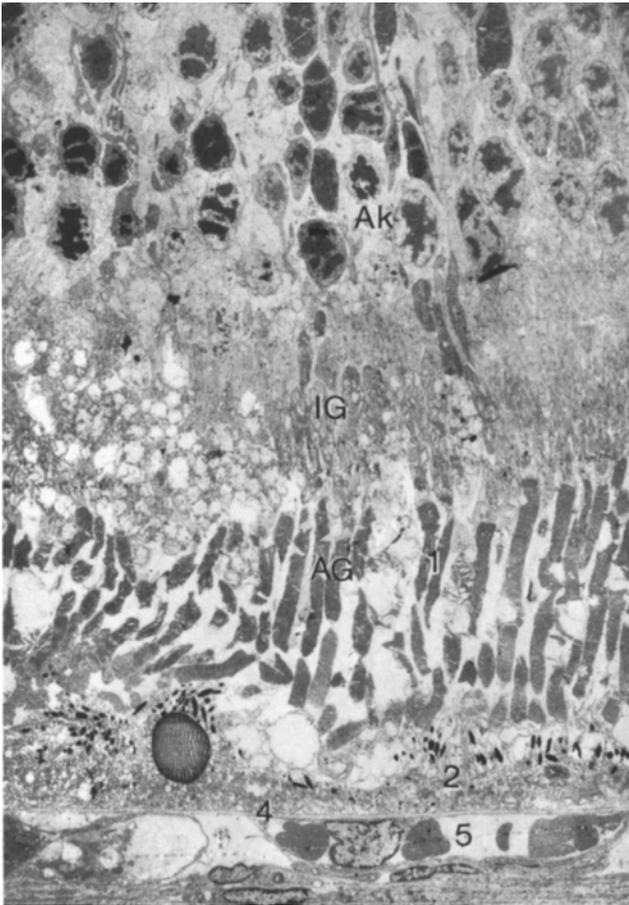


Abb. 2. Elektronenmikroskopische Aufnahme 1/2 Std nach Laserkoagulation der Kaninchenretina, $\times 1500$. *AK* äußere Körnerschicht mit verdichteten Zellkernen, *1* vakuolisch veränderte Stäbchenschicht mit *IG*-Innengliedern und *AG*-Außengliedern, *2* zerstörtes Pigmentepithel *4* intakte Bruch'sche Membran, *5* Choriokapillaris

der Außenglieder erkennen. Sie befinden sich innerhalb von Zellen, die keine Cytoplasmastrukturen besitzen. Histologisch unterscheiden sich diese Granula vom Pigment der Epithelzellen durch ihre abweichenden Färbeeigenschaften. Im elektronenmikroskopischen Bild imponieren sie als rundliche, relativ große und dunkle Körperchen, die eine fädige oder körnelige Innenstruktur besitzen und die im Durchmesser größer als die Pigmentkörnchen in den Epithelzellen sind.

Nach Ablauf von *20 Std* treten innerhalb der Läsion erste Hinweise auf eine phagozytotische Aktivität auf. In der Randzone der Koagulationsherde, in der die Zellen der äußeren Körnerschicht und die Rezeptoreninnenglieder weitgehend unbeschädigt erscheinen, sind Bruchstücke von Außengliedern vorhanden. Sie liegen zwischen intakten Stäbcheninnengliedern und teilweise auch jenseits der *Membrana limitans externa* in der äußeren Körnerschicht (Abb. 4).

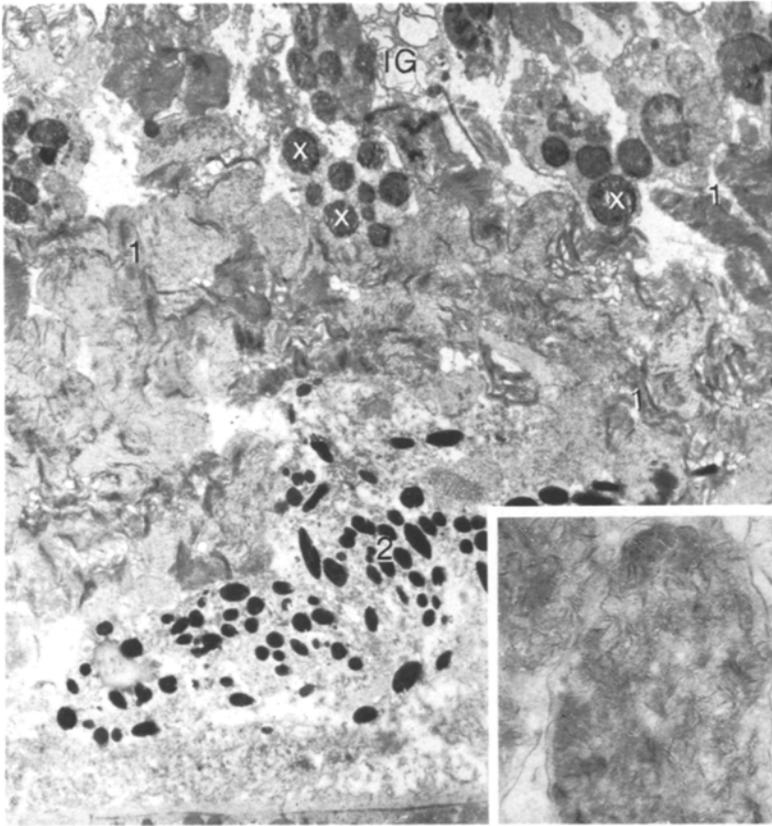


Abb. 3. 15 Std nach Laserkoagulation elektronendichte Granula (x) im Bereich der Stäbchenschicht, (x 4200). IG aufgetriebene Mitochondrien der Innenglieder, 1 zerstörte Außenglieder, (x) Granula im Bereich der Außenglieder, 2 veränderte Pigmentepithelzellen. *Insert:* 15 Std nach Laserkoagulation elektronendichte Granula aus dem Bereich der Stäbchenschicht bei stärkerer Vergrößerung mit deutlicher Innenstruktur (x 24000)

Im Pigmentepithel und in der Choriokapillaris bestehen zu diesem Zeitpunkt folgende Veränderungen: man erkennt unmittelbar unterhalb der zerstörten Pigmentepithelzelle mehrere keilförmig aussehende Zellen, deren Spitze gegen das Zentrum der Läsion gerichtet ist. Diese Zellen besitzen intakte Zellorganelle, Pigmentkörnchen und die für das Pigmentepithel typischen Einfältelungen an der basalen Zellmembran (Abb. 5). Der Befund deutet darauf hin, daß sich intakte Epithelzellen unter die vom Laserstrahl geschädigten Zellen schieben, wodurch eine Zweischichtung des Epithelverbandes hervorgerufen wird.

In der Choriokapillaris erscheinen neben den schon beschriebenen granulierten Zellen solche, die einen ovalen bis polygonalen Kern und ein heller gefärbtes Cytoplasma ohne Granula besitzen. Sie dürften als Histiocyten anzusprechen sein.

25 Std nach Laserstrahleinwirkung treten im Pigmentepithel die schon beschriebenen keilförmig aussehenden Zellen stärker in den Vordergrund. Histiocyten sind im gesamten weiteren Verlauf der Untersuchungen im Gefäßnetz der Choriokapillaris

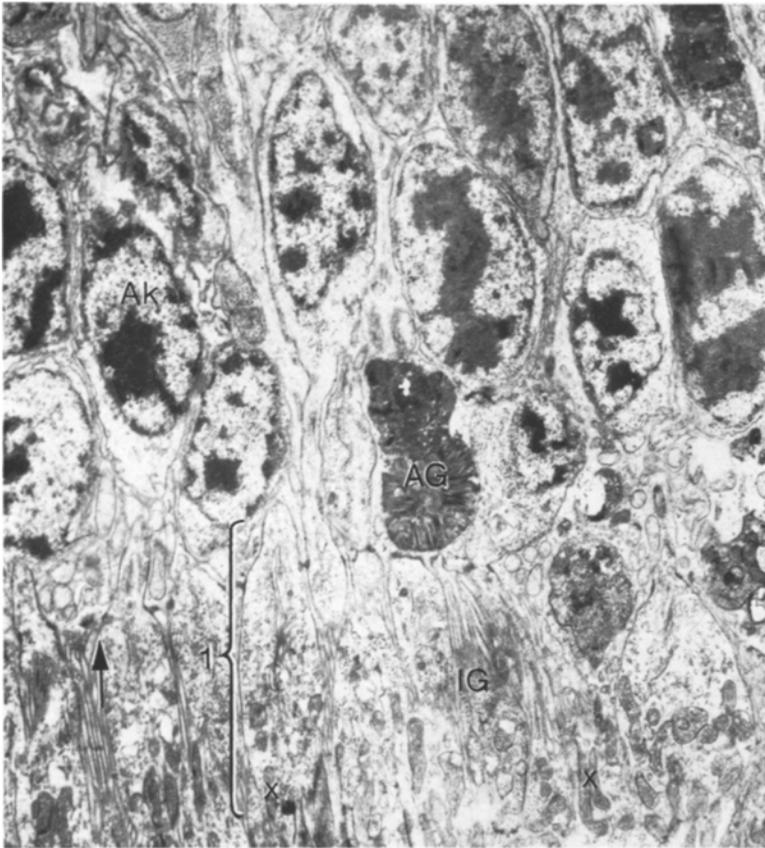


Abb. 4. 20 Std nach Laserkoagulation Bruchstücke eines Stäbchenaußengliedes in der äußeren Körnerschicht, (x 4000). AK äußere Körnerschicht, I Sinneszellen, AG Bruchstück eines Außengliedes, IG Innenglieder mit zahlreichen Mitochondrien (x). (←) Membrana limitans externa

vermehrt anzutreffen. Auch in der äußeren Körnerschicht nehmen die Umbauvorgänge vor allem an den Kernen zu. Sie verlieren ihre Begrenzungsmembran und zeigen verschiedene Abbaustufen. Neben noch fast normalen Kernen (Abb. 6a) trifft man auf solche, deren Chromatin homogen und dunkel erscheint (Abb. 6b). Bisweilen können die Kerne noch von einem feinen Karyoplasmasaum umgeben sein (Abb. 6c). Mitunter ist das Chromatin aufgelockert und läßt nur im Randbereich eine Verdichtung erkennen (Abb. 6d). Schließlich sind Kernreste mit deutlichen Einbuchtungen nachweisbar, zwischen denen schmale Fortsätze erhalten bleiben (Abb. 6e). Im Inneren besitzen diese Kerne verschieden dichte Karyoplasmazonen. Innerhalb der Zellen der äußeren Körnerschicht können in allen Degenerationsstadien unregelmäßig verlaufende, teilweise aus mehreren Lagen zusammengesetzte Doppelmembranen vorkommen, wobei die Membranstrukturen untereinander in Verbindung stehen (Abb. 6f).

35 Std nach erfolgter Laserkoagulation finden sich in der Kaninchenretina bemerkenswerte Veränderungen, vor allem in der Bruchschicht. In ihr liegen flache,

langgestreckte Zellen unmittelbar unterhalb der intakten Basalmembranepithelzellen (Abb. 7). Das Cytoplasma dieser Zellen erscheint wenig elektronendicht. Es enthält einzelne Ergastoplasmalamellen, freie Ribosomen und vereinzelt Mitochondrien. Der Zellkern weist einen dichten Karyoplasmasaum wechselnder Stärke auf. Nucleoli sind nicht erkennbar. Ähnlich aufgebaute Zellen fanden sich bereits 20 Std nach Laserkoagulation vermehrt im Gefäßnetz der Choriokapillaris und sind jetzt auch jenseits der Bruchschens Membran zwischen den zerstörten Pigmentepithelzellen an den Stäbchenaußengliedern zu beobachten. Da die Zellen in diesem Bereich zusätzlich jedoch lamellierte Einschlußkörperchen und Pigmentkörnchen enthalten, sind sie als Makrophagen anzusehen.

In der äußeren Körnerschicht trifft man zu diesem Zeitpunkt neben den in Auflösung begriffenen Stäbchenaußengliedern Zellanschnitte, die zahlreiche Vacuolen und einen großen Kern mit gleichmäßig verteiltem, wenig elektronendichtem Chromatin besitzen (Abb. 8). Die Nucleoli heben sich deutlich vom Chromatin ab. Das Aussehen dieser Kerne entspricht demjenigen der Müllerschen Stützzellen in der inneren Körnerschicht und deutet darauf hin, daß hier Kerne der Müllerschen Stützzellen in die äußere Körnerzellschicht eingewandert sind.

45 Std nach Laserstrahleinwirkung hat die Zahl der Müllerschen Stützzellen in der äußeren Körnerschicht erheblich zugenommen, während die degenerativ veränderten Kerne der Sinneszellen deutlich weniger geworden sind (Abb. 9).

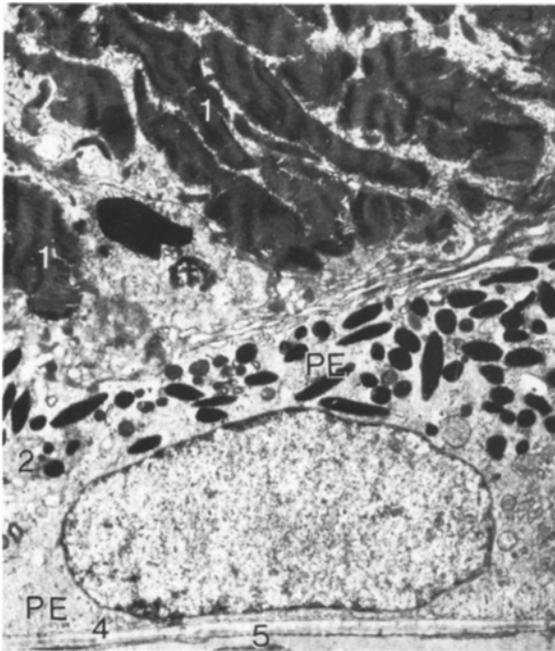


Abb. 5. 20 Std nach Laserkoagulation keilförmig vorgedrungene Pigmentepithelzelle PE, (x 3000). 1 Leicht veränderte Außenglieder, 2 zerstörte Pigmentepithelzelle oberhalb der neuen Epithelzelle (PE), 4 Bruchschens Membran, 5 Choriocapillaris

Im Zeitraum zwischen *45 und 92 Std* nach Laserkoagulation der Kaninchenretina nimmt die Ansammlung des Fibrins in der Choriokapillaris ab. Die innere kollagene Schicht der Bruchschens Membran enthält nach wie vor Zellen, die zum Teil den elastischen Faseranteil durchsetzen und sich gelegentlich bis in die interkapillären Räume verfolgen lassen. In der äußeren Körnerschicht dominieren im Zentrum des Laserherdes neben den Körnerzellen und neben einzelnen Makrophagen weiterhin die Müllerschen Stützzellen. Diese beginnen am Übergang zur ehemaligen Rezeptorenschicht untereinander und mit den vereinzelt noch vorhandenen Körnerzellen neue Desmosome zu bilden und stellen die Membrana limitans externa wieder her.

Im Zeitraum zwischen *62 und 116 Std* nach Laserstrahleinwirkung auf die Kaninchenretina spielen sich im Bereich des Pigmentepithels erhebliche Umbauprozesse

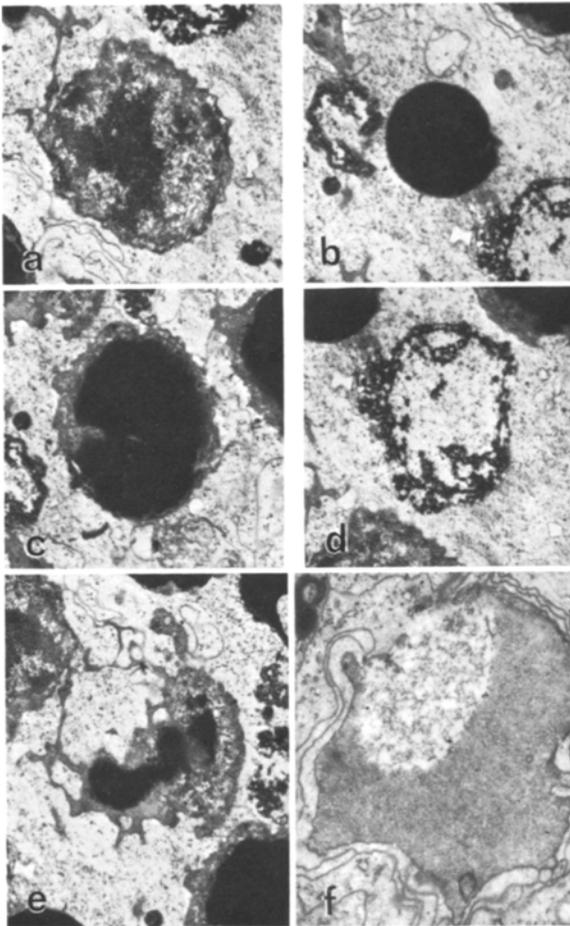


Abb. 6 a–e. 25 Std nach Laserkoagulation verschiedene Grade der Abbaustufen von Kernen in der äußeren Körnerschicht. (x 6000). **f** 25 Std nach Laserkoagulation in Auflösung begriffener Kern der äußeren Körnerschicht. Die Kernmembran und weitere den Kern umgebende Membransysteme sind an einer Stelle unterbrochen (x 6000).

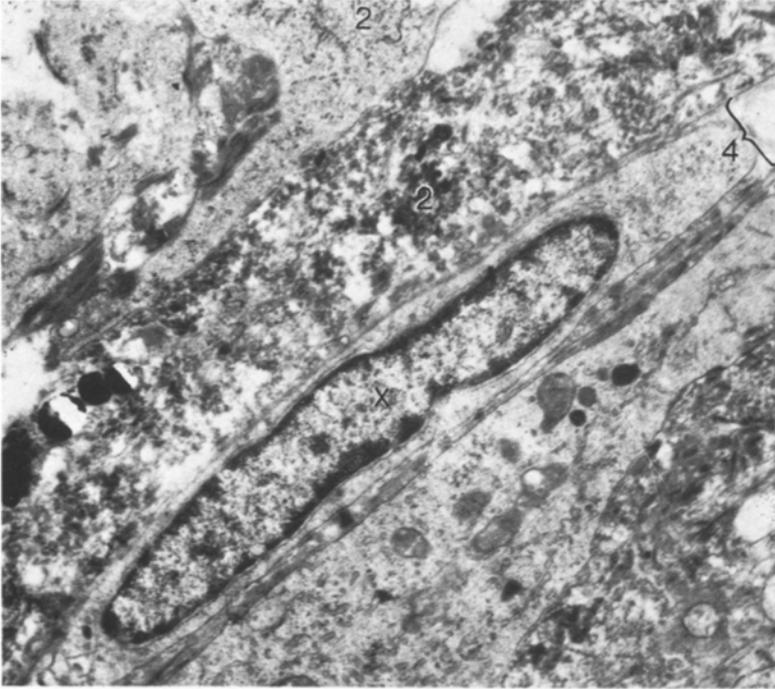


Abb. 7. 35 Std nach Laserkoagulation Zelle (Makrophage) *x* in der Bruch'schen Membran. ($\times 9200$).
2 zerstörte Pigmentepithelzelle, 4 Bruch'sche Membran

ab. Vier Zellformen lassen sich hier unterscheiden, wobei fließende Übergänge vorkommen:

1. Direkt über der Bruch'schen Membran liegen Zellen, die durch ihre Anordnung der Pigmentgranula, der Mitochondrien sowie der Lipoidtropfen den normalen Pigmentepithelzellen am ähnlichsten sind (Abb. 10a).
2. Von diesen Zellen heben sich solche ab, die durch die Vielzahl ihrer Mitochondrien und durch das Fehlen der Pigmentgranula auffallen (Abb. 10b).
3. Ferner imponieren Zellen, deren Zytoplasma einen großen Kern und zahlreiche runde dunkle Gebilde mit lamellärer Struktur, sog. Phagosomen, aufweist (Abb. 11a).
4. Schließlich fällt ein Zelltyp mit hellem Cytoplasma auf, das vorwiegend mit Ribosomen bedeckt ist und nur wenige Mitochondrien und Ergastoplasmalamellen, jedoch keine Pigmentgranula enthält (Abb. 11b).

Nach 140 Std lassen sich in den Schichten der äußeren Körnerzellen und der Rezeptoren gegenüber den Befunden nach 92 und 166 Std keine weiteren Umbauprozesse mehr beobachten. Wie bereits Marshall (1970) mitteilte, ergeben sich für die Beantwortung der Frage nach der Herkunft der Makrophagen nach diesem Zeitpunkt keine neuen Gesichtspunkte mehr. Um aber eine endgültige Aussage über die Vernarbung und über das Verhalten der Makrophagen machen zu können, wurde eine Kontrolluntersuchung 6 Wochen nach Laserstrahleinwirkung zusätzlich durchgeführt. Dabei ergaben sich folgende Befunde: Die Verhältnisse in der äußeren Körnerschicht ent-

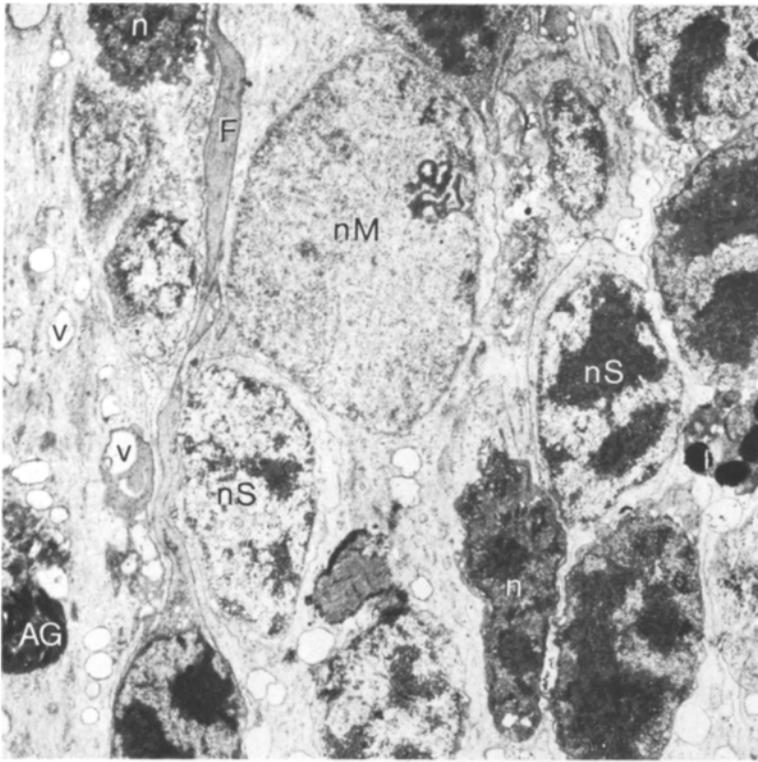


Abb. 8. 35 Std nach Laserkoagulation Ausschnitt aus der äußeren Körnerschicht. (x 9000). *nM* Kern einer Müllerschen Stützzelle, *nS* Kern einer normalen Sinneszelle, *n* Kern einer zerstörten Sinneszelle, *AG* phagocytisiertes Außenglied, *F* Zellfortsatz einer Sinneszelle, *V* Vakuolen

sprechen denjenigen zum Zeitpunkt von 92 und 116 Std. Unterhalb der Membrana limitans externa jedoch haben die Müllerschen Stützzellen einen Saum schmaler, dicht aneinandergelagerter Fortsätze gebildet, der nur an einigen Stellen von erhalten gebliebenen Stäbcheninnengliedern durchdrungen wird. Auch Außenglieder, die von den Rändern zum Zentrum der Läsion verlaufen, sind wieder nachweisbar und sprechen für eine beginnende Regeneration. Der einschichtige Pigmentepithelverband ist wiederhergestellt, hat aber an Höhe stark abgenommen. Zwischen dem Epithel und der äußeren Körnerschicht finden sich jetzt einzelne große, rundliche, mit reichlich Pigment beladene Zellen (Abb. 12). Sie sind durch feine apikale Pigmentepithelfortsätze vom Epithelverband abgegrenzt und besitzen einzelne Einschlusskörperchen mit konzentrisch geschichteter Lamellenstruktur. Mitunter stehen Fortsätze dieser, als Makrophagen anzusehenden Zellen mit denen der Epithelzellen in direktem Kontakt.

Die Bruchsche Membran ist an mehreren Stellen verdickt. In diesen Bezirken können innerhalb der inneren kollagenen Schicht Zellen eingelagert sein, die teilweise von einer Basalmembran umgeben werden (Abb. 13). Möglicherweise handelt es sich bei diesen Zellen um Endothelzellen aus der Choriokapillaris. Hierfür spricht auch die Tatsache, daß an einigen Stellen zwischen zwei Zellen ein erweiterter Interzellularraum sichtbar ist, ein Befund, der als Kapillarentwicklung gedeutet werden könnte.



Abb. 9. 45 Std nach Laserkoagulation Müllersche Stützzellen im Bereich der äußeren Körnerschicht, ($\times 1250$). *nM* Kern einer Müllerschen Stützzelle, *nS* normaler Sinneszellkern, *n* verdichteter Sinneszellkern, *1* Stäbchenschicht mit *AG* veränderten Außengliedern und *IG* veränderten Innengliedern, *2* Pigmentepithel, *4* Bruchsche Membran, *5* Choriocapillaris

Diskussion

Die Strukturveränderungen, die durch Rubinlaserstrahlen mit einer Energie von ca. 80 mWatt und einer Dauer von 0,1 sec in der Kaninchenretina hervorgerufen werden, betreffen die Körnerzellen, die Rezeptorenschicht, das Pigmentepithel sowie die Bruchsche Membran. Im Bereich der äußeren Körnerschicht treten nach der Koagulation Zellen auf, die eine phagocytotische Tätigkeit ausüben und sich am Abbau der äußeren Körnerzellen beteiligen. Dadurch verringert sich die Zahl der Körnerzellen, während das Zellvolumen der Müllerschen Stützzellen zunimmt.

Die Strukturveränderungen im Bereich der Stäbchenaußenglieder sind am stärksten ausgeprägt. Im Pigmentepithel geht die Mehrzahl der Zellen im Zentrum des Koagulationsherdes zugrunde. Die Zellen verlieren ihre Zellbegrenzung, das Cytoplasma ist aufgelöst. Vom Randgebiet her schieben sich nach 20 Std keilförmige Zellen unter die

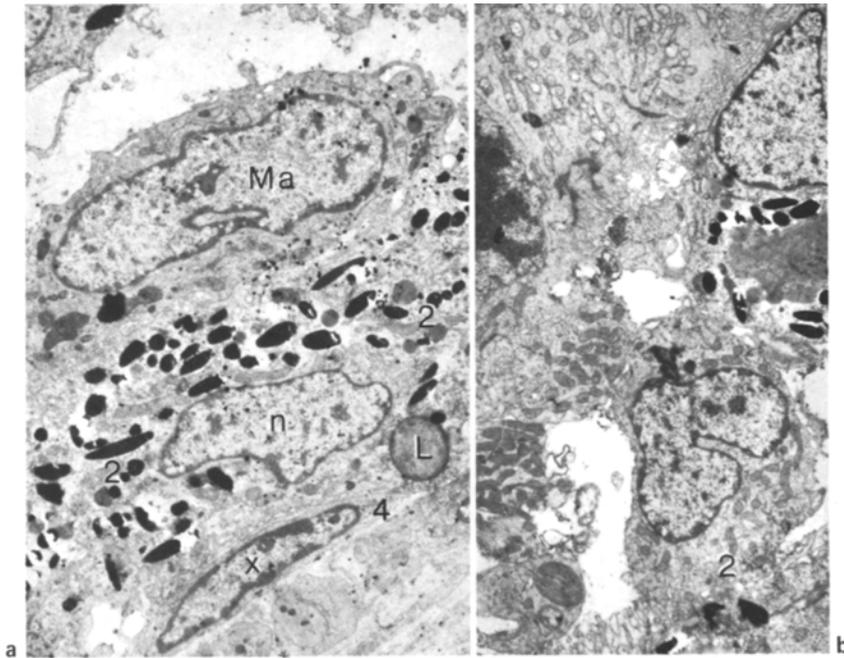


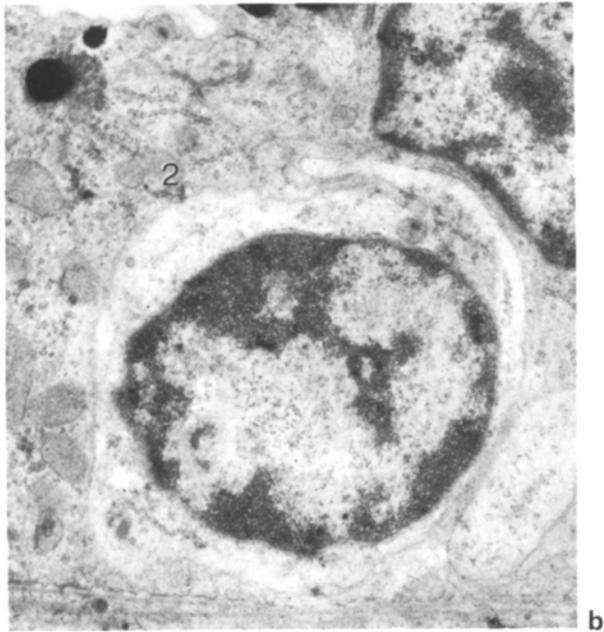
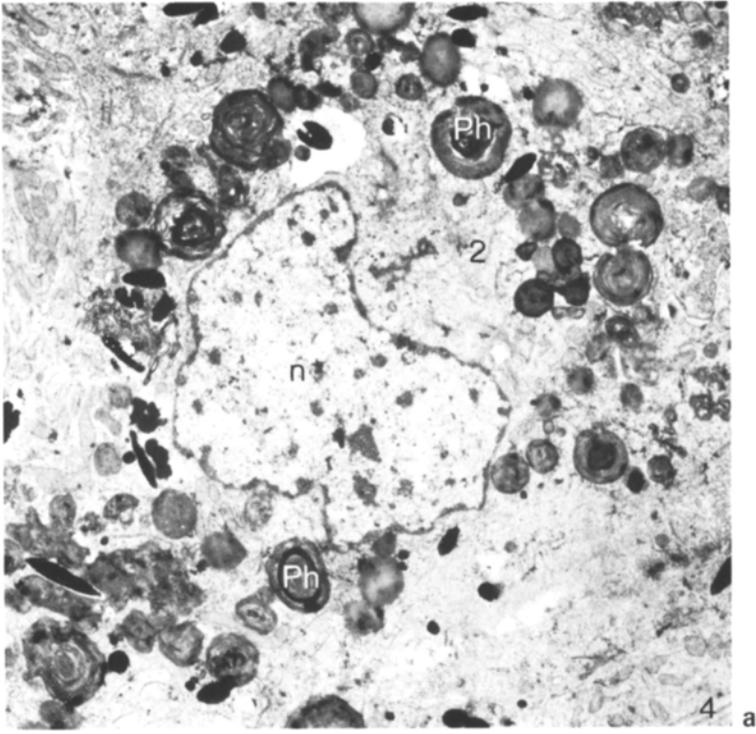
Abb. 10. a 92 Std nach Laserkoagulation 3. Zellvariante im Bereich des Pigmentepithels, (3000). 2 Zelle im Bereich des Pigmentepithels mit Kern (*n*) und Phagosom (*Pb*), 4 Bruchsche Membran. b 116 Std nach Laserkoagulation 4. Zellvariante im Bereich des Pigmentepithels, (6000). 2 Zelle im Bereich des Pigmentepithels mit Ribosomen und Mitochondrien aber nur wenig Pigmentgranula

zerstörten Epithelzellen, sodaß der Epithelverband wieder geschlossen wird. Hierbei treten zahlreiche Histiocyten auf.

Die Bruchsche Membran wird primär durch die Laserkoagulation nicht verändert. Innerhalb der inneren kollagenen Schicht sind jedoch im Verlauf von 35 Std Zellen sichtbar, die als Histiocyten zu deuten sind und sich teilweise durch die elastische Schicht hindurch in die Choriokapillaris verfolgen lassen. Da teilweise einzelne Zellen von einer gemeinsamen Basalmembran umgeben sind und untereinander verbreiterte Interzellularräume aufweisen, kann angenommen werden, daß einzelne Endothelzellen aus der Choriokapillaris in die Bruchsche Membran einwandern und hier neue Kapillaren bilden.

Die Frage nach der Herkunft der Makrophagen der Retina nach Laserstrahleneinwirkung ist bis heute noch ein ungeklärtes Problem. Drei Zellarten können hierfür in Betracht gezogen werden:

- a) die Pigmentepithelzellen
- b) die Mesenchymzellen aus der Aderhaut
- c) die Müllerschen Stützzellen.



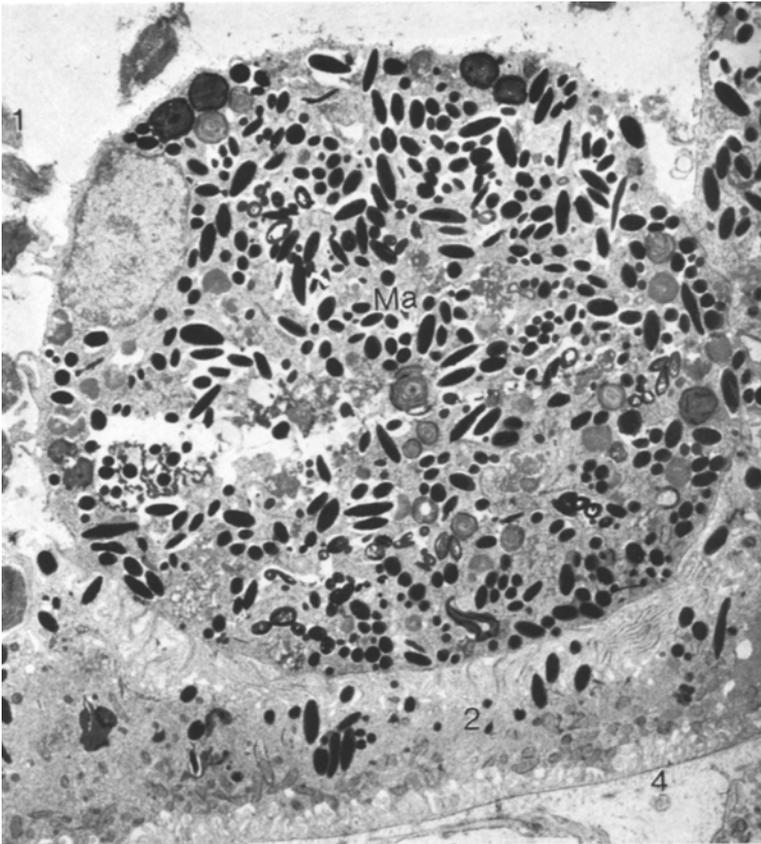


Abb. 12. 6 Wochen nach Laserkoagulation großer Makrophage (*Ma*) zwischen den apikalen Fortsätzen der Pigmentepithelzelle, (x 4000). 1 Außenglieder der Sinneszellen, 2 Pigmentepithel, 4 Bruchsche Membran

a) Die Pigmentepithelzellen

Aus morphologischen Untersuchungen von Bairati und Orzalesi (1963), Meier-Ruge (1968), Young und Bok (1969), Spitznas und Hogan (1970), Marshall und Ansell (1971) sowie Marshall (1970) geht hervor, daß den Pigmentepithelzellen normalerweise eine phagocytische Fähigkeit zukommt, indem Teile der Außenglieder der Stäbchen und Zapfen vom Pigmentepithel ständig aufgenommen werden. Auch Machemer (1968) fand bei künstlich hervorgerufener Netzhautablösung am Kaninchenaug Mitosen, Zellproliferationen und



Abb. 11 a 92 Std nach Laserkoagulation erste Zellvariante im Bereich des Pigmentepithels. (x 3000). *Ma* Makrophage, 2 Zelle im Bereich des Pigmentepithels mit Kern (*n*), 4 Bruchsche Membran mit Zelle (*x*). **b** 116 Std nach Laserkoagulation 2. Zellvariante im Bereich des Pigmentepithels mit wenig Pigmentgranula

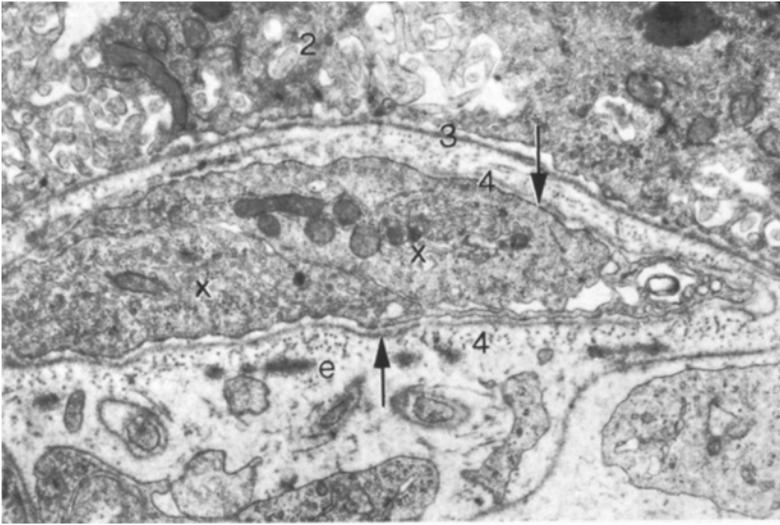


Abb. 13. 6 Wochen nach Laserkoagulation Zellgruppe (x) mit Basalmembran (←) innerhalb der Bruchschen Membran, (x 2600), 2 Pigmentepithel, 3 Basalmembran mit Pigmentepithel, 4 Bruchsche Membran mit elastischem Faserzug e

eine Phagozytoseaktivität der Pigmentepithelzellen. Mitosen der Pigmentepithelzellen konnten auch von Gloor (1969) und Friedman und Kuwabara (1968) nach Lichtkoagulation der Kaninchenretina festgestellt werden. Neuere Untersuchungen an der Kaninchenretina nach Laserkoagulation von Marshall und Mellerio (1967, 1970, 1971) und von Marshall, Fankhauser, Lotmar und Roulier (1971) sprechen ebenfalls für Zellproliferationen im Pigmentepithel.

Nach unseren Untersuchungen treten etwa 20 Std nach Laserstrahleinwirkung im Pigmentepithel neue Zellen auf, die sich keilförmig vom Rande der Läsion unter die geschädigten Epithelzellen schieben, wobei nur lichtmikroskopisch vereinzelt Mitosen zu beobachten waren. Aus der Tatsache, daß die Pigmentepithelzellen physiologischerweise phagozytieren und wir etwa 92 Std nach Koagulation im Bereich des Pigmentepithels mehrere Zelltypen finden, kann geschlossen werden, daß einige der proliferierenden Pigmentepithelzellen zu Makrophagen umgewandelt werden. Diesen Vorgang hat auch Gloor (1969) nach Lichtkoagulation beschrieben.

b) Mesenchymzellen aus der Aderhaut

Die Entstehung der Makrophagen aus proliferierten Pigmentepithelzellen begründet Gloor (1969) damit, daß eine Durchwanderung der Bruchschen Membran – falls überhaupt – nur innerhalb der ersten 24 Std nach Koagulation für polynukleäre Leukozyten, nicht aber für Histiozyten erfolgt. Auch wir können zwischen 2 1/2 und 15 Std nach Koagulation Leukozyten in der Rezeptorschicht nachweisen, nicht aber eine Durchwanderung dieser Zellen durch die Bruchsche Membran und das Pigmentepithel.

Im Gegensatz zu Gloor finden wir jedoch nach 35, 45, 68 und 92 Std sowie nach 6 Wochen Zellen in der inneren kollagenen Schicht der Bruchschen Membran, die teilweise auch die äußeren Schichten der Netzhaut durchdringen. Damit sind nach Laserbestrahlung der Kaninchennetzhaut, wie auch nach Kryo- und Laserkoagulation der menschlichen Retina von Lerche (1972, 1973) beobachtet wurde, Zellen in der Bruchschen Membran in größerer Anzahl gefunden worden. Da zum gleichen Zeitpunkt sowohl im Pigmentepithel als auch in der Rezeptorenschicht Zellen auftreten, die ihrem Aufbau nach denjenigen in der Bruchschen Membran ähneln, erhebt sich die Frage, ob diese Zellen die Bruchsche Membran auch vollständig durchwandern können. Unsere Befunde zeigen, daß Zellen, die als Makrophagen anzusehen, nicht nur in die äußeren Schichten der Bruchschen Membran hineingelangen, sondern auch kontinuierlich diese Schicht durchdringen können. Ob dies allerdings in dem Umfang erfolgt, der der Anzahl der Makrophagen in der Retina entsprechen würde, kann mit dem vorliegenden Material nicht eindeutig geklärt werden.

c) Die Müllerschen Stützzellen

Die Zellkörper der Müllerschen Stützzellen erstrecken sich normalerweise durch nahezu alle Schichten der Netzhaut. Sie sind daher beinahe zwangsläufig an allen Reaktionen des Gewebes auf schädigende Einflüsse beteiligt. Marshall und Mellerio (1970, 1971) sowie Marshall, Fankhauser, Lotmar und Roulier (1971) stellten an der Kaninchennetzhaut nach Laserkoagulation Proliferationen der Müllerfasern fest und beobachteten ihre maßgebliche Mitwirkung an der Bildung einer festen Narbe. Phagocytische Fähigkeiten der Müllerschen Stützzellen fanden auch Uga und Katsume (1970) bei entzündlichen Erkrankungen menschlicher Netzhäute. Geschädigte Sinneszellen wurden von Müllerzellfortsätzen umschlossen und in den Zellkörper aufgenommen.

Unsere Befunde zeigen — beginnend bei 20 Std im Bereich der Läsion eine deutliche Verlagerung einzelner Stäbchenaußenglieder und Innenglieder in die äußere Körnerschicht, und zwar in das Cytoplasma der Müllerschen Stützzellen. Ferner deuten unsere Ergebnisse darauf hin, daß Makrophagen, die sich im Pigmentepithel und in der Rezeptorenschicht nach Laserkoagulation befinden, in der Körnerschicht nur ganz vereinzelt vorkommen. Die Phagozytose der zerstörten Zellen der äußeren Körnerschicht bleibt damit fast ausschließlich den Müllerschen Stützzellen überlassen. Der Abbau der Körnerzellen scheint dabei so vonstatten zu gehen, daß sich die Kerne zunächst verdichten, danach auflösen und die Abbauprodukte von den umgebenden Müllerschen Stützzellen phagozytiert werden. Dieser Vorgang geht so vonstatten, daß das die Körnerzelle umgebende Cytoplasma der Müllerschen Stützzelle in die Zone der aufgehellten Kernreste eindringt und den freigewordenen Raum ausfüllt. Der Abbau der Körnerzellen spielt sich nicht für alle zerstörenden Zellen gleichmäßig ab, sodaß mehrere Degenerationsstadien nebeneinander bestehen. Mitunter treten während dieser Abbauvorgänge um die Kerne regelmäßig geformte Doppelmembranen auf, die von Hogan und Feeney (1963) mit der Bildung der Myelinscheiden durch Oligodendroglia — oder Schwannschen Zellen verglichen worden sind.

Literatur

- Apple, D.J., Goldberg, M.F., Wyhinny, G.: Histopathology and ultrastructure of the argon laser. Lesion in human retinal and choroidal vasculatures. *Am. J. Ophthalmol.* **75**, 575–609 (1973)
- Bairati, A., Jr., Orzalesi, N.: The ultrastructure of the pigment epithelium and of the photoreceptor. Pigmentepithelium junction in the human retina. *J. Ultrastruct. Res.* **9**, 484–496 (1963)
- Campbell, C.J., Rittler, M.C., Koester, C.J.: Optical maser as retinal coagulator: Evaluation. *Trans. Am. Acad. Ophthalm. Otolaryngol.* **67**, 58 (1963)
- Frankhauser, F., Lotmar, W., Roulier, A.: Photocoagulation through the Goldmann contact glass. Part II. *Arch. Ophthalmol.* **79**, 674–683 (1968)
- Fine, B.S., Geeraets, J.: Observations of early pathologic effects of photic injury to the rabbit retina. *Acta Ophthalmol.* **43**, 684–691 (1965)
- Francois, J., Neetens, A.: In "The Eye," Vol. 1 (ed. by Dawson, H.) New York: Academic Press 1962
- Friedman, E., Kuwabara, T.: The retinal pigment epithelium. IV The damaging effects of radiant energy. *Arch. Ophthalmol.* **80**, 265–279 (1968)
- Geeraets, W.J., Ham, W.T., Jr., Williams, R.C., Mueller, H.A., Burhart, J. Guerry, D., Vos, J.H.: Laser versus light coagulator: A fundusoscopic and histologic study of chorio-retinal injury as a function of exposure time. *Fed. Proc.* **24**, Suppl. 14, 48–61 (1965)
- Gloor, B.P.: Zellproliferation, Narbenbildung und Pigmentation nach Lichtkoagulation (Kaninchenversuche). *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* **154**, 633–648 (1969)
- Gloor, B.P.: Phagocytische Aktivität des Pigmentepithels nach Lichtkoagulation. Zur Frage der Herkunft von Makrophagen in der Retina. *Albrecht v. Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* **179**, 105–117 (1969)
- Hogan, M.J., Feeney, L.: The ultrastructure of the retinal vessels. III Vascular $\frac{1}{n}$ glia relationship. *J. Ultrastruct. Res.* **9**, 47–64 (1963)
- Lerche, W.: Licht- und elektronenmikroskopische Beobachtungen über die Einwirkung von Argonlaserstrahlen auf das Pigmentepithel der anliegenden menschlichen Retina. *Albrecht von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* **187**, 215–228 (1973)
- Lerche, W., Beeger, R.: Elektronenmikroskopische Befunde am Pigmentepithel der Kaninchenretina nach Laserstrahleneinwirkung. *72. Zusammenkunft der DOG Hamburg 1973*. Seite 216–223
- L'Esperance, F.A.: The effect of laser radiation on the retinal vasculature. *Arch. Ophthalmol.* **74**, 752–759 (1965)
- Machemer, R.: Experimental retinal detachment in the owl monkey. II Histology of retina and pigment epithelium. *Am. J. Ophthalmol.* **66**, 396–410 (1968)
- Marshall, J.: Thermal and mechanical mechanisms in laser damage to the retina. *Invest. Ophthalmol.* **9**, 97–115 (1970)
- Marshall, J.: Acid phosphatase activity in the retinal pigment epithelium. *Vision Res.* **10**, 821–824 (1970)
- Marshall, J., Ansell, P.I.: Membranous inclusions in the retinal pigment epithelium: Phagosomes and myloid bodies. *J. Anat.* **110**, 91–104 (1971)
- Marshall, J., Fankhauser, F., Lotmar, W., Roulier, A.: Pathology of short pulse retinal

- photocoagulations using the Goldman contact lens. *Albrecht v. Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* **182**, 154–169 (1971)
- Marshall, J., Mellerio, J.: Pathological development of retinal laser photocoagulations. *Exp. Eye Res.* **6**, 303–308 (1967)
- Marshall, J., Mellerio, J.: Laser irradiation of retinal tissue. *Br. Med. Bull.* **26**, 156–160 (1970)
- Marshall, J., Mellerio, J.: Disappearance of retina epithelial scar tissue from ruby laser photocoagulations. *Exp. Eye Res.* **12**, 173–174 (1971)
- Meier-Ruge, W.: The pathophysiological morphology of the retinal pigment epithelium and its importance for retinal structures and functions. *Mod. Probl. Ophthalmol.* **8**, 32–48 (1968)
- Noyori, K.S., Campbell, C.J., Rittler, C., Koester, C.J.: The characteristics of experimental laser coagulations of the retina. *Arch. Ophthalmol.* **72**, 254–263 (1964)
- Rassow, B.: Strahlenführungssystem für Laserkoagulatoren. *Tagungsber. der DOG* 1972 (im Druck)
- Rassow, B., Moghadam, R.: Die Laser-Lichtkoagulation bei experimentell erzeugter Amotio retinae an Kaninchenaugen. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* **161**, 52–55 (1972)
- Spitznas, M., Hogan, M.J.: Outer segments of photoreceptors and the retinal pigment epithelium. *Arch. Ophthalmol.* **84**, 810–819 (1970)
- Uga, S., Katsume, K.: Electron microscopic observations on reactions of retinal Müller cells under pathological conditions. *Jpn. J. Ophthalmol.* **14**, 223–236 (1970)
- Young, R.W., Bok, D.: Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J. Cell Biol.* **42**, 392–403 (1969)
- Zaret, M., Ripps, M., Siegel, J.M., Breinin, G.M.: Laser photocoagulation of the eye. *Arch. Ophthalmol.* **69**, 97–104 (1963)
- Zweng, H.C., Little, H.L., Peabody, R.R.: *Laser photocoagulation and retinal angiography.* Saint Louis: Mosby 1969

Eingegangen am 22. Juli 1977