

S. Torens · E. Berger · J. Stave · R. Guthoff
Augenklinik der Universität Rostock

Darstellung der Mikroarchitektur und Dynamik der Aufreißphänomene des präkornealen Tränenfilms mit Hilfe der Laser-Rastermikroskopie

Zusammenfassung

Hintergrund. Eine ausreichende Benetzung der Kornea ist eine Grundvoraussetzung für eine gute visuelle Funktion des Auges. Verschiedene Ursachen führen zur Alteration der Stabilität des labilen Tränenfilmsystems. Klinisch hat sich als Maß für die Tränenfilmstabilität die Bestimmung der Tränenfilmaufreißzeit bewährt. Wir entwickelten ein neuartiges Abbildungssystem zur hochauflösenden Darstellung des Tränenfilms, das einen Beitrag zur In-vivo-Darstellung der Dynamik der Tränenfilmstrukturen und der verschiedenen Aufreißphänomene leistet.

Technik und Methoden. Wir verwendeten ein modifiziertes Laser-Rastermikroskop. Ein Objektivadapter ermöglicht die hochauflösende Abbildung des Tränenfilms in einem großen Arbeitsabstand. Es wurden augengesunde Probanden und Patienten mit „trockenen Augen“ untersucht.

Ergebnisse. Mit Hilfe des Laser-Rastermikroskops wurde die Dynamik der Entstehung und die Struktur der Tränenfilmaufrisse analysiert und dokumentiert. Wir erarbeiteten eine Theorie zur Entstehung von Aufreißphänomenen des Tränenfilms über Epithelunebenheiten. Weitere Beobachtungen mittels simultaner Abbildung des Tränenfilms im Reflexions- und Fluoreszenzmodus des Mikroskops zeigten, dass bei Beobachtungen von Arealen ohne Epithelunebenheiten zu nächst lokale Verdünnungen des Tränenfilms in der wässrigen Phase auftreten, ohne dass es zu einem Einreißen der darüber liegenden Lipidschicht kommt.

Schlussfolgerungen. Erstmalig sind hochauflösende Darstellungen der Mikroarchitek-

tur und Dynamik der Aufreißphänomene des Tränenfilms gelungen, die zum besseren Verständnis des komplexen Schichtsystems des präkornealen Tränenfilms beitragen können. Die Kenntnis der verschiedenen Alterationen des Tränenfilms und ihrer bildmorphologischen Darstellung mit dem Laser-Rastermikroskop steht damit weiteren Untersuchungen, z. B. klinischen Korrelationen der Ausprägung der Erkrankung, oder der Beurteilung der Wirksamkeit und Verweildauer von Tränenersatzmitteln zur Behandlung von Benetzungsstörungen der Kornea zur Verfügung.

Schlüsselwörter

Tränenfilm · Aufreißphänomene · Konfokale Mikroskopie · „Dry spot“ · BUT

Ein stabiler Tränenfilm und eine gesunde Augenoberfläche sind wesentliche Voraussetzungen für ein einwandfreies Sehvermögen. Hierbei gleicht der Tränenfilm Unebenheiten der irregulären Hornhautoberfläche aus.

Pathologische Veränderungen des komplexen chemophysikalischen 3-Schicht-System des Tränenfilms führen zu Benetzungsstörungen, die nach dem heutigen Stand der Erkenntnisse ursächlich an einer Vielzahl von Erkrankungen der Augenoberfläche beteiligt sind.

Irritationen des Tränenfilms in Form von Benetzungsstörungen treten

aber auch bei zahlreichen Allgemeinleiden, als Nebenwirkung systemischer Medikation und bei postinfektiösen, toxischen und umweltbedingten Augenerkrankungen auf [2, 4, 8, 20]. Sie werden unter dem Symptomenkomplex des „Trockenen Auges“ zusammengefasst.

Die Stabilität des Tränenfilms wird wesentlich durch die Muzine beeinflusst, Makromoleküle, die die Oberfläche der hydrophoben Kornea benetzbar machen, sodass die wässrige Phase des Tränenfilms nicht abperlt. Jede Änderung der qualitativen oder quantitativen Zusammensetzung des Tränenfilms, z. B. der Viskosität oder der Osmolarität der Tränen [7] kann eine Herabsetzung der Tränenfilmstabilität bewirken.

Klinisch hat sich als Maß der Tränenfilmstabilität die Bestimmung der Tränenfilmaufreißzeit („Break-up-time“, BUT) mittels Na-Fluoreszein bewährt [18]. Das Verfahren ist jedoch störanfällig und mit einer großen Streubreite behaftet. Zum einen läuft der Vorgang des Aufreißens relativ langsam ab und der Startpunkt kann nur unsicher erfasst und leicht übersehen werden, zum anderen beeinflusst jeder Zusatz von Fluoreszein die BUT in nicht quantifizierbarem Maß [1, 15, 17]. Wird dieses Verfahren mit einer Zeit- und Bilddokumentation verbunden, besitzt es einen gewissen objektiven Charakter, da eine Einzelauswertung den Startpunkt erfassen

Stefanie Torens
Augenklinik des Universitätsklinikums
Rostock, Doberaner Straße 140, 18057 Rostock

S. Torens · E. Berger · J. Stave · R. Guthoff

Laser scanning microscopy for imaging the microarchitecture and dynamics of break-up phenomena of the precocular tear film

Abstract

Background. Sufficient and regular wetting of the cornea with a normal precocular tear film is an essential requirement for the accurate visual functioning of the eye. Multiple factors may cause tear film instability. Measuring the break-up time of the precocular tear film is a necessary, clinically reliable means for evaluating tear film stability. We designed a new instrument to observe the precocular tear film at high magnification which can contribute to the *in vivo* imaging of the physiological and pathophysiological dynamics of the tear film and its break-up phenomena.

Materials and methods. To image the tear film phenomena at sufficient magnification ($\times 200$) we used a confocal laser scanning microscope. Modification of an additional adaptor allows the tear film to be imaged at high magnification. This study evaluated the dynamics and microarchitecture of the break-up phenomena in the precocular tear film of normal patients and patients with “dry eye”.

Results. Laser scanning microscopy allows high magnification imaging of the precocular tear film and evaluation of a number of break-up mechanisms. The dynamics and structure of the tear film was analyzed and documented. Based on our observations we formulate a new hypothesis on the break-up mechanism of the precocular tear film caused by alterations in the epithelial surface, for example, an elevation or tear film microparticle. By evaluating video sequences in the fluorescence and reflection modus of the laser scanning ophthalmoscope we also found early thinning of the aqueous layer simultaneously with an intact lipid layer covering the aqueous layer.

Conclusion. Additional criteria result from using high-magnification microscopy, for example, laser scanning microscopy. This method reveals more microstructures of the corneal surface and the precocular tear film. The morphological representation of break-up phenomena leads to a better understanding of the underlying mechanisms and can be used for further investigations. Confocal laser scanning microscopy supplements the examination facilities and can be

Äußere Augenerkrankungen

used in addition to slit lamp microscopy and to diagnose “dry eye”.

Keywords

Tear film · Break-up phenomena · Confocal microscopy · Dry-spot · Break-up time

lässt, insgesamt hat die Bestimmung der BUT an der Spaltlampe jedoch zusätzlich mehrere andere Nachteile, wie z. B. Penetration des Fluoreszeins in das Augennere [14], das schlechte Auflösungsvermögen ohne Darstellung von Einzelheiten des Tränenfilms [5, 6] und die Untersuchungsmöglichkeit ausschließlich im dunklen Raum.

Ideal wäre daher ein Verfahren zur Bestimmung der BUT ohne den verfälschenden Einfluss des Fluoreszeins.

Der Mechanismus der Entstehung von Tränenfilmaufbrüchen („break-ups“) ist bis heute nicht in allen Einzelheiten geklärt. Erste, heute noch häufig vertretene Hypothesen gehen auf Arbeiten von Holly u. Lemp [7] zurück.

Im Folgenden soll diese Vorstellung kurz erläutert werden:

Nach einem Lidschlag wird der Tränenfilm durch Verdunstung der wässrigen Phase dünner und seine Oberflächenspannung ändert sich derart, dass die Lipidmoleküle des Lipidfilms in Kontakt mit der basalen Muzinschicht kommen. Diese wird dadurch kontaminiert und verliert ihre hydrophilen Eigenschaften. Der Tränenfilm bricht an dieser Stelle auf und bildet einen unbenetzten Fleck („dry-spot“). Durch den nächsten Lidschlag wird der Tränenfilm wieder erneuert und so fort.

Andere Hypothesen stammen u. a. von Ruckenstein und Sharma, die glau-

ben, dass der wichtigste Punkt für ein Aufreißen des Tränenfilms die Instabilität und ein eventuelles Aufreißen der mukösen Schicht ist. Dabei vermuten sie, dass es zum Aufreißen kommt, wenn die wässrige Phase mit dem hydrophoben Epithel in Kontakt gelangt. Lin und Brenner sehen das Aufreißen des Tränenfilms verursacht durch anhaltende intermolekulare Kräfte. Diese Kräfte sind bekannt als Dispersionskräfte in Verbindung mit kohärenten Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen neutralen Molekülen [13].

Lemp wies 1973 darauf hin, dass „dry-spots“ nur dann als Maß für die Tränenfilmstabilität gelten können, wenn sie einer zufälligen Verteilung unterliegen. Unebenheiten der Epitheloberfläche, wie z. B. eine Prominenz, bewirken bekannterweise ein Aufreißen des Tränenfilms über der veränderten Stelle. Der Mechanismus dieser an Niveauunterschiede gekoppelten Aufreißphänomene des Tränenfilms ist bis heute nicht näher untersucht.

Um durch eine hochauflösende Darstellung ein besseres Verständnis der Aufreißphänomene zu ermöglichen, entwickelten wir ein neuartiges optisches Abbildungssystem, das zur Beurteilung der Phänomene beitragen kann und neue Aspekte zur Aufreißdynamik des Tränenfilms liefert. Insbesondere liefern unsere Darstellungen einige Beiträge zum besseren Verständnis von Aufreißmechanismen über Epithelunebenheiten.

Zur hochauflösenden Beurteilung des präkornealen Tränenfilms modifizierten wir ein konfokales Laser-Rastermikroskop. Mithilfe eines speziellen, von uns entwickelten Vorsatzsystems, ist es möglich, das physiologische und pathophysiologische Verhalten des Tränen-



Abb. 1 ► Ansicht des modifizierten Laser-Rastermikroskops

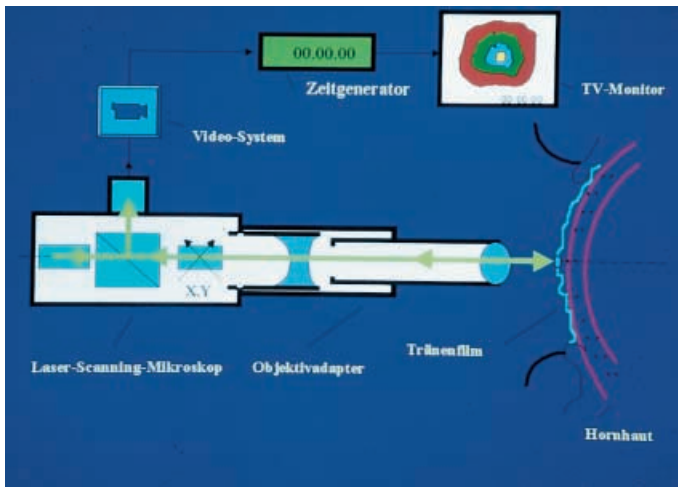


Abb. 2 ▲ Schemadarstellung des modifizierten Laser-Rastermikroskops

films bei geringer Lichtbelastung und ausreichendem Arbeitsabstand zu beurteilen.

Das Confocal Laser Scanning Ophthalmoscope (CLSO) der Fa. C. Zeiss (Oberkochen) wurde durch einen speziellen Objektivadapter, bestehend aus einer Minioptik zur Variation der Rasterfeldgröße (Vergrößerung), sowie einem Objektiv mit einem Arbeitsabstand von 20,5 mm (NIKON 10x/0,4, SLWD) zu einem konfokalen Laser-Rastermikroskop für die vorderen Augenabschnitte umgebaut (Abb. 1, Abb. 2). Damit gelingt die Abbildung des präkornealen Tränenfilms mit einem Auflösungsvermögen von ca. 1 µm bei einer bis zu 20fachen Vergrößerung. Die Tiefenauflösung liegt in Abhängigkeit von der verwendeten Laserstrahlung (Argon-Ionen-Laser: Wellenlänge 488 nm) etwa in dem gleichen Bereich. Das blaue Argon-Laserlicht ermöglicht zusammen mit einem im Gerät integrierten Sperrfilter die Herstellung von Mikrofluoreszenzaufnahmen; ein für die Früherfassung und Analyse von Break-up-Phänomenen wichtiges technisches Detail.

Auswahl der Probanden

Wir untersuchten je 5 augengesunde Probanden verschiedenen Alters und Patienten mit der Diagnose „Keratoconjunctivitis sicca“. Die Unterscheidung dieser Gruppen erfolgte mit Hilfe des Schirmer-Testes und der Bewertung der „Break-up-time“ (BUT) nach der Methode nach Norn [18]. War die BUT kleiner als 10 s und der Schirmer-Test gerin-

ger als 10 mm nach 5 min, lag eine Sicca-Symptomatik vor [2, 11, 19].

Physikalisch optische Probleme der Untersuchungstechnik

Infolge der wechselnden Brechungsindizes der obersten Schicht des Tränenfilms und seiner wechselnden Neigung zur Belichtungsrichtung, kommen folgende physikalische Wirkmechanismen bei der Kontrastentstehung zum Tragen: Zum einen werden bei senkrechter Einstrahlung und wechselndem Brechungsindex unterschiedliche Anteile des Laserlichtes reflektiert; zum anderen bewirken Hornhautunebenheiten einen

wechselnden Einstrahlwinkel mit reduziertem Lichteinfall in das Mikroskop.

Eine bildmorphologische Unterscheidung bezüglich der Ursache für einen entstehenden Kontrast ist bei dem unterschiedlichen Tränenfilmaufbau und der wechselnden Oberflächenstruktur der Hornhaut und der Tränenfilmdynamik nur schwer möglich [10, 16]. Folgende Aussagen sind jedoch möglich:

Bei senkrechtem Einstrahlwinkel stellt sich aufgrund der verschiedenen optischen Dichte die Lipidschicht hell und die wässrige Schicht dunkler dar, sodass die Kontraste Aussagen über die jeweilige Oberflächenschicht zulassen.

Aufreißphänomene des Tränenfilms

Die hochauflösenden Untersuchungen am Tränenfilm mit der Laser-Rastermikroskopie bestätigen, dass es individuell typische Aufreißformen gibt, die sich oft am gleichen Ort nach einem Lidschlag wiederholen. Dabei entstehen neben großflächigen Aufreißformen, die auch an der Spaltlampe gesehen werden, kleine Aufreißpunkte mit einer typischen Eigendynamik und unterschiedlichen Initialmechanismen wie Epithelunebenheiten oder schwimmenden Partikeln (Meibom-Sekret, Luftblasen, Mikrofremdkörper und Ähnliches). Diese Aufreißphänomene sind nicht zu verwechseln mit den in zufälliger Verteilung auftretenden „dry-spots“, die physiologi-

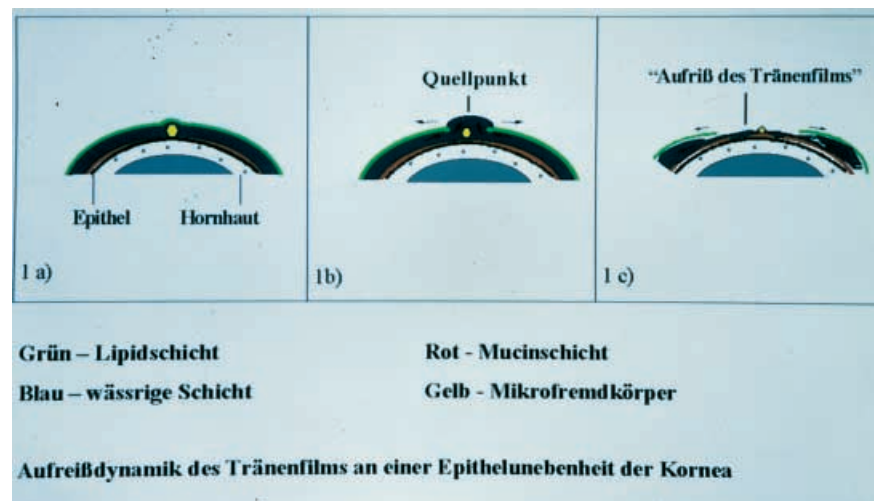
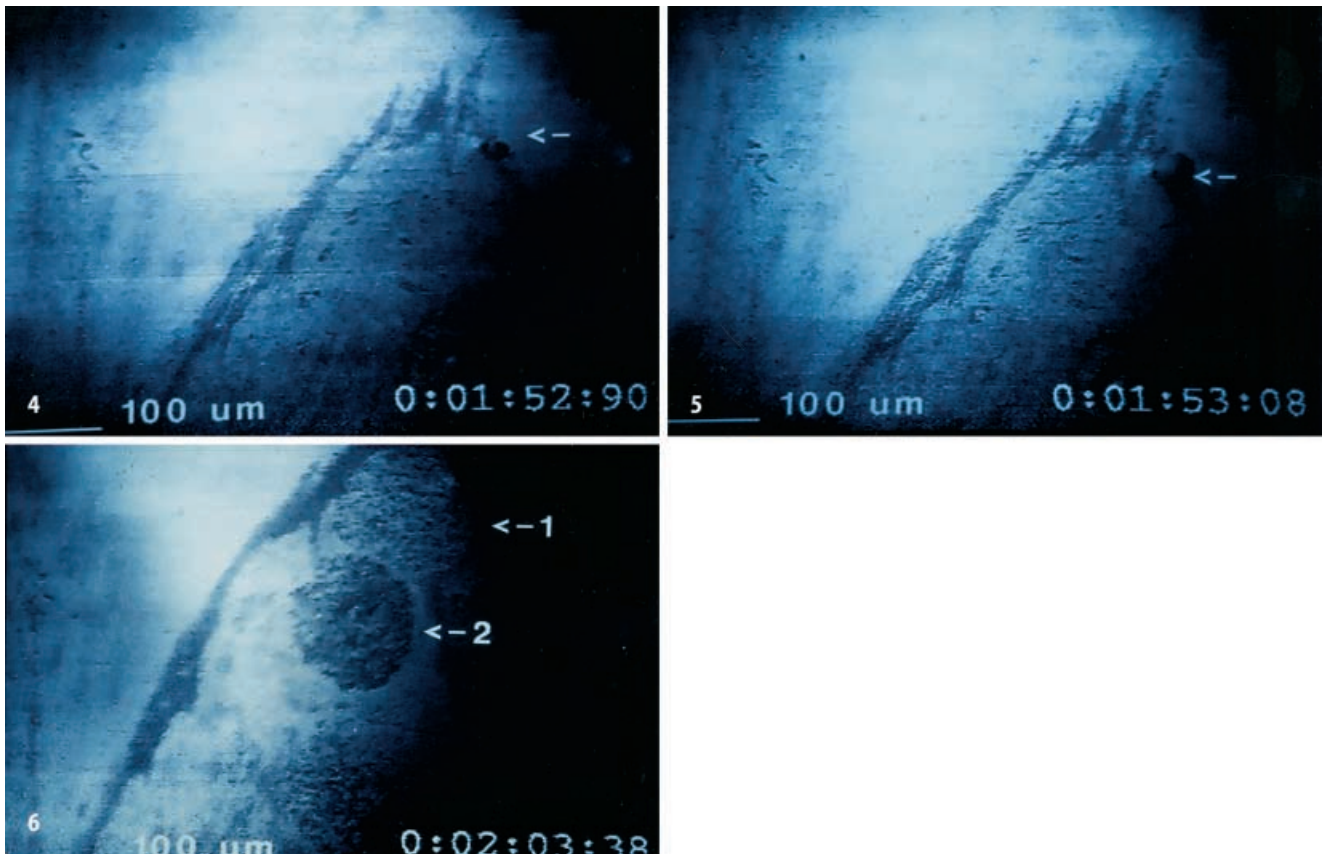


Abb. 3 ▲ Skizze: Aufreißdynamik des Tränenfilms an einem Mikrofremdkörper auf der Kornea. a Bildung eines dünnen Tränenfilmmeniskus über der Mikrostruktur. b Aufreißen der Tränenfilms und Hervorquellen der wässrigen Phase. c Öffnung des Tränenfilms zu einem größeren „dry spot“ sowie Verdunstung der wässrigen Phase (das Epithel wird langsam sichtbar)



scherweise auch im gesunden Tränenfilm auftreten und deren verfrühtes Auftreten als Maß für die Tränenfilminstabilität gelten kann [12].

Die folgenden Skizzen und die ihnen zugeordneten mikroskopische Abbildungen zeigen einen Interpretationsversuch der von uns beobachteten Initialdynamik des Aufreißens des Tränenfilms an einer prominenten Mikrostruktur auf der Kornea (Abb. 3).

Bei dem in den Skizzen gezeigten Aufreißen des Tränenfilms an einer Unebenheit (Mikrofremdkörper) spielen ursächlich hydromechanische Prozesse eine entscheidende Rolle. Durch die erhabene Struktur auf der Kornea kommt es über dieser zur Ausbildung eines dünnen Filmmeniskus im Spitzenbereich, was das Aufreißen erleichtert. Die Oberflächenspannung und der hydrostatische Überdruck der Wasserphase unter der gewölbten Lipidschicht verursachen ein explosionsartiges Hervorquellen der Wasserphase aus der sich öffnenden Lipidschicht. Die Wasserphase stellt sich zunächst kugelförmig mit steilem Kontaktwinkel dar. Im weiteren Verlauf flacht sich dieser Bereich ab und vergrößert sich unter Verschiebung der Lipid-

schicht. Durch Verdunstung kommt es zur langsamen Austrocknung dieser Stelle und das Epithel wird sichtbar. Die Muzinschicht ist dabei optisch nicht identifizierbar (Abb. 4).

Im Gegensatz zu den Beobachtungen der Aufreißphänomene über Mikrofremdkörpern zeigen die Aufnahmen von Bezirken ohne Epithelunregelmäßigkeiten unserer Meinung nach, dass zunächst lokale Verdünnungen des Tränenfilms auftreten, ohne dass es zu einem Einreißen kommt. Diese Beobachtung konnte durch annähernd simultane Abbildung des Tränenfilms mittels CLSO im Fluoreszenzmodus und im Reflexionsmodus gewonnen werden. Die dunkleren Stellen im Fluoreszenzmodus können der wässrigen Phase des Tränenfilms zugeordnet werden, da Fluoreszein-Natrium hydrophil ist und sich ausschließlich in dieser Phase des Tränenfilms lösen kann.

Die in Abb. 5 und Abb. 6 dargestellte Tränenfilmoberfläche eines Sicca-Patienten zeigt den identischen Bereich der Kornea in Reflexions- und Fluoreszenzdarstellung mit eindeutig punktuell ausgedünnten Arealen (dunkle Bereiche) in der wässrigen Phase im Fluores-

zenzmodus unter dem im Reflexionsmodus zu sehenden, noch geschlossenen Lipidfilm.

Diskussion

Die bisher von uns am Laser-Rastermikroskop beobachteten Phänomene erweitern unsere Vorstellungen über den präkornealen Tränenfilm, insbesondere über den Mechanismus der Entstehung von Aufreißphänomenen über Epithelunebenheiten.

Sie konnten sowohl bei augengesunden, als auch bei Sicca-Patienten gefunden werden.

Die Darstellung von zufällig auftretenden Aufreißmechanismen ist bisher nicht gelungen, da, bedingt durch die hohe Vergrößerung des Laser-Rastermikroskops, der betrachtete Bildausschnitt zu klein ist, und ein Abrastern nach dem Vorbild der Methode der BUT-Bestimmung nach Norn und Lemp bedingt durch die schwierige Handhabung des Gerätes nicht möglich ist.

Die beobachtete Ausdünnung der wässrigen Phase in den simultanen Fluoreszenz- und Reflexionstechniken kann unserer Meinung nach als Beginn des

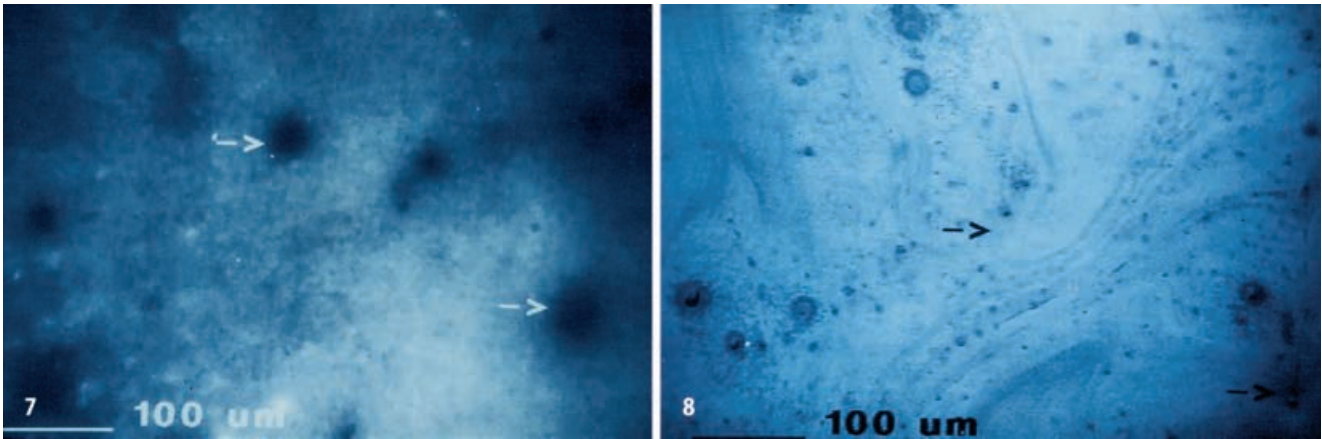


Abb. 4–6 ◀ **Bildmorphologische Darstellung eines Tränenfilmaufrisses an einem Mikrofremdkörper auf der Kornea**

Tränenfilmzerfalls gewertet werden und unterstützt die Theorie von Holly u. Lemp [6, 12], die eine Verdünnung der wässrigen Phase als Ausgangspunkt der nachfolgenden Aufreißmechanismen sehen.

Der Tränenfilm blieb bei den von uns betrachteten Arealen über die Zeit stabil, die die Patienten die Augen geöffnet halten konnten. Es ist jedoch möglich, dass an anderer, gerade nicht fokussierter Stelle, ein Tränenfilmaufriss stattgefunden hat, der den Lidschlagreflex ausgelöst hat. Unsere Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Lipidschicht des Tränenfilms in vivo auch bei beginnender Ausdünnung der wässrigen Phase über längere Zeit stabil bleibt. Ähnliche Ergebnisse wurden in biophysikalischen Untersuchungen der Lipidschicht des Tränenfilms unter In-vitro-Bedingungen gefunden, in denen die Lipidschicht auffallend stabile Oberflächeneigenschaften zeigte [9].

Ein Zusammenhang zu dem klinischen Beschwerdebild und der Ausprägung der Sicca-Symptomatik wurde von uns noch nicht berücksichtigt und bedarf weiterer Untersuchungen, um die Ergebnisse evtl. korrelieren zu können.

Insgesamt stellt die Laser-Rastermikroskopie eine gute Ergänzung zu den Spaltlampenuntersuchungen dar und kann zum besseren Verständnis des

komplexen Dreischichtsystems des Tränenfilms beitragen.

Die Kenntnis der verschiedenen Alterationen des Tränenfilms und ihrer bildmorphologischen Darstellung mit dem Laser-Rastermikroskop steht damit weiteren Untersuchungen, z. B. klinischen Korrelationen der Ausprägung der Erkrankung, oder der Beurteilung der Wirksamkeit und Verweildauer von Tränenersatzmitteln zur Behandlung von Benetzungstörungen der Kornea zur Verfügung.

Literatur

1. Blassmann K (1981) Funktionelle Eigenschaften des Tränenfilmes. In: Marquardt R (Hrsg) Chronische Konjunktivitis, Trockenes Auge. Springer, Wien New York 1981
2. Brewitt H (1995) Diagnostik und Therapie des „Trockenen Auges“. Z Prakt Augenheilk 16:425–431
3. Haberich FJ, Lingelbach B (1982) Kritische Übersicht über unsere Kenntnisse und Vorstellung einer neuen Arbeitshypothese über die Stabilität des präkornealen Tränenfilms (PKTF). Klin Monatsbl Augenheilk 180:115–126
4. Höh H, Schirra F, Ruprecht KW (1992) Diagnostik des „Trockenen Auges“ (sicca-Syndrome). Folia Ophthalmol 17:63–67
5. Holly FJ (1973) Formation and rupture of the tear film. Exp Eye Res 15:515
6. Holly FJ (1973) Formation and stability of the tear film. Int Ophthalmol Clin 13:73
7. Holly FJ, Lemp MA (1977) Tear physiology and dry eyes. Surv Ophthalmol 22:69–87
8. Kaden R (1991) Systemic associations of dry-eye syndrome. Int. Ophthalmol Clin 31:62–68
9. Kaercher T, Möbius D (1989) Stabilität und Flexibilität der Lipidschicht des Tränenfilms sowie deren pathologische Veränderungen im biophysikalischen Experiment. Fortsch Ophthalmol 86:245–248
10. Kilp H (1986) Pathophysiologie der präcornealen Tränenfilms-Lipidschicht. Fortsch Ophthalmol 83:122–124
11. Lee SH, Tseng SC (1997) Rose bengal staining and cytologic characteristics associated with lipid tear deficiency. Am J Ophthalmol 124:736–750
12. Lemp MA (1973) Break-up of the tear film. Int Ophthalmol Clin 13:97
13. Lemp MA (1981) Grundlagen und Klassifizierungen von Funktionsstörungen des trockenen Auges. In Marquardt R (Hrsg) Chronische Konjunktivitis – Trockenes Auge. Springer, Wien New York 1981
14. Liegl O, Mehring M (1980) Der Weg des Fluoresceinnatrium durch die Hornhaut. Klin Monatsbl Augenheilk 159:219
15. Marquardt R, Wenz FH (1980) Untersuchungen zur Tränenfilmstabilität. Klin Monatsbl Augenheilk 176:879
16. Mc Donald JE (1969) Surface phenomena of the tear film. Am J Ophthalmol 67:56–64
17. Mengher LS, Bron AS, Tonge SR, Gilbert DJ (1981) Effect of fluorescein-installation on the pre-corneal tear film stability. Curr Eye Res 4:9–12
18. Norm MS (1969) Desiccation of the precorneal film. I. Corneal wetting time. Acta Ophthalmol 47:865
19. Pflugfelder SC, Tseng SC, et al. (1998) Evaluation of subjective assessments and objective diagnostic tests for diagnosing tear-film disorders known to cause ocular irritation. Cornea 17:38–56
20. Ruprecht KW, Naumann GOH (1980) Augen- und Allgemeinerkrankheiten. In: Naumann OGH (Hrsg) Pathologie des Auges. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 834ff