

⇒ Weiteres Ziel der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen war es, die Zelldichten, die Zellkernvolumina und die Zellkernoberflächeninhalte der Linseneithelien zu bestimmen und daraufhin eine Einordnung der Daten zum Lebensalter und Geschlecht der Patienten, zur Lokalisation der Linsentrübungen sowie zum Auftreten eines NIDDM vorzunehmen.

⇒ Mit Hilfe röntgenspektrometrischer Untersuchungen sollte der Gehalt der Linseneithelien an Phosphor ermittelt werden. Mit Hilfe dieser Methode sollten Rückschlüsse auf den ATP-Gehalt und damit die Energiereserven des Linseneithels gezogen werden. Auch diese Resultate sollten unter Berücksichtigung des Lebensalters und Geschlechts der Patienten und des Auftretens eines NIDDM betrachtet werden.

Ziel aller Untersuchungen sollte es sein, mögliche Zusammenhänge zwischen Veränderungen der Linseneithelien und der Entwicklung alterskorrelierter Katarakte aufzudecken. Dabei war insbesondere der Einfluß des NIDDM auf die Alterationen des Linseneithels von Interesse.

4 Patientenkollektiv, Material und Methode

4.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 206 fortlaufend gewonnene Fragmente des vorderen zentralen Linseneithels elektronenmikroskopisch und röntgenspektrometrisch untersucht sowie Einsicht in die Krankenakten genommen. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich vom März 1994 bis zum März 1996. Die Phakoemulsifikationen, bei denen die untersuchten Fragmente des vorderen zentralen Linseneithels gewonnen wurden, führte stets der gleiche Operateur durch. Die Proben wurden zuerst untersucht und bewertet, später wurde die ophthalmologische und allgemeine Anamnese aus den Krankengeschichten erhoben, um eine objektive Begutachtung der Präparate zu sichern.

4.1.1 Anzahl der Patienten bei verschiedenen Kataraktogenesen

Der größte Anteil der untersuchten Linsenepithelien wurde von Patienten mit alterskorrelierten Katarakten gewonnen. Dabei waren die meisten Linsentrübungen anhand der spaltlampenmikroskopischen Untersuchung der Cataracta progrediens zuzuweisen. Die Zuordnung der untersuchten Katarakte zu den verschiedenen Ätiologien wurde in Tabelle 1 vorgenommen. Die folgenden Untersuchungen beziehen sich auf die Cataracta progrediens bei stoffwechselgesunden Patienten und Patienten mit NIDDM. Es wurde ein Einfluß der Ausprägung der Linsentrübungen auf die Alterationen des Linsenepithels nachgewiesen (Konofsky et al., 1987; Struck et al., 1994). Es erfolgte der Ausschluß der kleineren Gruppen der maturen, hypermaturen und intumeszenten Katarakte zur Gewährleistung der Vergleichbarkeit der Kollektive.

Tab. 1: Auftreten verschiedener Ätiologien der Katarakte im untersuchten Patientenkollektiv [n=206]

<u>Katarakt</u>	<u>Anzahl der</u> <u>Patienten [n]</u>	<u>männliche</u> <u>Patienten [n]</u>	<u>weibliche</u> <u>Patienten [n]</u>
Cataracta traumatica	9	9	0
Cataracta complicata	9	5	4
Cataracta congenita	2	1	1
Cataracta diabetica	1	0	1
Cataracta syndermatotica	1	0	1
Cataracta praesenilis et senilis	184	73	111
- Cataracta progrediens	157	59	98
- ohne NIDDM	101	41	60
- mit NIDDM	56	18	38
- Cataracta praematura et matura	14	7	7
- bei Glaukom	7	3	4
- bei Glaukom und NIDDM	2	1	1
- bei Pseudoexfoliationssyndrom	4	3	1

4.1.2 Erhebung der Patientendaten aus den Krankenakten

Aus den Krankenakten der Patienten wurden folgende Daten erhoben:

- Lebensalter
- Geschlecht
- Kataraktogenese
- Lokalisation der Linsentrübung
- Morphologie der Trübungen
- Reifegrad der Katarakt
- ophthalmologische Vorerkrankungen wie Traumen, intraokulare Entzündungen, Glaukome, Operationen
- Stoffwechselerkrankungen
- Hauterkrankungen
- anamnestisch bekannte kataraktogene Einflüsse (wie z. B. Radiatio im Gesicht, vermehrte Belastung mit infraroter Strahlung, etc.)
- prä- und postoperativer (2. postoperativer Tag) Visus

4.1.3 Ein- und Ausschlußkriterien für die Teilnahme an der Studie und die Zuordnung zu einem Katarakttyp

Folgende Kriterien waren Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie:

- alterskorrelierte Katarakt
- Lebensalter der Patienten 40-90 Jahre

Folgende Kriterien führten zum Ausschluß aus der Studie

- bekanntes okuläres Trauma oder intraokulare Operation
- bekannte abgelaufene intraokulare Entzündung oder Infektion
- angeborene Linsenerkrankung
- bekanntes Glaukom
- bekannter Insulin-abhängiger Diabetes mellitus
- mit der Kataraktogenese assoziierte Einflüsse und Erkrankungen wie:
 - Radiatio im Gesicht
 - Infrarotstrahlung

- Fundus-Rotreflex im durchfallenden Licht noch nachweisbar, aber deutlich abgeschwächt,
- Visusreduktion,
- eventuell Auftreten von Blendungsgefühlen,
- mögliche Myopisierung, eventuell monokulare Doppelbilder

- Cataracta matura:
- alle Linsenschichten durchgetrübt, nicht mehr abzugrenzen,
 - Fundus-Rotreflex im durchfallenden Licht nicht mehr nachweisbar
 - starker Visusabfall
 - eventuell Auftreten von Blendungsgefühlen
 - mögliche Myopisierung

4.2 Entnahmetechnik des Untersuchungsmaterials

Die untersuchten Fragmente der Linsenepthelien wurden während der Phakoemulsifikation durch kreisförmige Kapsulorhexis aus dem vorderen zentralen Abschnitt der Linsenkapsel gewonnen. Die Operation wurden stets vom gleichen Operateur durchgeführt. Der Durchmesser der Präparate betrug ca. 4 mm.

Die Linsenepthelfragmente wurden in 10%igem Formaldehyd bei +4°C 24-72 Stunden aufbewahrt. Danach erfolgte die Spülung in Aqua bidestillata, um das Auskristallisieren des Formaldehyds bei der folgenden rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung zu verhindern. Hierbei mußte auf eine Spülung in einer isotonischen und damit physiologischen Lösung verzichtet werden, da diese die Elemente Natrium, Kalium und Phosphor enthält, die noch mittels EDX-Analyse quantitativ bestimmt werden sollten. Im Anschluß erfolgte die Lufttrocknung des Linsenepthelfragmentes. Dazu wurde das Präparat mit einer feinen Pinzette möglichst peripher gefaßt und in einen Tropfen Aqua bidestillata auf ein Deckgläschen aufgebracht und dann bei Zimmertemperatur getrocknet.

Es wurden mehrere Versuche zur Verbesserung und Optimierung der Präparier-technik durchgeführt, da bei der Formaldehydfixation und auch bei der Lufttrocknung Artefaktbildungen und Veränderungen (insbesondere Größenveränderungen) der

Linseneithelpräparate auftreten. Die Volumenveränderungen bei Fixation in 5-10%iger Formaldehydlösung sollen zwischen 3-6 Volumenprozent betragen (Romeis, 1993). Die Zielstellung war dabei immer, sowohl den Zellverband als auch die Morphologie der Einzelzelle zu beurteilen sowie eine Bestimmung der Zelldichte durchführen zu können. Die Fixation mit Glutaraldehyd verschiedener Konzentrationen mit und ohne Austauschspülung in aufsteigender Acetonreihe wurde getestet. Es wurde die Methode der Kritisch-Punkt-Trocknung ohne vorhergehende chemische Fixation geprüft. Außerdem wurde die Möglichkeit genutzt, die Präparate nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Überführung ins Rasterelektronen-mikroskop mittels einer Kryotransfereinrichtung ohne vorher notwendige chemische Fixation in ihrer ursprünglichen Form zu begutachten. Die Formaldehydfixation zeigte im Vergleich zur Glutaraldehydfixation und zur Kritisch-Punkt-Trocknung deutlich geringere Artefaktbildungen besonders im Sinne von Reißbildungen. Bei der Kritisch-Punkt-Trocknung müssen die Linseneithelfragmente vor dem Trocknungsprozeß in kleine Metallnetzchen eingelegt werden, um ein Einrollen der Präparate zu verhindern. Diese Manipulation stellt eine starke Belastung für die Epithelien dar. Desweiteren erschweren die Metallgitter dieser Netzchen die Darstellung des Epithels im Elektronenmikroskop. Die Betrachtungsmöglichkeiten sowohl der Oberflächenstrukturen als auch der Binnenstruktur an der Bruchstelle des Kapselhäutchens nach Frostung des Präparates in flüssigem Stickstoff sind gegenüber der Formaldehydfixation deutlich überlegen. Bezüglich der Zielsetzung der vorliegenden Untersuchungen, den Zellverband und die Morphe der Einzelzelle zu beurteilen sowie die Zelldichte zu bestimmen, ist festzuhalten, daß das mit dieser Darstellungsmethode nicht möglich ist. Aus diesen Gründen fiel die Entscheidung trotz der bekannten Nachteile der Formaldehydfixation für diese Technik.

4.3 Untersuchungstechnik

Die Untersuchung erfolgte mit einem Rasterelektronenmikroskop S-2400 der Firma Hitachi. Durch die Rasterelektronenmikroskopie wird mittels eines beschleunigten Elektronenstrahls das Oberflächenprofil des Präparates abgetastet und mit hoher Tiefenschärfe plastisch dargestellt. Dazu ist es notwendig, das Präparat vorher auf der Oberfläche leitfähig zu machen, da ansonsten Aufladungen eine befriedigende

Betrachtung verhindern und das Präparat zusätzlich zerstören. Üblich sind dabei die Besputterung mit Gold, die die differenzierteste Darstellung der Strukturen ermöglicht oder die Bedampfung mit Kohlenstoff. Die Entscheidung fiel für die Bedampfung mit Kohlenstoff, da sich die Röntgenspektren für Phosphor und Gold derart überlagern, daß eine Bestimmung des Phosphorgehaltes der Proben bei der Besputterung mit Gold nicht möglich gewesen wäre. Die Dicke der Kohlenstoffschicht beträgt ca. 10- 20 nm.

Für die Abbildung der Linsenepithelien wurde nach verschiedenen Versuchen eine Beschleunigungsspannung von 15 kV festgelegt. Um die EDX-Analyse optimal durchführen zu können, wurden die Proben um 15° geneigt. Die Präparate wurden zunächst bei 20facher Vergrößerung untersucht, um eine Übersicht über das Präparat zu erhalten, daraufhin wurden charakteristische Ausschnitte bei 500facher und 800facher Vergrößerung bewertet und über einen digitalen Fotoprinter dokumentiert. Bei Veränderungen einzelner Zellen wurden auch noch andere Vergrößerungen zur näheren Begutachtung herangezogen und gegebenenfalls fotodokumentiert.

Die EDX-Analyse wurde mit dem Röntgenspektrometer TN-5500 der Firma Tracor durchgeführt. Für jede Probe wurde ein energiedispersives Röntgenspektrum über einen Zeitraum von 300 ms bei einer Beschleunigungsspannung von 8 kV aufgenommen (Abb. 5). Die bei dieser Meßmethode mit 8kV beschleunigten Elektronen treffen auf das Präparat und werden in dem biologischen Gewebe stark abgebremst. Dabei wird Energie in Form von Bremsstrahlung freigesetzt und kann in einem kontinuierlichen Spektrum dargestellt werden. Die Wechselwirkungen der beschleunigten Elektronen mit den Atomen der Probe führen in dem als Anregungsvolumen bezeichneten Bezirk des Präparates durch Übergang von Elektronen innerer Schalen (geringere Energie) auf äußere Schalen (höhere Energie) und das nachfolgende Emittieren eines elementspezifischen Röntgenquanten beim Übergang auf die innere Schale zur Ausbildung eines Linienspektrums, welches das Bremsspektrum überlagert. Die Häufigkeitsverteilung der Quanten, die mittels eines Si(Li)-Detektors mit Be-Fenster ermittelt wurde, erlaubt Rückschlüsse auf die Art und Menge der in der Probe vorkommenden Elemente.

4.4 Ermittlung der Ergebnisse

Zur Bewertung der untersuchten Linsenepithelien wurden folgende Kriterien herangezogen:

- Patientenalter zum Zeitpunkt der Operation
- Art der Katarakt
- Reifegrad der Katarakt
- Morphologie des Linsenepithels
- Zelldichte
- Bestimmung des Kerndurchmessers, Kernflächeninhalts und Kernvolumens
- Bestimmung des relativen Phosphorgehalts der Linsenepithelzellen

4.4.1 Patientenalter

Die Patienten mit alterskorrelierter Katarakt wurden in 4 Altersklassen unterteilt, um den Einfluß des Alters auf die erhobenen Daten untersuchen zu können. Als Cataracta praesenilis werden die alterskorrelierten Katarakte bezeichnet, die bis zum 60. Lebensjahr auftreten. Danach spricht man von Cataracta senilis.

Tab. 2: Einteilung der Patienten mit Katarakt in Altersklassen

Patientenalter	Altersklasse	Bezeichnung der Katarakt
40-60 Jahre	I	Cataracta praesenilis
61-70 Jahre	II	Cataracta senilis
71-80 Jahre	III	Cataracta senilis
81-90 Jahre	IV	Cataracta senilis

4.4.2 Beurteilung der Morphologie des Linsenepithels und Einteilung in Schädigungsgrade

Zur Beurteilung einer möglichen Schädigung des Linsenepithels wurden 2 Kriterien herangezogen:

1. die Begutachtung des Zellverbandes

Dokumentiert wurden hierbei lokale Auflösungen des Zellverbandes mit Verlust von Zellen oder aber auch deutlicher Vermehrung von Zellen.

2. die Begutachtung der Morphologie der Zellkerne

Mögliche Schädigungsmuster:

- Abflachung der Zellkerne
- Bildung von Zellkernausstülpungen oder Zellkernausläufern
- starke Verkleinerung der Zellkerne

Diese morphologischen Veränderungen sind Ausdruck von Karyolyse, Karyorhexis und Kernpyknose. Auf Grundlage der im Vorangegangenen beschriebenen möglichen morphologischen Veränderungen wurde eine Einteilung der untersuchten Präparate in 3 Schädigungsgrade (Score I bis III) definiert. Die gewählte Präparationsmethode ermöglicht nur die Beurteilung der Zellkerne, nicht der Zellgrenzen.

Schädigungsgrad Merkmale

I
(Abb. 2) - Der Zellverband ist regelmäßig, vollständig und ohne lokale Zellvermehrungen.

ohne Schädigung - Die Zellkerne zeigen keine pathologischen Veränderungen.

II
(Abb. 3) - Es sind einzelne Zellen aus dem Zellverband herausgelöst. Der Zellverband erscheint aufgelockert, ist aber insgesamt als zusammenhängend erkennbar.

und/ oder

- Einzelne Zellkerne stellen sich abgeflacht oder geschrumpft dar oder haben Ausläufer bzw. Ausstülpungen.

III
(Abb. 4) - Der Zellverband ist aufgelöst. Es ist kein Zusammenhang zwischen den Zellen erkennbar.

und/ oder

- Ein großer Teil der Zellen stellt sich im Sinne der beschriebenen möglichen Veränderungen als geschädigt dar.

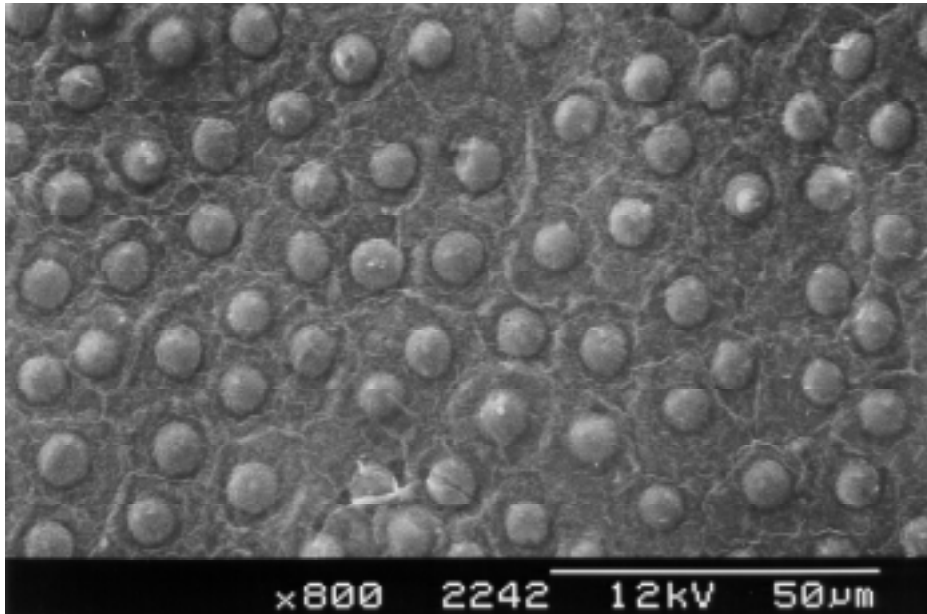


Abb. 2: Vorderes zentrales Linsenepithel eines Patienten mit alterskorrelierter Katarakt, das keine morphologischen Schädigungen aufweist (Schädigungsgrad I); rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, 800fache Vergrößerung

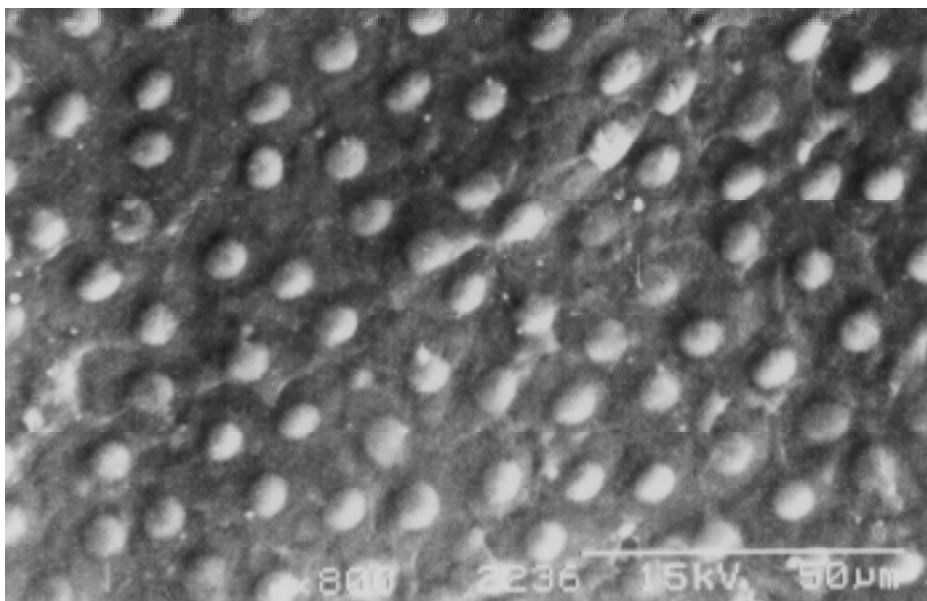


Abb. 3: Vorderes zentrales Linsenepithel eines Patienten mit alterskorrelierter Katarakt und einzelnen Schädigungen (Auszipfelungen) der Zellkerne und leichten Gefügestörungen des Zellverbandes (Schädigungsgrad II); rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, 800fache Vergrößerung

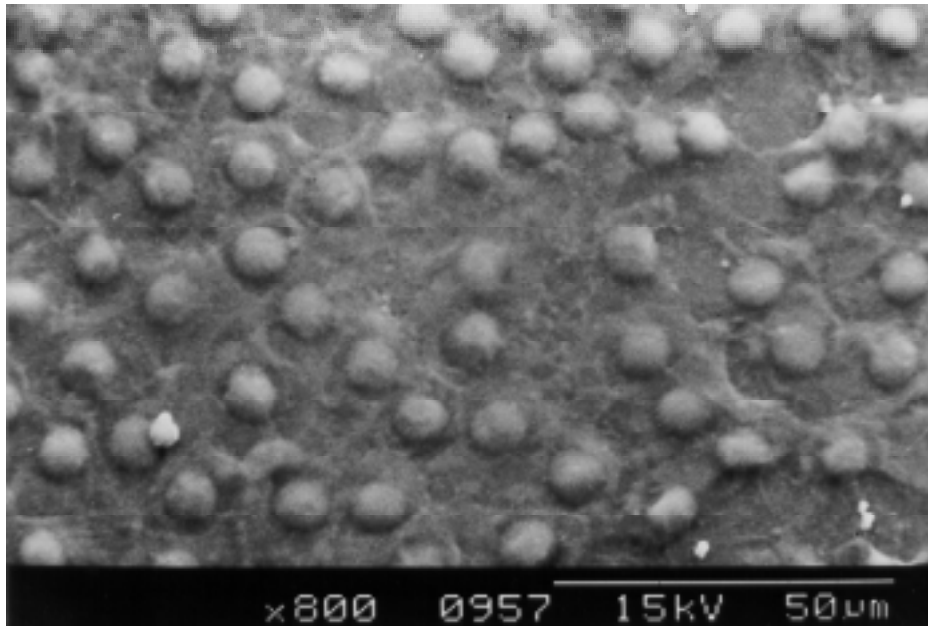


Abb. 4: Vorderes zentrales Linsenepithel eines Patienten mit alterskorrelierter Katarakt, bei dem sowohl die Morphe der einzelnen Zellkerne als auch der Zellverband deutlich pathologisch verändert sind (Schädigungsgrad III); rasterelektronenmikroskopische Aufnahme, 800fache Vergrößerung

4.4.3 Bestimmung der Zelldichte

Die Linsenepithelien wurden bei einer 500fachen Vergrößerung im Rasterelektronenmikroskop photographiert. Anhand dieser Photos wurden je Präparat 2 Flächen von je $0,04 \text{ mm}^2$ mit einer Schablone ausgezählt. Aus den beiden Zählungen wurde das arithmetische Mittel errechnet. Durch Multiplikation mit dem Faktor 25 wurde die Zelldichte/ mm^2 bestimmt.

4.4.4 Bestimmung des Kerndurchmessers, Kernoberflächeninhalts und Kernvolumens

Während der Untersuchung der Präparate im Rasterelektronenmikroskop wurden die Linsenepithelien u. a. in 1000facher Vergrößerung dargestellt. Mittels eines bildverarbeitenden Systems wurden diese Rasterelektronenmikroskopiebilder gescannt. Am Computer war es dann möglich, eine lange und eine kurze Achse in die als Ellipsen angenommenen Zellkerne zu projizieren und so einen größeren und einen kleineren Zellkerndurchmesser zu ermitteln. Es wurden je Linsenepithelpräparat 10 Zellkerne

vermessen. Danach wurde das arithmetische Mittel der 2 Durchmesser ermittelt. Mit Hilfe dieser Größen wurde der Oberflächeninhalt und das Volumen der Zellkerne nach den Formeln von Palkovits und Fischer berechnet (Palkovits et al., 1968).

$$A_0 = a \times b \times \pi / 4 \quad A_0 = \text{Kernflächeninhalt} \quad a = \text{größerer Durchmesser}$$

$$V = a \times b^2 \times \pi / 6 \quad V = \text{Kernvolumen} \quad b = \text{kleinerer Durchmesser}$$

4.4.5 Bestimmung des relativen Phosphorgehaltes

Das gesamte mit dem Röntgenspektrometer aufzunehmende Spektrum besteht aus 1024 Kanälen. Jeder einzelne Kanal zeigt ausschließlich eine Empfindlichkeit für Elektronen eines bestimmten Quantenenergiewertes. Die Peakbildung für ein Element basiert auf der Häufigkeitsverteilung um den für das Element spezifischen Quantenenergiewert. Zur quantitativen Phosphorbestimmung wurden die mittleren 27 Kanäle des Phosphorpeaks herangezogen. Der 14. Kanal entspricht genau der K_{κ} - Linie des Elementes Phosphor. Es wurde die Summe aller in den gewählten 27 Kanälen eingegangenen Impulse registriert. Ein Teil dieser Impulse wurde anschließend dem kontinuierlichen Background zugeordnet (Uemura et al., 1978). Danach wurde das Peak/Background-Verhältnis bestimmt.

Das Peak-/Background-Verhältnis entspricht dem Quotienten:

$$\text{relativer Phosphorgehalt} = \text{Peak} : (\text{Gesamtanzahl der eingehenden Impulse} - \text{Peak})$$

Mit Hilfe von Plasmaätztechniken und quantitativen Tiefenmessungen der Elemente mittels EDX-Analyse konnte bei im Rahmen unserer Studie durchgeführten Begleituntersuchungen gezeigt werden, daß sich der nachgewiesene Phosphor im Linsenepithel und nicht in der Linsenkapsel befindet. Nachdem die Lage der Linsenepithelzellen weggeätzt wurde, was durch fraktioniertes Ätzen und raster-elektronenmikroskopische Kontrollen erreicht wurde, konnte die selektive EDX-Analyse der deepithelialisierten Linsenkapsel vorgenommen werden. Der Phosphorpeak war nicht mehr nachweisbar. Der in der folgenden Abbildung nicht gekennzeichnete, dem Phosphorpeak benachbarte Peak entspricht charakteristischerweise dem Schwefelgehalt der Kapsel.

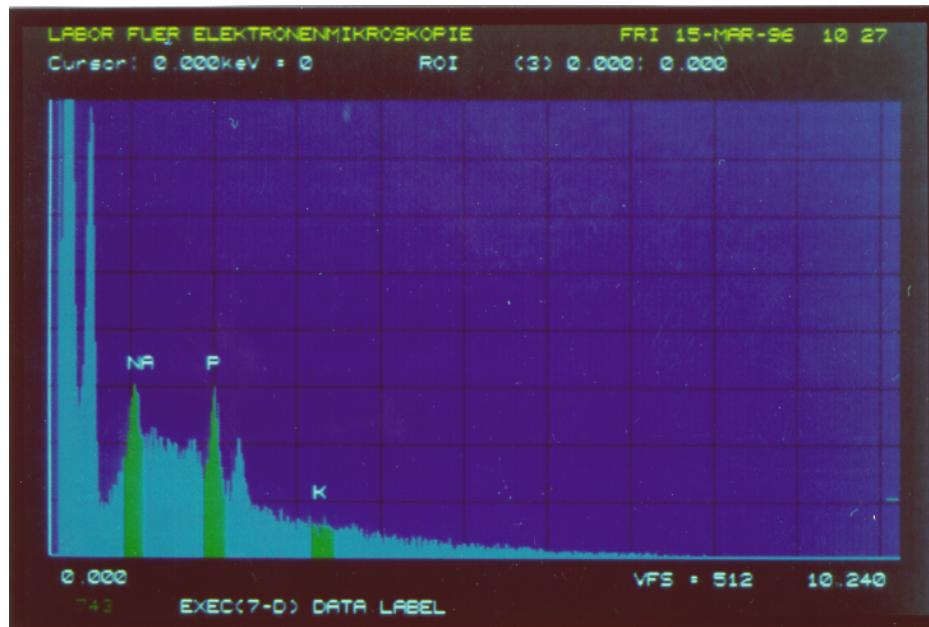


Abb. 5: Röntgenspektrum einer vorderen zentralen Linsenkapsel mit Linsenepithel; typische Peaks für die Elemente P, Na, K und S (nicht gekennzeichnet) sowie dem kontinuierlichen Background; Aufnahme mittels EDX-Analyse

4.5 Statistische Auswertung

Die arithmetischen Mittelwerte der Zellparameter Zelldichte, Zellkernvolumen, Zellkernoberflächeninhalt und relativer Phosphorgehalt verschiedener Altersgruppen, verschiedener Geschlechter und unter Berücksichtigung der Einflußgröße NIDDM wurden unter Verwendung des t-Testes verglichen (Kaiser et al., 1956).

Da bei der Bewertung des Schädigungsgrades eine Einteilung in den vorher definierten, aber doch subjektiven Score von I-III vorgenommen wurde, wurden für diesen Zellparameter keine statistischen Signifikanzen berechnet. Es erfolgte die Beschreibung der absoluten Ergebnisse.

5 Ergebnisse

5.1 Auftreten verschiedener Kataraktformen bei Patienten mit alterskorrelierter Cataracta progrediens ohne Diabetes mellitus

Die Anzahl der verschiedenen Kataraktformen wurde sowohl für das Gesamtkollektiv (99 Patienten) als auch für das weibliche (60 Patientinnen) und männliche Unterkollektiv (39 Patienten) dargestellt (Tab. 3).