

Aus der Augenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Sundmacher

Sicherheit von lokalem Cyclosporin A bei entzündlichen Erkrankungen von Hornhaut und Bindehaut
--

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

Bartosz Wojanowski

2007

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Thomas Reinhard

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Antonia Jousen

Inhaltsverzeichnis

1. Studiendesign und Fragestellung	6
2. Hintergrund	9
2.1. Anatomie der Hornhaut	9
2.2. Anatomie der Bindehaut	11
2.3. Entzündliche Krankheiten der Hornhaut und Bindehaut	13
2.3.1. Blepharokeratokonjunktivitis sicca	13
2.3.2. Rosazea Blepharokeratokonjunktivitis	16
2.3.3. Blepharokeratokonjunktivitis atopica und Keratokonjunktivitis vernalis	19
2.3.4. Nummuläre Keratitis	24
2.3.5. Varizella-Zoster-Keratitis	25
2.3.6. Thygeson Keratitis	27
2.3.7. Ulcus Mooren	29
2.3.8. Praedescemetale Keratitis	31
2.3.9. Rheumatische Erkrankungen des Auges	31
2.4. Therapieoptionen	33
2.4.1. Kortikosteroide	34
2.4.1.1. Wirkmechanismus	35
2.4.1.2. Nebenwirkungen	36
2.4.2. Zytotoxische Medikamente	37
2.4.3. Selektive IL-2 Antagonisten	37
2.4.3.1. Cyclosporin A	37
2.4.3.1.1. Herstellung	38
2.4.3.1.2. Pharmakodynamik	40
2.4.3.1.3. Pharmakokinetik	42
2.4.3.1.4. Nebenwirkungen	43
2.4.3.1.5. Anwendungsgebiete	45
2.4.3.2. Tacrolimus	46
2.4.3.3. Pimecrolimus	47
2.5. Oberflächliche epitheliale Tumore der Konjunktiva	48
2.5.1. Präkanzeröse Prozesse	48
2.5.2. Karzinome der Konjunktiva – Bindehautkarzinom	50

3. Patienten und Methoden	55
3.1. Gliederung des Patientenkollektivs	55
3.2. Datentechnische Auswertung	57
3.2.1. Tabellarische Übersichten	57
3.2.2. Aufteilung der Krankheiten nach Geschlecht	60
3.2.3. Patienten bis 16 Jahre	60
3.3. Anschreiben	61
3.4. Patientenaufklärung	62
3.5. Augenärztliche Untersuchung	62
3.6. Bindehautabstrich	62
3.7. Zytopathologische Untersuchung	64
3.7.1. Zytopathologie	64
3.7.2. Färbung	64
3.7.3. Diagnostische Kriterien der zytopathologischen Untersuchung	65
3.8. DNA-bildzytometrische Untersuchung	66
3.8.1. DNA-Bildzytometrie	66
3.8.2. Färbung	68
3.8.3. Diagnostische Kriterien der DNA-bildzytometrischen Untersuchung	69
4. Ergebnisse	72
4.1. Ergebnisse der spaltlampenmikroskopischen Untersuchung	72
4.2. Ergebnisse der Bindehautabstriche	72
4.3. Kasuistiken	74
4.3.1. Kasuistik Patient 1	74
4.3.2. Kasuistik Patient 2	77
5. Diskussion	79
5.1. Diskussion Patientenkollektiv	79
5.2. Diskussion Methodik	80
5.2.1. Diskussion Bindehautabstrich	80
5.2.2. Diskussion Zytopathologie	81
5.2.3. Diskussion DNA-Zytometrie	83
5.3. Diskussion Kasuistiken	86
5.4. Diskussion Latenzzeit	87
5.5. Diskussion Immunsystem	89
5.6. Diskussion Sicherheit von CSA-Augentropfen	90

5.7. Schlussfolgerung	93
6. Literaturverzeichnis	94
7. Danksagung	110
8. Lebenslauf	111
9. Zusammenfassung	112
9. Anhang, Anlagen	113

1. Studiendesign und Fragestellung

In dieser Arbeit soll die Sicherheit von lokal angewendetem Cyclosporin A (CSA) Augentropfen bei entzündlichen Erkrankungen von Hornhaut und Bindehaut des Auges bezüglich einer möglichen Kanzerogenität geprüft werden. Daraus soll auf die empfehlenswerte Zeitspanne eines Kontrollintervalls für verschiedene chronische Erkrankungen der Binde- und Hornhaut im Rahmen einer solchen Therapie geschlossen werden.

Für alle mit lokalem CSA behandelte Patienten ist diese Therapie eine Alternative u.a. zur Gabe von Kortikosteroiden. Seit 1994 wendet die Augenklinik der Heinrich-Heine-Universität lokales Cyclosporin A bei Patienten mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen der Horn- und Bindehaut an. Dabei handelt es sich um Patienten mit einer der zehn entzündlichen Augenerkrankungen, die Kapitel 2.3. besprochen werden. Alle zehn betreffen Horn- und/oder Bindehaut und weisen in ihrer Genese einen entzündlichen Aspekt auf. Daher werden sie meist mit lokalen Kortikosteroiden therapiert. Cyclosporin A scheint aber offenbar eine gute Alternative zu sein, obwohl es meistens bei vielen der im Kapitel 2.3. genannten Krankheiten, einen nicht so schnellen Therapieeffekt aufweist, wie Kortikosteroide [105, 184]. Andererseits zeigen viele der Erkrankungen einen chronischen Verlauf und benötigen daher eine langwierige Therapie, die bei andauernder lokaler Kortikosteroidgabe mit schwerwiegenderen Nebenwirkungen einhergeht [87, 88, 99, 105, 165, 209]. Ein weiteres Problem der lokalen Kortikosteroidtherapie ist die hohe Rezidivrate, insbesondere bei der Thygeson Keratitis und der nummulären Keratitis [105]. Da Cyclosporin A erst verhältnismäßig kurz eingesetzt wird (ca. 10 Jahre), ist es Ziel dieser retrospektiven Studie, die Sicherheit bezüglich einer möglichen lokalen Kanzerogenität von lokalem Cyclosporin A zu untersuchen.

Sie bezieht sich auf Patienten, die aufgrund ihrer entzündlichen Augenerkrankungen zwischen 486 und 1160 Tage lang mit dem lokalen Immunsuppressivum CSA behandelt wurden.

Kallen et al. 2003 [95] und Feltgen et al. 2005 [47] wiesen daraufhin, dass chronische Entzündungen der Hornhaut und Bindehaut vor allem bei Atopikern mit einer Blepharokeratokonjunktivitis atopica, bzw. Patienten mit einer chronischen Immunschwäche (Alkoholiker), zur Entwicklung von Bindehautkarzinomen bzw. Neoplasien des Lides [117] prädisponieren können. Macarez et al. verwiesen 1999 darauf [109], dass die Bindehaut von Patienten, die unter systemischer CSA-Therapie nach Organtransplantationen steht, ebenfalls zu Karzinomen neigt. So wurde auch in vielen weiteren Studien beschrieben, dass die systemische Cyclosporin A Therapie, insbesondere nach Organtransplantationen, kanzerogen wirkt [34, 53, 91, 94, 101, 109, 111, 124, 159, 179]. Yarosh et al. gehen auch in einer Publikation von 2005 davon aus, dass systemisch verabreichte Calcineurininhibitoren, wie Cyclosporin A, DNA-Reparatur-Systeme und Apoptose in menschlichen epidermalen Keratinozyten (NHEK) verringern [207]. Eine weitere Veröffentlichung vom September 2005 [44, 50] durch die amerikanische Arzneimittel-Zulassungsbehörde (Food and Drug Administration, FDA) verzeichnet einem Warnhinweis in der Fachinformation für Protopic® (lokales Immunsuppressivum, Kapitel 2.4.3.2.), der daraufhin deutet, dass die Anwendung dieser Produkte die Entstehung von Hauttumoren und Lymphomen möglicherweise begünstigen könnte. Diese Informationen lassen den Verdacht aufkommen, dass das Entstehen von Bindehautkarzinomen, vor allem bei chronisch entzündlichen Erkrankungen der Hornhaut und Bindehaut, durch eine lokale Cyclosporin A Therapie begünstigt werden könnte.

In dieser Studie soll daher geprüft werden, ob Dysplasien oder in situ Karzinome bei chronisch entzündlichen Erkrankungen der Hornhaut und Bindehaut, insbesondere bei Atopikern mit einer Blepharokeratokonjunktivitis atopica, durch zusätzliches lokales CSA gehäuft induziert werden. Folglich können gegebenenfalls Empfehlungen für die Intensität der erforderlichen Nachkontrollen und des Kontrollintervalls abgegeben werden.

Das Patientenkollektiv gliedert sich in insgesamt 200 Patienten, die mit lokalem Cyclosporin A behandelt wurden (Kapitel 3.1. Gliederung des Patientenkollektivs). Alle Patienten erhielten eine Einladung zur Teilnahme an dieser Studie. Dabei wurde eine augenärztliche Untersuchung mit nachfolgendem Bindehautabstrich durchgeführt. Während der Untersuchung wurde der aktuelle Stand der Erkrankung bewertet, die persönlichen Erfahrungen des Patienten mit Cyclosporin A Augentropfen erfasst und abschließend ein Bindehautabstrich mit zytologischer Untersuchung durchgeführt.

Der erste Teil der Studie, die Auswertung der Erfahrungen sowie der Effektivität der lokalen Cyclosporin A Therapie bei entzündlichen Erkrankungen von Hornhaut und Bindehaut, wurde in einer parallel verlaufenden Studie mit speziellen Fragebögen erfasst (Reinhard T, Braun M et al. 2005). Der zweite Teil, die Erfassung der Sicherheit von lokalem Cyclosporin A bei entzündlichen Erkrankungen von Hornhaut und Bindehaut, ist Gegenstand dieser Arbeit.

2. Hintergrund

2.1. Anatomie der Hornhaut

Die Cornea bulbi beschreibt den durchsichtigen Abschnitt der Augapfelhülle (Tunica fibrosa bulbi), der am Limbus corneae in die weiße Augenhaut (Sklera) übergeht. Ihr geschichteter Aufbau gliedert sich zunächst in 5 Schichten [6, 97, 125]:

1. Epithelium anterior: mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel
2. Lamina limitans anterior: auch als Bowman-Membran bezeichnet
3. Substantia propria: Stroma, Lamellen kollagener Fibrillen mit Fibrozyten
4. Lamina limitans posterior: Descemet-Membran als Basalmembran
5. Epithelium posterius: Endothel

Das äußere Epithel, das 10% der gesamten Hornhautdicke ausmacht, besteht aus 3 Zelltypen. Es ist unter anderem eine Barriere gegen Fremdproteine und hat eine mechanische Schutzfunktion. Defekte, die ausschließlich das Epithel betreffen, führen nicht zur Narbenbildung.

Das Stroma macht fast 90% der Hornhautdicke aus und besteht aus parallel angeordneten Kollagenlamellen. Die Grundsubstanz besteht aus Muko- und Glykoproteinen und enthält Leukozyten sowie Makrophagen.

Die Descemet-Membran stellt die Basalmembran des Hornhautendothels dar. Sensibel innerviert wird die Hornhaut durch den N. ophthalmicus des fünften Hirnnerven (V₁).

Die Form der Hornhaut ist fast rund und im Scheitel (Vertex corneae) sphärisch gekrümmt. Die Dicke variiert zwischen 1,0 – 1,2 mm in der Peripherie (Limbus) und 0,7 – 0,8 mm zentral. Sie ist stärker gewölbt als die Sklera und trägt mit 43dpt am stärksten zur Brechkraft des Auges bei. Der Durchmesser beträgt 10 – 13 mm [125].

Die Transparenz der Hornhaut ist durch die Avaskularität, die regelmäßig angeordneten Kollagenfibrillen und durch den relativ niedrigen Wassergehalt bedingt. Änderungen dieser Parameter oder eine unregelmäßige Oberfläche führen zur Abnahme der Transparenz bzw.

der Brechkraft. Hinzukommt, dass der Wassergehalt durch die Dehydrierung des Endothels reguliert wird. Hierbei bewirkt ein aktiver Transport von Natrium, Kalium und Hydrogenkarbonat-Ionen einen Wasseraustritt vom Hornhautstroma in die Vorderkammer. Ändert sich dieser Wassergehalt, so werden die Fibrillen auseinander gedrängt und die Transparenz sowie die Sehkraft nehmen ab.

Die Hornhautoberfläche wird durch den Tränenfilm geglättet. Dieser setzt sich aus drei Schichten zusammen [5, 6, 125]. 1. Die *äußere Lipidschicht* wird von den Meibom'schen Drüsen gebildet und verhindert die Verdunstung der wässrigen Schicht. Sie hält die Tränenfilmstabilität aufrecht. 2. Die *wässrige Schicht* stellt den Hauptanteil dar und wird von den Haupttränendrüsen und den akzessorischen Tränendrüsen nach Krause und Wolfring sezerniert. Die Haupttränendrüse wird reflektorisch, d.h. neurogen gesteuert. Die Stimulation erfolgt emotional oder über eine Reizung des N. trigeminus, z.B. bei Rhinitis, Sinusitis oder Keratitis. Die akzessorischen Tränendrüsen leisten eine Basalsekretion, die das Auge stets feucht hält. Die wässrige Schicht ist ein isotonisch wässriges Sekret und besteht zum größten Teil aus Wasser, enthält aber zusätzlich anorganische Salze, Glukose, Harnstoff, Immunglobuline, Lysozym, Betalysin, Laktoferrin und andere Proteine. Das Vorhandensein von antibakteriellen Substanzen erklärt auch, warum ein trockenes Auge stets anfälliger für Infektionen ist als ein gesundes Auge. Weitere Funktionen sind das Wegschwemmen von Fremdkörpern, das Zuführen von Sauerstoff auf das Hornhautepithel, die Pufferung der Augenoberfläche, bedingt durch den neutralen pH-Wert, und das Ausgleichen kleiner Hornhautunregelmäßigkeiten, so dass eine glatte optische Fläche entsteht [6, 97]. 3. Die *innere Muzinschicht* ist ein schleimiges Sekret der Becherzellen der Konjunktiva. Die wesentliche Funktion dieser Schicht besteht in der „Verwandlung“ der hydrophoben in eine hydrophile Hornhautoberfläche. Muzin ist ein Glykoprotein, welches an die Zellmembranen des Hornhautepithels adsorbiert und durch ihre Mikrovilli festgehalten wird. Somit werden die Spreitfähigkeit der Tränen und die vollständige Benetzung der Hornhaut garantiert.

Weiterhin sind ein normaler Lidschlußreflex, die Kongruenz der äußeren Augenoberfläche mit den Lidern und ein gesundes, unvernarbtes Hornhautepithel für die Erhaltung des Tränenfilms von Bedeutung. Nur das Zusammenwirken von intakten Lidern, Tränen und Bindehaut stellt eine optimale Verteidigung gegen exogene Einflüsse des Auges dar und gewährleistet so eine bestmögliche Sehkraft der Hornhaut [5, 6, 125].

2.2. Anatomie der Bindehaut

Die Konjunktiva ist eine schleimhautähnliche Fortsetzung der äußeren Haut, welche die hintere Fläche des Lids als *Conjunctiva palpebrarum* überzieht, sich nach oben und unten sackförmig ausstülpt (*Fornix conjunctivae*) und am Tarsus (*Conjunctiva tarsi*) fixiert ist. Unter Ausbildung der oberen und unteren Umschlagfalte setzt sie sich auf der vorderen Fläche der Sklera fort (*Conjunctiva bulbi*), um sich am Limbus fest mit der Cornea zu verbinden [5, 6, 97, 125].

Sie ist kälte- und schmerzempfindlich und stellt die Hülle für den Augapfel dar, in der dieser reibungsfrei gleiten kann [6]. Mikroskopisch gliedert die Bindehaut sich in Epithel und Stroma, mit zahlreichen Drüsenanteilen [5].

Das *Epithel* besteht aus mehreren Zellschichten. Die kuboiden Basalzellen entwickeln sich auf dem Weg zur Oberfläche zu abgeflachten, vieleckigen Zellen. Bei chronischer Reizung oder Austrocknung kann es zur Verhornung kommen, so dass das Epithel den Charakter der äußeren Haut annimmt [5].

Das *Stroma* ist vom Epithel durch eine Basalmembran getrennt und reich vaskularisiert. Die oberflächliche Schicht enthält lymphatisches Gewebe. Die lymphatischen Abflusswege ziehen zu den präaurikulären und submandibulären Lymphknoten. Die tiefere Schicht ist dick und fibrös und eher zum subkonjunktivalen Gewebe zu zählen. Eingelagert ins Stroma sind zahlreiche Drüsen der schleimproduzierenden Becherzellen und der akzessorischen

Tränendrüsen. Der Schleim der Becherzellen bedingt die Haftung des Tränenfilms auf der Hornhaut [5].

Die Bindehaut wird aus klinischen Gründen in drei Abschnitte unterteilt [5, 6, 125]. Die palpebrale Bindehaut beginnt an der Haut-Schleimhaut-Grenze und kleidet die Innenseite der Lider aus. Dort ist sie fest mit dem Tarsus verwachsen. Im Bereich der Fornices ist sie reichlich und locker vorhanden, so dass es dort leicht zu Schwellungen kommen kann.

Die bulbäre Bindehaut bedeckt den vorderen Teil der Sklera. Hier liegt sie lose auf und geht am Limbus in die Hornhaut über. Erst dort ist sie fest mit der darunter liegenden Tenon-Kapsel verbunden.

2.3. Entzündliche Krankheiten der Hornhaut und Bindhaut

2.3.1. Blepharokeratokonjunktivitis sicca

Die Blepharokeratokonjunktivitis sicca ist charakterisiert als ein chronisch rotes Auge.

Ursächlich liegt hier eine bakterielle Fehlbesiedlung, meist durch Staphylokokken vor [193a].

Mikrobiologisch sind neben den häufigsten Erregern, Staphylokokkus aureus und Staphylokokkus epidermidis, auch Pseudomonas aeruginosa, Corynebakterien und Streptokokken, meist in Mischkultur, nachweisbar [125, 193a]. Die Bakterien sind ein infektiöses Agens und wirken über toxische und mikrobiallergische Mechanismen. Die bakterielle Fehlbesiedlung kann sowohl primär, als auch sekundär als Folge einer mangelhaften Zusammensetzung des Tränenfilms, insbesondere der äußeren Lipidschicht sein. Eine mangelhafte Tränenfilmzusammensetzung kann viele Ursachen haben.

Abgelaufene Infektionen, wie das Trachom oder Virusinfektion, Allergien, verschiedene Hauterkrankungen, wie okuläres Pemphigoid, Lyell-Syndrom, Stevens-Johnson-Syndrom, Erythema exsudativum multiforme, Verätzungen und narbenbildende Verletzungen können ätiologisch eine Rolle spielen. Weiterhin können nach Brewitt et al. [26] verschiedene Medikamente aus den Substanzgruppen der Anticholinergika, Antihistaminika, Beta-Rezeptorblocker, Östrogene (Ovulationshemmer, Frauen in der Menopause oder in der Schwangerschaft), Methyldopa, Retinoide, aber auch ein Vitamin-A-Mangel, Thiazid-Diuretika, sowie tri- und tetrazyklische Antidepressiva die natürliche Tränenfilmzusammensetzung stören. Weitere Ursachen für eine sekundäre bakterielle Infektion sind die Therapie mit lokalen Immunsuppressiva, wie Kortikosteroide oder Zytostatika, und Vorerkrankungen oder Verletzungen am Auge, die den Eintritt von Bakterien ermöglichen (z.B. Hornhautulcera, Erosionen, Lidotropium, unvollständiger Lidschluß, Kontaktlinsen) [125, 193a]. Anamnestische Hinweise auf Allergien (Neurodermitis), Lymphome und HIV-Infektion sollten ätiologisch ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden [6, 125, 130]. Der Blepharitis liegt ein toxischer Pathomechanismus zugrunde. Als hautschädigende Agenzien

werden ein bakterielles Exotoxin, das so genannte nekrotisierende Toxin, bakterielle Lipasen und andere Toxine postuliert [125, 193a]. Obwohl bei ungefähr 40% der Patienten Hinweise auf eine zelluläre Immunität zu beobachten sind, wird eine immunologische Reaktion bei der Blepharitis nicht als Hauptursache gesehen, sondern eher eine direkte Schädigung durch Bakterientoxine [193a].

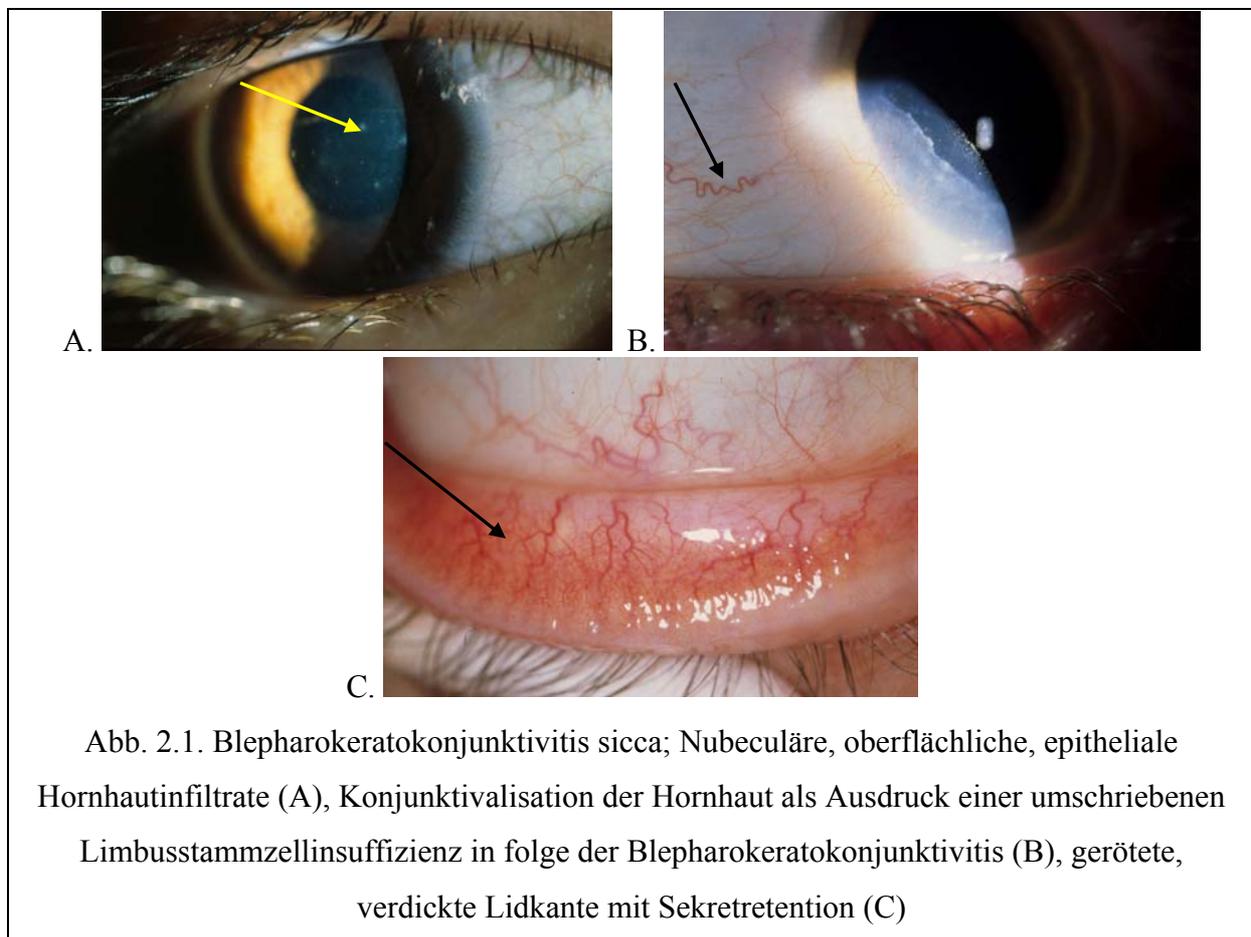
Die Konjunktivitis imponiert meist als papilläre Konjunktivitis. Der Pathomechanismus liegt am ehesten in einer chronisch toxischen Irritation der Bindehaut. Vereinzelt können Lymphfollikel in der Bindehaut nachgewiesen werden [125, 193a]. Die Keratitis kann sich als epitheliale Keratitis, ebenfalls ausgelöst durch bakterielle Toxine, manifestieren [6, 125, 130]. Des Weiteren beobachtet man bei Patienten mit einer Blepharokeratokonjunktivitis sicca häufig marginale Hornhautinfiltrate und -ulzerationen. Diesen Läsionen liegt ursächlich eine Antigen-Antikörper-Reaktion im Sinne einer Immunreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV nach Coombs und Gell) zugrunde [61]. Die immunologische Ursache wird aus dem Nachweis von Immunglobulinen und C3-Komplement in den Keratozyten bei fehlendem Erregernachweis wahrscheinlich. Die Läsionen sind meist am unteren Limbusrand zu finden, da dort eine längere Einwirkzeit antigenen Materials aufgrund der Nähe zu den Lidrändern und Tränemenisken zu finden ist. Die Erkrankung ist durch einen langen chronischen Verlauf und häufige Rezidive charakterisiert. Von einer weiteren immunologischen Komponente gehen Gao et al. in einer Publikation von 1998 aus [59]. Dabei spielt die Apoptose von epithelialen und die Suppression von lymphatischen Zellen eine große Rolle in der Pathogenese der Blepharokeratokonjunktivitis sicca [59].

Die Prävalenz liegt zwischen 7% und 30%, wobei Frauen häufiger betroffen sind [38, 80, 125]. Epidemiologische Daten sind, infolge einer Vielzahl von Definitionen, schwer miteinander zu vergleichen [38, 125, 130].

Die Patienten klagen über eine starke Augenrötung, Schmerzen, Brennen, Juckreiz, Fremdkörpergefühl, Ermüdbarkeit der Augenlider, Lidschwellungen und Visusreduktion. Die Patienten sind lichtscheu und neigen häufig zu Kopfschmerzen.

Die herkömmliche Therapie besteht in Lidrandhygiene mit mechanischer Entfernung der Schuppen und Krusten, der Anwendung von Tränenersatzmitteln, der Beseitigung von Toxinbildnern mit lokaler Applikation von antibiotischen Tropfen oder Salben (z.B. Erythromycin) und, zur Unterdrückung der Immunphänomene, die Anwendung von kortikoidhaltigen Tropfen [6, 59, 193a].

Alternativ werden zur lokalen Immunsuppression versuchsweise Cyclosporin A Augentropfen verwendet um die Entzündungsprozesse am Auge zu unterbrechen und dadurch eine quantitative und qualitative Besserung des Tränenfilms zu erreichen [26]. Gao et al. gehen davon aus, dass die lokale CSA-Therapie zu einer physiologischen Balance zwischen Apoptose und Wachstum führt [59].



2.3.2. Rosazea Blepharokeratokonjunktivitis

Die Rosazea ist eine Sonderform der Blepharokeratokonjunktivitis sicca. Sie ist eine häufige, chronisch-progrediente Gesichtsdermatose mit sowohl vaskulärer (Erythem,

Teleangiektasien) als auch entzündlicher Komponente (Papeln, Pusteln, Knoten) [125, 137].

Meist beginnt sie im 4.-5. Lebensjahrzehnt. Insbesondere hellhäutig-sommersprossige,

blauäugige und rothaarige Hauttypen, sowie Frauen sind bevorzugt von der Rosazea

Blepharokeratokonjunktivitis betroffen [6, 97, 125, 130, 137].

Sie manifestiert sich in der Gesichtsmitte. Befallen werden Nase, Wangen, Kinn, Stirn und Glabella. Perioral und periorbital befinden sich schmale, erscheinungsfreie Zonen.

Extrafaziale Lokalisationen sind selten [6, 130]. Die Krankheit verläuft in Schüben und wird

in drei Schweregrade eingeteilt. Als Rosazeadiathese bezeichnet man flüchtige, zentrofaziale,

livide Erytheme, die nach unspezifischen Stimuli wie Erregung, Sonne, heiße Getränke,

Alkohol, scharfen Speisen sowie Kälte- und Wärmeeinflüsse auftreten. Im so genannten

Erythema congestivum (Rosazea I) bleiben die oben genannten Erytheme im Laufe der Zeit

über Stunden bis Tage bestehen [6]. Im weiteren Verlauf entstehen Teleangiektasien (Rosazea

II), die hauptsächlich nasolabial und an den Wangen auftreten. Hinzukommen gruppiert

stehende, sukkulente, entzündlich gerötete Papeln und Pusteln, die von einer feinlamellären

Schuppung bedeckt sind und über Tage und Wochen persistieren. Komedonen gehören nicht

zum klinischen Bild. Die Abheilung der Effloreszenzen erfolgt narbenlos. Schließlich können

sich mit dem Fortschreiten der Erkrankung entzündliche Knoten und Infiltrate sowie eine

diffuse Gesichtshyperplasie ausbilden (Rosazea III). Die Haut ist höckerig und aufgetrieben.

Es kann zur Hypertrophie der Nase (Rhinophym) kommen [6, 137]. Manche Patienten

verspüren ein Brennen der geröteten Hautareale, Juckreiz ist nicht typisch.

Ätiologisch führen Entzündungsreaktionen zu destruktiven Dermisveränderungen mit

Schädigung der oberflächlichen Blutgefäße. Diskutiert werden genetische, hormonelle und

immunologische Faktoren, sowie Verbindungen mit inneren Erkrankungen und eine

funktionell gestörte Blutgefäßversorgung von Gehirn und Gesichtshaut [137]. Bei Rosazeapatienten wurde eine unzureichende vaskuläre Thermoregulation des Gehirns als Folge einer verzögerten Umstellung des Blutkreislaufes und eines venösen Blutstaus im Abflussgebiet der Vena facialis sive angularis beobachtet. Das Abflußgebiet der Vene entspricht weitestgehend der Topographie der Rosazea. In dieses Gebiet ist auch die Bindehaut mit einbezogen, was die häufige Augenbeteiligung erklären würde. Die mit der Rosazea verbundenen Flush-Reaktionen könnten Folge eines Wärmeaustausches zwischen arteriellem und venösem Blut sein, vielleicht aber auch eine direkte transpharyngeale Stimulierung der neuroaxialen vasomotorischen Zentren oder eine indirekte Stimulierung dieser Zentren durch Mediatorsubstanzen wie Endorphine, Bradykinin oder Substanz P [6, 97, 130]. In 5% der Fälle tritt bei der Rosazea eine Augenbeteiligung in Form einer Blepharokeratokonjunktivitis, ähnlich der Blepharokeratokonjunktivitis sicca, auf [125, 137]. Primär kommt es zunächst zu einer Blepharokonjunktivitis, die durch Lidrötung, -schwellung, Krustung und Schuppung gekennzeichnet ist. Sekundär kann es zu einem Befall der Hornhaut kommen, und damit zu einer Blepharokeratokonjunktivitis. Diese tritt zumeist im unteren Limbusbereich auf. Es zeigt sich eine auffällige Gefäßeinsprossung, die die Infiltrate schlingenartig umwachsen. Es kann zu Ulzerationen kommen, die zu dichten, kalkweißen Narben führen. Die Prognose dieser Keratitis im Rahmen der Rosazea gilt als schlecht und kann bis zur Erblindung führen. Als Ursache der Augenkomplikationen wird eine Störung der Sekretion der Meibom-Drüsen vermutet. Diese führt zu einer mangelhaften Zusammensetzung des Tränenfilms, die wiederum eine bakterielle Fehlbesiedlung, wie bei der Blepharokeratokonjunktivitis sicca, hervorrufen kann [6, 125, 137, 193a]. Die Augenkomplikationen sind nicht an die Schwere der Rosazea gebunden. Rezidive sind sehr häufig. Subjektiv machen sich Fremdkörpergefühl, Brennen, Schmerzen oder Lichtempfindlichkeit bemerkbar [6].

In 20% der Fälle gehen die Augenveränderungen den Hauterscheinungen voraus, in 27% treten sie gleichzeitig auf und in 53% bestehen zuerst die Hauterscheinungen [6, 125, 137]. Eine Heilung der Rosazea ist nicht immer möglich, doch können die Symptome durch eine dem Schweregrad der Erkrankung angepasste Therapie stets günstig beeinflusst werden [137]. Systemisch behandelt man antibiotisch mit Tetrazyklinen, Makroliden oder Metanidazol. Des Weiteren werden Antimalariamittel wie Chloroquin erfolgreich eingesetzt. Isoretinoin (13-cis-Retinsäure) bleibt aufgrund vieler Nebenwirkungen schweren Verlaufsformen vorbehalten. Die Remissionen halten hier aber ungewöhnlich lange. Bei Frauen wird die Isoretinoin-Therapie häufig mit Antiandrogenen kombiniert. Diätetisch sollten erythemprovozierende Faktoren wie Alkohol, heiße Getränke oder scharfe Speisen vermieden werden [6, 97, 137]. Äußerlich kommen ebenfalls Antibiotika (Erythromyzin, Tetrazyklin, Clindamyzin oder Metronidazol) und Isoretinoin zur Anwendung. Zusätzlich kann man Schwefel, Kortikosteroide (nur bei schweren Formen) und Azelainsäure anwenden [6, 97]. Obligat ist die Anwendung von Lichtschutzmitteln [6, 97, 137]. Zur Beseitigung der Ödeme kann eine Lymphdrainage indiziert sein. Operativ kommt die Beseitigung kosmetisch störender Teleangiektasien, des Rhinophyms und ophthalmologisch eine Keratoplastik in Frage [6, 97]. Die Rosazea Blepharokeratokonjunktivitis wird primär lokal immunsuppressiv mit Kortikosteroiden behandelt. Aufgrund einer möglicherweise immunologischen Reaktion auf eine bakterielle Fehlbesiedlung, ähnlich der Blepharokeratokonjunktivitis sicca, erfolgen nun auch Therapieversuche mit lokalen Cyclosporin A Augentropfen in der Hoffnung die Symptome effektiver lindern und den schwer progredienten Verlauf abmildern zu können.

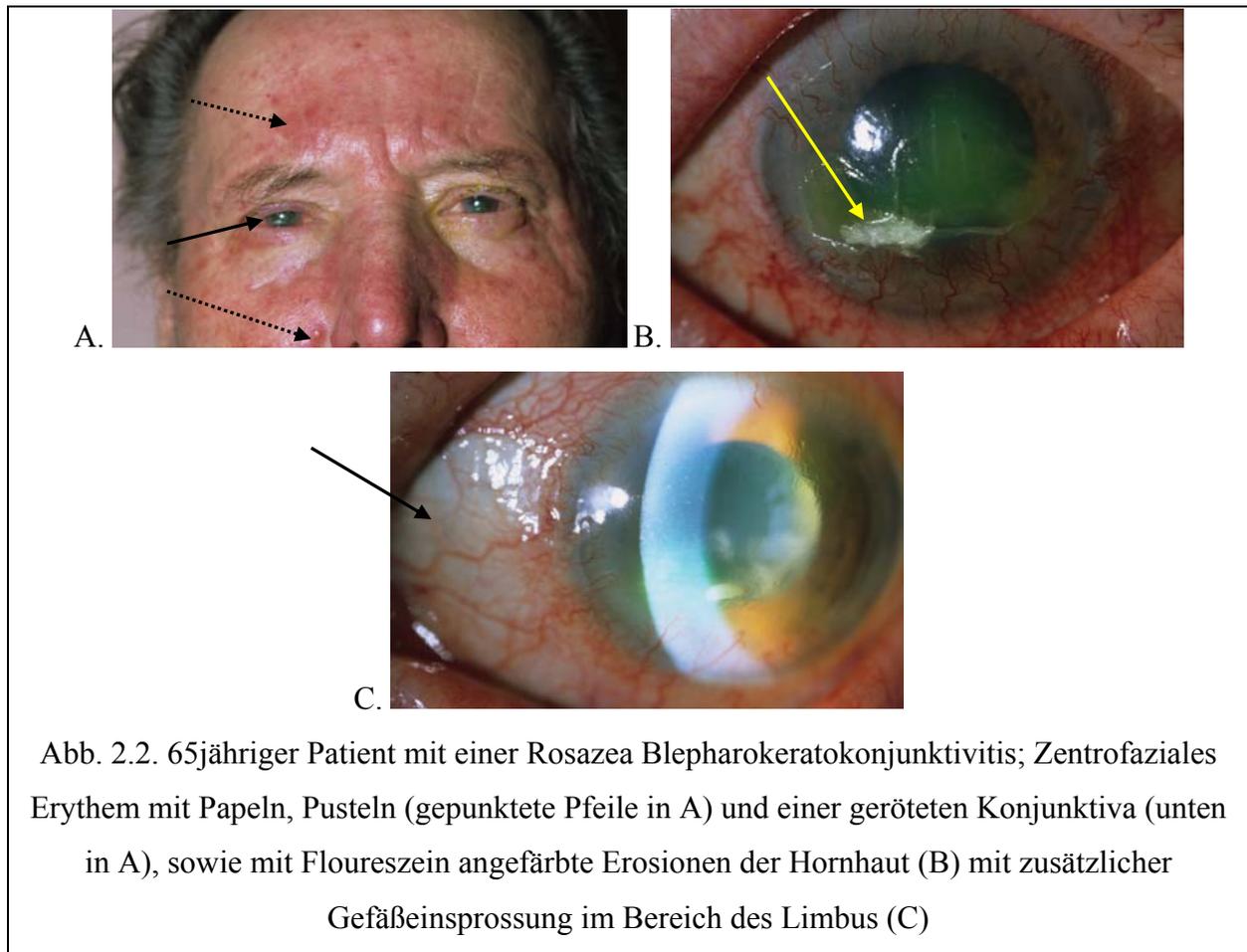


Abb. 2.2. 65jähriger Patient mit einer Rosazea Blepharokeratokonjunktivitis; Zentrofaziales Erythem mit Papeln, Pusteln (gepunktete Pfeile in A) und einer geröteten Konjunktiva (unten in A), sowie mit Floureszein angefärbte Erosionen der Hornhaut (B) mit zusätzlicher Gefäßeinsprossung im Bereich des Limbus (C)

2.3.3. Blepharokeratokonjunktivitis atopica und Keratokonjunktivitis vernalis

Die Atopie ist eine Erkrankung, die sich nicht nur am Auge, sondern auch systemisch am ganzen Körper manifestiert [6, 130]. Sie äußert sich in einer ungewöhnlichen Überempfindlichkeitsreaktion vom Soforttyp (Typ I der Allergieformen [61]) auf Umweltsubstanzen, die größtenteils auf einer genetischen Prädisposition beruht. Insbesondere geht sie mit unspezifisch gesteigerter Reaktivität von Haut, Schleimhaut und Augenhäuten einher. Die Hautveränderungen werden als atopisches Ekzem bezeichnet. Die Irritation der Atemwege äußert sich in einer Rhinitis allergica, einer Sinusitis, einem exogen-allergischen Asthma bronchiale, einer Nahrungsmittelallergie, sowie in Form von Urtikaria [6, 51, 97, 130]. Die Prävalenz liegt in unterschiedlich starker Ausprägung bei 10-15 % in der Bevölkerung [6, 51, 97, 130, 125].

In der Pathogenese der Atopie spielen sowohl intrinsische Faktoren, wie die genetische Prädisposition und das männliche Geschlecht [125], als auch extrinsische Faktoren, wie Umweltallergene eine Rolle. Sehr häufig werden erhöhte Serum-Immunglobulin-E-Spiegel gefunden [51, 85, 125, 199]. Das von der Umwelt aufgenommene Allergen bindet einerseits über IgE an den niederaffinen IgE-Rezeptor auf einer Reihe verschiedener Zelltypen [6, 61, 85, 125]. Von diesen sind Makrophagen in der Lage, den Komplex aus Rezeptor, IgE und Antigen zu internalisieren, das Antigen enzymatisch zu zerlegen und durch das MHC II-Molekül den T-Helferzellen zu präsentieren. Dadurch werden diese T-Zellen aktiviert und exprimieren CD 40-Liganden [6, 51, 125]. Andererseits bindet das Allergen über Immunglobulin E an Mastzellen und Basophile, welche dann bei Antigenkontakt vasoaktive Substanzen wie Histamin, als Auslöser der Spätsymptome der allergischen Reaktion, exprimieren. Dies führt zu Reaktionen wie Pruritus oder Rötung. Diese Reaktion wird als Typ I Überempfindlichkeitsreaktion (nach Coombs und Gell) bezeichnet und entspricht der akuten Verlaufsform [6, 61, 92, 97]. Hinzu kommt bei Atopikern die chronische Verlaufsform, die T-Zell-vermittelte Überempfindlichkeitsreaktion Typ IV [51, 61, 97, 125]. Hierbei bindet das IgE an die antigenpräsentierenden Langerhans-Zellen der Epidermis, welche T-Lymphozyten aktivieren und eine ekzematöse Spätreaktion hervorrufen (Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ). Außerdem wird Interleukin-4, -5 und -6 gebildet [6, 51, 92, 125, 142]. Diese Interleukine lösen bei einer reifen B-Zelle nach deren Kontakt mit einer aktivierten T-Zelle einen Immunglobulin-Switch zur IgE Produktion aus. Inhibiert wird diese Reaktion durch die von TH₁-Zellen sezernierten Interferon- γ , Tumor-Nekrose-Faktor- α und IL-2. Dem erhöhten IgE-Serumspiegel liegen drei Störungen zugrunde [6, 85, 92]:

- A. Fettstoffwechsel: Defekt der Delta-6-Desaturase mindert die Dihomo-Gamma-Linolensäure und die Arachidonsäure. Beide werden zur Prostaglandin-Synthese benötigt.
- B. Prostaglandin-Synthese: Prostaglandin E₂ ist in Monozyten und Makrophagen vermindert.

C. T-Lymphozyten: Durch das fehlende Prostaglandin ist die T-Zell-Maturation gestört. Des weiteren verschiebt sich das Verhältnis von CD-8 T-Suppressorzellen zu CD4 T-Helferzellen deutlich zu Gunsten der T-Helferzellen. Diese CD4 Zellen wandeln bei Antigenkontakt den Antikörperisotyp IgM in den Isotyp IgE um.

Das Immunsystem des Atopikers zeigt sich also hyperaktiv, ist aber gleichzeitig in der Abwehr von Fremdstoffen aus der Natur wie Bakterien, Pilzen und Viren eingeschränkt oder überfordert [6, 97, 142, 194]. Epidemiologisch geht man davon aus, dass 43% der Patienten mit atopischer Dermatitis eine Augenbeteiligung zeigen, die selten isoliert ist, sondern in systemischer Kombination mit atopischen Reaktionen anderer Organsysteme auftritt [6, 97].

Die Lider reagieren mit Ekzemen, Rötung, Schuppung, Papeln, Erosionen und Krusten. Als Folge der chronischen Lidentzündungen können Lidfehlstellungen wie Entropia und Ectropia entstehen. Auch Lidverdickungen sind häufig. Bei den Bindehäuten unterscheidet man eine akute Verlaufsform, die mit einer Bindehauthyperämie oder Epiphora einhergeht. Zu den chronischen Verlaufsformen gehören die Konjunktivitis vernalis (junge Patienten), die atopische Konjunktivitis und die papilläre Konjunktivitis [6, 51, 92, 97, 130].

Die Überempfindlichkeit der Hornhaut geht mit Erosionen, Infiltrationen, Plaque-Bildung, Neovaskularisationen, Narben, Ulcera, Granulomen [6, 51, 97, 142], sowie mit einem Keratokonus [6] einher. Weitere Reaktionen breiten sich auf Linse (Kataraktbildung), sowie Retina (Ablationes retinae) aus und führen zu einer erhöhten Infektanfälligkeit, insbesondere bei Herpes-Viren-Infektionen [6, 170, 205]. Zu den chronischen Verlaufsformen gehört die Keratokonjunktivitis vernalis, die atopische Konjunktivitis und die Kontaktlinsen – induzierte papilläre Konjunktivitis. Die **Keratokonjunktivitis vernalis** stellt die chronische Verlaufsform der atopischen Augenbeteiligung bei Kindern dar [6, 97, 130]. Auch el-Asrar et al. folgerten 1996 aus der Besserung der klinischen Symptome unter lokaler CSA-Therapie, dass eine immunmodulatorische Komponente bei der Pathogenese der Keratokonjunktivitis vernalis eine Rolle spielt [42]. Wichtigster pathophysiologischer Mechanismus scheint auch

hier, die durch Degranulation von Mastzellen hervorgerufene Entzündungsreaktion zu sein [76]. Mehrere Arbeiten sprechen für eine Erhöhung von IgE, IgG, IgM sowie Komplement C3 [160, 169]. Bei der Untersuchung findet man hier besonders ausgeprägt am oberen Tarsus eine diffuse papilläre Hypertrophie, so genannte Riesenpapillen, die eine Art Pflastersteinrelief bilden. Auch am Limbus der Hornhaut kann es zur Verdickung der Bindehaut kommen. Im Verlauf der Erkrankung können sich mukoide Knötchen auf der Bindehautoberfläche bilden. Auf der Hornhaut können sich unterschiedlich stark ausgeprägte Erosionen und Plaques bilden. Im schlimmsten Fall kann es sogar Ulzerationen der Hornhaut kommen [6, 97, 125, 130].

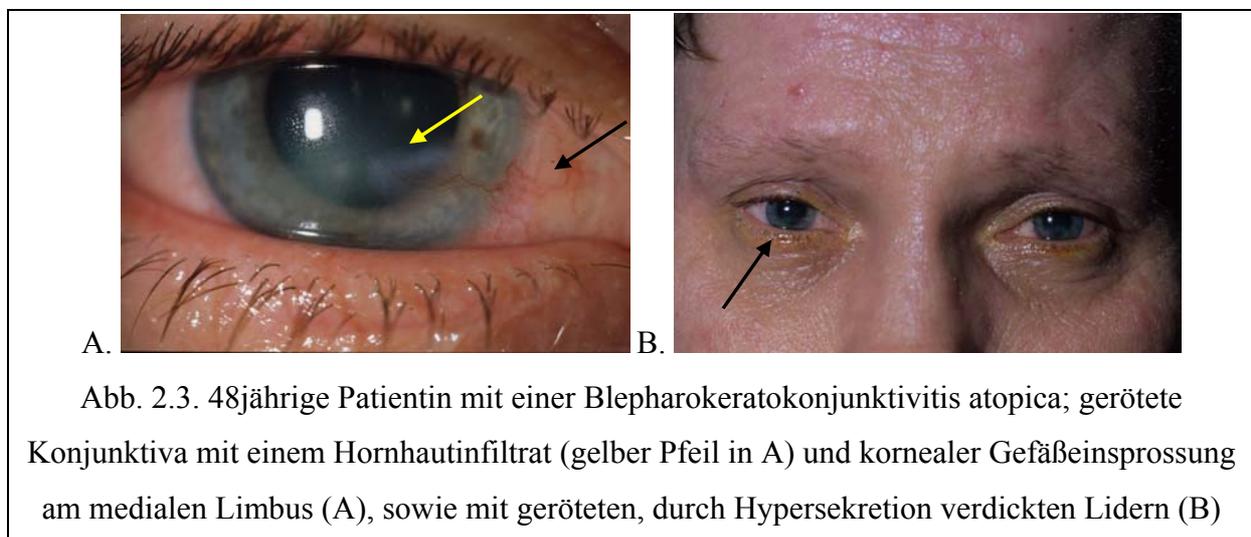
Typische Befunde zur Diagnosesicherung sind die gigantopapilläre Hypertrophie der Bindehaut, hypervisköse Schleimauflagerungen und Plaques auf der Hornhaut. Des Weiteren sind die Familienanamnese, die Frage nach bereits bekannten Unverträglichkeiten und die saisonale Häufung der Beschwerden wichtig für die Diagnosestellung. Die Diagnose sollte jedoch interdisziplinär gesichert und behandelt werden.

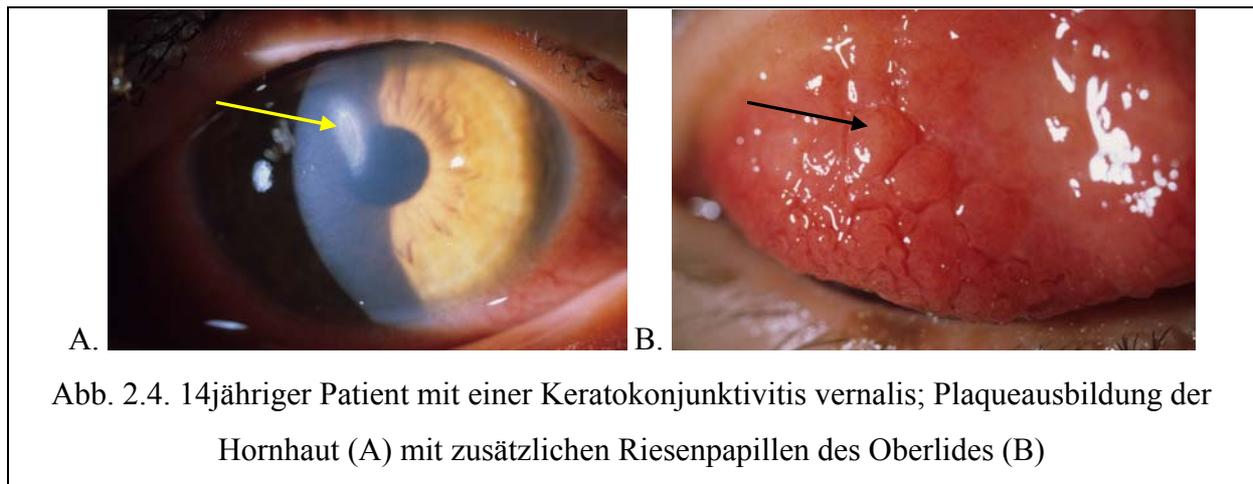
Der oberste Grundsatz der lokalen therapeutischen Maßnahmen bei atopischer Blepharokeratokonjunktivitis ist die Konservierungsmittelfreiheit der Therapeutika.

Bei einer akuten Verlaufsform werden kurzzeitig lokale Kortikosteroide und Antihistaminika gegeben. Dazu kommt die mechanische Lidkantenpflege im warmen Wasser und mit Wattestäbchen. Bei den chronischen Verlaufsformen (Typ VI der Allergie) sind darüber hinaus noch weitere Maßnahmen nötig. Das chronische Lidekzem wird ebenfalls kurzzeitig mit intermittierenden lokalen Kortikosteroiden behandelt. Dazu kommen kühlende Umschläge und gegebenenfalls eine UV-Therapie [6, 51, 97, 142].

Die Blepharokeratokonjunktivitis atopica behandelt man mit Mastzellstabilisatoren (Cromoglycinsäure 2-4%) und H₁-Blockern. Des Weiteren sind Acetylcystein, mit konsequenter Lidkantenpflege und Tränenersatzmitteln im therapeutischen Einsatz. Diese sind jedoch bei chronischen Verläufen oft nicht ausreichend und werden daher entweder

durch die Gabe lokaler oder systemischer Kortikosteroide bzw. Cyclosporin A ergänzt [142]. Kortikosteroide sollten allerdings längerfristig zurückhaltend eingesetzt werden, vor allem wegen der Infektanfälligkeit und der Rezidivneigung [87, 88, 99, 105, 165, 209] (Kapitel 2.4.1.2. Nebenwirkungen). Weiterhin zeichnet sich eine gute Therapieoption mit FK-506 aus. Mayer et al. konnten 2001 an 14 Patienten zeigen, dass FK-506 bei der atopischen Blepharokeratokonjunktivitis besser wirkte als lokales CSA [114]. Alle 14 befragten Patienten bewerteten im Nachhinein ihre Gesamtsituation als stark gebessert. Hingorani et al. [85] konnten 1999 zeigen, dass CSA-Augentropfen zur Normalisierung des Verhältnisses von CD4 zu CD8 Zellen, zur Abnahme der T-Zell-Aktivität und zur Reduktion der T-Zell-Zytokinexpression, v.a. IL-2 und IF- γ führt. In den Arbeiten von Bleik [12], Secchi [168] und BenEzra [7, 8] erwies sich die Behandlung mit topischem CSA als sehr wirksam. Avunduk et al. zeigten auch, dass unter 2%iger lokaler CSA-Therapie insbesondere CD-23 und CD-4 positive Zellen deutlich rückläufig waren [98]. Da die Anzahl der CD-23 und CD-4 positiven Zellen mit den subjektiven und objektiven Symptomen der Patienten korrelierte, schlussfolgerte er daraus, dass lokales CSA bei der Keratokonjunktivitis vernalis sehr gut wirksam sei [98]. Pucci et al. zeigten 2002 nochmals an 24 Kindern, die an einer Keratokonjunktivitis vernalis erkrankt waren, wie effektiv und sicher die Therapie mit Cyclosporin A Augentropfen ist [138].



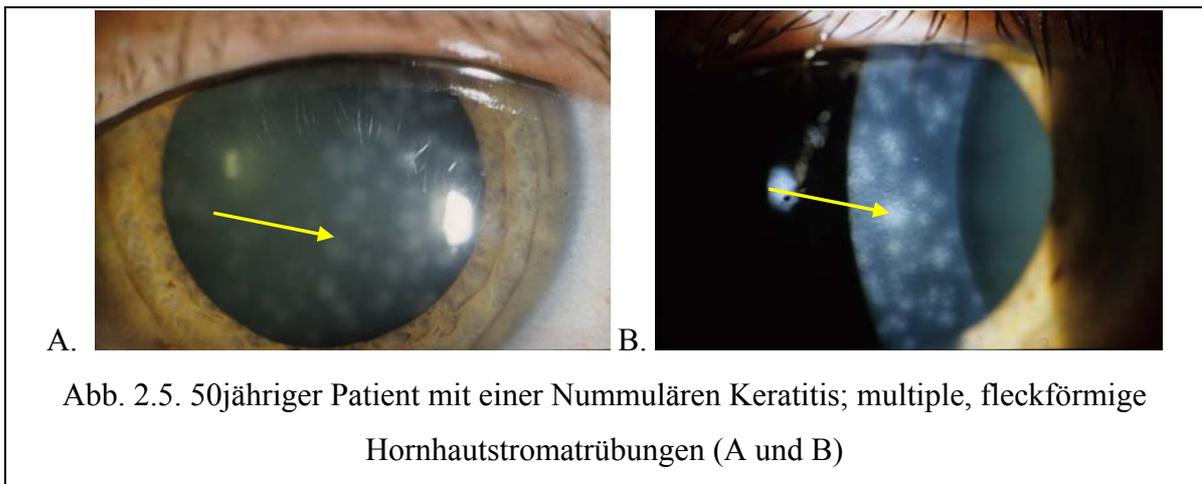


2.3.4. Nummuläre Keratitis

Die nummuläre Keratitis ist meist eine Hornhautbeteiligung bei Keratokonjunktivitis epidemica [70, 105, 125, 157]. Sie besteht aus münzförmigen, subepithelial gelegenen, nicht mit Fluoreszin anfärbaren Hornhautstromatrübungen, die sich meist aus Ansammlungen von Lymphozyten, Histozyten und Fibroblasten [70] formieren und zu der Krankheitsbezeichnung nummuläre Keratitis geführt haben [6, 84, 97, 125, 130]. Selbst nach Abklingen der adenoviralen Infektion bleibt die Keratitis nummularis häufig länger bestehen und bildet Hornhautnarben, die die Sehschärfe stark beeinträchtigen können [70]. Wahrscheinlich spielt eine Viruspersistenz und –replikation in den Keratozyten eine entscheidende Rolle für das monate- bis jahrelange Verbleiben der Nummuli nach einer Keratokonjunktivitis epidemica. Es wird auch vermutet, dass das Virus Antigene exprimiert, gegen die sich eine zelluläre Immunantwort richtet [139]. Die daraus resultierende Ansammlung an Immunzellen ergibt das nummuliforme klinische Bild. Eine virusspezifische Therapie existiert zurzeit nicht. Prophylaktisch wird Interferon eingesetzt [157]. Virustatika wie (S)-HPMPC und (S)-HPMPA werden zurzeit immer noch klinisch getestet [65]. Therapeutisch wartet man entweder eine Spontanheilung ab (durchaus vertretbar) [6, 97, 184] oder setzt immunmodulierende Medikamente ein. Lokale Kortikosteroide zeigen eine klinische Besserung, die sich aber im weiteren Verlauf, aufgrund der Immunsuppression in

21.06.2007 24

einer Persistenz der Adenoviren und erneuten Rezidiven zeigt (insbesondere beim Ausschleichen der Kortikosteroide) [87, 88, 99, 105, 165, 209]. Mit lokalen Cyclosporin A Augentropfen konnten bereits gute Ergebnisse erzielt werden [82, 83, 139, 145, 184]. So konnten Sundmacher et al. zeigen [184], dass $\frac{2}{3}$ der 56 Nummularisfälle, die mit lokalem CSA behandelt wurden, primär auf die Therapie mit einem Rückgang der Nummuli ansprachen, allerdings viel langsamer als unter Steroidtropfen.



2.3.5. Varizella-Zoster-Keratitis

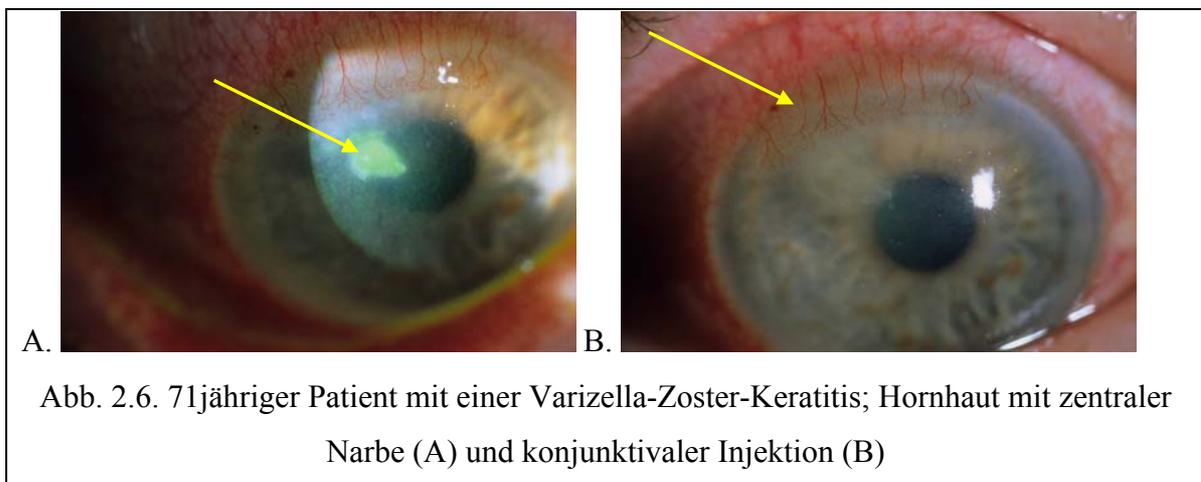
Der Zoster ophthalmicus wird durch das Varizella-Zoster-Virus ausgelöst, welches mit dem Herpes simplex Virus morphologisch identisch ist, sich jedoch im klinischen Bild und in den Antigeneigenschaften unterscheidet [125, 141, 182].

Die Erstinfektion löst zunächst die Windpockenerkrankung aus. Daraufhin persistiert das Virus, wie auch die Herpes simplex Viridae, im Ganglion Gasseri des N. Trigeminus. Der Zoster ophthalmicus ist also ein endogenes Rezidiv [6, 97]. Die Erkrankung kann prinzipiell in jedem Alter auftreten, betrifft aber hauptsächlich ältere und immunsupprimierte Patienten.

Lediglich 10% der Zoster-Infektionen betreffen den N. ophthalmicus. In seltenen Fällen kann es auch zum Befall des N. maxillaris kommen [6, 97]. Klinisch kommt es zunächst zu einer akuten Reinfektion mit Hautausschlag, der ein oder mehrere Äste des N. ophthalmicus betreffen kann. Der makulopapulöse Ausschlag wird pustulös. Die Pusteln beginnen

aufzuplatzen, zu ulzerieren und zu verkrusten. In den ersten drei Wochen kann das Virus aus den Hautläsionen isoliert werden und ist ansteckend [6, 97]. Der Hautausschlag ist von mäßig bis schweren periorbitalen Ödemen begleitet. Die Hauteffloreszenzen sind mitunter sehr schmerzhaft. Bei äußerst starken Schmerzen im betroffenen Hautbereich ist die Hornhautsensibilität herabgesetzt (Anaesthesia dolorosa). Bei Befall des N. nasociliaris kommt es sehr häufig zu einer Augenbeteiligung (Hutchinson-Regel) [6, 97]. Die häufigste Augenbeteiligung stellt die mukopurulente Konjunktivitis dar. Sie geht stets mit Bläschen am Lidrand einher und klingt meist innerhalb einer Woche wieder ab. Ein Drittel der Patienten erkranken an einer Episkleritis, seltener an einer Skleritis [6, 97, 125, 130, 170, 182, 205]. Bei 30% der Patienten tritt ca. 10 Tage nach Ausbruch der Erkrankung eine nummuläre Keratitis auf [170, 205]. Hierbei zeigen sich feine, körnige, weißliche Ablagerungen in der Bowman-Membran, die später bräunlich und häufig chronisch werden. Meist drei Wochen nach den Hauteffloreszenzen kommt es bei 5% der Erkrankten zu einer Keratitis disciformis. Sie ist stets verbunden mit einer Iritis und Endothelbeschlägen [6, 97]. Diese Form der Keratitis wird ohne Therapie fast immer chronisch [6, 97]. Eine seltene Komplikation ist die Keratitis neuroparalytica, welche mit heftigen Hornhautulzerationen einhergeht [6, 97, 125, 205]. Weitere Komplikationen sind Uveitiden, Sekundärglaukome, Vorderkammerblutungen und Netzhautnekrosen. Als neurologische Komplikationen sind Hirnnervnlähmungen, besonders des III. (N. oculomotorius), IV (N. trochlearis) und des VI. (N. abducens), recht häufig, welche dann zu Augenmuskelparesen führen. Eine Neuritis nervi optici tritt in 1% der Fälle auf. Eine Enzephalitis ist selten und nur bei besonders schweren Verlaufsformen zu beobachten [6, 97, 205]. Zu den chronischen Läsionen, die bis zu zehn Jahre persistieren können, zählen verschieden pigmentierte Narben, eine Ptosis als Folge von Lidvernarbungen, genauso wie ein Ektropium und ein Entropium. Häufig bildet sich eine chronische schleimabsondernde Konjunktivitis mit tastbaren Granulomen unter der Konjunktiva tarsi [6, 97, 205].

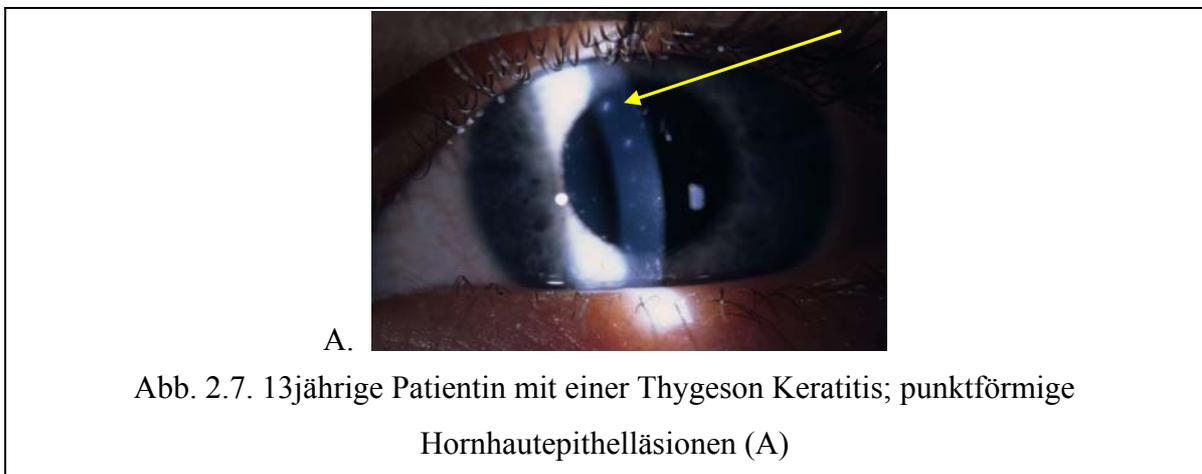
Die Behandlung der Varizella-Zoster-Keratitis zielt auf eine rasche Abheilung der Hautveränderungen ab um Vernarbungen und posttherapeutischen Neuralgien vorzubeugen. Die Behandlung besteht in der Gabe von Virustatika und Kortikosteroiden [6, 97]. Nach mehreren Jahren kommt es häufig nach plötzlichem Absetzen einer Kortikosteroidtherapie zu wiederkehrenden Symptomen. Meist handelt es sich hierbei um eine Episkleritis, Skleritis, Keratitis, Iritis oder ein Glaukom [87, 88, 99, 105, 165, 209]. Vahlme et al. berichteten 1992 [200], dass lokale CSA Tropfen auch eine eigene virustatische Wirkung entfalten und als Steroidersatz bei der kombinierten virustatischen-immunsuppressiven Behandlung tiefer Herpeserkrankungen eingesetzt werden können [108]. Auch bei der Behandlung mit HSV-1 infizierten stromalen Keratitiden durch lokales CSA wurden Erfolge erzielt. Zwar konnte Heiligenhaus et al. 1999 [75] dies nur für HSV-1 zeigen, denkbar ist eine ähnliche Virustase aber auch für das HZV.



2.3.6. Thygeson Keratitis

Die Keratitis superficialis punctata Thygeson wurde erstmals 1950 von dem kalifornischen Ophthalmologen Phillips Thygeson beschrieben [196]. Sie ist eine meist beidseitig auftretende chronische Hornhauterkrankung. Ihr Verlauf ist sowohl durch spontane vorübergehende oder absolute Heilung als auch durch viele Rezidive charakterisiert.

Die Patienten sind meist unter 40 Jahren alt und klagen über Fremdkörpergefühl, verschwommenes Sehen, Photophobie und vermehrten Tränenfluss [97, 125, 191, 196, 201]. Bei der Spaltlampenuntersuchung zeigt sich beobachtet man multiple punktförmige Hornhautepithelläsionen, die häufig mit subepithelialen Ödemen assoziiert sind [196]. Ätiologisch wird eine virale Genese mit immunologischen Aspekten vermutet [35, 123, 141, 191]. In Zusammenhang mit der Erkrankung finden sich häufig Störungen des Tränenfilms, Hornhatdystrophien, Verletzungen durch UV-Licht, chemische Reagenzien oder mechanische Einwirkung. Auch der unsachgemäße Gebrauch von Kontaktlinsen gilt als Prädisposition. Die Diagnose wird bisher ausschließlich anhand klinischer Parameter gestellt [97, 123, 196]. Therapeutisch werden lokale Kortikosteroide eingesetzt, die jedoch nach Absetzen sehr häufig zu Rezidiven führen [87, 88, 99, 105, 165, 209]. Oft bringen Verbandskontaktlinsen eine Symptombesserung. Als alternative Therapieoption steht lokal angewandtes Cyclosporin A zur Verfügung. Mit dieser Therapie werden auch nach deren Absetzen weniger Rezidive und Nebenwirkungen beobachtet, als bei Kortikosteroiden [64, 87, 165, 123, 165]. Reinhard et al. zeigten 1996 und 1999 [146, 147], dass bei mehr als 70% aller therapierten Patienten mit lokalem 2%-igem Cyclosporin A, bei denen eine Thygeson Keratitis diagnostiziert wurde, sich die typischen klinischen Symptome zurückbildeten. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei Del Castillo et al. [37] und Holsclaw et al. [89].



2.3.7. Ulcus Mooren

Die erstmals 1867 von Mooren beschriebene seltene Hornhautentzündung, die oft zu Erblindung führt, imponiert im Erwachsenenalter als äußerst schmerzhaft, oberflächlich ulzerierend, später granulomatös-nekrotisierend, aber selten perforierend [97, 127, 156]. Die benigne Form des Ulcus rodens Mooren tritt meist einseitig und bei älteren Menschen auf. Für gewöhnlich spricht sie gut auf eine Therapie an. Die maligne Form (rapid progressive Form) stellt sich meist beidseits (25-40%) überwiegend bei jungen Menschen dar. Sie ist therapeutisch schlecht zu beeinflussen [135].

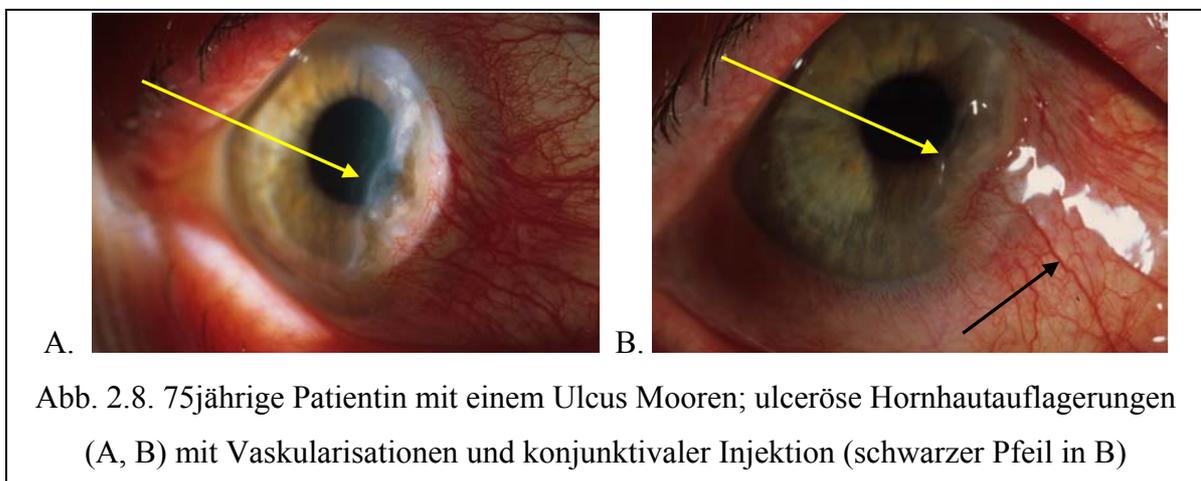
Ätiologisch wird eine autoimmune Ursache diskutiert, da unter anderem Antikörper gegen die Basalmembran des Hornhautepithels nachgewiesen [164] und eine Einwanderung von Entzündungszellen beobachtet wurden [127].

Klinisch imponieren anfängliche Limbusrandinfiltrationen und –ulzerationen, die sich zunächst zirkulär in die Hornhautperipherie, dann nach zentral zur Hornhautmitte und schließlich in Richtung Sklera ausdehnen [135, 164]. Der Prozess ist auf das Epithel und das Stroma begrenzt. Die oberflächlichen Hornhautschichten schmelzen ein, die tiefen Hornhautschichten sind stark vaskularisiert. Beim Fortschreiten des Ulcus werden die oberflächlichen Hornhautschichten unterminiert und es kommt zur Gefäßneubildung mit Granulomwachstum, insbesondere bei Typ I Diabetes mellitus [6, 97, 125, 127]. Die Patienten klagen über Rötung, vermehrten Tränenfluss, Photophobie, aber vor allem heftige Schmerzen. Häufig ist die Sehschärfe eingeschränkt. Am Ende der Erkrankung resultiert meist eine narbige, vaskularisierte Hornhaut, deren Dicke auf weniger als die Hälfte reduziert ist. Komplikationen sind Iritis, Hypopyon, Glaukom und Katarakt. Selten kann es auch zur Perforationen kommen, da bereits Mikrotraumen ausreichen um die ausgedünnte Hornhaut zu verletzen. Darüber hinaus findet sich oft in der den Hornhautprozess umgebenden Bindehaut eine dichte Infiltration mit Plasmazellen, Mastzellen und eosinophilen Granulozyten, die mit ihren proteolytische Enzymen die Bindehaut mit einbeziehen. Im Bereich des ulzerierenden

Prozesses finden sich zahlreiche aktivierte neutrophile Granulozyten [156]. Systemisch lässt sich eine erniedrigte Anzahl von T-Suppressorzellen im Vergleich zur Anzahl von T-Helferzellen nachweisen. Diese unregulierten T-Helferzellen können eine vermehrte Produktion von Autoantikörpern induzieren. Daraus resultieren eine Ablagerung von Immunkomplexen in der Hornhaut, was zur Einwanderung der Entzündungszellen führt und das wiederum zur Freisetzung von Proteasen und Kollagenasen, die dann insgesamt zur Ulzeration der gesamten Hornhaut führen [6, 96, 97, 127].

Die konservative Therapie beinhaltet Kortikosteroide [87, 88, 99, 105], epithelialisierende Salben, Antibiotika und bei Superinfektionen auch Immunsuppressiva (Cyclophosphamid, Methotrexat und Azathioprine), sowie eine chirurgische Exzision mit Bindehautdeckung und Keratoplastik [27, 96]. Das lokale Cyclosporin A ist wegen mangelnder Penetration nur schwach wirksam. Daher wird bei diesem Krankheitsbild zusätzlich systemisches Cyclosporin A (Sandimmun[®]), verbunden mit Tränenersatzmitteln, verabreicht [180]. Die Dosierung sollte dem Serumspiegel von CSA im EDTA-Blut von mindestens 150µg/ml angepasst werden, meistens beträgt sie 8mg/kg Körpergewicht/Tag [180, 210].

Die Prognose ist besonders bei der malignen Form schlecht [6, 97]. Meist schreitet der Prozess bis zur vollständigen Zerstörung der Hornhaut fort. Bindegewebe und Epithel ersetzen mit erheblicher Narbenbildung das vordere Hornhautparenchym. Anhaltende Schmerzen können zu einer notwendigen Hornhauttransplantation führen.

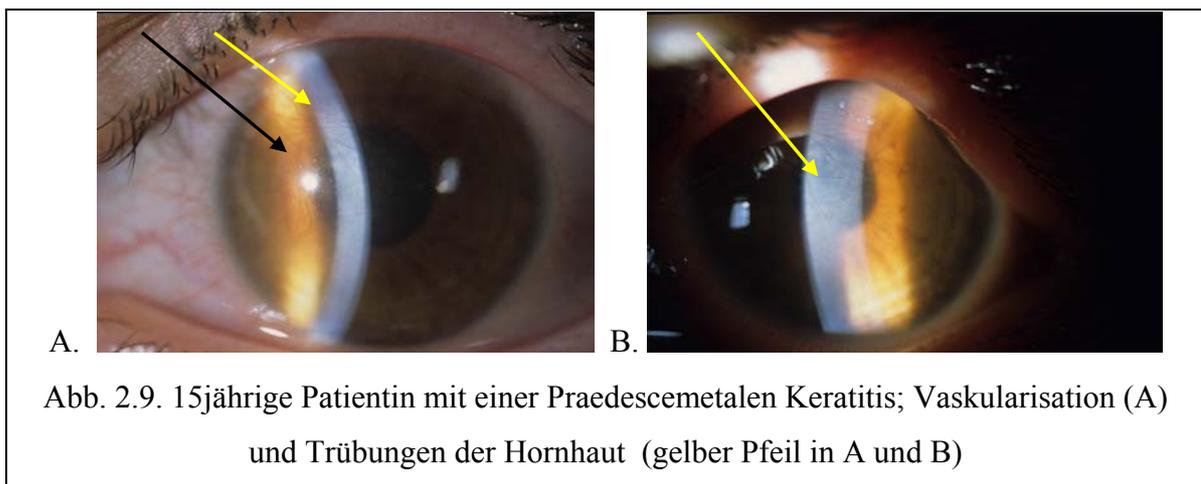


2.3.8. Praedescemetale Keratitis

Die praedescemetale Keratitis ist eine Entzündung des stromalen und epithelialen Anteils der Hornhaut. Die Pathogenese ist weitestgehend unbekannt. Man vermutet eine virale Genese durch Viren der Herpesgruppe [6, 97]. Es gibt einige Gemeinsamkeiten zu der nummulären Keratitis, der Thygeson Keratitis und der Varizella-Zoster Keratitis. Daher ist es möglich, dass in den Hornhautinfiltraten durch das persistierende Virus antigene Eigenschaften entstehen, die eine überschießende Immunantwort auslösen.

Daher macht auch hier der Behandlungsversuch mit lokalem Cyclosporin A zur Unterdrückung der überschießenden Immunreaktion auf die Viruspersistenz durchaus Sinn. Im Hinblick auf eine eventuell virusstatische Eigenschaft des Cyclosporin A [200], könnte sich diese Therapie auch positiv auf den Verlauf und die Rezidivneigung auswirken.

Bei der Spaltlampenuntersuchung findet man zunächst prädescemetale Hornhauttrübungen mit einem stromalen Ödem. Später kommt es zur Vaskularisation der betroffenen Areale und in Folge dessen zu Vernarbungen [6, 97].



2.3.9. Rheumatische Erkrankungen des Auges

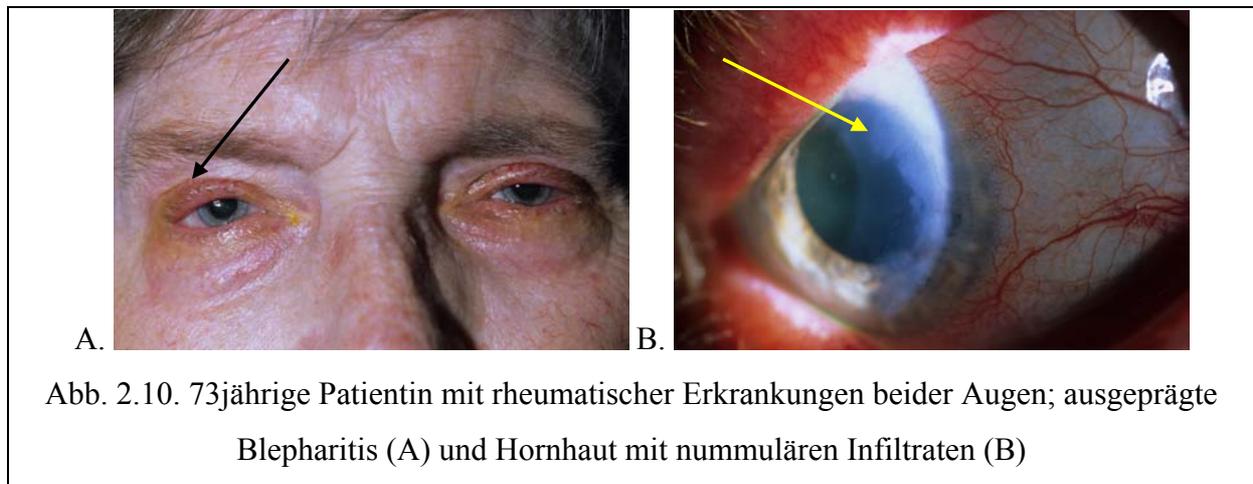
Bei den rheumatischen Erkrankungen des Auges handelt es sich um autoimmune Krankheitsgeschehen. Hierzu zählen vor allem Kollagenosen und die rheumatoide Arthritis,

die sich in einem systemisch-autoimmunen Krankheitsgeschehen manifestieren [71, 125]. Eine Beteiligung der Augen ist sehr häufig. Fast 30% der Patienten mit rheumatoider Arthritis bekommen im Laufe ihrer Erkrankung eine Keratokonjunktivitis sicca mit verminderter Tränenproduktion. Aufgrund eines inadäquaten Tränenfilms werden bakterielle Infektionen der Kornea begünstigt und können schlimmstenfalls zu Ulzerationen führen [71, 125]. Neben den bakteriellen Ulzera werden nach langer systemischer und lokaler Kortikosteroidtherapie auch sterile Ulzera beobachtet. Man findet gelegentlich Hornhauttrübungen mit Vaskularisationen, welche bevorzugt in Limbusnähe entstehen. Weitere ophthalmologische Komplikationen im Rahmen einer rheumatoiden Arthritis sind die Skleritis und die Episkleritis. Bei langen Krankheitsverläufen findet man auch episklerale Knötchen, die histologisch den Rheumaknoten an betroffenen Gelenken entsprechen [6, 97]. Histologisch findet sich an der Bindehaut des beteiligten Auges eine Ansammlungen von Lymphozyten und Makrophagen [71]. Ursache für die Autoimmunreaktion ist das Auftreten von autoreaktiven B-Lymphozyten und zytotoxischen T-Lymphozyten, die durch folgende Mechanismen aktiviert werden können [71, 97]:

1. So genannte Kontrasuppressor-T-Zellen unterlaufen die T-Suppressorzellen und bewirken eine Aktivierung der T-Helferzellen.
2. Die Expression eines Autoantigens mit einem HLA-Antigen auf Monozyten führt zur Aktivierung der T-Helferzellen.
3. Ein toleriertes Autoantigen kann durch Konjugation mit einem bakteriellen Antigen oder einer chemischen Substanz die T-Helferzellen aktivieren (molekulares Mimikry)
4. Viren können direkt B-Zellen und zytotoxische T-Zellen aktivieren.

Cyclosporin A Augentropfen stellen aufgrund der immunsupprimierenden Wirkung, besonders durch die gezielte Wirkung auf T-Lymphozyten, eine Alternative zu den Kortikosteroiden dar. Bei starken Ulzerationen kann eine Keratoplastik indiziert sein.

Erfahrungsgemäß bessern sich die okulären Symptome nicht durch eine verstärkte systemische Therapie der Grunderkrankung, sondern sind weiter progredient [6, 71, 97].



2.4. Therapieoptionen

Die Therapiemöglichkeiten umfassen bei allen unter Kapitel 2.3. genannten Erkrankungen des vorderen Augenabschnittes vor allem eine konservative Therapie mit Antibiotika, Kortikosteroiden und alternativ auch Immunsuppressiva.

Die konventionelle Therapie setzt sich hauptsächlich aus künstlichen Tränenersatzmitteln, mechanischer Reinigung der Lidkanten mit mit warmem Wasser getränkten Wattestäbchen und pflegerischen Maßnahmen zusammen. Die wichtigste Therapieoption stellt aber die Immunsuppression dar. Zur Unterdrückung bzw. Kontrolle des Immunsystems gibt es drei Therapiemöglichkeiten [92]:

- hochwirksame entzündungshemmende Kortikosteroide
- Zytotoxische Medikamente: Cyclophosphamid, Azathioprin
- IL-2 Antagonisten: CSA, Takrolimus, Pimecrolimus.

Alle drei Medikamentengruppen sollten nach Möglichkeit lokal am Auge eingesetzt werden, nur in sehr schwerwiegenden Situationen, in Abhängigkeit vom Schweregrad der Ausprägung und Art der Erkrankung, wie zum Beispiel bei den rheumatischen Augenerkrankungen oder

dem Ulcus Mooren, werden sie auch systemisch eingesetzt. Zytotoxische Medikamente werden häufig systemisch eingesetzt. Lokale Einsatzgebiete sind eher selten. Daher greift man oft auf spezifischer wirkende Wirkstoffe, wie selektive IL-2 Antagonisten zu, die in Pilzen entdeckt wurden.

Alle drei werden v.a. zur systemischen Therapie eingesetzt, haben aber bei der topischen Behandlung ophthalmologischer Erkrankungen durchaus ihren Stellenwert.

2.4.1. Kortikosteroide

Kortikosteroide werden bevorzugt bei entzündlichen Erkrankungen der Hornhaut und Bindehaut eingesetzt, da sie schnell und effektiv wirken, aber auf lange Sicht meist schwerwiegendere Nebenwirkungen und höhere Rezidivraten als CSA mit sich bringen [88, 92, 184, 209]. Sie sind Mittel der Wahl bei vielen autoimmunologischen Erkrankungen [92]. Das Grundgerüst besteht aus einem Cyclopentanoperhydrophenanthren (Gonan), einer Verbindung mit drei Sechsringen und einem Fünfring. Die Ringe werden mit A, B, C und D bezeichnet. Sie enthalten 18-30 C-Atome, die fortlaufend nummeriert werden. Das Ringsystem ist perhydriert, d.h. vollständig abgesättigt. Die C-Atome 10 und 13 tragen je eine Methylgruppe, die eine Aromatisierung des Ringsystems mit Entwicklung zu Kokarzinogenen verhindern. Vom Gonangerüst leiten sich zahlreiche natürliche und synthetische Kortikosteroide ab [92].

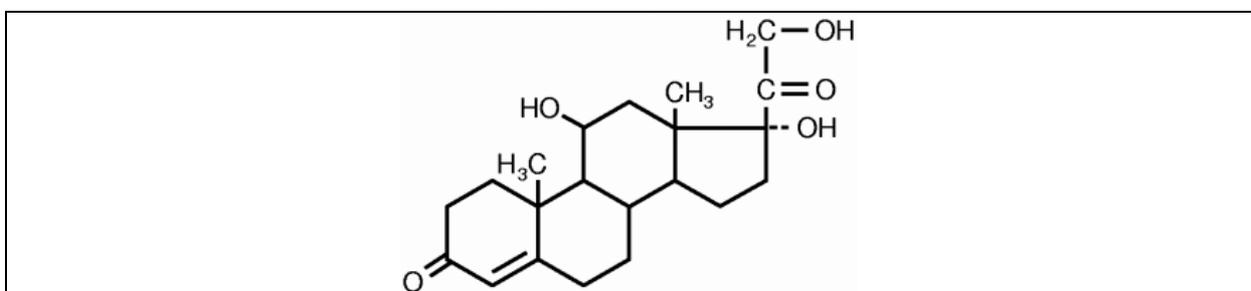


Abb. 2.11. Gonangerüst [92]

Obwohl die Kortikosteroide sehr verschiedene biologische Eigenschaften und Wirkungen haben, unterscheiden sie sich in ihrer Struktur oft nur geringfügig. Die unterschiedlichen

Eigenschaften werden durch Länge und Art der Seitenketten sowie durch Einführung funktioneller Gruppen bzw. Doppelbindungen in das Grundgerüst verursacht [92]. Alle leiten sich im Endeffekt von den Glukokortikoiden ab, dabei gehört das Prednison zu den am häufigsten angewendeten Kortikosteroiden. Es ist ein synthetisches Analogon des natürlichen Andrenocorticosteroids Cortisol. Durch Einführung einer 1,2-Doppelbindung im Ring A erhöht sich die entzündungshemmende Wirkung um das Vierfache, ohne dass die Fähigkeit, Natrium zurückzuabsorbieren beeinflusst wird [92].

2.4.1.1. Wirkmechanismus

Kortikosteroide wirken über intrazelluläre Rezeptoren, die fast in jeder Zelle des Menschen exprimiert werden. Als fettlösliche Hormone, durchdringen sie die Zellmembran und binden an Komplexe aus Rezeptoren und Hitzeschockproteinen (Hsp90), die durch den Kortikosteroidkontakt in seine Anteile zerfällt [92]. Dieser neu entstandene Kortikosteroid-Rezeptor-Komplex dringt nun in den Zellkern ein und heftet sich dort an DNA-Sequenzen bestimmter Promotorregionen an. Diese setzen daraufhin eine vielfältige Transkription von Kortikosteroid Genen frei. So kann eine Fülle von menschlichen Genen (bis zu 1%) durch Steroide exprimiert werden [92]. Hierbei kann die pharmakologische Wirkung der Kortikosteroide durch ein Überangebot an Liganden nicht nur in einer heilenden, sondern auch in einer toxischen Wirkung bestehen [87, 88, 99, 105, 165, 209], was sich unter anderem auf die hohe Genexpression, weniger auf eine Genrepression, zurückführen lässt. Gewollte Wirkungen sind v.a. eine Reduktion der Entzündungsmediatoren wie Zytokine, Prostaglandine, Stickoxide und Leukotriene, sowie eine verminderte Leukozytenwanderung aus den Blutgefäßen (Leukodiapedese) durch Repression von Adhäsionsmolekülen [92]. Weiterhin kommt es zur Apoptose bei Lymphozyten und Eosinophilen, sodass die entzündungshemmende Wirkung zusätzlich verstärkt wird (insbesondere bei Atopikern) [92]. Diese kann aber auch in eine Lymphopenie bzw. Eosinopenie umschlagen (hauptsächlich bei

systemischer Verabreichung). Lokale Kortikosteroide sind meist effektiver bei entzündlichen Erkrankungen als lokales CSA haben aber eine höhere Rezidivrate [105, 184].

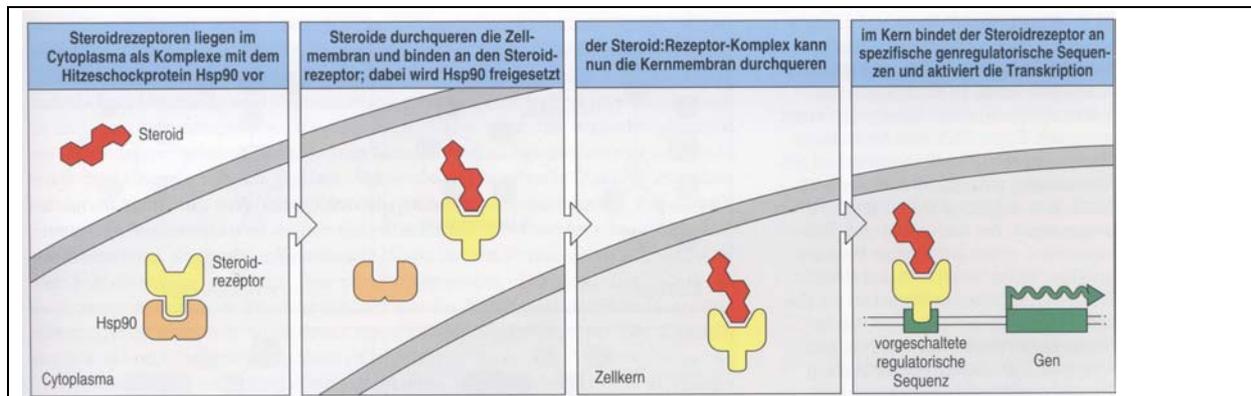


Abb. 2.12. Wirkmechanismus der Kortikosteroide [92]

2.4.1.2. Nebenwirkungen

Bei systemisch verabreichten Kortikosteroiden müssen unerwünschte Nebenwirkungen, wie Ödeme, Gewichtszunahme, Stammfettsucht, Vollmondgesicht, Diabetes mellitus, Mineralverluste im Knochen (Osteoporose), Abnahme der Hautdicke (Cortisonhaut), erhöhte Infektanfälligkeit, Striae rubrae, Muskelschwäche, Verluste von Kalium und Calcium, Hypertonie, Thrombozytose, Neutrophilie, Nebenniereninsuffizienz, und Hypertrichose in Kauf genommen werden [92]. Diese werden bei lokaler Applikation nicht beobachtet. Auch treten bei systemischer, nicht jedoch bei lokaler (inhalativer) Medikation von Prednisolon signifikant vermehrt Malignome (Basalzell- und Plattenepithelkarzinome) auf [99, 207].

Bei lokal in den Bindehautsack applizierten, aber auch bei systemisch verabreichten Kortikosteroiden beobachtet man nicht selten die Ausbildung eines Glaukoms oder Katarakts, eines Trockenen Auges (sicca) oder einer bakteriellen Hornhautinfektion [87, 88, 99, 105, 165, 209]. Generell gilt, wie bei allen Immunsuppressiva, dass sie behutsam abgesetzt werden müssen, da die Rezidivneigung, insbesondere bei raschem Absetzen einer Kortikosteroidtherapie besonders hoch ist [105].

2.4.2. Zytotoxische Medikamente

Die zytotoxisch-immunsuppressiven Medikamente unterdrücken zwar spezifischer das Immunsystem (als Kortikosteroide), aber sie hemmen auch die viele Immunantworten unterschiedslos. Im Gegensatz dazu vermögen zum Beispiel Anti-Lymphozyten-Globuline, zelluläre Immunreaktionen selektiver zu beeinflussen [33, 36, 39, 92, 129, 167, 175].

2.4.3. Selektive IL-2 Antagonisten

Sowohl Kortikosteroide als auch zytotoxische Medikamente haben erhebliche Nachteile, was deren klinische Anwendung betrifft. Eine wichtige Alternative sind die vergleichsweise weniger toxischen bzw. nebenwirkungsärmeren Wirkstoffe aus Pilzen und Bakterien. Die wichtigsten Vertreter sind CSA (2.8.3.1.), Tacrolimus (Kapitel 2.8.3.2.) und Pimecrolimus (Kapitel 2.4.3.3.). Ihr systemisches Einsatzgebiet liegt vor allem in der Transplantationsmedizin. Lokal werden sie u.a. in der Dermatologie [44, 194, 181] und in der Augenheilkunde eingesetzt.

2.4.3.1. Cyclosporin A

1969 wurden von einem Schweizer Pharmaunternehmen in norwegischen Bodenproben diverse Pilzstämme isoliert. Einer davon war *Tolypocladium inflatum*. Daraufhin folgte eine aufwendige chemische Analyse der aktiven Substanz, des Cyclosporin A. Es enthält 11 zum Teil ungewöhnliche und zum Teil methylierte Aminosäuren und ist praktisch ausschließlich in organischen Lösemitteln und in fettigen Ölen löslich [92, 129].

CSA ist ein Immunsuppressivum, das in nanomolaren Konzentrationen [1, 3, 116, 195] die Proliferation der T-Zellen blockiert und die B-Lymphozyten, als Folge der verminderten Zytokinproduktion durch die T-Lymphozyten in ihrer Zellteilung hemmt und diese auch zur Apoptose anleitet [92, 129]. Allerdings werden damit auch andere Immunreaktionen beeinflusst, sodass sich auch unter IL-2 Antagonisten eine generalisierte Immunsuppression

einstellen kann [92, 129]. Diese kann aber durch die individuell angepasste Dosierung kontrolliert werden. Zusätzlich spielen Tropfhäufigkeit und Konzentration bei lokal appliziertem CSA in den Bindehautsack bei entzündlichen Augenerkrankungen, eine entscheidende Rolle in Bezug auf nicht immunologische Nebenwirkungen, wie Augenbrennen, Rötung, Stomatitis, sowie Visusänderung eine Rolle [2, 87]. Die Dosierung ist von der Art der entzündlichen Erkrankungen des vorderen Augenabschnittes und dem Ausprägungsgrad abhängig. Sie schwankt zwischen alle 4 Tage einmal bis hin zu 4 Tropfen 3-mal täglich. Sie muss individuell angepasst werden, sodass regelmäßige Kontrollen unvermeidbar sind.

In der Transplantationsmedizin wird regelmäßig der *systemische* CSA-Blutspiegel bestimmt. Bei lokal appliziertem Cyclosporin A sind die Konzentrationen in einem nanomolaren Messbereich [1, 3, 116, 195]. Bei systemischem Einsatz von CSA werden insbesondere die Nieren, aber auch andere Organe in Mitleidenschaft gezogen. Es konnte auch der Einfluss auf Epithelzellen nachgewiesen werden. Davon gehen Yarosh et al. in einer Publikation von 2005 aus [44, 207]. Darin zeigen sie, dass insbesondere systemisch verabreichte Calcineurininhibitoren wie Cyclosporin A zusammen mit einer UVB-Bestrahlung DNA-Reparatur-Systeme und Apoptose in menschlichen epidermalen Keratinozyten (NHEK) verringern [207] und es daher vermehrt zu Neoplasien des Plattenepithels kommen kann.

Auch ist Cyclosporin A für die lokale Anwendung am Auge bisher nicht zugelassen.

Durch die individuelle Zubereitung der CSA-Augentropfen in der Apotheke entstehen hohe Kosten.

2.4.3.1.1. Herstellung

Cyclosporin A Augentropfen in 2%iger Lösung enthalten 20mg CSA auf 1g Lösung, die Standardabgabemenge beträgt 5g. 98% der Lösung bestehen meistens aus Erdnussöl und 2% aus Cyclosporin A [126]. Ölige Tropfen werden vom Patienten besser toleriert als wässrige

Dispersionen [129]. Als ölige Grundlage sind neben Erdnussöl [2] auch Maiskeimöl [2, 52, 118], mittelkettige Triglyceride [100], Rizinusöl [2, 100, 168, 189] und Olivenöl [2, 10, 134, 197] beschrieben.

Die Zubereitung erfolgt mit einem Glasstab oder Magnetrührkern in einem tarierten Becherglas, wobei 0,1g Cyclosporin unter leichter Erwärmung in der erforderlichen Menge Erdnussöl gelöst werden [126]. Die erhaltene Lösung muss bei visueller Prüfung klar und frei von auffällig vielen Schwebeteilchen sein. Sie ist schwach gelb und geruchlos. Diese wird, ggf. durch eine Kanüle, möglichst vollständig in eine 5-ml-Spritze mit Luer-Lock-Konus aufgezogen und evtl. enthaltende Luft, durch die nach oben gehaltene Öffnung, entfernt [126]. Auf den Luer-Lock-Ansatz wird ein sterilisierter Filtrationsvorsatz mit einem hydrophoben Membranfilter aus Fluorpolymermaterial und auf den Vorsatz eine sterilisierte Injektionsnadel aufgesetzt. Die Kanüle soll möglichst kurz und weitlumig sein. Unter möglichst aseptischen Bedingungen, insbesondere ohne die Ausgangsöffnung des Filtrationsvorsatzes oder die Nadel zu berühren, wird die Lösung in eine sterile Augentropfenflasche aus Polyethylen filtriert. Erst unmittelbar vor dem Abfüllen im Reinraum-Arbeitsplatz wird die Folienumhüllung, welche die mit geöffnetem Verschluss einzeln verpackte Flasche vor Kontamination schützt, aufgeschnitten und entfernt. Nur so können schwebeteilchen- und bakterienfreie Augentropfen für den Patienten gewährleistet werden [126]. Die Tropfen sollten nicht länger als 10 Tage nach Abgabe bzw. Anbruch der Flasche verwendet werden, da die Kontaminationsgefahr enorm ansteigt und dies zu protrahierten Augenentzündungen führen kann [126]. Auch deshalb ist eine der Aufbrauchfrist angemessene Mengenbegrenzung auf 5 ml Inhalt konsequent einzuhalten. Eine Lagerung im Kühlschrank zur mikrobiellen und chemischen Stabilisierung ist sinnvoll. Eine Konservierung regelrecht hergestellter, öligere Augentropfen wird aus Verträglichkeitsgründen nicht empfohlen, insbesondere nicht im Zusammenhang mit Operationen am Auge [126]. Bei einem möglichen Konservierungsmittel wie dem Chlorobutanol sind keine Rezepturbeispiele aus der Praxis bekannt, sondern nur

Verträglichkeitsuntersuchungen zu einer mit Chlorobutanol konservierten Cyclosporin-Augensalbe auf der Basis von Vaseline und Maiskeimöl an gesunden Freiwilligen [177]. CSA aus wässrigen Infusionslösungen bindet sich meistens an Applikationsbestecke aus Kunststoff [133]. Allerdings ist eine Verwendung von Glasflaschen mit abschraubbarem Pipettenverschluss [134] aus hygienischen Gründen abzulehnen. Bei Polyethylen ist eine solche Resorption des CSA aus öliger Lösung nicht zu erwarten [126].

2.4.3.1.2. Pharmakodynamik

Cyclosporin wirkt immunsuppressiv, indem es in die Signalübermittlung zwischen den Lymphozyten eingreift. Dies erfolgt über eine Hemmung der Zytokinproduktion, besonders von IL-2 in der frühen Aktivierungsphase von T-Zellen [33, 92, 129]. Die Expression von IL-3, IL-4, GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), TNF α , sowie die Zellteilung werden durch die Abnahme der IL-2 Produktion gehemmt. Folglich vermindert sich auch die durch Antigene ausgelöste Apoptose der T-Lymphozyten. Bei den Granulozyten bewirkt CSA eine verminderte Ca²⁺-abhängige Exozytose von Granula-assoziierten Serinesterasen [33, 92, 129, 167]. Der Wirkmechanismus besteht darin (Abb. 2.13.), dass CSA an unterschiedliche Gruppen von Immunophilinen (Cyclophilinen) bindet. Dabei handelt es sich um Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen. Die Isomeraseaktivität hängt nicht mit der immunsuppressiven Wirkung von CSA zusammen. Allerdings bindet ein Immunophilin-CSA-Komplex an die Ca²⁺-aktivierte Serin/ Threonin-Phosphatase namens Calcineurin (calciumabhängiges Enzym) und blockiert so deren Aktivität [33, 92, 129]. Calcineurin wird normalerweise in den T-Zellen aktiviert, wenn sich der intrazelluläre Ca²⁺-Spiegel, infolge der Bindung des T-Zell-Rezeptors an entsprechende Antigen-MHC-Komplexe, erhöht. Calcineurin kommt auch sonst in anderen Zellen vor, dort jedoch in höheren Konzentrationen, so dass vor allem die T-Zellen empfindlicher für die inhibitorische Wirkung von CSA sind. Das so aktivierte Calcineurin dephosphoryliert die Transkriptionsfaktoren der NFATc-Familie

(nukleäre Faktoren aktivierter T-Zellen) im Zytosol, die dann in den Zellkern gelangen. Hier bilden sie Komplexe mit anderen Transkriptionsfaktoren und diese wiederum induzieren die Transkription von Genen, die für die Aktivierung von T-Zellen nötig wären [92]. Diese Gene führen zur Expression von dem bereits erwähnten IL-2, aber auch CD-40-Liganden oder Fas-Liganden, die durch CSA-(und FK-506)-Cyclophilin-Komplexe eben gehemmt werden [33, 39, 92, 167]. Vahlme et al. beschrieb 1992, dass CSA auch eine eigene virustatische Wirkung enthält [108, 200]. So könnten sie als Steroidersatz bei der kombinierten virustatischen-immunsuppressiven Behandlung tiefer Herpeserkrankungen eingesetzt werden.

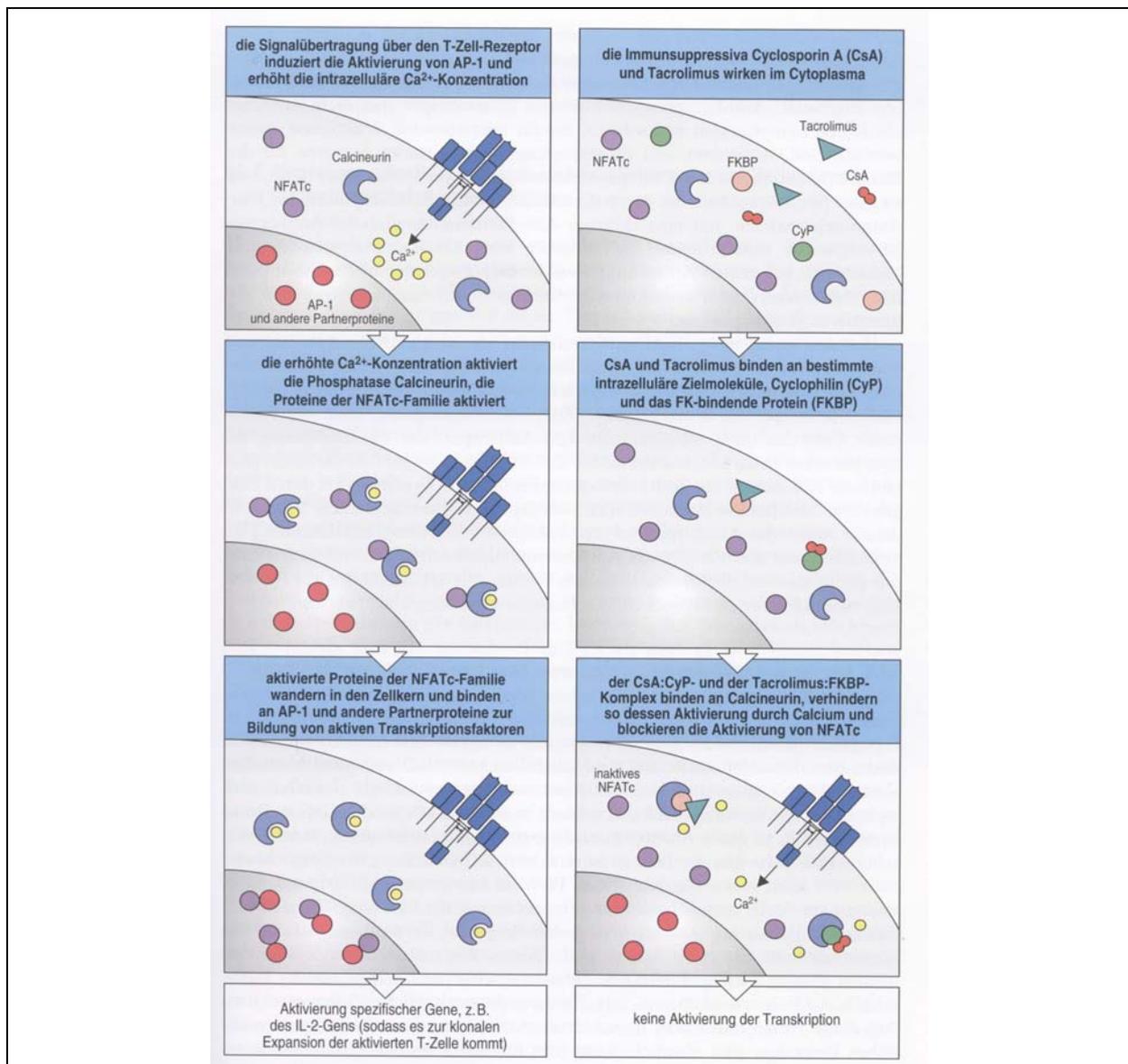


Abb. 2.13. Mechanismen der Wirkung von Cyclosporin A und Tacrolimus [92]

2.4.3.1.3. Pharmakokinetik

Bei *lokaler* Applikation von Cyclosporin A Augentropfen in den Bindehautsack, ist die Penetration, unter anderem aufgrund der ausgeprägten Hydrophobie von CSA, bei intakter Hornhaut sehr begrenzt [3, 36, 106, 195]. Ein Anteil wird über die Nase resorbiert und mit einer etwa 14-stündigen Halbwertszeit systemisch in der Leber (80%: hepatische Metabolisierung) und der Niere zu mehr als 30 inaktiven Metaboliten umgewandelt und ausgeschieden [45, 92, 129]. Nur 3% der Dosis werden, vornehmlich als Metaboliten, renal eliminiert. Bei der Metabolisierung in der Leber wird Cyclosporin von Cytochrom P-450 Enzymen zu weiteren Metaboliten mit höherer Polarität konvertiert. Dies geschieht durch Hydroxylierung und Demethylierung. Diese können zum Teil an den Wirkungen der Cyclosporin-Medikation beteiligt sein [92]. Die Biotransformation wird hauptsächlich von Monooxygenase-Isoenzymen aus der CYP 3 A-Reihe vermittelt. Enzyminduzierende Substanzen wie Phenobarbital können die Cyclosporin-Elimination beschleunigen, Hemmstoffe von CYP 3 A wie Erythromycin, Ketoconazol oder sogar Grapefruitsaft können die Biotransformation verlangsamen. Der Cyclosporin-Spiegel kann daher durch Medikamente, die ebenfalls von Cytochrom P-450 Enzymen metabolisiert werden, stark beeinflusst werden (Interaktionen). Ein extrahepatischer Metabolismus in der vorderen Augenkammer ist möglich, wurde allerdings noch nicht nachgewiesen [3]. Die einzelnen Metabolite haben eine geringere immunsuppressive Wirkung, es scheint aber ein synergistischer Effekt zwischen ihnen vorzuliegen, da der aktivste immunsuppressive Metabolit nur eine immunsuppressive Potenz von 10%, aber alle zusammen eine deutlich höhere Potenz besitzen [3]. Im Allgemeinen sind CSA-Metabolite hydrophiler als CSA selbst. So sind nach systemischer Applikation die Vorderkammerspiegel von CSA deutlich höher, als bei topischer Gabe von CSA in den Bindehautsack. Durch die High-performance liquid-chromatography-electrospray-Massenspektrometrie (HPLC-ES-MS) konnte gezeigt werden, dass sich nach Tropfapplikation die CSA-Spiegel von im Mittel 81 ng/ml, aber deutlich

höhere CSA-Metabolitenspiegel von im Mittel 378 ng/ml ausbildeten. Dagegen konnte nach systemischer Applikation ein eher ausgeglichenes Verhältnis bei einem deutlich höheren CSA-Spiegel von im Mittel 256 ng/ml und etwa gleich hohen CSA-Metabolitenspiegel von im Mittel 317 ng/ml gefunden werden [3].

Maximale Plasmakonzentrationen werden bei systemischer Gabe nach ein bis zu sechs Stunden erreicht [92]. Dagegen lässt sich der Plasmaspiegel bei topischer Applikation aufgrund geringster systemischer Konzentrationen nur mit aufwendigen Messmethoden messen und liegt deutlich unter dem des systemisch verabreichten CSA [1, 3, 116, 195].

2.4.3.1.4. Nebenwirkungen

Grundsätzlich muss zwischen unerwünschten Arzneimittelwirkungen von systemisch verabreichtem und lokal appliziertem Cyclosporin A unterschieden werden.

Im Vordergrund stehen Unverträglichkeitsprobleme [2, 87]. So konnte in der parallel verlaufen Studie gezeigt werden, dass das Brennen der Augen, welches bei bis zu 70% der Patienten auftritt, eine sehr häufige Nebenwirkung darstellt. Häufig ist auch eine Rötung des Auges (59%). 51% der Patienten entwickelten ein Fremdkörpergefühl am Auge, welches wie Sand im Auge empfunden wird. Weniger ein Problem sind Geschmacks- oder Empfindungsstörung im Mund- und Rachenbereich (22%) [2, 87]. Die lokalen Nebenwirkungen sind u.a. auch auf die Zusammensetzung bzw. die Zusatzstoffe des Cyclosporin A zurückzuführen (Kapitel 2.4.3.1.1. Herstellung) [126].

Die Indikation zum Einsatz von systemischem Cyclosporin A in der Augenheilkunde zum Beispiel bei perforierender Keratoplastik muss wegen potentiell gravierender Nebenwirkungen eng gestellt werden [143, 144, 186, 188]. Die Nebenwirkungen der systemischen CSA-Therapie sind im Allgemeinen dosisabhängig und sprechen auf eine Dosisreduktion an. Insbesondere Störungen der Nierenfunktion mit Anstieg des arteriellen Blutdrucks und eine Proteinurie stellen das Hauptproblem dar [104, 173, 186]. Da bei

Transplantationspatienten höhere Initialdosen benötigt werden, treten Nebenwirkungen dort üblicherweise häufiger und stärker ausgeprägt auf als bei Patienten, die wegen anderer Indikationen behandelt werden. Eine wichtige Sicherheitsmaßnahme zur Therapieüberwachung bei Transplantations-Patienten stellt die Bestimmung der Cyclosporin A-Konzentration im Vollblut dar, welche mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gemessen wird. Keine der systemischen Nebenwirkungen konnte bisher bei Patienten beobachtet werden, die lokal appliziertes Cyclosporin A erhielten. Die systemischen Nebenwirkungen des CSA betreffen weiterhin v.a. das Herz-Kreislauf-System, das Nervensystem, die Sinnesorgane, die Leber, den Gastrointestinaltrakt und das Immunsystem [143, 144, 186]. Auch wurden bei systemischer CSA Gabe Malignome und lymphoproliferative Störungen beobachtet [34, 53, 69, 91, 94, 101, 111, 124, 159, 179, 208]. Ihre Häufigkeit und Verteilung ähneln denen von Patienten mit konventioneller immunsuppressiver Therapie. Auch konnten Kallen et al. 2003 [95] und Feltgen et al. 2005 [47] zeigen, dass Patienten mit einer Blepharokeratokonjunktivitis atopica gehäuft Bindehautkarzinome entwickelten. Zwei Patienten der Kallen Studie (Kasuistik 1 und 7) wurden jedoch zuvor mit MMF und CSA behandelt, bevor bei ihnen ein Bindehautkarzinom diagnostiziert wurde.

Meist stellt jedoch eine systemische Immunsuppression ein Risikofaktor für ein gehäuftes Auftreten von Karzinomen dar. Dies zeigten auch Yarosh et al. in einer Publikation von 2005. Insbesondere systemisch verabreichte Calcineurininhibitoren wie Cyclosporin A verringern zusammen mit einer UVB Bestrahlung die DNA-Reparatur-Systeme und die Apoptose in menschlichen epidermalen Keratinozyten (NHEK) [207], wodurch es vermehrt zu Neoplasien des Plattenepithels kommen kann.

2.4.3.1.5. Anwendungsgebiete

Cyclosporin wird bereits mit gutem Erfolg verwendet um Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen zu verhindern [144, 186]. So hat sich nach Einführung von Cyclosporin die Erfolgsquote besonders bei Nierentransplantationen, aber auch bei Herz- und Lebertransplantationen deutlich steigern lassen [28]. Cyclosporin wird auch bei Autoimmunerkrankungen systemisch eingesetzt [36, 193, 194]. Weitere Indikationen sind schwere endogene Uveitis, sowie Behçet-Uveitis mit Beteiligung der Retina [38], schwerste Formen der Psoriasis [92, 129] und bestimmte Formen des nephrotischen Syndroms [92], sowie die unter Kapitel 2.3. genannten Entzündungen des vorderen Augenabschnittes [87].

Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Abstoßungsreaktion nach Hochrisiko-Keratoplastik [144, 186, 188]. Sundmacher et al. zeigten 1983, dass diese zwar durch konsequente lokale und systemische Kortikosteroidbehandlung gesenkt werden kann [189], jedoch ist auch diese Indikation mit vielen Nebenwirkungen verbunden [209]. Seit ca. 15 Jahren wird daher lokales und systemisches Cyclosporin A zur Verhinderung der allogenen Abstoßungsreaktion nach Hochrisiko-Keratoplastik eingesetzt [144, 186, 188, 189]. Es ist zwar so zu einem deutlichen Rückgang des Transplantatversagens nach Hochrisiko-Keratoplastik gekommen [113, 143, 144, 185, 186, 187, 189], allerdings wird diese Prophylaxe meist noch sehr kontrovers diskutiert [143].

Vor Einleitung einer systemischen CSA-Abstoßungs-Prophylaxe oder Therapie wird generell eine internistische Untersuchung empfohlen. Insbesondere sollten Malignome, Leber-, Nieren- oder gastrointestinale Erkrankungen ausgeschlossen werden. Als weitere Ausschlusskriterien für eine Behandlung mit CSA gelten ferner eine durchgemachte oder aktive maligne Erkrankung, serologische Evidenz für HIV oder Hbs-Ag, therapiebedürftige akute oder systemische Infektionen, ulzerative gastrointestinale Erkrankungen, inadäquate Kontrazeption, Schwangerschaft sowie junges Lebensalter.

Bei der Indikationsstellung zur lokalen CSA-Therapie werden in der Augenklinik der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf ebenfalls strenge Aufnahmekriterien gesetzt. So wird Frauen im gebärfähigem Alter generell von der Therapie abgeraten. Andernfalls ist eine konsequente Empfängnisprophylaxe zu betreiben. Die Behandlung von Kindern stellt eine relative Kontraindikation dar, zumal bedacht werden sollte, dass es zur Zeit kaum vergleichbare nebenwirkungsarme Alternativen zu lokalen CSA-Augentropfen gibt (Kapitel 2.4.3.1.4. Nebenwirkungen, Kapitel 3.2.2. Patienten bis 16 Jahre).

Wegen der unsicheren Bioverfügbarkeit insbesondere bei Transplantationspatienten und daraus resultierender großer Variabilität der benötigten Dosis erfolgt die systemische Therapie mit Cyclosporin A unter fortlaufender Kontrolle der Vollblut- (oder Plasma-) Konzentrationen. Als therapeutisches Fenster werden Talspiegel von 100-200 µg/L (Vollblut) angestrebt. Die mittlere Tagesdosis beträgt 4-8 mg/kg Körpergewicht/ Tag (täglich zwei Einzeldosen im Abstand von 12 h).

2.4.3.2. Tacrolimus

Tacrolimus (FK-506, Protopic[®]) ist ein zur Gruppe der Makrolide gehöriges Molekül, das zuerst aus dem filamentösen Bakterium *Streptomyces tsukubaensis* isoliert wurde und eine starke immunsuppressive Wirkung zeigt [92, 167].

Die kompletten Abläufe innerhalb der Immun- und anderer Körperzellen nach einer Exposition gegenüber Tacrolimus sind noch nicht vollständig geklärt („Black Box“ [44]).

Der Wirkmechanismus beruht darauf, dass die Moleküle in der Lage sind, an verschiedene intrazelluläre Proteine zu binden, die man demnach als Immunophiline bezeichnet [92, 167].

Die bekanntesten sind die Chaperon-Proteine der FKBP-Gruppe (FK-506 binding proteins), sowie die Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Blockade von Signaltransduktionsvorgängen und einer verminderten Transkription von Interleukin 2 und 3 [92, 167, 175]. Im Gegensatz zu lokalem CSA durchdringt FK-506 die

epidermale Barriere viel leichter und besitzt somit auf der Haut eine höhere lokale Wirksamkeit [36, 106, 140]. Indikationen ergeben sich vor allem zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen [92]. Hier hat sich FK-506 in verschiedenen Studien anderen Immunsuppressiva (Azathioprin, Cyclosporin A) überlegen gezeigt [154, 167]. Wechselwirkungen zeigen sich bei Substanzen, die ebenfalls wie Tacrolimus über das Cytochrom-System 3A4 (CYP3A4) metabolisiert werden [92]. Lokal wird es v.a. in der Dermatologie bei atopischer Dermatitis eingesetzt [44, 154, 178, 181, 194]. Das Einsatzgebiet in der Ophthalmologie beinhaltet unter anderem entzündliche Erkrankungen von Hornhaut und Bindehaut [140], insbesondere die Blepharokeratokonjunktivitis atopica [114]. Wie beim lokalen CSA, wird auch hier eine mögliche Kanzerogenität diskutiert [131].

2.4.3.3. Pimecrolimus

Pimecrolimus (SDZ ASM 981), ein Vertreter der neuen Verbindungsklasse der Ascomycine, hemmt die Phosphatase Calcineurin und verhindert die Produktion entzündlicher Zytokine in T-Zellen [92, 183]. Im Gegensatz zu Kortikosteroiden wirkt Pimecrolimus zellspezifisch und hat z.B. keinen Effekt auf Langerhans-Zellen. Pimecrolimus zeigt eine geringere Permeation durch die Haut als Kortikosteroide und Tacrolimus [131]. Daher ist das Nebenwirkungspotenzial nach topischer Anwendung gering [131]. In Tiermodellen hat Pimecrolimus sowohl nach topischer als auch nach oraler Gabe ausgeprägte und dosisabhängige entzündungshemmende Wirkung, ohne die typischen Kortikosteroidnebenwirkungen [92, 209]. Verglichen mit Tacrolimus hat Pimecrolimus auf der Haut keinen Effekt auf die primäre Immunreaktion in der Sensibilisierungsphase der allergischen Kontaktdermatitis [128, 181] und hat generell auch ein deutlich geringeres Potenzial zur Unterdrückung systemischer Immunreaktionen. Das Einsatzgebiet ist also sehr begrenzt. Trotzdem wird auch hier eine mögliche Kanzerogenität diskutiert [131].

2.5. Oberflächliche epitheliale Tumore der Konjunktiva

2.5.1. Präkanzeröse Prozesse

Unter präkanzerösen Läsionen der Bindehaut werden Veränderungen verstanden, die nicht nur klinisch einem Karzinom ähneln, sondern auch unbehandelt in ein solches übergehen können [46, 102]. Präkanzeröse Läsionen sind Dysplasien und das Carcinoma in situ. **Dysplasien** des Plattenepithels sind fakultative präkanzeröse Läsionen. Sie enthalten abnormes Epithel, Störungen der Schichtung und Ausdifferenzierung mit Kernatypien, vermehrte Mitosen und breiten sich strikt intraepithelial aus [46]. Die Wahrscheinlichkeit der Progression zum Karzinom steigt mit dem Grad der Dysplasie [46]. Das **Carcinoma-in-situ** stellt eine komplette Verdrängung des normalen Bindehautepithels durch neoplastisch veränderte Epithelzellen am Ort der Läsion dar. Per definitionem hat das Carcinoma-in-situ die Basalmembran des Epithels noch nicht durchbrochen [46, 125]. Es handelt sich dabei um das früheste, aber noch nicht invasive Stadium eines Plattenepithelkarzinoms.

Beide präkanzeröse Läsionen der Bindehaut, Dysplasien und das Carcinoma in situ, werden unter dem Begriff **conjunctivale intraepitheliale Neoplasie** (CIN der Bindehaut) zusammengefasst [46] und lassen sich klinisch nicht von einander differenzieren. In der Spaltlampenuntersuchung stellt sich die CIN als fleischige, flache oder höchstens minimal erhabene Läsion meist am Limbus dar [6, 97, 171]. Seltener findet man die CIN auch im Bereich der Fornices oder der palpebralen Bindehaut. Die limbale Läsion kann sich unterschiedlich weit in das Epithel der angrenzenden Cornea ausbreiten. Auf der Oberfläche der Läsion kann sich, infolge von Hyperkeratosen, ein weißer Plaque (Leukoplakie) ausbilden [6, 97, 171].

Die Erforschung der conjunctivalen intraepithelialen Neoplasien an Bindehaut ist nicht so weit fortgeschritten, wie die der conjunctivalen intraepithelialen Neoplasie an der Cervix uteri. An der Cervix uteri konnte gezeigt werden, dass für die Entstehung des Plattenepithelkarzinoms auch eine Infektion mit Humanen-Papilloma-Viren (HPV)

verantwortlich ist [46]. Die Wirkung des HPV auf das Genom ist auch bei dem Plattenepithelkarzinom der Bindehaut von zentraler Bedeutung [46, 115, 117, 122, 192]. Um karzinogen wirken zu können, müssen die Papillomaviren in die Basalzellen eindringen [46, 115, 192]. Papillomaviren können aber weder in die Zellen der oberen Schichten des Plattenepithels noch durch das intakte mehrschichtige Plattenepithel zu den Basalzellen gelangen. Erst durch länger bestehende Epitheldefekte gelangen sie zu den anfälligen Zellen des Regenerationsepithels und der basalen Zellschichten [46]. Sobald sich das Virus in der Zelle befindet, baut es seine DNS in die DNS-Kette der Wirtszelle ein, um sich zu replizieren. Die von den viruseigenen Genen, vor allem vom E6- und E7-Gen, produzierten Onkoproteine E6 bzw. E7 binden und inaktivieren zelluläre Tumorsuppressorgene [46, 78, 125]. Daraus entsteht eine genetische Instabilität, die zur Kanzerogenese beiträgt. Aller Wahrscheinlichkeit nach müssen auch noch die Mechanismen, die die Virustranskription unterdrücken, gehemmt werden. Dies bewirken ebenfalls die E6 und E7 Proteine, aber auch exogene Mutagene wie chronische UV-B-Strahlen. Hinzu kommt eine Kaskade aus Mutationen, unter anderem die des Tumorsuppressorgens p53. Dies konnte zumindest an dem Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut bewiesen werden. Giese und Scheifele konnten 2001 bzw. 2002 zeigen, dass die Mutation des p53 Gens bei den Plattenepithelkarzinomen der Mundschleimhaut signifikant erhöht war [62, 166]. Zusätzlich zu der Mutation des p53 Tumorsuppressorgens kommt eine Expression des p63 Onkogens. Dies konnten Auw-Haedrich et al. 2005 feststellen [6a]. Darin haben sie gezeigt, dass p63 bevorzugt in conjunctivalen intraepithelialen Neoplasien und Karzinomzellen der Bindehaut exprimiert wird.

Das Risiko für das Erlangen einer präkanzerösen Läsion an der Bindehaut stellt vor allem chronischer UV-B-Schaden, meist bei älteren Menschen im 6. – 8. Lebensjahrzehnt dar [107]. Dieser führt über Schädigung der DNA zur Mutation und zur Entwicklung von kanzerösen Zellen [198, 207]. Auf der Haut manifestiert sich diese als sog. „Landmannshaut“ [107]. Mehr als 90% der Tumoren entstehen auf den „Sonnenterrassen“ der Haut wie den Lidern, wobei

das Unterlid häufiger betroffen ist als das Oberlid [107]. Weitere Risikofaktoren sind Röntgenbestrahlung, hoher Nikotinkonsum, genetische Komponenten, die photodynamische Therapie mit UV-A-Strahlen (PUVA) der Psoriasis, chronische Wunden und Immunsuppression [107, 109]. So konnten Kallen et al. 2003 [95] und Feltgen et al. 2005 [47] zeigen, dass chronische Entzündungen der Hornhaut und Bindehaut in Zusammenhang mit Immunschwäche v.a. bei Atopikern [47], zur Entwicklung von Bindehautkarzinomen prädisponieren. Macarez et al. verwiesen 1999 darauf [109], dass die Bindehaut von Patienten, die unter systemischer CSA-Therapie nach Organtransplantationen steht, ebenfalls gehäuft zu Bindehautkarzinomen neigt.

2.5.2. Karzinome der Konjunktiva – Bindehautkarzinom

Karzinomatöse Läsionen unterscheiden sich von den vorher genannten präkarzinomatösen durch invasives Wachstum und prinzipielle Fähigkeit zur Metastasierung [46, 102, 125].

Bei den epithelialen Tumoren der Bindehaut handelt es sich meistens um Plattenepithelkarzinome. Es werden aber auch Spindelzellkarzinome und mukoepidermoide Karzinome der Konjunktiva beobachtet [125]. Plattenepithelkarzinome entwickeln sich aus einer Dysplasie oder einem Carcinoma-in-situ (präkanzeröse Läsionen). Typisch für die grauweißen Plattenepithelkarzinome sind eine vorwiegend am Limbus cornea lokalisierte Lage und eine unregelmäßige höckerige Oberfläche [6]. Histologisch handelt es sich meistens um ein Carcinoma-in-situ [6].

Das invasive Plattenepithelkarzinom ist im Allgemeinen größer und prominenter als das Carcinoma-in-situ. Meist bleibt es auf die Conjunctiva beschränkt. Auch Verhornung der Bindehaut kann ein klinisches Malignitätszeichen sein. So kann bei chronischen Reizzuständen der Tumor den Charakter der äußeren Haut annehmen [125]. In seltenen Fällen kann es jedoch durch die corneosclerale Lamelle in die Vorderkammer einbrechen, oder sogar das orbitale Septum durchbrechen und das Bindegewebe der Orbitahöhle infiltrieren [125].

Diese Art der Ausdehnung betrifft häufiger das mucoepidermoide Karzinom. Dieses tritt hauptsächlich bei älteren Patienten auf und hat, aufgrund im Tumor enthaltender schleimproduzierender Zellen, eine gelblich zystische Komponente. Es ist allgemein aggressiver als das Plattenepithelkarzinom und neigt zu einer größeren Ausdehnung. Ähnlich aggressiv zeigt sich eine zweite Variante des Plattenepithelkarzinoms der Bindehaut, das Spindelzellkarzinom [125].

Nach Feichter et al. [46] stellen sich in einer zytologischen Untersuchung die Tumorzellen eines Plattenepithelkarzinoms einzeln oder in kleinen Verbänden, manchmal in ganzen Gewebefragmenten dar. Entscheidend sind Kernvergrößerungen, Kernpolymorphie, grob granuläres, verklumptes und unregelmäßig verteiltes Chromatin sowie vergrößerte Nukleolen. Manchmal sind längliche bis fadenförmige Tumorzellen mit pyknotischen Kernen der einzige mikroskopische Hinweis [46, 102].

Histopathologisch hat das invasive Karzinom die Basalmembran durchbrochen und wächst in das stromale Gewebe ein. Obwohl die Zellen Blutgefäße und Lymphgefäße arrodieren, sind sowohl regionale als auch Fernmetastasen bei immunkompetenten Patienten höchst selten [125]. Dennoch weisen immunsupprimierte Patienten, welche ein höheres Risiko für das Erlangen eines Plattenepithelkarzinoms der Bindehaut [95] oder der Lider [117] haben, auch eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine Metastasierung auf.

Die Verdachtsdiagnose wird zunächst durch das klinische Erscheinungsbildes gestellt. Daraufhin erfolgt zunächst ein Bindehautabstrich oder eine Exzisionsbiopsie. Die Präparate werden zytologisch bzw. histologisch am Mikroskop vom Pathologen ausgewertet. Eine zytologische DNA-Bildzytometrie erfolgt nur, wenn die Zytologie eine unsichere Dignität ergeben hat [46]. Dabei spielen Dysplasien, im Sinne von Kerngrößenzunahme, Verschiebung der Kern-Plasma-Relation, Anisonukleose, Kernpolymorphien, Hyperchromasie, Vergrößerung der Nukleolen oder atypische Mitosen (atypische Anordnung der Mitosespindeln) eine entscheidende Rolle (vgl. Kapitel 3.7.3. „Diagnostische Kriterien der

zytopathologischen Untersuchung⁶). Die Größenausdehnung der Karzinome der Konjunktiva erfolgt nach der TNM-Klassifikation der WHO (Tab. 2.1).

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor \leq 5mm in größter Ausdehnung
T2	Tumor $>$ 5mm in größter Ausdehnung, ohne Infiltration von Nachbarstrukturen
T3	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen außer Orbita
T4	Tumor infiltriert Orbita
T4a	Tumor infiltriert Weichteile der Orbita, keine Knocheninfiltration
T4b	Tumor infiltriert Weichteile der Orbita, mit Knocheninfiltration
T4c	Tumor infiltriert Orbita und angrenzende Nasennebenhöhlen
T4d	Tumor infiltriert Orbita und Gehirn
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen: präaurikulär, submandibulär, Halslymphknoten
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tab. 2.1. TNM Klassifikation der Karzinome der Konjunktiva [29, 56, 204]

Histologisch und/oder zytologisch wird eine Unterteilung nach Art des Karzinoms (Basalzell-, Plattenepithel-, Talgdrüsenkarzinom) unternommen.

Differentialdiagnostisch müssen ein atypisches Basalzellkarzinom, ein Dermoid, ein Pterygium oder ein Naevus conjunctivae abgegrenzt werden [6, 86, 97, 152, 202].

Das Therapiemanagement variiert mit der Ausdehnung des Tumors [58, 107, 122]. Die

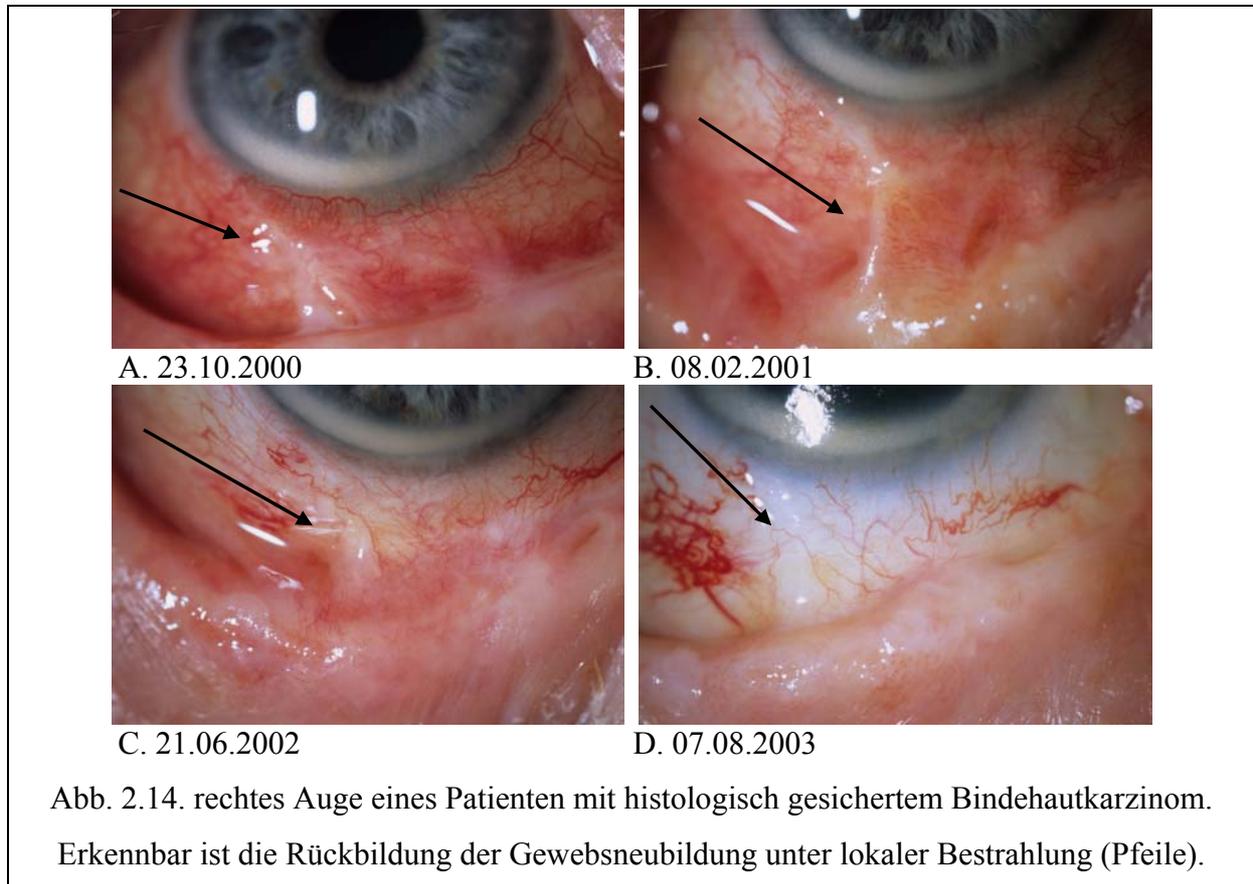
Therapie erfolgt bei kleineren Tumoren bis T2 durch Exzision mit einem Sicherheitsabstand

von 0,5cm [6, 58, 97, 107]. Größere Tumore mit Lymphknotenmetastasen werden mit einer zusätzlichen Lymphadenektomie der lokoregionalen Lymphknotenstationen therapiert. Die Behandlung von Patienten mit Infiltration von Nachbarstrukturen ist bisher nicht durch kontrollierte Studien abgesichert. Daher ist es durchaus notwendig, das Therapieschema individuell entsprechend den zytologischen, zytometrischen und histopathologischen Befunden anzupassen [122, 202]. Bei Patienten mit sehr aggressivem und ausgedehntem Tumorwachstum oder bei Rezidiven, wird in der Regel mit Mitomycin-C-0,02%-Augentropfen (bis zu 6 Zyklen à 2 Wochen mit jeweils 2 Wochen Pause zwischen 2 Zyklen) therapiert [172]. Weitere Chemotherapeutika der Wahl sind 5-Floururacil/Cisplatin/Bleomycin, Interferone oder Methotrexat [Merlano 1992, Sadek 1990, Khansur 1990]. Alternativ kann eine Kryotherapie durchgeführt werden [58]. Bei invasiven Bindehautkarzinomen erfolgt zusätzlich eine Radiatio mit einer Gesamtdosis von 60 Gray à 30 Zyklen [6, 22, 97, 122, 171, 202]. Sobald extrakutane Strukturen infiltriert sind, verschlechtert sich die Prognose der Patienten drastisch. Bei knöcherner Beteiligung, Durchbruch durch das orbitale Septum oder Ausbreitung über die Nasennebenhöhlen besteht eine relative Indikation zur Exenteratio orbitae [171, 202]. Bei Invasion der Subkutis, einer Tumordicke von mehr als 5mm oder Infiltration tiefer extrakonjunkivaler Strukturen (T4) kann das Risiko für Rezidive und Metastasen ansteigen [125, 171, 202].

Bei der Nachsorge der Patienten sollten die Region des Primärtumors und die lokoregionalen Lymphknotenstationen in den ersten beiden postoperativen Jahren klinisch und bei schwierig zu erhebendem oder unklarem Palpationsbefund sonographisch kontrolliert werden.

Persistierende Lymphknoten, die größer als 1 cm sind, erfordern eine exzisionale Biopsie [6, 97, 171, 202]. Immunsupprimierte Patienten, insbesondere mit einer Atopie [47, 95, 109], schweren Blutzuckerentgleisung, Alkoholiker [117] oder Patienten mit anderen Immunschwächenden (HIV) sollten wegen des erhöhten Rezidivrisikos zeitlebens zur Eigenkontrolle angehalten und jährlich nachuntersucht werden [117, 171, 202].

Die Prognose der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Bindehaut ist in der Regel relativ gut. Voraussetzung ist, dass die Diagnose rechtzeitig gestellt und der Tumor mit ausreichendem Sicherheitsabstand entfernt wurde. Die nachfolgende Abbildung Abb. 2.14. zeigt den Verlauf eines Bindehautkarzinoms unter Therapie.



3. Patienten und Methoden

3.1. Gliederung des Patientenkollektivs

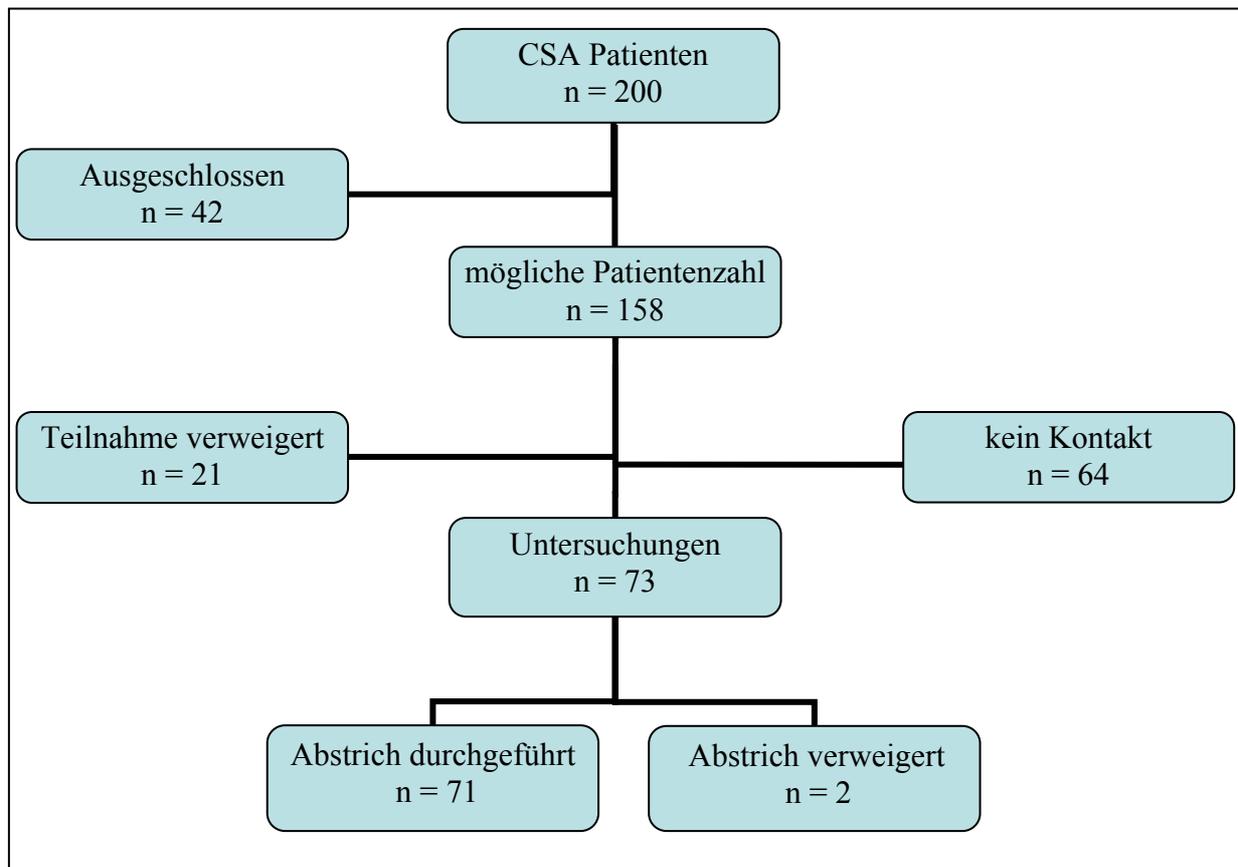


Abb. 3.1. Gliederung des Patientenkollektivs

Der Abb. 3.1. zeigt, wie sich die Patientenkohorte der mit CSA behandelten Patienten gliederte. Der Studienaufbau wurde, soweit möglich, entsprechend den Empfehlung der „STARD Initiative“ nach Bossuyt et al. 2003 designt [24, 25]. Bereits zu Beginn der Studie wurden 200 Patienten über einen unterschiedlich langen Zeitraum an der Universitäts-Augenklinik in Düsseldorf mit lokalen CSA-Augentropfen therapiert. Alle 200 CSA Patienten wurden zunächst schriftlich eingeladen an dieser Studie teilzunehmen (3.3. Anschreiben). Die Patienten, mit denen ein Termin vereinbart werden konnte, erhielten ein persönliches Aufklärungsgespräch über die geplante Untersuchung (3.4. Patientenaufklärung) und unterzogen sich einer augenärztlichen Untersuchung (3.5. augenärztliche Untersuchung). Insgesamt konnte bei 71 Patienten ein Bindehautabstrich (3.6. Bindehautabstrich), der in der

Cytopathologie der Universität Düsseldorf begutachtet wurde (3.7. Zytologische Untersuchung), gewonnen werden.

42 von 200 Patienten wurden für statistische und zytopathologische Untersuchungen aus der Studie ausgeschlossen. Bei dem größten Teil der ausgeschlossenen Patienten stimmte weder die angegebene Adresse, noch konnte eine aktuellere Anschrift oder Telefonnummer über die telefonische Auskunft ermittelt werden, sodass ein Kontakt gar nicht hätte stattfinden können. Einige wenige Patienten hatten, anders als vom Arzt verordnet, die CSA-Augentropfen nach wenigen Tagen bis zu sechs Wochen selbstständig abgesetzt, oder diese wurden von auswärtigen Augenärzten indiziert und waren daher schwer nachzuvollziehen. Dabei wird davon ausgegangen, dass man keine Aussage über den Langzeiteffekt und die Sicherheit einer Therapie machen kann, wenn diese nur über einen kurzen Zeitraum, eben unter sechs Wochen, verabreicht wurde. Bei den wenigen Patienten, die nur über sehr kurze Zeiträume mit Cyclosporin A Augentropfen therapiert wurden (einige wenige Tage bis sechs Wochen), wurde die Therapie meist aus Unverträglichkeitsgründen oder aufgrund mangelnder Compliance abgesetzt.

Mit 64 Patienten kam trotz korrekter Anschrift und ordnungsgemäßer Tropfapplikation keinerlei Kontakt zustande, sodass eine Terminvereinbarung zur Nachuntersuchung bzw. zum Bindehautabstrich nicht möglich war. 94 Patienten konnten per Post oder Telefon kontaktiert werden. 21 Patienten verweigerten die Teilnahme direkt. Dafür wurden unterschiedliche Gründe angegeben. Den meisten war die Entfernung zur Augenklinik in Düsseldorf zu groß, für andere war die Untersuchung mit viel Zeitaufwand verbunden und/oder sie hatten Bedenken gegenüber den Nebenwirkungen des Bindehautabstrichs. So konnte mit 73 Patienten ein Termin zur Nachuntersuchung vereinbart werden. 2 Patienten entschieden sich jedoch im Nachhinein, nach der augenärztlichen Untersuchung und Aufklärung über die Studie und den Bindehautabstrich, diesen doch nicht durchführen zu lassen. Als Grund gaben beide Ängste vor den Nebenwirkung des Bindehautabstrichs an.

Im Endeffekt konnten so an 71 von 158 möglichen Patienten ein Bindehautabstrich gewonnen werden (Abb. 3.1.). 87 von 158 möglichen Patienten haben nicht an dem Abstrich teilgenommen. Die nachfolgende Graphik (Abb. 3.2.) verdeutlicht nochmals die Gründe dieser 87 Patienten, die nicht an einem Bindehautabstrich teilgenommen haben.



Abb. 3.2. Gründe der 87 Patienten, die keinen Bindehautabstrich erhielten

3.2. Datentechnische Auswertung

Die Auswertung aller statistischen Ergebnisse und epidemiologischen Daten wurden mit dem Programm SPSS[®] 11 und 12, sowie Microsoft Excel[®] der Firma Microsoft Windows[®] XP berechnet.

3.2.1. Tabellarische Übersichten

Die nachfolgende Tabelle 3.1. ist gruppiert nach der klinischen Diagnose und bezieht sich auf die absolute Patientenzahl, den Mittelwert des Patientenalters, die absolute Augenanzahl bzw. die Patientenzahl mit beidseitiger Augenbeteiligung aller 71 Patienten.

klinische Diagnose	Patientenanzahl	Alter	Augen	beidseitig
Ulcus Mooren	3	59,3	4	1
Thygeson Keratitis	16	31,0	27	11
Rosazea Keratokonjunktivitis	1	65,0	2	1
Rheumatische Erkrankung	1	73,0	2	1
Praedescemetale Keratitis	2	24,0	2	0
Nummuläre Keratitis	26	53,6	49	23
Keratokonjunktivitis vernalis	2	11,0	4	2
Varizella-Zoster-Keratitis	2	54,0	2	0
Blepharokeratokonj. atopica	6	30,0	11	5
Blepharokeratokonj. sicca	12	44,1	22	10
Gesamt(-durchschnitt)	71	43,0	125	54

Tab. 3.1. allgemeine Daten

Tabelle 3.2. zeigt die Mittelwerte der Tropfenanzahl des linken (LA) bzw. rechten Auges (RA), sowie die Summe der Tropfen aus rechtem und linkem Auge. Dagegen ist in der letzten Spalte die kumulative Tropfenanzahl aufgelistet. Diese ist als die höchste Tropfenanzahl einer der beiden Augen definiert. So ergibt sich für den Mittelwert der kumulativen Tropfenanzahl stets ein gleich hoher oder kleinerer Wert, als für die Gesamttropfenanzahl.

klinische Diagnose	Tropfen LA	Tropfen RA	Gesamttropfenanzahl	kum. Tropfenanzahl
Ulcus Mooren	3121,0	5764,0	8885,0	5036,3
Thygeson Keratitis	1125,6	1043,0	2168,6	1827,2
Rosazea Keratokonjunktivitis	1170	1084	2254,0	2254
Rheumatische Erkrankung	2631	2631	5262,0	5262
Praedescemetale Keratitis	587,4	0,0	587,4	587,4
Nummuläre Keratitis	1222,2	1085,3	2307,5	1085,3
Keratokonjunktivitis vernalis	1001,0	1146,0	2147,0	2147,0
Varizella-Zoster-Keratitis	0,0	3283,0	3283,0	3283,0
Blepharokeratokonj. atopica	2187,1	2179,8	4366,9	4366,8
Blepharokeratokonj. sicca	770,1	723,5	1493,6	1369,2
Gesamtdurchschnitt	1153,5	1142,1	2295,7	2295,7

Tab. 3.2. Tropfenverteilung

In der nächsten Tabelle 3.3. sind die durchschnittlichen Behandlungstage mit lokalen CSA-Augentropfen, sowie die durchschnittlichen Nachbeobachtungstage, -monate und -jahre dargestellt. Die Nachbeobachtungszeit wurden von dem ersten Tag der initialen CSA-Therapie gezählt und ist daher mindestens so hoch, wie die lokale CSA-Therapie selbst.

klinische Diagnose	Behandlung	Nachbeobachtung		
	Tage	Tage	Monate	Jahre
Ulcus Mooren	1132,3	1188,3	39,6	3,3
Thygeson Keratitis	851,5	2439,5	81,3	6,8
Rosazea Keratokonjunktivitis	585,0	585,0	19,5	1,6
Rheumatische Erkrankung	1143,0	1274,0	42,5	3,5
Praedescemetale Keratitis	485,5	1759,5	58,7	4,9
Nummuläre Keratitis	755,5	1960,5	65,4	5,4
Keratokonjunktivitis vernalis	525,0	1109,5	37,0	3,1
Varizella-Zoster-Keratitis	1160,0	1515,0	50,5	4,2
Blepharokeratokonj. atopica	1134,7	1155,8	38,5	3,2
Blepharokeratokonj. sicca	494,3	986,8	32,9	2,7
Gesamtdurchschnitt	781,3	1732,0	57,7	4,8

Tab. 3.3. Dauer und Nachbeobachtung der topischen CSA-Therapie

Die letzte Tabelle 3.4. zeigt die durchschnittliche Tropfenzahl pro Tag aufgeschlüsselt nach Diagnose. Dabei wurde der Mittelwert der kumulativen Tropfenzahl, also die einseitig höchste Tropfenzahl, durch den Mittelwert der Behandlungstage mit lokalen CSA-Augentropfen dividiert.

klinische Diagnose	Tropfen/ Tag
Ulcus Mooren	4,4
Thygeson Keratitis	2,1
Rosazea Keratokonjunktivitis	3,9
Rheumatische Erkrankung	4,6
Praedescemetale Keratitis	1,2
Nummuläre Keratitis	1,4
Keratokonjunktivitis vernalis	4,1
Varizella-Zoster-Keratitis	2,8
Blepharokeratokonj. atopica	3,8
Blepharokeratokonj. sicca	2,8
Gesamtdurchschnitt	3,0

Tab. 3.4. Tropffrequenz

3.2.2. Aufteilung der Krankheiten nach Geschlecht

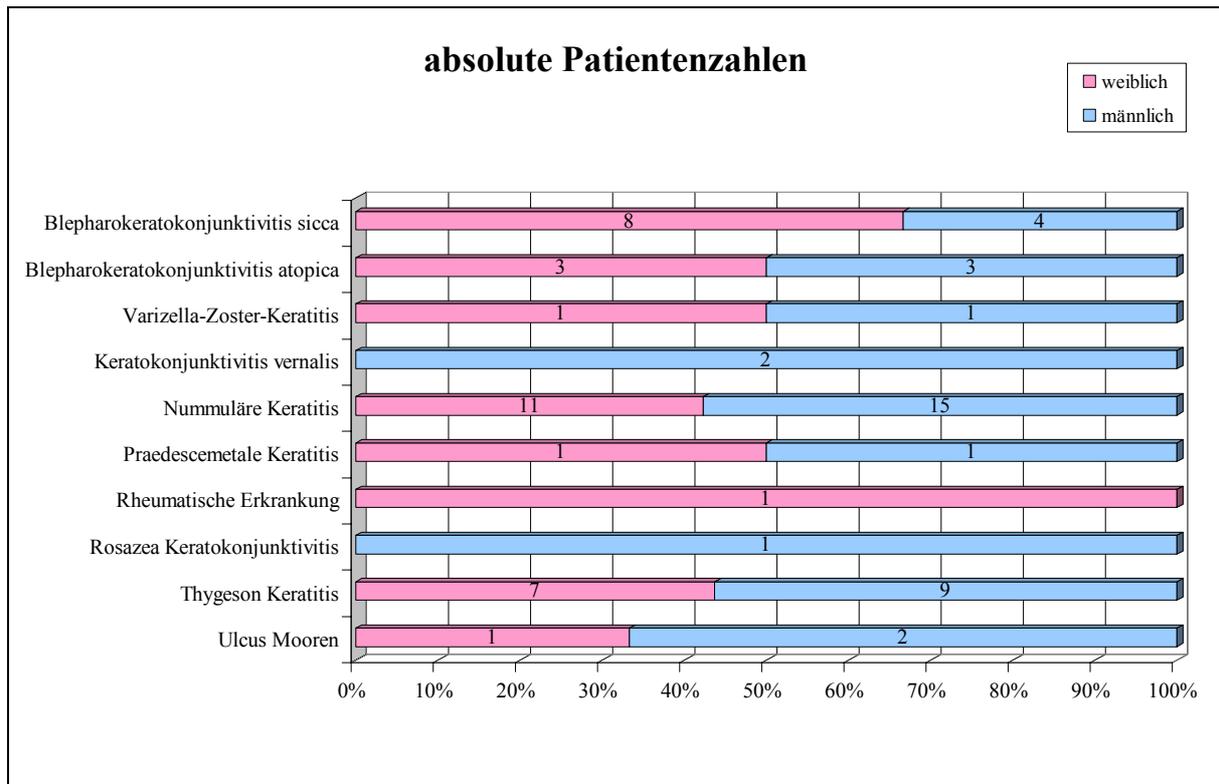


Abb. 3.3. Absolute Patientenzahlen aller 71 Patienten bezogen auf die 10 Erkrankungen

3.2.3. Patienten bis 16 Jahre

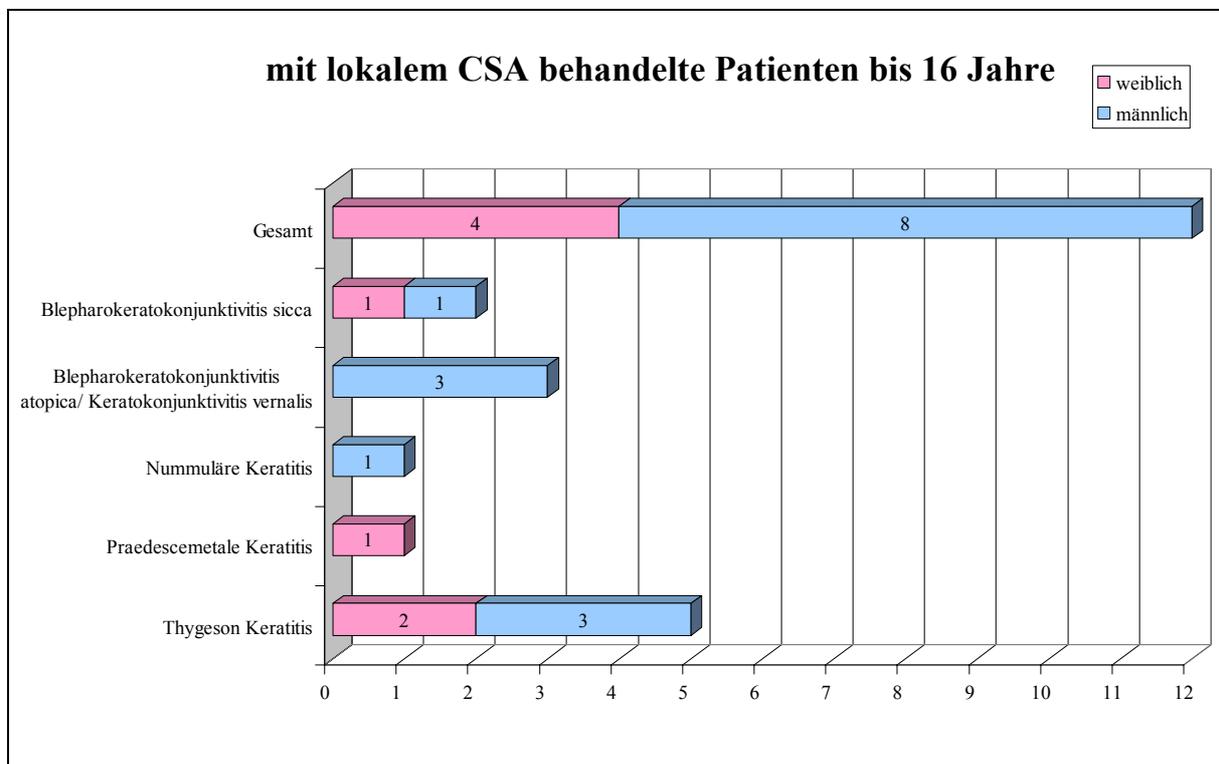


Abb. 3.4. Patienten bis 16 Jahre, die mit lokalem CSA behandelt wurden (aller 71 Patienten)

3.3. Anschreiben

Alle 200 mit lokalem CSA behandelten Patienten erhielten zunächst ein Anschreiben (siehe Anlage 1). Darin wurden sie gebeten, an der retrospektiven Studie teilzunehmen.

In dem Anschreiben wurde auf den persönlichen Behandlungszeitraum mit lokalem CSA hingewiesen, und dass nunmehr eine Untersuchung durchgeführt würde, die die Langzeitsicherheit von lokalem Cyclosporin A prüfen sollte.

Parallel dazu lag dem Anschreiben ein Fragebogen bei, der für die Auswertung der Effektivität und Nebenwirkungen der lokalen Cyclosporin A Therapie bei entzündlichen Erkrankungen der Hornhaut und Bindehaut verwendet wurde (dieser wurde in der parallel verlaufenden Studie ausgewertet).

3.4. Patientenaufklärung

73 Patienten vereinbarten einen Untersuchungstermin in der Düsseldorfer Augenklinik, wobei 71 im Endeffekt an den zytologischen Abstrichen teilnahmen (Tab. 3.1. und Abb. 3.3.). Jeder dieser Patienten wurde in einem persönlichen Gespräch über die Risiken des Bindehautabstrichs (Fremdkörpergefühl am Auge) aufgeklärt und erhielt eine schriftliche Aufklärung. Darin wurde mit einer Unterschrift des Patienten, die Zustimmung zur Teilnahme zu dieser Studie eingeholt (siehe Anlage 2 und 3). Diese Teilnahme war selbstverständlich freiwillig. Weiterhin konnten die Patienten zu jedem Zeitpunkt und ohne Rechtfertigung Ihre Einverständniserklärung zurückziehen. Die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf unter dem Vorsitz von Prof. Dr. med. Lenard begutachtete und bewilligte im Voraus die Studienplanung und Durchführung. Die während der Untersuchung von den an der Studie beteiligten Ärzten erhobenen Daten wurden vertraulich behandelt.

Alle 73 Patienten, bis auf zwei, die nach dem Aufklärungsgespräch aus Angst vor den Nebenwirkungen des Abstrichs nicht einwilligten, erklärten sich einverstanden an der Studie

teilzunehmen und unterschrieben nach dem persönlichen Arztgespräch den Aufklärungsbogen.

3.5. Augenärztliche Untersuchung

Bei der augenärztlichen Untersuchung wurde von jedem Patienten vor dem Bindehautabstrich der best korrigierte Visus ermittelt, der Augeninnendruck mit einem Applanationstonometer nach Goldmann kontrolliert, die Lider, die Bindehaut, die Hornhaut, die Vorderkammer, die Iris und die Linse Spaltlampenmikroskopisch augenärztlich begutachtet. Dabei wurde insbesondere auf Veränderungen der Bindehaut bzw. Hornhaut geachtet, wie sie typischerweise bei einer conjunctivalen intraepithelialen Neoplasie beobachtet werden (vgl. Kapitel 2.5. Oberflächliche epitheliale Tumore der Konjunktiva).

3.6. Bindehautabstrich

Um verdächtige Areale der Schleimhäute zytopathologisch untersuchen zu können, werden zytologische Abstriche mittels eines Bürstchens oder Wattestäbchens abgetragen. Diese Methode hat sich bereits in vielen Fachdisziplinen der Medizin bewährt um Zellen eines Epithels zur zytologischen Untersuchung zu gewinnen [4, 14, 16, 17, 67, 68, 79, 81, 90, 119, 120, 163, 206]. Auch ist man in der Lage maligne Transformationen oraler Präkanzerosen [62, 110, 149, 151, 150, 166] durch den Nachweis von DNA-Histogrammen mit atypischen Stammlinien vorherzusagen [19]. Der zytologische Abstrich von der Bindehaut ist vom Vorgehen dem der anderen ähnlich. Aufgrund der Verhornung lassen sich Abstriche von (feuchten) Schleimhäuten viel einfacher gewinnen und zytologisch beurteilen, als von trockener Haut [46]. Im Wesentlichen hängt der Erfolg zytologischer Untersuchungen von der klinischen Zellenentnahme, der Aufarbeitung, der Ausstrichtechnik, der zytologischen Qualifikation des Untersuchers und der Färbung im Labor ab [46].

Die Bürstenabstriche dieser Studie erfolgten nach abgeschlossener augenärztlicher Untersuchung, an drei standardisierten konjunktivalen Stellen durch einen darin erfahrenen Augenarzt, jeweils an dem mit CSA-Augentropfen behandelten Auge. Dabei wurde ein Spezialbürstchen der Firma Medscan Medical, Accellon[®] Multi, AB, Malmö, Schweden zur zytologischen und DNA-bildzytometrischen Untersuchung in der Cytopathologie des Universitätsklinikums in Düsseldorf verwendet. Zuvor erfolgte die lokale Anästhesie eines jeden mit Cyclosporin A behandelten Auges mit 0,5%igem Proxymetacain-Hydrochlorid Augentropfen, um eventuelle unangenehme Sensibilitätsstörungen der Bindehaut in Form von Bindehautirritationen durch den Bürstenabstrich zu vermeiden. Das Abstrichmaterial wurde jeweils mit einem separaten Bürstchen nasal, kaudal und temporal aus der unteren Bindehaut gewonnen und auf einem gereinigten und fettfreien Glasobjektträger aufgetragen. Das Auftragen des abgestrichenen Zellmaterials geschah in einer Bewegung (Bürste in rollender Bewegung). Dabei wurde darauf geachtet, dass der Abstrich genügend Zellen enthält. Die Zellen wurden möglichst gleichmäßig dünn in einer Schicht ausgestrichen. Die Ausstrichqualität hängt nicht nur von der Ausstrichtechnik, sondern ebenso von der Qualität des Untersuchungsmaterials ab. Beimischungen von Sekret, Blut oder Fibrin sind zu vermeiden [46]. Unmittelbar danach wurde das Präparat, mit alkoholischem Fixierspray der Firma E. Merck, Merckofix[®], Darmstadt, Deutschland aus 20 cm Entfernung fixiert und luftgetrocknet. Die Objektträger enthielten mattierte Endstücke, um darauf mit einem Bleistift Name des Patienten und Nummer des Abstriches aufzubringen. Zur weiteren Diagnostik wurden die Präparate in stabilen kartonierten Umschlägen in die Cytopathologie verschickt. An spaltlampenmikroskopisch bzw. klinisch erkennbaren oder verdächtigen Arealen wurden zusätzliche Bürstenabstriche durchgeführt, um so verdächtige Tumorzellen in der Zytopathologie nicht zu übersehen

3.7. Zytopathologische Untersuchung

3.7.1. Zytopathologie

Die Zytopathologie befasst sich mit dem Aufbau und der Funktion von Zellen. Sie untersucht die Architektur und Aktivität der gesamten Zelle [22, 102]. Da der Trend dahin geht, immer differenziertere Diagnosen an möglichst wenig Gewebe bzw. Zellen zu stellen, gewinnt die Zytopathologie immer mehr an Bedeutung. Ziel ist es, Patienten nur für eine Diagnosestellung nicht speziell ins Krankenhaus aufzunehmen. Werden in einem zytologischen Präparat pathologische Zellen nachgewiesen, gilt es zu klären, ob es sich tatsächlich um Tumorzellen handelt. Liegt eine Entartung vor, stellt sich die Frage nach seiner Dignität (benigne oder maligne) und im Falle eines bösartigen Tumors nach dem Malignitätsgrad (Grading) und nach dem histologischen Typ. Mittlerweile ist klar, dass eine einzige Zelle ausreichen kann, eine zytologische Tumordiagnose zu stellen [46].

Bei der Frage, ob eine Neoplasie vorliegt, wird u.a. auf Kernatypien, wie Kerngrößenzunahme, Verschiebung der Kern-Plasma-Relation, Anisonukleose, Kernpolymorphien, Hyperchromasie, Vergrößerung der Nukleolen oder atypische Mitosen und Chromosomen geachtet [46].

3.7.2. Färbung

Die zytologische Diagnostik bedient sich zahlreicher Färbemethoden. Die gängigsten sind die Färbungen nach Papanicolaou (PapF) und die May-Grünwald-Giemsa (MGG-) Färbung [46]. Daneben werden in der Zytologie noch weitere Färbungen angewendet [155].

Die Papanicolaou-Färbung wurde ursprünglich für die Darstellung der zyklusbedingten Veränderungen des Vaginalepithels entwickelt [132] und wurde später in der gesamten Zytologie angewendet. Ihr Vorteil liegt in der exzellenten Darstellung der Chromatinstruktur der Zellkerne. Die Pap-Färbung eignet sich weniger zur Darstellung von Zytoplasmastrukturen [46].

Sie setzt eine Feuchtfixation der Präparate voraus. Der Nachteil der Pap-Färbung ist ihre begrenzte Haltbarkeit. Besonders wenn sie dem Licht ausgesetzt werden, blassen die Präparate zwar innerhalb weniger Wochen ab, können aber nahezu beliebig nachgefärbt werden, ohne dass Zellgehalt und Beurteilbarkeit darunter leiden [46, 102, 132]. Nach 10-minütiger Fixierung der Abstriche in 96%igem Äthyl- oder 99%igem Isopropylalkohol wird das Präparat zu je einer halben Minute in 96%igem, 80%igem, 60%igem und schließlich 50%igem Äthanol eingetaucht [46]. Daraufhin erfolgt eine Kernfärbung mit Hämatoxin nach Boehmer, gefolgt von Aqua dest. und 0,25%iger Salzsäure (2x kurz eingetaucht). Bevor nun eine erneute Alkoholreihe erfolgt, sollte das Präparat in Leitungswasser gebläut werden. Die nachfolgenden Schritte beinhalten eine Färbung mit Orange G6, ein kurzes zweimaliges Eintauchen in 96%igem Äthanol, sowie eine erneute Färbung mit EA 50. Abschließend wird das Präparat in 96%igem Äthanol und Xylol eingetaucht und eingedeckt [46]. Die Kernfärbung ermöglicht eine zytologische Beurteilung der Kernstrukturen (Größe, Form und Chromatingehalt) zur Festlegung des Karyopyknoseindex (Kernreifung) und zur Karzinomdiagnostik mittels Mikroskop. Die Plasmafärbung macht die Bestimmung des Reifegrades des Zytoplasmas (Eosinophilieindex) aufgrund der Farbveränderung von blaugrün nach rot möglich.

3.7.3. Diagnostische Kriterien der zytopathologischen Untersuchung

Alle zytologischen Präparate werden systematisch und vollständig mäanderförmig durchgemustert. Unabhängig von der Herkunft der Probe wird ein Zytogramm erstellt. Alle Zelltypen werden nach einer 5-stufigen Skala diagnostisch klassifiziert. Die Intra- und Interobserver Übereinstimmung ist nach kurzer Einarbeitungszeit hoch [46]. Gesucht wird u.a. nach Erregern, malignen Zellen und Zeichen anderer Erkrankungen. Insbesondere wird auf Dysplasien, im Sinne von Kerngrößenzunahme, Verschiebung der Kern-Plasma-Relation, Anisonukleose, Kernpolymorphien, Hyperchromasie, Vergrößerung der Nukleolen oder

atypische Mitosen (atypische Anordnung der Mitosespindeln) geachtet. Eine Dysplasie ist definiert als gewebliche und/oder zelluläre Normabweichung, welche zwar verdächtig auf, aber nicht beweisend für ein Malignom ist. Während geringe und mittlere Dysplasien fakultative Präkanzerosen darstellen, sind schwere Dysplasien obligat präkanzerös [22, 46, 102, 122, 151]. Dementsprechend wurden die Diagnose in die Kategorien „Tumorzellnegativ“, „ohne sicheren Nachweis von Tumorzellen (zweifelhaft)“, „mit dringendem Verdacht auf Tumorzellen“ oder „sicher mit Tumorzellen (positiv)“ eingeteilt.

3.8. DNA-bildzytometrische Untersuchung

3.8.1. DNA-Bildzytometrie

Bei der DNA-Bildzytometrie wird die integrierte optische Dichte (IOD) der Zellkerne computergestützt am Mikroskop gemessen. Diese Messung erfolgt interaktiv am Monitor eines mit einem konventionellen Mikroskop gekoppelten, PC-basierten Fernsehbildanalyse-Systems (Firma Carl-Zeiss-Jena, AutoCyte QUIC-DNA[®], USA) nach dem europäischen Standard zur diagnostischen DNA-Bildzytometrie [19]. Das Mikroskop ist mit einer TV-Farb- oder Schwarzweiß-Kamera samt passenden Interferenzfiltern ausgestattet. Personen, die diagnostische DNA-Messungen ausführen, sollten in zytologischer Diagnostik gut ausgebildet sein, da es darauf ankommt, in einer konventionellen Färbung zuvor als diagnostisch relevant erachtete dysplastische oder Tumorzellen in der Feulgen-Färbung wieder zu erkennen. Innerhalb der relevanten Zellpopulation werden, sofern vorhanden, mindestens 300 Zellkerne nach Zufallskriterien gemessen. Eine Ausnahme bildet das gezielte Suchen nach einzelnen Zellen mit einem pathognomonisch erhöhten DNA-Gehalt größer als 9c (1c entspricht der DNA-Menge eines einfachen Chromosomensatzes).

Diese Methode kommt in der Regel bei zytopathologisch verdächtigen und/oder pathologischen Zellen im Mikroskop zum Einsatz, die der Zytopathologe selbst diagnostiziert. Weicht der DNA-Gehalt einer bestimmten Anzahl ausgewählter Zellen von der Norm ab,

beweist dies, dass die vorliegenden Zellen neoplastisch transformiert sind [18, 19, 20, 21, 122].

Derartige Abweichungen beruhen auf einem Verlust oder Gewinn einzelner Chromosomen (chromosomale Aneuploidie), wie sie nur bei Tumoren vorkommen [40].

Schon bevor man Krebs mit herkömmlichen Methoden (histologisch oder zytologisch) am Mikroskop erkennen kann, ist so ein krankhaft veränderter (meist erhöhter) Gehalt an DNA an der Bindehaut zu diagnostizieren. Auch an der Colon- [161], Mund- [62, 110, 149, 151, 150, 166], Bronchial- [4, 16, 79], Cervix-, Vulva-, Vagina- [14, 16, 17, 67, 68, 81, 90, 120, 163, 206] und Kehlkopf-Schleimhaut [119], sowie der Prostata [66] und sogar an der Mamma [176] sind veränderte DNA Gehalte bei Tumoren frühzeitig erkennbar und somit unter anderem zu prognostisch Zwecken nutzbar. Bei allen wird ein von der Norm abweichender Zellkern-DNA-Gehalt in Form von chromosomaler Aneuploidie angenommen. Böcking et al. beschrieben bereits in den 80er Jahren [14, 40, 120, 162], dass die DNA-Aneuploidie nicht nur eine frühere Hilfe für die Diagnose von Neoplasien ist, sondern ihre Ausprägung auch mit der malignen Potenz des entstehenden Malignoms korreliert.

Dagegen sind präkanzeröse Dysplasien, histologische und/oder zytologische Abweichungen von der Norm verdächtig auf, aber nicht beweisend für eine Neoplasie. Veränderungen durch entzündliche (Virusinfekte), degenerative (Nekrosen) oder regenerative Einflüsse werden nicht als Dysplasie bezeichnet. Dabei entsprechen ansteigende Grade epithelialer Dysplasien zunehmenden Wahrscheinlichkeiten, dass sich die betreffende Läsion in ein In-situ- oder später in ein invasives Karzinom weiterentwickelt. Das Ziel der DNA-Zytometrie an Dysplasien eines Epithels ist es, diejenigen Dysplasien zu identifizieren, welche sich zu einem Plattenepithelkarzinom weiterentwickeln werden [19].

Indikationen zur DNA-Zytometrie ergeben sich in der Augenheilkunde bei der Abklärung tumorverdächtiger Flecken der Horn- und/oder Bindehaut, beim Therapie-Monitoring von epibulären malignen Tumoren, als präkanzeröse Diagnostik des Plattenepithels [21] und der Diagnostik des malignen Melanoms der Kornea und/oder Konjunktiva [122].

Klinische Bedeutung kommt dieser Methode insofern zugute, da sie ein preiswertes, schmerzfreies, komplikationsarmes und treffsicheres Verfahren zur Abklärung eines Krebsverdachtes an Horn- oder Bindehaut des Auges darstellt und auch zur Kontrolle des Therapie-Erfolges nach Zytostatika oder Bestrahlung von Tumoren geeignet ist.

3.8.2. Färbung

Die Färbung aller Präparate nach Papanicolaou [132] und die anschließende zytologische Untersuchung wurden im Institut für Cytopathologie unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. med. A. Böcking an der Universität Düsseldorf durchgeführt.

Für die DNA-Bildzytometrie muss eine quantitative Färbung der Zellkern-DNA nach R. Feulgen und Rossenbeck mit Pararosanilin (violett) vorgenommen werden [46, 48]. Diese ist unbedingt notwendig, da eine densitometrische zytologische DNA-Bestimmung wegen der deutlich geringeren bis fehlenden Spezifität bei dem üblicherweise in der Zytologie eingesetzten Kernfarbstoffen wie Haematoxin nicht möglich ist [46]. Diese kann mit einem speziellen Färbeautomaten über Nacht erfolgen. Nach Feulgen (um-)gefärbte Präparate können anschließend zurückgefärbt werden, so dass sie wieder konventionell mikroskopisch beurteilbar sind [19].

Durch saure Hydrolyse werden die Purinbasen der DNS entfernt und die reaktionsfähigen Aldehydgruppen der Desoxyribose freigelegt, welche dann mit dem Schiff'schen Reagens reagieren. Es färbt sich nur die DNS. Die Lichtabsorption durch das Reaktionsprodukt ist ein Maß für die DNS-Menge eines Zellkerns [46].

Der gesamte Präparationsprozess muss standardisiert sein. So muss u.a. die Salzsäurelösung für jede Färbung neu hergestellt werden. Die Färbezeiten müssen genau eingehalten werden. Das Schiff'sche Reagens muss bei Anwendung Zimmertemperatur haben [46].

Im einzelnen wird das mit Delaunay-fixierte Präparat in 4 n Salzsäure (HCl) bei 27,5°C für 55 Minuten im Wasserbad gebadet, bevor es kurz in kaltes Wasser eingetaucht wird, um dann für

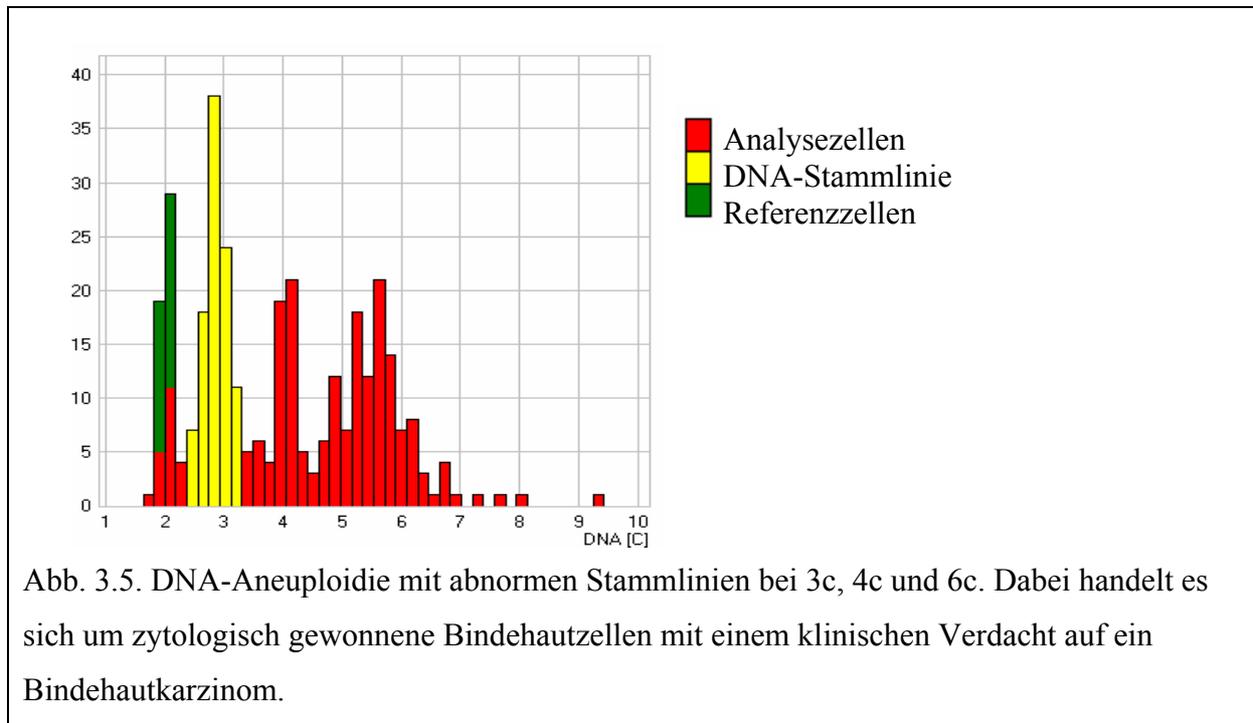
60 Minuten im Schiff'schens Reagens bei Zimmertemperatur zu liegen. Daraufhin taucht man es dreimal zu je 2-5 Minuten in SO₂-Wasser ein, dazwischen wird es jedes Mal unter fließendem Wasser abgespült. Zum Schluss folgt eine aufsteigende Alkoholreihe (Xylol), bevor es endgültig eingedeckelt wird [46].

3.8.3. Diagnostische Kriterien der DNA-bildzytometrischen Untersuchung

Die Messung der integrierten optischen Dichte (IOD) erfolgt automatisch nach Anklicken relevanter Zellkerne mit einer Maus auf dem Monitor. Als Referenzzellen werden zirka 30 im selben Präparat befindliche, morphologisch unauffällige diploide Zellen (zum Beispiel normale Intermediärzellen oder Lymphozyten) gemessen. Eine entsprechende Software wertet die Befunde aus. Aufgrund der integrierten optischen Dichte (IOD) der gesunden Zellen mit ihrem diploidem Chromosomensatz, 2c und der davon abweichenden IOD der zytologisch tumorverdächtigen Zellen, wird ein DNA-Histogramm erstellt [19, 20, 21, 122].

Die Beurteilung der DNA-Histogramme zu diagnostischen Zwecken erfolgt qualitativ in die Kategorien DNA-aneuploid, DNA-polyploid und DNA-diploid, gemäß den im Folgenden illustrierten Grafiken. Die Ordinate des DNA-Histogramms enthält die Anzahl der Zellen mit gleichem DNA-Gehalt (bzw. IOD) und die Abszisse ihren DNA-Gehalt in der Dimension c. Wobei die Farbe grün die physiologischen Referenzzellen, die Farbe gelb die interaktiv markierte DNA-Stammlinie und die Farbe rot die Analysezellen darstellt [21, 122, 20, 19, 18]. *DNA-Aneuploidie* lag vor (Abb. 3.5.), sobald die berechneten Modalwerte einer DNA-Stammlinie um mehr als $\pm 10\%$ von 2c, 4c oder 8c abwichen oder Zellen mit einem DNA-Gehalt von mehr als 9c nachweisbar waren. DNA-aneuploide Zellen weisen auf neoplastisch transformierte Zellen hin und erfordern weitere zytologische oder histologische Untersuchungen [40]. Eine Quantifizierung der DNA-Aneuploidie zum Zwecke der Malignitäts-Gradierung erfolgt bei der Messung von Dysplasien in der Regel nicht, weil eine nicht ausgeschlossene Mitmessung normaler Zellen das Gradierungsergebnis verfälschen

könnte. Nur wenn ausschließlich morphologisch eindeutige Tumorzellen gemessen wurden, darf auch ein "DNA-Malignitätsgrad" bestimmt werden [15].



Ein polyploides DNA-Histogramm spricht für einen eventuellen viralen Infekt, eine vorangegangene Chemotherapie, Bestrahlung oder Regeneration [11, 31]. Es gab daher Anlass für eine weitere Abklärung einer viralen Genese. Abb. 3.6. zeigt eine **DNA-Polyploidie**, bei der Stammlinien innerhalb der Bereiche von 2c, 4c und 8c $\pm 10\%$ vorlagen. Diese kann auch physiologisch z.B. bei erhöhter Zellregeneration vorkommen.

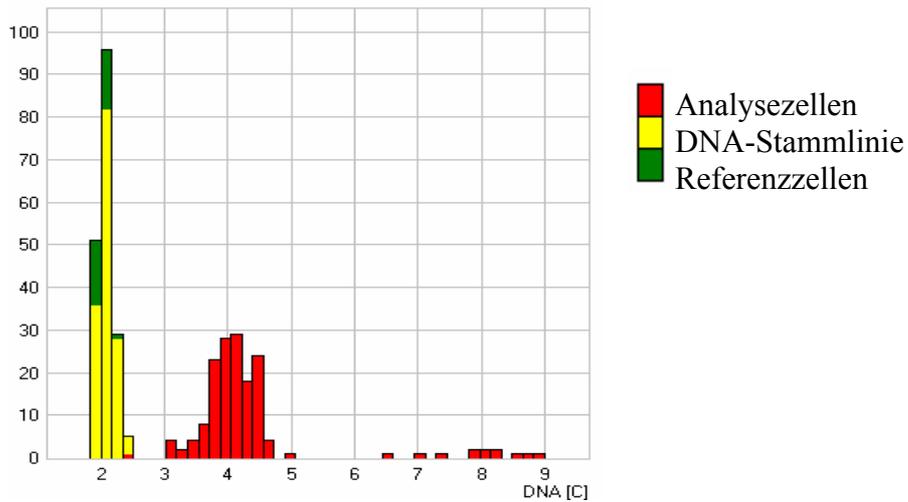


Abb. 3.6. DNA-Polyploidie mit abnormen Stammlinien bei 2c, 4c und 8c. Dabei handelt es sich um zytologisch gewonnene Bindehautzellen nach topischer Mitomycin C und nachfolgender Bestrahlung der Bindehaut.

Liegen Stammlinien innerhalb der Bereiche von 2c und eventuell von 4c $\pm 10\%$, so wurde die Diagnose DNA-diploidie gestellt. Dies gilt als physiologisch. Die Abbildung 3.7. zeigt eine solche physiologische DNA-Diploidie.

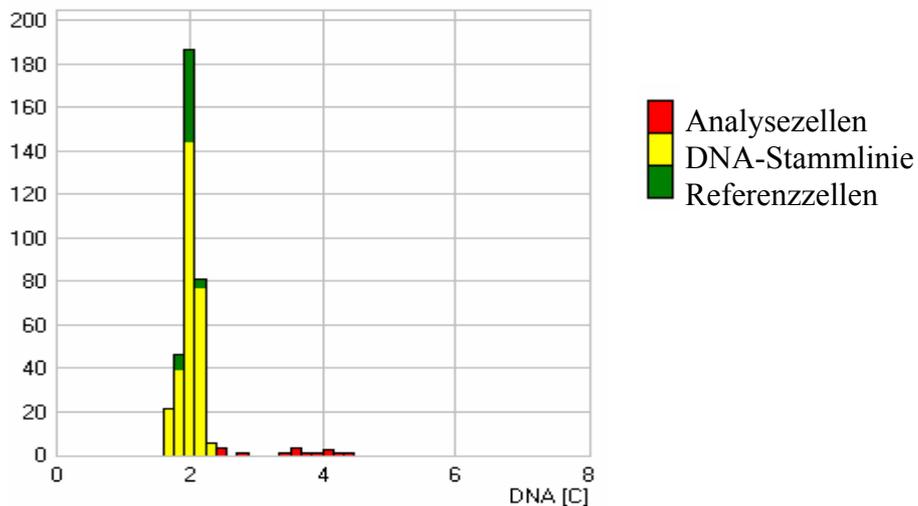


Abb. 3.7. DNA-Diploidie mit Stammlinien bei 2c und 4c. Dabei handelt es sich um zytologisch gewonnene Bindehautzellen eines Patienten mit einer Blepharokeratokonjunktivitis atopica ohne Verdacht auf ein Bindehautkarzinom.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der spaltlampenmikroskopischen Untersuchung

Insgesamt wurden 73 Patienten spaltlampenmikroskopisch untersucht. 2 der 73 zeigten klinische Anzeichen für eine conjunctivale intraepitheliale Neoplasie (vgl. Kapitel 4.3. Kasuistiken). 2 Patienten wollten nach der Untersuchung und Aufklärung über die Nebenwirkungen des Bindehautabstrichs (Fremdkörpergefühl am Auge), diesen doch nicht durchführen lassen. Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich also auf 71 Patienten bzw. 125 Augen (vgl. Kapitel 3.1. Gliederung des Patientenkollektivs und Abb. 3.2.).

4.2. Ergebnisse der Bindehautabstriche

Alle 125 Bindehautabstriche konnten einwandfrei für eine Zytodiagnostik verwendet werden. 123 von 125 Bindehautabstrichen wurden zytologisch als Tumorzell – negativ (unauffällig) bewertet (Tab. 4.1. und 4.2.).

Ein „zweifelhafter“ Abstrich stammt vom rechten Auge eines 50jährigen Patienten mit der klinischen Diagnose einer Blepharokeratokonjunktivitis atopica (Kapitel 4.3.1. Kasuistik Patient 1). Dieser zeigte im Oktober 2002 zytologisch eine geringe Dysplasie, bei der sich in der DNA-Bildzytometrie eine DNA-Aneuploidie zeigte, woraus sich der Verdacht auf das Vorliegen einer Bindehautneoplasie im Sinne einer schweren Dysplasie bzw. eines Carcinoma in situ ergab. Ein weiterer nicht negativer Abstrich stammte vom 25. Oktober 2000 (Patient 2 ebenfalls vom rechten Auge, Kapitel 4.3.2. Kasuistik Patient 2) und zeigte in der zytologischen Untersuchung mit der Kategorie „sicher Tumorzell – positiv“ ein Carcinoma in situ des Plattenepithels, das sich in der DNA-Bildzytometrie durch den Nachweis einer DNA-Aneuploidie bestätigte.

Die nachfolgenden Tabellen 4.1. (für linkes Auge) und 4.2. (für rechtes Auge) zeigen die Anzahl der Bindehautabstriche, die Anzahl der zytologisch auffälligen Ergebnisse, sowie die

Anzahl der DNA-aneuploiden Präparate. Das grau schraffierte Feld in der Tab. 4.2. mit der klinischen Diagnose „Blepharokeratokonjunktivitis atopica“ verweist auf die beiden zytologisch auffälligen bzw. DNA-aneuploiden Proben.

klinisch gestellte Diagnosen	Abstrich links		
	Anzahl	zytologisch auffällig	DNA-aneuploid
Ulcus Mooren	3	0	0
Thygeson Keratitis	13	0	0
Rosazea Keratokonjunktivitis	1	0	0
Rheumatische Erkrankung	1	0	0
Praedescemetale Keratitis	2	0	0
Nummuläre Keratitis	24	0	0
Keratokonjunktivitis vernalis	2	0	0
Varizella-Zoster-Keratitis		0	0
Blepharokeratokonj. atopica	5	0	0
Blepharokeratokonj. sicca	11	0	0
Gesamt	62	0	0

Tab. 4.1. Ergebnisse der Abstriche des linken Auges

klinisch gestellte Diagnosen	Abstrich rechts		
	Anzahl	zytologisch auffällig	DNA-aneuploid
Ulcus Mooren	1	0	0
Thygeson Keratitis	14	0	0
Rosazea Keratokonjunktivitis	1	0	0
Rheumatische Erkrankung	1	0	0
Praedescemetale Keratitis	0	0	0
Nummuläre Keratitis	25	0	0
Keratokonjunktivitis vernalis	2	0	0
Varizella-Zoster-Keratitis	2	0	0
Blepharokeratokonj. atopica	6	2	2
Blepharokeratokonj. sicca	11	0	0
Gesamt	63	2	2

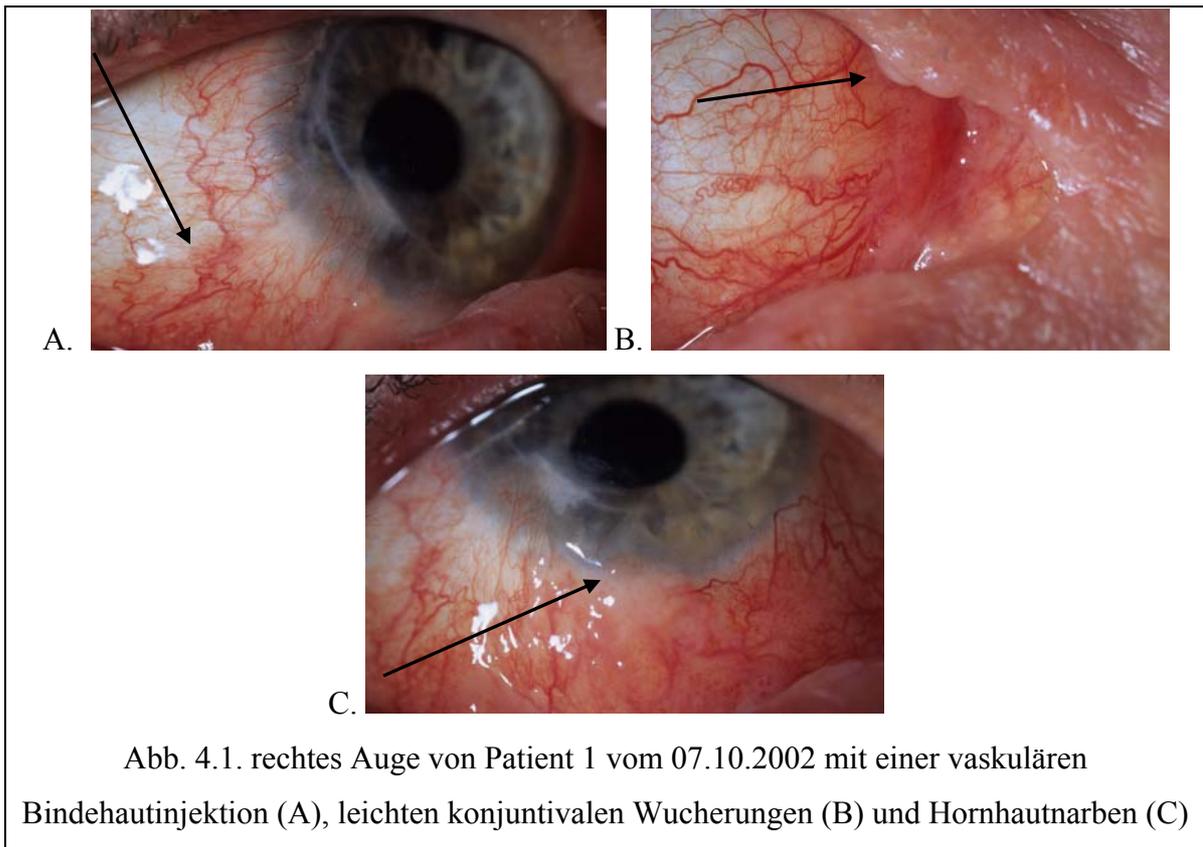
Tab. 4.2. Ergebnisse der Abstriche des rechten Auges

4.3. Kasuistiken

Im Folgenden werden zwei Studienpatienten näher beschrieben, die ein Bindehautkarzinom aufweisen. Alle beide erhielten im Rahmen einer Blepharokeratokonjunktivitis atopica auch lokales Cyclosporin A, was den Verdacht aufkommen lies, dass das Bindehautkarzinom (bei Atopikern) durch lokales Cyclosporin A begünstigt werden könnte.

4.3.1. Kasuistik Patient 1, männlich 50 Jahre

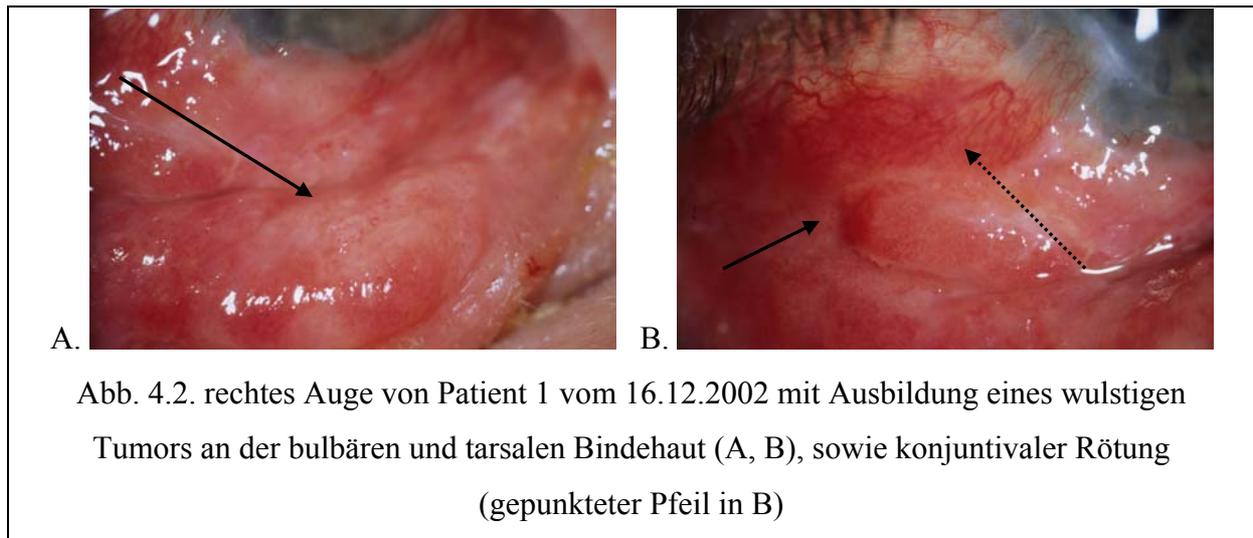
Der Atopiker mit Asthma bronchiale stellte sich in der Augenklinik der Universität Düsseldorf mit bereits erfolgter Keratoplastik rechts aufgrund einer Keratopathia atopica in Trier im Februar 1997 vor. Im Mai 1997 wurde eine erneute Re-Keratoplastik à chaud bei Transplantations-Ulkus durchgeführt. Die Blutplasmaspiegel des systemischen CSA waren bei Aufnahme mit einer Dosis von 150 mg CSA zweimal täglich zu hoch eingestellt, so dass eine Reduktion auf 2 x 100 mg und im August 1997 nochmals auf 2 x 75mg systemisches CSA angestrebt wurde. Im Januar 1999 bei einem Z.n. Cataract-OP rechts, wurden unter stationären Blutspiegelkontrollen zu niedrige CSA-Blutwerte festgestellt, so dass daraufhin die systemische CSA Dosis nochmals auf 2 x 125mg erhöht wurde. Im März 1999 erfolgte ein Ausschleichversuch des systemischen CSA und gleichzeitig wurde die lokale CSA-Augentropfentherapie mit 1% 3 x täglich rechts und links begonnen. Im Mai 2000 wurde am linken Auge ein physiologischer Augeninnendruck diagnostiziert. Trotzdem entwickelte der Patient im Oktober desselben Jahres ein PEX-Glaukom. Am 07. Oktober 2002 konnten am rechten Auge erhebliche Bindehautveränderungen am unteren Fornix, an der bulbären und tarsalen Bindehaut erkannt werden (Abb. 4.1.). Die zytologische Untersuchung zeigte Bindehautepithelien mit geringen Dysplasien, die sich in der DNA-Bildzytometrie als DNA-aneuploid mit dem dringenden Verdacht auf ein Vorliegen einer Bindehautneoplasie im Sinne einer schweren Dysplasie bzw. eines Carcinoma in situ herausstellten.



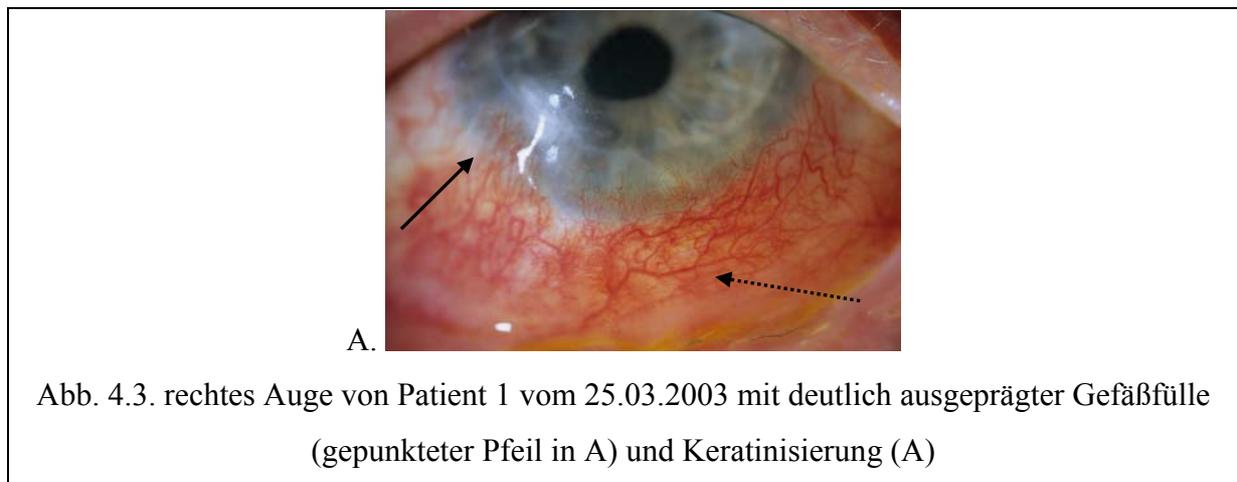
Daraufhin wurde das lokale CSA (insgesamt 1425 Tage, mehr als 4 Jahre), die Protopic Therapie abgesetzt, sowie eine Biopsie durchgeführt. Histologisch wurde ebenfalls ein Carcinoma in situ diagnostiziert.

Einige Wochen später, am 30. Oktober 2002 zeigten sich im Bindehautabstrich der rechten Bindehaut in der zytologischen Untersuchung Bindehautepithelien mit mittleren Dysplasien. Die DNA-Bildzytometrie zeigte eine DNA-Aneuploidie als Zeichen für eine maligne Transformation der Zellen.

Eine am 18. Dezember 2002 durchgeführte zytologische Untersuchung zeigte ein Zellbild, das einem Carcinoma in situ des Plattenepithels entspricht. Die DNA-Bildzytometrie ergab eine DNA-Aneuploidie und die gleichzeitig durchgeführte Histologie bewies ein invasives Karzinom, dessen vollständige Resektion nicht möglich war. Die daraufhin eingeleitete Radiatio der gesamten bulbären und tarsalen Bindehaut mit 25 x 2 Gy bei 50kV verlief komplikationslos.



Im März 2003 erhielt der Patient zur Vermeidung einer ausgeprägten Keratinisierung all trans Retinsäure in niedriger Dosierung (0,05% alle drei Tage). Die Zytologie vom 26. März 2003 ergab einen dringenden Verdacht auf das Vorliegen von Tumorzellen, der sich in der DNA-Zytometrie bestätigte.

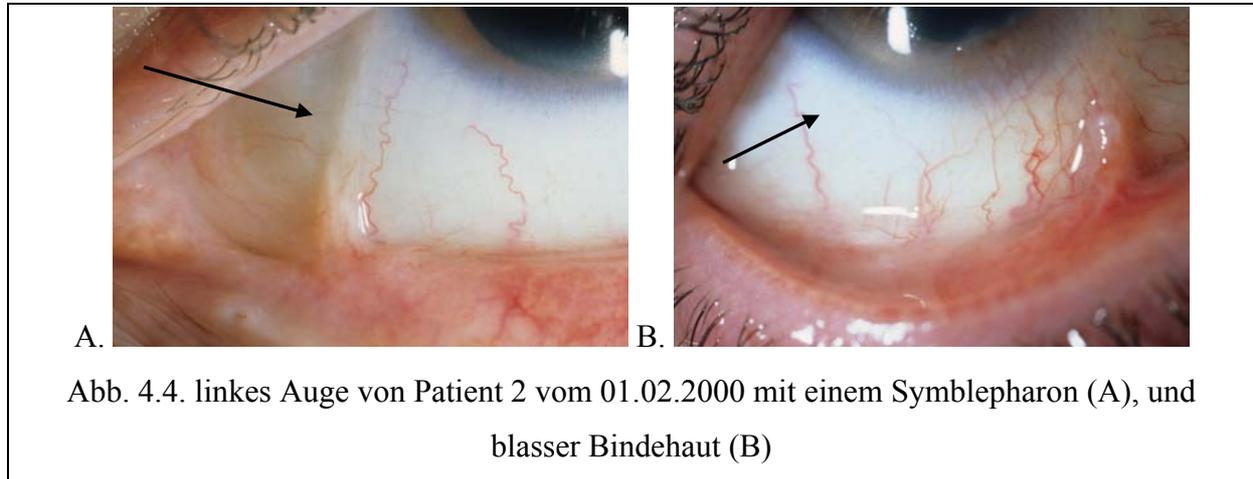


Allerdings zeigte ein 3 Monate später durchgeführter Kontrollabstrich im Juni 2003 nur noch strahleneffektbedingte Entzündungen ohne einen Nachweis einer DNA-Aneuploidie.

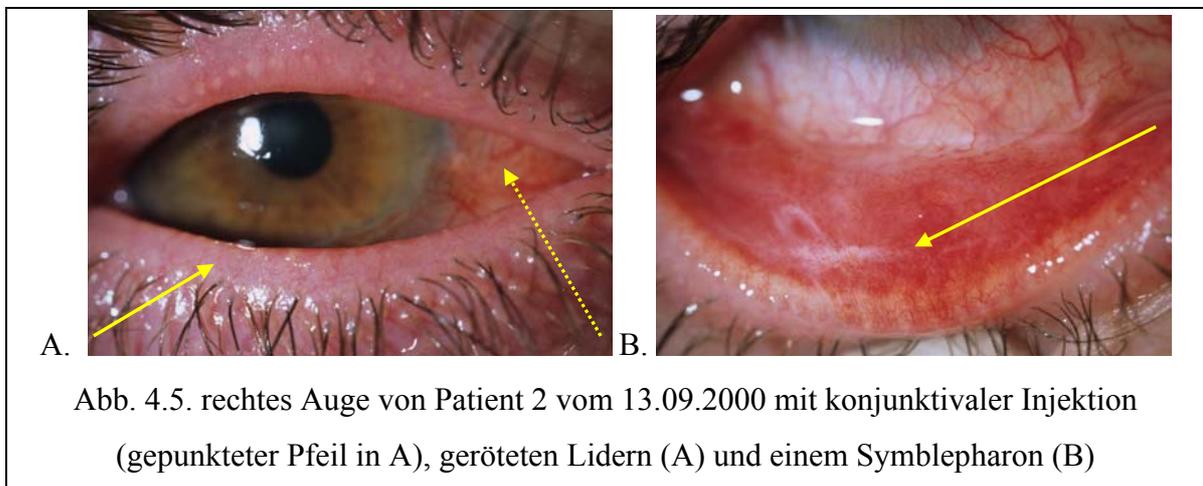
Im Oktober 2003 konnten wieder klinisch atopische Veränderungen erkannt werden, die aber nicht mit der Zytologie korrelierten. Im März des nächsten Jahres wurde die Fornix als klinisch auffällig beurteilt, wobei die Zytologie ein regressives, chronisch entzündliches Bild darstellte.

4.3.2. Kasuistik Patient 2, weiblich 42 Jahre

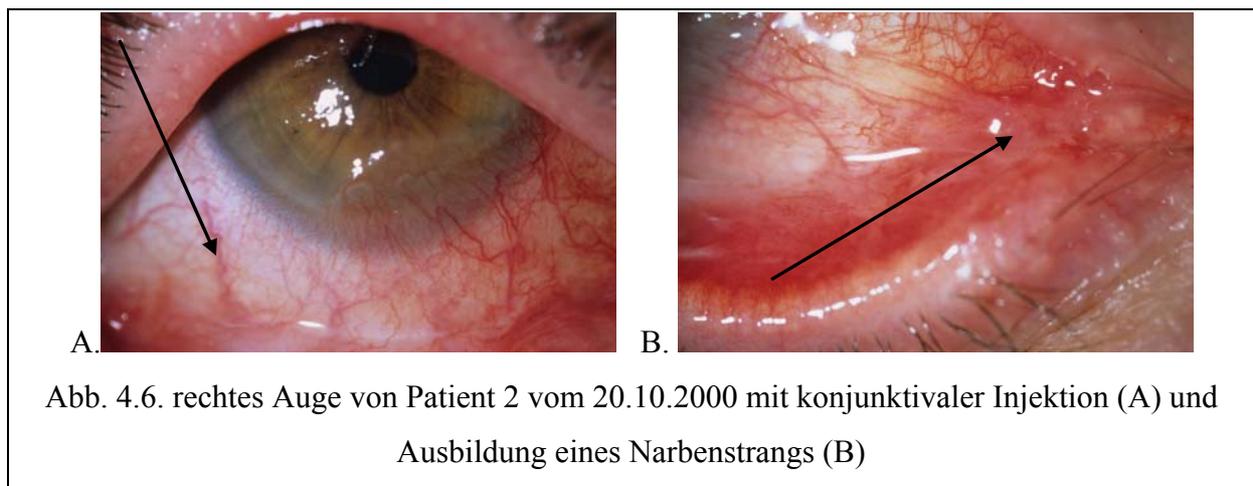
Die Patientin stellte sich 1997 mit einem Bindehautpapillom am rechten Auge (Chlamydien negativ, HPV positiv) vor, das in der Universitätsklinik Münster behandelt wurde. Im Februar 2000 wurde der V.a. ein beidseitiges oculäres Pemphigoid gestellt (Abb. 4.4).



Die Probeentnahme am rechten Auge zeigte in der Histologie zwar keinen eindeutigen Pemphigoidnachweis, trotzdem wurde eine systemische Mycophenolatmofetil (MMF) Therapie 3 x 1g täglich angesetzt [23, 148, 43, 112, 139a, 148]. Im Juni 2000 äußerte die Patientin zunächst eine Besserung, jedoch kurz darauf im September 2000 eine subjektive Verschlechterung ihrer Symptomatik, sodass die MMF Therapie am 13.09.2000 abgesetzt und stattdessen CSA-Augentropfen 1% 3 mal täglich nur am rechten Auge angeordnet wurden (Abb. 4.5. zeigt das rechte Auge am Anfang der lokalen CSA-Therapie).



Ein Monat später kam es zu einer klinischen Verschlechterung, sodass 6 Wochen später (insgesamt 79 Tage topisches CSA) die CSA-Augentropfen ausgeschlichen und stattdessen FK-506 (Takrolimus) angeordnet wurde (Abb. 4.6. zeigt das rechte Auge am Ende der lokalen CSA-Therapie). Der Bindehautabstrich zeigte am 25. Oktober 2000 in der zytologischen Untersuchung ein Carcinoma in situ des Plattenepithels, sowie in der DNA-Bildzytometrie eine DNA-Aneuploidie.



Die am 24. November 2000 erneut durchgeführte DNA-Bildzytometrie ergab eine DNA-Aneuploidie. Damit bestätigte sie die zytologische Diagnose vom 14. November 2000 „böartige Zellen wahrscheinlich“. Die Probeexzision im Januar 2001 ergab in der Histologie ein multifokales Carcinoma in situ der Bindehaut. Am 15. März 2001 wurden vier Mitomycin 0.02% Augentropfen 4x/Tag über 14 Tage angesetzt, mit jeweils 14 Tagen Pause dazwischen [32, 172].

Am 27. April 2001 ergab die zytologische Untersuchung, dass böartige Zellen nicht sicher auszuschließen seien (= zweifelhafter Befund). Die DNA-Bildzytometrie zeigte eine typische Verteilung, wie sie nach Mitomycin Therapie vorliegen kann [31], sodass DNA-bildzytometrisch kein sicherer Anhalt für Malignität zu finden war.

In den weiteren Monaten besserte sich der klinische Zustand der Augen immer mehr. Auch die Patientin äußerte im Mai 2002 eine subjektive Besserung.

5. Diskussion

Zur Langzeitbehandlung der unter Kapitel 2.3. genannten Krankheiten, existiert momentan keine dauerhaft verträgliche Alternative zu CSA-Augentropfen. In der vorliegenden Studie soll geprüft werden, wie sicher, im Hinblick auf eine mögliche Kanzerogenität, die Behandlung mit Cyclosporin A ist. Daraus soll auf eine Zeitspanne eines Kontrollintervalls für diese chronischen Erkrankungen der Binde- und Hornhaut geschlossen werden.

Dabei wurden klinische und zytologische bzw. DNA-zytometrisch Kontrollen durchgeführt, um die Sicherheit von lokalem Cyclosporin A, bei entzündlichen Erkrankungen von Hornhaut und Bindehaut, zu überprüfen. Hierbei bedienten wir uns der klinischen Untersuchung, sowie zytologisch ausgewerteter Bindehautabstriche, die an den mit CSA behandelten Augen durchgeführt wurden. Mit dieser Strategie sollte eine hohe Sensitivität sowohl für die Diagnose früherer, als auch für fortgeschrittener Neoplasien der Horn- und Bindehaut gewährleistet sein.

5.1. Diskussion Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv stellt eine heterogene Gruppe dar. Alle 73 Patienten wurden lediglich danach ausgewählt, ob sie CSA-Augentropfen an der Augenklinik der Universität Düsseldorf erhalten haben. Es wurde Wert auf eine hohe Compliance und eine Therapiedauer von mindestens sechs Wochen gelegt. Weitere Aufnahmekriterien wurden nicht gestellt. Divergenzen gab es daher im Patientenalter, in der lokalen CSA-Therapiedauer, in der ophthalmologischen Diagnose und der damit verbundenen zusätzlich (Vor-) Behandlung, sowie in einer unterschiedlichen Komorbidität und Medikamenteninteraktion.

5.2. Diskussion Methodik

5.2.1. Diskussion Bindehautabstrich

Bei 71 Patienten konnte ein Bindehautabstrich gewonnen werden. Dabei erfolgte dieser stets nach dem gleichen Schema und an standardisierten Stellen der Bindehaut. Zunächst könnte der Gedanke aufkommen, dass grundsätzlich nur oberflächliche Zellen der Bindehaut erfasst wurden und sich eventuell tiefer sitzende Zellen dem Nachweis entziehen. Dabei sollte aber bedacht werden, dass die Regenerationszeit des Bindehaut- und Hornhaut-Epithels nur wenige Wochen dauert, das heißt dass die Zellen der Parabasalschicht in dieser kurzen Zeit an die Oberfläche gelangen [46, 102]. Auch gewinnt die Abrasion des Epithels mit einer Bürste meist nicht nur oberflächliche Zellen, sondern auch Zellen mittlerer Schichten. Selbst wenn der Bindehautabstrich nur Superfizialzellen entnehmen würde, wären auch diese repräsentativ für das ganze Epithel, da sich die Parabasalzellen innerhalb weniger Wochen über Intermediär- zu Superfizialzellen weiterentwickelt haben [46, 102]. Dabei ändern sie lediglich ihre Zytoplasmadifferenzierung, nicht aber ihren Zellkern, anhand dessen im Wesentlichen zytologische und DNA-zytometrische Diagnosen gestellt werden können. „Tief sitzende Zellen“ entziehen sich daher insofern meist nicht der zytologischen Diagnose, weil sie nach zwei bis drei Wochen an der Bindehautoberfläche angekommen sind. Unterhalb der Basalmembran entwickeln sich aber keine Karzinome [46]. Dorthin gelangen sie erst, nachdem sie das in-situ-Stadium, das mehrere Jahre dauern kann, durchlaufen haben [30]. In diesem sind sie zytologisch auch in Abstrichen bestens zu diagnostizieren.

Wenn es sich anders verhalten würde, könnte auch die zytologische Diagnostik des Gebärmutterhalskarzinoms und des Krebses an der Mundschleimhaut nicht funktionieren. Für diese hat Dr. med. T. Remmerbach in Leipzig in seiner aktuellen Habilitationsschrift an 490 Patienten zusammen mit der DNA-Bildzytometrie eine Sensitivität von 98,4 % und eine Spezifität von 99,3 % ermittelt [149, 151, 190].

Die Sensitivität einer möglichen histologischen Biopsiediagnose ist in der Regel nicht viel besser als die eines Bindehautabstrichs (98,2 %) [150, 166]. Andererseits ist diese auch nicht bei entzündlichen Erkrankungen als diagnostisches Mittel der Wahl indiziert. Sie kommt erst bei bösartigen Erkrankungen als diagnostisch-therapeutische Maßnahme zum Einsatz (Exzisionsbiopsie). Ein Abstrich ist dagegen weniger invasiv und schneller durchführbar als eine Bindehautbiopsie.

Vergleicht man nicht zuletzt die Kosten eines Bindehautabstrichs gegenüber einer Bindehautbiopsie, so ergibt sich nach dem gesetzlich festgelegten einheitlichen Bewertungsmaßstab (EBM) von 2005 [41] ein Preis von 20,22 Euro für den Bindehautabstrich mit zytologischer Untersuchung und für die Exzision mit nachfolgender histologischer Untersuchung einer Bindehautläsion ein Betrag von 42,25 Euro. Auch nach der Gebührenordnung für Ärzte (GOÄ) von 2005 [77] zeigt sich, dass der Bindehautabstrich mit zytologischer Untersuchung um mehr als die Hälfte preiswerter ist (Tab. 5.1.).

Untersuchungsbereich	Zytologie (Bürstung)	Histologie (Biopsie)
Abklärung eines Tumorverdacht von der Bindehaut des Auges	Abstrich: 11, 53 €	Anästhesie: 12, 84 €
	Zytologie: 18,26 €	Exzision: 20, 38 €
		Wundversorgung: 17,43 €
		Histologie: 29,09 €
	Insgesamt: <u>29,79 €</u>	Insgesamt: <u>79,74 €</u>

Tabelle 5.1. Kostenvergleich Bürstung – Biopsie, GOÄ 2,3facher Punktwertsatz [77]

5.2.2. Diskussion Zytopathologie

Die zytologische Diagnostik konnte sich schon mehrmals als objektive und sichere Methode zur Untersuchung der Bindehaut etablieren [31, 32, 122]. Die Abfassung zytopathologischer Diagnosen unterliegt den gleichen Prinzipien und Regeln wie die histopathologische Diagnostik. Es werden die gleichen Ordnungsprinzipien, Termini und Klassifikationen verwendet. Die Diagnosen werden auf die prospektiven, histologischen Diagnosen ausgerichtet. Da für die zytologische Diagnostik meist nur ein Bruchteil des Zell- und

Gewebematerials, verglichen mit der Histologie, zur Verfügung steht und die gewebliche Verbandstruktur als wesentliche Informationsquelle fehlt, sind in der Regel die Möglichkeiten zur histologischen Tumorklassifikation und zur Typisierung von Entzündungen aufgrund morphologischer Kriterien allein in der Zytologie begrenzt [22, 46]. Die Dignitätsbeurteilung (liegen maligne Zellen vor oder nicht?) stellt die häufigste und wesentlichste Aufgabe der Zytologie dar, was in den meisten Fällen zur Planung des weiteren Vorgehens auch ausreichend ist (Vorfelddiagnostik) [22, 46, 102]. In Abhängigkeit von der Qualität und der Menge des eingesandten Zellabstrichs (Materials), sowie dem Ausmaß der Zellveränderungen, ist aber oft eine eindeutige Dignitätsbeurteilung aufgrund zytologischer Kriterien alleine nicht möglich. Daher kann eine Zellpopulation auch diagnostisch als „zweifelhaft“ oder „dringend verdächtig auf das Vorliegen von Tumorzellen“ klassifiziert werden. Dies gilt vor allem dann, wenn nur sehr wenige Zellen zur Verfügung stehen oder diese wegen eines schlechten Erhaltungszustandes bzw. einer schlechten Fixierung nicht mit hinreichender Sicherheit zu beurteilen sind [22, 46]. Ein weiterer Grund dafür, dass nur der Verdacht auf das Vorliegen von bösartigen Zellen geäußert werden kann, ist das Vorliegen von Dysplasien. Eine Dysplasie ist definiert als gewebliche und/oder zelluläre Normabweichung, welche zwar verdächtig auf, aber nicht beweisend für Krebs ist. Während geringe und mittlere Dysplasien fakultative Präkanzerosen darstellen, sind schwere Dysplasien obligat präkanzerös. Dementsprechend ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich eine mittlere Dysplasie in Krebs weiterentwickelt, gering, bei einer schweren Dysplasie ist sie aber relativ hoch. Es macht daher Sinn, eine mittlere Dysplasie der diagnostischen Kategorie „zweifelhaft“, eine schwere Dysplasie dem „dringenden Verdacht“ zuzuweisen. Speziell die DNA-Bildzytometrie kann eine genauere Diagnose stellen als „dysplastisch veränderte Zellen“, wie sie histopathologisch oft nur gestellt werden kann [122, 151]. Etablierte Nomenklaturen der zytopathologischen Diagnostik bieten daher zusätzlich zu einer Klartextdiagnose der vorliegenden Zellpopulation eine Stufung ihrer

Malignitätswahrscheinlichkeit an (z.B. keine Tumorzellen = negativ, ohne sicheren Nachweis von Tumorzellen = zweifelhaft, mit dringendem Verdacht auf Tumorzellen oder mit Tumorzellen = positiv). Allerdings geht dieser nicht auf die Unterscheidung von bösartigen und gutartigen Tumorzellen ein [22, 46].

Der diagnostische Befund des Zytopathologen gliedert sich wie ein histologischer Befund in einen exakt beschriebenen Typ und Art des eingesandten Untersuchungsmaterials (hier Bindehautzellen), die klinische Fragestellung des Augenarztes, eine detaillierte Deskription der Zellbilder und schließlich eine Klartextdiagnose unter Verwendung der gängigen Termini. Histologische und zytologische Kriterien der Dysplasie sind zwar weitgehend unterschiedlich, beschreiben aber nur verschiedene Aspekte derselben Läsion. Daher sollte beispielsweise der zytologischen Diagnose mittelgradig dysplastischer Zellen auch histologisch eine mittelgradige Dysplasie des Epithels entsprechen [22, 46]. Meistens ist es morphologisch schwierig zu entscheiden, ob sich die betreffende Dysplasie zurückbildet oder zu einem Karzinom fortschreiten wird. So gibt es auch unter erfahrenen Histopathologen der Universität von Wales, England, eine unbefriedigende Übereinstimmung der Dysplasiegradierung an Biopsien der Cervix uteri [90]. So konnten bei der Sicherheit der Unterscheidung zwischen reaktiven Veränderungen und geringen Dysplasien gravierende Unterschiede erkannt werden. Wie schwer es also Pathologen fällt reproduzierbar mikroskopische Dysplasie Diagnosen zu stellen, zeigten Ismail et al 1990. Sie fanden heraus, dass insbesondere niedriggradige cervicale intra-epitheliale Neoplasien (CIN 1 und 2) wenig, höhergradige cervicale intra-epitheliale Neoplasien (CIN 3) viele und invasive Karzinome exzellente Übereinstimmungen unter verschiedenen Histopathologen zeigten [90].

5.2.3. Diskussion DNA-Zytometrie

Die beiden zytologisch nicht negativen Befunde wurden mittels der DNA-Zytometrie abgeklärt. In beiden Fällen ergab sich DNA-Aneuploidie, als Marker für eine maligne

Transformation des Plattenepithels. Bereits Anfang der 80er Jahre wurde gezeigt, dass die DNA-Bildzytometrie an Zellen der Lunge [4], des Larynx [13a] oder der Cervix uteri [32a] deutlich früher krebserkrankte Zellen erkennen kann als dies in der Histopathologie möglich ist. Voraussetzung dafür ist die Annahme, dass die meisten Krebse auch mit DNA-Veränderungen in den Zellkernen einhergehen. Davon gehen Duesberg und Li von der Universität Kalifornien [40] in Ihrer Veröffentlichung von Juni 2004 aus. Darin stellen sie die Theorie auf, dass die meisten Zellen einer DNA-Veränderung (in Form einer chromosomalen Aneuploidie) unterliegen, wenn sie maligne entarten. Die diagnostische DNA-Zytometrie unterliegt standardisierten Prinzipien und Regeln, welche in vier Consensus Reports der European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) dokumentiert sind [13, 15, 63, 72, 73, 74]. Die meisten Tumore, auch gutartige, zeigen von den übrigen Körperzellen abweichende numerische und/oder strukturelle Chromosomenaberrationen, welche nicht in normalen oder reaktiv veränderten Zellen vorkommen [162]. So konnte gezeigt werden, dass sich in allen in situ- und invasiven Gebärmutterhalskarzinomen derartige chromosomale Aneuploidien finden lassen. Auch Plattenepithelkarzinome der Bronchial-, Kehlkopf-, Mund- und Pharynxschleimhaut, sowie der Haut weisen DNA-Aneuploidien auf. Typische Chromosom-1-Aberrationen werden nur in denjenigen zervikalen Dysplasien gefunden, welche sich zu morphologisch manifestem Karzinom weiterentwickelten [120]. Diejenigen Dysplasien sind daher obligat präkanzerös, welche die beim Karzinom anzutreffenden und in normalen oder reaktiv veränderten Plattenepithelien nicht vorkommenden chromosomalen Aberrationen aufweisen. Dem Nachweis chromosomaler Aneuploidie kommt damit die Funktion eines Markers für neoplastische Transformationen der Zelle zu.

Für die Routine-Tumordiagnostik sind zytogenetische Untersuchungen bezüglich Chromosomen-Aberrationen aber zu aufwendig. Daher bietet sich alternativ an, den Nettoeffekt der chromosomalen Aberrationen auf den DNA-Gehalt der Zellkerne als diagnostischen Marker zu nutzen. DNA-Aneuploidie ist das quantitative zytometrische

Äquivalent chromosomaler Aneuploidie nicht nur in Plattenepithelien [81, 206]. Die Nichtnachweisbarkeit von DNA-Aneuploidie schließt Malignität aber nicht aus, da wenige Tumore so geringe Aberrationen zeigen, dass sie keinen DNA-zytometrisch nachweisbaren Effekt haben. Diese Befunde stellen die Grundlage für die Hypothese dar, dass diejenigen plattenepithelialen Dysplasien obligate Präkanzerosen darstellen, welche DNA-Aneuploidie aufweisen.

Die große Bedeutung der Bürsten (Brush)-Biopsie liegt in der Anwendung bei Läsionen, die der Untersucher klinisch als „nicht malignomverdächtig“ einschätzt und bei der daher zunächst eine klinische Verlaufkontrolle erfolgt. Durch die recht hohe Sensitivität können klinisch falsch negativ bewertete Läsionen zu einem großen Anteil durch zytologische Verfahren identifiziert werden.

Die Spezifität der DNA-Bildzytometrie liegt nahezu bei 100%, die Sensitivität bei 98% [31, 32, 122, 150]. So suchte 2002 auch die Arbeitsgruppe um Herrn Dr. med. T. Remmerbach der Klinik für Mund-, Kiefer-, Gesichts- und Plastische Chirurgie an der Universität Leipzig nach einer Methode, mit der sich auf eine einfache Art und Weise Zellen aus dem Mund-Rachen-Raum entnehmen lassen und bereits im Frühstadium ausreichend sicher eine bösartige Tumorerkrankung diagnostiziert werden kann [190]. Der Mediziner griff auf eine schon in den 50er Jahren beschriebene Methode zurück, wie sie der Frauenarzt seit längerem bei der Früherkennung des Gebärmutterhalskrebses anwendet und die auf die Belange des Zahnarztes bzw. Kieferchirurgen abgestimmt wurde: der Abstrich der Mundschleimhaut. Das Verfahren wurde in den 70er Jahren nach seiner Prüfung in verschiedenen Kliniken wegen der sehr stark variierenden Untersuchungsergebnisse und der nach Meinung einiger Mediziner nicht ausreichenden Treffsicherheit, entartete Zellen zu entdecken, zunächst verlassen.

Remmerbach fand 2002 heraus, dass die von Untersucher zu Untersucher schwankenden Ergebnisse auf die Entnahmetechnik der erkrankten Zellen zurückzuführen waren. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, müssen also Zahnärzte in die Entnahme- und

Ausstrichtechnik eingewiesen werden. Daher werden die Bindeabstriche auch von einem darin erfahrenen Augenarzt durchgeführt, bevor der Zytopathologe sie untersucht. Durch eine Kombination beider Verfahren, der zytologischen Untersuchung und der DNA-Zytometrie, lässt sich die Treffsicherheit und Reproduzierbarkeit zur Erkennung entarteter Zellen von 94% durch die alleinige Zytologie, auf 98,6% mit zusätzlicher DNA-Zytometrie erhöhen [149, 150, 151, 190]. Auch hier wurde eine DNA-Zytometrie nur bei unsicherer Dignität durchgeführt. Eindeutig negative zytologische Ergebnisse werden in der Regel nicht zusätzlich einer DNA-Zytometrie unterzogen [46].

Weiterhin werden zur Gewährleistung einer präzisen DNA-Zytometrie von der European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) detaillierte Testmessungen vorgeschlagen, mitsamt der Richtwerte der Messpräzision, die einzuhalten sind [20, 63, 72, 73]. Der Variationskoeffizient der DNA-Gehalte der jeweiligen Referenzzellpopulationen soll z.B. weniger als fünf Prozent betragen [20, 63, 72, 73]. Diese sind regelmäßig vom Nutzer zu kontrollieren, um eine hohe Präzision des Meßvorgangs zu gewährleisten.

5.3. Diskussion Kasuistiken

Zwei der insgesamt 71 untersuchten Patienten zeigten tumorzellverdächtige Veränderungen im Abstrich. Beide litten an einer Blepharokeratokonjunktivitis atopica. Komplexe Krankengeschichten und daraus resultierende Medikamenteninteraktionen erschwerten die systematische Bewertung.

Der 50jährige *Patient 1* applizierte 1425 Tage am rechten Auge insgesamt 3705 CSA-Augentropfen, erhielt aber zusätzlich von Februar 1997 bis März 1999 systemisches CSA (zunächst mit einer zu hoch eingestellten Dosis von 150 mg CSA zweimal täglich). Dass systemisches CSA Malignome begünstigen kann, auch Bindehautkarzinome [109], wird schon seit längerem diskutiert [34, 53, 91, 94, 101, 111, 124, 159, 179]. Die 42jährige *Patient 2* tropfte 79 Tage am rechten Auge insgesamt 237 CSA-Augentropfen, erhielt aber zuvor von

Februar bis September 2000 systemisches Mycophenolatmofetil (MMF) dreimal täglich 1g. Nach 79 Tagen wurden die CSA-Augentropfen ausgeschlichen und FK-506 (Takrolimus) angeordnet. Die Fachinformation von Mycophenolatmofetil, CellCept[®] der Firma Roche[®] [154a] vom 09.11.2001 verweist auch hier auf ein erhöhtes Risiko für Lymphome (ab 2g/Tag) und andere Malignome, insbesondere der Haut, unter systemischer Therapie mit Mycophenolatmofetil. Geilen et al. 2000 [60] und Wang et al. 2004 [203] empfehlen beide eine sorgfältige Beobachtung der Patienten bei systemischer MMF-Gabe, da eine Kanzerogenität durchaus möglich sei [139a].

5.4. Diskussion Latenzzeit

Zur Ermittlung einer Latenzzeit, die von der ersten Applikation eines potenziellen Karzinogens bis zu einem zytologisch oder histopathologisch nachweisbarem bösartigen Tumor dauert, gibt es keine systematischen Erhebungen für systemisch verabreichtes, oder gar lokal appliziertes CSA. Um solche Daten zu erheben, wäre eine Langzeit-Following-Studie der Konjunktiva unter CSA-Therapie wünschenswert. Berücksichtigt man die Datenlage dieser Studie, so zeigt die Untersuchung des Bindehautabstrichs bei Patient 1 nach 1425 Tagen (3,9 Jahren) und 3705 CSA-Augentropfen, Bindehautepithelien mit DNA-Aneuploidie. In der zytologischen Untersuchung diagnostizierten wir bei Patient 2 nach 79 Tagen und 237 CSA-Augentropfen ein Carcinoma in situ des Plattenepithels. Bei 69 Patienten konnte klinisch und zytologisch kein Hinweis auf ein Bindehautkarzinom gefunden werden. Eine Nachbeobachtungszeit von durchschnittlich 57,7 Monaten (\approx 4 Jahre und 9 Monate) ist aber nicht ausreichend, um das Entstehen von Karzinomen mit hinreichender Sicherheit ausschließen zu können. Aus Analogien der Cervix uteri ist bekannt, dass die Progredienz einer cervicalen intraepithelialen Neoplasie (CIN der Cervix uteri), d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass sich ein invasives Karzinom aus einer CIN entwickelt, mit dem Grad der CIN entscheidend zunimmt [46]. Ungefähr 20% der Fälle mit einer cervicalen

intraepithelialen Neoplasie I machen eine Progression zur cervicalen intraepithelialen Neoplasie III durch [30]. Bei der cervicalen intraepithelialen Neoplasie III beträgt die Progression zum invasiven Karzinom aber schon 30% [55]. Die Latenzzeit zwischen Erstdiagnose einer Dysplasie und dem Auftreten eines Carcinoma in situ nimmt mit dem Grad der cervicalen intraepithelialen Neoplasie ab [153]. Die Latenzzeit zwischen Diagnose einer leichten Dysplasie und dem Auftreten einer schweren Dysplasie bzw. einem Carcinoma in situ wird von Campion et al. 1986 bei der Cervix uteri mit 22 Monaten angegeben [30]. Vergleichende Arbeiten für die CIN der Bindehaut gibt es so nicht. Daher erscheint fraglich, ob sich diese Zeiten auch auf die Bindehaut beziehen lassen.

Beide Patienten dieser Studie, bei denen im Follow-up Bindehautkarzinome nachgewiesen wurden, erhielten über eine längere Zeit (Monate bis Jahre) systemische Immunsuppressiva (CSA bzw. MMF). Wann nun aber Malignome bei systemischer Immunsuppression auftreten, ist nicht genau geklärt. So geht zum Beispiel aus der Fachinformation von Mycophenolatmofetil (MMF, CellCept[®]) [154a] hervor, dass dieses in kontrollierten Studien zur Prophylaxe einer Abstossungsreaktion nach einer Nierentransplantation, bösartige Nicht-Melanom-Hauttumore (somit zum Beispiel auch Plattenepithelkarzinome) bei einem Follow-up von 42 Monaten (3,5 Jahre), zwischen 1,6% bis 4,2% hervorruft [154a]. Wann diese genau auftraten wird darin aber nicht erwähnt. Generell wird die Latenzzeit bis zum Eintritt eines Malignoms in anderen Studien bei systemischer MMF-Gabe zwischen vier und sieben Jahren angegeben [10a, 105a]. Macarez et al. haben 1999 bei zwei Patienten Bindehautkarzinome nach systemischer CSA-Therapie beobachtet [109]. So erhielt die 46jährige Patientin der 1. Kasuistik von Macarez et al. nach einer Nierentransplantation systemisches CSA (200mg/d) und Predisolon (7,5mg/d). Nach 13 Jahren konsequenter Immunsuppression entwickelte sie ein Carcinoma in situ der Bindehaut. Der 57jährige Patient der 2. Kasuistik erhielt nach einer Herztransplantation 4,5 Jahre systemisches CSA (325mg/d). Danach entwickelte sich bei ihm ein histologisch nachgewiesenes Bindehautkarzinom.

Durch die Kombination aus mehreren Risikofaktoren (CSA-Augentropfen und systemische Immunsuppressiva und Blepharokeratokonjunktivitis atopica), entstehen Dysplasien möglicherweise rascher. Zur Klärung des genauen Risikos für das Entstehen einer CIN der Bindehaut unter lokaler CSA-Therapie, wäre eine untherapierte Vergleichsgruppe von Atopikern wünschenswert.

5.5. Diskussion Immunsystem

Das Auftreten conjunctivaler intraepithelialer Neoplasien und Bindehautkarzinome wurde bei Patienten mit Blepharokeratokonjunktivitis atopica vermehrt beobachtet [47, 95]. Es ist zu befürchten, dass CSA-Augentropfen dazu beitragen könnten, deren Entstehung zusätzlich zu begünstigen. Hingorani et al. haben 1999 den immunmodulatorischen Effekt von CSA-Augentropfen bei der Blepharokeratokonjunktivitis atopica untersucht [85]. Sie randomisierten zwei Patientengruppen mit einer Blepharokeratokonjunktivitis atopica zu je vier Patienten. Eine Gruppe erhielt für drei Monate CSA-Augentropfen, die andere lediglich Placebotropfen. Konjunktivale Biopsien wurden vor und nach der Therapie bei beiden Gruppen entnommen und systematisch verglichen. Darin zeigten sie eine Normalisierung des Verhältnisses von CD4 zu CD8 Zellen, eine Abnahme der T-Zell-Aktivität und eine Reduktion der T-Zell-Zytokinexpression, v.a. IL-2 und IF- γ . In vitro zeigte sich kein Einfluss auf die IL-4 Expression und auch keine Reduktion von Mastzellen oder Eosinophilen.

Hinzu kommt, dass Cyclosporin A selbst immunsuppressiv wirkt, indem es in die Signalübermittlung zwischen den Lymphozyten eingreift. Dies erfolgt über eine Hemmung der Zytokinproduktion, besonders von IL-2 in der frühen Aktivierungsphase von T-Zellen (daher IL-2 Antagonist) [33, 92, 129]. Die Expression von IL-3, IL-4, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), TNF α , sowie die Zellteilung werden durch die Abnahme der IL-2 Produktion gehemmt. Folglich vermindert sich auch die durch Antigene ausgelöste Apoptose der T-Lymphozyten [33, 92, 129].

Shimada et al. konnten zeigen, dass murine Haut immunologische Zellen wie Langerhans Zellen und Th₁-positive epidermale dendritische Zellen aufweist [174]. CSA inhibiert die Antigen-präsentierende Funktion der Langerhans Zellen [57]. Yokota et al. gehen davon aus [208], dass gerade diese immunologischen Th₁-positiven Zellen der murinen Haut zur Tumorprogression beitragen könnten.

Auch haben Yarosh et al. 2005 postuliert, dass systemisch verabreichte Calcineurininhibitoren, wie Cyclosporin A, DNA-Reparatur-Systeme und Apoptose in menschlichen epidermalen Keratinozyten (NHEK) verringern [207]. Dies könnte auch ein Hinweis darauf sein, dass Hauttumore durch lokale Calcineurininhibitoren begünstigt werden, denn eine Inhibition der Apoptose in menschlichen epidermalen Keratinozyten führt bekannterweise zur Tumorpromotion [9]. Doch zeigten Yarosh et al. dies hauptsächlich in Kombination mit intensiver UV-Bestrahlung der Haut [207].

Diese Sachverhalte zeigen, dass CSA-Augentropfen insbesondere bei der Blepharokeratokonjunktivitis atopica eine zusätzliche Modulation der immunologischen Zellen in der Konjunktiva bewirken. Daher vermag die Kombination aus Atopie und CSA dazu beitragen, dass sich vermehrt conjunctivale intraepitheliale Neoplasien bei der Blepharokeratokonjunktivitis atopica ausbilden.

5.6. Diskussion Sicherheit von CSA-Augentropfen

Bei 2 der 71 untersuchten Patienten konnte, nach der Gabe von CSA-Augentropfen, eine CIN nachgewiesen werden. Die Inzidenz für Bindehautkarzinome ist in dieser Studie gegenüber der Allgemeinbevölkerung erhöht (Norm unter 0,1%) [125]. Ein eindeutiger Rückschluss auf eine mögliche Kanzerogenität im Rahmen der Therapie mit lokalen Cyclosporin A

Augentropfen lässt sich nicht ableiten, aber auch nicht ausschließen. Beide Patienten waren Atopiker und erhielten zusätzlich systemische Immunsuppressiva. Dass systemisches CSA u.a. bei Organtransplantation zur Entstehung von Malignomen führt, wird in

unterschiedlichen Fachdisziplinen diskutiert [34, 53, 69, 91, 94, 101, 111, 124, 159, 179, 208]. In der Dermatologie ist auch bekannt, dass eine systemische Immunsuppression mit systemischem Cyclosporin A, zum gehäuftem Auftreten von aktinischer Keratose, Morbus Bowen, Basalzellkarzinomen, Plattenepithelkarzinomen und lymphoproliferativen Erkrankungen führt [34, 53, 91, 94, 101, 111, 124, 159, 179]. Dementsprechend können auch hier topische Immunsuppressiva ein erhöhtes Risiko kutaner Malignome beinhalten. Andererseits haben präklinische Langzeit-Karzinogenitätsstudien mit den lokalen Immunsuppressiva Tacrolimus (Kapitel 2.8.3.2.) und Pimecrolimus (Kapitel 2.8.3.3.) gezeigt, dass beide eher nicht kanzerogen wirken (Fujisawa und Novartis on file [128, 131, 193]). Die darüber hinaus durchgeführten Photokarzinogenitäts-Studien zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Vehikel und Tacrolimus in der klinisch angewandten Dosierung. In klinischen Studien mit Tacrolimus wurde die Inzidenz von weißem Hautkrebs bei 9813 Erwachsenen ≥ 40 Jahre untersucht [154]. Hierbei fand sich ebenfalls kein über das normale Maß des Alters der entsprechenden US-Kontrollbevölkerung hinausgehende Inzidenz von weißem Hautkrebs [54]. In einer Untersuchung von Blohme von 1992 konnten keine Unterschiede der Inzidenz von Hautkrebs unter der Therapie mit CSA festgestellt werden. Allerdings verweist der Autor auf eine mögliche Latenzzeit von mehr als fünf Jahren [12a]. Auch haben frühere Untersuchungen mit Cyclosporin A in einem Hautkarzinogenesemodell indirekt gezeigt, dass die topische Applikation eine Tumorenstehung der Haut eher unterdrückt, die systemische Gabe dagegen die Hauttumorentstehung signifikant fördert [69, 208]. Diese Untersuchungen von Yokota [208] unterstreichen, dass für die Hauttumorentstehung in seinem Mausmodell insbesondere die systemische Immunsuppression eine bedeutende Rolle spielt. Bezüglich der murinen Haut, muss aber auch darauf hingewiesen werden, dass es anatomische Unterschiede zwischen muriner und menschlicher Haut gibt und daraus auch eine unterschiedliche Penetrationsfähigkeit von Calcineurininhibitoren resultiert. Auch wurden die Mäuse nach lokaler CSA-Applikation in

der Yokota Studie [208] lediglich 24 Wochen lang beobachtet. Längere Zeiträume, bei denen die Mäuse lokalem CSA ausgesetzt waren, haben nicht stattgefunden. Seitdem aber bekannt ist, dass CSA nicht genotoxisch ist [211], ist der plausibelste Grund für eine mögliche Tumorprogression ein immunsuppressiver Effekt von CSA. Weiterhin zeigen vergleichende Studien mit Kortikosteroiden, dass generell eine systemische (orale) Medikation mit Prednisolon zu einem 1,49fach höheren Krebsrisiko für Basalzellkarzinome und 2,31fach höherem Risiko für Plattenepithelkarzinome führt. Dagegen war bei der Verwendung von Prednisolon-Inhalation (lokale Anwendung) kein erhöhter Malignitätsindex erkennbar [99]. Der aktuellste Stand der Forschung zeigt eine kontroverse Diskussion über Calcineurin Inhibitoren. So ist in einer Veröffentlichung vom September 2005 [44, 50] von der amerikanischen Arzneimittel-Zulassungsbehörde (Food and Drug Administration, FDA), der Warnhinweis in der Fachinformation für Protopic® (FK-506) verzeichnet (nicht CSA), dass die Anwendung dieser Produkte die Entstehung von Hauttumoren und Lymphomen möglicherweise begünstigen könne. Die FDA beruft sich hier auf das Anraten des Expertengremiums des Pediatric Advisory Committee. Dieser Warnhinweis wird allerdings von deutschen Dermatologen als übertrieben dargestellt [44]. Zumal sollte bedacht werden, dass lokales CSA zwar einen ähnlichen Wirkmechanismus wie FK-506 besitzt, aber die Haut nur viel schwieriger penetrieren kann [3, 36, 106]. Bei lokal appliziertem Cyclosporin A sind die systemischen Konzentrationen in einem nanomolaren Messbereich [1, 3, 116, 195], aber an Ort und Stelle dafür umso höher konzentriert.

Auch gehen Yarosh et al. in einer Untersuchung von 2005 davon aus, dass systemisch verabreichte Calcineurininhibitoren wie Cyclosporin A, DNA-Reparatur-Systeme und Apoptose in menschlichen epidermalen Keratinozyten (NHEK) verringern [207], und so zur Tumorpromotion beitragen [9].

Feltgen et al. 2005 [47] und Kallen et al. [95] konnten schon 2003 beobachten, dass sich die Blepharokeratokonjunktivitis atopica als Risikofaktor für die Entstehung eines

Bindehautkarzinoms abzeichnet. Dabei mag eine eventuelle lokale CSA-Therapie dazu beigetragen haben, dass sich bereits bestehende leichte dysplastische Bindehautzellen zu höhergradigen Dysplasien bis hin zum Carcinoma in situ entwickelten (Kasuistik 7 von Kallen et al. [95]).

5.7. Schlussfolgerung

Ein Ausschluss der Kanzerogenität von lokalem Cyclosporin A, bei Patienten mit Blepharokeratokonjunktivitis atopica, konnte nach einem mittleren Beobachtungszeitraum von etwa vier Jahren durch Bindehautabstrichkontrollen nicht erbracht werden. Dazu sind längere Beobachtungszeiträume erforderlich. Patienten mit einer Blepharokeratokonjunktivitis atopica, die zusätzlich zu lokalem auch systemisches CSA oder MMF erhielten, zeigten vermehrt conjunctivale intraepitheliale Neoplasien. Regelmäßige zytologische Kontrollen an Bindehautabstrichen, gegebenenfalls ergänzt durch eine DNA-Zytometrie, scheinen jedoch ein geeignetes Mittel zu sein, um maligne Transformationen frühzeitig zu erkennen. Die Abstrichkontrollen sollten in Abhängigkeit von der Zahl der Risikofaktoren gestaltet werden. Patienten mit einer Blepharokeratokonjunktivitis atopica, die nur mit lokalen CSA-Augentropfen therapiert werden, sollte jeweils halb jährlich eine Kontrolle erhalten, mit zusätzlicher systemischer Immunsuppression sogar alle drei Monate. Patienten mit anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen der Horn- und Bindehaut, bei denen keine weiteren Risikofaktoren, ausser einer lokalen CSA-Therapie vorliegen, werden einmal jährlich einem Bindehautabstrich unterzogen. Eine prospektive Studie zur Prüfung des vermuteten Risikofaktors Blepharokeratokonjunktivitis atopica für die Entwicklung eines Bindehautkarzinoms läuft seit zwei Jahren an der Universitäts-Augenklinik in Freiburg. Erste Ergebnisse werden in einem Jahr erwartet.

6. Literaturverzeichnis

1. Acheampong AA, Shackleton M, Tang-Liu DD, Ding S, Stern ME, Decker R. Distribution of CSA on ocular tissues after topical administration to albino rabbits and beagle dogs. *Curr Eye Res* 1999; 18,2:91-103
2. Allen LV. Cyclosporine ophthalmic drops. *U.S. Pharmacist* 1992; 17,88:78-79
3. Althaus C, Dages E, Reinhard T, Christians U, Sundmacher R. Cyclosporin and its metabolites in the anterior chamber after topical and systemic application as determined with high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Ger J Ophthalmol* 1996; 5,4:189-194
4. Auffermann W, Böcking A. Early detection of precancerous lesions in dysplasias of the lung by rapid DNA image cytometry. *Anal Quant Cytol Histol* 1984; 7, 3:218-226
5. Augenheilkunde, A. Augustin, Springer Verlag, 2006
6. Augenheilkunde, M. Sachsenweger, Thieme Verlag, 2002
- 6a. Auw-Haedrich C, Sundmacher R, Freudenberg N, Spelsberg H, Feltgen N, Maier P, Reinhard T. Expression of p63 in conjunctival intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005; 244,1:96-103
7. BenEzra D, Peter J, Brodsky M, Cohen E. Cyclosporin eye drops for the treatment of severe vernal keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1989; 107:160-166
8. BenEzra D, Pe'er J, Brodsky M, Cohen E. Cyclosporine Eyedrops for the Treatment of Severe Vernal Keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1986; 101:278-282
9. Bernstein C, Bernstein H, Payne C, Garewal H. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways. *Mutat Res* 2002; 511:145-178
10. Bigelbach A. Die lokale Behandlung kortikoidresistenter Fälle von Keratitis superficialis chronica (Überreiter) und der plasmazellulären Nickhautinfiltration mit Cyclosporin; *Kleintierpraxis* 1993; 38:271-280
- 10a. Birkeland SA, Hamilton-Dutoit S. Is posttransplantat lymphoproliferative disorder (PTLD) caused by any specific immunosuppressive drug or by the transplantation per se? *Transplantation* 2003; 76:984-988
11. Bisterfeld S, Gerres K, Fischer-Wein G, Böcking A. Polyploidy in non-neoplastic tissues. *J Clin Pathol* 1994; 47:38-42
12. Bleik J, Tabbara K. Topical Cyclosporine in Vernal Keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 1991; 98:1679-1684
- 12a. Blohme I, Larko O. No difference in skin cancer incidence with or without cyclosporine.

- A 5-year perspective. *Transplant Proc* 1992; 24,1:313
13. Böcking A, Adler CP, Common HH, Hilgarth M, Granzen B, Auffermann W. Algorithm for a DNA-Cytophotometric Diagnosis and Grading of Malignancy. *Anal Quant Cytol* 1984; 1:1-8
 - 13a. Böcking A, Auffermann W, Vogel H, Schlondorff G, Goebbels R. Diagnosis and grading of malignancy in squamous epithelial lesions of the larynx with DNA cytophotometry. *Cancer* 1985; 56,7:1600-4
 14. Böcking A, Chatelain R. Diagnostic and prognostic value of DNA cytometry in gynaecologic cytology. *Anal Quant Cytol Histol* 1989; 11:177-86
 15. Böcking A, Giroud F, Reith A. Consensus report of the ESACP task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. *Anal Cell Pathol* 1995; 8:67-74
 16. Böcking A, Hilgarth M, Auffermann W, Hack-Werdier C. DNA-Cytometric Diagnosis of Prospective Malignancy in Borderline Lesions of the Uterine Cervix. *Acta Cytol* 1986; 30,6:608-615
 17. Böcking A, Nguyen Vu. Diagnostic and Prognostic Use of DNA Image Cytometry in Cervical Squamous Intraepithelial Lesions and Invasive Carcinoma. *Cancer* 2004; 102:41-54
 18. Böcking A, Wied GL, Keebler CM, Rosenthal DL, Schenck U, Somrak TM, Vooijs GP. DNA measurements. When and why? In: *Compendium on quality assurance, proficiency testing, and workload limitations. Tutorials of Cytology* 1995; 170-188
 19. Böcking A. Abklärung plattenepithelialer Dysplasien mittels DNA-Bildzytometrie. *Deutsches Ärzteblatt* 1998; 95,12: 658-662
 20. Böcking A. Biologische Grundlagen und Anforderungen an die Methodik der statischen DNA-Zytometrie. In: *Fortschritt und Fortbildung in der Medizin. Dt Ärzte Verlag* 1997; 21:21-49
 21. Böcking A. Identifizierung progredienter Dysplasien des Plattenepithels mittels DNA-Bildzytometrie. *MTA Dialog* 2002; Vol. 6,3:490-494
 22. Böcking A. Standardisierte Befunderstellung in der extragenitalen Zytologie. *Pathologie* 1998; 19:235-258
 23. Bohm M, Beissert S, Schwarz T. Bullous pemphigoid treated with mycophenolate mofetil. *Lancet* 1997; 349:541
 24. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA et al. The STARD Statement for Reporting Studies of Diagnostic Accuracy: Explanation and Elaboration. *Croatian Medical Journal* 2003; 44,5:639-650

25. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA et al. Towards Complete and Accurate Reporting of Studies of Diagnostic Accuracy: The STARD Initiative. *Clinical Chemistry* 2003; 49,1:1-6
26. Brewitt H. Diagnostik und Therapie des trockenen Auges. Teil 3: Diagnostische Methoden. *Praktische Augenheilkunde* 1996; 17:33-37
27. Brown SI Mooren's ulcer. Treatment by conjunctival excision. *Brit J Ophthal* 1975; 59:675-682
28. Calne RY, White DJG, Pentlow BD, Rolles K, Syrakos T, Ohtawa T. Cyclosporin A as the only immunosuppressant in 34 recipients of cadaveric organs: 32 kidneys, 2 pancreases and 2 livers. *Lancet* 1979; 17:1033-1036
29. Campbell RJ. Histological typing of tumors of the eye and its adnexa, 2nd edn. 1998. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
30. Campion MJ, McCane DJ, Cuzick J, Singer A. Progressiv potential of mild cervical atypia: prospective cytological, colposcopic and virological study. *Lancet* 2 1986; 8501:237-240
31. Carstburg O, Kallen C, Hillenkamp J, Sundmacher R, Pomjanski N, Böcking A. Topical mitomycin C and radiation induce conjunctival DNA-polyploidy. *Anal Cell Pathol* 2001; 23:65-74.
32. Carstburg O, Kersten A, Sundmacher R, Nadjari B, Pomjanski N, Böcking A. Behandlung von 9 plattenepithelialen Carcinomata in situ der Bindehaut (CIN) mit Mitomycin-C-Augentropfen unter zytologischer und DNA-bildzytometrischer Kontrolle. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2001; 218:429-434
- 32a. Chatelain R, Schunck T, Schindler EM, Schindler AE, Böcking A. Diagnosis of prospective malignancy in koilocytic dysplasias of the cervix with DNA cytometry. *J Reprod Med* 1989; 34,8:505-10
33. Clipstone NA, Crabtree GR. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* 1992; 357, 6380:695-697
34. Craig FE, Gulley ML, Banks PM. Posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol* 1993; 99:265
35. Darrell RW. Thygeson's superficial punctate Keratitis: natural history and associator with HLA DR3. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1981; 79:486-516
36. De Rie MA, Meinardi MM, Bos JD. Lack of efficacy of topical cyclosporin A in atopic dermatitis and allergic contact dermatitis. *Acta Derm Venereol* 1991; 71,5:452-454

37. Del Castillo JM, Del Castillo JB, Garcia-Sanchez J. Effect of topical cyclosporin A on Thygeson's superficial punctate keratitis. *Doc Ophthalmol* 1996; 93,3:193-198
38. Doughty MJ, Fonn D, Richter D, Simpson T, Caffery B, Gordon K. A patient questionnaire approach to estimating the prevalence of dry eye symptoms in patients across Canada. *Optom Vis Sci* 1997; 74:624-631
39. Dua HS, Jindal VK, Gomes JA, Amoaku WA, Donoso LA, Laibson P, Mahlberg K. The effect of topical cyclosporin on conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT). *Eye* 1996; 10:433-438
40. Duesberg P, Li R, Rasnick D. Aneuploidy Approaching a Perfect Score in Predicting and Preventing Cancer. *Cell Cycle* 2004; 3,6:823-828
41. Einheitlicher Bewertungsmaßstab (EBM) April 2005.
42. El-Asrar AM, Tabbara KF, Geboes K, Missotten L, Desmet V. An immunohistochemical study of topical cyclosporine in vernal keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 1996; 121,2:156-161
43. Elser I, Selimovic D, Ruzicka T, Kuhn A, Megahed M. Myophenolatmofetil als effective Therapieoption bei vernarbendem Pemphigoid. *Hautarzt* 2003; 54:981-984
44. Enderlein E, Meller S, Rieker J, Ruzicka T, Homey B. Aktuelle Aspekte der Therapie mit topischen Calcineurininhibitoren. *Hautarzt* 2005; 56:937-941
45. Faulds D, Goa KL, Benfield P. Cyclosporin A Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Use in Immunoregulatory Disorders. *Drugs* 1993; 45,6:953-1040
46. Feichter G, Dalquen P. *Zytopathologie*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York 2000
47. Feltgen N, Auw-Hädrich C. Ungewöhnlicher Bindehauttumor bei einer jungen Atopikern. *Ophthalmologie* 2005; 102:1204-1206
48. Feulgen R, Rossenbeck H. Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1924; 135:203-248
49. Fischer T, Neumayer HH, Fischer R, Barenbrock M, Schobel HP, Lattrel BC, Jacobs VR et al. Effect of pregnancy on long-term kidney function in renal transplant recipients treated with cyclosporine and with azathioprine. *Am J Transplant* 2005; 5,11:2732-9
50. Food and Drug Administration. Fda alert for healthcare professionals: Tacrolimus: <http://www.fda.gov/cder/drug/infopage/protopic/default.htm>

51. Foster CS, Calonge M. Atopic Keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 1990; 97:992-1000
52. Freisen HA. Cyclosporin – ein neuer Weg bei rassespezifischen Keratitiden des Hundes. *Prakt Tierarzt* 1993; 2:108-110
53. Frezza EE, Fung JJ, van Thiel DH. Non-lymphoid cancer after liver transplantation. *Hepatology* 1997; 44:1172
54. Frieling UM, Schaumberg DA, Kupper TS, Muntwyler J, Hennekens CH. A randomized, 12-year primary-prevention trial of beta carotene supplementation for nonmelanoma skin cancer in the physician's health study. *Arch Dermatol* 2000; 136,2:179-84
55. Fu YS, Reagan JW, Richart RM. Definition of precursors. *Gynecol Oncol* 1981; 12:220-231
56. Furdova A, Olah Z, Pesko K. The TNM classification system in malignant conjunctival neoplasms. *Cesk Slov Oftalmol* 2000; 56,3:154-60
57. Furue M, Katz SI. Cyclosporin A inhibits accessory cell and antigen-presenting cell functions of epidermal Langerhans cells. *Transplant Proc* 1988; 20:87-91
58. G Peksayar, R Altan-Yaycioglu and S Onal. Excision and cryosurgery in the treatment of conjunctival malignant epithelial tumours. *Eye Journal* 2003; 17,2:228-32
59. Gao J, Schwalb TA, Addeo JV, Ghosn CR, Stern ME. The role of apoptosis in the pathogenesis of canine keratoconjunctivitis sicca: the effect of topical CSA therapy. *Cornea* 1998; 17,6:654-663
60. Geilen CC, Orfanos-Boeckel H, Offermann G, Orfanos CE. MMF: Ein neues Immunsuppressivum in der Dermatologie und seine Einsatzmöglichkeiten. *Hautarzt* 2000; 51:63-69
61. Gell PGH, Coombs RR. *Clinical aspects immunology*. Philadelphia FA Davis 1963; 317
62. Giese M, Friedrich RE, Riethdorf S, Löning T. p53-Mutationsnachweis in Abstrichen der Mundschleimhaut von Patienten mit oralem Plattenepithelkarzinom. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2001; 5:37-43
63. Giroud F, Haroske G, Reith A, Böcking A. Part II: Specific recommendations for quality assurance. *Analyt Cell Pathol* 1998; 17:201-208
64. Goldberg DB, Schanzlin DJ, Brown SI. Management of Thygeson's superficial punctate keratitis. *Am J Ophthalmol* 1980; 89,1:22-24
65. Gordon YJ, Romanowski E, Araullo-Cruz T, Seaberg L, Erzurum S, Tolman R, DeClerq E. Inhibitor effect of (S)-HPMPC, (S)-SPMPA, and 2'-nor-cyclic GMP on clinical ocular adenoviral isolates is serotype-dependent in vitro. *Antiviral Res* 1991; 16:11-16

66. Greene DR, Taylor SR, Wheeler TM, Scardino PT. DNA ploidy by image analysis of individual foci of prostate cancer. *Cancer Res* 1991; 51:4084-4089
67. Grote H, Friedrichs N, Pomjanski N, Guhde H. Prognostic significance of DNA cytometry in carcinoma of the uterine cervix FIGO stage IB and II. *Anal Cell Pathol* 2001; 23:97-105
68. Grote HJ, Nguyen HVQ, Leik AG, Böcking A. Identifikation of progressive cervical epithelial cell abnormalities using DNA cytometry. *Cancer Cytopathol* 2004; in press
69. Gschwendt M, Kittstein W, Marks F. Cyclosporin A inhibits phorbol ester-induced cellular proliferation and tumor promotion as well as phosphorylation of a 100-kd protein in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 1987; 8:203
70. Günther R. Pathologisch-anatomischer Befund einer Hornhaut bei Keratitis epidemica. *Klin Monatsbl Augenheilk* 1993; 103:309-314
71. Hamideh F, Prete P. Ophthalmologic Manifestation of Rheumatic Diseases. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 30:217-241
72. Haroske G, Baak JPA, Danielsen H, Giroud F, Gschwendtner A, Oberholzer M, Reith A, Spieler P, Böcking A. Fourth updated ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. *Analyt Cell Pathol* 2001; 23:89-95
73. Haroske G, Giroud F, Reith A, Böcking A. Part I: Basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. *Analyt Cell Pathol* 1998; 17:189-200
74. Haroske G, Meyer W, Oberholzer M, Böcking A, Kunze KD. Competence on Demand in DNA Image Cytometry. *Pathol Res Pract* 2000; 196:285-291
75. Heiligenhaus A, Steuhl K. Treatment of HSV-1 stromal keratitis with topical Cyclosporin A: a pilot study. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 237:435-438
76. Henriquez AS, Kenyon KR, Allansmith MR. Mast cell ultrastructure: Comparison in contact lens associated giant papillary conjunctivitis and vernal keratokonjunctivitis. *Arch Ophthalmol* 1981; 99:1266
77. Hermanns PM, Filler G, Roscher B. Gebührenordnung für Ärzte (GOÄ) 2005
78. Herrington CS. Human papillomaviruses, and cervical neoplasia. I Classification, virology, pathology, and epidemiology. *J Clin Pathol* 1994; 47:1066-1072
79. Hesse H, Mizera W, Kasperek R, Konietzko N. Method of photometric measurement of ciliary beat frequency from human tracheobronchial epithelium (author's transl). *Klin Wochenschr* 1981; 59,3:135-140

80. Hikichi T, Yoshida A, Fukui Y, Hamano T, Ri M, Araki K, Horimoto K, Takamura E. Prevalence of dry eye in Japanese eye centers. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1995; 233:555-558
81. Hillemanns HG. Entstehung und Wachstum des Zervixkarzinoms. Basel, New York: S. Karger, 1964
82. Hillenkamp J, Reinhard T, Ross RS, Bohringer D, Carlsburg O, Roggendorf M, De Clercq E, Godehardt E, Sundmacher R. The effects of cidofovir 1% with and without cyclosporin a 1% as a topical treatment of acute adenoviral keratoconjunctivitis: a controlled clinical pilot study. *Ophthalmology* 2002; 109,5:845-50
83. Hillenkamp J, Reinhard T, Ross RS, Bohringer D, Carlsburg O, Roggendorf M, De Clercq E, Godehardt E, Sundmacher R. Topical treatment of acute adenoviral keratoconjunctivitis with 0.2% cidofovir and 1% cyclosporine: a controlled clinical pilot study. *Arch Ophthalmol* 2001; 119,10:1487-91
84. Hillenkamp J, Reinhard T, Sundmacher R. Adenoviruskeratokonjunktivitis und ihre Differentialdiagnose. *internist.prax.*2001; 41:77-83
85. Hingorani M, Calder VL, Buckley RJ, Lightman S. The immunomodulatory effect of topical CSA in atopic keratoconjunctivitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40,2:392-399
86. Hintschich C, Stefani FH. Keratoakanthom im Lidbereich. Probleme und Risiken bei Diagnose und Therapie. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1997; 210:219–224
87. Holland EJ, Olsen TW, Ketcham JM et al. Topical Cyclosporin A in the treatment of anterior segment inflammatory disease. *Cornea* 1993; 12,5:413-419
88. Holsclaw DS, Whitcher JP, Wong IG, Margolis TP. Supratarsal injection of coricosteroid in the treatment of refractory vernal keratokonjunktivitis. *Am J Ophthalmol* 1996; 121,3:243-249
89. Holsclaw DS, Wong IG, Sherman M. Masked trial of topical Cyclosporine A in the treatment of refractory Thgeson's punctate Keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:1302
90. Ismail SM, Colclough AB, Dinnen JS. Reporting cervical intra-epithelial neoplasia (CIN): intra- and interpathologist variation and factors associated with disagreement. *Histopathology* 1990; 16: 371-376
91. Jain AB, Yee LD, Nalesnik MA. Comparative incidence of de novo nonlymphoid malignancies after liver transplantation under tacrolimus using surveillance epidemiologic end result data. *Transplantation* 1998; 66:1193
92. Janeway, Travers, Walport, Shlomchik 2003: Immunobiology

93. Jonas JB, Rank RM, Budde WM. Tectonic sclerokeratoplasty and tectonic penetrating keratoplasty as treatment for perforated or predescemetal corneal ulcers. *Am J Ophthalmol* 2001; 132,1:14-8
94. Jonas S, Reyes N, Neumann U. De novo malignancies after liver transplantation using tacrolimus-based protocols or cyclosporine-based quadruple immunosuppression with an interleukin-2 receptor antibody or antithymocyte globulin. *Cancer* 1997; 80:1141
95. Kallen C, Reinhard T, Schilgen G, Carlsburg O, Böcking A, Auw-Hädrich C, Sundmacher R. Atopische Keratokonjunktivitis, wahrscheinlich ein Risikofaktor für die Entstehung von Bindehautkarzinomen. *Ophthalmologie* 2003; 100: 808-814
96. Kalogeropoulos CD, Malamou-Mitsi VD, Aspiotis MB, Psilas KG Bilateral. Mooren's ulcer in six patients: diagnosis, surgery and histopathology. *Int Ophthalmol* 2004; 25,1:1-8
97. Kanski, Spitznas 1987: Lehrbuch der klinischen Ophthalmologie
98. Avunduk AM, Avunduk MC, Erdol H, Kapicioglu Z, Akyol N. Cyclosporine Effects on Clinical Findings and Impression Cytology Specimens in Severe Vernal Keratoconjunctivitis. *Ophthalmologica* 2001; 215:290-3
99. Karagas MR, Cushing GL Jr, Greenberg ER. Non-melanoma skin cancers and glucocorticoid therapy. *Br J Cancer* 2001; 85:683
100. Kiang E. The use of topical Cyclosporin-A in ocular graft-versus-host-disease, Bone Marrow Transplantation 1998; 22:147-151
101. Knowles DM. Immunodeficiency-associated lymphoproliferative disorders. *Mod Pathol* 1999; 12:200
102. Koss L. diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases. Fourth Edition. J.B. Lippincott Company Philadelphia 1992
103. Kuchle M, Seitz B, Langenbacher A, Naumann GO. Nonmechanical excimer laser penetrating keratoplasty for perforated or predescemetal corneal ulcers. *Ophthalmology* 1999; 106,11:2203-09
104. Kutkuhn B, Hollenbeck M, Heering P et al. Development of Insulin Resistance and Elevated Blood Pressure during Therapy with Cyclosporine A. *Blood Press* 1997; 6:13-17
105. Laibson PR, Dhiri S, Oconer J, Ortolan G. Corneal infiltrates in epidemic keratokconjunctivitis. Response to double-blind corticosteroid therapy. *Arch Ophthalmol* 1970; 84:36-40

- 105a. Lake JR, David KM, Steffen BJ, Chu AH, Gordon RD, Wiesner RH. Addition of MMF to dual immunosuppression does not increase the risk of malignant short-term death after liver transplantation. *Am J Transpl* 2005; 5:2961-2967
- 105b. Lamarque V, Monka C, Commare MC, Krupp R. Risk of malignancies in patients treated with Sandimmun® for autoimmune diseases. Touraine JL et al. (eds.). *Cancer in Transplantation. Prevention and Treatment*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers 1996, p. 141-148
106. Lauerma AI, Maibach HI. Topical FK-506 – clinical potential or laboratory curiosity? *Dermatology* 1994; 188,3:173-176
107. Lee GA, Hirst LW. Ocular surface squamous neoplasia. *Surv Ophthalmol* 1995; 39,6:429-30
108. Mabon PJ, Weaver LC, Dekaban GA. Cyclosporin A reduces the inflammatory response to a multi-mutant herpes simplex virus type-1 leading to improved transgene expression in sympathetic preganglionic neurons in hamsters. *J Neurovirol* 1999; 5,3:268-279
109. Macarez R, Bossis S, Robinet A et al. Conjunctival Epithelial Neoplasias in Organ Transplant Patients receiving Cyclosporine Therapy. *Cornea* 1999; 18 ,4:495-497
110. Maraki D, Becker J, Boecking A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. *J Oral Pathol Med* 2004; 33,7:398-404
111. Marcen R, Pascual J, Tato AM. Influence of immunosuppression on the prevalence of cancer after kidney transplantation. *Trans plant Proc* 2003; 35:1714
112. Marx W, Reinhard T, Megahed M, Sundmacher R. Immunologisch bedingte, chronisch progressive vernarbende Bindehauterkrankungen. *Ophthalmologe* 2001; 98:185-193
113. Maske R, Hill JC, Horak S. Mixed lymphocyte culture responses in rabbits undergoing corneal grafting and topical cyclosporine treatment. *Cornea* 1994; 13, 4:324-330
114. Mayer K, Reinhard T, Reis A, Böhringer D, Sundmacher R. 0,1% FK-506-Salbe: Eine Option bei der atopischen Blepharitis. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2001; 218:733-736
115. McDonnell JM, Mayr AJ, Martin WJ. DNA of human papillomavirus type 16 in dysplastic and malignant lesions of the conjunctiva and cornea. *N Engl J Med* 1989; 320:1422-1446
116. Minguez E, Tiestos MT, Cristobal JA, Casillo J, Dapena MP, Palom A. Intraocular absorption of CSA eyedrops. *J Fr Ophthalmol* 1992; 15,4:263-267
117. Mittelviehhaus H, Auw-Hädrich C, Witschel H. Ulzerierte Lidtumoren beidseits bei Atopie. *Ophthalmologe* 2003; 100:848–851

118. Mueller DW. Improved extemporaneous formulation of cyclosporine ophthalmologic drops. *Am J Hosp Pharm* 1994; 51:3080-3081
119. Munck-Wikland E, Kuylenstierna R, Lindholm J, Auer G. Image cytometry DNA analysis of dysplastic squamous epithelial lesions in the larynx. *Anticancer Research* 1991; 11:597-600
120. Murty UV, Mitra AB, Das BC, Murty N, Luthra UK. Chromosomal phenotypes in patients with precancerous lesions of the uterine cervix progressed to cancer during follow up. *Oncology* 1988; 45:384-388
121. Nadashkevich O, Davis P, Fritzler M, Kovalenko W. A randomized unblinded trial of cyclophosphamide versus azathioprine in the treatment of systemic sclerosis. *Clin Rheumatol*. 2005 Oct 14
122. Nadjari B, Kersten A, Roß B, Krallmann R. Cytologic and DNA Cytometrie Diagnosis and Therapy Monitoring of Squamous Cell Carcinoma in Situ and Malignant Melanoma of the Cornea and Conjunctiva. *Analyt Quanti Cytol Histol* 1999; 21:387-396
123. Nagra PK, Rapuano CJ, Cohen EJ, Laibson PR. Thygeson's superficial punctate keratitis : ten years' experience. *Ophthalmology* 2004; 111:34-37
124. Nalesnik MA, Jaffe R, Starzl TE. The pathology of posttransplant lymphoproliferative disorders occurring in the setting of cyclosporine A-prednisone immunosuppression. *Am J Pathol* 1988; 133:173
125. Naumann G. *Pathologie des Auges* 1997. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio
126. Neues Rezeptur-Formularium 28.09.2004; NRF 15.21; ABDA 2004
127. Nguyen QD. *Mooren's ulcer: Diagnosis and Management*. Immunology and Uveitis Service, Massachusetts Eye and Ear infirmary.
128. No authors listed. Pimecrolimus cream for atopic dermatitis. *Drug Ther Bull*. 2003; 41,5:33-6
129. Oates JA, Wood AJJ, Kahan BD. Medical Intelligence – Drug Therapy – Cyclosporine. *N Engl J Med* 1989; 321:1725-1737
130. *Ophthalmothek*, Hrsg. Dr. Mann Pharma
131. Ormerod A. Topical tacrolimus and pimecrolimus and the risk of cancer: how much cause for concern? *Br J of Dermatol* 2005; 153:701-705
132. Papanicolaou GN. *Atlas of exfoliative cytology*. Harvard University Press, Cambridge 1954
133. Parr. Cyclosporin binding to components in medication administration sets; *DICP Ann Pharmacother* 1998; 22:173-174

134. Pasto L. Oily solutions for ophthalmic use: microbial stability. *Eur Hosp Pharm* 1999; 5:79-82
135. Pau H, Schmitt-Gräff A. Das Ulcus rodens Mooren als mögliche Autoaggressionskrankheit. *Klin Mbl Augenheilk* 1983; 183:192-194
136. Perry H, Doshi-Carnevale S, Donnenfeld E, Kornstein H. Topical Cyclosporine A 0,5% as a Possible New Treatment for Superior Limbic Keratoconjunctivitis. *Ophthalmology* 2003; 110:1578-1581
137. Plewig G, Jansen T. Die chronisch-progrediente Gesichtsdematose Rosazea. *Deutsches Ärzteblatt* 94, 1997; 3:A-97/B-81/C-79
138. Pucci N, Novembre E, Cianferoni A, Lombardi E, Bernardini R, Caputo R, Campa L, Vierucci A. Efficacy and safety of cyclosporine eyedrops in vernal keratoconjunctivitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 89,3:298-303
139. Reinhard T, Godehardt E, Pfahl H.-G., Sundmacher R. Lokales Cyclosporin A bei Nummuli nach Keratoconjunctivitis epidemica. *Ophthalmologe* 2000; 97:764-768
- 139a. Reinhard T, Reis A, Bohringer D, Malinowski M, Voiculescu A, Heering P, Godehardt E, Sundmacher R. Systemic mycophenolate mofetil in comparison with systemic cyclosporin A in high-risk keratoplasty patients: 3 years' results of a randomized prospective clinical trial. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001; 239,5:367-72
140. Reinhard T, Reis A, Mayweg S, Oberhuber H, Mathis G, Sundmacher R. Lokales FK-506 bei entzündlichen Erkrankungen von Hornhaut und Bindehaut. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2002; 219:125-131
141. Reinhard T, Roggendorf M, Fengler I, Sundmacher R. PCR for varicella zoster virus genome negative in corneal epithelial cells patients with Thygeson's superficial punctate keratitis. *Eye* 2004; 18,3:304-305
142. Reinhard T, Ruzicka T, Sundmacher R. Pathogenese und Therapie der Augenbeteiligung bei Atopie. *Ophthalmologe* 1999; 96:473-488
143. Reinhard T, Sundmacher R, Godehardt E, Heering P. Systemische Cyclosporin A Prophylaxe nach Keratoplastiken mit erhöhtem Risiko für Immunreaktionen als einzigem erhöhten Risikofaktor. *Ophthalmologe* 1997; 94:496-500
144. Reinhard T, Sundmacher R, Heering P. Systemic Cyclosporin A in highrisk keratoplasty. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; 234:115-121
145. Reinhard T, Sundmacher R. Lokale Cyclosporin A Therapie bei Nummuli nach Keratokonjunktivitis epidemica – Fallbericht. *Klin Monatsbl Augenheilk* 1997; 210:165-168

146. Reinhard T, Sundmacher R. Lokale Cyclosporin A Therapie bei Thygeson Keratitis, Pilotstudie. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1996; 209,4: 224-227
147. Reinhard T, Sundmacher R. Topical Cyclosporin A in Thygeson's superficial punctate keratitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999; 237:109-112
148. Reis A, Reinhard T, Sundmacher R. Mycophenolatmofetil (CellCept) bei oculären immunologischen Störungen. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1998; 213:257-261
149. Remmerbach T, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A. Earliest detection of oral cancer using non-invasive brush biopsy including DNA-image-cytometry: Report on four cases. *Anal Pathol* 2003; 25:159-166
150. Remmerbach TW, Mathes SN, Weidenbach H, Hemprich A, Böcking A. Nichtinvasive Bürstenbiopsie als innovative Methode in der Früherkennung des Mundhöhlenkarzinoms. *Mund Kiefer Gesichts Chir* 2004; 8:229–236
151. Remmerbach TW, Weidenbach H, Pomjanski N, Knops K, Mathes S, Hemprich A, Böcking A. Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. *Anal Cell Pathol* 2001; 22:211-221
152. Rhode D, Blum M, Kosmehl H, Strobel J. Rezidivierender Bindehauttumor. *Ophthalmologie* 1997; 94:752-753
153. Richert RM, Barron BA. A follow-up study of patients with cervical dysplasia. *Am J Obstet Gynecol* 1969; 105:386-393
154. Rico MJ, Lawrence I. Tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis: clinical and pharmacologic effects. *Allergy Asthma Proc* 2002; 23,3:191-7
- 154a. Roche Fachinformation des Arzneimittel-Kompendium der Schweiz ® von CellCept®/-i.v., AMZV 09.11.2001
- 154b. Robson R, Cecka JM, Opelz G, Budde M, Sacks S. Prospective registry-based observation cohort study of the long-term risk of malignancies in renal transplantat patients treated with MMF. *Am J Transpl* 2005; 5:2954-2960
155. Romeis B. *Mikroskopische Technik*. Urban & Schwarzenberg Verlag, München Wien Baltimore 1989
156. Rossa V, Sundmacher R, Schmitt-Gräff A, Heering P. Klinischer Krankheitsverlauf, histologische Befunde und therapeutische Probleme bei einem Patienten mit einem beidseitigen Ulcus rodens Mooren. *Klin Mbl Augenheilk* 1991; 199:165-169
157. Rossa V, Sundmacher R. Lokale Interferonprophylaxe einer "epidemischen" Konjunktivitis durch ein bislang nicht identifizierbares Virus. *Klin Monatsbl Augenheilk* 1991; 199:192-194

158. Ruzicka T, Assmann T, Homey B. Tacrolimus: the drug for the turn of the millennium? *Arch Dermatol* 1999; 135,5:574-580
- 158a. Ryffel B. The carcinogenicity of ciclosporin. *Toxicology* 1992; 73:1-22
159. Sadahira Y, Kumori K, Mikami Y. Posttransplant malignant lymphoma with monoclonal immunoglobulin gene rearrangement and polyclonal Epstein-Barr virus episomes. *J Clin Pathol* 2001; 54:887
160. Samara Z, Zavaro A, Barishak Y et al. Vernal keratokonjunctivitis: The significance of immunoglobulin E levels in tears and serum. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1984; 74:158
161. Sampedro A, Urdiales G, Martinez A, Rieza J, Hardison D. Prognostic value of DNA image cytometry in colorectal carcinoma. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 1996; 18,3:214-220
162. Sandberg A. The chromosomes in human cancer and leukemia. New York, Amsterdam, Oxford: Elsevier, 1990
163. Sandritter W, Fischer R. Der DNS-Gehalt des normalen Plattenepithels und des invasiven Carcinoms der Portio. In: Proceedings of the First International Congress of Exfoliative Cytology. Philadelphia: Lippincott, 1961: 189-195
164. Schaap OL, Feltkamp TE, Breebart AC. Circulating antibodies to corneal tissue in a patient suffering from Mooren's ulcer (ulcus rodens corneae). *Clin Exp Immunol* 1969; 5:365-370
165. Scheer S, Touzeau O, Boderie V, Laroche L. Immunosuppression in corneal transplantation. *J Fr Ophthalmol* 2003; 26,6:637-47
166. Scheifele C, Schlechte H, Bethke G, Reichart PA. Nachweis von TP53-Mutationen mittels Exfoliativzytologie (brush biopsy) oraler Leukoplakien. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2002; 6:410-414
167. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK 506. *Immunol Today* 1992; 13,4:136-142
168. Secchi A, Tognon S, Leonardi A. Topical Use of Cyclosporine in the Treatment of Vernal Keratoconjunctivitis. *Amer J Ophthalmol* 1990; 110:641-645
169. Sen DK, Sarin GS. Immunoglobulin concentrations in human tears in ocular diseases. *Br J Ophthalmol* 1979; 97:671
170. Shaikh S, Ta CN. Evaluation and management of herpes zoster ophthalmicus. *Am Fam Physician* 2002; 66,9:1723-30

171. Shields CL, Shields J. Tumors of the Conjunctiva and Cornea. *Surv Ophthalmol* 2004; 49,1:3-24
172. Shields CL, Naseripour M, Shields JA. Topical mitomycin C for extensive, recurrent conjunctival-corneal squamous cell carcinoma. *Am J Ophthalmol* 2003; 135,1:122-3
173. Shihab FS. Cyclosporine nephropathy: pathophysiology and clinical impact. *Semin Nephrol* 1996; 16:536-547
174. Shimada S, Katz SI. The skin as an immunologic organ. *Arch Pathol Lab Med* 1988; 112:231-234
175. Sigal NH, Dumont FJ. Cyclosporin A, FK-506, and rapamycin: pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:519-560
176. Siitinen SM, Kallioieniemi OP, Helin HJ, Isola JJ. Prognostic value of cells with more than 5c DNA content in node-negative breast cancer- as determined by image cytometry from tissue sections. *Hum Pathol* 1993; 24,12:1348-1353
177. Solch S. Safety and tolerability of two percent Cyclosporine (sandimmun) ophthalmic ointment in normal volunteers. *J Ocul Pharmacol* 1991; 7:301-312
178. Soter NA, Fleischer AB Jr, Webster GF, Monroe E, Lawrence I. Tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in adult patients: part II, safety. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44,1:39-46
179. Soter NA, Fleischer AB Jr, Webster GF. Tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in adultpatients: part II, safety. *J Am Acad Dermatol* 2001; 44:39
180. Stammen J, Althaus C, Sundmacher. Ulcus Mooren. Vier verschiedene beidseitige Verläufe unter systemischer Cyclosporin A Therapie. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1997; 211:306-311
181. Ständer S, Luger T A. Antipruritische Wirkung von Pimecrolimus und Tacrolimus. *Hautarzt* 2003; 54:413-417
182. Starr CE, Pavan-Langston D. Varicella-zoster virus: mechanisms of pathogenicity and corneal disease. *Ophthalmol Clin North Am* 2002; 15:7-15
183. Stütz A, Grassberger M, Meingassner JG. Entstehungsgeschichte und präklinisches Profil von Pimecrolimus. *Hautarzt* 2003; 54:405-412
184. Sundmacher R, Hillenkamp J, Reinhard T. Perspektiven von Therapie und Prophylaxe der Adenoviruskeratokonjunktivitis. *Ophthalmologie* 2001; 98:991-1009
185. Sundmacher R, Reinhard T, Althaus C. Homologous central limbo-keratoplasty in limbus stem cell damage. Retrospective study of 3 years' experience. *Ophthalmologie* 1997; 94, 12:897-901

186. Sundmacher R, Reinhard T, Heering P. Six years' experience with systemic Cyclosporin A prophylaxis in high-risk perforating keratoplasty patients. *Ophthalmologie* 1992; 1:432-436
187. Sundmacher R, Reinhard T. Central corneolimbal transplantation under systemic cyclosporin A cover for severe limbal stem cell insufficiency. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996; 234: 122-125
188. Sundmacher R, Reinhard T. Cyclosporin A in perforating keratoplasty. *Cesk Slov Oftalmol* 1995; 51,5:271-6
189. Sundmacher R, Stefansson A, Mackensen G. Verlaufsbeobachtungen nach Keratoplastik. *Fortschr Ophthalmol* 1983; 80:224-227
190. T.Remmerbach. Innovations report, Forum für Wissenschaft, Industrie und Wirtschaft „Neues Verfahren zur Krebsfrüherkennung“ vom 03.04.2002
191. Tabbara KF, Ostler HB, Dawson C, Oh J. Thygeson's superficial punctate keratitis. *Ophthalmology* 1981; 88,1:75-77
192. Tabrizi SN, McCurrach FE, Drewe RH, Borg AJ, Garland SM, Taylor HR. Human papillomavirus in corneal and conjunctival carcinoma. *Aust N Z J Ophthalmol* 1997; 25,3:211-5
193. Taieb A, Boralevi F. New treatments of atopic dermatitis. *Arch Pediatr.* 2005; 12,4:491-497
- 193a. Tetz M, Klein U, Völcker H. Staphylokokken-assoziierte Blepharokeratokonjunktivitis. *Ophthalmologie* 1997; 94:186-190
194. Thaci D. Langzeitmanagement des atopischen Ekzems bei Kindern mit Calcineurininhibitoren. *Der Hautarzt* 2003; 54:418-423
195. Theng J, Zhou L, Tan D, Lam K. Distribution of Cyclosporine A in the Cornea after Topical or Oral Administration. *J Ocul Pharmacol Ther* 2002; 18, 1:83-88
196. Thygeson P. Superficial punctate keratitis. *Medical Association* 1950; 144:1544-1549
197. Tran U. Human corneal levels of topically applied immunosuppressants. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:858
198. Trosko JE, Krause D, Isoun M. Sunlight-induced pyrimidine dimers in human cells in vitro. *Nature* 1970; 228:358
199. Tuft SJ, Kemeny M, Kart JKG et al. Clinical features of atopic keratokonjunktivitis. *Ophthalmology* 1991; 98:150
200. Vahlme A, Larsson PA, Horal P, Ahlmen J, Svennerholm B. Inhibition of herpes simplex virus production in vitro by Cyclosporin A. *Arch Virol* 1992; 122:61-75

201. van Bijsterveld OP, Mansour KH, FJ. Thygeson's superficial punctate keratitis. *Ann Ophthalmol* 1985; 17,2:150-3
202. Van Dessel P, Parys-van Ginderdeuren R, Foets B. Invasive squamous cell carcinoma of the conjunctiva. *Bull Soc belge Ophthalmol* 2000; 278:43-47
203. Wang K, Zhang H, Li Y, Wei Q, Li H, Yang Y, Lu Y. Safety of mycophenolate mofetil versus azathioprine in renal transplantation: a systematic review. *Transplant Proc* 2004; 36,7: 2068-70
204. Wittekind C, Klimpfinger M, Sobin LH. TNM-Atlas 5. Auflage. Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio 2005
205. Womack LW, Liesegang TJ. Complications of herpes zoster ophthalmicus. *Arch Ophthalmol* 1983; 101,1:42-45
206. Wright TC, Kurmann RG, Ferenczy A. Precancerous lesions of the uterine cervix. In: Blaustein's pathology of the female genital tract. Kurmann R (Hrsg.), New York: Springer Verlag 1994: 229-277
207. Yarosh DB, Pena AV, Nay SL, Canning MT, Brown DA. Calcineurin Inhibitors Decrease DNA Repair and Apoptosis in Human Keratinocytes Following Ultraviolet B Irradiation. *J Invest Dermatol* 2005, 125:1020-1025
208. Yokota K, Gill TJ 3rd, Shinozuka H. Effects of oral versus topical administration of cyclosporine on phorbol ester promotion of murine epidermal carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49:4586
209. Zhang E, Schulte F, Bulfone-Paus S, Hoffmann F. The effect of corticosteroid and Cyclosporin A on murine corneal allograft rejection. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000; 238:525-530
210. Zhao JC, Jin XY. Immunological analysis and treatment of Mooren's ulcer with cyclosporine A applied topically. *Cornea* 1993; 12:481-488
211. Zwarenburg TSB, Suter W, Matter BE. Absence of genotoxic potential for cyclosporine in experimental systems. *Transplant Proc* 1988; 20:435-437
212. Zylka-Menhorn V. Bedenkliches Marketing für Zytoautomaten. *Deutsches Ärzteblatt* 94, Heft 44 vom 31.10.1997

7. Danksagung

Die Danksagung gilt vor allem dem Personal der Augenklinik. Insbesondere danke ich Frau Riedel aus der Augenambulanz, die mir stets in organisatorischen Tätigkeiten bereitwillig zur Seite stand. Ebenso dem Pflegepersonal, v.a. Herrn Korf, allen Assistenzärzten, die mir bei den Untersuchungen und den Abstrichen mit Rat und Tat zur Seite standen, allen Oberärzten/-innen, v.a. Herr Dr. med. Stammen und Frau Dr. med. Spelsberg, die viele Patienten selbst untersucht bzw. begutachtet haben und sich die Zeit dafür nehmen konnten.

Ich danke der Kodoktorandin, meiner Verlobten Mareike Braun, ohne die ich sicherlich diese wissenschaftliche Arbeit nicht abgeschlossen hätte und die mir in vielen fachlichem Problemen und der Organisation geholfen hat. Weiterhin Herrn Dr. med. D. Böhringer, mit dessen Mithilfe wir die statistischen Ergebnisse, Berechnung und Planungen der Datenbanken bewerkstelligt haben. Besonders danke ich meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. T. Reinhard, der immer für alle fachlichen Fragen zur Verfügung stand.

Weiterhin möchte ich dem Direktor des zytopathologischen Institutes, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. A. Böcking, seinen Mitarbeitern, sowie dem Direktor der Universitäts-Augenklinik Düsseldorf, Herrn Univ.-Prof. Dr. med. R. Sundmacher und seinen Mitarbeitern danken, die uns die Möglichkeit gegeben haben, in der Universitäts Augenklinik Düsseldorf diese Arbeit durchzuführen.

Nicht zuletzt danke ich auch meinem ehemaligem Gymnasiallehrer, Herrn Hensel, der in mühevoller Kleinarbeit viele Ausdrucks- und Rechtschreibfehler dieser Arbeit korrigiert hat.

Danke sagen möchte ich natürlich auch meiner Familie, dass sie mir mein Studium in dieser Art ermöglicht und mir immer zur Seite steht.

8. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Bartosz Wojanowski
Wohnort: Am Botanischen Garten 12, 40225 Düsseldorf
Geburtstag/-ort: 28.07.1979/ Rzeszow (Polen)
Familienstand: ledig
Konfession: katholisch

Schulbildung

1986 – 1990 Grundsule, Gelsenkirchen
1990 – 1999 Bertha-von-Suttner-Gymnasium, Oberhausen
07.05.1999 Abitur

Zivildienst

26.07.99 – 29.08.99 Rettungsanitärausbildung Landesrettungsschule DRK, Düsseldorf
30.08.99 – 30.07.00 Zivildienst als Rettungsanitäter, Oberhausen

Hochschulstudium

10/ 00 – 10/ 06 Studium der Humanmedizin
Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
August 2002 Ärztliche Vorprüfung
August 2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
August 2005 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Herbst 2006 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

17.10.05 – 05.02.06 Neurochirurgie, Universitätsklinik Düsseldorf
06.02.06 – 28.05.06 Hämatookologie und Rheumatologie, Universitätsklinik Düsseldorf
01.06.06 – 03.09.06 Unfallchirurgie, Universitätsspital Zürich, Schweiz

Düsseldorf, im Frühjahr 2007

9. Zusammenfassung

Sicherheit von lokalem Cyclosporin A bei entzündlichen Erkrankungen von Hornhaut und Bindehaut

Hintergrund: Zur Behandlung von chronisch entzündlichen Erkrankungen der Hornhaut und Bindehaut mit CSA-Augentropfen existiert momentan keine für den Langzeiteinsatz geeignete Alternative. In dieser Studie wurde die mögliche Kanzerogenität einer Langzeitbehandlung an 71 Patienten, mit zehn unterschiedlichen Erkrankungen der Horn- und Bindehaut klinisch und zytologisch untersucht, um daraus auf eine Zeitspanne eines Kontrollintervalls zu schließen.

Patienten und Methoden: An insgesamt 125 Augen konnte ein Bindehautabstrich gewonnen und zytologisch ausgewertet werden. Die lokale CSA Behandlungsdauer betrug durchschnittlich 26,0 Monate ($\pm 24,5$), die durchschnittliche Nachbeobachtungszeit lag bei 57,7 Monaten ($\pm 28,1$), die durchschnittliche Tropfenzahl bei $2295,7 \pm 2683,3$ und das Durchschnittsalter bei 43 Jahren. Bei fast allen Patienten wurde die Therapie zunächst mit 2%igem CSA begonnen und dann nach einer ersten Besserung gegen das 1%ige CSA ausgetauscht.

Ergebnisse: Bei 69 Patienten konnten in der zytologischen Untersuchung keine bösartigen Zellen nachgewiesen werden. Jeweils das rechte Auge von 2 Patienten zeigte zytologisch und DNA-zytometrisch nachgewiesene conjunctivale intraepitheliale Neoplasien. Beide Patienten litten an einer Blepharokeratokonjunktivitis atopica und erhielten zusätzlich systemische Immunsuppression in der Vorgeschichte.

Diskussion: Die Inzidenz von Malignomen in dieser Untersuchung ist höher als in der Allgemeinbevölkerung. Beide betroffenen Patienten wiesen mit Atopie und systemischer Immunsuppression jeweils zwei etablierte Risikofaktoren für das Entstehen einer CIN der Konjunktiva auf. Ergebnisse aus systematischen Screeninguntersuchungen bei Atopie liegen momentan noch nicht vor.

Schlussfolgerung: Ein Ausschluss der Kanzerogenität von lokalem Cyclosporin A, bei Patienten mit Blepharokeratokonjunktivitis atopica, konnte nach einem mittleren Beobachtungszeitraum von etwa vier Jahren durch Bindehautabstrichkontrollen nicht erbracht werden. Dazu sind längere Beobachtungszeiträume erforderlich. Regelmäßige zytologische Kontrollen an Bindehautabstrichen, gegebenenfalls ergänzt durch eine DNA-Zytometrie, scheinen jedoch ein geeignetes Mittel zu sein, um maligne Transformationen frühzeitig zu erkennen. Diese sollten bei Patienten mit Blepharokeratokonjunktivitis atopica, die zusätzlich zur lokalen CSA-Therapie auch systemische Immunsuppressiva erhalten, alle drei Monate, ohne diese alle sechs Monate stattfinden. Bei allen anderen entzündlichen Erkrankungen ist eine jährliche Kontrolle ausreichend.

10. Anhang, Anlagen

Anlage 1


HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT
DÜSSELDORF
UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Augenklinik und LIONS Hornhautbank Nordrhein-Westfalen
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Direktor Universitätsprofessor Dr. med. R. Sundmacher

Universitäts-Augenklinik, Postfach 101007, 40001 Düsseldorf, Prof. Dr. med. T. Reinhard

Moorenstraße 5
40225 Düsseldorf

Telefon 0211 / 81-18795
Telefax 0211 / 81-18796

E-Mail thomas.reinhard@uni-duesseldorf.de

Für die Sicherheit und Gesundheit Ihrer Augen

Sehr geehrter Herr...,
Sehr geehrte Frau...,

Sie haben in dem Zeitraum von... bis... von uns Cyclosporin A Augentropfen bekommen.

Nunmehr führen wir eine Untersuchung durch, die die Langzeitsicherheit von Cyclosporin A auf die Augen prüft.

Dabei handelt es sich um eine unverzichtbare Kontrolle Ihrer Augen. Diesbezüglich möchten wir Sie auch bitten, den umseitigen Fragebogen auszufüllen und zur Untersuchung mitzubringen, oder vorher zurückzusenden.

Weitere Informationen entnehmen Sie bitte dem beigegefügtten Blatt und klären offen gebliebene Fragen unter der oben genannten Telefonnummer.

Ihr persönlicher Beitrag trägt zur weiteren Verbesserung der Therapie und Nachsorge Ihrer und zukünftiger Augenerkrankungen bei.

Mit freundlichen Grüßen

Cyclosporin A bei entzündlichen Erkrankungen des Auges

Patientenaufklärung

Name des Patienten.....

Geburtsdatum.....

Das Aufklärungsgespräch erfolgte am.....

Durch.....

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Sie haben wegen einer entzündlichen Erkrankung im vorderen Augenabschnitt lokales Cyclosporin A erhalten. Theoretisch ist hierdurch die Entstehung bösartiger Tumoren der Augenoberfläche denkbar. Als Sicherheitsmaßnahme bieten wir Ihnen die Teilnahme an dieser Studie an.

Es ist Ziel dieser Studie, die Risiken einer lokalen Cyclosporin A Therapie besser einschätzen zu können. Hierzu werden im Rahmen einer Untersuchung des Auges unter lokaler Betäubung Abstriche der Bindehaut entnommen und zytopathologisch unter einem Mikroskop untersucht. Bei dem Abstrich werden nur oberflächliche Zellen der Bindehaut mit einer feinen Bürste abgelöst. Hierdurch kann selten ein Fremdkörpergefühl entstehen. Weitere Nebenwirkungen sind bei Abstrichen bei einer vierstelligen Zahl von Patienten bisher nicht bekannt geworden. Im Rahmen dieser Studie werden keine zusätzlichen Maßnahmen erforderlich.

Ihre Teilnahme an der Studie ist selbstverständlich freiwillig. Falls Sie an der Studie teilnehmen wollen, unterschreiben Sie bitte die beiliegende Einwilligungserklärung. Sie können zu jedem Zeitpunkt und ohne Rechtfertigung Ihre Einverständniserklärung zurückziehen. Diese Entscheidung hat keinen Einfluss auf die Qualität Ihrer weiteren Behandlung und beeinflusst auch nicht das Verhältnis zu Ihrem Arzt. Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Universität, die Ihre Patientenrechte überwacht, begutachtet und genehmigt. Sollten Sie zu einem späteren Zeitpunkt noch Fragen zur Studie haben, stehen Ihnen die behandelnden Ärzte gerne zur Verfügung.

Die während der Untersuchung von den an der Studie beteiligten Ärzten erhobenen Daten werden vertraulich behandelt. Die Daten werden so gespeichert und ausgewertet, dass kein Außenstehender Einsicht in Ihre persönlichen Daten nehmen kann, da diese nur den in der Klinik tätigen Ärzten zugänglich sind.



UniversitätsKlinikum Augenklinik

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Sundmacher

Cyclosporin A bei entzündlichen Erkrankungen des Auges

Einwilligungserklärung

Name des Patienten.....

Geburtsdatum.....

Ich bestätige, dass ich von dem unterschreibenden Arzt

1. Über die Art, die Bedeutung und den Umfang dieser Studie informiert wurde. Ich habe die Patientenaufklärung gelesen und verstanden.
2. Meine Teilnahme an dieser Studie ist freiwillig. Ich kann meine Einwilligung jederzeit und ohne irgendeine Begründung oder gar Benachteiligung zurückziehen.
3. Ich stimme einer Speicherung und elektronischen Verarbeitung meiner anonymisierten Daten im Rahmen dieser klinischen Studie zum Zwecke wissenschaftlicher Auswertung zu.

Datum und Unterschrift des Patienten.....

Datum und Unterschrift des Arztes.....

Gyn/CIN; CERVIX/PORIO: 52(CIN), 53, 56, 61 (GYN allg.), 63 (CIN), 71 (CIN), 74 (Cervix, Portio), 75 (Cervix CA), 77 (Cervix)
→ 52, 53, 56, 61, 63, 71, 74, 75, 76, 77

colon 105
Bronchial-[56, 110, 168]
brustkrebs 106
larynx 107
prostata 108
oral cancer: 51, 55, 64, 169, 170, 171
leukoplakie: 54
melanom cornea: 50
Färbung: 69
PAP Färbung: 191
DNA-Bildzytometrie: 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 59, 60, 61, 63, 64, 67, 68, 72, 140, 142, 143
Kritik an DNA-Zytoautomaten: **65**
allg. Zytologie: 42
spez. Zytologie 50, 55

Aneuploidie: 58, 73, 74
Bestrahlung und Mitomycin C → DNA Polyploidy 79, 141

pimecrolimus 81, 88, 89, 91
tacrolimus 82, 88, 89

bindehauttumor 85, 202
DD Akanthom 86,
Zytologie: 42, 49 bis 61, 63, 64, 67-79

lokales CSA kann nicht **Haut penetrieren**: 12, 115, 116 aber muß da [9, 12, 149, 150].
gegen Kanzerogenität von lokalem CSA: 93, 94
gegen Kanzerogenität von Tacrolimus und Pimecrolimus: 80,81, 82, 83, 88
für Kanzerogenität von lokalem CSA: 90 164, 165 (FDA),
für Kanzerogenität von systemischem CSA: 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104
gegen Kanzerogenität von lokalen Glukokortikoiden: 95
für Kanzerogenität von systemischen Glukokortikoiden: 95

Effektivität von CSA: 13, 14, 125, 129, 137 (bei Thygeson), 135 (Mooren), 153, 6, 4, 136, 160 (vernalis), 138, 161 (als Virostatikum bei HSV), 11, 48 (nummuli), 146 (sicca), **13**, 3
Effektivität von FK-506: 1, 10
Effektivität von Cortison: 162 (bei vernalis)
Rezidivrate niedriger bei Csa als bei Kortison: 45
CSA mit Erfolg bei Augenentzündungen: 3, 4, 6, 11, 13, 14, 48, 125, 129, 135, 136, 137, 138, 146, 153, 160, 161

Aufgaben

PB

- Tab. 4.1. und 4.2. → warum DNA aneuploid schreiben, wenn keine DNA Zytometrie durchgeführt wurde?
-
- Bilder vergrößert und mit Pfeilen versehen
- Korrekturen vorgenommen
- Zeilenabstände abstimmen, unter den Abb. Kursive Schrift!
- Namen rausgenommen
-