

Aus der Augenklinik und Poliklinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. A. Kampik

**Immunhistologische Analyse der inneren Grenzmembran bei
idiopathischen, rezidivierenden und sekundären Makulaforamen
in der Chirurgie der Netzhaut**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Martin Scheerbaum

aus Leinefelde

2014

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med. Ricarda G. Schumann

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Carl-Ludwig Schönfeld
Prof. Dr. med. Siegfried G. Priglinger

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2014

I. Gliederung

1. Einführung	7
1.1 Einleitung und Zielsetzung	7
1.2 Grundlagen	9
1.2.1 Vitreoretinale Grenzfläche	9
1.2.2 Glaskörper	10
1.2.3 Altersbedingte hintere Glaskörperabhebung	11
1.3 Makulaforamen	13
1.3.1 Stadieneinteilung nach Gass	13
1.3.2 Pathogenese	14
1.3.3 Diagnosestellung	19
1.3.4 Chirurgische Therapie	22
1.4 Präparation der inneren Grenzmembran	23
1.4.1 Neue Flachpräparation und konventionelle Serienschnittpräparation	23
1.4.2 Immunhistologische Untersuchung am Flachpräparat	23
1.4.3 Zellspezifische Antigene epiretinaler Zellproliferationen	24
2. Patienten und Methoden	26
2.1 Patientenkollektiv	26
2.1.1 Retrospektive Analyse der Daten	26
2.1.2 Operatives Vorgehen	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Flachpräparation	28
2.2.2 Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie	28
2.2.3 Immunhistologie	28
2.3 Fotodokumentation	31
2.5 Statistische Analyse	31
2.5 Materialien	32
2.5.1 Reagenzien und Rezepturen	32
2.5.2 Laborausstattung	32

3.	Ergebnisse	39
3.1	Deskription des Patientenkollektivs	39
3.1.1	Idiopathische Makulaforamen	39
3.1.2	Rezidivierende Makulaforamen	41
3.1.3	Sekundäre Makulaforamen	42
3.2	Analyse der Zellverteilung in Präparaten der inneren Grenzmembran	43
3.2.1	Zellverteilung in idiopathischen Makulaforamen	45
3.2.2	Zellverteilung in rezidivierenden Makulaforamen	46
3.2.3	Zellverteilung in sekundären Makulaforamen	47
3.2.4	Vergleich nach Grunderkrankung	48
3.3	Analyse Zell-spezifischer Antigene in Präparaten der inneren Grenzmembran	54
3.3.1	Lokalisation Zell-spezifischer Antigene	54
3.3.2	Co-Lokalisation Zell-spezifischer Antigene	55
4.	Diskussion	60
4.1	Flachpräparation der inneren Grenzmembran	60
4.2	Zellzahl und Zellverteilung in Präparaten der inneren Grenzmembran	61
4.3	Immunhistologische Färbung zellspezifischer Antigene	63
4.4	Nachweis von Hyalozyten	64
4.5	Co-Lokalisationen von Gliazellen und Hyalozyten	64
4.6	Kontraktile Komponenten epiretinaler Zellproliferationen	65
4.7	Schlussfolgerungen	66
5.	Zusammenfassung	68
6.	Literaturverzeichnis	70
7.	Anhang	79

8. Publikation	80
9. Danksagung	82
10. Lebenslauf	83
11. Ehrenwörtliche Erklärung	86

II. Abkürzungsverzeichnis

α –SMA	α -Aktin Filament (α -smooth-muscle-actin)
CE	Kataraktextraktion
CytokeratinPan	Cytokeratin 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 und 19
DAPI	Fluoreszenzfarbstoff: 4',6-Diamidin-2-phenylindol
ERM	Epiretinale Membranen
GFAP	fibrilläres saures Gliaprotein (engl.: glial fibrillary acidic protein)
HKL	Hinterkammerlinse
ILM	Membrana limitans interna (engl.: inner limiting membrane)
IMF	Idiopathisches Makulaforamen
MMHS	Moorfields Macular Hole Study
OCT	Optische Kohärenztomografie
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (engl.: periodic acid-Schiff reaction)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PBTA	Protein bindender Transkriptionsaktivator (engl.: protein-binding transcriptional activator)
ppV	Pars Plana Vitrektomie
PTP	Tyrosinphosphatase-Proteine
RMF	Rezidivierendes Makulaforamen
SMF	Sekundäres Makulaforamen
VMHS	Vitrektomie for Macular Hole Study

1. Einführung

1.1 Einleitung und Zielsetzung

Makulaforamen gehören zur Gruppe der traktiven Makulopathien, einer Gruppe von Netzhauterkrankungen die den Bereich des schärfsten Sehens betreffen. Sie zeichnen sich durch das Vorliegen von antero-posterior oder tangential gerichteten Zugkräften an der vitreoretinalen Grenzfläche aus.¹⁻⁵ Die vitreoretinale Grenzfläche ist die anatomische Grenze zwischen Glaskörper und Netzhaut. Hauptbestandteil der vitreoretinalen Grenzfläche ist die innere Grenzmembran, die Membrana limitans interna (ILM). Die Pathogenese der Makulaforamen ist eng verknüpft mit den altersbedingten Veränderungen des Glaskörpers und mit der Entstehung epiretinaler Membranen. Epiretinale Membranen (ERM) sind pathologische Zell- und Kollagenansammlungen an der Oberfläche der Netzhaut mit einer hohen Prävalenz in der Bevölkerung. Jeder Dritte über 45-Jährige weist funduskopisch sichtbare ERM auf.⁶ Von durchgreifenden Makulaforamen betroffene Patienten leiden unter einem massiven Sehverlust, der zu einer dauerhaften Sehbehinderung führen kann, die den Alltag erheblich erschwert.

Als einzige Therapiemöglichkeit bei Makulaforamen ergibt sich derzeit die operative Intervention. Zur Entlastung vitreoretinaler Traktionen wird dabei der Glaskörper während der Vitrektomie von der Netzhaut gelöst und die ILM von der Netzhautoberfläche mikrochirurgisch entfernt. Dieses sogenannte „Peeling“ der ILM zusammen mit pathologischem, epiretinalem Gewebe ist wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Therapie, da die ILM eine bedeutende Leitschiene für Zellproliferationen darstellen kann.

Es besteht jedoch Unklarheit darüber, welche Rolle die epiretinalen Zellproliferationen auf der ILM bei der Entstehung von Makulaforamen spielen und mit welcher Häufigkeit diese epiretinalen Zellansammlungen an der ILM auftreten. Ebenso unklar ist weiterhin, ob sich epiretinale Zellproliferationen bei idiopathischen, rezidivierenden und sekundären Makulaforamen unterscheiden. Derzeit wird angenommen, dass epiretinale Zellproliferationen sekundär im Rahmen von altersbedingten, pathologischen Veränderungen an der vitreoretinalen Grenzfläche entstehen. Sie könnten dabei im Verlauf zu Progression oder Rezidiv eines Makulaforamens führen. Mit Hilfe von licht- und elektromikroskopischen Präparationstechniken wurde in der Vergangenheit eine Vielzahl von Zelltypen in epiretinalen Zellproliferationen beschrieben. Dazu gehören Zellen retinalen und extra-retinalen Ursprungs

wie retinale Gliazellen (Makrogliazellen und Mikrogliazellen), Hyalozyten, retinale Pigmentepithelzellen, Fibroblasten und Myofibroblasten sowie Makrophagen.⁷⁻¹¹ Die genaue Zuordnung und die Herkunft epiretinaler Zellen wird jedoch erheblich durch eine Transdifferenzierung der Zellen im epiretinalen Zellverband erschwert, so dass Untersuchungen, die allein auf morphologischen Beschreibungen beruhen, keine ausreichende Differenzierung aller epiretinaler Zellen ermöglichen.

Bisher wurden für die Analyse von Präparaten der ILM und epiretinaler Zellproliferationen mehrheitlich konventionelle Serienschritte angefertigt. Die Flachpräparation der ILM ist eine neue Methode, die von Hisatomi und Mitarbeitern vorgeschlagen und durch Gandorfer und Kollegen modifiziert wurde.¹²⁻¹⁵ Die Flachpräparation erlaubt erstmals eine en face Perspektive auf chirurgisch gewonnene ILM-Präparate. Auf diese Weise können Aussagen über die tatsächliche Anzahl von Zellen, die Zelldichte und Zellverteilung in Präparaten der ILM bei Makulaforamen getroffen werden, die vorher mittels Serienschrittechnik nicht möglich waren. Des Weiteren erlaubt die Flachpräparation durch den Erhalt der Antigenität des Gewebes die Kombination verschiedener Untersuchungstechniken. In dieser Arbeit werden nachfolgend die Ergebnisse von phasenkontrast- und interferenzmikroskopischen sowie immunhistologischen Untersuchungen von ILM-Präparaten mittels Flachpräparation vorgestellt. Die Präparate wurden von Patienten mit idiopathischen Makulaforamen °III nach Gass, von Patienten mit sekundären sowie rezidivierenden durchgreifenden Makulaforamen chirurgisch während der Vitrektomie gewonnen und im Labor für Vitreoretinale Pathologie und Elektronenmikroskopie der Augenklinik der Universität München konsekutiv aufgearbeitet. Die vorliegende Arbeit stellt neue Ergebnisse über die Häufigkeit, die Verteilung und die Herkunft von epiretinalen Zellen an der ILM bei idiopathischen, sekundären und rezidivierenden Makulaforamen vor. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind für das pathogenetische Verständnis dieser Netzhauterkrankungen und für das Vorgehen in der Netzhautchirurgie bei Makulaforamen von wesentlicher Bedeutung.

1.2 Grundlagen

Die Membrana limitans interna (ILM), die innere Grenzmembran der Netzhaut, ist Hauptbestandteil der vitreoretinalen Grenzfläche, welche die anatomische Grenze zwischen Glaskörper und Netzhaut darstellt. Sie überträgt die traktiven Zugkräfte, die bei Makulaforamen durch altersbedingte Veränderungen des Glaskörpers und durch epiretinale Zell- und Kollagenansammlungen entstehen, auf tiefer gelegene Netzhautschichten.

1.2.1 Vitreoretinale Grenzfläche

Die ILM ist die Basalmembran der retinalen Müllerzellen und besteht in Anlehnung an den dreischichtigen Aufbau epithelialer Basalmembranen aus der Lamina lucida, der Lamina densa und der Lamina fibroelastica.^{1,16} Die retinalen Müllerzellen sind radiäre Gliazellen, die sich von der ILM bis zur äußeren Grenzmembran (Membrana limitans externa) erstrecken. Hauptbestandteil der ILM sind Kollagen IV, VI und XVIII sowie die Glykoproteine Laminin und Fibronectin.^{13,17} Die ILM liegt den Endplatten der Müllerzellen, die die retinale Nervenfaserschicht zur Glaskörperseite hin begrenzen, direkt an. Die Dicke der ILM und die Länge der Kollagenfibrillen der vitreoretinalen Grenzfläche variieren in den verschiedenen Regionen der Netzhaut. So sind die längsten Kollagenfasern in der Ora serrata und die kürzesten in der Makularegion zu finden. Die dem Glaskörper zugewandte Seite der ILM, die vitreale Seite, weist eine glatte Oberfläche auf, die retinale Seite der ILM zeigt hingegen charakteristische Undulierungen.^{17,18} Die unterschiedliche Oberflächenstruktur erlaubt in morphologischen Schnittpräparaten der ILM eine eindeutige topographische Zuordnung von vitrealer und retinaler Seite der ILM.

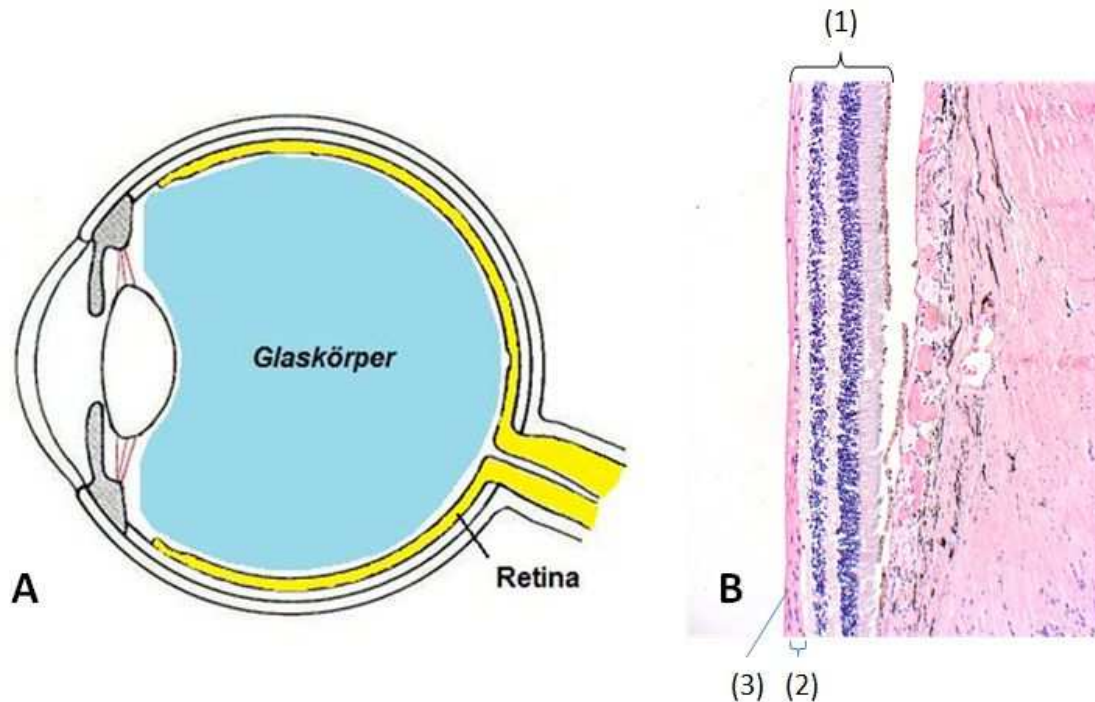


Abb. 1: A) Das menschliche Auge (eigene Schema-Zeichnung), B) Histologischer Schnitt durch die Retina mit Darstellung der Schichten der Retina (1) Retina, (2) retinale Nervenfaserschicht, (3) innere Grenzmembran, (Vergrößerung 40x); (Jubal Harshaw; <http://www.shutterstock.com/pic-16360507/stock-photo-a-microscopic-cross-section-of-a-mammalian-retina-showing-the-different-layers.html>)

1.2.2 Glaskörper

Der Glaskörper macht $\frac{4}{5}$ des kompletten Augenvolumens aus und befindet sich in der Camera postrema zwischen Linse und Retina. Zu 99% besteht er aus einer viskosen Flüssigkeit, dem sogenannten Humor vitreus, welcher neben Wasser (98% des gesamten Glaskörpervolumens) aus Hyaluronsäure, Ascorbinsäure und dem Proteoglykan Versican zusammengesetzt ist.¹⁹ Des Weiteren finden sich einzelne Hyalozyten, Fibroblasten und Makrophagen im Glaskörper.¹⁹⁻²¹ Diese sind selten und kommen vorwiegend in der Glaskörperrinde vor. Das Kollagenfasergerüst des Glaskörpergels, das sogenannte Stroma vitreum, wird durch die Kollagene Typ II, V, IX und XI gebildet. Kollagen Typ II macht dabei 80% des gesamten Glaskörperkollagens aus.²⁰

Das kollagene Netzwerk des Glaskörpers ist in den Randzonen dichter und an die Basallamina von Retina und Ziliarkörper angeheftet. Die Kollagenfasern dieser Glaskörperrinde verlaufen parallel zur Netzhaut und sind im Bereich des posterioren Pols durch eine Art „Zellkleber“ aus Fibronectin, Laminin, Opticin, Chondroitinsulfat und Heparansulfat mit der Netzhaut verbunden.¹⁷⁻¹⁹ Im Bereich der Ora serata strahlen die

Kollagenfasern des Glaskörpers jedoch radiär in die Netzhautschichten ein und bilden so eine feste, nicht lösbare Verbindung an der Glaskörperbasis.¹⁹ An diese Kollagenfasern sind Glykoproteine gebunden. Veränderungen im Kollagen- und Glykoproteingehalt des Glaskörpergels führen vermutlich zu einer Verflüssigung des Glaskörpers mit zunehmendem Alter.²² Damit verbunden ist die Entstehung einer hinteren Glaskörperabhebung von der Netzhaut.

1.2.3 Altersbedingte hintere Glaskörperabhebung

Mit zunehmendem Lebensalter verändert der Glaskörper seine gleichmäßige gelartige Struktur. Einerseits bilden sich Kollagenverdichtungen, andererseits entstehen flüssigkeitsgefüllte Lakunen.²⁰ Das Glaskörpergel schrumpft. Auch die ILM unterliegt altersbedingten Veränderungen, die zu einer Zunahme der Dicke und einer Abnahme der Elastizität der ILM führen sowie zu einer Abnahme von Laminin.^{23,24} Durch das Zusammenspiel der altersbedingten Veränderungen des Glaskörpers und der vitreoretinalen Grenzfläche wird eine altersbedingte hintere Glaskörperabhebung hervorgerufen.

Die altersbedingte hintere Glaskörperabhebung beginnt perifoveal ungefähr ab dem 40. Lebensjahr und setzt sich danach langsam über einen Zeitraum von Jahren in die Peripherie fort.²⁵ (Abb. 3) Dabei kann es zur Ausbildung vitreomakulärer oder vitreopapillärer Adhäsionen kommen, die antero-posterior oder tangential gerichtete Zugkräfte auf die Netzhaut ausüben. Oft ist die Stelle des schärfsten Sehens betroffen. Ort dieser vitreoretinalen Anheftungen ist die ILM. Bereits bei 70% aller 70 Jährigen und bei 85% aller 80-Jährigen liegt eine komplette hintere Glaskörperabhebung vor, bei der sich der Glaskörper komplett von der Netzhaut gelöst hat.²⁵ Liegen vitreoretinale Adhäsionen vor, spricht man von einer inkompletten oder partiellen hinteren Glaskörperabhebung.²¹ Wenn durch eine Abhebung des Glaskörpers Reste von Glaskörperkollagen der Glaskörperrinde an der Netzhaut verbleiben, spricht man von einer „anormalen“ hinteren Glaskörperabhebung, einer „Vitreoschisis“.²¹ Der Verbleib von Glaskörperkollagenfibrillen an der ILM ist mit der Entstehung pathologischer mehrschichtiger epiretinaler Membranen an der vitrealen Seite der ILM assoziiert, die ihrerseits eine Traktion auf die Netzhaut ausüben können.^{13,15}

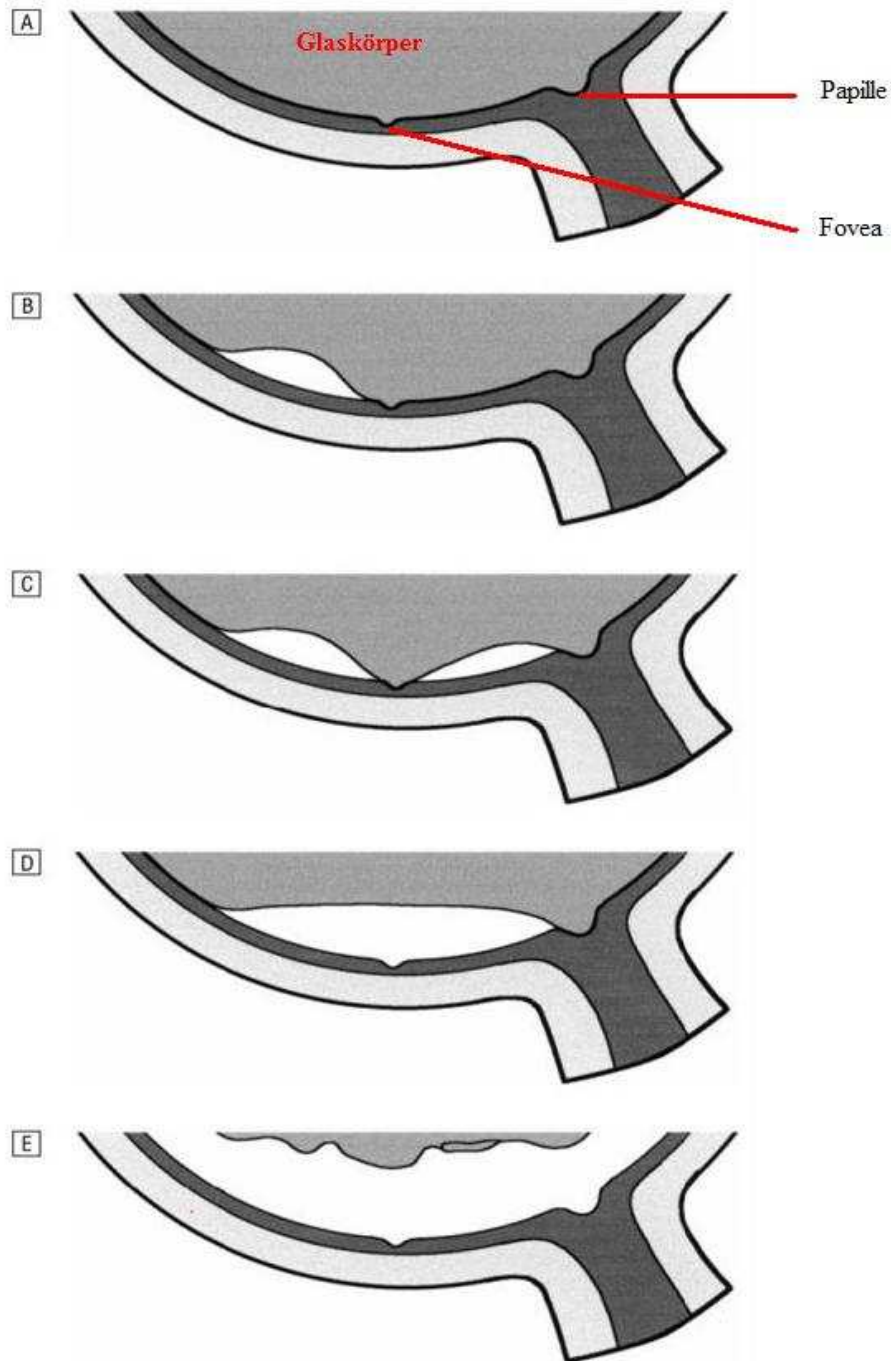


Abb. 2: Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge einer altersbedingten hinteren Glaskörperabhebung (PVD). A) Vitreoretinale Grenzfläche ohne PVD. B) Hintere Glaskörperabhebung im superioren Quadranten der Perifovea. C) Ausdehnung der Glaskörperabhebung über die gesamte Perifovea mit persistierender Anheftung an der Fovea sowie der Papille. D) Glaskörperabhebung auch über der Fovea mit vitreopapillärer Adhäsion. E) Komplette PVD. (Uchino E, Uemura A, Ohba N. Initial stages of posterior vitreous detachment in healthy eyes of older persons evaluated by optical coherence tomography. Arch Ophthalmol. 2001;119(10):1475-1479.)

1.3 Makulaforamen

Ein Makulaforamen ist definiert als Defekt der Retina im Bereich der Makula, der bis auf seltene Ausnahmen die Fovea betrifft.²⁶ Bei durchgreifenden Makulaforamen sind alle retinalen Schichten bis zum retinalen Pigmentepithel betroffen. Die Angaben über die Prävalenz der durchgreifenden Makulaforamen schwanken in der Literatur erheblich zwischen 0,02% und 0,33%.²⁷⁻²⁹ Idiopathische Makulaforamen treten bei Frauen ungefähr drei Mal häufiger auf als bei Männern.^{26,27}

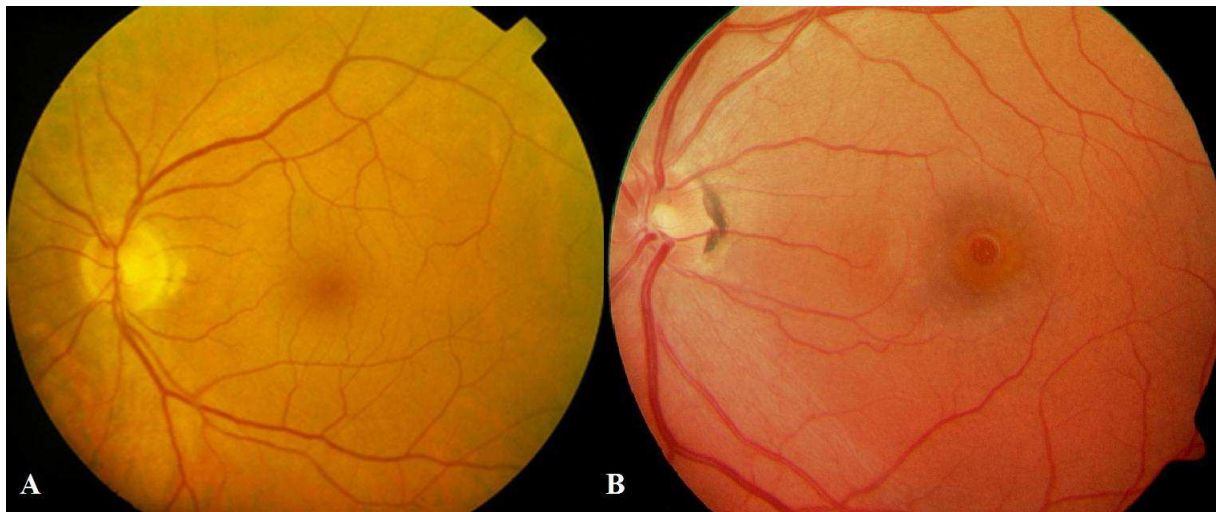


Abb. 3: Funduskopie. (A) Normalbefund. (B) Durchgreifendes Makulaforamen.

(Fotoarchiv der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München)

1.3.1 Stadieneinteilung nach Gass

Die häufigste Einteilung der Stadien eines durchgreifenden idiopathischen Makulaforamens ist die Einteilung nach Gass.^{5,30} Diese viel genutzte Klassifikation basiert auf biomikroskopischen Beobachtungen und hat im klinischen Alltag trotz neuer bildgebender Verfahren weiterhin Bedeutung:

- Makulaforamen °I: Dieses Stadium wird in die Stadien Ia und Ib unterteilt. Biomikroskopisch zeigt sich der Defekt als 50-100 µm großer, zentral gelegener gelber Punkt (Stadium Ia), der sich im Stadium Ib als vergrößernder gelber Ring darstellt.

- Makulaforamen °II: Dieses Stadium ist durch einen zentralen, foveolär gelegenen Netzhaut einriss beziehungsweise eine zunehmende Vergrößerung des Defektes von 200-400 µm charakterisiert.
- Makulaforamen °III: Dieses Stadium beschreibt einen vollständig durchgreifenden Defekt größer 400 µm, bei dem eine inkomplette hintere Glaskörperabhebung vorliegt.
- Makulaforamen °IV: Dieses Stadium beschreibt ein Makulaforamen größer als 400 µm mit einer kompletten hinteren Glaskörperabhebung. Als verlässlichstes Zeichen einer kompletten hinteren Glaskörperabhebung gilt dabei der Nachweis eines Weiss-Ringes.

1.3.2 Pathogenese

Ursprünglich wurde die Entstehung eines durchgreifenden idiopathischen Makulaforamens einem degenerativen Prozess zugeschrieben. Dabei wurde angenommen, dass die Lochentstehung auf eine vaskuläre Insuffizienz zurückzuführen sei.^{26,31,32} Später wurde erkannt, dass für die Entstehung idiopathischer Makulaforamen die Ausbildung einer vitreomakulären Traktion wichtige Voraussetzung ist.^{5,30,31,33} Der altersbedingten hinteren Glaskörperabhebung und der Entstehung persistierender vitreomakulärer und vitreopapillärer Adhäsionen kommt dabei eine wesentliche Bedeutung zu.^{31,34-40}

Seit der Einführung der Optischen Kohärenztomographie (OCT) ist die ursprüngliche Theorie von Gass zur Pathogenese durchgreifender idiopathischer Makulaforamen ergänzt worden.^{5,30} Vor allem Gaudric et al. hat 1999 auf der Grundlage neuer Erkenntnisse mittels OCT den Verlauf der Entstehung eines durchgreifenden idiopathischen Makulaforamens schematisch neu dargestellt.⁴¹ (Abb.4)

(A) Normale Fovea. Der hintere Glaskörper ist anliegend und durch eine unterbrochene Linie gekennzeichnet.

(B) Durch Glaskörpertraktion entsteht ein zystischer Raum innerhalb der Fovea. Perifoveal ist der Glaskörper von der Retina abgelöst. (Makulaforamen °I nach Gass)

(C) In der fovealen Zyste hat sich eine Dehiszenz entwickelt, die die Schichten so auseinander zieht, dass sich ein vollständig durchgreifender Makuladefekt entwickelt. (Makulaforamen °II nach Gass)

(D) Der Glaskörper ist inkomplett gelöst. Ein Pseudo-Operkulum hat sich herausgebildet. (Makulaforamen °III nach Gass)

(E) Der Glaskörper hat sich nun vollständig vom hinteren Pol der Netzhaut gelöst. (Makulaforamen °IV nach Gass)

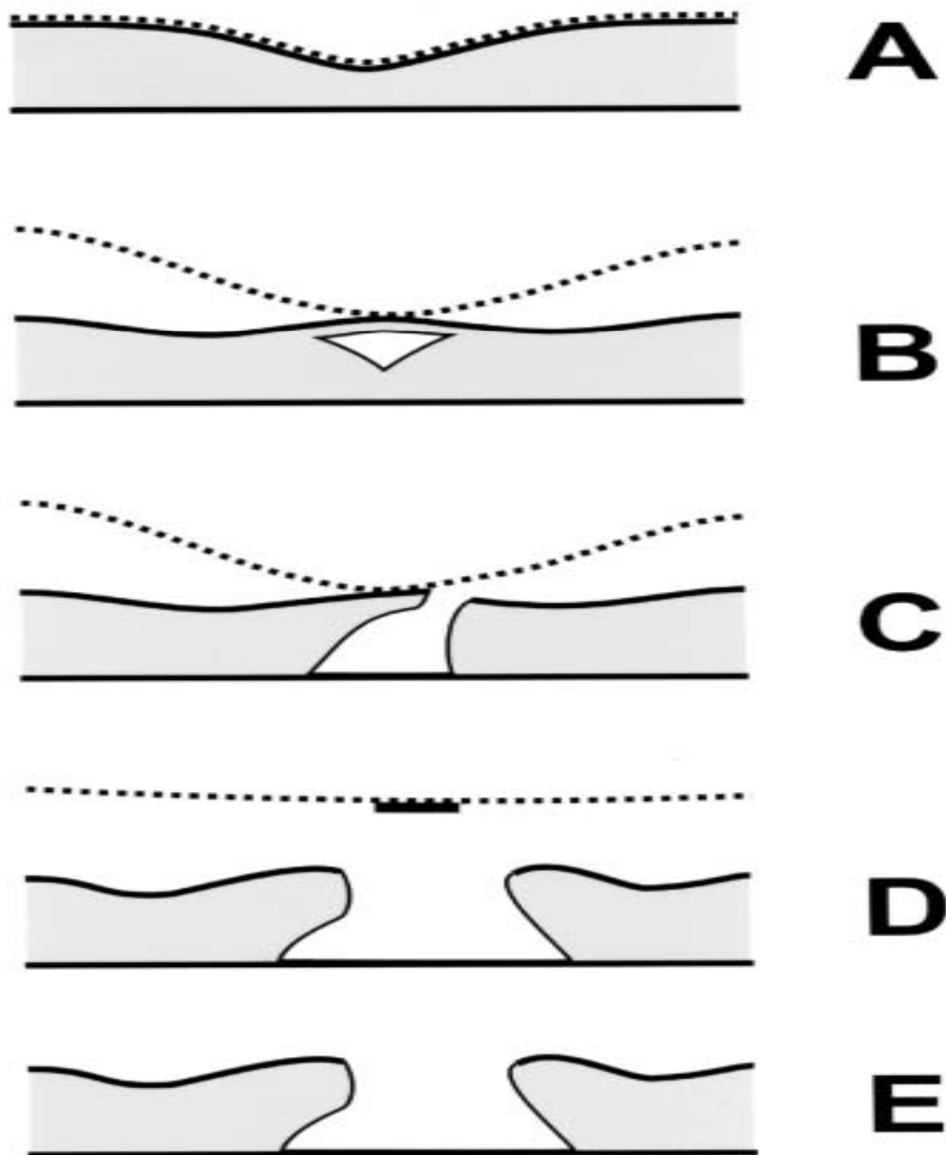


Abb. 4: Darstellung der Pathogenese eines Makulaforamens mittels OCT-Aufnahmen nach Gaudric et al.. (A) Diagramm einer normalen Fovea. Der hintere Glaskörper ist anliegend und durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. (B) Ein beginnendes Makulaforamen mit einem zystischen Raum innerhalb des fovealen Umbos. Perifoveal ist der Glaskörper von der Retina abgelöst. (entspricht Gass I) (C) Ein Makulaforamen °II nach Gass. In der fovealen Zyste hat sich eine Dehnschneise entwickelt, die die Schichten so auseinander zieht, dass sich ein durchgreifendes Makulaforamen entwickelt. (D) Ein durchgreifendes Makulaforamen °III nach Gass. Der Glaskörper ist nun vollständig losgelöst von der Makula jedoch nicht von der Papille. Ein kleines Pseudo-Operkulum hat sich herausgebildet. (E) Ein Makulaforamen °IV nach Gass. Der Glaskörper hat sich nun vollständig von der Retina gelöst. Meist ist auch ein Weiss-Ring in der Biomikroskopie sichtbar.

(La Cour M, Friis J. Macular holes: classification, epidemiology, natural history and treatment. Acta Ophthalmol Scand. 2002;80(6):579-587.)

Diese Darstellung von Gaudric et al.⁴¹ basiert auf OCT Untersuchungen und stellt die Bedeutung des Glaskörperstatus in der Diagnosestellung eines idiopathischen Makulaforamens heraus. Wesentlicher Unterschied zwischen der Einteilung nach Gass und der Darstellung von Gaudric et al. ist die Dokumentation des Vorliegens einer inkompletten bzw. kompletten hinteren Glaskörperabhebung.

Die Rolle epiretinaler Zell- und Kollagenansammlungen bei der Pathogenese idiopathischer Makulaforamen ist jedoch nicht vollständig geklärt. Sowohl die Herkunft epiretinaler Zellen als auch die Transdifferenzierung epiretinaler Zellen zu kontraktilen Myofibroblasten ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Es wird davon ausgegangen, dass retinale und extraretinale Zellen bei der Entstehung epiretinaler Membranen beteiligt sind.¹⁵ Vermutlich können aktivierte retinale Gliazellen von der retinalen auf die vitreale Seite der ILM migrieren und dort proliferieren.⁴² Aber auch Hyalozyten könnten bei der Entstehung epiretinaler Membranen eine wichtige Rolle spielen.^{15,43} Durch epiretinale Zell- und Kollagenansammlungen können tangential Traktionen an der vitreoretinalen Grenzfläche entstehen, die im Verlauf zur Ausbildung eines Makulaforamens beitragen.¹⁵

Die rezidivierenden Makulaforamen unterscheiden sich in ihrer Pathogenese durch einen bereits operativ entfernten Glaskörper von idiopathischen Makulaforamen. Dass bei Vorliegen eines Makulaforamens eine operative Intervention indiziert ist, haben verschiedene Untersuchungen seit Anfang der 1990er Jahre nachgewiesen.^{36,44,45} Als rezidivierend werden Makulaforamen bezeichnet, die nach der Vitrektomie als anatomisch geschlossen dokumentiert waren. Makulaforamen, die bereits wenige Tage oder Wochen nach der Vitrektomie nicht anatomisch verschlossen sind, werden als persistierend bezeichnet. Die Angaben über die Prävalenz von rezidivierenden oder persistierenden Makulaforamen schwanken in der Literatur erheblich. Durch ILM-Peeling während der Makulaforamen-Operation konnte in den letzten Jahren der Operationserfolg erheblich gebessert werden, so dass 95% der Makulaforamen erfolgreich nach der ersten Vitrektomie verschlossen bleiben.⁴⁶ Über Rezidive von Makulaforamen wurde jedoch auch nach vielen Jahren nach Operation berichtet.⁴⁷

Sekundäre Makulaforamen sind durch vorangehende Traumata oder Vorerkrankungen bzw. Voroperationen von den idiopathischen Makulaforamen abzugrenzen. Zu den Vorerkrankungen zählen beispielsweise zystische Makulaödeme, rhegmatogene Ablationes, Morbus Best, akzidentielle Exposition zu Laser-Strahlen/-Energien, Myopie, Verletzung

durch Blitzschlag sowie die proliferative diabetische Retinopathie.^{26,48-50} Bei den traumatischen Makulaforamen wird davon ausgegangen, dass eine direkte Kraftübertragung von den vorderen Augenabschnitten auf die Makula stattfindet und dies zu einer Ruptur der retinalen Schichten im Bereich der Fovea führt.⁵¹ Vitreoretinale Traktionen durch plötzliche Bulbuskompression spielen eine wichtige Rolle.⁵² Hochgeschwindigkeitsaufnahmen von stumpfen Traumata zeigten, dass es zunächst zu einer Eindellung der Kornea kommt. (Abb. 5) Anschließend expandiert die äquatoriale Zone des Auges bei gleichzeitiger Abflachung sowie Verlagerung des posterioren Poles. Diese trampolinartigen Bewegungen führen zu einer vitreoretinalen Traktion auf die Netzhaut.⁵¹⁻⁵³

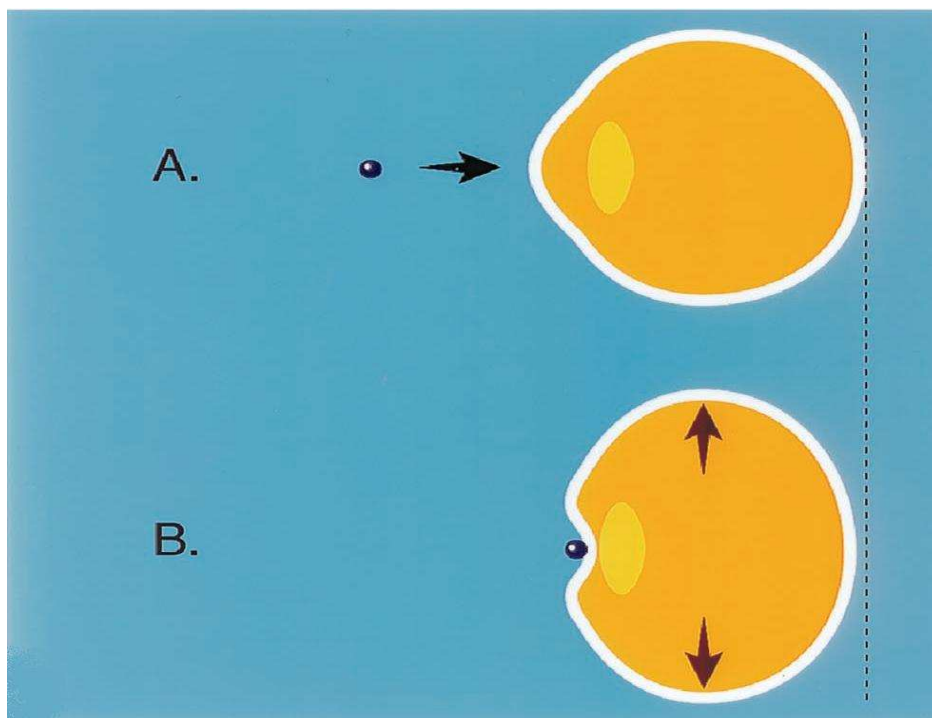


Abb. 5: Äquatoriale Ausbreitung des Bulbus als Reaktion auf eine stumpfe Kontusion.

(Johnson, R. N., H. R. McDonald, et al. (2001). "Traumatic macular hole: observations, pathogenesis, and results of vitrectomy surgery." *Ophthalmology* 108(5): 853-857.)

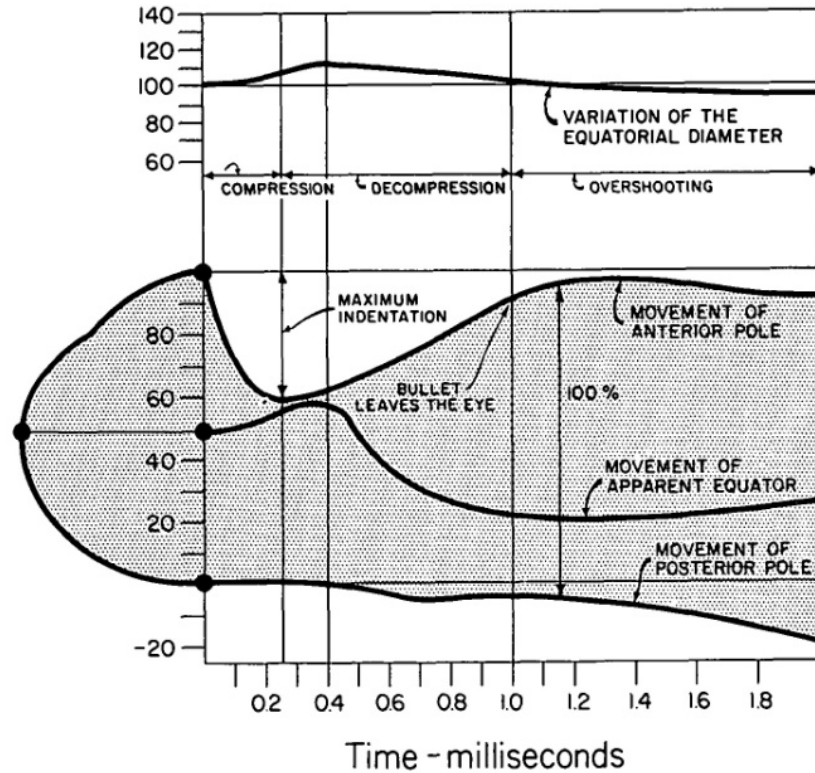


Abb. 6 Augendeformation während der ersten 1,9 Millisekunden. Ordinate: Dimensionen des Auges in Prozent vom Ausgangszustand. Abszisse: Zeit nach Aufschlag in Millisekunden. Der posteriore Pol ist auf dem Nullpunkt der Ordinate, während der anteriore Pol auf Punkt 100 projiziert ist.

(Delori, F., O. Pomerantzeff, et al. (1969). "Deformation of the globe under high-speed impact: it relation to contusion injuries." Invest Ophthalmol 8(3): 290-301.)

1.3.3 Diagnosestellung

Die Diagnose eines Makulaforamens basiert auf der biomikroskopischen Untersuchung entsprechend der Stadieneinteilung nach Gass.³⁰ Zur Diagnosestellung eines durchgreifenden Makulaforamens dient der Watzke-Allen-Test, der trotz neuer bildgebender Verfahren im klinischen Alltag weiterhin von Bedeutung ist. Bei dieser Untersuchung wird dem Patient ein schmaler Lichtspalt über den Defekt der Makula projiziert. Bemerkt der Patient eine Unterbrechung dieses Spalts, so gilt der Test als positiv.^{31,54-56}

Patienten mit durchgreifenden Makulaforamen verlieren massiv an Sehschärfe und berichten über Metamorphopsien und über zentrale Gesichtsfelddefekte.^{31,57} Erste Hinweise auf ein pathologisches Geschehen im Zentrum der Retina lassen sich bereits mit einfachen Selbsttests des Patienten gewinnen. Marc Amsler, ein schweizerischer Ophthalmologe, entwickelte zu

Beginn des 20. Jahrhunderts das nach ihm benannte Amsler-Gitter. Dabei handelt es sich um eine circa 40x40 cm Rastergitter mit einem mittig angebrachten Punkt, welchen der Patient monookulär fixieren muss. Physiologischerweise bleibt die Gitterstruktur des Rasters bei Fixation des mittleren Punktes erhalten. Bei Makulopathien mit Beteiligung der Fovea können sich die Gitterlinien verschieben.⁵⁸ Sollte der Patient eine Veränderung des Rasters bemerken, so ist eine weitergehende Diagnostik notwendig.

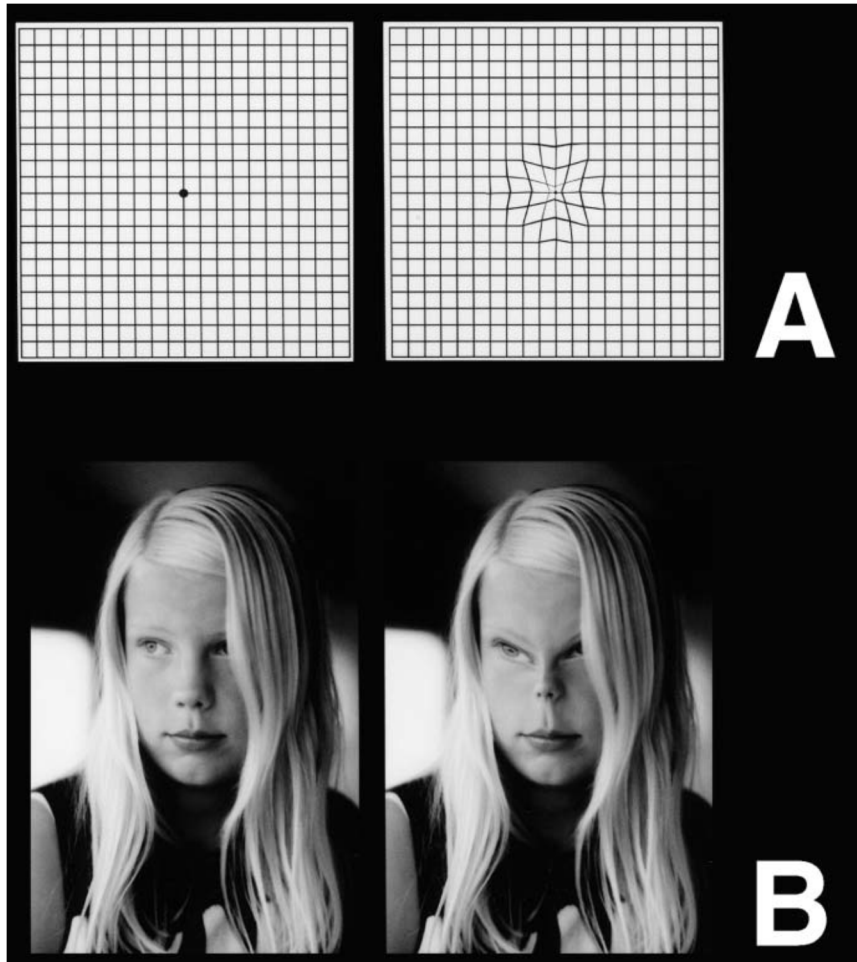


Abb. 7: Bild einer typischen *pincushion* Metamorphopsie. Links ist der physiologische Zustand zu sehen. Rechts sieht man die Abbilder, die durch eine *pincushion* Metamorphopsie entstehen. (A) Im Amsler-Gitter ziehen sich die Linien zusammen. (B) Die typischen Gesichtsveränderungen, bei denen die Gesichtsmerkmale zum Punkt der Fixation hingezogen werden.

(la Cour M, Friis J. Macular holes: classification, epidemiology, natural history and treatment. *Acta Ophthalmol Scand.* 2002;80(6):579–587)

Durch die Einführung der optischen Kohärenztomographie (OCT) im Jahr 1991 wurde es möglich, durch eine standardisierte Untersuchung bereits beginnende retinale Defekte sichtbar zu machen.⁵⁹ Eine Dekade später wurde dieses Verfahren durch Drexler et al.⁶⁰ bedeutend weiterentwickelt. Das OCT kann als Schnittbildverfahren verstanden werden. Mittels einer

Lichtquelle und eines Retro-Reflektors können minimale Unterschiede in der Interferenz des reflektierten Lichtes wahrgenommen und entsprechend vorher eingegebener Muster rechnergestützt korreliert werden.⁶⁰

Des Weiteren kann zur Diagnostik die Fluoreszenz-Angiographie verwendet werden, dabei handelt es sich um ein kontrastmittelgestütztes, bildgebendes Verfahren zur Beurteilung des Gefäßstatus des Augenhintergrunds. Mithilfe zeitversetzter Fundus-Aufnahmen vor, während und nach Kontrastmittel-Gabe kann eine Aussage über den Gefäßstatus in der arteriellen und der venösen Phase sowie über einen Austritt intravasaler Flüssigkeit in die Retina selbst getroffen werden.^{61,62}

Eine weitere Möglichkeit der Beurteilung von Makulaforamen stellt die Autofluoreszenz^{63,64} oder die Sonographie dar. Letztere kann insbesondere das Verhältnis des Glaskörpers zur Retina darstellen und somit eine Glaskörper-Abhebung dokumentieren.^{65,66}

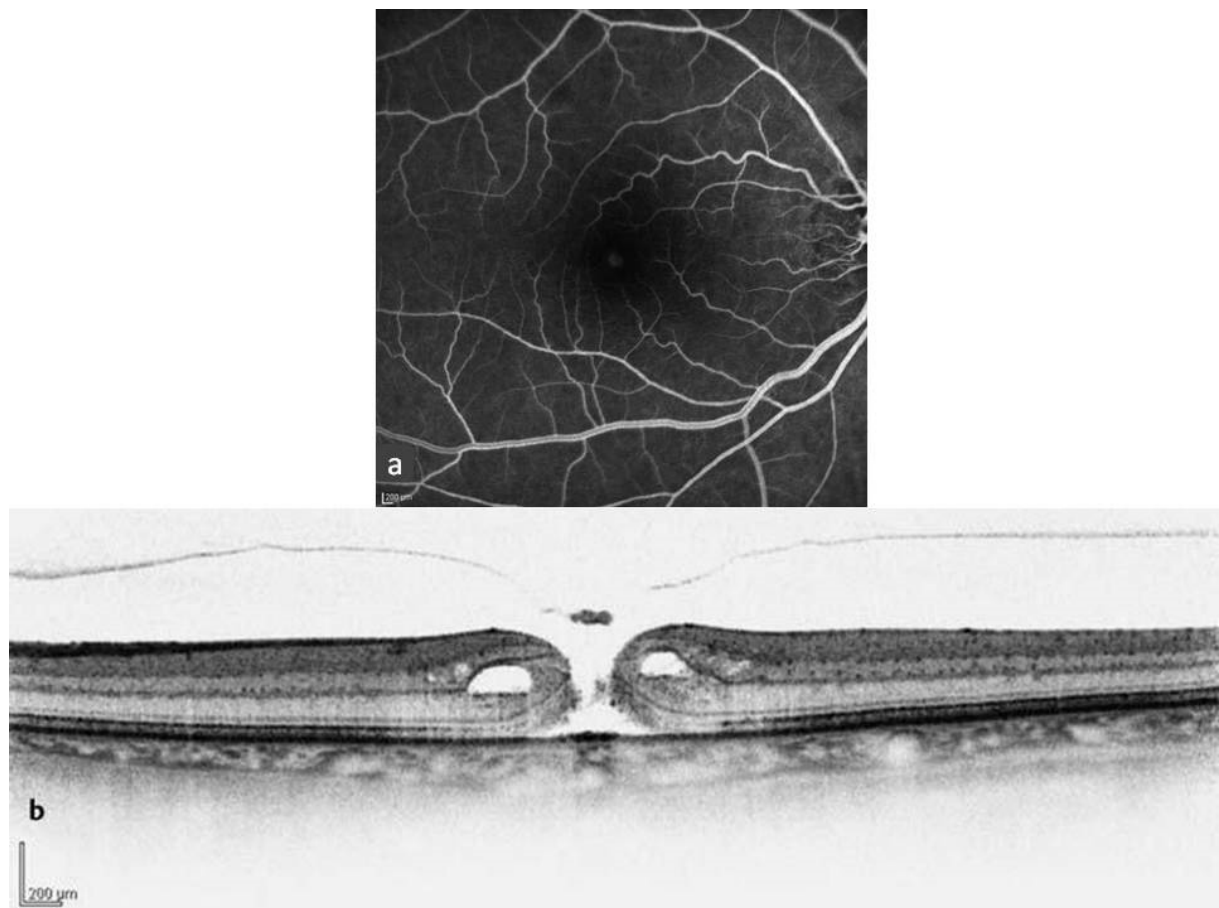


Abb. 8: a) Fluoreszenz-Angiografie eines durchgreifenden Makulaforamen, b) OCT eines Makulaforamen °IV mit Operkulum und dargestelltem abgehobenem Glaskörper-Kortex.

(Schumann RG, Gandorfer A. Vitreoretinale degenerative Makulaerkrankungen Klin Monbl Augenheilkd. 2010;227(4))

1.3.4 Chirurgische Therapie

Seit der ersten Beschreibung eines Makulaforamens durch Knapp 1869 galt diese Erkrankung mehr als einhundert Jahre als nicht therapierbar.⁶⁷ Erst seit der Einführung der Vitrektomie durch Kelly und Wendel 1991 konnte das Makulaforamen behandelt werden.^{44,45} Die pars plana Vitrektomie (ppV) bei Makulaforamen ist zu einem Standardverfahren mit hoher Erfolgsrate geworden.^{68,69}

Ziel der Makulachirurgie ist es, durchgreifende Foramen zu verschließen. Die Indikation zur Operation wird heute bei idiopathischen Makulaforamen ab einem Makulaforamen $\geq 400 \mu\text{m}$ gestellt sowie bei rezidivierenden und sekundären Makulaforamen. Vor allem Kim et al. sowie Freeman et al. legten mit ihrer gemeinsamen Vitrectomy for Macular Hole Study (VMHS) den Grundstein des heutigen therapeutischen Vorgehens.^{55,56}

Des Weiteren wird seit mehr als 10 Jahren die ILM, nach kompletter Entfernung des Glaskörpers, von der Netzhaut abgezogen. Das Peeling der ILM verfolgt das Ziel, vitreoretinale Traktionen sicher von der Makula zu entfernen, ebenso wie epiretinale Zell- und Kollagenansammlungen. Da die ILM als Leitschiene für Re-Proliferationen epiretinaler Zellen dient, ist ihre Entfernung operative Zielvorgabe zur Reduktion von Rezidiven und Re-Proliferationen geworden.⁷⁰ Die ILM wird beim Peeling oft mit einem Farbstoff sichtbar gemacht, da sie durchscheinend ist und schwer zu greifen. Als Farbstoff wurde ab 2000 Indozyanin Grün oder Trypan Blau verwendet. Heute werden vornehmlich neuere Farbstoffe wie Brilliant Blau G genutzt.^{71,72}

Eine zeitnahe Vitrektomie nach dem ersten Auftreten von Symptomen geht mit besseren Ergebnissen einher. Außerdem verbessert sich die Prognose je kleiner das Foramen ist, sowie bei einem guten präoperativen Visus.³¹ Ferner wird das Resultat von der Erfahrung des Operateurs beeinflusst. Eine pars plana Vitrektomie hat einige spezifische Komplikationen. Neben Komplikationen wie postoperative Infekte (z.B. Endophthalmitis) oder intraoperative Blutungen werden postoperative Kataraktentwicklung, Netzhautablösungen, Umbauten des retinalen Pigmentepithels, Wiedereröffnung von einstmals verschlossenen Makulaforamen, choroideale Neovaskularisationsmembranen, zystische Makulaödeme, Gesichtsfeldverluste und parazentrale Skotome als mögliche Komplikationen erwähnt.³¹ Die Rate der Wiedereröffnung von postoperativ verschlossenen Makulaforamen liegt bei 5-10%.^{31,47,73,74}

1.4 Präparation der inneren Grenzmembran

1.4.1 Neue Flachpräparation und konventionelle Serienschnittpräparation

Histopathologische Untersuchungen operativ entfernter epiretinaler Membranen enthielten zunächst akzidentiell Teile der ILM.⁷⁵ Daraufhin wurde das Gewebe der vitreoretinalen Grenzschicht durch histopathologische, licht- und elektromikroskopische Analysen genauer untersucht.^{1,2,7,11,17,18,76,77} All diese Untersuchungen basierten darauf, das Gewebe jeweils in der Sagittalebene als Schnittpräparat aufzuarbeiten. Die Erstellung von Schnittpräparaten erlaubt eine eindeutige Zuordnung fibrozellulärer Proliferationen zur vitrealen oder retinalen Seite der ILM. Dadurch konnten Zellen und Kollagene auf der ILM identifiziert werden. Die Verteilung dieser Zell- und Kollagenansammlungen auf der gesamten Fläche des ILM-Präparates sowie die Gesamtfläche der entfernten ILM konnten jedoch nur annähernd bestimmt werden. Des Weiteren wird trotz der Erstellung von Serienschnitten nur ein geringer Teil des gesamten Präparates analysiert.

Erst Hisatomi et al. zeigten mit ihrer „Bird’s Eye“-Methode einen Weg auf, die Zellverteilung im gesamten ILM-Präparat zu untersuchen.^{12,78} Gandorfer et al. modifizierten die Technik und etablierten die neue Flachpräparation der ILM für die Phasenkontrast- und Interferenzmikroskopie sowie für die Immunhistologie.^{13,14} Auf diese Weise kann sowohl die Zellzahl als auch die Zellverteilung des gesamten Präparates analysiert werden. Der besondere Vorteil der Flachpräparation von ILM und epiretinalen Zellproliferationen liegt im hervorragenden Erhalt der Antigenität. Weiterhin können Präparate, die als Flachpräparat analysiert wurden und immunhistologisch aufgearbeitet wurden, trotzdem einer konventionellen Serienschnittpräparation für eine nachfolgende elektronenmikroskopische Untersuchung zugeführt werden.

1.4.2 Immunhistologische Untersuchung am Flachpräparat

Um die Zellen immunhistologisch mittels Fluoreszenzmikroskopie zu differenzieren, werden Antikörper genutzt, die gegen zelluläre Strukturen (Epitope) der jeweiligen Zellen gerichtet sind. Nachdem die spezifischen Antikörper eine Bindung mit den Epitopen eingegangen sind, werden die verbliebenen, nicht gebundenen Antikörper ausgewaschen. In einem zweiten Durchlauf werden diese Epitop-Antikörper-Verbindungen mit Farbstoff-markierten

Antikörpern in Kontakt gebracht, die eine Bindung mit dem initialen Epitop-Antikörper-Komplex eingehen. Die ungebundenen Antikörper werden erneut ausgewaschen. Der fluoreszierende Farbstoff kann nun mithilfe eines Fluoreszenz-Mikroskopes in dem zu untersuchenden Gewebe sichtbar gemacht werden.⁷⁹⁻⁸³

1.4.3 Zellspezifische Antigene epiretinaler Zellproliferationen

Die immunhistologischen Zellmarker anti-GFAP (Zielstruktur: Gliazellen), anti- α -SMA (Zielstruktur: Aktinfilamente), anti-CD-45 (Zielstruktur: Hyalozyten), anti-CD-68 (Zielstruktur: Makrophagen) und anti-CytokeratinPan (Zielstruktur: retinale Pigmentepithelzellen) werden im folgenden näher beschrieben:

GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) beschreibt eines der wichtigsten Intermediärfilamentproteine in Gliazellen. Dieses Protein ist insbesondere als „Stressprotein“ in Astrozyten und Müllerzellen zu finden.⁸⁴

Das α -Aktin des glatten Muskels (α -Smooth-Muscle-Actin / α -SMA) gehört zur Gruppe der Aktinproteine, die die Zellmotilität, -struktur und -integrität maßgeblich beeinflussen. Das α -Aktin gehört zu den Proteinen, die im kontraktilen Apparat der glatten Muskelzellen zu finden sind. Synonym für α -SMA stehen die Bezeichnungen ACTA2, AAT6, ACTSA und MYMY5.⁸⁵

Cytokeratin-Pan beschreibt einen Sammelantikörper gegen die Cytokeratine 1, 4, 5, 6, 8, 10, 13, 18 und 19. Alternativ wird für Cytokeratin auch das Kürzel KRT verwendet. Keratine sind Intermediärfilamentproteine, die für die strukturelle Integrität von Epithelzellen verantwortlich sind. Dabei paaren sich immer 2 Arten von Cytokeratinen und bilden heterogene Gruppen von Keratinketten. Einzig Cytokeratin 19 paart sich nicht. Dieses Protein findet sich vor allem in der Entwicklung der Epithelzellen.⁸⁶⁻⁹⁰

Das CD-45-Protein ist Teil der Gruppe von Tyrosinphosphatase-Proteinen (PTP). In der Molekularbiologie wird vorrangig die Bezeichnung PTPR (protein tyrosine phosphatase, receptor type, C) verwendet. Synonym sind auch die Begriffe LCA, LY5, B220, L-CA, T200, CD45R und GP180 zu finden. Die PTP sind Signalmoleküle, die eine Reihe von Zellprozessen steuern. Sie spielen eine Rolle bei Zellwachstum und -differenzierung, Mitose und onkologischer Entartung. Exprimiert wird CD-45 in Zellen der Hämatopoese. Vor allem

findet es sich bei Regulation von T- und B-Zell-Antigenrezeptorsignalen. Dabei wirkt CD-45 entweder direkt am Rezeptor der jeweiligen Leukozyten oder durch Aktivierung intrazellulärer Signalwege.⁹¹ Des Weiteren finden sich CD-45-Proteine in der Gruppe der Hyalozyten.¹⁵

CD-68 beschreibt ein Transmembran-Glykoprotein, das vorrangig in Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. Ferner gehört es zur Familie der LAMP-Proteine (lysosomal/endosomal-associated membrane glycoprotein). Jedoch findet es sich auch an der Zelloberfläche. Außerdem findet sich CD-68 in der Gruppe der Scavenger-Rezeptor-Familie. Typischerweise finden sich Scavenger-Rezeptoren als Induktoren der Phagozytose, sowie der Rekrutierung und Aktivierung von Makrophagen.⁹²

2. PATIENTEN UND METHODEN

Die Präparate der inneren Grenzmembran (ILM) wurden von 50 Patienten während der pars plana Vitrektomie gewonnen. Eingeschlossen wurden Patienten mit idiopathischen, rezidivierenden und sekundären Makulaforamen, die im Zeitraum von Oktober 2007 bis August 2009 an der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München operiert worden sind. Die Patientendaten wurden retrospektiv ausgewertet und das zu untersuchende Material entsprechend der Diagnose in die drei Präparategruppen der idiopathischen, rezidivierenden und sekundären Makulaforamen eingeteilt. Insgesamt wurden 50 Flachpräparate der ILM immunhistologisch, interferenz- und phasenkontrastmikroskopisch untersucht.

2.1 Patientenkollektiv

2.1.1 Retrospektive Analyse der Daten

Von den insgesamt 50 Präparaten ließen sich 26 Präparate den idiopathischen Makulaforamen im Stadium Gass III, 11 Präparate den sekundären Makulaforamen und 13 Präparate den rezidivierenden Makulaforamen zuordnen. Von diesen Gruppen wurden Patientendaten, wie Name, Geburtsdatum, Operationsdatum, Patientenalter und Geschlecht dokumentiert. Ferner wurden die behandlungsspezifischen Fakten erfasst. Dazu zählten das Operationsdatum, das operierte Auge (linke oder rechte Seite), die Operationsindikation/-diagnose, die Erstdiagnose, die Zeitdauer zwischen zwei Operationen (bei rezidivierenden Makulaforamen), der Operateur sowie die Art der Operation, die Dauer zwischen Symptombeginn und Therapie, das Vorhandensein von Metamorphopsien, der Linsenzustand vor/nach der Operation (phak/pseudophak), der Visus vor/nach der Operation, der Zustand des Makulaforamens nach der Operation sowie die anschließende Nachbeobachtungszeit.

2.1.2 Operatives Vorgehen

Die Patienten erhielten entweder eine 23 gauge (g) pars plana Vitrektomie oder eine 20 g pars plana Vitrektomie. Bei den rezidivierenden Makulaforamen wurden die Patienten ausschließlich mittels 20 g pars plana Vitrektomie operiert. Die Patienten mit idiopathischen

Makulaforamen wurden 8 Mal mittels 23 g Vitrektomie und 18 Mal mittels 20 g pars plana Vitrektomie behandelt. Bei den Patienten mit sekundärem Makulaforamen wurde die Vitrektomie 4 Mal in 23 g-Technik und 7 Mal in der 20 g-Technik durchgeführt.

Dabei unterschieden sich die beiden operativen Techniken im Durchmesser der eingesetzten Trokare. Die 23 g Trokare besitzen einen Außendurchmesser von 0,6 mm. 20 g Trokare haben einen Außendurchmesser von 0,9 mm. Zunächst wurden 3 pars plana Zugänge angelegt. Die Ablösung des Glaskörpers von der Retina wurde mit dem Vitrektom über der Papille begonnen und anschließend nach peripher fortgesetzt. Nachdem der Glaskörper entfernt war, wurde die transluzide ILM mit dem Farbstoff Brilliant Blau angefärbt, um sie sichtbar zu machen. Anschließend wurde die ILM mittels einer gebogenen Kanüle (28 g) oder einer Eckardt-Pinzette von der Makula abgezogen (sog. ILM-Peeling). Danach wurde eine C2F6-Gasmischung in den Glaskörperraum injiziert. Zum Schluss wurden die Trokare entfernt. Die Patienten wurden angewiesen, eine Kopf-Tief-Lage über 2-3 Tage einzuhalten.

2.2 Methoden

Mithilfe der Flachpräparation war es erstmals möglich, die Zellzahl und die Zellverteilung auf der ILM sichtbar zu machen. Zusätzlich konnte eine Differenzierung der Zellen, die sich auf ILM fanden, vorgenommen werden. Die dafür eingesetzten Antikörper sind in **Tabelle 1** mit der entsprechenden Zielstruktur aufgelistet.

Antikörper	Zielstruktur
GFAP	Gliazellen
CD-45	Hyalozyten
α SMA	Aktinfilamente
CD-68	Makrophagen
CytokeratinPan	retinale Pigmentepithelzellen

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Antikörper und ihrer jeweiligen Zielstruktur.

2.2.1 Flachpräparation

Die operativ entfernten Membranen wurden umgehend in einer Lösung aus 4 % Paraformaldehyd und 0,1 % Glutaraldehyd bei 4°C für mindestens 24 Stunden fixiert. Anschließend wurden die ILM-Präparate unter einem Stereomikroskop (Leica MS5, Leica Microsystems, Wetzlar) auf einem Objektträger in einem Tropfen ImmunoSelect® Antifading Mounting Medium DAPI (AKS-38448, Dianova, Hamburg) ausgebreitet. Die Flachpräparation erfolgte dabei mit einer Glaspipette, so dass möglichst das Präparat flach ausgebreitet wurde. Zum Abschluss wurde mit einem Deckglas die ILM in Position gehalten. Die Präparate wurden nun mit einem modifizierten Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DM 2500, Wetzlar, Deutschland) in Phasenkontrast- sowie in Interferenz-Technik untersucht.

2.2.2 Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie

Die Phasenkontrastmikroskopie wurde in einer optischen Kontrastanreicherungstechnik durchgeführt, um die Strukturen der durchscheinenden ILM besser zu verstärken. Diese Bildverstärkung wurde dadurch erreicht, dass kleinste Veränderungen in der Phase in entsprechende Amplitudenverstärkung des eingehenden Bildes resultierten.

Die Interferenzmikroskopie diente der Verdeutlichung von oberflächlichen Veränderungen der ILM. Dazu wurde das Licht von der Quelle ausgehend in zwei Strahlen gebündelt und auf dem Objektträger erneut zusammengeführt. Dadurch konnten vor allem kleinste, erhabene Details wie Zellkerne oder Zellfortsätze auf der ILM dargestellt werden.

2.2.3 Immunhistologie

Entsprechend **Tabelle 2** wurden die ILM-Präparate zuerst einer zweifachen Waschung mit 0,1 M PBS-Lösung unterzogen, bevor sie enzymatisch demaskiert werden konnten. Dazu wurde 0,1 % Pepsin (P 7000, SIGMA Aldrich, St. Louis, USA) in 0,1 M PBS-Puffer gelöst und 30 Minuten auf den Membranen belassen. Anschließend erfolgte eine erneute zweimalige Auswaschung mit PBS. Im nächsten Schritt wurden die ILM-Präparate für 2 bis 3 Stunden in einer Lösung aus 5 % Normal Donkey Serum (017-000-001, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) in PBTA (0,5 % Albumin Bovine Serum [A7030, SIGMA Aldrich, St. Louis, USA], 0,1 % Triton-X-100 [X100, SIGMA Aldrich, St. Louis, USA] und 0,1 % Natriumazid

[822335, MERCK, Darmstadt, Deutschland] in 0,1 M PBS) gebadet. Danach erfolgte eine erneute Auswaschung für 3 Mal 5 Minuten in PBTA. Nun wurden die ILM-Präparate über Nacht mit den jeweiligen primären Antikörpern inkubiert. Dabei wurden zwei verschiedene Kombinationen verwendet. Zum einen wurde polyklonales anti-GFAP (Z 0334, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark / Kaninchenantikörper) zusammen mit anti-CD45 (sc-1123, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA / Ziegenantikörper) kombiniert, und zum anderen wurde monoklonales anti-Pan Cytokeratin (C 2562, SIGMA, Saint Louis, USA / Mausantikörper), anti-GFAP (Z 0334, DakoCytomation, Glostrup, Dänemark / Kaninchenantikörper) und anti-CD68 (sc-7092, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA / Ziegenantikörper) gemeinsam verwendet. Das Mischungsverhältnis zwischen den Antikörpern und PBTA betrug dabei 1:50. Für die Negativkontrollen wurden jeweils die primären Antikörper weggelassen. Alle anderen Präparationsschritte blieben unverändert.

Nach der ersten Antikörperbehandlung über Nacht wurden die ILM-Präparate erneut mit PBTA für 3 Mal 10 Minuten gewaschen. Im Anschluss folgte die zweite Antikörperbehandlung. Dazu wurden mit Fluoreszenz-Farbstoff Cy 3 markiertes monoklonales anti- α -Smooth-Muscle-Actin (C 6198, SIGMA, Saint Louis, USA / Mausantikörper) bzw. Cy 3 (715-165-150, Dianova, Hamburg, Deutschland, Emission bei 570 nm, rote Farbe / Mausantikörper) sowie Cy 2 (715-225-150, Dianova, Hamburg, Deutschland, Emission bei 508 nm, grüne Farbe / Kaninchenantikörper) und Cy 5 (705-175-003, Dianova, Hamburg, Deutschland, Emission bei 670 nm, infrarote Farbe / Ziegenantikörper) verwendet. Abhängig von der Vorbehandlung mit den primären Antikörpern wurden diese Antikörper lichtgeschützt für 2 Stunden auf die ILM-Präparate gegeben. Das Mischungsverhältnis zwischen PBTA und Antikörper betrug dabei 1:100. Im Anschluss wurden die Membranen 4 Mal für jeweils 10 Minuten in PBTA gewaschen, bevor sie einem zweiten Waschgang in 0,1 M PBS für 3 Mal 5 Minuten unterzogen wurden. Zum Abschluss wurden die gefärbten ILM-Präparate analog der Flachpräparation auf einen Objektträger aufgebracht, zusammen mit DAPI Mountain Medium ausgebreitet und mit einem Deckglas abgedeckt.

2. Patienten und Methoden

1.	Waschen in 0,1 M PBS (pH 7,4)	2 x
2.	enzymatische Demaskierung: 0,1% Pepsin in 0,1 M PBS-Puffer (pH 7,4)	30 min
3.	Waschen in 0,1 M PBS-Puffer (pH 7,4)	2 x
4.	Blocken der unspezifischen Proteine: Normales DONKEY-Serum (1:20) in PBTA	2-3h
5.	Waschen in Inkubationspuffer PBTA	3 x 5 min
6.	1. Antikörperkombination (1:50) in PBTA	über Nacht
7.	Waschen in Inkubationspuffer PBTA	3 x 10 min
8.	2. Antikörperkombination (1:100) in PBTA	2 h
9.	Waschen in Inkubationspuffer PBTA	4 x 10 min
10.	Waschen in 0,1 M PBS	3 x 5 min
11.	Eindeckelung mit DAPI Mountain-Medium	
<p><u>Alle Lösungen/Ansätze wurden zentrifugiert (13000U/min für 5 min)</u></p>		
Kombination	1. Antikörper (1:50)	2. Antikörper (1:100)
1	<p>GFAP (Kaninchen) DAKO Z00334</p> <p>CD 45 (Ziege) StCruz sc-1123</p>	<p>Alpha-SMA (Maus) Sigma C 6198</p> <p>Cy2 (Kaninchen) Dianova 715-225-150</p> <p>Cy5 (Ziege) Dianova 705-175-003</p>
2	<p>Cytok. Pan (Maus) SIGMA C 2562</p> <p>GFAP (Kaninchen) DAKO Z00334</p> <p>CD 68 (Ziege) StCruz sc-7082</p>	<p>Cy3 (Maus) Dianova 715-165-150</p> <p>Cy2 (Kaninchen) Dianova 715-225-150</p> <p>Cy5 (Ziege) Dianova 705-175-003</p>

Tab. 2: Schematischer Überblick über die Vorgehensweise bei der Präparation

2.3 Fotodokumentation

Die Präparate wurden nun mittels Fluoreszenzmikroskop, Mikroskop-Kamera und dem Computerprogramm Adobe® Photoshop® CS 3 digital analysiert und dokumentiert. Anschließend wurden sie bearbeitet und zusammengesetzt. Ziel dieses Arbeitsschrittes war es, die Zellzahl und Zellverteilung sowie die Gesamtfläche der ILM und das Färbeverhalten der Zellen zu erfassen und auszuwerten.

Dazu wurden die ILM-Präparate zunächst bei 5-facher Übersichtsvergrößerung digital in Teilen fotografiert und danach mit Adobe Photoshop® zusammengesetzt. Anschließend wurde die Zellauszählung mit ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) manuell und automatisiert ausgezählt. Jede Einstellung des Präparates wurde sowohl in Phasen-, Interferenz- und Fluoreszenzmikroskopie dokumentiert. Dabei wurden in der Fluoreszenzmikroskopie Filter mit den Wellenlängen 460 nm (DAPI), 670 nm (Cy5), 508 nm (Cy2) und 570 nm (Cy3) verwendet. Danach wurden einzelne Areale der Präparate gezielt mit 10-facher und 20-facher Vergrößerung fotografiert. Des Weiteren wurden die einzelnen Abbildungen eines Präparates sich überschneidend aufgenommen, um sie später zu einem Gesamtbild zusammenfügen zu können.

Mit Hilfe des Computerprogramms Adobe Photoshop® CS3 wurden die einzelnen Bilder, in ungefilterter sowie gefilterter Belichtungsweise zu jeweils einem Gesamtbild in 5-facher Vergrößerung zusammengesetzt, übereinandergelegt und ausgemessen. Dabei wurden insbesondere Präparatfläche, Zellzahl und Zellverteilung erfasst. Die Abbildungen der immunhistologisch bearbeiteten ILM-Präparate wurden in verschiedenen Vergrößerungen von 10x, 20x, 40x aufgenommen. Zunächst wurde eine Aufnahme der Einzelfärbung des jeweiligen Fluorochroms vorgenommen und anschließend die einzelnen Bilder zu einem Gesamtbild zusammengeführt.

2.4 Statistische Analyse

Mit Hilfe der Predictive Analytics Software 17.0® des Herstellers SPSS (SPSS, IBM™ Company, Chicago, IL, USA) wurden folgende Daten ausgewertet:

Gesamtfläche in mm² (Fläche_mm²)

Gesamtzellzahl des Präparats (Zellzahl)

Anordnung/Verteilung der Zellen auf dem Präparat (Zellverteilung)

Zelldichte auf dem gesamten ILM-Präparat (Density/Zellen pro mm²)

Anzahl der Zellcluster (Clusterzahl)

Fläche der Cluster in mm² (mm²_Cluster)

Anzahl der Zellen in den Clustern (Zellzahl_Cluster)

Zelldichte in den Clustern (Dens_Cluster/Zellen pro mm²)

2.5 Materialien

2.5.1. Reagentien und Rezepturen

Bei **Alcon BSS Plus®** handelt es sich um 305 mOsm-Lösung mit einem pH-Wert von 7,4. Diese intraokulare Spülflüssigkeit ähnelt dem Kammerwasser des Auges und ist aus folgenden Bestandteilen zusammengesetzt: 160,9 mM Natrium, 5,8 mM Kalium, 1,05 mM Calcium, 0,98 mM Magnesium, 130 mM Chlorid, 25 mM Bikarbonat, 3 mM Phosphat, 5 mM Glukose und 0,3 mM Glutathion.

Die Lösung aus **4 % Paraformaldehyd-Lösung mit 0,1 % Glutaraldehyd** wurde wie folgt hergestellt:

Zunächst wurden 2g Paraformaldehyd (MERCK 104005) in 20 ml 0,1 M PBS (phosphate buffered saline / pH 7,4) aus der hausinternen Apotheke unter leichtem Rühren erhitzt. Dabei sollte die Temperatur 80°C nicht überschritten werden. Die Lösung wurde so lange gerührt, bis sie klar war. Anschließend wurde die Flüssigkeit mit 0,1 M PBS auf 50 ml aufgefüllt und durch einen doppelten Faltenfilter filtriert. Schließlich wurden der Lösung 200 µl einer 25 %-igen Glutaraldehyd-Lösung (FLUKA 49626) zugegeben. Die Flüssigkeit wurde bei 4°C gelagert und war 14 Tage haltbar.

2.5.2. Laborausstattung

Folgende Geräte und Programme kamen zum Einsatz:

- Fluoreszenzmikroskop von Leica (DM 2500, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) mit Mikroskop-Kamera von ProgRes® CF (Jenoptik Optical Systems, Jena).
- Stereomikroskop von Leica MS5 (Leica Microsystems, Wetzlar)
- Computer-Programm ProgRes® CapturePro 2.5 (Jenoptik Optical Systems, Jena)
- Fotoprogramm Adobe Photoshop® CS 3 (Adobe Systems GmbH, München)
- Computer-Programm ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>)
- Zentrifuge MiniSpin® (Eppendorf, Hamburg)
- Kühl-/Gefrierschrank (Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe)
- Rüttler IKA-Vibrax-VXR (IKA-Werke, Staufen)
- SuperFrost™ Objektträger (Menzel, Braunschweig)
- Pipetten Research® (verschiedene Größen, Eppendorf, Hamburg)
- MircroWell® Mini Trays (SigmaAldrich, St. Louis, USA)



Abb. 9: Fluoreszenzmikroskop von Leica (DM 2500, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) mit Mikroskop-Kamera von ProgRes® CF (Jenoptik Optical Systems, Jena)



Abb. 10: Stereomikroskop von Leica MS5 (Leica Microsystems, Wetzlar)



Abb. 11: Rüttler IKA-Vibrax-VXR (IKA-Werke, Staufen)



Abb. 12: Zentrifuge MiniSpin® (Eppendorf, Hamburg)



Abb. 13: Pipette Research® 10 µl (Eppendorf, Hamburg)

3. ERGEBNISSE

Insgesamt wurden 50 Patienten mit Makulaforamen in diese Studie eingeschlossen. Bei allen Patienten war jeweils ein Auge betroffen. Bei 26 Augen war ein idiopathisches Makulaforamen °III nach Gass diagnostiziert worden, bei 13 Patienten ein rezidivierendes Makulaforamen und bei 11 Patienten ein sekundäres Makulaforamen.

3.1 Deskription des Patientenkollektivs

Von den insgesamt 50 Augen wurden 26 rechte und 24 linke Augen eingeschlossen. Es waren 20 männliche und 30 weibliche Patienten betroffen. Das Durchschnittsalter lag bei 61,7 Jahren (Median: 66 Jahre, Maximum: 82 Jahre, Minimum: 16 Jahre). Durchschnittlich 5,4 Monate (Median: 3 Monate) klagten die Patienten über Symptome, wobei einige unmittelbar nach den ersten Symptomen den Arzt aufsuchten, während ein Patient etwa 5 Jahre über Symptome klagte, bevor er sich in der Klinik vorstellte. Bei insgesamt 62 % der Patienten verbesserte sich der Visus nach der Operation. Die mediane Nachbeobachtungszeit der gesamten Kohorte betrug 2 Monate, wobei im Maximum ein Patient 16 Monate lang in Kontrolluntersuchungen nachverfolgt werden konnte, während andere Patienten sich direkt im Anschluss an ihren primären stationären Aufenthalt, meist erfolgte die Entlassung am dritten postoperativen Tag, unserer Nachuntersuchung entzogen (folgend mit 0 Monaten Nachbeobachtung angegeben).

3.1.1 Idiopathische Makulaforamen

Die 26 Patienten mit idiopathischem Makulaforamen °III nach Gass waren zwischen 45 bis 82 Jahren alt, wobei das mittlere Alter 66,4 Jahren betrug (Median: 66 Jahre). Sieben Betroffene waren männlich und 19 weiblich. Insgesamt wurden 14 rechte Augen und 12 linke Augen operiert. Bei 17 Patienten stellte sich nach der operativen Behandlung eine Visusverbesserung ein, bei 4 Patienten blieb die Sehschärfe unverändert und 2 Patienten zeigten eine Verschlechterung des Visus. Drei Patienten wiesen keine Nachuntersuchung nach Vitrektomie auf. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 2 Monate (Mittelwert: 2,8 Monate / Maximum: 12 Monate / Minimum: 0 Monate).

3. Ergebnisse

Nr.	Alter/Sex /Auge	Symptom- dauer (Monate)	Visus präoperativ	Visus postoperativ
1	76/M/L	0,5	1,0	1,0
2	80/M/R	0,5	0,5	0,2
3	64/F/L	1,0	1,3	0,2
4	67/F/L	6,0	1,3	1,0
5	75/F/L	5,0	0,7	0,4
6	68/M/L	5,0	0,6	0,2
7	64/F/L	6,0	1,3	0,4
8	77/M/R	4,0	0,7	2,0
9	60/F/R	3,0	0,5	0,4
10	66/F/R	12,0	0,5	2,0
11	53/F/L	5,0	1,0	0,4
12	48/F/R	3,0	0,3	0,3
13	68/F/R	2,0	0,4	0,1
14	66/F/R	0,5	0,5	0,5
15	67/F/R	5,0	0,5	0,2
16	70/F/L	0,5	1,5	1,0
17	71/F/R	6,0	0,7	0,5
18	58/F/R	12,0	1,0	0,7
19	65/F/R	3,0	0,7	0,5
20	64/F/R	0,5	1,2	0,5
21	45/M/L	4,0	0,6	0,0
22	82/M/R	6,0	0,5	1,3
23	73/F/L	1,0	1,3	0,2
24	67/F/R	2,0	0,4	0,4
25	73/F/L	3,0	0,2	0,4
26	58/M/L	6,0	1,3	2,0

Tab. 3: Darstellung des Patientenkollektivs der idiopathischen Makulaforamen. Sex = Geschlecht. F = weiblich. M = männlich. R = rechtes Auge, L = linkes Auge. Visus in LogMAR.

3.1.2 Rezidivierende Makulaforamen

Das durchschnittliche Alter der 13 Patienten mit rezidivierendem Makulaforamen betrug 66,2 Jahre (Median: 67 Jahre, Maximum: 79 Jahre, Minimum: 49 Jahre). Von den Patienten waren 7 männlich und 6 weiblich. Es wurden 8 rechte Augen und 5 linke Augen eingeschlossen. Während sich bei 6 Patienten der Visus nach der Operation verbesserte, blieb der Visus bei 6 weiteren Patienten unverändert. Ein Patient zeigte eine Visusverschlechterung nach der Behandlung. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 3 Monate (Mittelwert: 5,3 Monate; Maximum: 15 Monate, Minimum: 0 Monate)

Nr.	Alter/Sex /Auge	Symptombdauer (Monate)	Visus (LogMAR) präoperativ	Visus (LogMAR) postoperativ
1	71/F/R	n.a.	1,2	1,2
2	67/F/L	3,0	1,5	1,4
3	69/M/L	2,0	1,0	1,0
4	71/F/R	1,0	0,4	0,3
5	71/M/R	0,0	1,2	1,2
6	49/M/L	3,0	1,0	0,5
7	57/F/R	3,0	0,5	0,4
8	79/F/R	6,0	1,0	1,0
9	75/M/R	3,0	0,2	0,2
10	56/M/L	2,5	1,3	1,0
11	66/M/R	0,2	1,5	1,5
12	67/F/R	0,5	1,0	1,5
13	63/M/L	0,0	1,4	1,0

Tab. 4: Darstellung des Patientenkollektivs der rezidivierenden Makulaforamen. Sex = Geschlecht. F = weiblich. M = männlich. R = rechtes Auge, L = linkes Auge. Visus in LogMAR.

3.1.3 Sekundäre Makulaforamen

Das durchschnittliche Alter der 11 Patienten mit sekundären Makulaforamen betrug 45,4 Jahre (Median: 48 Jahre, Maximum: 74 Jahre, Minimum: 16 Jahre). Von den Patienten waren 6 männlich und 5 weiblich. Es wurden 4 rechte Augen und 7 linke Augen eingeschlossen. Bei 8 Patienten verbesserte sich der Visus postoperativ, 3 Patienten hatten postoperativ einen schlechteren Visus. Die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 2 Monate (Mittelwert: 4,5 Monate; Maximum: 16 Monate, Minimum: 0 Monate)

Nr.	Alter/Sex /Auge	Symptom- dauer (Monate)	Visus (LogMAR) präoperativ	Visus (LogMAR) postoperativ	Genese
1	16/M/L	1,0	1,3	1,0	Trauma
2	37/M/L	36,0	0,7	1,0	Trauma
3	74/M/L	60,0	1,2	1,7	Trauma
4	22/F/L	1,0	0,7	0,4	Trauma
5	30/F/R	0,5	1,2	0,5	Ablatio
6	58/F/L	0,0	1,5	3,0	Ablatio
7	55/M/R	1,0	3,0	0,5	Ablatio
8	48/M/L	2,0	0,8	0,4	Ablatio
9	48/M/R	12,0	1,3	1,0	Diabetes
10	46/F/R	0,5	1,3	1,1	Myopie
11	65/F/L	24,0	0,5	0,4	Myopie

Tab. 5: Darstellung des Patientenkollektivs der sekundären Makulaforamen. Sex = Geschlecht. F = weiblich. M = männlich. R = rechtes Auge, L = linkes Auge operiert. Visus in LogMAR. Genese: direktes Bulbustrauma, Ablatio retinae, Diabetische Retinopathie mit Netzhauttraktion, und Myopia magna (> - 8 dpt)

3.2 Analyse der Zellverteilung in Präparaten der inneren Grenzmembran

Die chirurgisch exzidierten ILM-Präparate der jeweiligen Patienten wurden vollständig gewonnen. Bei mehreren Präparaten eines Patienten wurden diese einzeln ausgewertet und die Ergebnisse anschließend summiert. Die summierte ILM-Präparate der einzelnen Patienten variierten in ihrer Größe von 26,73 mm² bis 0,48 mm² (Median: 10,41 mm²; Mittelwert: 10,42 mm²). Die Präparate zeigten eine mediane Zellzahl von 577 Zellen pro Präparat (Mittelwert: 1227 Zellen; Maximum: 6915 Zellen, Minimum: 5 Zellen). Dabei zeigten sich diese Zellen in 28 Präparaten homogen verteilt und in 22 Präparaten als Clusterformation. Die mediane Dichte in allen ILM-Präparaten betrug 73 Zellen/mm² (Mittelwert: 124 Zellen/mm²; Maximum: 667 Zellen/mm², Minimum: 3 Zellen/mm²). In den Clustern betrug die mediane Zelldichte 468 Zellen/mm² (Mittelwert: 474 Zellen/mm²; Maximum: 1709 Zellen/mm², Minimum: 23 Zellen/mm²).

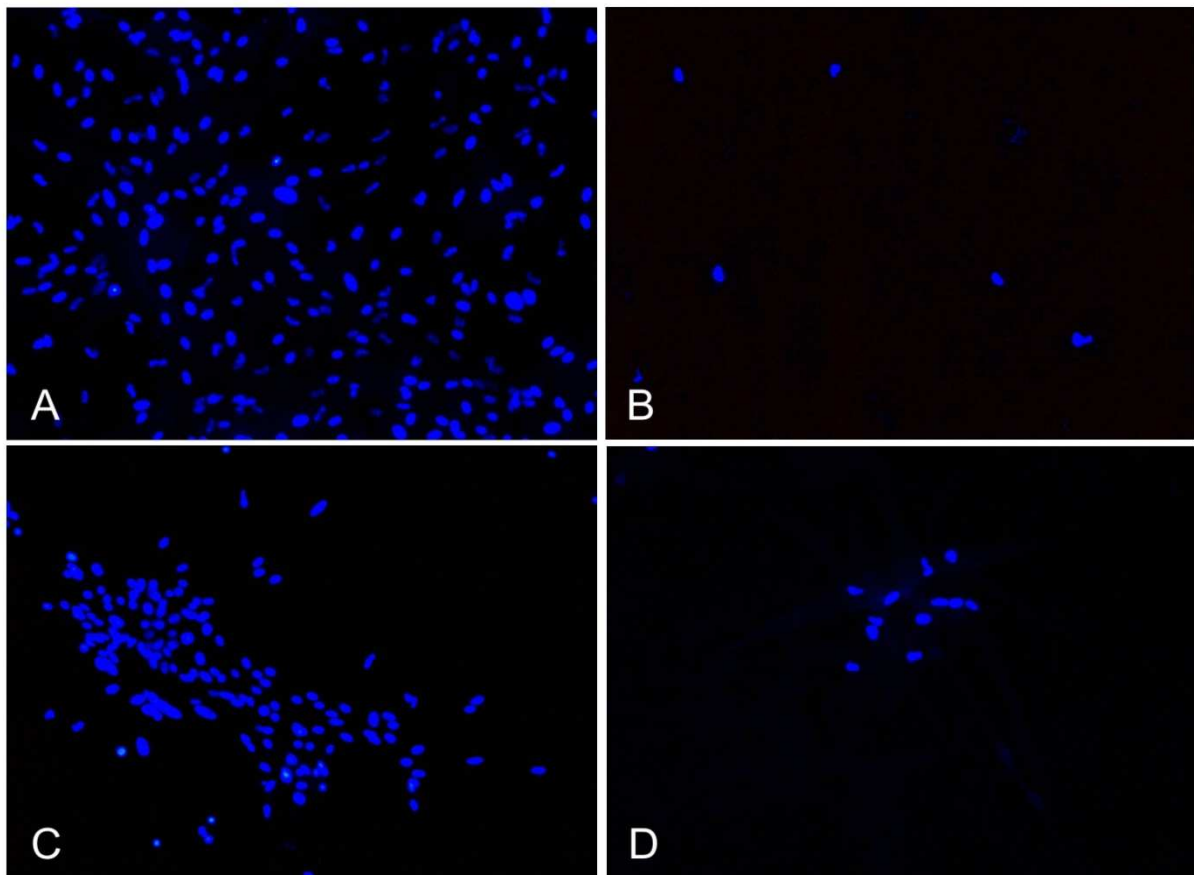


Abb. 14: Muster verschiedener Zellverteilungen. A) und B) Formen homogener Zellverteilungen. C) und D) Formen inhomogener Zellverteilung als Zellcluster. (Vergrößerung A und C 50fach, B und D 200fach)

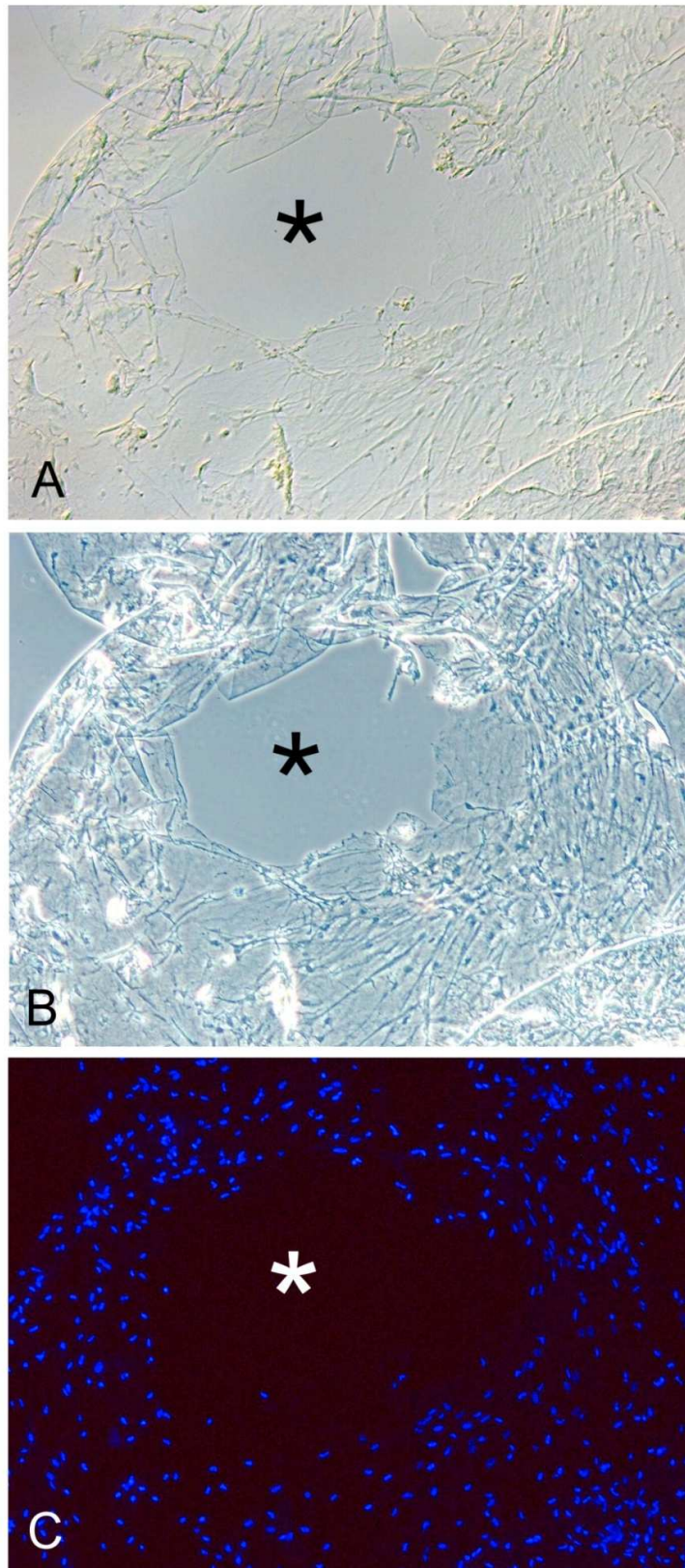


Abb. 15 : ILM-Flachpräparat eines idiopathischen Makulaforamens (mit * markierter Defekt stellt das Makulaforamen dar). A) Interferenz-Abbildung. B) Phasenkontrast- Abbildung. C) Fluoreszenzaufnahme des gleichen Präparates. Zellkerne sind mittels Zellkernfärbung DAPI blau dargestellt. (Vergrößerung: 100-fach)

3.2.1 Zellverteilung in idiopathischen Makulaforamen

Die ILM-Präparate der idiopathischen Makulaforamen zeigten eine mediane Größe von 10,98 mm² (Mittelwert: 11,89 mm²; Maximum: 22,64 mm², Minimum: 3,22 mm²) und wiesen im Median 999 Zellen (Mittelwert: 1670 Zellen; Maximum: 6915 Zellen, Minimum: 18 Zellen) auf. Die Zelldichte der untersuchten Membranen betrug im Median 54 Zellen/mm² (Mittelwert: 133 Zellen/mm²; Maximum: 667 Zellen/mm², Minimum: 3 Zellen/mm²). Die ILM-Präparate, die Zellcluster aufwiesen, zeigten in diesen Clustern eine deutlich höhere Zelldichte. Dabei fanden sich in 10 Präparaten eine homogene Zellverteilung und in 16 Präparaten Zellcluster. Die mediane Zelldichte in den Clustern betrug 468 Zellen/mm² (Mittelwert: 429 Zellen/mm²; Maximum: 1099 Zellen/mm², Minimum: 23 Zellen/mm²).

Nr.	Fläche (in mm ²)	Zellzahl (n)	Zelldichte (n/mm ²)	Verteilung	Zelldichte im Cluster (n/mm ²)
1	10,98	2307	210,11	homogen	n.a.
2	03,80	18	04,74	homogen	n.a.
3	04,98	120	24,10	homogen	n.a.
4	09,16	3045	332,42	4 Cluster	1.099,28
5	14,77	1446	97,90	2 Cluster	170,52
6	12,28	244	19,87	1 Cluster	169,44
7	10,97	162	14,77	1 Cluster	23,11
8	04,32	1192	02,76	1 Cluster	677,27
9	21,07	805	38,21	1 Cluster	53,81
10	10,45	311	29,76	2 Cluster	41,19
11	12,89	6278	487,04	2 Cluster	674,33
12	17,45	173	09,91	homogen	n.a.
13	12,12	241	19,88	homogen	n.a.
14	09,74	124	12,73	homogen	n.a.
15	10,36	6915	667,47	1 Cluster	756,56
16	24,33	2607	140,92	6 Cluster	446,40
17	13,59	78	05,74	homogen	n.a.
18	06,87	137	19,94	homogen	n.a.

3. Ergebnisse

19	09,61	1270	132,15	1 Cluster	204,84
20	22,64	736	32,51	3 Cluster	73,38
21	11,20	1888	168,57	5 Cluster	817,32
22	13,99	3915	279,84	3 Cluster	489,38
23	03,22	227	70,50	homogen	n.a.
24	08,90	3299	370,67	3 Cluster	591,22
25	19,68	3832	194,72	homogen	n.a.
26	09,78	2060	79,42	2 Cluster	573,82

Tab. 6: Darstellung der Zellverteilung in ILM-Präparaten der idiopathischen Makulaforamen.

3.2.2 Zellverteilung in rezidivierenden Makulaforamen

Die chirurgisch exzidierten ILM-Präparate der rezidivierenden Makulaforamen zeigten eine mediane Größe von 8,06 mm² (Mittelwert: 7,84 mm²; Maximum: 16,06 mm², Minimum: 0,48 mm²) und eine mediane Zellzahl von 416 Zellen (Mittelwert: 720 Zellen; Maximum: 3060 Zellen, Minimum: 5 Zellen). Bei den untersuchten ILM-Präparaten fand sich ein Präparat, das einen Zellcluster aufwies. Die übrigen 12 ILM-Präparate wiesen eine homogene Zellverteilung auf. Die Zellzahl und die Größe der ILM-Präparate variierten stark. Die mediane Zelldichte betrug 76 Zellen/mm² (Mittelwert: 104 Zellen/mm²; Maximum: 342 Zellen/mm², Minimum: 9 Zellen/mm²). Die Clusterformation zeigte eine Dichte von 138 Zellen/mm².

Nr.	Fläche (in mm ²)	Zellzahl (n)	Zelldichte (n/mm ²)	Verteilung	Zelldichte im Cluster (n/mm ²)
1	2,56	268	104,69	homogen	n.a.
2	4	610	152,36	homogen	n.a.
3	12,79	1918	149,91	homogen	n.a.
4	8,6	300	34,89	1 Cluster	137,97
5	14,35	135	9,41	homogen	n.a.
6	8,06	850	105,46	homogen	n.a.

3. Ergebnisse

7	3,9	210	53,79	homogen	n.a.
8	12,1	3060	252,98	homogen	n.a.
9	2,65	905	341,51	homogen	n.a.
10	0,48	5	10,42	homogen	n.a.
11	2,07	158	76,33	homogen	n.a.
12	16,06	416	25,9	homogen	n.a.
13	14,26	527	36,96	homogen	n.a.

Tab. 7: Darstellung der Zellverteilung in ILM-Präparaten der rezidivierenden Makulaforamen.

3.2.3 Zellverteilung in sekundären Makulaforamen

Die chirurgisch exzidierten ILM-Präparate der sekundären Makulaforamen zeigten eine mediane Größe von 7,31 mm² (Mittelwert: 9,98 mm²; Maximum: 26,73 mm², Minimum: 1,75 mm²) und eine mediane Zellzahl von 543 Zellen (Mittelwert: 779 Zellen; Maximum: 2268 Zellen, Minimum: 55 Zellen). Sechs der ILM-Präparate zeigten ein homogenes Verteilungsmuster der Zellen, 5 Präparate eine Clusterformation. Die Zelldichte variierte stark. Die mediane Zelldichte betrug 88 Zellen/mm² (Mittelwert: 124 Zellen/mm²; Maximum: 418 Zellen/mm², Minimum: 4 Zellen/mm²). In den Zellclustern lag die mediane Zelldichte bei 597 Zellen/mm² (Mittelwert: 685 Zellen/mm²; Maximum: 1709 Zellen/mm², Minimum: 270 Zellen/mm²).

Nr.	Fläche (in mm ²)	Zellzahl (n)	Zelldichte (n/mm ²)	Verteilung	Zelldichte im Cluster (n/mm ²)
1	6,15	543	88,29	homogen	n.a.
2	13,03	55	4,22	homogen	n.a.
3	11,25	79	7,02	homogen	n.a.
4	7,31	1991	272,19	2 Cluster	1709,18
5	26,73	756	28,29	1 Cluster	269,59
6	13,45	511	37,99	homogen	n.a.

3. Ergebnisse

7	6,48	930	143,58	homogen	n.a.
8	4,92	635	129,07	2 Cluster	596,63
9	13,27	444	33,46	1 Cluster	214,94
10	1,75	353	201,31	1 Cluster	633,49
11	5,43	2268	417,70	homogen	n.a.

Tab. 8: Darstellung der Zellverteilung in ILM-Präparaten der sekundären Makulaforamen.

3.2.4 Vergleich nach Grunderkrankung

Hinsichtlich der Altersstruktur des Gesamtkollektivs waren die jüngsten Patienten der Gruppe der sekundären Makulaforamen zuzuordnen. Mit durchschnittlich 45 Jahren waren diese zum Zeitpunkt der Operation etwa 20 Jahre jünger als die Patienten der idiopathischen oder rezidivierenden Makulaforamen. Sowohl die Patienten mit idiopathischen Makulaforamen als auch die Patienten mit rezidivierenden Makulaforamen waren durchschnittlich 66 Jahre alt. Geschlechtsspezifische Altersunterschiede fanden sich in keiner der Gruppen.

Bezüglich der Geschlechtsverteilung zeigte sich, dass in der Gruppe der idiopathischen Makulaforamen mehr Frauen zu finden waren. Das Verhältnis von Männern zu Frauen betrug 1:2,7. Die Männer und Frauen waren in den Gruppen der rezidivierenden und sekundären Makulaforamen dagegen gleich verteilt.

Die Dauer der Symptome vor Operation variierte. In den Gruppen der idiopathischen Makulaforamen lag die mediane Dauer bis zum Therapiebeginn bei 3,5 Monaten (Mittelwert: 3,9 Monate) und zeigte eine Schwankungsbreite von 6 Monate bis zu einem Jahr. Die mediane Symptombdauer der rezidivierenden sowie sekundären Makulaforamen war dagegen geringer. Die Patienten mit einem rezidivierenden Makulaforamen klagten im Median sowie im Mittel über eine Symptombdauer von 2 Monaten (Maximum: 6 Monate; Minimum: 0 Monate). Mit einem Median von 1 Monat war die Symptombdauer bei Patienten mit sekundären Makulaforamen am kürzesten. Jedoch betrug der Mittelwert in dieser Gruppe 12,5 Monate bei einer erheblichen Schwankungsbreite von Patienten mit sofortigen Therapiebeginn nach Symptombeginn sowie einem Patienten, der 5 Jahre über Symptome klagte, ehe er sich einer Therapie unterzog. [Abb. 16]

3. Ergebnisse

Parameter	Idiopathische MF	Rezidivierende MF	Sekundäre MF
Alter	66,35	66,2	45,4
Geschlecht	7 M / 19 W	7 M / 6 W	6 M / 5 W
Mediane Symptombdauer	3,5 Monate	2 Monate	1 Monat
Zellzahl (Median)	999	416	543
ILM-Fläche (Median)	11,0 mm ²	8,1 mm ²	7,3 mm ²
Zelldichte (Median)	54 Zellen/mm ²	76 Zellen/mm ²	88 Zellen/mm ²
Clusterverteilung	16 von 26 (61,5%)	1 von 13 (7,7%)	5 von 11 (45,5%)

Tab. 9: Klinische Daten der Patienten und Zellverteilung in ILM-Präparaten der verschiedenen Makulaforamen

In allen untersuchten Präparaten zeigten sich Zellansammlungen auf der ILM. Die Zellverteilung in den einzelnen Diagnosegruppen war nicht einheitlich. Während in der Gruppe der rezidivierenden Makulaforamen nur ein ILM-Präparat von 13 eine Zellclusterformation aufwies, so waren dies bei den sekundären Makulaforamen 5 von 11 und bei den idiopathischen Makulaforamen 16 von 26 ILM-Präparaten. Die Gruppe der idiopathischen Makulaforamen wies eine Zellclusterbildung auf 65,4 % aller ILM-Präparate auf. Die sekundären Makulaforamen wiesen in 45,5 % der Präparate Zellcluster im ILM-Präparat auf. Innerhalb der Gruppe der sekundären Makulaforamen zeigten nur 25 % der traumatischen MF eine Clusterformation (1 von 4 Präparaten). Bei den rezidivierenden Makulaforamen lag die Clusterrate mit 7,7 % deutlich niedriger als in den anderen Gruppen.

Die größte Fläche im Median der ILM-Präparate konnte bei den idiopathischen Makulaforamen mit 11,0 mm² gefunden werden. Die Fläche der ILM-Präparate war bei den sekundären Makulaforamen im Median mit 7,3 mm² am kleinsten [Abb. 17 und Tab. 9].

Die meisten Zellen fanden sich in den ILM-Präparaten der idiopathischen Makulaforamen mit 999 Zellen im Median. Die Präparate der rezidivierenden Makulaforamen wiesen im Median 416 Zellen und die der sekundären Makulaforamen 543 Zellen auf [Tab. 9].

3. Ergebnisse

Die größte mediane Zelldichte fand sich in den ILM-Präparaten der sekundären Makulaforamen mit 88 Zellen/mm². Die Präparate der rezidivierenden Makulaforamen zeigten 76 Zellen/mm² und die Präparate der idiopathischen Makulaforamen 54 Zellen/mm². [Abb. 18 und Tab. 9].

Die extreme Schwankungsbreite der Zelldichten in allen untersuchten Untergruppen sowie von homogener beziehungsweise clusterartiger Verteilung ist in den Abb. 17 und 18 dargestellt. In den Scatterplots wurde die Zelldichte entsprechend der Zellzahl sowie der Präparatgröße aufgetragen. [Abb. 19, Abb. 20]

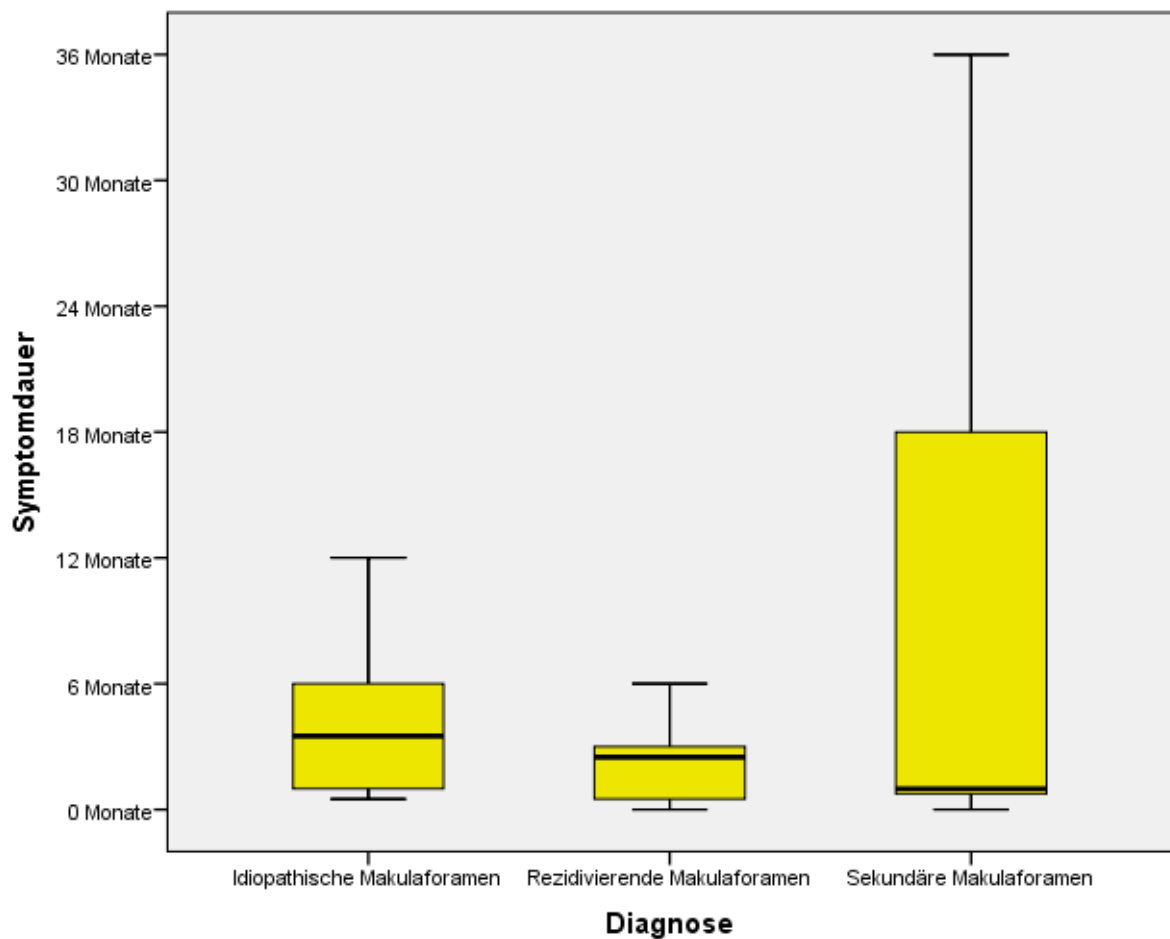


Abb. 16: Boxplot der Dauer der Symptome vor der Operation.

3. Ergebnisse

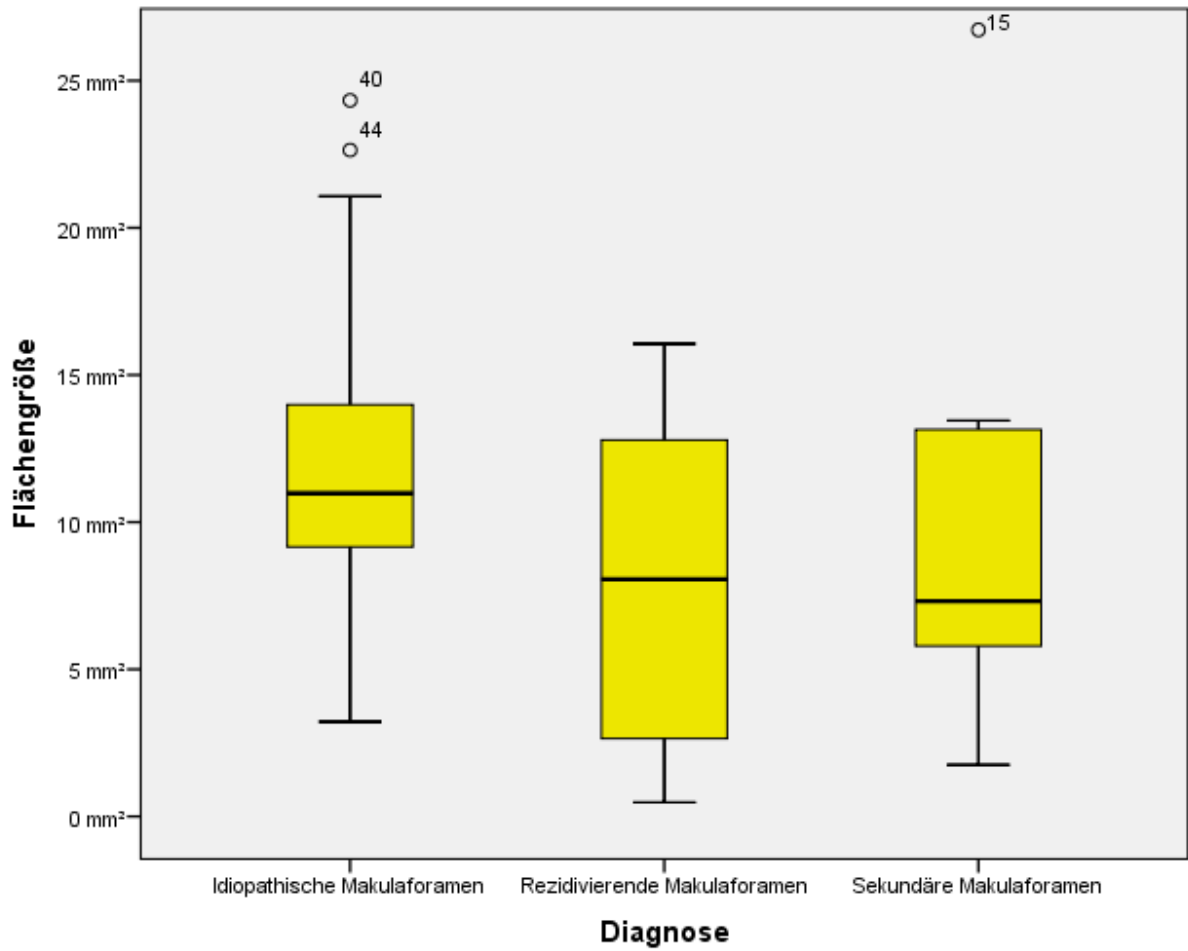


Abb. 17: Boxplot der Fläche der ILM-Präparate.

3. Ergebnisse

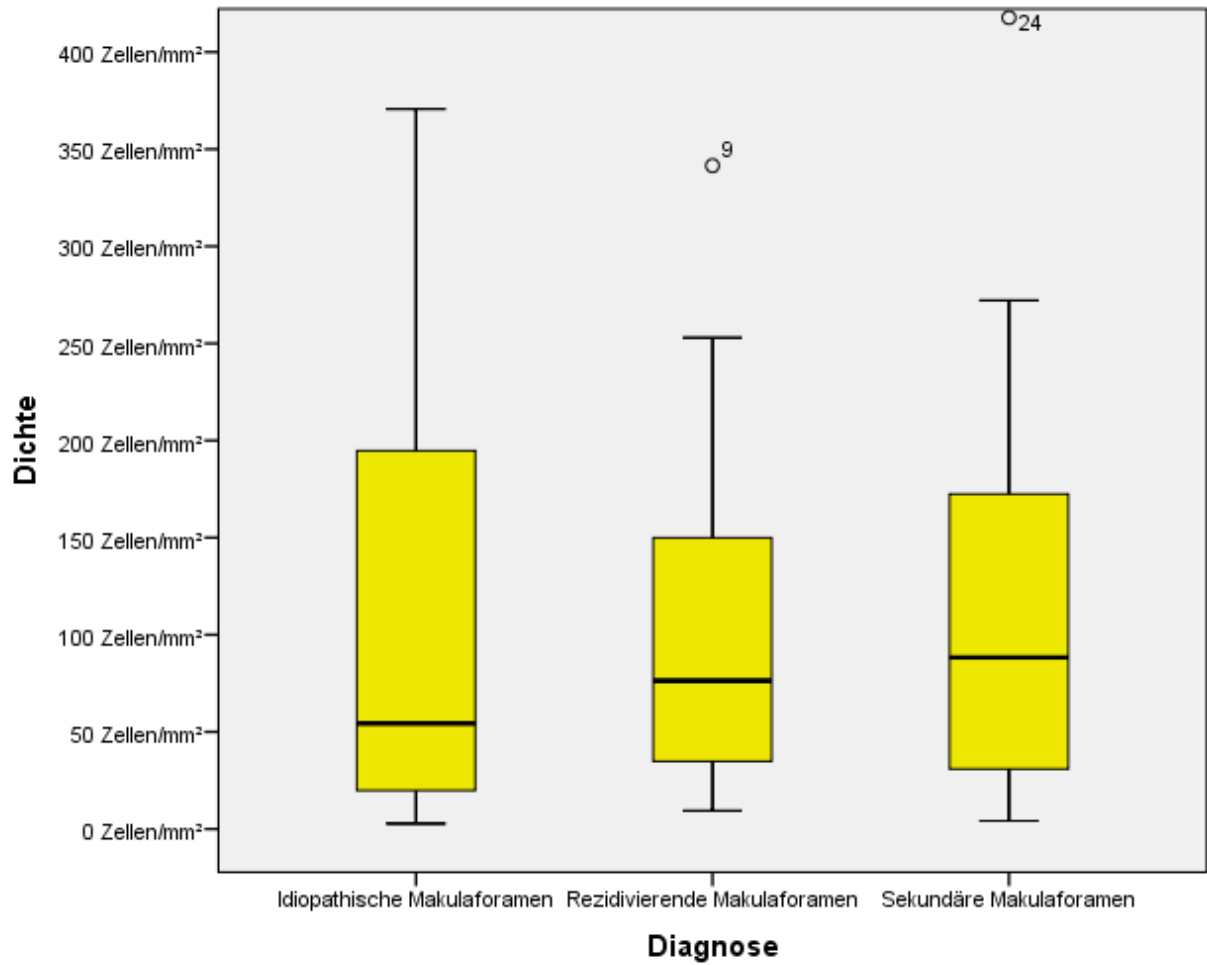


Abb. 18: Boxplot der Zelldichte in den ILM-Präparaten.

3. Ergebnisse

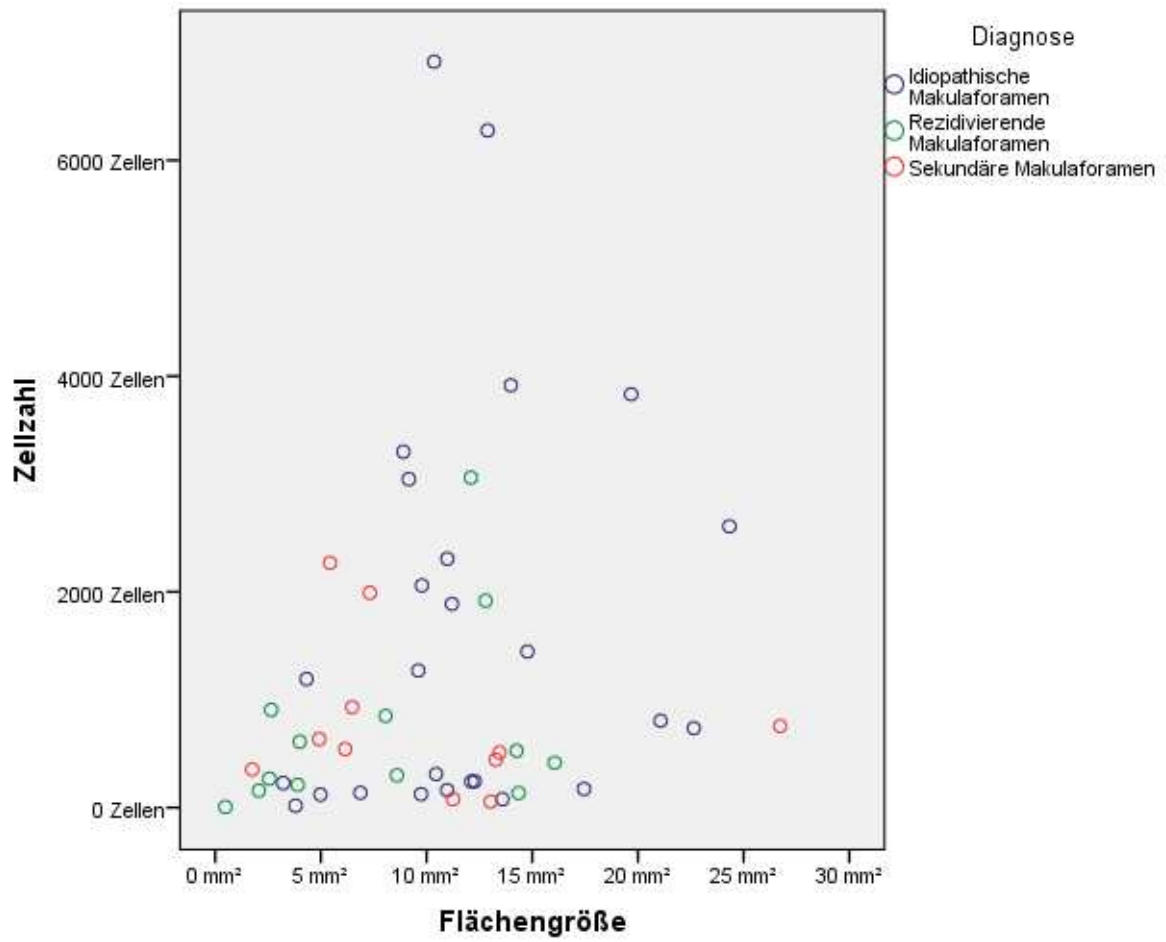


Abb. 19: Scatter-Plot-Diagramm mit Zellzahl und Fläche der ILM-Präparate (in mm²).

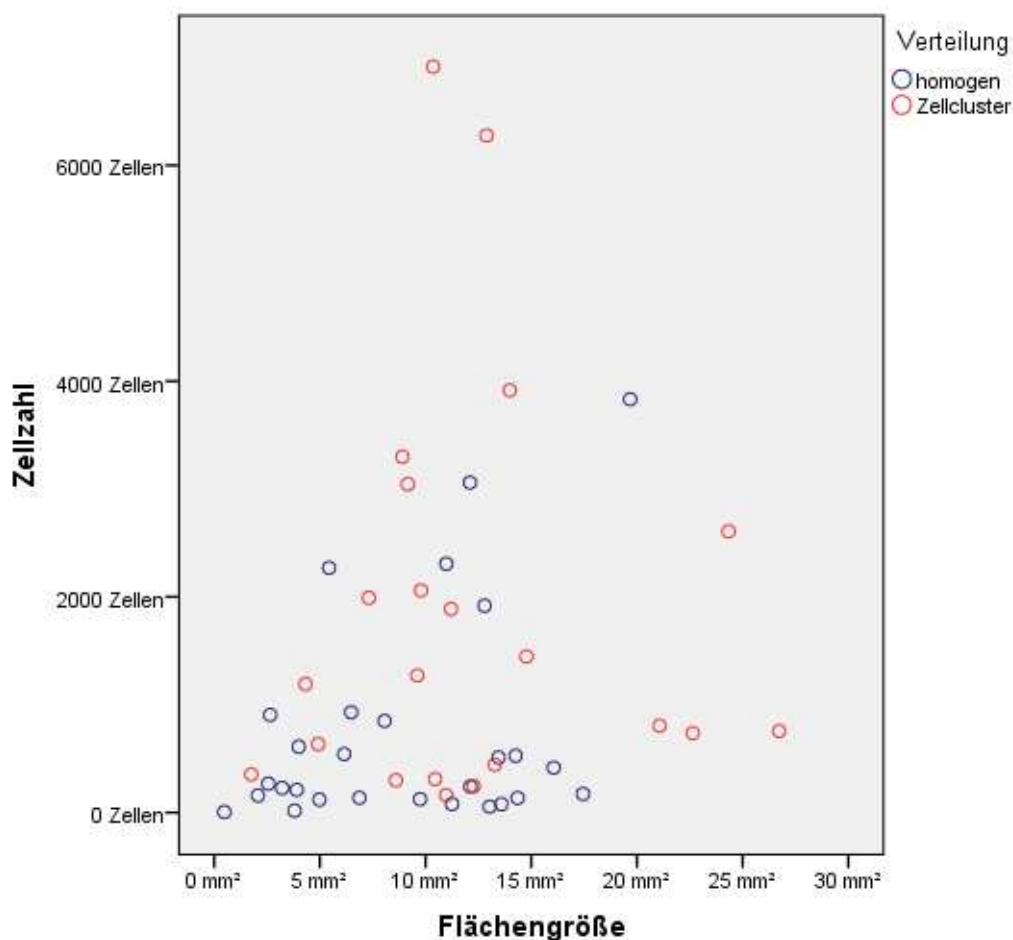


Abb. 20: Scatter-Plot-Diagramm mit Zellzahl und Fläche der ILM-Präparate (in mm²) sowie Darstellung der homogenen und clusterförmigen Zellverteilung

3.3 Analyse Zell-spezifischer Antigene in Präparaten der inneren Grenzmembran

3.3.1 Lokalisation Zell-spezifischer Antigene

In der immunhistologischen Analyse zeigte sich, dass die einzelnen Diagnosegruppen ein unterschiedliches Färbeverhalten bezüglich Zell-spezifischer Antigene aufwiesen. Das Gesamtergebnis ist in Tabelle 10 dargestellt.

Anti-GFAP wurde in allen Präparaten positiv gefärbt. Es zeigte sich weiterhin, dass ebenfalls Anti-CD45 in den Präparaten aller Diagnosegruppen positiv war. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass alle Diagnosegruppen ein ähnliches Färbeverhalten aufweisen. Die Häufigkeit der positiven Anfärbungen schwankte in den untersuchten Präparaten der

verschiedenen Makulaforamen bei CD68 und pan-Cytokeratin. In der Gruppe der rezidivierenden Makulaforamen fand sich in keiner der Proben eine Anfärbung für Antikörper gegen CD-68 sowie CytokeratinPan.

Die Negativkontrollen zeigten jeweils keine Anfärbung für alle getesteten Antikörper.

Antikörper	Zielstruktur	Antigen Expression in		
		Idiopathische Makulaforamen	Rezidivierende Makulaforamen	Sekundäre Makulaforamen
GFAP	Gliazellen	+	+	+
CD-45	Hyalozyten	+	+	+
αSMA	Aktinfilamente	+	(+)	(+)
CD-68	Makrophagen	+	-	(+)
CytokeratinP	RPE-Zellen	(+)	-	(+)

Tab. 10: Antigenexpression in den einzelnen Diagnosegruppen.

+ Expression in mindestens 80% der untersuchten Präparate, (+) Expression in mindestens 40% der untersuchten Präparate;
 – Expression in maximal 20 % der untersuchten Präparate.

3.3.2 Co-Lokalisation Zell-spezifischer Antigene von Gliazellen und Hyalozten

Anti-CD45, der Hyalozten-Marker, und Anti-GFAP, der Gliazell-Marker, zeigten oft ein gleiches Anfärbemuster. Dabei war es unerheblich, welcher Diagnosegruppe die Probe zugeordnet wurde. Die Co-Expression war in allen Proben nachweisbar, in denen sich diese Antikörper anfärben ließen.

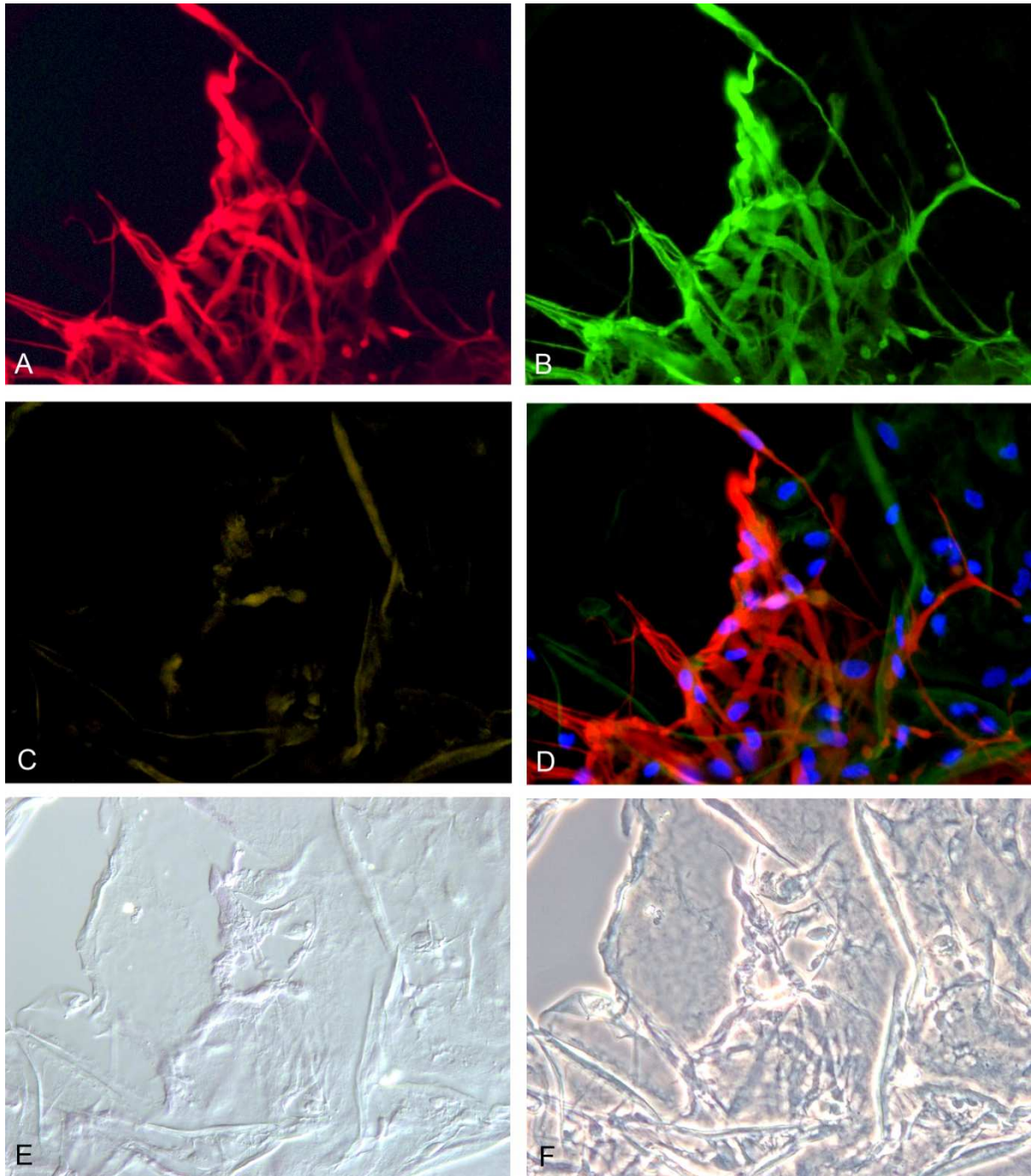


Abb. 21: Idiopathische Makulaforamen. A) Positive Anfärbung mit anti-CD45. B) Positive Anfärbung mit anti-GFAP (Co-Lokalisation mit anti-CD45). C) Anti-CytokeratinPan Färbung ohne Co-Lokalisation. D) Kombination von A, B und C mit DAPI-Anfärbung der Zellkerne. E) Interferenz-Aufnahme des dargestellten Areal. F) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme des gleichen Areal.

(Vergrößerung A-F: 40-fach)

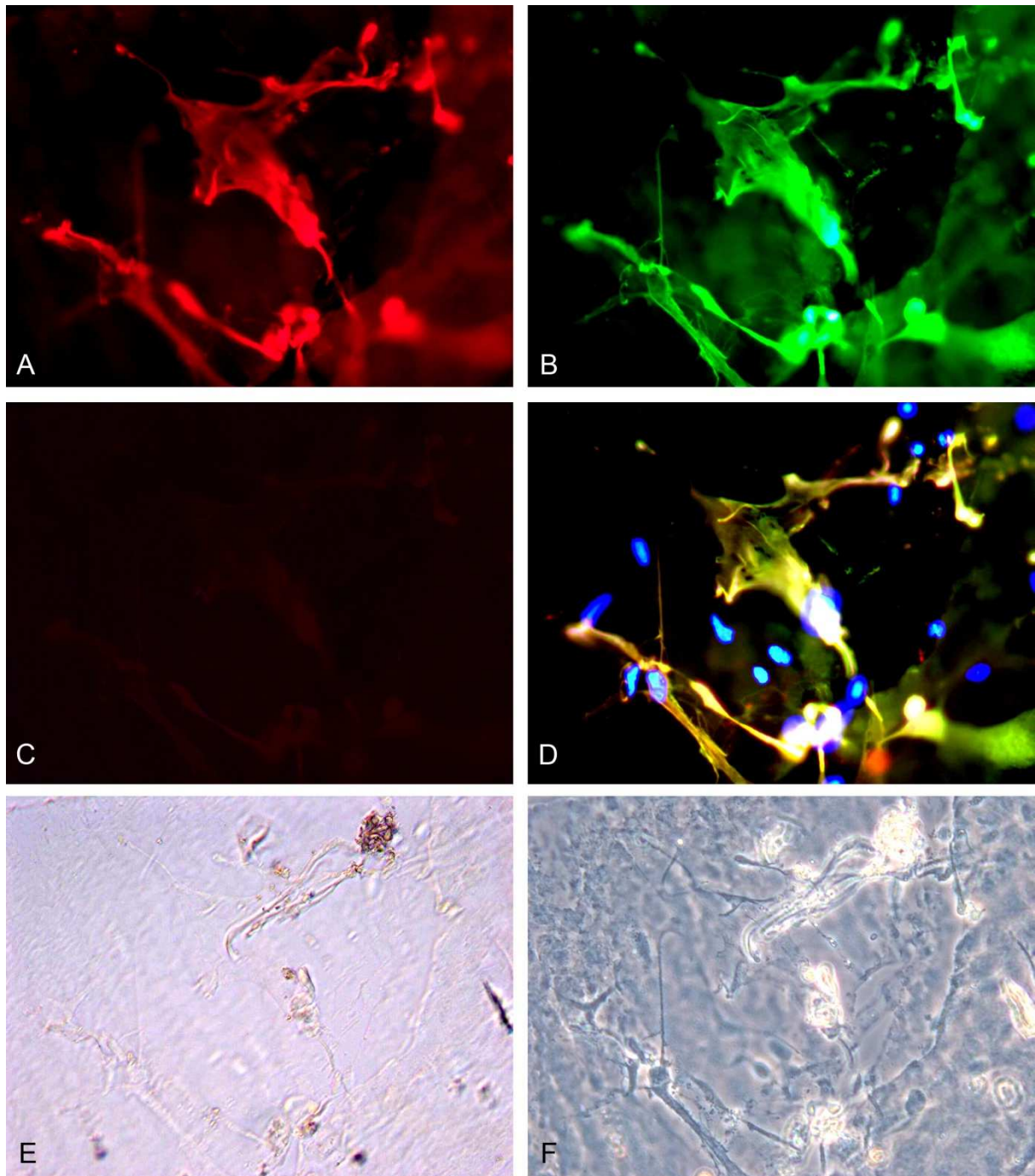


Abb. 22: Rezidivierende Makulaforamen. A) Positive Anfärbung mit anti-CD45. B) Positive Anfärbung mit anti-GFAP (Co-Lokalisation mit anti-CD 45). C) Anti-SMA Färbung negativ. D) Kombination von A, B und C mit DAPI-Anfärbung der Zellkerne. E) Interferenz-Aufnahme des dargestellten Areal. F) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme des gleichen Areal.

(Vergrößerung A-F: 40fach)

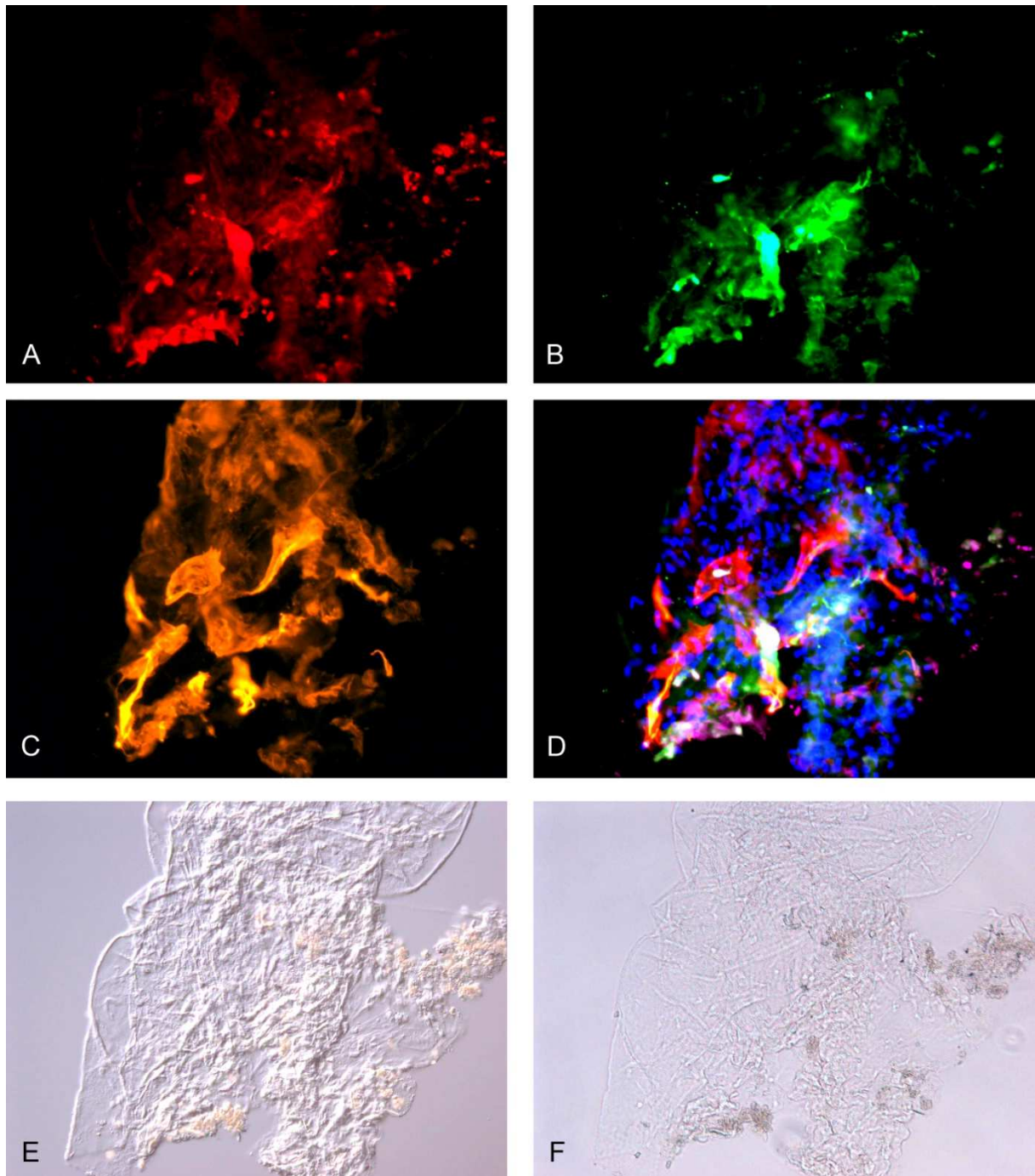


Abb. 23: Sekundäre Makulaforamen. A)Positive Anfärbung mit anti-CD 45. B) Positive Anfärbung mit anti-GFAP (Co-Lokalisation mit anti-CD 45). C) Positive Anfärbung mit anti-SMA ohne Co-Lokalisation. D) Kombination von A, B und C mit DAPI-Anfärbung der Zellkerne. E) Interferenz-Aufnahme des dargestellten Areal. F) Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme des gleichen Areal.

(Vergrößerung A-F: 20fach)

3. Ergebnisse

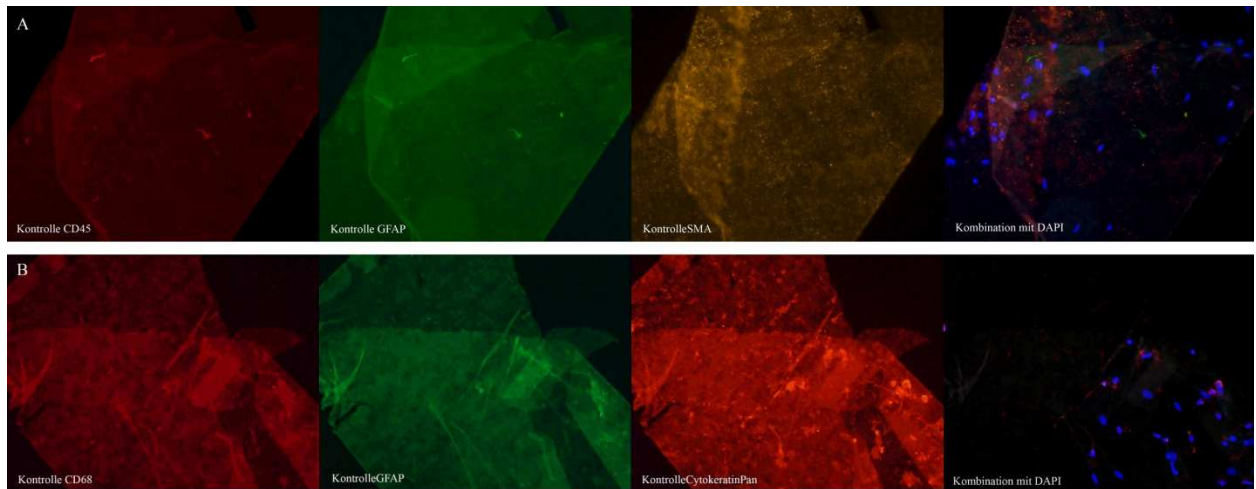


Abb. 24: Negativkontrollen der verwendeten Antikörper mit jeweils einem Überlagerungsbild der DAPI Zellkernfärbung. A) von links nach rechts: anti-CD45, anti-GFAP, anti-SMA, Überlagerung mit DAPI. B) von links nach rechts: anti-CD68, anti-GFAP, anti-CytokeratinPan, Überlagerung mit DAPI.

(Vergrößerung A und B: 20-fach)

4. Diskussion

Diese Studie stellt eine vergleichende Untersuchung der Präparate der inneren Grenzmembran dar, die von Patienten mit idiopathischen, rezidivierenden und sekundären Makulaforamen während der pars plana Vitrektomie gewonnen wurden. Dabei wurden die chirurgisch exziierten ILM-Präparate mittels Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie sowie nach immunhistologischer Anfärbung von Zell-spezifischen Antigenen mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Des Weiteren wurden die jeweiligen Patientendaten retrospektiv analysiert. Neu war dabei insbesondere, dass die interferenz- und phasenkontrastmikroskopische Darstellung sowie die immunhistologische Analyse nicht an Schnittpräparaten der ILM sondern an Flachpräparaten durchgeführt wurden. Dadurch konnten erstmals verlässliche Aussagen über die Gesamtzahl der Zellen und deren Verteilung auf der ILM bei Patienten mit Makulaforamen getroffen werden, die nach wie vor Gegenstand anhaltender Debatten bezüglich Pathogenese und therapeutischem Vorgehen sind. Bisher waren ILM-Präparate konventionell mittels Serienschnitttechnik aufgearbeitet worden, die keine absolute Zellzahlzählung zugelassen hatte. Die vorliegende Arbeit analysiert erstmals das Vorkommen und die Menge der Zellen sowie die Verteilung um den fovealen Defekt bei Patienten mit idiopathischen, rezidivierenden und sekundären Makulaforamen.

4.1 Flachpräparation der inneren Grenzmembran

Die Methode der Flachpräparation der ILM, die erstmals durch Hisatomi et al.⁷⁸ 2005 als „bird’s eye analysis“ vorgestellt wurde, lässt im Vergleich zur vormals verwendeten Serienschnitttechnik einen Überblick über die Gesamtgröße der entfernten ILM, der gesamten Zellzahl auf der ILM sowie der Verteilung der Zellen auf der ILM zu. Des Weiteren erlaubt die Flachpräparation der ILM-Präparate und deren Analyse aus der Vogelperspektive eine einfache und individuelle Korrelation mit den biomikroskopischen Untersuchungsbefunden der jeweiligen Patienten. Die Flachpräparation, die ohne Fixierung oder mit einer milden chemischen Fixierung durchgeführt werden kann, ermöglicht auch die Durchführung immunhistologischer Färbungen sowie die anschließende Aufbereitung des Materials für die Serienschnittpräparation der Elektronenmikroskopie. Auf diese Weise kann die Fortführung der Präparation vom Flach- zum Serienschnittpräparat im Verlauf der Analyse eine eindeutige

topographische Zuordnung der zellulären und extrazellulären Bestandteile zu retinaler oder vitrealer Seite der ILM zulassen.

Da die Flachpräparation ohne Fixierung oder mit einer nur milden chemischen Fixierung in Paraformaldehyd durchgeführt werden kann, erlaubt sie in besonderem Maße den Erhalt der Antigenität des Gewebes und ermöglicht damit die immunhistochemische Untersuchung des flach ausgebreiteten ILM-Präparates. Die Fixierung in Glutaraldehyd, wie sie gewöhnlich in der Schnittpräparation der konventionellen Elektronenmikroskopie Anwendung findet, zerstört dagegen die Antigenität zugunsten des Erhalts der Ultrastruktur. Die Flachpräparation kann auf diese Weise einen Gesamtüberblick über die verschiedenen Antigene der ILM-Präparate geben. Erwähnt werden soll jedoch, dass aufgrund der begrenzten Einstellungen am Fluoreszenzmikroskop nur eine begrenzte Anzahl von Antigenen als Kombinationsfärbung pro Präparat getestet werden kann, in unseren Untersuchungen war es eine Kombination von jeweils 3 Antigenen.^{13,14,93}

4.2 Zellzahl und Zellverteilung in Präparaten der inneren Grenzmembran

In dieser Arbeit zeigten alle untersuchten Präparate von Patienten mit idiopathischen, rezidivierenden und sekundären Makulaforamen zelluläre Ansammlungen auf der ILM. Über die Dichte und die Verteilung dieser Zellen in ILM-Präparaten von Patienten mit sekundären und rezidivierenden Makulaforamen wurde bisher noch nicht berichtet. Publikationen, die sich mit der ILM-Flachpräparation beschäftigten, konzentrierten sich zunächst auf den Nachweis von Zellen auf der ILM bei Patienten mit idiopathischen Makulaforamen.^{14,78}

Über Untersuchungen der Zelldichte auf der ILM berichtete erstmals Gandorfer et al. 2009.¹³ Bei 8 untersuchten idiopathischen Makulaforamen des Stadiums III nach Gass kamen die Autoren rechnerisch auf eine mediane Zelldichte von 189,5 Zellen/mm². Die Zelldichte variierte in den Präparaten deutlich und reichte von einem Minimum von 14 Zellen/mm² bis zu einem Maximum von 667 Zellen/mm². Eine clusterartige Zellverteilung zeigten 62,5% der ILM-Präparate. In der hier vorliegenden Arbeit lag die mediane Zelldichte der Präparate der idiopathischen Makulaforamen bei 54 Zellen/mm² und war damit deutlich geringer als bei Gandorfer et al.¹³, die Zelldichte variierte jedoch in ähnlicher Weise (Minimum 3 Zellen/mm²,

Maximum 667 Zellen/mm²). In den 26 untersuchten ILM-Präparaten von idiopathischen Makulaforamen fanden sich zudem ähnlich viele Cluster. Wir können daher die Beobachtung, dass circa 2/3 aller idiopathischen Makulaforamen im Stadium Gass III auf der ILM eine clusterartige Zellverteilung aufweisen, in der vorliegenden Arbeit bestätigen.

Bisher sind keine Angaben zu Zelldichte und Zellverteilung bei ILM-Präparaten von sekundären und rezidivierenden Makulaforamen bekannt. Die ILM-Präparate der sekundären Makulaforamen waren mit einer medianen Clusterrate von 45,5 % nur leicht niedriger als die Rate der Zell-Cluster von IMF. Allerdings war die Zelldichte der sekundären Makulaforamen höher als bei den IMF. Die Variation der absoluten Zellzahl war ähnlich ausgeprägt wie bei den idiopathischen Makulaforamen. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass Glaskörperveränderungen mit vitreoretinaler Traktion bei der Entstehung sekundärer Makulaforamen pathogenetisch eine den IMF vergleichbare Rolle zukommt.

Bei rezidivierenden Makulaforamen lag die mediane Zelldichte mit 76 Zellen/mm² höher als die Zelldichte bei Präparaten der idiopathischen Makulaforamen. Allerdings wurde in nur einem Präparat der rezidivierenden Makulaforamen eine Zell-Clusterbildung beobachtet. Mit einem Cluster in einem von 13 untersuchten ILM-Präparaten war diese Zellverteilung deutlich seltener bei den rezidivierenden Makulaforamen als bei den idiopathischen Makulaforamen vorhanden. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass bei den Patienten mit rezidivierenden Makulaforamen zelluläre Ansammlungen und Cluster-Formationen der ILM bereits entfernt wurden und nun die restliche ILM, die in der Regel der Fovea fern gelegen war, keine Zellcluster aufweist. Es wird vermutet, dass Zellcluster an Orten vitreoretinaler Traktion entstehen und epiretinale Zellen von diesen Clustern aus proliferieren und im Verlauf dichte, mehrschichtige epiretinale Membranen ausbilden.¹⁵ Denkbar ist auch, dass sich die Herkunft der epiretinalen Zellen bei rezidivierenden Makulaforamen von der Herkunft der Zellen bei idiopathischen Makulaforamen unterscheiden könnte. Die seltene Clusterbildung auf der ILM könnte in diesem Zusammenhang Ausdruck einer unterschiedlichen Pathogenese bei idiopathischen und rezidivierenden Makulaforamen sein. Während die antero-posteriore Glaskörpertraktion bei idiopathischen Makulaforamen eine primäre Rolle spielt, scheinen die epiretinalen Zellproliferationen auf der ILM für die tangentielle Traktion bei der Entstehung rezidivierende Makulaforamen verantwortlich zu sein.⁹⁴

Die ILM grenzt die Netzhaut zum Glaskörper im gesamten Bereich des hinteren Augenabschnittes ab. Operativ kann nicht immer ein genormtes Areal der Makula durch den Operateur gepeelt werden. In Augen mit rezidivierenden Makulaforamen muss diskutiert werden, ob das Areal des ILM-Peelings der Erstoperation vielleicht zu klein war, ob vitreomakuläre Traktionen daher nicht gelöst wurden und anteilig weiterbestanden, so dass ein Rezidiv des Makulaforamens auftreten konnte und eine Zweitoperation nötig wurde. Weiterhin belegen unsere Daten, dass ein Fortsetzen und Erweitern der gepeelten Fläche eine erfolgreiche Behandlung des rezidivierenden Makulaforamens darstellen kann.

4.3 Immunhistologische Färbung zellspezifischer Antigene

Alle immunhistologisch gefärbten Präparate zeigten unabhängig von ihrer Genese eine Expression von GFAP und CD45, die auf das Vorliegen von Gliazellen und Hyalozyten schließen lässt. Weiterhin zeigte sich in allen Untergruppen die Expression von α -SMA, bei den idiopathischen Makulaforamen häufig, bei den rezidivierenden Makulaforamen sowie den sekundären Makulaforamen im Vergleich zu den idiopathischen Makulaforamen seltener. Es ist davon auszugehen, dass der Nachweis von α -SMA-Antigenen das Vorhandensein von Aktinfilamenten in Myofibroblasten anzeigt. Das Vorkommen von Myofibroblasten wurde bereits in ultrastrukturellen und immunhistologischen Studien beschrieben.^{10,11,15} Es wird vermutet, dass Myofibroblasten in epiretinalen Membranen durch Transformation aus retinalen und extraretinalen Zellen entstehen und starke traktive Aktivität im Zellverbund ausüben können.^{15,43,95,96} Des Weiteren wurde in der hier vorliegenden Studie CD68 als Makrophagenmarker in den ILM-Präparaten von idiopathischen Makulaforamen sowie sekundären Makulaforamen immunhistologisch positiv nachgewiesen. Bei den rezidivierenden Makulaforamen ließen sich diese Zellen nicht nachweisen.

Insgesamt ermöglichte die Flachpräparation der ILM-Präparate von idiopathischen, rezidivierenden und sekundären Makulaforamen erstmals den direkten immunhistologischen Vergleich dieser Entitäten durch eine gleichzeitige Färbung mit verschiedenen Antikörpern. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf der inneren Grenzmembran bei allen Patienten insbesondere Gliazellen, Hyalozyten und Myofibroblasten eine wesentliche Rolle spielen. Die Präsenz von Gliazellen und Hyalozyten in idiopathischen Makulaforamen wurde

kürzlich von Schumann et al.¹⁵ beschrieben. Zudem wurde über Hinweise auf eine Beteiligung von Myofibroblasten in idiopathischen Makulaforamen von Yoo et al.¹¹, Schumann et al.¹⁰ sowie Gandorfer et al.⁹ bereits berichtet. Hiscott et al.⁹⁷ zeigte ebenfalls Makrophagen und retinale Pigmentepithelzellen in epiretinalen Membranen. Die hier vorliegende Arbeit zeigte erstmals auf immunhistologischer Grundlage, dass Zellpopulationen, die an der Pathogenese idiopathischer Makulaforamen beteiligt sind, auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese der rezidivierenden und sekundären Makulaforamen spielen. Das Verständnis der pathogenetischen Zusammenhänge wird jedoch durch die Transdifferenzierung epiretinaler Zellen im Zellverbund und durch die damit verbundene Phänotypänderung der Zellen mit assoziierter Änderung der Antigenpräsentation erschwert.

4.4 Nachweis von Hyalozyten

Die in dieser Arbeit untersuchten ILM-Präparate zeigten alle einheitlich eine Expression des Hyalozyten-Markers CD45. Diese Expression zeigte sich auch unabhängig der ätiologischen Gruppe der jeweiligen Makulaforamen. Das Vorhandensein von Hyalozyten im Bereich der inneren Grenzmembran ist schon seit mehr als 30 Jahren bekannt^{97,98}. Jedoch wurde bisher besonders den Gliazellen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese von Makulaforamen zugeschrieben. Die Beteiligung der Hyalozyten an der Entstehung der Makulaforamen wurde früher zwar bereits vermutet, aber erst kürzlich durch unsere Studien bestätigt. Die Arbeiten von Schumann et al.¹⁵ und Zhao et al.⁹⁴ zeigten Hyalozyten in Präparaten von idiopathischen Makulaforamen, epiretinaler Gliose und vitreomakulärem Traktionssyndrom. Auf die Rolle der Hyalozyten bei der Entstehung vitreoretinaler Erkrankungen wiesen auch Sakamoto et al. hin.⁹⁶

4.5 Co-Lokalisationen von Gliazellen und Hyalozyten

Die immunhistologischen Ergebnisse dieser Studie zeigten nicht nur bei idiopathischen Makulaforamen sondern erstmals auch bei rezidivierenden und sekundären Makulaforamen das Vorkommen von Zellen, in denen GFAP und CD-45 co-lokalisiert waren.

Hiscott et al.⁹⁹ hatten postuliert, dass GFAP-positive Zellen immer glialen Ursprungs sind. Anti-GFAP ist zwar als Gliazellmarker beschrieben, es ist jedoch denkbar, dass Anti-GFAP auch andere Zellen markieren könnte als Gliazellen. Die Co-Expression der Antigene GFAP und CD-45 in derselben Lokalisation wurde bereits bei Hyalozyten von Vögeln¹⁰⁰, Schweinen¹⁰¹ und Rindern⁴³ gezeigt. Aufgrund der bekannten phagozytären Eigenschaften der Hyalozyten kann vermutet werden, dass zumindest einige der initial dargestellten GFAP-positiven Zellen hyalozytären, vitrealen Ursprungs sind. Dabei ist denkbar, dass Hyalozyten makrophagenartige Anteile der Gliazellen phagozytieren und anschließend durch Antikörpernachweis für CD-45 sowie GFAP detektiert werden können. Des Weiteren ist auch eine Phänotypänderung mit Änderung der Antigenexpression im Rahmen einer Transdifferenzierung der Hyalozyten möglich.

Andererseits wurde bereits in den vergangenen Jahren darauf hingewiesen, dass retinale Müller-Zellen eine besondere Rolle in der Pathogenese der Makulaforamen spielen könnten.^{42,102–104} Es zeigte sich, dass GFAP-positive Zellen in Stresssituation auf der retinalen Oberfläche vermehrt anzutreffen sind.^{40,105} Für eine Transdifferenzierung retinaler Gliazellen in Hyalozyten-ähnliche Zellen sind jedoch bisher keine Hinweise bekannt.

4.6 Kontraktile Komponenten epiretinaler Zellproliferationen

Die Fähigkeit epiretinaler Zellen zur Transdifferenzierung in Myofibroblasten-artige Zellen zeigt sich in der Expression von α -SMA. Dieser Marker ist bekannt für den Nachweis kontraktiler Myofibroblasten, die in dieser Arbeit bei allen drei untersuchten Entitäten nachgewiesen werden konnten. Die gemeinsame Expression von α -SMA mit CD-45 und/oder GFAP wurde bereits in mehreren Arbeiten zuvor beschrieben.^{15,43,95,96,106} In dieser Arbeit zeigte sich α -SMA in unmittelbare Nähe von CD-45 und/oder GFAP, jedoch nie co-lokalisiert. Neuere Erkenntnisse von Zhao et al. zeigen, dass auch eine Co-Expression von α -SMA und GFAP in epiretinalen Membranen bei epiretinaler Gliose beobachtet werden kann.⁹⁴ Es wird derzeit davon ausgegangen, dass sich sowohl Hyalozyten als auch Gliazellen zu α -SMA-positiven Myofibroblasten differenzieren können. Während dieses Prozesses lässt die Immunreaktivität von GFAP und auch von CD-45 nach.¹⁰⁶ Die traktiven Bestandteile von Myofibroblasten ließen sich in jedem Stadium von IMF nachweisen¹⁵ und zeigten sich auch

in dieser Arbeit bei den sekundären und rezidivierenden Makulaforamen positiv gefärbt. Daher scheinen tangentielle Kräfte epiretinaler Zellproliferationen an der Pathogenese idiopathischer, rezidivierender und sekundärer Makulaforamen beteiligt zu sein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in einigen ILM-Präparaten der idiopathischen und sekundären Makulaforamen, jedoch nicht in den ILM-Präparaten der rezidivierenden Makulaforamen, die Antigene CD68 und CytokeratinPan nachweisbar waren. Die Antikörper zur Detektion von Makrophagen und retinalen Pigmentepithelzellen zeigten sich nur bei den Makulaforamen positiv, bei denen die Erkrankung längere Zeit vor Operation bestand. Schumann et al. zeigten bereits, dass CytokeratinPan sowie CD-68 erst ab Stadium III bei den IMF zu finden sind.¹⁵ Es ist anzunehmen, dass es sich bei den sekundären Makulaforamen ähnlich verhält.

4.7 Schlussfolgerungen

Zusammenfassend lässt sich aus dieser Arbeit folgendes schlussfolgern:

1. Die Flachpräparation chirurgisch exzidierter ILM ergänzt in besonderem Maße die konventionellen Präparationsverfahren der Serienschmitttechnik. Erstmals gelang es in dieser Arbeit die absolute Zellzahl, die Zellverteilung und die Zelldichte sowie die Größe von ILM-Präparaten idiopathischer Makulaforamen °III nach Gass, sekundärer und rezidivierender Makulaforamen darzustellen und zu analysieren. Zudem konnte durch eine milde chemische Fixierung dieser ILM-Präparate eine immunhistochemische Analyse der zellulären Bestandteile durchgeführt werden.
2. Hyalozyten und Gliazellen waren in allen untersuchten Entitäten der Makulaforamen nachweisbar. Ihnen kommt eine wesentliche Bedeutung in der Entstehung der Makulaforamen zu. Dabei konnten wir erstmals zeigen, dass Hyalozyten nicht nur bei idiopathischen sondern auch bei sekundären und rezidivierenden Makulaforamen in epiretinalen Zellproliferation auf der ILM auftreten.
3. Die gleichzeitige Co-Lokalisation von Zell-spezifischen Antigenen für Hyalozyten und Gliazellen konnte für idiopathische Makulaforamen bestätigt werden und erstmals für sekundäre und rezidivierende Makulaforamen gezeigt werden. Durch den

Nachweis von Hyalozyten kommt dem Glaskörper in der Entstehung dieser Makulaforamen eine zunehmende Bedeutung zu. Die Konsequenzen sind weitreichend. Ziel der Vitrektomie muss sein, alle Reste der Glaskörperrinde möglichst vollständig von der Netzhautoberfläche auszuräumen und die ILM als Leitschiene für epiretinale Zellproliferationen ausgiebig im Bereich der Makula zu entfernen. Zukünftig wird der kürzlich eingeführten pharmakologischen Vitreolyse auf dem Gebiet der Makulaforamentherapie eine zunehmende Bedeutung zukommen.

Der Nachweis von α -SMA-positiven Zellen weist auf das Vorkommen von Myofibroblasten hin, die als transdifferenzierte Zellen sowohl von Gliazellen als auch von Hyalozyten ausgehen können und starke kontraktile Eigenschaften besitzen. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch keine Hinweise zur Herkunft der Myofibroblasten gefunden. Die Kontraktilität dieser Zellen führt zur Ausbildung tangentialer Traktionen an der Netzhaut. Das Vorkommen von Myofibroblasten bei idiopathischen Makulaforamen^{°III} sowie bei sekundären und rezidivierenden Makulaforamen scheint demnach bei der Ausbildung von Traktionen an der Netzhaut eine wichtige Rolle zu spielen. Zukünftige Forschungsarbeiten sollten Therapiestrategien entwickeln, um Myofibroblasten und Fibrosereaktion auf der Netzhaut pharmakologisch zu hemmen, um dadurch die Behandlung der Patienten risikoärmer und erfolgreicher durchführen zu können.

5. Zusammenfassung

Makulaforamen gehören zur Gruppe der traktiven Makulopathien, einer Gruppe von Netzhauterkrankungen, die den Bereich des schärfsten Sehens betreffen und sich durch das Vorliegen von Zugkräften an der inneren Grenzmembran (ILM) auszeichnen. Als effektive Therapie bei Makulaforamen ergibt sich derzeit das Peeling der ILM im Rahmen einer Vitrektomie. Es besteht jedoch Unklarheit über das Auftreten epiretinaler Zellansammlungen an der ILM bei idiopathischen, rezidivierenden und sekundären Makulaforamen, was die anhaltende Diskussion über das therapeutische Vorgehen und die Entfernung der ILM während der Vitrektomie bedingt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Häufigkeit, Verteilung und Herkunft dieser epiretinalen Zellen an der ILM bei idiopathischen, sekundären und rezidivierenden Makulaforamen zu analysieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind für das pathogenetische Verständnis und für das Vorgehen in der Netzhautchirurgie bei Makulaforamen von wesentlicher Bedeutung.

In bisherigen Untersuchungen von Präparaten der ILM mit epiretinalen Zellproliferationen wurden konventionelle Serienschnitte angefertigt, die keine absolute Zellzahlzählung zuließen. In dieser Arbeit wurde eine neue Methode für die Präparation der ILM verwendet, die Flachpräparation. Sie erlaubt, im Gegensatz zur Serienschnitttechnik, die Gesamtfläche der entfernten ILM, die Gesamtzellzahl sowie die Verteilung der Zellen auf der ILM zu bestimmen sowie immunhistologische Untersuchungen an ILM-Präparaten durchzuführen.

Dafür wurden in dieser Arbeit die ILM-Präparate von 50 Patienten gewonnen, die im Zeitraum von Oktober 2007 bis August 2009 an der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München operiert worden sind. Insgesamt wurden 26 Patienten mit idiopathischen Makulaforamen, 13 Patienten mit rezidivierenden Makulaforamen und 11 Patienten mit sekundären Makulaforamen eingeschlossen. Die chirurgisch gewonnenen ILM-Präparate wurden immunhistologisch, interferenz- und phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Dabei kamen Zell-spezifische Antikörper für Gliazellen (anti-GFAP), Hyalozyten (anti-CD-45), Aktinfilamente (anti- α -SMA), Makrophagen (anti-CD-68) und retinale Pigmentepithelzellen (anti-CytokeratinPan) zur Anwendung. Die Patientendaten wurden retrospektiv ausgewertet.

In allen Präparaten wurden epiretinale Zellproliferationen nachgewiesen. ILM-Präparaten von idiopathischen Makulaforamen zeigten eine mediane Zelldichte von 54 Zellen/mm² mit

großer Varianz sowie das Vorliegen von Zellclustern in 2/3 der Fälle. Die Präparate der rezidivierenden Makulaforamen zeigten eine mediane Zelldichte von 76 Zellen/mm². In 92% (12 von 13 Präparaten) wurde eine homogene Zellverteilung beobachtet. In nur einem Präparat wurde eine einzelne Zellclusterformation gefunden. Die Präparate der sekundären Makulaforamen zeigten eine mediane Zelldichte von 88 Zellen/mm² mit einer Clusterrate von 45,5%. Das Auftreten der Zellcluster im Präparat ist pathogenetisch relevant und spricht für eine stattgehabte Glaskörperanheftung mit vitreomakulärer Traktion in diesem lokalisierten Areal der ILM. Gliazellen und Hyalozyten dominierten in allen ILM-Präparaten bei idiopathischen, rezidivierenden und sekundären Makulaforamen. Myofibroblasten wurden häufig in idiopathischen Makulaforamen gefunden. Die Häufigkeit der positiven Anfärbungen schwankte besonders bei anti-CD68 und anti-CytokeratinPan. In der Gruppe der rezidivierenden Makulaforamen fand sich in keiner der Proben eine Anfärbung für Makrophagen oder retinale Pigmentepithelzellen. Anti-CD45, der Hyalozyten-Marker, und Anti-GFAP, der Gliazell-Marker, zeigten oft eine Co-Lokalisation. Dabei war es unerheblich, welcher Diagnosegruppe die Probe zugeordnet wurde. Die Co-Expression war in allen Proben nachweisbar, in denen sich diese Antikörper anfärben ließen.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Flachpräparation chirurgisch exzidierter ILM-Präparate in besonderem Maße die konventionellen Präparationsverfahren der Serienschnitttechnik ergänzt. Erstmals gelang es in dieser Arbeit die absolute Zellzahl, die Zellverteilung und die Zelldichte sowie die Größe von ILM-Präparaten bei idiopathischen Makulaforamen^{°III} nach Gass, sekundären und rezidivierenden Makulaforamen darzustellen und dabei auch immunhistologisch zu analysieren. Die gleichzeitige Co-Lokalisation von Zell-spezifischen Antigenen für Hyalozyten und Gliazellen konnte für idiopathische Makulaforamen bestätigt werden und erstmals für sekundäre und rezidivierende Makulaforamen gezeigt werden. Durch den Nachweis von Hyalozyten kommt dem Glaskörper in der Entstehung dieser Makulaforamen eine zunehmende Bedeutung zu. Die Konsequenzen sind weitreichend. Ziel der Vitrektomie muss sein, alle Reste der Glaskörperinde möglichst vollständig von der Netzhautoberfläche zu entfernen sowie die ILM als Leitschiene für epiretinale Zellproliferationen ausgiebig im Bereich der Makula zu peelen.

6. Literaturverzeichnis

1. Sebag J. Anatomy and pathology of the vitreo-retinal interface. *Eye* 1992;6 (Pt 6):541–52.
2. Sebag J. Anomalous posterior vitreous detachment: a unifying concept in vitreo-retinal disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;242(8):690–8.
3. Smiddy WE, Flynn Jr. HW. Pathogenesis of macular holes and therapeutic implications. *Am J Ophthalmol* 2004;137(3):525–37.
4. Green WR. The macular hole: histopathologic studies. *Arch Ophthalmol* 2006;124(3):317–21.
5. Gass JD. Reappraisal of biomicroscopic classification of stages of development of a macular hole. *Am J Ophthalmol* 1995;119(6):752–9.
6. Ng CH, Cheung N, Wang JJ, et al. Prevalence and risk factors for epiretinal membranes in a multi-ethnic United States population. *Ophthalmology* 2011;118(4):694–9.
7. Heidenkummer HP, Kampik A. [Morphologic analysis of epiretinal membranes in surgically treated idiopathic macular foramina. Results of light and electron microscopy]. *Ophthalmologie* 1996;93(6):675–9.
8. Kampik A, Kenyon KR, Michels RG, Green WR, de la Cruz ZC. Epiretinal and vitreous membranes. Comparative study of 56 cases. *Arch Ophthalmol* 1981;99(8):1445–54.
9. Gandorfer A, Rohleder M, Grosselfinger S, Haritoglou C, Ulbig M, Kampik A. Epiretinal pathology of diffuse diabetic macular edema associated with vitreomacular traction. *Am J Ophthalmol* 2005;139(4):638–52.
10. Schumann RG, Schaumberger MM, Rohleder M, Haritoglou C, Kampik A, Gandorfer A. Ultrastructure of the vitreomacular interface in full-thickness idiopathic macular holes: a consecutive analysis of 100 cases. *Am J Ophthalmol* 2006;141(6):1112–9.
11. Yoo HS, Brooks Jr. HL, Capone Jr. A, L'Hernault NL, Grossniklaus HE. Ultrastructural features of tissue removed during idiopathic macular hole surgery. *Am J Ophthalmol* 1996;122(1):67–75.
12. Hisatomi T, Enaida H, Sakamoto T, et al. Cellular migration associated with macular hole: a new method for comprehensive bird's-eye analysis of the internal limiting membrane. *Arch Ophthalmol* 2006;124(7):1005–11.

13. Gandorfer A, Scheler R, Haritoglou C, Schumann R, Nentwich M, Kampik A. Pathology of the macular hole rim in flat-mounted internal limiting membrane specimens. *Retina* 2009;29(8):1097–105.
14. Gandorfer A, Scheler R, Schumann R, Haritoglou C, Kampik A. Interference microscopy delineates cellular proliferations on flat mounted internal limiting membrane specimens. *Br J Ophthalmol* 2009;93(1):120–2.
15. Schumann RG, Eibl KH, Zhao F, et al. Immunocytochemical and ultrastructural evidence of glial cells and hyalocytes in internal limiting membrane specimens of idiopathic macular holes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(11):7822–34.
16. Mitry D, Fleck BW, Wright AF, Campbell H, Charteris DG. Pathogenesis of rhegmatogenous retinal detachment: predisposing anatomy and cell biology. *Retina* 2010;30(10):1561–72.
17. Heegaard S. Morphology of the vitreoretinal border region. *Acta Ophthalmol Scand Suppl* 1997;(222):1–31.
18. Heegaard S. Structure of the human vitreoretinal border region. *Ophthalmologica* 1994;208(2):82–91.
19. Benninghoff A, Drenckhahn D. Anatomie. 2. Herz-Kreislauf-System, Lymphatisches System, Endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. Urban & Schwarzenberg; 2004.
20. Kampik A. Brief overview of the molecular structure of normal and aging human vitreous. *Retina* 2012;32 Suppl 2:S179–80.
21. Sebag J. Vitreoschisis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008;246(3):329–32.
22. Bishop PN, Holmes DF, Kadler KE, McLeod D, Bos KJ. Age-related changes on the surface of vitreous collagen fibrils. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(4):1041–6.
23. Bishop PN. Vitreous as a substrate for vitreolysis. *Dev Ophthalmol* 2009;44:7–19.
24. Johnson MW. Posterior vitreous detachment: evolution and role in macular disease. *Retina* 2012;32 Suppl 2:S174–8.
25. Uchino E, Uemura A, Ohba N. Initial stages of posterior vitreous detachment in healthy eyes of older persons evaluated by optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 2001;119(10):1475–9.
26. Aaberg TM, Blair CJ, Gass JD. Macular holes. *Am J Ophthalmol* 1970;69(4):555–62.
27. McCannel CA, Ensminger JL, Diehl NN, Hodge DN. Population-based incidence of macular holes. *Ophthalmology* 2009;116(7):1366–9.

28. Rahmani B, Tielsch JM, Katz J, et al. The cause-specific prevalence of visual impairment in an urban population. The Baltimore Eye Survey. *Ophthalmology* 1996;103(11):1721–6.
29. Mitchell P, Smith W, Chey T, Wang JJ, Chang A. Prevalence and associations of epiretinal membranes. The Blue Mountains Eye Study, Australia. *Ophthalmology* 1997;104(6):1033–40.
30. Gass JD. Idiopathic senile macular hole. Its early stages and pathogenesis. *Arch Ophthalmol* 1988;106(5):629–39.
31. La Cour M, Friis J. Macular holes: classification, epidemiology, natural history and treatment. *Acta Ophthalmol Scand* 2002;80(6):579–87.
32. Duke-Elder S. *System of Ophthalmology: Diseases of the retina*. London: Mosby; 1967.
33. Johnson RN, Gass JD. Idiopathic macular holes. Observations, stages of formation, and implications for surgical intervention. *Ophthalmology* 1988;95(7):917–24.
34. Akiba J, Yoshida A, Trempe CL. Risk of developing a macular hole. *Arch Ophthalmol* 1990;108(8):1088–90.
35. Akiba J, Quiroz MA, Trempe CL. Role of posterior vitreous detachment in idiopathic macular holes. *Ophthalmology* 1990;97(12):1610–3.
36. Ezra E. Idiopathic full thickness macular hole: natural history and pathogenesis. *Br J Ophthalmol* 2001;85(1):102–8.
37. Hikichi T, Trempe CL. Risk of decreased visual acuity in full-thickness idiopathic macular holes. *Am J Ophthalmol* 1993;116(6):708–12.
38. Hikichi T, Akiba J, Trempe CL. Effect of the vitreous on the prognosis of full-thickness idiopathic macular hole. *Am J Ophthalmol* 1993;116(3):273–8.
39. Kakehashi A, Schepens CL, Trempe CL. Vitreomacular observations. II. Data on the pathogenesis of idiopathic macular breaks. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996;234(7):425–33.
40. Lewis ML, Cohen SM, Smiddy WE, Gass JD. Bilaterality of idiopathic macular holes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996;234(4):241–5.
41. Gaudric A, Haouchine B, Massin P, Paques M, Blain P, Erginay A. Macular hole formation: new data provided by optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* 1999;117(6):744–51.
42. Bringmann A, Wiedemann P. Involvement of Muller glial cells in epiretinal membrane formation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247(7):865–83.

43. Kohno RI, Hata Y, Kawahara S, et al. Possible contribution of hyalocytes to idiopathic epiretinal membrane formation and its contraction. *Br J Ophthalmol* 2009;93(8):1020–6.
44. Kelly NE, Wendel RT. Vitreous surgery for idiopathic macular holes. Results of a pilot study. *Arch Ophthalmol* 1991;109(5):654–9.
45. Wendel RT, Patel AC, Kelly NE, Salzano TC, Wells JW, Novack GD. Vitreous surgery for macular holes. *Ophthalmology* 1993;100(11):1671–6.
46. Haritoglou C, Reiniger IW, Schaumberger M, Gass CA, Priglinger SG, Kampik A. Five-year follow-up of macular hole surgery with peeling of the internal limiting membrane: update of a prospective study. *Retina* 2006;26(6):618–22.
47. Paques M, Massin P, Blain P, Duquesnoy AS, Gaudric A. Long-term incidence of reopening of macular holes. *Ophthalmology* 2000;107(4):760–5; discussion 766.
48. Cohen SM, Gass JD. Macular hole following severe hypertensive retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994;112(7):878–9.
49. Brown GC. Macular hole following rhegmatogenous retinal detachment repair. *Arch Ophthalmol* 1988;106(6):765–6.
50. Flynn Jr. HW. Macular hole surgery in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1994;112(7):877–8.
51. Delori F, Pomerantzeff O, Cox MS. Deformation of the globe under high-speed impact: its relation to contusion injuries. *Invest Ophthalmol* 1969;8(3):290–301.
52. Johnson RN, McDonald HR, Lewis H, et al. Traumatic macular hole: observations, pathogenesis, and results of vitrectomy surgery. *Ophthalmology* 2001;108(5):853–7.
53. Gill MK, Lou PL. Traumatic macular holes. *Int Ophthalmol Clin* 2002;42(3):97–106.
54. Kim JW, Freeman WR, El-Haig W, Maguire AM, Arevalo JF, Azen SP. Baseline characteristics, natural history, and risk factors to progression in eyes with stage 2 macular holes. Results from a prospective randomized clinical trial. Vitrectomy for Macular Hole Study Group. *Ophthalmology* 1995;102(12):1818–9.
55. Kim JW, Freeman WR, Azen SP, El-Haig W, Klein DJ, Bailey IL. Prospective randomized trial of vitrectomy or observation for stage 2 macular holes. Vitrectomy for Macular Hole Study Group. *Am J Ophthalmol* 1996;121(6):605–14.
56. Freeman WR, Azen SP, Kim JW, El-Haig W, Mishell 3rd DR, Bailey I. Vitrectomy for the treatment of full-thickness stage 3 or 4 macular holes. Results of a multicentered randomized clinical trial. The Vitrectomy for Treatment of Macular Hole Study Group. *Arch Ophthalmol* 1997;115(1):11–21.

57. Saito Y, Hirata Y, Hayashi A, Fujikado T, Ohji M, Tano Y. The visual performance and metamorphopsia of patients with macular holes. *Arch Ophthalmol* 2000;118(1):41–6.
58. Marmor MF. A brief history of macular grids: from Thomas Reid to Edvard Munch and Marc Amsler. *Surv Ophthalmol* 2000;44(4):343–53.
59. Huang D, Swanson EA, Lin CP, et al. Optical coherence tomography. *Science* (80-) 1991;254(5035):1178–81.
60. Drexler W, Morgner U, Ghanta RK, Kartner FX, Schuman JS, Fujimoto JG. Ultrahigh-resolution ophthalmic optical coherence tomography. *Nat Med* 2001;7(4):502–7.
61. Novotny HR, Alvis DL. A method of photographing fluorescence in circulating blood in the human retina. *Circulation* 1961;24:82–6.
62. Dollery CT, Hodge J V, Engel M. Studies of the retinal circulation with fluorescein. *Br Med J* 1962;2(5314):1210–5.
63. Lorentzen SE. Drusen of the optic disk. A clinical and genetic study. *Acta Ophthalmol* 1966;:Suppl 90:1–180.
64. Sanders MD, Ffytche TJ. Fluorescein angiography in the diagnosis of drusen of the disc. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1967;87:457–68.
65. Oksala A. [Ultrasonic apparatus in examination of the eye & its diseases]. *Nord Med* 1958;59(21):721–5.
66. Buschmann W. [A new optical-acoustic method of examination]. *Klin Monbl Augenheilkd* 1963;142:170–6.
67. Knapp. Über die isolierte Zerreißung der Aderhaut infolge von Traumen auf den Augapfel. *Arch Augenheilkd* 1869;1:8–29.
68. Williams GA. Macular holes: the latest in current management. *Retina* 2006;26(6 Suppl):S9–12.
69. Destatis SB. Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern - ausführliche Darstellung -. 2010;49(0):16.
70. Schumann RG, Schaumberger MM, Rohleder M, Haritoglou C, Kampik A, Gandorfer A. [The primary objective in macular hole surgery. Ultrastructural features of the vitreomacular interface]. *Ophthalmologie* 2007;104(9):783–9.
71. Schumann RG, Remy M, Grueterich M, Gandorfer A, Haritoglou C. How it appears: electron microscopic evaluation of internal limiting membrane specimens obtained during brilliant blue G assisted macular hole surgery. *Br J Ophthalmol* 2008;92(3):330–1.

72. Schumann RG, Gandorfer A, Priglinger SG, Kampik A, Haritoglou C. Vital dyes for macular surgery: a comparative electron microscopy study of the internal limiting membrane. *Retina* 2009;29(5):669–76.
73. Duker JS, Wendel R, Patel AC, Puliafito CA. Late re-opening of macular holes after initially successful treatment with vitreous surgery. *Ophthalmology* 1994;101(8):1373–8.
74. Christmas NJ, Smiddy WE, Flynn Jr. HW. Reopening of macular holes after initially successful repair. *Ophthalmology* 1998;105(10):1835–8.
75. Smiddy WE, Michels RG, de Bustros S, de la Cruz Z, Green WR. Histopathology of tissue removed during vitrectomy for impending idiopathic macular holes. *Am J Ophthalmol* 1989;108(4):360–4.
76. Messmer EM, Heidenkummer HP, Kampik A. Ultrastructure of epiretinal membranes associated with macular holes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998;236(4):248–54.
77. Ezra E, Fariss RN, Possin DE, et al. Immunocytochemical characterization of macular hole opercula. *Arch Ophthalmol* 2001;119(2):223–31.
78. Hisatomi T, Enaida H, Sakamoto T, et al. A new method for comprehensive bird's-eye analysis of the surgically excised internal limiting membrane. *Am J Ophthalmol* 2005;139(6):1121–2.
79. Tozzoli R, Bonaguri C, Melegari A, Antico A, Bassetti D, Bizzaro N. Current state of diagnostic technologies in the autoimmunology laboratory. *Clin Chem Lab Med* 2013;51(1):129–38.
80. Hargraves MM, Richmond H, Morton R. Presentation of two bone marrow elements; the tart cell and the L.E. cell. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1948;23(2):25–8.
81. Friou GJ. Clinical application of a test for lupus globulin-nucleohistone interaction using fluorescent antibody. *Yale J Biol Med* 1958;31(1):40–7.
82. Holborow EJ, Weir DM, Johnson GD. A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. *Br Med J* 1957;2(5047):732–4.
83. Moller G. Demonstration of Mouse Isoantigens at the Cellular Level by the Fluorescent Antibody Technique. *J Exp Med* 1961;114(4):415–34.
84. Isaacs A, Baker M, Wavrant-De Vrieze F, Hutton M. Determination of the gene structure of human GFAP and absence of coding region mutations associated with frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17. *Genomics* 1998;51(1):152–4.
85. Ueyama H, Bruns G, Kanda N. Assignment of the vascular smooth muscle actin gene ACTSA to human chromosome 10. *Jinrui Idengaku Zasshi* 1990;35(2):145–50.

86. Leube RE, Bosch FX, Romano V, Zimbelmann R, Hofler H, Franke WW. Cytokeratin expression in simple epithelia. III. Detection of mRNAs encoding human cytokeratins nos. 8 and 18 in normal and tumor cells by hybridization with cDNA sequences in vitro and in situ. *Differentiation* 1986;33(1):69–85.
87. Lessin SR, Huebner K, Isobe M, Croce CM, Steinert PM. Chromosomal mapping of human keratin genes: evidence of non-linkage. *J Invest Dermatol* 1988;91(6):572–8.
88. Rosenberg M, Fuchs E, Le Beau MM, Eddy RL, Shows TB. Three epidermal and one simple epithelial type II keratin genes map to human chromosome 12. *Cytogenet Cell Genet* 1991;57(1):33–8.
89. Schweizer J, Bowden PE, Coulombe PA, et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol* 2006;174(2):169–74.
90. Waseem A, Alexander CM, Steel JB, Lane EB. Embryonic simple epithelial keratins 8 and 18: chromosomal location emphasizes difference from other keratin pairs. *New Biol* 1990;2(5):464–78.
91. Kaplan R, Morse B, Huebner K, et al. Cloning of three human tyrosine phosphatases reveals a multigene family of receptor-linked protein-tyrosine-phosphatases expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(18):7000–4.
92. Jones E, Quinn CM, See CG, et al. The Linked Human Elongation Initiation Factor 4A1 (EIF4A1) and CD68 Genes Map to Chromosome 17p13. *Genomics* 1998;53(2):248–50.
93. Gandorfer A, Schumann R, Scheler R, Haritoglou C, Kampik A. Pores of the inner limiting membrane in flat-mounted surgical specimens. *Retina* 2011;31(5):977–81.
94. Zhao F, Gandorfer A, Haritoglou C, et al. Epiretinal Cell Proliferation in Macular Pucker and vitreomacular Traction Syndrome: Analysis of Flat-Mounted Internal Limiting Membrane Specimens. *Retina* 2012;32(3):477–85.
95. Hirayama K, Hata Y, Noda Y, et al. The involvement of the rho-kinase pathway and its regulation in cytokine-induced collagen gel contraction by hyalocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(11):3896–903.
96. Sakamoto T, Ishibashi T. Hyalocytes: essential cells of the vitreous cavity in vitreoretinal pathophysiology? *Retina* 2011;31(2):222–8.
97. Hiscott PS, Grierson I, Hitchins CA, Rahi AH, McLeod D. Epiretinal membranes in vitro. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1983;103 (Pt 1):89–102.
98. Ogawa K. Scanning electron microscopic study of hyalocytes in the guinea pig eye. *Arch Histol Cytol* 2002;65(3):263–8.
99. Hiscott PS, Grierson I, McLeod D. Retinal pigment epithelial cells in epiretinal membranes: an immunohistochemical study. *Br J Ophthalmol* 1984;68(10):708–15.

100. Llombart C, Nacher V, Ramos D, et al. Morphological characterization of pecteneal hyalocytes in the developing quail retina. *J Anat* 2009;215(3):280–91.
101. Nishitsuka K, Kashiwagi Y, Tojo N, et al. Hyaluronan production regulation from porcine hyalocyte cell line by cytokines. *Exp Eye Res* 2007;85(4):539–45.
102. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, et al. Muller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res* 2006;25(4):397–424.
103. Guerin CJ, Wolfshagen RW, Eifrig DE, Anderson DH. Immunocytochemical identification of Muller's glia as a component of human epiretinal membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990;31(8):1483–91.
104. Gass JD. Muller cell cone, an overlooked part of the anatomy of the fovea centralis: hypotheses concerning its role in the pathogenesis of macular hole and foveomacular retinoschisis. *Arch Ophthalmol* 1999;117(6):821–3.
105. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol* 2011;93(3):421–43.
106. Guidry C, King JL, Mason 3rd JO. Fibrocontractive Muller cell phenotypes in proliferative diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(4):1929–39.

Quellenverzeichnis der Abbildungen

Abb. 1: Jubal Harshaw; <http://www.shutterstock.com/pic-16360507/stock-photo-a-microscopic-cross-section-of-a-mammalian-retina-showing-the-different-layers.html>

Abb. 2: Uchino E, Uemura A, Ohba N. Initial stages of posterior vitreous detachment in healthy eyes of older persons evaluated by optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol.* 2001;119(10):1475-1479.)

Abb. 3: Fotoarchiv der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Abb. 4: La Cour M, Friis J. Macular holes: classification, epidemiology, natural history and treatment. *Acta Ophthalmol Scand.* 2002;80(6):579-587.

Abb. 5: Johnson, R. N., H. R. McDonald, et al. (2001). "Traumatic macular hole: observations, pathogenesis, and results of vitrectomy surgery." *Ophthalmology* 108(5): 853-857.

Abb. 6 Delori, F., O. Pomerantzeff, et al. (1969). "Deformation of the globe under high-speed impact: it relation to contusion injuries." *Invest Ophthalmol* 8(3): 290-301.

Abb. 7: la Cour M, Friis J. Macular holes: classification, epidemiology, natural history and treatment. *Acta Ophthalmol Scand.* 2002;80(6):579-587.

Abb. 8: Schumann RG, Gandorfer A. Vitreoretinale degenerative Makulaerkrankungen *Klin Monbl Augenheilkd.* 2010;227(4).

Abb. 9 - 24: Eigene Abbildungen

7. Anhang

Visus-Umrechnungstabelle

Fuß	Meter	Dezimal	LogMAR
20/200	6/60	0.10	1.00
20/160	6/48	0.125	0.90
20/125	6/38	0.16	0.80
20/100	6/30	0.20	0.70
20/80	6/24	0.25	0.60
20/63	6/19	0.32	0.50
20/50	6/15	0.40	0.40
20/40	6/12	0.50	0.30
20/32	6/9.5	0.63	0.20
20/25	6/7.5	0.80	0.10
20/20	6/6	1.00	0.00
20/16	6/4.8	1.25	-0.10
20/12.5	6/3.8	1.60	-0.20
20/10	6/3	2.00	-0.30

8. Publikation

Publikation: Schumann RG, Eibl KH, Zhao F, Scheerbaum M, Scheler R, Schaumberger MM, Wehnes H, Walch AK, Haritoglou C, Kampik A, Gandorfer A. Immunocytochemical and ultrastructural evidence of glial cells and hyalocytes in internal limiting membrane specimens of idiopathic macular holes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011; 52:7822-7834. Impact: 3,466

Abstract

PURPOSE: To provide new information on epiretinal cell proliferation and the cells' origin in idiopathic macular holes and to overcome the effects of embedding and sectioning preparation procedures on cell-distribution patterns.

METHODS: Interference and phase-contrast microscopy, immunocytochemistry, and scanning and transmission electron microscopy were performed on surgically excised whole-mounted internal limiting membrane (ILM) specimens removed from 60 eyes with idiopathic macular holes. Cell distribution and cell morphology were correlated with immunocytochemical staining characteristics. Twelve cell type-specific antibodies were used to detect glial cells, hyalocytes, retinal pigment epithelial cells, retinal ganglion cells, and immune cells. Cell viability was analyzed.

RESULTS: Epiretinal cell proliferation was found in all ILM specimens, irrespective of the stage of the macular hole. Cell density showed a broad variety. Immunocytochemistry frequently revealed simultaneous expression of GFAP/CD45, GFAP/CD64, GFAP/CD68, GFAP/CRALBP, and GFAP/CD90. Some cells presented with intracellular contractile filaments (anti- α SMA); others were not immunoreactive to any antibody examined. The percentage of viable cells showed a broad variety with a mean of 73% (SD 29%). Electron microscopy demonstrated glial cells, hyalocytes, and myofibroblast-like cells.

CONCLUSIONS: The presence of epiretinal cells at the ILM in all macular hole stages strongly suggests a substantial involvement of cell migration and proliferation in the course of

macular hole development. Glial cells and hyalocytes play the predominant role in epiretinal cell proliferation. Given the co-expression of glial cell and hyalocyte markers, transdifferentiation of epiretinal cells needs further elucidation, especially with respect to α SMA-positive cells leading to traction at the vitreoretinal interface.

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich insbesondere Frau PD Dr. med. Ricarda Schumann Dank sagen. Zunächst gebührt natürlich mein Dank der Überlassung des Themas sowie der stetigen Unterstützung im Entstehungsprozess dieser Dissertation.

Liebe Ricarda, ohne Deine Hilfe wäre diese Arbeit nicht machbar gewesen. Vor allem Deine wohl dosierten Wechsel von Ermahnung, Nachsichtigkeit und umgehender Korrektur suchen Seinesgleichen. Ich bin Dir aus tiefstem Herzen zu Dank verpflichtet!

Dann danke ich Herrn Professor Dr. med. Anselm Kampik für die Möglichkeit einer Dissertation in seinem Hause. Ferner gebührt Frau Renate Scheler ein Ehrenplatz in dieser Danksagung. Ohne Dich, Renate, hätte ich bis dato nicht verstanden wie Immunhistologie, Flachpräparation und die anschließende mikroskopische Fotografie in der Praxis funktionieren. Außerdem darf nicht unerwähnt bleiben, dass Deine zuweilen mütterliche Hilfe mich durch manches Tal der Tränen geleitete. Danke!

Ich danke zudem allen Berichterstattern dieser Arbeit für die Durchsicht und faire Benotung. Weiterhin gilt mein Dank der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, die den Rahmen für diese Doktorarbeit zur Verfügung stellt.

Ein besonderer Dank gebührt allen Korrekturlesern dieser Arbeit. Namentlich sind dies Herr Philipp Birzele sowie meine Frau Petra Scheerbaum. Vielen Dank für Eure Ratschläge.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie für die Unterstützung im Prozess dieser Arbeit. Meinen Eltern gilt mein Dank für die Tugend der Standhaftigkeit. Meiner Frau Petra und meiner kleinen Tochter Edith möchte an dieser Stelle für Ihre Nachsicht danken, dass Papa an arbeitsfreien Tagen mehr Zeit in der Bibliothek als mit Ihnen verbrachte. Danke für Eure Unterstützung. Ihr seid das Beste, was mir im Leben passieren konnte!

Martin Scheerbaum

Bonn, 1. Juli 2014

11. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin München zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Die neue Flachpräparation der inneren Grenzmembran der Netzhaut bei idiopathischen, rezidivierenden und sekundären Makulaforamen“ in der Augenklinik der Universität München unter Leitung von Frau PD Dr. med. Ricarda Schumann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde in Teilen in folgender Publikation – Schumann RG, Eibl KH, Zhao F, et al. Immunocytochemical and ultrastructural evidence of glial cells and hyalocytes in internal limiting membrane specimens of idiopathic macular holes. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011;52(11):7822-7834. – veröffentlicht.

Bonn, den 15.10.2014

Martin Scheerbaum