

Aus der Augenklinik und Poliklinik
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Siegfried Priglinger

**Analyse immunhistochemischer Fibrosemarker bei idiopathischer epiretinaler
Gliose und proliferativer Vitreoretinopathie**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Stefanie Ricarda Günther
aus München
2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Ricarda G. Schumann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christos Haritoglou
Prof. Dr. Rainer Glaß

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Denise Vogt

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2019

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	Fragestellung und Zielsetzung	6
2	Hintergrund	8
2.1	Grundlagen	8
2.1.1	Aufbau der Netzhaut und des Glaskörpers	8
2.1.2	Die vitreoretinale Grenzfläche.....	12
2.1.3	Physiologische Altersveränderung.....	14
2.2	Idiopathische epiretinale Gliose	19
2.2.1	Pathogenese	21
2.2.2	Immunozytochemische und ultrastrukturelle Charakteristika.....	23
2.2.3	Klinik und Therapie.....	25
2.3	Proliferative Vitreoretinopathie.....	30
2.3.1	Pathogenese	32
2.3.2	Immunozytochemische und ultrastrukturelle Charakteristika.....	35
2.3.3	Klinik und Therapie.....	35
3	Methoden und Material	40
3.1	Patientenkollektiv	40
3.2	Operatives Vorgehen.....	41
3.3	Methoden	42
3.3.1	Präparateaufbereitung und Flachpräparation.....	42
3.3.2	Phasenkontrast- und Interferenzmikroskopie	42
3.3.3	Immunhistochemie	43
3.3.4	Elektronenmikroskopie	48
3.3.5	Auswertung	51
3.4	Material	53
3.4.1	Reagenzien und Rezepturen	53
3.4.2	Immunmarkierungen.....	54
3.4.3	Geräte	57
4	Ergebnisse	59
4.1	Idiopathische epiretinale Gliose.....	59
4.1.1	Analyse der Zellverteilung und Zellzahl	60
4.1.2	Analyse Zell-spezifischer Antigene	61
4.1.3	Analyse ultrastruktureller Bestandteile	66
4.2	Proliferative Vitreoretinopathie.....	71
4.2.1	Analyse der Zellverteilung und Zellzahl	72
4.2.2	Analyse Zell-spezifischer Antigene	72
4.2.3	Analyse ultrastruktureller Bestandteile	76
4.3	Vergleich nach Grunderkrankung	80
4.3.1	Vergleich Zell-spezifischer Antigene	82
4.3.2	Vergleich ultrastruktureller Bestandteile.....	83
5	Diskussion	85
5.1	Immunhistologische Färbung von Zell- und Fibrose-spezifischen Antigenen	85
5.1.1	Anti- α -smooth muscle actin (anti- α -SMA)	85
5.1.2	Anti-Integrin α V, anti-Integrin α V β 3 und anti-Integrin α V β 5.....	87
5.1.3	Anti-Transforming growth factor beta (Anti-TGF- β)	88
5.1.4	Anti-Galectin-1 und Anti-Galectin-3.....	89
5.1.5	Anti-Emmprin.....	90
5.1.6	Anti-Isolectin B4 (anti-ILB4), anti-IBA-1 und anti-Ricinus communis agglutinin I (anti-RCA I).....	91
5.1.7	Anti-Ulex europaeus agglutinin I (Anti-UEA I).....	93

5.1.8	Anti-Glial fibrillary acidic protein (Anti-GFAP).....	93
5.1.9	Anti-Cytokeratin-8 (Anti-CK-8).....	94
5.1.10	Anti-Kollagen-1.....	94
5.1.11	Anti-CD-45 und Anti-CD-64.....	96
5.2	Ultrastrukturelle Beschreibungen.....	96
5.3	Anti-proliferative Therapieansätze.....	97
5.4	Schlussfolgerungen.....	100
6	Zusammenfassung.....	102
7	Literaturverzeichnis.....	105
8	Anhang.....	124
8.1	Abbildungsverzeichnis.....	124
8.2	Tabellenverzeichnis.....	127
8.3	Visus-Umrechnungstabelle.....	128
8.4	Abkürzungsverzeichnis.....	129
9	Danksagung.....	132
10	Eidesstattliche Versicherung.....	127

1 Fragestellung und Zielsetzung

Traktive Makulopathien stellen eine vielschichtige Gruppe von Netzhauterkrankungen dar, welche die Makula lutea - die Stelle des schärfsten Sehens - betreffen. Hierzu zählen die epiretinale Gliose, die verschiedenen Makulaforamina, das vitreomakuläre Traktionssyndrom und die proliferative Vitreoretinopathie. Allen traktiven Makulopathien ist die Ausbildung von mehrschichtigen Zell- und Kollagenansammlungen an der vitreoretinalen Grenzregion zwischen Glaskörper und innerer Grenzmembran der Netzhaut gemein. Diese Proliferationen entstehen im Bereich der Makula und werden als prämakuläre Membranen bezeichnet (Sebag, 2004), (Sebag, et al., 2007), (Johnson M., 2005), (Green, 2006), (Gandorfer, et al., 2002).

Aufgrund ihrer hohen Prävalenz sind prämakuläre Membranen funduskopisch bei nahezu jedem Dritten über 45-Jährigen nachweisbar (Ng, et al., 2011). Bei traktiven Makulopathien kommt es zur Entstehung von vitreomakulären Zugkräften, welche prä-, intra- und subretinale Veränderungen mit sich führen können (Sebag, 2008), (Sebag, et al., 2009), (Krebs, et al., 2011). In der Pathogenese von primären und sekundären prämakulären Membranen nimmt die Transdifferenzierung von Myofibroblasten aus verschiedenen Vorläuferzellen eine wichtige Rolle ein (Hinz B., 2016), (Hinz, et al., 2012), (Wiedemann, 1992). Durch aktive Kontraktion intrazellulärer Bündel von Aktinfilamenten in Myofibroblasten, welche sich immunzytochemisch mit anti- α -smooth muscle actin (anti- α -SMA) anfärben lassen, verursachen sie die Ausbildung schwerer Netzhautfalten im Bereich der Makula (Hinz B., 2010), (Gandorfer, et al., 2005), (Smiddy, et al., 1989), (Hinz B., 2016), (Kampik, et al., 1981), (Kampik, et al., 1980), (Messmer, et al., 1998), (Hiscott P., et al., 1984). Hierdurch kommt es neben einem deutlichen Sehschärfeverlust auch zum Auftreten von Metamorphopsien (Verzerrtsehen). Dies führt dazu, dass Betroffene Tätigkeiten des Alltags wie beispielsweise Lesen, Schreiben oder Autofahren oft nicht mehr ausführen können (Ng, et al., 2011), (Mitchell, et al., 1997).

Derzeit stellt die mikrochirurgische pars plana Vitrektomie mit Entfernung der inneren Grenzmembran und der prämakulären Membran von der Oberfläche der Netzhaut das einzig mögliche therapeutische Verfahren zur Behandlung traktiver Makulopathien dar (Schaub, et al., 2016). Dieses sogenannte „Peeling“ von innerer Grenzmembran und

prämakulären Gewebes ist ein risikobehaftetes und anspruchsvolles Verfahren, da sich die innere Grenzmembran als eine feine und durchscheinende Struktur von nur 4-10 μm Dicke präsentiert. Medikamentöse Anti-Fibrose-Therapiestrategien zur Behandlung oder gar Verhinderung der Entstehung von prämakulären Membranen werden derzeit untersucht und geprüft (Alge, et al., 2006).

Nicht nur in der Augenheilkunde, sondern auch in vielen anderen Fachbereichen wie der Pneumologie, Nephrologie und Kardiologie kommt der Anti-Fibrose-Forschung eine wichtige Rolle zu, mit dem Ziel pharmakologische Therapieansätze zu entwickeln. Als zelluläre Zielstrukturen sind dafür die Myofibroblasten identifiziert worden. In prämakulären Membranen sind Myofibroblasten transdifferenzierte Zellen, die sich beispielsweise aus Hyalozyten und retinalen Gliazellen entwickeln können. Da Myofibroblasten eine höhere kontraktile Aktivität als glatte Muskelzellen besitzen, ist das Ziel, sie im Sinne einer Anti-Fibrose-Therapie pharmakologisch zu hemmen. Als Substanzgruppen werden derzeit beispielsweise Alkylphosphocholine (APCs) diskutiert (Eibl, et al., 2007).

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, chirurgisch exzidierte prämakuläre Membranen von 16 Augen mit idiopathischer epiretinale Gliose und 12 Augen mit proliferativer Vitreoretinopathie für die Flachpräparation aufzuarbeiten, um mittels Phasenkontrast-, Interferenz-, Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie immunozytochemische und ultrastrukturelle Gemeinsamkeiten und Unterschiede beider Entitäten zu untersuchen und zu vergleichen. Für die immunhistologische Analyse wurden insgesamt 20 primäre Antikörper wie α -smooth muscle actin (α -SMA), Integrine (αv , $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, $\alpha\text{v}\beta\text{5}$), Galectine (-3, -1), IBA-1, Emmprin (CD147), Ricinus communis agglutinin I (RCA I) und Kollagen-1 verwendet. Die Erfassung demographischer Patientendaten sowie eine Auswertung der bestkorrigierten Sehschärfe auch im zeitlichen Verlauf erfolgte für die klinische Korrelation. Dadurch sollen das Verständnis für die Entstehung traktiver Makulopathien verbessert und das therapeutische Vorgehen in der Makulachirurgie weiterentwickelt werden. Die Ergebnisse sollen durch Entwicklung pharmakologischer Therapieansätze dazu beitragen, Möglichkeiten für Ansätze der Anti-Fibrose-Behandlung zu liefern.

2 Hintergrund

2.1 Grundlagen

Das menschliche Auge lässt sich topographisch in zwei Abschnitte unterteilen: den vorderen und den hinteren Augenabschnitt. Der vordere Augenabschnitt besteht aus Bindehaut, Hornhaut, Vorderkammer, Regenbogenhaut (Iris), Pupille und Linse. Der hintere Augenabschnitt umfasst u.a. den Glaskörper, die Netzhaut und den Sehnerv. Einen groben Überblick über die Strukturen des Auges gibt [Abbildung 1](#).

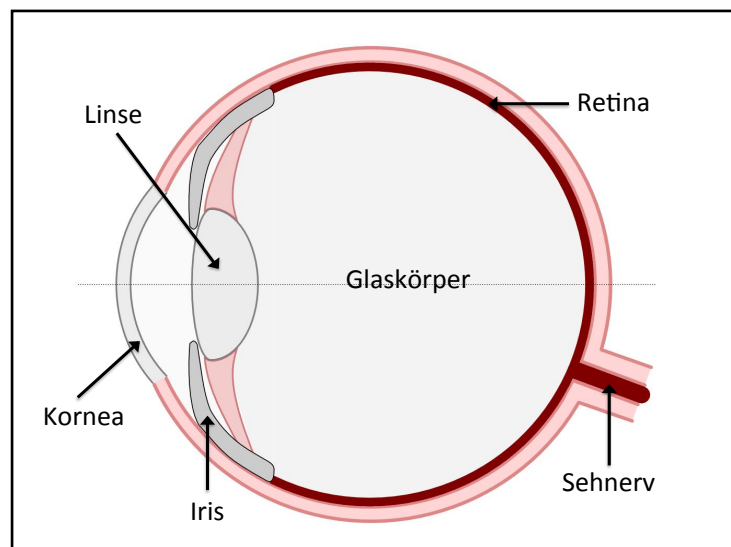


Abbildung 1: Vereinfachtes Schema eines menschlichen Augapfels (modifiziert nach (Grotz, 2016)).

2.1.1 Aufbau der Netzhaut und des Glaskörpers

Die Netzhaut, Retina (von lateinisch „rete“, Netz), bildet die innerste von drei Schichten des Augapfels. Sie lässt sich in einen lichtempfindlichen Teil (Pars optica) und einen lichtunempfindlichen Teil (Pars caeca mit Pars iridica und Pars ciliaris) unterteilen (Huppelsberg & Walter, 2009). Die Makula lutea bildet mit der Fovea centralis die Stelle des schärfsten Sehens. Hier ist die Dichte der Photorezeptoren, der Sehsinneszellen, mit 175 000 Zapfen pro mm² besonders hoch (Coupland & Bechrakis, 2008). Insgesamt beherbergt die Netzhaut rund 126 Millionen Photorezeptoren (etwa 6 Mio. Zapfen und etwa 120 Mio. Stäbchen) (Huppelsberg & Walter, 2009). Nach Reizaufnahme wird die Sinnesinformation durch den Sehnerv, den Nervus opticus, der durch die Axone der Ganglienzellen gebildet wird, zum Gehirn geleitet und dort verarbeitet. Die

Austrittsstelle des Sehnervs wird als Papilla nervi optici bezeichnet. [Abbildung 2](#) zeigt eine Fundusaufnahme eines gesunden rechten Auges. Dargestellt sind die Stelle des schärfsten Sehens (Makula lutea) und der Sehnervenkopf (Papille).

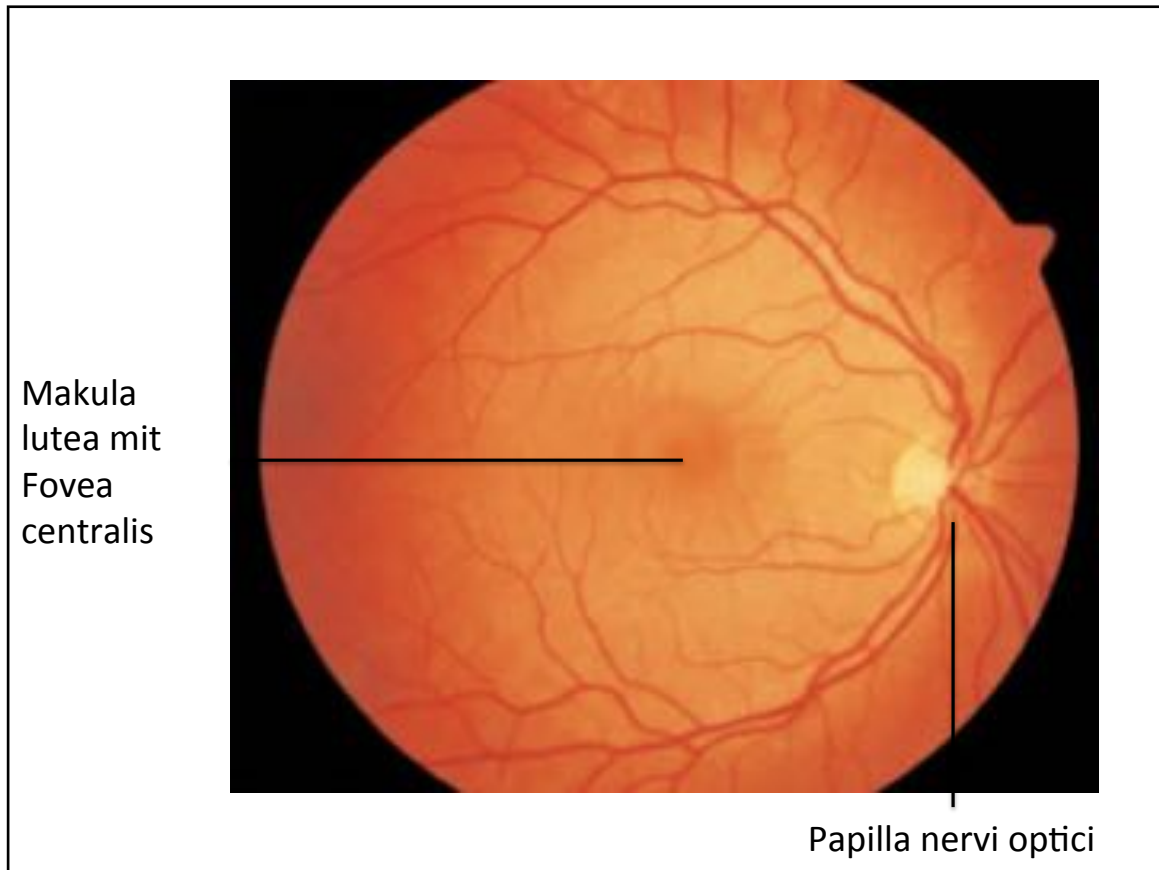


Abbildung 2: Fundusaufnahme eines gesunden rechten Auges. Innerhalb des oberen und unteren Gefäßbogens liegt die Stelle des schärfsten Sehens, die Makula lutea. Nasal der Makula lutea liegt der Sehnervenaustritt, die Papilla nervi optici (modifiziert nach (Grehn F., 2011)).

Anatomisch gliedert sich die Netzhaut von außen nach innen in die folgenden zehn Schichten (Lüllmann-Rauch, 2009):

- 1) Pigmentepithelschicht
- 2) Schicht der Photorezeptoren (Stäbchen und Zapfen)
- 3) Äußere Grenzmembran
- 4) Äußere Körnerschicht
- 5) Äußere plexiforme Schicht
- 6) Innere Körnerschicht
- 7) Innere plexiforme Schicht
- 8) Ganglienzellschicht
- 9) Nervenfaserschicht

10) Innere Grenzmembran

Die Lage der einzelnen Netzhautschichten zueinander ist in [Abbildung 3](#) dargestellt. Eine Besonderheit ist, dass sich zellkernreiche und zellkernarme Schichten miteinander abwechseln.

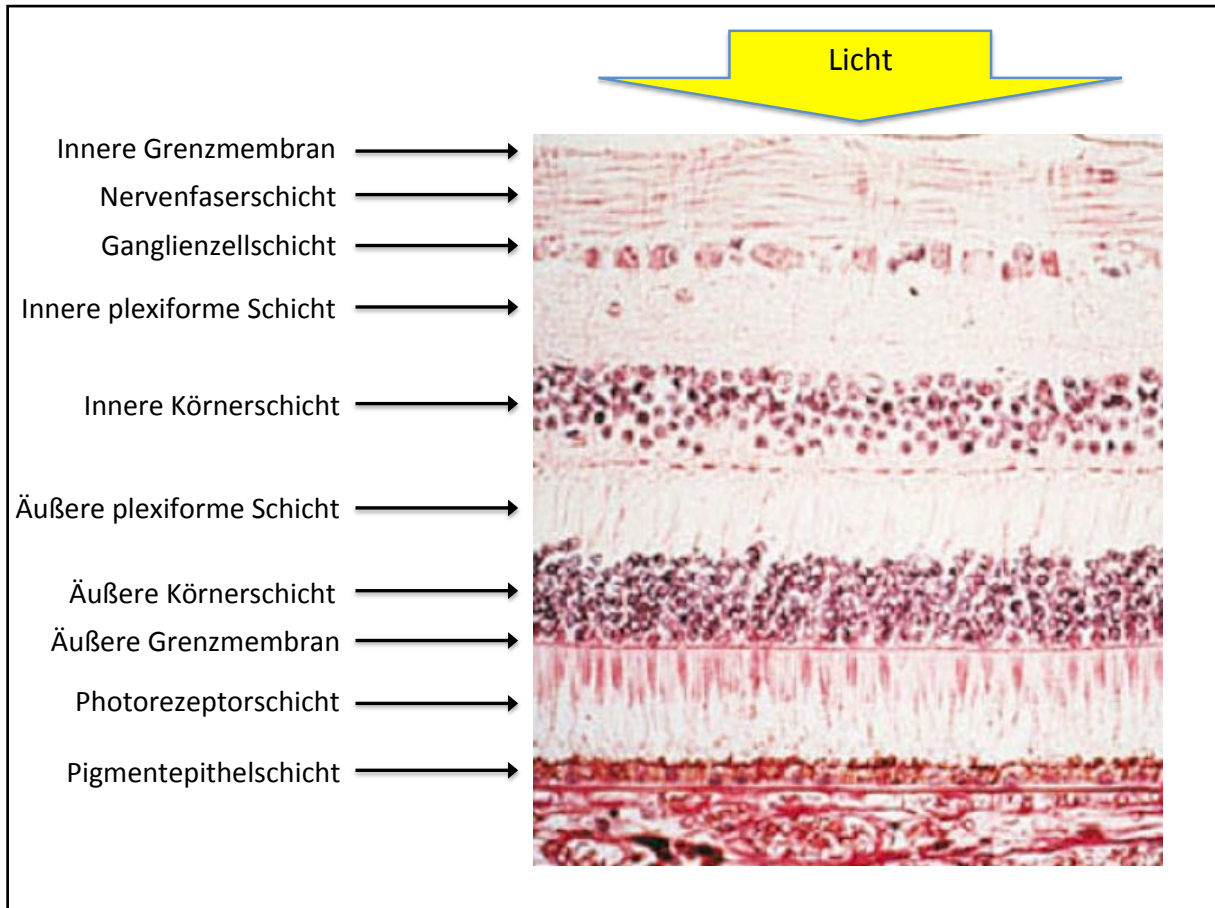


Abbildung 3: Histologischer Querschnitt durch die Netzhaut (modifiziert nach (Lang, 2014)).

Das erste Neuron bilden hierbei die Photorezeptoren, die Zapfen und Stäbchen. Die Zapfen sind für das Tag- und Farbsehen verantwortlich und befinden sich somit vor allem im zentralen Teil der Netzhaut, der Makula lutea. Die Stäbchen hingegen sind für das Dämmerungs- und Nachtsehen zuständig und finden sich überwiegend in der Peripherie der Netzhaut. Die Bipolarzellen bilden das zweite Neuron der Netzhaut. Sie leiten die Informationen an das dritte Neuron, die Ganglienzellen, weiter. Embryologisch bedingt, zeigt die Netzhaut einen inversen Aufbau, sodass die Photorezeptoren sich im äußeren Teil der Netzhaut befinden. Dadurch muss der

Lichtstrahl (elektromagnetische Strahlung einer Wellenlänge von 400-750nm) alle Schichten der Netzhaut durchdringen, um zu den Photorezeptoren zu gelangen.

Des Weiteren enthält die Netzhaut Horizontalzellen und amakrine Zellen, die als inhibitorische Querverknüpfungen der Netzhaut an der Signalweiterleitung der Lichtreize mitbeteiligt sind. Die Horizontalzellen verknüpfen mehrere Photorezeptoren miteinander, die amakrinen Zellen verschalten mehrere Ganglienzellen miteinander.

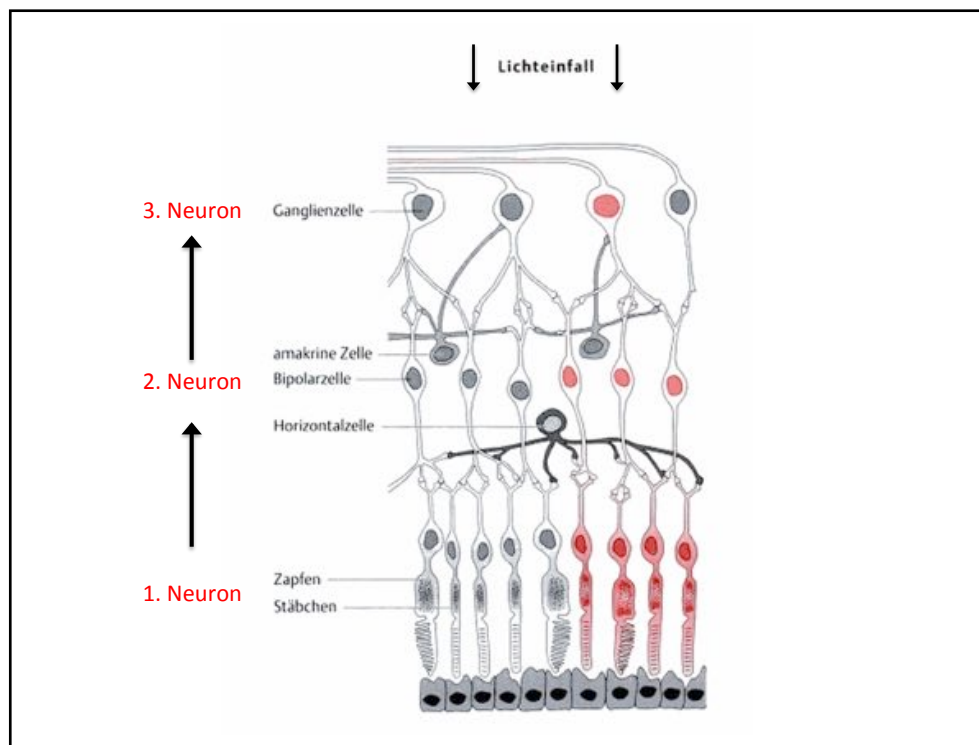


Abbildung 4: Schematische Darstellung der konvergenten Signalübertragung der Retina mit Zapfen und Stäbchen als 1. Neurone, Bipolarzellen als 2. Neurone, Ganglienzellen als 3. Neurone und den dazwischen gelegenen Horizontalzellen und amakrinen Zellen (modifiziert nach (Huppelsberg & Walter, Kurzlehrbuch Physiologie, 2009)).

Der Glaskörper, das Corpus vitreum, nimmt mit einem Anteil von rund 65%, den größten Teil des Bulbus ein (Grehn F., 2008). Er befindet sich im hinteren Augenabschnitt und füllt den Raum zwischen Linse und Retina. Zur Erhaltung seiner optischen Transparenz ist der Glaskörper gefäßlos und wird durch Diffusion ernährt. Er bildet nicht nur eine wichtige Barriere zwischen der vorderen Augenkammer und der Netzhaut, sondern hält auch den intraokulären Druck des Auges aufrecht. Außerdem unterstützt er die Akkommodation durch die morphologische Besonderheit

der posterioren Zonulafasern der Linse und der anterioren Glaskörperanteile (Lütjendrecoll, et al., 2010).

Ultrastrukturell bildet der Glaskörper eine transparente extrazelluläre Matrix, welche bis zu 99% aus Wasser und dem darin gelösten Hyaluronan (Humor vitreus) besteht (Lüllmann-Rauch, 2009). Zu den festen Bestandteilen des Glaskörpers zählen Glykosaminoglykane wie Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Heparansulfat sowie unlösliche Proteine (Schumann, 2015). Hierbei stellt Kollagen das wichtigste unlösliche Protein. Durch seine Netzwerk-ähnliche Anordnung aus einzelnen Kollagenfibrillen verleiht es dem Glaskörper seine gelartige Konsistenz. Mit 60-75% befindet sich im Glaskörper überwiegend das Kollagen Typ II. Kollagen Typ IX findet sich mit 25% am zweithäufigsten, Kollagen Typ V/XI ist mit 10-25% vertreten (Bishop, 2009). Als weitere unlösliche Proteine lassen sich Albumin und Immunglobuline nachweisen.

2.1.2 Die vitreoretinale Grenzfläche

Die vitreoretinale Grenzfläche (vitreoretinal border region = VBR) setzt sich aus den Ankerfibrillen der Glaskörperrinde und aus der inneren Grenzmembran der Netzhaut zusammen.

Die innere Grenzmembran (engl.: inner limiting membrane, ILM) grenzt als innerste Netzhautschicht direkt an die Glaskörperrinde und stellt die Basalmembran der Müller-Zellen dar (Heegaard, 1997), (Heegaard, 1994). Sie besteht aus der Lamina densa, die den zentralen Teil der Basalmembran bildet, und der Lamina rara (Lamina lucida), die eine Verbindung vom Epithel zur Lamina densa der Basalmembran herstellt (Tozer & Sebag, 2014). Die Dicke der Lamina rara ist über den ganzen Augenhintergrund verteilt konstant und beträgt 0,03 - 0,06 μm . Die Dicke der Lamina densa variiert je nach Lokalisation (Tozer & Sebag, 2014), (Henrich, et al., 2012).

Im Bereich der Fovea ist die innere Grenzmembran mit circa 20 nm am dünnsten, wohingegen sie im Bereich des hinteren Netzhautpols eine maximale Dicke von 400-2000 nm aufweist (Schumann, 2015). Dies liegt an den unterschiedlichen Längen der Kollagenfibrillen des Glaskörpers. Diese sind nämlich im Bereich der Ora serrata am längsten und im Bereich der Makula lutea am kürzesten (Heegaard, 1997). Zudem ist

bekannt, dass die innere Grenzmembran altersbedingten Veränderungen unterliegt. Mit dem Alter nimmt die Dicke zu, die Elastizität hingegen ab (Schumann, 2015).

Ultrastrukturell weist die innere Grenzmembran eine glatte, dem Glaskörper zugewandte Seite auf sowie eine charakteristisch undulierte Seite, welche zur Netzhaut gerichtet ist (Heegaard, 1994), (Henrich, et al., 2012). Dies ist in [Abbildung 5](#) dargestellt.

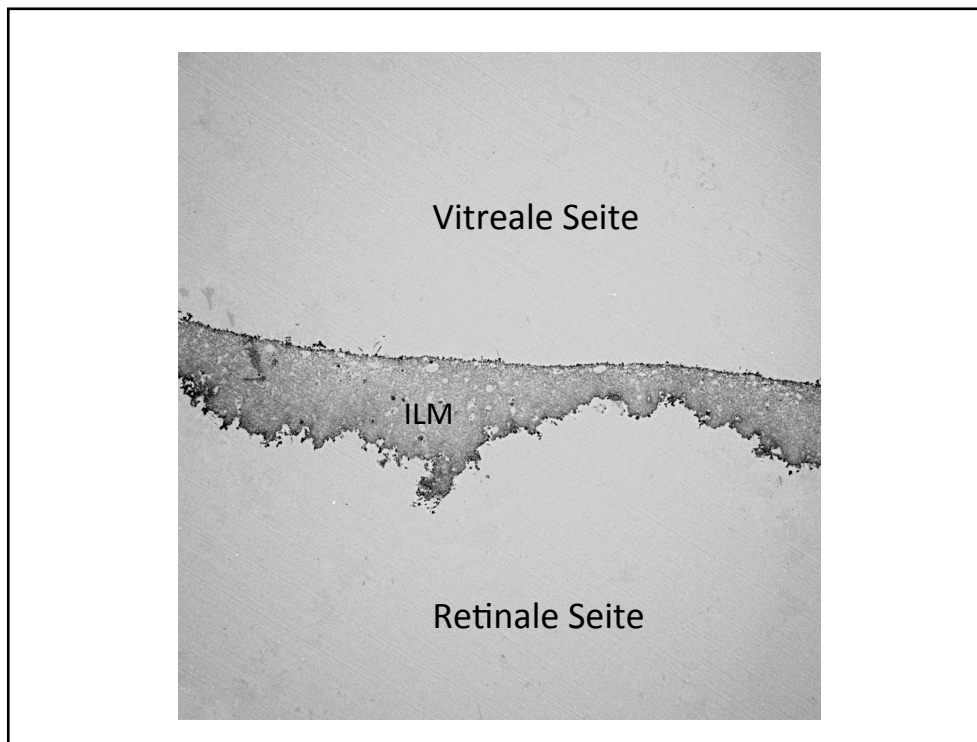


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer inneren Grenzmembran (ILM) mit glatter vitrealer Seite und undulierter retinaler Seite. Vergrößerung 3000-fach (eigene Aufnahme).

Die innere Grenzmembran setzt sich aus einem fibrillären Geflecht aus Kollagen Typ I und IV sowie aus unterschiedlichen Proteoglykanen zusammen (Henrich, et al., 2012). Die Verbindung zum Glaskörper wird durch die extrazellulären Verbindungsproteine Laminin und Fibronectin erreicht. Hierbei bindet das mit zunehmendem Alter immer geringer werdende Laminin an das Kollagen Typ IV der inneren Grenzmembran. Fibronectin bindet an das Kollagen Typ II und die Hyaluronsäure des Glaskörpers (Gandorfer & Kampik, 2008).

Die Glaskörperrinde stellt neben der inneren Grenzmembran die zweite Hauptkomponente der vitreoretinalen Grenzfläche dar. Die Glaskörperrinde formt den

äußeren Abschnitt des Glaskörpers und wird aus einem Netz aus Kollagenfibrillen gebildet, welches zum Glaskörperrand immer dichter wird. Dadurch entsteht eine Verankerung an der Netzhaut. Besonders fest mit der Netzhaut verwachsen ist der Glaskörper im Bereich der Ora serrata und der Sehnervenpapille (Lüllmann-Rauch, 2009). Die Glaskörperrinde ist circa 100 – 110 µm dick (Tozer & Sebag, 2014) und enthält ultrastrukturell neben Kollagenfibrillen auch vereinzelt Zellen wie Hyalozyten und Fibroblasten (Bishop, 2009). Diese in die Glaskörperrinde eingebetteten Hyalozyten befinden sich etwa in einem Abstand von 20 – 75 µm zur ILM (Tozer & Sebag, 2014), (Qiao, et al., 2005).

Zwischen der inneren Grenzmembran und der Glaskörperrinde befindet sich eine extrazelluläre Matrix mit Fibronectin, Laminin, Chondroitinsulfat, Heparansulfat und Opticin (Ramesh, et al., 2004), (Wang & Sebag, 2010). Diese Matrix sorgt für eine feste Anheftung der inneren Grenzmembran mit der Glaskörperrinde.

2.1.3 Physiologische Altersveränderung

Die altersbedingte hintere Glaskörperabhebung stellt eine physiologische strukturelle Veränderung des Glaskörpers dar. Sie beginnt meist ab dem 40. Lebensjahr im perifovealen Bereich und schreitet dann langsam über viele Jahre fort (Schumann, 2015).

Pathogenetisch wird die altersbedingte hintere Glaskörperabhebung überwiegend durch die Syneresis des Glaskörpers bedingt (Bishop, 2009), (Johnson M., 2012). Unter Syneresis versteht man die Schrumpfung und Verflüssigung des Glaskörpers. Hierbei geht seine Konsistenz langsam von gelartig in flüssig über. Die Verflüssigung ist Ergebnis der Änderung des Gehalts an Hyaluronsäure und Kollagen (Balazs & Denlinger, 1982), (Sebag, et al., 2014). Durch die stetige Produktion der Hyaluronsäure durch die Hyalozyten nimmt deren Konzentration im Alter zu. Die Konzentration des Kollagens vermindert sich jedoch im Laufe des Lebens, da einmal embryonal angelegte Kollagenfibrillen im Alter nicht mehr nachgebildet werden, sondern auch vermehrt abgebaut werden (Denlinger & Balazs, 2014). Hierbei scheint insbesondere der Verlust von Kollagen Typ IX von herausragender Bedeutung zu sein.

Neben der Verflüssigung des Glaskörpers ist auch die Abnahme von Laminin an der vitreoretinalen Grenzfläche an der Entstehung der altersbedingten hinteren Glaskörperabhebung beteiligt (Bishop, 2009), (Johnson M., 2012). In jungen Jahren ist der Glaskörper an der Papille, den Gefäßen und der peripheren Netzhaut angeheftet. Im Alter lösen sich diese Verbindungen von Glaskörper und Netzhaut und führen folglich zu einer Ablösung der hinteren Glaskörperrinde von der inneren Grenzmembran (Johnson M., 2012). Uchino und Kollegen haben diesen über Jahre andauernden Prozess in fünf Stadien eingeteilt, welche in [Abbildung 6](#) schematisch dargestellt sind:

- Stadium 0: Der Glaskörper liegt vollständig an der Netzhaut an.
- Stadium 1: Beginn der Ablösung des Glaskörpers perifoveal.
- Stadium 2: Der Glaskörper ist in allen Quadranten perifoveal abgehoben, aber mit Fovea und der Papille noch verbunden. Dies wird als partielle hintere Glaskörperabhebung bezeichnet.
- Stadium 3: Der Glaskörper ist von der gesamten Fovea getrennt. Es besteht noch eine Anheftung des Glaskörpers an der Papille.
- Stadium 4: Der Glaskörper hat sich vollständig von der Netzhaut gelöst. Hierbei handelt es sich um eine komplette hintere Glaskörperabhebung.

(Uchino, 2001).

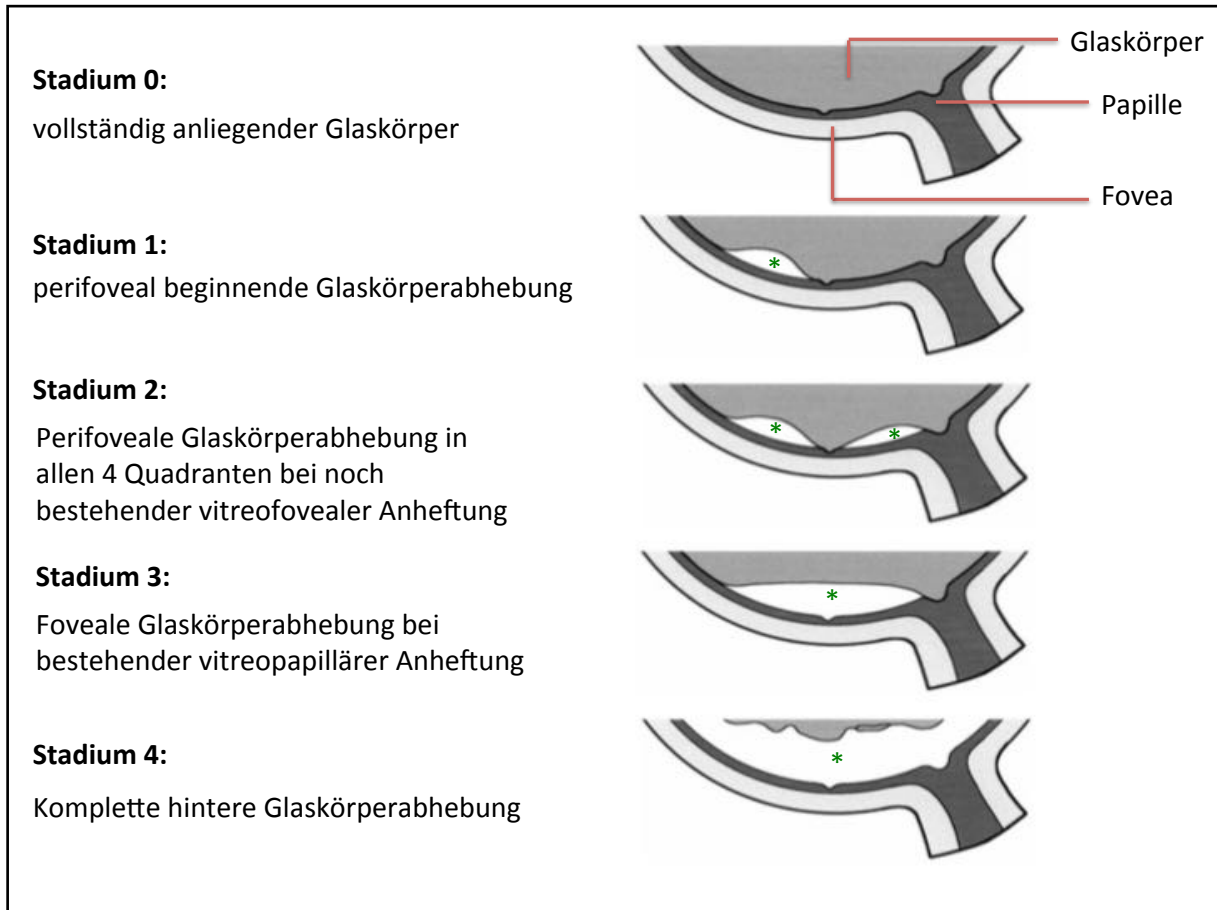


Abbildung 6: Schematische Darstellung der physiologischen hinteren Glaskörperabhebung von Stadium 0 bis Stadium 4. Abgehobene Bereiche sind jeweils mit * markiert (modifiziert nach (Uchino, 2001)).

Im klinischen Alltag ist das häufigste Symptom der Patienten die Wahrnehmung von Glaskörpertrübungen. Diese imponieren als Schleier oder Schatten und werden auch als „mouches volantes“ (engl.: „Floater“) bezeichnet. Hierbei handelt es sich um eine entoptische Erscheinung, die durch anatomische Gegebenheiten im Augeninneren bedingt ist, aber vom Patienten subjektiv vor dem Auge wahrgenommen wird.

Normalerweise verläuft dieser Vorgang von Glaskörperverflüssigung und Loslösung vitreoretinaler Adhärenzen zeitgleich. Verflüssigt sich der Glaskörper ohne Loslösung vitreoretinaler Adhärenzen oder umgekehrt, wird dies als anomale hintere Glaskörperabhebung bezeichnet. Man unterscheidet eine inkomplette hintere Glaskörperabhebung (Vitreoschisis) von einer kompletten hinteren Glaskörperabhebung, bei der noch an einzelnen Stellen Anheftungen von Glaskörper und Netzhaut bestehen (partiell komplette hintere Glaskörperabhebung). Die anomale

hintere Glaskörperabhebung kann Ursache verschiedener vitreoretinaler Pathologien sein. Dies zeigt [Abbildung 7](#).

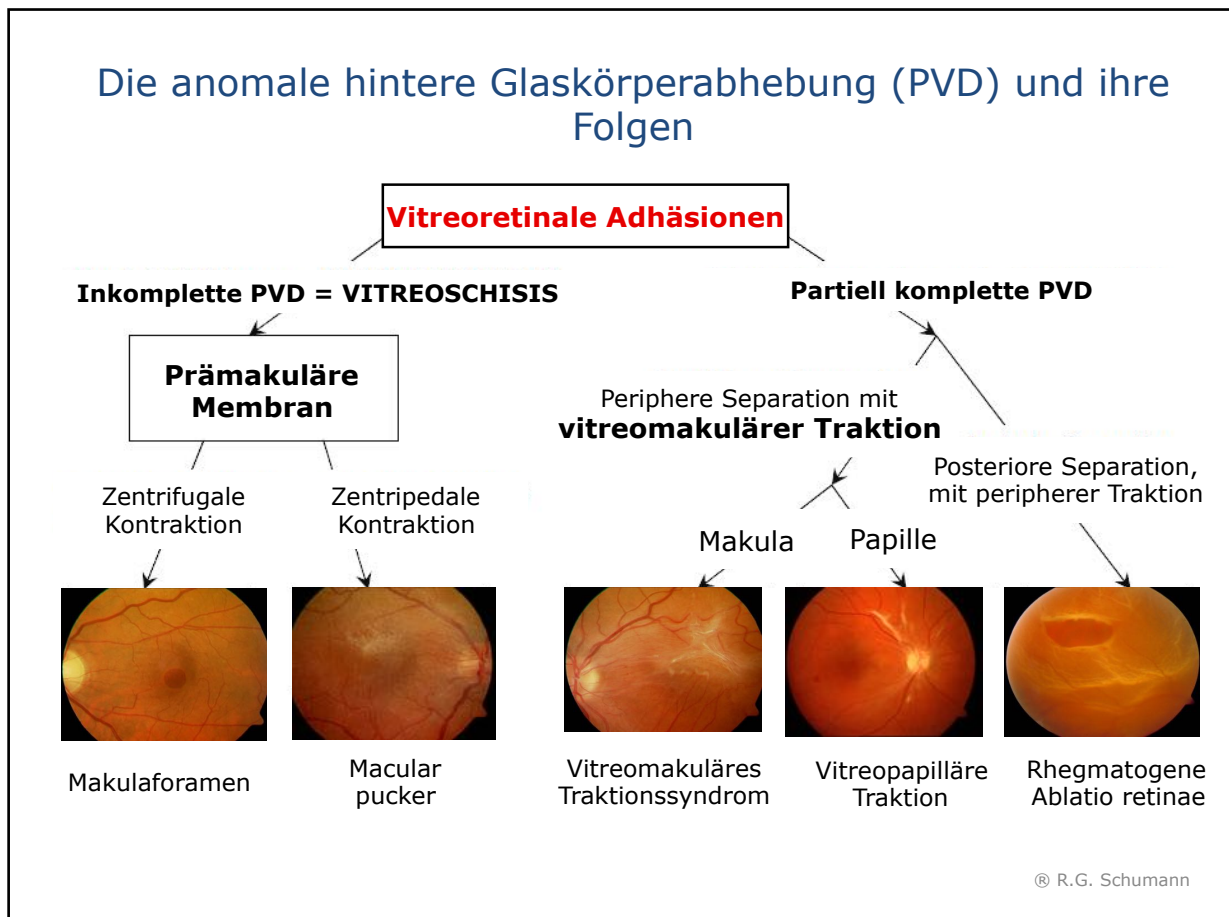


Abbildung 7: Die anomale hintere Glaskörperabhebung und ihre Folgen (modifiziert nach (Sebag, 2008)).

Als Vitreoschisis wird eine inkomplette hintere Glaskörperabhebung bezeichnet, bei der sich die Glaskörperrinde in ein vorderes und hinteres Blatt auftrennt. Das hintere Blatt bleibt aufgrund bestehender fester Verbindungen an der inneren Grenzmembran haften. Das vordere Blatt löst sich mit dem sich verflüssigenden Glaskörper nach anterior (Sebag, 2008). Mögliche Folgen einer inkompletten hinteren Glaskörperabhebung mit Vitreoschisis können Makulaforamen und Macular Pucker (idiopathische epiretinale Gliose) sein (Sebag, et al., 2014).

Bei der partiell kompletten hinteren Glaskörperabhebung bleibt die Glaskörperrinde intakt, löst sich allerdings nicht an allen Stellen von der Netzhaut ab. Bei persistierender zentraler Verbindung, aber losgelöster Peripherie, resultiert eine vitreomakuläre oder vitreopapilläre Traktion. Löst sich der Glaskörper vom hinteren

Netzhautpol, bleibt aber mit der Netzhautperipherie verankert, kann dies zu traktionsbedingten Netzhautablösungen führen (Sebag, et al., 2014).

2.2 Idiopathische epiretinale Gliose

Die idiopathische epiretinale Gliose bezeichnet eine membranöse Zell- und Kollagenansammlung, welche sich auf der Netzhautoberfläche auf der vitrealen Seite der inneren Grenzmembran bildet (Schumann, 2015), (Tozer & Sebag, 2014), (Sebag, et al., 2014). Typischerweise entstehen diese Membranen im Makulabereich und werden daher oft als prämakuläre Membranen bezeichnet.

Unterschieden werden primäre (idiopathische) epiretinale Gliosen von sekundären, die nach Netzhautablösung, Augenoperation, Trauma oder Entzündung entstehen können. Das Manifestationsalter idiopathischer epiretinaler Gliosen liegt meist über dem 50. Lebensjahr (Burk & Burk, 2014).

Je nach Lokalisation und Ausprägung können epiretinale Gliosen symptomatisch werden. Die mildere Form zeigt sich funduskopisch als transparente und leicht glitzernde prämakuläre Membran und wird als Cellophan-Makulopathie bezeichnet (Grehn F., 2008). Die begleitende Sehschärfe kann dabei normal bis leicht reduziert sein (Kanski, 2004). Bei fortgeschrittenen Befunden stellt sich die prämakuläre Membran als grau-weißliche Struktur dar, die eine deutlich sichtbare Traktion auf die Netzhaut ausüben und somit innere Netzhautschichten in Falten ziehen kann. Diese fortgeschrittene Form einer idiopathischen epiretinalen Gliose wird „Macular pucker“ genannt (Schumann, 2015). Bei dieser Form bemerkt der Patient oft ein starkes Verzerrtsehen (Metamorphopsien) bis hin zum deutlichen Visusverlust (Kanski, 2004). Die Einteilung nach Gass ist in [Abbildung 8](#) dargestellt. Das Stadium Gass °0 bezeichnet die reine Cellophanmakulopathie ohne Netzhautfalten oder Verziehungen im Bereich der Makula. Eine idiopathische epiretinale Gliose nach Gass °1 weist neben der Cellophanmakulopathie zusätzlich oberflächliche Netzhautfalten auf. Gass °2 beschreibt mit deutlichen Netzhautfalten eine fortgeschrittene Form der idiopathischen epiretinalen Gliose, den Macular Pucker (Burk & Burk, 2014).

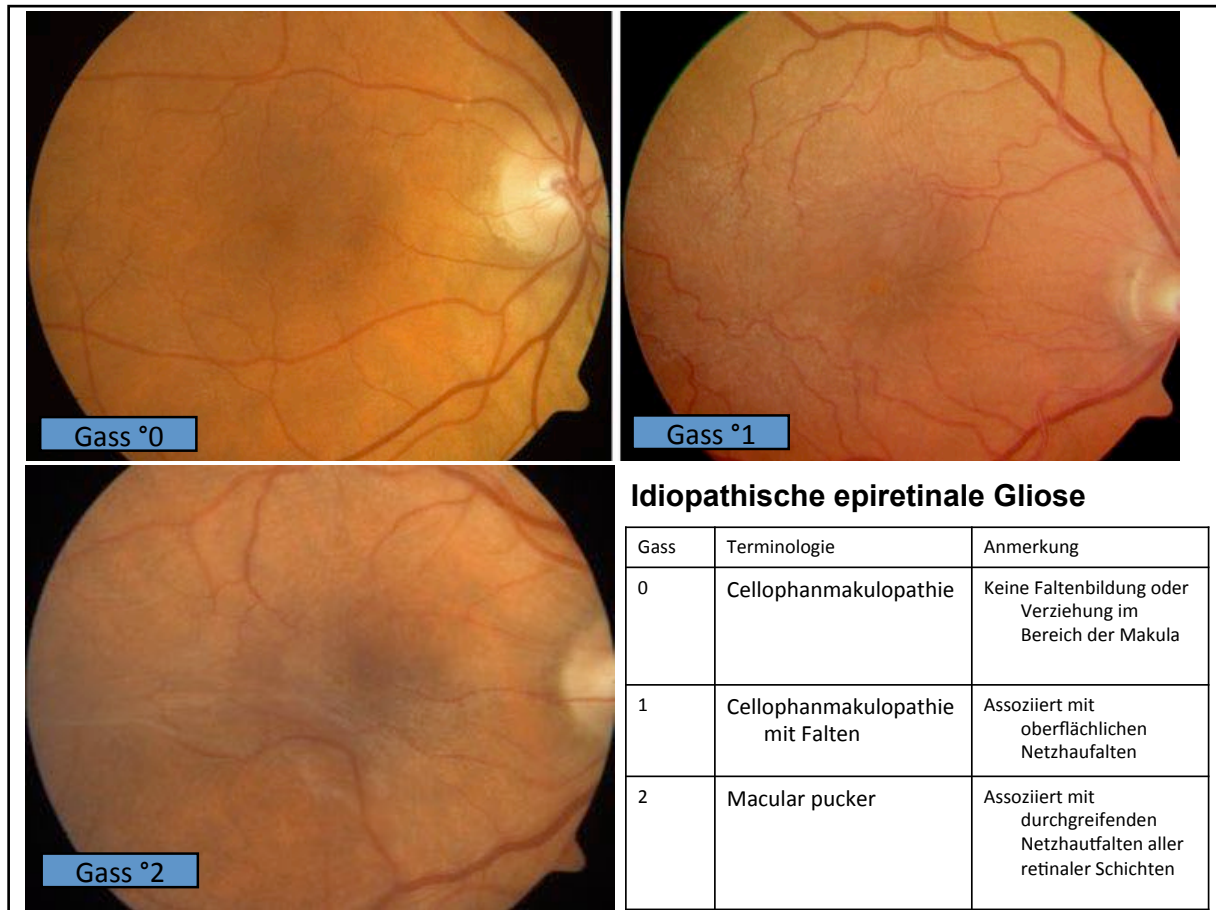


Abbildung 8: Augenhintergrund von 3 rechten Augen in verschiedenen Stadien der idiopathischen epiretinalen Gliose: Gass °0, Gass °1 und Gass °2 (modifiziert aus dem Archiv der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München).

Mit 15,1% ist die Prävalenz der idiopathischen epiretinalen Gliose in der Bevölkerungsgruppe der über 70-Jährigen relativ hoch (McCarty, et al., 2005). Zuletzt konnte gezeigt werden, dass sogar bei jedem dritten Gesunden über 45 Jahre eine funduskopisch sichtbare idiopathische epiretinale Gliose nachgewiesen werden konnte (Ng, et al., 2011). Im Erwachsenenalter ist das Risiko an einer idiopathischen epiretinalen Gliose zu erkranken für Frauen und Männer gleich hoch (McCarty, et al., 2005), (Klein, et al., 1994), (Khaja, et al., 2008). Der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer idiopathischen epiretinalen Gliose ist das fortschreitende Alter. Weitere Risikofaktoren sind hohe Cholesterinspiegel, Diabetes mellitus, Rauchen und vorangegangene Augenoperationen (vor allem Plomben-Operationen) (Khaja, et al., 2008), (Klein, et al., 1994), (Ng, et al., 2011). Außerdem scheint die idiopathische epiretinale Gliose in der asiatischen Bevölkerung häufiger aufzutreten, verglichen mit der kaukasischen, afroamerikanischen und hispanischen Bevölkerung (Ng, et al., 2011).

2.2.1 Pathogenese

In der Pathogenese von prämakulären Membranen werden in der Literatur zwei verschiedene Entstehungstheorien diskutiert. Unumstritten scheint jedoch, dass die hintere Glaskörperabhebung eine entscheidende Rolle spielt (Sebag, et al., 2014). Bei 80-95% aller an idiopathischer epiretinaler Gliose erkrankten Patienten konnte eine hintere Glaskörperabhebung dokumentiert werden (Appiah, et al., 2005), (Johnson M., 2010), (Gupta, et al., 2008), (Kishi & Shimizu, 1994), (Sidd, et al., 1982), (Wise, 1975). Dieser Prozentsatz ist deutlich höher als die Prävalenz der hinteren Glaskörperabhebung in der Normalbevölkerung der über 50-Jährigen mit 53% und sogar höher als die Prävalenz der über 70-Jährigen mit 63% (Foos & Wheeler, 1982), (Lindner, 1966).

Zum Einen wird postuliert, dass während der hinteren Glaskörperabhebung durch antero-posteriore Zugkräfte Defekte (sog. Poren) in der inneren Grenzmembran entstehen, welche folglich eine präretinale Migration und Proliferation retinaler Zellen induzieren. Hierbei handelt es sich in erster Linie um Gliazellen, Fibroblasten und Astrozyten, die nach Glaskörperabhebung durch die sog. Poren in der inneren Grenzmembran in den vitreoretinalen Grenzspalt gelangen und dort zur Proliferation angeregt werden (Hiscott P., et al., 1984), (Gandorfer, et al., 2014). Diese proliferierenden Zellen konnten auch auf der retinalen Seite der inneren Grenzmembran bei Patienten mit Cellophanmakulopathie nachgewiesen werden (Haritoglou, et al., 2007).

Derartige „Poren“ wurden in der inneren Grenzmembran bisher aber nur sehr selten gefunden (Gandorfer, et al., 2011). Deshalb wird davon ausgegangen, dass auch andere Mechanismen die Absiedlung und Proliferation präretinaler Zellen auf der inneren Grenzmembran begünstigen können. Es wird vermutet, dass durch die anomale hintere Glaskörperabhebung eine Spaltung der Glaskörperrinde (Vitreoschisis) entstehen kann, welche mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) bei 42-50% und intraoperativ bei 80% aller Patienten mit idiopathischer epiretinaler Gliose nachgewiesen werden konnte. Folglich können Hyalozyten auf der Oberfläche der inneren Grenzmembran verbleiben und durch Proliferation und Transdifferenzierung die Bildung prämakulärer Membranen induzieren (Gupta, et al., 2011), (Girach & de Smet, 2013), (Yamashita, et al., 2008). Wie bereits erwähnt befinden sich die Hyalozyten in

einem Abstand von 20 – 75 μm zur inneren Grenzmembran in der Glaskörperrinde (Tozer & Sebag, 2014), (Qiao, et al., 2005).

Spaltet sich die Glaskörperrinde anterior der eingebetteten Hyalozyten, verbleibt eine relativ dicke, zelulläre Membran auf der inneren Grenzmembran (Sebag, et al., 2014). Die verbleibenden Hyalozyten sorgen dann nicht nur mittels „connective tissue growth factor“ (CTGF) Ausschüttung für eine Kontraktion des Glaskörpers (Hirayama, et al., 2004), sondern können sich auch in Anwesenheit von ausgeschüttetem „transforming growth factor β 2“ (TGF- β 2) in aktive Myofibroblasten transdifferenzieren (Kohno, et al., 2009). Aktive α -smooth muscle actin (α -SMA)-positive Myofibroblasten können schließlich durch ihre kontraktile Fähigkeit retinale Schichten in Falten ziehen (Kohno, et al., 2009). Wird eine zentral in Richtung Fovea centralis gerichtete Kontraktion erzeugt, resultiert daraus das Krankheitsbild eines Macular Pucker (Sebag, et al., 2014). Spaltet sich die Glaskörperrinde posterior der eingebetteten Hyalozyten, verbleibt eine weitaus dünnere, hypozelluläre prämakuläre Membran auf der inneren Grenzmembran. Kommt es durch diese Membran zu einer tangential (zentrifugal zur Fovea centralis) gerichteten Traktion, kann ein Makulaforamen induziert werden (Sebag, et al., 2014).

Erst kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass bei idiopathischer epiretinale Gliose auch an mehreren Orten gleichzeitig eine Kontraktion auftreten kann. Hierbei gilt, je mehr kontrahierende Stellen eine prämakuläre Membran aufweist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass der betroffene Patient intraretinale Zysten und eine verdickte Makula entwickelt (Gupta, et al., 2008).

Außerdem ist bekannt, dass die prämakuläre Membran mit der Zeit strukturellen Umbaumaßnahmen unterworfen ist. So konnte nachgewiesen werden, dass erst kurz bestehende prämakuläre Membranen mehr Zellen und weniger Kollagen enthielten. Dagegen wurde in schon länger bestehenden prämakulären Membranen vermehrt Kollagen und ein voranschreitender Zelltod beobachtet (Hiscott, et al., 1985).

Die nachfolgende [Abbildung 9](#) bietet eine Übersicht der bei idiopathischer epiretinale Gliose vorkommenden Zellen und ihrer Herkunft.

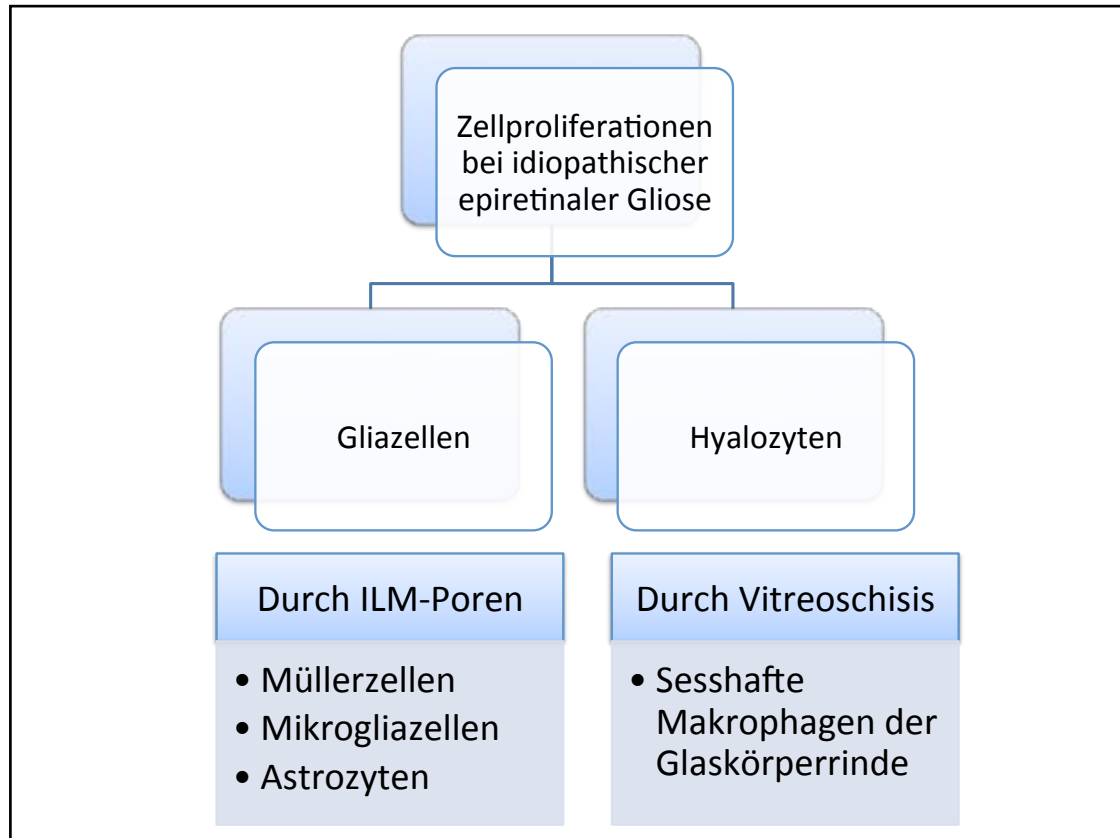


Abbildung 9: Zellen der idiopathischen epiretinalen Gliose und ihre Herkunft (modifiziert nach (Gandorfer, et al., 2014)).

2.2.2 Immunozytochemische und ultrastrukturelle Charakteristika

Der Begriff Gliose gibt bereits Hinweise auf die ultrastrukturelle Zusammensetzung dieser prämakulären Membranen. Den Großteil der zellulären Komponente stellen somit Gliazellen und Hyalozyten dar (Gandorfer, et al., 2014), (Sebag, et al., 2014), (Zhao, et al., 2013).

Ein wichtiges Merkmal prämakulärer Membranen der idiopathischen epiretinalen Gliose ist deren Fähigkeit zur Kontraktion. Gewährleistet wird diese Eigenschaft durch das Vorhandensein von Myofibroblasten, welche die kontraktile Zellen der prämakulären Membranen darstellen. Immunozytochemisch reagieren sie stark positiv auf anti- α -Glattmuskelaktin (engl.: anti- α -smooth-muscle-actin; anti- α -SMA). Myofibroblasten oder Myofibroblasten-ähnliche Zellen entstehen bei idiopathischer epiretinaler Gliose durch Transdifferenzierung aus möglichen Vorläuferzellen, den Gliazellen und Hyalozyten, seltener aus Fibroblasten (Gandorfer, et al., 2014), (Abu El-Asrar, et al., 2011). Vor allem die beobachtete Kollokalisierung von anti- α -SMA mit dem Hyalozytenmarker anti-CD-163 lässt darauf schließen, dass Hyalozyten mögliche

Progenitorzellen der Myofibroblasten-Transdifferenzierung darstellen (Zhao, et al., 2013). Hyalozyten gelten als die Makrophagen des Glaskörpers und zeigen ultrastrukturell einen lobulären Zellkern, einen deutlich erkennbaren Golgi-Apparat, sowohl raues als auch glattes endoplasmatisches Retikulum und viele lysosomale Vesikel und Phagosomen in ihrem Zytoplasma (Gandorfer, et al., 2014). Myofibroblasten sind charakterisiert durch einen fusiformen Zellkern und Zellkörper, viel raues endoplasmatisches Retikulum und Ansammlungen von 5-7 nm dicken, subplasmalemalen zytoplasmatischen Filamenten mit fusiformen Verdichtungen (Gandorfer, et al., 2014).

Da deutlich mehr Myofibroblasten bei idiopathischer epiretinale Gliose mit anomaler hinterer Glaskörperabhebung vorkommen, als bei idiopathischer epiretinale Gliose mit physiologischer hinterer Glaskörperabhebung, scheint eine anomale hintere Glaskörperabhebung sowohl die Hyalozytenproliferation als auch die Transdifferenzierung in Myofibroblasten-ähnliche Zellen positiv zu beeinflussen (Gandorfer, et al., 2014), (Zhao, et al., 2013).

Neben Gliazellen, Hyalozyten und Fibroblasten finden sich auch wenige Astrozyten, Müllerzellen, Mikrogliazellen und Makrophagen (Kampik, et al., 1980), (Kampik, et al., 1981), (Schumann, et al., 2010), (Smiddy, et al., 1989). Vereinzelt können auch Zellen des retinalen Pigmentepithels nachgewiesen werden. Allerdings scheinen diese mehr im Zusammenhang mit sekundären prä- und subretinalen Membranen z.B. nach Netzhautablösungen zu stehen (Sebag, et al., 2014), (Gandorfer, et al., 2014).

Ultrastrukturell lassen sich zwei verschiedene Membrantypen voneinander unterscheiden. Bei **Typ 1** befindet sich eine Schicht aus Glaskörperkollagen zwischen prämakulärer Membran und innerer Grenzmembran, sodass dieser Membrantyp aus einer anomalen hinteren Glaskörperabhebung mit Vitreoschisis resultieren könnte (Gandorfer, et al., 2014).

Prämakuläre Membranen vom **Typ 2** liegen hingegen direkt der inneren Grenzmembran auf. Diesem Typ prämakulärer Membran scheint eine komplette hintere Glaskörperabhebung (ohne Vitreoschisis) vorauszugehen (Gandorfer, et al., 2014).

Dementsprechend unterscheiden sich diese beiden Membrantypen auch hinsichtlich des Ursprungs ihrer zellulären Bestandteile. Während Hyalozyten bei Typ 1 die vorherrschenden Zellen sind, kommen bei Typ 2 vor allem Gliazellen und fibröse Astrozyten vor (Gandorfer, et al., 2014).

Diese beiden Membrantypen sind in nachfolgender [Abbildung 10](#) gegenübergestellt.

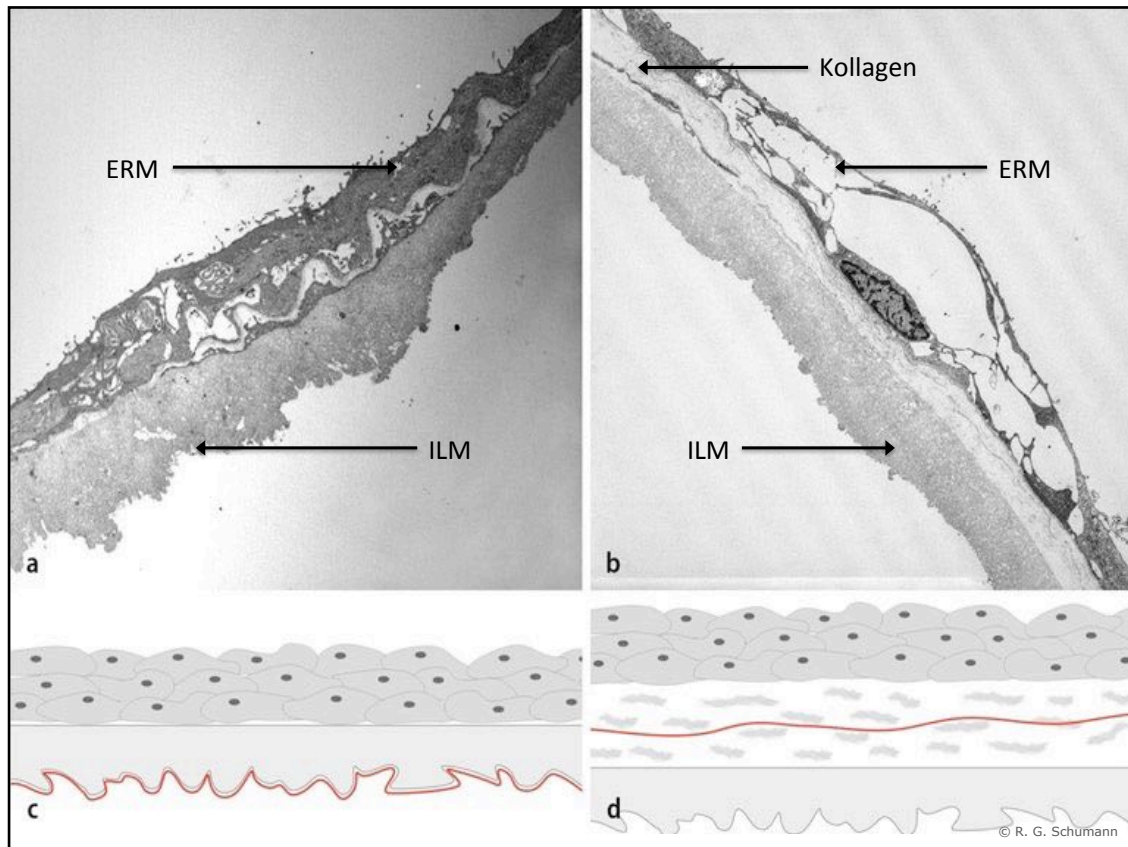


Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Aufnahme mit schematischer Gegenüberstellung der Typ 1 und Typ 2 prämakulären Membranen (PMM). a: elektronenmikroskopische Aufnahme einer PMM Typ 2, b: elektronenmikroskopische Aufnahme einer PMM Typ 1, c: schematische Darstellung einer PMM Typ 2, d: schematische Darstellung einer PMM Typ 1 (modifiziert nach (Haritoglou, et al., 2014), (Gandorfer, et al., 2012)).

2.2.3 Klinik und Therapie

Im klinischen Alltag werden idiopathische epiretinale Gliosen oft durch Metamorphopsien symptomatisch. Metamorphopsie bezeichnet ein Verzerrtsehen, welches durch Netzhautfalten aufgrund der kontraktile Elemente der idiopathischen epiretinalen Gliose entstehen kann. Hierbei korreliert der Grad der Netzhautkontraktion mit dem Ausmaß der Metamorphopsien (Arimura, et al., 2005). Zudem können idiopathische epiretinale Gliosen neben Mikropsien (Verkleinerung der

Umgebung) und Makropsien (Vergrößerung der Umgebung) auch zu Nebelsehen und Visusminderung bis hin zu deutlichem Visusverlust führen (Haritoglou, et al., 2014). Die Sehschärfeverschlechterung ist auf traktionsbedingte, irreversible Defekte in der Photorezeptorschicht zurückzuführen. Eine Beurteilung dieser Schicht ist von besonderer, prognostischer Relevanz. Bisherige Untersuchungen konnten nämlich zeigen, dass präoperativ bestehende Defekte der Photorezeptorschicht statistisch signifikant mit einem schlechteren postoperativen Visus korrelieren (Suh, et al., 2009). Neben Defekten in der Photorezeptorschicht, kann die auf innere Netzhautschichten ausgeübte Traktion auch zu Verziehungen der Gefäße oder zu einem traktiven Makulaödem führen, was wiederum mit einer schlechteren Sehschärfe korreliert (Sebag, et al., 2009), (Wilkins, et al., 1996). Funduskopisch sind sowohl die prämakuläre Membran, als auch Netzhautfalten und Gefäßdistorsionen gut zu erkennen. Zudem zeigt sich an der Spaltlampe oft eine Netzhautverdickung mit Aufhebung der fovealen Depression (Watanabe, et al., 2009), (Okamoto, et al., 2012).

In der Regel schreitet die Visusminderung jedoch nur langsam voran. Innerhalb von 5 Jahren entwickeln nur circa 29% der Augen mit idiopathischer epiretinale Gliose eine deutliche Sehschärfeverschlechterung (Fraser-Bell, et al., 2003). Anfangs betrifft die idiopathische epiretinale Gliose meist nur ein Auge. Bei 20 – 31% aller Patienten sind beide Augen betroffen; bilaterale Symptome entwickeln 14% aller Patienten innerhalb von 5 Jahren (Fraser-Bell, et al., 2003), (Mitchell, et al., 1997).

Neben der Funduskopie spielt die hochauflösende Spektral-Domain optische Kohärenztomographie (SD-OCT) eine entscheidende Rolle in der Diagnostik der idiopathischen epiretinalen Gliose (Do, et al., 2007). Die prämakuläre Membran stellt sich in der SD-OCT-Aufnahme als hochreflektierende dünne Linie dar, die der inneren Grenzmembran der Netzhaut direkt aufliegt und zu deutlicher Faltenbildung führen kann (Kanski, 2004). Dies ist in [Abbildung 11](#) dargestellt. Auch die Aufhebung der fovealen Depression kann mittels SD-OCT durch eine über die Fovea hinwegziehende prämakuläre Membran deutlich gemacht werden.

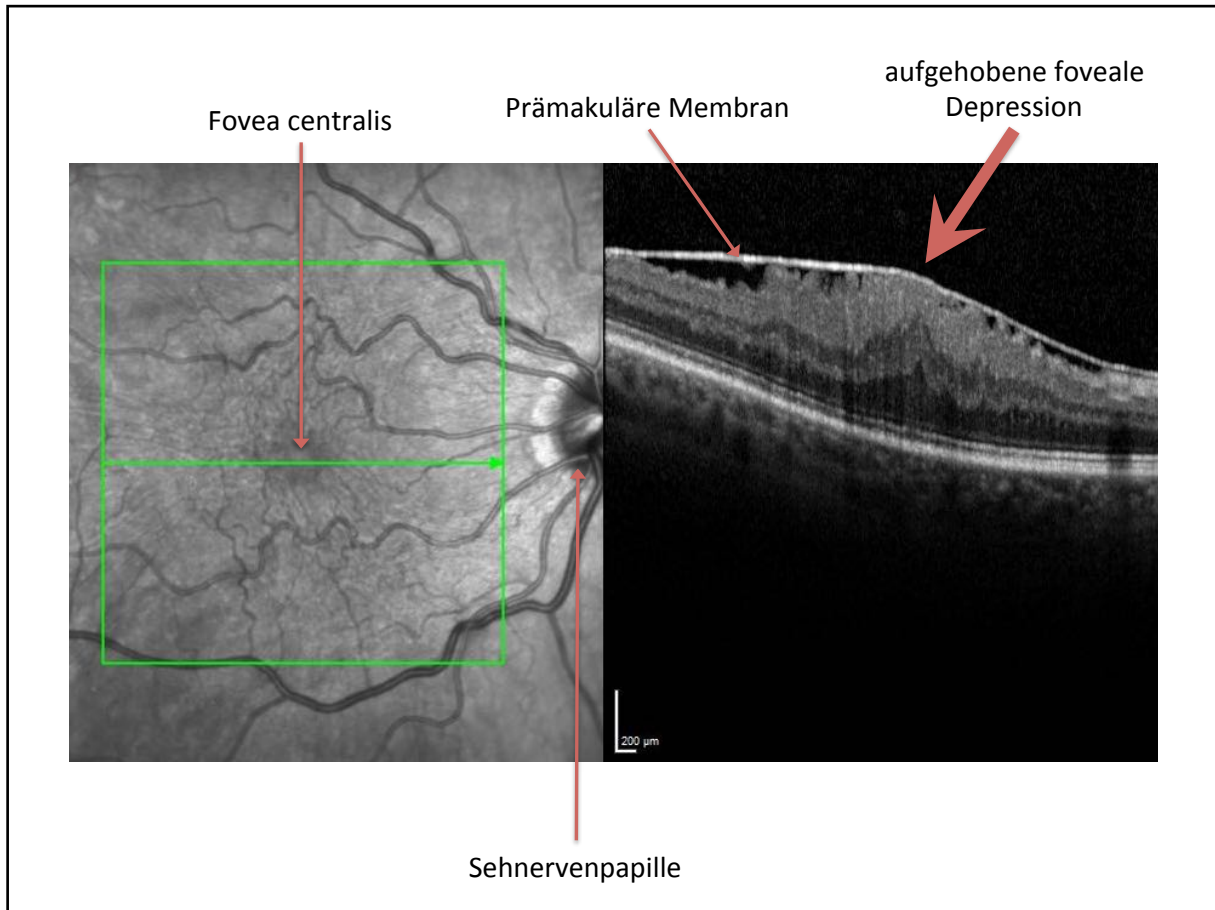


Abbildung 11: SD-OCT-Aufnahme eines rechten Auges mit idiopathischer epiretinaler Gliose (modifiziert aus dem Archiv der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München).

Als weitere diagnostische Mittel können die rotfreie Fotografie und in speziellen Fällen die Fluorescein-Angiografie angewandt werden. In der Fluorescein-Angiografie zeigt sich charakteristischerweise meist keine oder eine mittelgradige Leckage aus den Gefäßen ohne Zysten. Die typischen Verziehungen der Gefäße werden hierdurch gut sichtbar (Kanski, 2004). Die Ausdehnung der prämakulären Membran lässt sich am besten durch Fotografie mit rotfreiem Licht darstellen (Kanski, 2004).

Therapeutisch besteht die Möglichkeit einer operativen Entfernung des prämakulären Gewebes. Die primäre Therapieindikation ist hierbei zum einen abhängig vom Leidensdruck des Patienten und zum anderen von der zunehmenden Visusminderung. Da idiopathische epiretinale Gliosen trotz ihrer relativ hohen Prävalenz oft auch asymptomatisch bleiben, kann auch erst bei Auftreten oder Zunahme der Symptome ein operatives Vorgehen überlegt werden. Jedoch sollte die Operation bei Beschwerden und deutlichem Visusverlust nicht zu lange hinausgezögert werden, da

eine lang bestehende idiopathische epiretinale Gliose zum Nachlassen der Netzhautelastizität und zu Alterationen der Photorezeptoren und des retinalen Pigmentepithels führt. Dies kann, wie oben bereits erwähnt, die postoperative Prognose ungünstig beeinflussen (De Bustros, et al., 1988), (Rice, et al., 1986), (Wong, et al., 2005).

Die operative Therapie beinhaltet eine transkonjunktivale, nahtlose pars plana Vitrektomie mit Peeling der prämakulären Membran und der inneren Grenzmembran. Bei diesem Verfahren wird nach Glaskörperentfernung die prämakuläre Membran und innere Grenzmembran mittels Pinzette möglichst vollständig von der Netzhaut abgezogen. Zur besseren Darstellbarkeit der Membran wird meistens ein Farbstoff (z.B. Brilliant Blau) verwendet. Abschließend wird eine Tamponade, meist bestehend aus Luft oder Gas (C2F6), in das Auge eingegeben.

Postoperativ bessern sich die Metamorphopsien nach erfolgreicher Operation meist zügig. Eine postoperative Visusverbesserung tritt in mehr als 50% der operierten Patienten auf. Bei erfolgreicher Operation wird im Mittel ein postoperativer Visus von 0,2 bis 0,6 erreicht (Burk & Burk, 2014). Wichtig ist aber, die Patienten ausführlich darüber aufzuklären, dass sich eine Verbesserung der Sehschärfe über einen Zeitraum von mehreren Wochen sogar bis zu einem Jahr hinausziehen kann. Die foveale Depression bildet sich bei lang vorbestehender idiopathischer epiretinale Gliose oft nicht vollständig zurück (Heimann & Kellner, 2010). In 10% der Fälle kommt es auch nach initial erfolgreicher pars plana Vitrektomie mit Peeling prämakulären Gewebes zu einer erneuten idiopathischen epiretinalen Gliose (Gibran, et al., 2008), (Kwok, et al., 2004). Eine Erklärung hierfür wäre, dass durch Peeling Defekte entstehen können, durch die Gliazellen erneut in den vitreoretinalen Grenzspalt migrieren und dort anschließend proliferieren.

Eine pharmakologische Therapie zur Hemmung der Migration und Proliferation prämakulärer Zellen existiert derzeit leider noch nicht.

Ein möglicher pharmakologischer Therapieansatz wäre jedoch die Kontraktionshemmung durch Hemmung der aus Hyalozyten transdifferenzierten Myofibroblasten-ähnlichen Zellen. Platelet Derived Growth Factor (PDGF) sorgt in

Kombination mit Transforming Growth Factor β 2 (TGF- β 2) für eine Phosphorylierung und damit Aktivierung der Myosin-Leichtketten. Hierfür wird der rho-Kinase Reaktionsweg genutzt. Durch eine pharmakologische Blockade der rho-Kinase (ROCK) könnte eine durch Myofibroblasten-ähnliche Zellen verursachte Kontraktion der prämakulären Membran verhindert werden (Hirayama, et al., 2004), (Sakamoto & Ishibashi, 2011). Hydroxyfasudil ist ein bereits bei zerebralen Vasospasmen eingesetzter selektiver ROCK-Inhibitor und könnte zukünftig auch in der pharmakologischen Behandlung der idiopathischen epiretinalen Gliose eine Rolle spielen (Hirayama, et al., 2004).

2.3 Proliferative Vitreoretinopathie

Die Proliferative Vitreoretinopathie (PVR) ist eine Erkrankung des Glaskörpers und der Netzhaut, bei der sich pathologische fibrozelluläre Membranen nicht nur auf der Netzhautoberfläche (präretinal), sondern auch unter der Netzhaut (subretinal) (siehe [Abbildung 12](#)) ausbilden können (Ryan, et al., 2013). Die proliferative Vitreoretinopathie gilt als die häufigste und wichtigste Ursache für Misserfolge der Ablatiochirurgie, da sie sich meist nach rhegmatogener Ablatio retinae entwickelt. Im Sinne eines überaktiven Prozesses der Netzhautreparatur kann sie durch Membranbildung im Spätstadium zu Netzhauttraktion mit erneuter Netzhautablösung führen (Kampik & Grehn, 2002). Sie wurde bei 5-10% der Patienten nach rhegmatogener Netzhautablösung (Lei, et al., 2010) und sogar in 75% nach rezidivierender rhegmatogener Netzhautablösung nachgewiesen (Pastor, 1998). Aber auch nach Verletzungen des Auges, insbesondere penetrierenden Stichverletzungen, intraokularen Fremdkörpern oder nach Prellungsschäden, kann sich eine proliferative Vitreoretinopathie durch entstandene Netzhautrisse entwickeln (Reim, et al., 2003), (Burk & Burk, 2014).

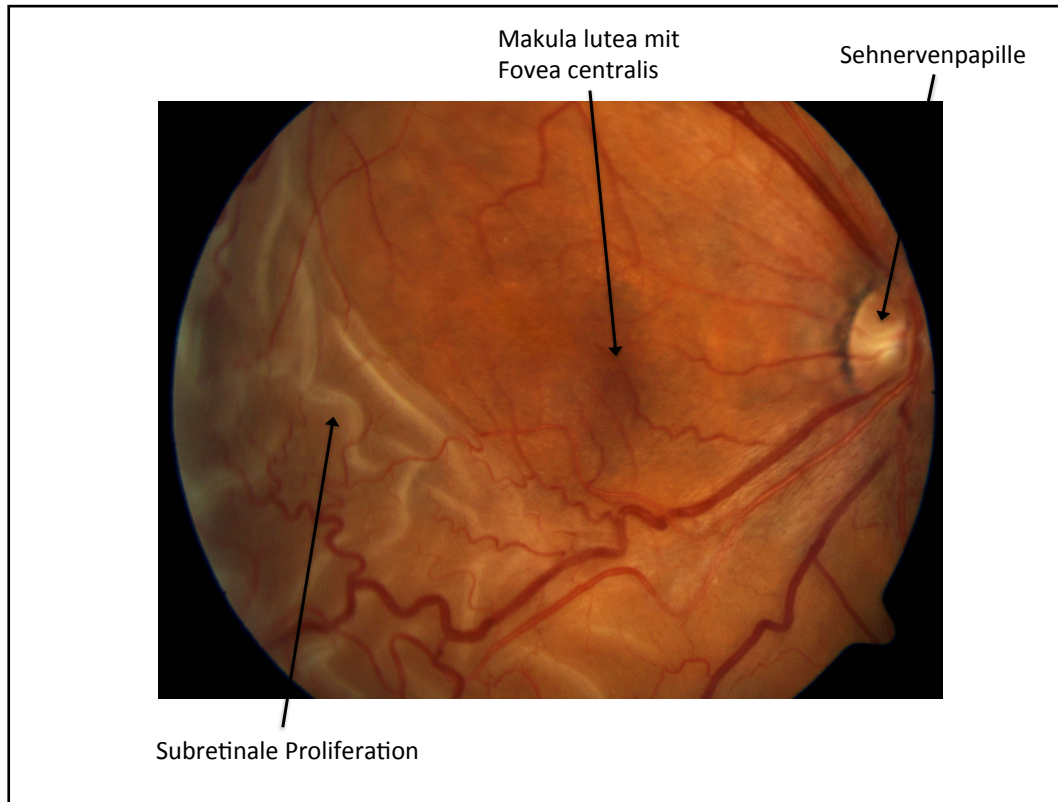


Abbildung 12: Fundusaufnahme eines rechten Auges mit proliferativer Vitreoretinopathie und damit verbundener subretinaler Proliferation (modifiziert aus dem Archiv der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München).

Je nach Ausbildung und Progression erfolgt eine Einteilung der proliferativen Vitreoretinopathie in die Stadien A bis C nach einer Klassifikation der Retina Society aus dem Jahr 1983 (Mehta, et al., 2014). Im Anfangsstadium (**Stadium A**) lässt sich ein Netzhautriss mit progressiver zellulärer Invasion des Corpus vitreum detektieren. Klinisch zeigen sich Pigmentpartikel im Glaskörper („tobacco dust“) und eine Glaskörpertrübung (Burk & Burk, 2014). Im **Stadium B** beginnen sich die Rissflächen der Retina einzurollen, was zu einer Vergrößerung des bereits bestehenden Netzhautforamens führt (Ciprian, 2015). Die Netzhaut erscheint rigide, die Gefäße der Netzhaut geschlängelt (Tortuositas) und der Glaskörper entwickelt eine geringere Mobilität (Burk & Burk, 2014). Im **Stadium C** führt die Ausbildung fibrozellulärer Membranen zu traktiven, alle Schichten betreffenden Netzhautfalten (Ciprian, 2015). Diese können auch als konfluierende Sternfalten auftreten, wie in [Abbildung 13](#) dargestellt. Neben den konfluierenden Sternfalten zeigen sich in Stadium C subretinale Stränge und der Glaskörper erscheint kondensiert (Burk & Burk, 2014).

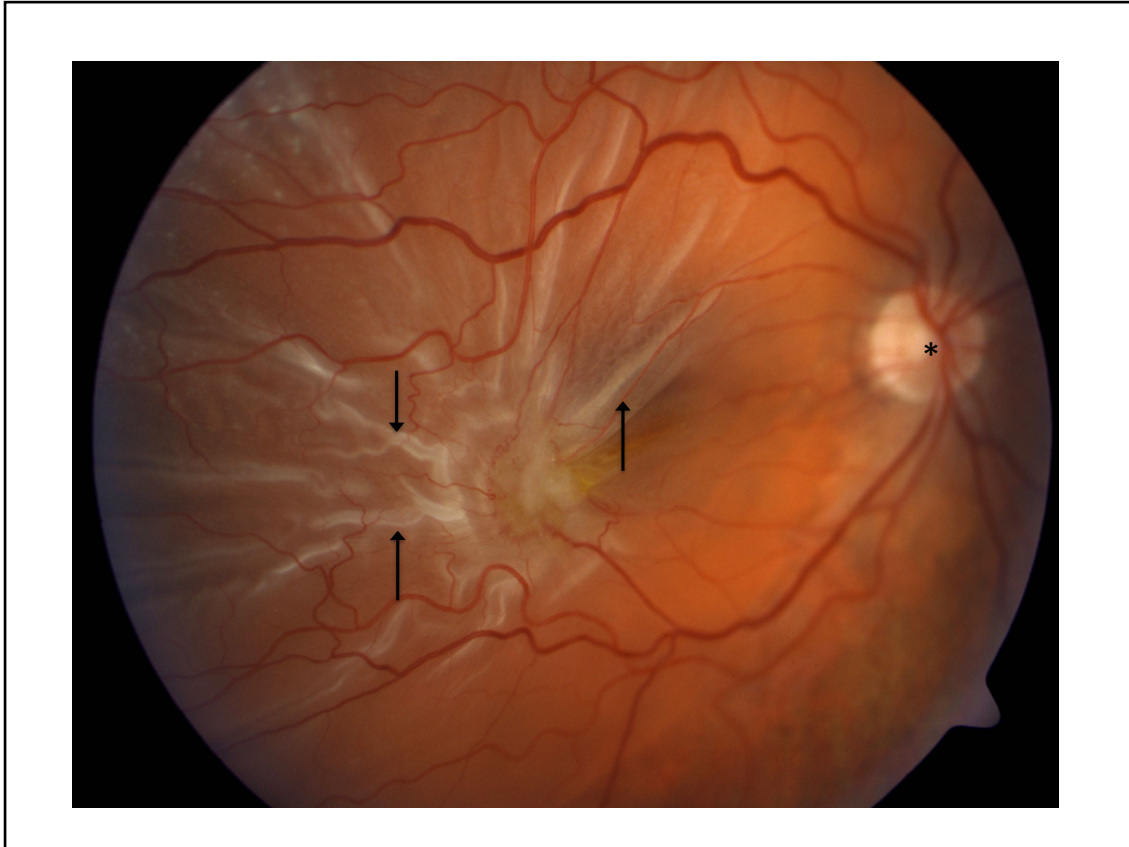


Abbildung 13: Fundusaufnahme eines rechten Auges mit retinalen Sternfalten (siehe Pfeile) bei proliferativer Vitreoretinopathie (PVR). Der Sehnervenkopf ist mit einem Stern markiert. (Modifiziert aus dem Archiv der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München).

2.3.1 Pathogenese

Ausprägung und Lokalisation der progressiven zellulären Progression unterliegen einer hohen Variabilität. Dennoch folgt die Entstehung einer proliferativen vitreoretinalen Pathologie meist einem ähnlichen Muster (Kampik & Grehn, 2002). Hierbei kommt ausgeschwemmten retinalen Pigmentepithelzellen (RPE-Zellen) eine zentrale Rolle zu.

Durch das bestehende Netzhautforamen können retinale Pigmentepithelzellen und Gliazellen auf die innere und äußere Netzhautoberfläche und Glaskörperrückfläche wandern (Mehta, et al., 2014). Dort beginnen sie zu proliferieren und zu transformieren. Durch Aktivierung entwickeln die dedifferenzierten Zellen Fibroblasten-ähnliche und Myofibroblasten-ähnliche Merkmale (Mehta, et al., 2014), (Kita, et al., 2014), (Banerjee, et al., 2014). Die Kontraktion der Membranen wird zum einen durch intrazelluläre Aktin-Filamente der Myofibroblasten verursacht (Banerjee, et al., 2014), (Mehta, et al., 2014), (Wynn, 2008). Zum anderen scheint eine Interaktion zwischen den Fibroblasten-

ähnlichen retinale Pigmentepithelzellen und der extrazellulären Matrix (v.a. Fibronektin) zu einer Kontraktion zu führen (Ciprian, 2015), (Banerjee, et al., 2014). Als Zeichen einer Entzündungsreaktion finden sich außerdem Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten. Makrophagen können eine Bindegewebsbildung induzieren, indem sie zu Fibroblasten-ähnliche Zellen differenzieren (Mehta, et al., 2014). Zytokine und Chemokine ließen sich in der Glaskörperflüssigkeit nachweisen. Im Vergleich zu Patienten mit idiopathischer epiretinale Gliose wurden bei Patienten mit proliferativer Vitreoretinopathie höhere Spiegel an Interleukin-1, -6, -8, -10 (IL-1, -6, -8, -10) und Interferon γ (INF γ) nachgewiesen (Ciprian, 2015). Durch in vitro Untersuchungen ist bekannt, dass IL-1 und INF γ das Wachstum der RPE-Zellen anregen (Kishi, et al., 1994).

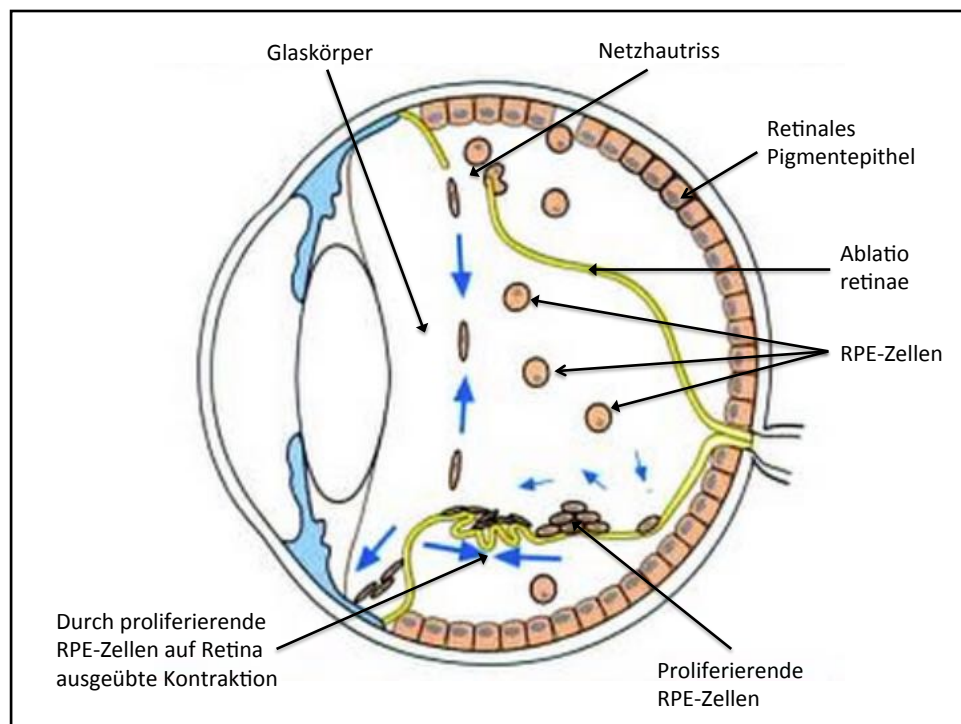


Abbildung 14: Schema eines möglichen Pathomechanismus der proliferativen Vitreoretinopathie; RPE-Zelle = Zelle des retinalen Pigmentepithels (modifiziert nach (Reim, et al., 2003)).

Für die Entwicklung einer proliferativen Vitreoretinopathie sind folgende präoperativen Risikofaktoren bekannt:

1. Der Zeitraum zwischen Auftreten der Netzhautablösung und operativer Versorgung spielt eine wichtige Rolle. Bleibt die Ablösung über einen Monat ungenügend oder gar nicht behandelt, sind sowohl Migration also auch

Proliferation der retinalen Pigmentepithelzellen und der Gliazellen deutlich häufiger zu erwarten (Ciprian, 2015).

2. Typ, Form und Größe der Ablatio retinae sind ebenfalls entscheidend für die Entwicklung einer proliferativen Vitreoretinopathie. Ein erhöhtes Risiko besteht bei einer großen Ablatio retinae mit einer Ausbreitung über 3 Uhrzeiten.
3. Eine bestehende Aphakie gilt als Risikofaktor. Pseudophake Patienten haben jedoch kein erhöhtes Risiko (Rouberol & Chiquet, 2014).
4. Erhöhte Glaskörperspiegel von Matrixmetalloproteinase (MMP) -2 und MMP-9 sowie des intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) führen häufiger zur PVR-Membran Bildung (Rouberol & Chiquet, 2014).
5. Ein junges Alter der Patienten ist ebenfalls ein Risikofaktor.
6. Vorbestehende Entzündungen wie zum Beispiel eine Uveitis stimulieren die PVR-Membran Bildung (Mehta, et al., 2014).
7. Kontrovers diskutiert wird, ob eine bestehende Glaskörperblutung einen Risikofaktor darstellt.

Als intraoperative Risikofaktoren sind bekannt:

1. Eine inkomplette Vitrektomie.
2. Eine Kryotherapie. Hierbei können besonders häufig retinale Pigmentepithelzellen in die Glaskörperhöhle gelangen. Zudem kann eine Kryotherapie zu einem Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke führen. Auch exzessive Laserphotokoagulation stellt einen Risikofaktor dar (Garweg, et al., 2013).
3. Das Auftreten von intraoperativen Komplikationen wie Hyphäma, subretinale Hämorrhagie oder choroidales Hämatom (Rouberol & Chiquet, 2014).

Der Typ der verwendeten Netzhaut-Tamponade (Ciprian, 2015), besonders die Verwendung einer Silikonöl-Tamponade scheint die Anlockung von Makrophagen zu induzieren, die Zytokine und Wachstumsfaktoren ausschütten und damit die Entstehung der proliferativen Vitreoretinopathie begünstigen. Hierbei sorgt der Wachstumsfaktor „Transforming Growth Factor β “ (TGF- β) für eine gesteigerte Produktion von extrazellulärer Matrix (EZM) (Gamulescu, et al., 2006).

2.3.2 Immunozytochemische und ultrastrukturelle Charakteristika

Die Hauptzelltypen der Membranen bei proliferativer Vitreoretinopathie sind Myofibroblasten und Zellen des retinalen Pigmentepithels (Abu El-Asrar, et al., 2006), (Abu El-Asrar, et al., 2007), (Abu El-Asrar, et al., 2008), (Abu El-Asrar, et al., 2011). Seltener finden sich Makrophagen (inklusive Hyalozyten), Fibroblasten und Gliazellen (Astrozyten und Müllerzellen) (Vinores, et al., 1990), (Schwartz, et al., 1988), (Mehta, et al., 2014).

Die retinalen Pigmentepithelzellen sind postmitotisch und dienen physiologisch der Unterstützung der Photorezeptoren der Retina (Mehta, et al., 2014). Ultrastrukturell sind retinalen Pigmentepithelzellen gekennzeichnet durch ihre mit Melanin gefüllten intrazytoplasmatischen Vesikel und durch Mikrovilli an der Zelloberfläche (Schumann, et al., 2015). Retinale Pigmentepithelzellen können einer epithelial-mesenchymalen und metaplastischen Umwandlung unterliegen (Du, et al., 2013), sobald sie ihre Anheftungen an die extrazelluläre Matrix und an die Nervenzellen der Netzhaut verlieren. Gelangen sie durch retinale Defekte zwischen innere Grenzmembran und Glaskörper, können sie durch den Umgebungswechsel zur Transdifferenzierung in Fibroblasten-ähnliche und Myofibroblasten-ähnliche Zellen angeregt werden (Banerjee, et al., 2014), (Kita, et al., 2014), (Mehta, et al., 2014). Unterstützt wird dieser Vorgang durch die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren wie Transforming Growth Factor β (TGF- β), Insulin-like Growth Factor (IGF-1), Fibroblast Growth Factor (FGF) und Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (Kita, et al., 2014), (Wiedemann, 1992). Diese werden von Gliazellen und Makrophagen freigegeben, die ebenfalls in den vitreoretinalen Grenzspalt gelangt sind (Wiedemann, 1992). Transdifferenzierte Myofibroblasten haben nicht nur die Fähigkeit zur Kontraktion, die zur retinalen Faltenbildung führt, sondern haben auch die Eigenschaft Kollagen zu produzieren, was eine Fibrose induziert (Abu El-Asrar, et al., 2011), (Wynn, 2008).

2.3.3 Klinik und Therapie

Klinisch kann die proliferative Vitreoretinopathie zu Visusminderung bis hin zur Erblindung führen. Im Endstadium kann eine Rubeosis iridis mit Neovaskularisationsglaukom und eine Hypotonie des Bulbus, die eine Phtisis bulbi

bedingen kann, entstehen (Burk & Burk, 2014). Funduskopisch zeigen sich fibrozelluläre Membranen mit Netzhautfalten, konfluierende Sternfalten und je nach Befund ein trichterförmiges Zusammenziehen der Netzhaut.

Therapeutisch ist eine operative Entfernung der traktiven Membranen unabdingbar. Ziel ist es, die traktiven Membranen und Stränge mittels pars plana Vitrektomie mit Peeling vollständig zu beseitigen und die Netzhaut wieder anzulegen. Bei der Vitrektomie wird der pathologisch veränderte Glaskörper mikrochirurgisch entfernt und anschließend durch eine Gas- oder Silikonöltamponade ersetzt. Je nach Befund muss zusätzlich eine Cerclage, eine Retinotomie oder Retinektomie erfolgen (Schaub, et al., 2016).

Die anatomische Wiederanlegung der Netzhaut gelingt dabei in 50-90% der Fälle (Burk & Burk, 2014). Die funktionelle Erfolgsrate sowie das postoperative Sehvermögen ist allerdings sehr variabel. In manchen Fällen lässt sich auch trotz Operation eine Reproliferation nicht verhindern und die Krankheit schreitet bis zum Endstadium fort (Burk & Burk, 2014).

Da die proliferative Vitreoretinopathie leider keine seltene Komplikation der chirurgischen Behandlung der rhegmatogenen Ablatio retinae darstellt, wären pharmakologische Therapiemöglichkeiten zur Verhinderung der Ausbildung einer proliferativen Vitreoretinopathie nach Netzhautoperationen wünschenswert. Pharmakologische Ansatzpunkte (Tabelle 1) sind hierbei vor allem die Entzündungshemmung und antiproliferative Therapie mit dem Ziel, die Ausbildung von traktiven Membranen zu verhindern. Derzeit existieren jedoch nur experimentelle Berichte einzelner Forschungsgruppen. Ergebnisse erster klinischer Studien stehen noch aus.

Pathologischer Vorgang bei PVR	Pharmakologischer Ansatzpunkt
Zusammenbruch der Blut-Retina-Schranke Fibrinbildung	Anti-entzündliche Therapie Hemmung der Fibrinproduktion
Gesteigerte Bildung von extrazellulärer Matrix (EZM)	Hemmung der Zellaktivierung, Manipulation von Matrixmetalloproteinasen (MMP)

Zellaktivierung und -proliferation

Anti-proliferative Therapie,
Manipulation von Wachstumsfaktoren

Tabelle 1: Auflistung möglicher pharmakologischer Therapieansätze bei proliferativer Vitreoretinopathie mit pharmakologischem Ansatzpunkt und dazugehörigem pathologischen Vorgang (modifiziert nach (Banerjee, et al., 2014))

Anti-entzündliche Therapie

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die okuläre Entzündung und die Schwere der proliferativen Vitreoretinopathie in frühen Stadien durch Cannabinoid-2-Rezeptor (CB2R) Agonisten reduziert werden kann (Szczesniak, et al., 2016). Diese Erkenntnis wurde bisher allerdings nur bei wild-type und Cannabinoid-2-Rezeptor knock-out Mäusen gewonnen. Untersuchungen an menschlichen Augen gibt es bisher nicht.

Zu bedenken ist, dass die Retinotoxizität vieler entzündungshemmender Pharmatherapeutika eine erhebliche Hürde in der Entwicklung und Anwendung von Wirkstoffen darstellt. Deshalb mussten Zytostatika wie Vincristin, Cisplatin, Adriamycin, Mitomycin, Dactomycin und Etoposid bereits nach in vitro Experimenten ausgemustert werden (Priglinger & Priglinger, 2013). Nur mit Tacrolimus und IMS2186 konnten Tierversuche durchgeführt werden (Turgut, et al., 2012), (Falkenstein, et al., 2008).

Wegen des erhöhten Vorkommens von Entzündungsparametern bei der proliferativen Vitreoretinopathie in Vorderkammer und Glaskörper werden aktuell Untersuchungen zu einer möglichen präventiven Wirkung einer intravitrealen Injektion von Triamcinolon, der oralen Gabe von Prednisolon und der subkonjunktivalen Applikation von Dexamethason untersucht (Hoerster, et al., 2013), (Schroder, et al., 2012), (Dehghan, et al., 2010), (Ahmadi, et al., 2008), (Jonas, Hayler, & Panda-Jonas, 2000), (Koerner, et al., 2012), (Yamakiri, et al., 2008).

Hemmung der Fibrinproduktion

Ein weiterer wichtiger Ansatzpunkt ist die Kombinationstherapie mit niedermolekularem Heparin und 5-Fluorouracil (Mehta, et al., 2014). Beide Substanzen greifen in die Entwicklung der proliferativen Vitreoretinopathie hemmend ein. Niedermolekulares Heparin vermindert die postoperative Fibrinbildung und hat seinen Ansatzpunkt somit in der frühen Phase der proliferativen Vitreoretinopathie (Iverson, et al., 1991). Im Gegensatz dazu greift 5-Fluorouracil in der späten Phase der proliferativen Vitreoretinopathie ein, indem es durch Inhibition der DNA-Synthese die Fibroblastenproliferation hemmt (Blumenkranz, et al., 1984). Dies soll in klinischen Studien untersucht werden (Sundaram, et al., 2013). Eine Bedeutung für die Zukunft könnte die Verwendung von intravitrealen Implantaten haben, die kontinuierlich 1mg 5-Fluorouracil ausschütten. In einer experimentellen Studie an Hasen wurde dadurch

die Inzidenz der proliferativen Vitreoretinopathie von 89% auf 11% reduziert (Rubsamen, et al., 1994).

Hemmung der Zellaktivierung durch Manipulation von Matrixmetalloproteinasen

Da der Umbau und die gesteigerte Produktion von extrazellulärer Matrix bei der proliferativen Vitreoretinopathie eine wesentliche Rolle spielen, ist auch hier ein Ansatz zur pharmakologischen Therapie gegeben. An diesem Vorgang sind vor allem die Matrixmetalloproteinasen 1,2,3 und 9 (MMPs) und die „tissue inhibitors of metalloproteinases“ 1,2 und 3 (TIMPs) beteiligt (Salzmann, et al., 2000), (Kon, et al., 1998), (Banerjee, et al., 2014). Eine Manipulation von MMPs und TIMPs klingt daher erfolgsversprechend. Der synthetische MMP-Inhibitor Prinomastat (AG3340) konnte in experimentellen Versuchen an Hasen- und Rattenaugen eine reduzierte PVR-Membranbildung zeigen (Banerjee, et al., 2014), (Ozerdem, et al., 2000), (Ozerdem, et al., 2001), (El-Bradey, et al., 2004). Es bleibt jedoch noch abzuwarten, ob sich diese positiven Ergebnisse auch an menschlichen Augen reproduzieren lassen.

Anti-proliferative Therapie

Auch die Behandlung mit Isotretinoin (13-cis-Retinolsäure), welche in der Dermatologie erfolgreich zur Behandlung von Akne eingesetzt wird, scheint erfolgsversprechend zu sein. Im Tiermodell konnte bereits mehrmals ein positiver Effekt von Isotretinoin auf die Entwicklung der proliferativen Vitreoretinopathie nachgewiesen werden, da es die Proliferation der Zellen des retinalen Pigmentepithels hemmt (Wu, et al., 2005), (Veloso, et al., 1997), (Takahashi, et al., 1997), (Mehta, et al., 2014), (Araiz, et al., 1993). Hierzu plant das Wills Eye Hospital (Philadelphia, USA) eine kontrollierte klinische Studie (Khan, et al., 2015). Weitere anti-proliferative Therapieansätze werden im Abschnitt 5.3 der Diskussion erläutert.

3 Methoden und Material

Von insgesamt 28 Augen mit idiopathischer epiretinale Gliose (16 Augen) und proliferativer Vitreoretinopathie (12 Augen) wurde prämakuläres Gewebe durch pars plana Vitrektomie im Zeitraum von August 2014 bis Juni 2015 an der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität gewonnen und für die Flachpräparation aufgearbeitet. Insgesamt wurden 109 Flachpräparate des prämakulären Gewebes immunhistologisch, interferenz- und phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Für die Immunozytochemie wurden die Flachpräparate mit verschiedenen Antikörpern markiert. Als primäre Antikörper wurden Antikörper für Myofibroblasten, Hyalozyten, Gliazellen, Mikrogliazellen, retinale Pigmentepithelzellen und Immunzellen getestet. Zusätzlich erfolgte eine ultrastrukturelle Darstellung von 32 Präparaten von 8 Augen mittels Elektronenmikroskopie.

3.1 Patientenkollektiv

Eingeschlossen wurden alle Proben von Patienten, die klinisch eine eindeutige idiopathische epiretinale Gliose oder proliferative Vitreoretinopathie aufwiesen.

Die Diagnose der idiopathischen epiretinalen Gliose wurde präoperativ via SD-OCT gesichert. Augen, die andere ophthalmologische Begleiterkrankungen wie u.a. eine Netzhautablösung, Entzündungen des Auges oder eine diabetische Retinopathie aufwiesen, wurden ausgeschlossen.

Eingeschlossene Patienten mit proliferativer Vitreoretinopathie erlitten im Vorfeld alle eine Netzhautablösung (Ablatio retinae). Die Netzhautablösung wurde durch eine Spaltlampenuntersuchung des Augenhintergrundes diagnostiziert. Zur besseren Darstellung des prämakulären Gewebes wurde präoperativ eine SD-OCT Untersuchung durchgeführt.

Von allen eingeschlossenen Augen wurden aus der Krankenakte folgende Patientendaten erhoben: Patientenalter zum Zeitpunkt der Operation, Geschlecht, Operationsdatum, Lokalisation (linke oder rechte Seite), Diagnose, bestkorrigierte Sehschärfe vor/nach Operation, Operateur sowie Art der Operation.

3.2 Operatives Vorgehen

Alle eingeschlossenen Patienten erhielten eine pars plana Vitrektomie (ppV) mit Peeling prämakulären Gewebes und innerer Grenzmembran. Meist wurde die pars plana Vitrektomie mit einer Kataraktoperation kombiniert.

Die Vitrektomie wird mit einer gründlichen Desinfektion der Lider und Bindehaut mit Povidon-Iod (PVP-Iod) begonnen. Im Anschluss wird das betroffene Auge steril abgedeckt und ein Lidsperrer eingesetzt. Nun wird der erste Trokar temporal unten eingebracht und an die Infusion angeschlossen. Die Infusion von physiologischer, balancierter Salzlösung (BSS) sorgt für eine Aufrechterhaltung des Augeninnendrucks. Es folgen zwei weitere Trokare nasal und temporal oben für die Lichtquelle und die chirurgischen Werkzeuge wie das Vitrektom, ein spezielles Saug-Schneidegerät, oder die Eckhardt-Pinzette. Zunächst werden zentrale Glaskörperanteile mittels Vitrektom freigeschnitten, um an die Netzhaut zu gelangen. Anschließend wird zur besseren Visualisierung des prämakulären Gewebes ein Farbstoff in das Auge eingegeben (z.B. Brilliant Blau). Nach erfolgreicher Entfernung prämakulären Gewebes und innerer Grenzmembran mit der Pinzette, wird eine Tamponade, aus Luft, Gas (Schwefelhexafluorid = C₂F₆) oder Silikonöl verwendet. Die Luft und das Gas entweichen durch Diffusion aus dem Auge von selbst. Das Silikonöl hingegen muss nach frühestens 3-6 Monaten wieder operativ entfernt werden. Etwaige Netzhautlöcher können intraoperativ durch eine Endolaser-Koagulation verödet werden. Nach Entfernung der Trokare wird das Auge mit einem sterilen Salbenverband abgedeckt. Je nach Diagnose und Operationsverlauf wird dem Patienten postoperativ eine bestimmte Lagerung für 2-3 Tage empfohlen.

Das entfernte prämakuläre Gewebe wird innerhalb der folgenden 24 Stunden in Paraformaldehyd (PFA) für immunhistochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen fixiert.

3.3 Methoden

Die Flachpräparation ermöglicht Zellzahl und Zellverteilung des prämakulären Gewebes sichtbar zu machen. Mit der anschließenden Fluoreszenzmikroskopie erfolgt eine Differenzierung der unterschiedlichen Zellen durch die Beurteilung des zellulären Färbeverhaltens. Mittels Elektronenmikroskopie werden ultrastrukturelle Bestandteile des prämakulären Gewebes und der inneren Grenzmembran (ILM) ausgewertet.

3.3.1 Präparateaufbereitung und Flachpräparation

Die durch pars plana Vitrektomie gewonnenen Präparate wurden direkt nach Operation in einer Lösung aus 4% Paraformaldehyd (PFA) und 0,1% Glutaraldehyd (GA) in 0,1M Phosphatpuffer (PBS) für mindestens 24 Stunden fixiert.

Für die Immunhistologie wurden die Präparate unter einem Stereomikroskop (Leica MS5, Leica Microsystems, Wetzlar) mit zwei Pinzetten stumpf in drei bis fünf möglichst gleich große Membranstücke geteilt, die dann im Folgenden mit unterschiedlichen Antikörperkombinationen beladen wurden.

Nachdem die Membranstücke für die Immunhistologie aufbereitet wurden, erfolgte mithilfe einer Glaspipette eine erneute Ausbreitung und Flachpräparation auf Objektträgern unter dem Stereomikroskop in einem Tropfen ImmunoSelect® Antifading Mounting Medium 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, AKS-38448, Dianova, Hamburg, Deutschland, Emission bei 460 nm). Zur Fixierung der Präparate auf dem Objektträger wurde ein Deckglas verwendet.

Nun wurden die Präparate mit einem modifizierten Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DM 2500, Wetzlar, Deutschland) auf Phasenkontrast, Interferenz und Immunfluoreszenz untersucht. Anschließend folgten weitere Arbeitsschritte für die Aufbereitung der Präparate für die Elektronenmikroskopie.

3.3.2 Phasenkontrast- und Interferenzmikroskopie

Die Phasenkontrastmikroskopie wurde 1935 – 1942 von F. Zernike entwickelt und eröffnete vor allem in der biologischen Mikroskopie völlig neue Möglichkeiten durch die mikroskopische Darstellung lebender, ungefärbter Objekte (Zernike, 1935). Durch die optische Kontrastanreicherungstechnik können die Strukturen der

durchscheinenden inneren Grenzmembran gut sichtbar gemacht werden. Das Licht erfährt hierbei beim Durchqueren der inneren Grenzmembran nur sehr geringe Phasenänderungen. Zur Verstärkung wird das „direkte“, nicht gebeugte Licht gegenüber dem gebeugten durch eine „Phasenplatte“ in der Phase verschoben und geschwächt. Dadurch wird eine entsprechende Amplitudenverstärkung im eingehenden Bild erreicht.

Mithilfe der Interferenzmikroskopie können unterschiedliche Dicken durchstrahlender Objekte (Durchlicht-Interferenzmikroskopie) oder Oberflächenunebenheiten (Auflicht-Interferenzmikroskopie) im Hell-Dunkel-Kontrast sichtbar gemacht werden (Spektrum Akademischer Verlag, 1999). Es entsteht ein dreidimensionales Bild des Präparates. Bei dieser Technik wird das abbildende Licht durch vorgeschaltete Prismen in zwei kohärente, räumlich getrennte Strahlenbündel aufgeteilt. Während das eine Strahlenbündel an der Oberfläche des Objektes reflektiert wird, wird das andere Strahlenbündel, auch Referenzstrahl genannt, an einer ideal ebenen Referenzfläche reflektiert (Auflicht-Interferenzmikroskopie). Wenn sich beide Strahlenbündel hinter dem Objekt wieder vereinigen, kommt es durch die Gangunterschiede zwischen Objekt- und Referenzstrahl zu einer, von der Objektdicke abhängigen, unterschiedlich starken Interferenz. So können Oberflächenunebenheiten des Präparates wie Zellkerne und Zellfortsätze des prämakulären Gewebes dargestellt werden (Spektrum Akademischer Verlag, 1999).

3.3.3 Immunhistochemie

In unseren Untersuchungen wurde das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz angewendet, bei dem charakteristischerweise primäre und sekundäre Antikörper verwendet werden. Die jeweiligen primären Antikörper dienen der Bindung an die entsprechenden Zell-/ Zielstrukturen. Zur Fluoreszenz kommen sekundäre Antikörper zum Einsatz, welche durch Licht bestimmter Wellenlänge zur spontanen Emission angeregt werden. Durch eine Bindung des sekundären Antikörpers an den primären Antikörper erfolgt die Darstellung der Zielstruktur.

Nach bereits erwähnter stumpfer Teilung der Präparate in drei bis fünf möglichst gleich große Stücke, wurden die entstandenen Membranteile in voneinander getrennten

Schälchen für „floating membranes“ zunächst zweimal mit 0,1M PBS gewaschen. Jeweils ein Teilstück wurde als Reserve wieder in PFA fixiert und gekühlt gelagert. Anschließend wurden die Membranen mittels 0,1%igem Pepsin in 0,1M PBS für zehn Minuten bei Raumtemperatur enzymatisch demaskiert. Zur Entfernung des Pepsins, wurden die Membranstücke wieder zweimalig mit PBS-Lösung für fünf Minuten gewaschen. Im Anschluss wurde die PBS-Lösung mittels Glaspipette abpipettiert und durch den Inkubationspuffer PBT ersetzt. Dieser blieb bei Raumtemperatur für maximal drei Stunden - jedoch mindestens 30 Minuten - auf den Membranen. Während der Inkubationszeit wurden die Mischungen für die verschiedenen primären Antikörper zusammengestellt. Die verwendeten primären Antikörper mit entsprechender Zielstruktur können [Tabelle 2](#) entnommen werden. Nach erfolgreicher Inkubation wurde die Lösung aus drei verschiedenen Antikörpern und PBT in die Membranschälchen gegeben und bei Raumtemperatur über Nacht leicht geschüttelt.

Anti-	Zielstruktur
α-smooth muscle actin (α-SMA)	Aktinfilamente, Myofibroblasten (Meister, 1998), (Klingberg, et al., 2013), (Zhao, et al., 2013), (Gandorfer, et al., 2014)
CD45	Hyalozyten (Gandorfer, et al., 2014), (Kingston, et al., 2014), (Kita, et al., 2014), (Zhao, et al., 2013)
CD64	Hyalozyten, Makrophagen, Monozyten (Zhao, et al., 2013), (Kita, et al., 2014), (Kingston, et al., 2014), (Gandorfer, et al., 2014)
CD68	Makrophagen, Mikroglia (Zhao, et al., 2013), KEINE Hyalozyten (Kingston, et al., 2014), (Kita, et al., 2014)
Cytokeratin-8 (CK-8)	Retinales Pigmentepithel (Sheridan, et al., 2005)
Collagen-1 (Coll-1)	Extrazelluläre Matrix (Klingberg, et al., 2013)
Emmprin/CD-147	Retinales Pigmentepithel (apikal und basolateral) (Priglinger, et al., 2013)
Galectin-1	Retinales Pigmentepithel (Plasmamembran, Zytoplasma und Nukleus) (de Freitas Zanon, et al., 2015)
Galectin-3	Retinales Pigmentepithel (Priglinger, et al., 2013), Mikroglia (Bauer, et al., 2016)
Glial fibrillary acidic protein (GFAP)	Gliazellen (Astrozyten und Müllerzellen) (Gandorfer, et al., 2014), (Zhao, et al., 2013), Hyalozyten (Gandorfer, et al., 2014)
IBA 1	Retinale Mikroglia (Bauer, et al., 2016), (Omri, et al., 2011), Makrophagen (Omri, et al., 2011)
Isolectin-B4 (ILB4)	Endothelzellen der retinalen Gefäße (Omarova, et al., 2012), (Tual-Chalot, et al., 2013), Mikroglia (Boscia, et al., 2013)
Integrin α V	Retinales Pigmentepithel (Priglinger, et al., 2013)
Integrin αV β3	Retinales Pigmentepithel (Priglinger, et al., 2013), (Hoffmann, et al., 2005), Endothelzellen bei retinaler Neovaskularisation (Friedlander, et al., 1996), (Alavi & Cheresch, 2008), (Penn, 2008),

	Fibroblasten/Myofibroblasten (Hinz, et al., 2012)
Integrin αV β5	Retinales Pigmentepithel (Hoffmann, et al., 2005), (Priglinger, et al., 2013), Endothelzellen bei retinaler Neovaskularisation (Penn, 2008), (Friedlander, et al., 1996), Fibroblasten/Myofibroblasten (Hinz, et al., 2012)
Ricinus communis agglutinin-I (RCA I)	Endothelzellen der retinalen Blutgefäße (Blanks & Johnson, 1984), Mikrovilli und Phagosomen der RPE-Zellen (Koide, et al., 1986), Immunzellen (Mikroglia und Makrophagen) (Oberstein, et al., 2011), innere und äußere Segmente der Zapfen (Blanks & Johnson, 1984), äußere Segmente der Stäbchen (Blanks & Johnson, 1984), innere und äußere Grenzmembran (ILM bzw. OLM) (Blanks & Johnson, 1984)
Transforming growth factor β (TGF-β)	Extrazelluläre Matrix (Klingberg, et al., 2013), Myofibroblasten (Bochaton-Paillat, et al., 2000)
Ulex europaeus agglutinin I (UEA I)	Endothelzellen (Holthöfer, et al., 1982), Epithelzellen (Holthöfer, et al., 1982), (Khaled, 2013), innere Segmente der Zapfen und Stäbchen (in Affenaugen) (Khaled, 2013)

Tabelle 2: Auflistung verwendeter primärer Antikörper und ihrer Zielstruktur.

Am darauffolgenden Tag wurde die Antikörperlösung wieder abpipettiert und die Membranen mit 0,1M PBS dreimal für je zehn Minuten gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Membranen mit den sekundären Antikörpern Cy-2, Cy-3 und Cy-5 lichtgeschützt im dunklen Raum für zwei Stunden inkubiert. Das Mischverhältnis zwischen 0,1M PBS und Antikörpers betrug 1:100. Bevor die dreifach markierten Membranen nun auf Objektträgern ausgebreitet und zusätzlich mit DAPI gefärbt wurden, wurden sie noch viermal mit 0,1M PBS (pH = 7,4) für je zehn Minuten gewaschen. Alle verwendeten Arbeitsschritte können [Abbildung 15](#) entnommen werden.

Arbeitsprotokoll für Immunfluoreszenz an floating Membranen

- waschen in 0,1 M **PBS** (pH 7.4) 2 x
- enzymatische Demaskierung: 10 min RT
 => 0,1% **Pepsin** in 0,1M PBS-Puffer
- waschen in 0,1 M **PBS** (pH 7.4) 2 x
- **Inkubationspuffer (PBT)** 30 min – 3h
 => 0,1M PBS; 6% BSA; 0,1% Triton-X; (0.1% Na-Azid evtl)
- **1. AK** in **PBT** dreifach-Markierung ÜN – RT
- waschen in 0,1 M **PBS** (pH 7.4) 3 x 10 min
- **2. AK** (1:100) in 0,1 M **PBS** dreifach-Markierung 2 h
- waschen in 0,1 M **PBS** (pH 7.4) 4 x 10 min

- auf Objektträger ziehen, mit **DAPI** Mountain-Medium eindeckeln und fotografieren

	1. Antikörper (1:50)			2. Antikörper (1:100)			Zellkern
1	Integrin αV β5	α-SMA	Ricinus	Cy3	Cy2	Cy5	DAPI
2	α-SMA	Integrin αV	Emmprin	Cy3	Cy2	Cy5	DAPI
3	Integrin αV β3	α-SMA	Coll 1	Cy3	Cy2	Cy5	DAPI
4	α-SMA	IBA 1	CD45	Cy3	Cy2	Cy5	DAPI

RT: Raumtemperatur; ÜN: über Nacht

Abbildung 15: verwendetes Arbeitsprotokoll für Immunfluoreszenz an floating Membranen. Die dargestellte Antikörperkombination dient als Beispiel.

Zur Dokumentation wurden die Präparate mittels Fluoreszenzmikroskop analysiert und im .jpg-Format gespeichert, um die Zellverteilung und das Färbeverhalten der Zellen zu erfassen und auszuwerten.

Zunächst wurde von allen Präparaten eine Übersichtsaufnahme bei 5-facher Vergrößerung aufgenommen. War das Präparat größer, wurde es in Abschnitten fotografiert, deren Bilder anschließend zu einem Gesamtbild zusammengefügt wurden. Um die Details hervorzuheben, wurde danach bei jedem Präparat eine 10-fache, 20-fache und 40-fache Vergrößerung durchgeführt. Auch hier wurde möglichst das gesamte Präparat fotografiert, um es im Nachhinein zu einem Bild zusammensetzen zu können. Von allen Einstellungen wurden eine Phasenkontrast-, eine Interferenz- und vier Fluoreszenzaufnahmen gemacht. Die vier verschiedenen Fluoreszenzaufnahmen benötigte man, da die Präparate zuvor mit drei verschiedenen ersten und den zugehörigen zweiten Antikörpern markiert wurden. Für die Antikörperverbindungen kamen Fluoreszenzfilter der Wellenlängen 508 nm (Cy-2), 570 nm (Cy-3) und 670 nm (Cy-5) zum Einsatz. Die vierte Aufnahme benötigte einen Filter der Wellenlänge 460 nm, um die mit DAPI eingefärbten Zellkerne sichtbar zu machen. Insgesamt wurden von jeder Einstellung also sechs Aufnahmen gemacht.

3.3.4 Elektronenmikroskopie

Die Präparate, die ebenfalls unter dem Elektronenmikroskop betrachtet wurden, erhielten vor der Betrachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop zusätzlich eine fünfminütige Postfixierung in 2%igem Glutaraldehyd (GA) in 0,1M PBS und wurden im Anschluss dreimal für je fünf Minuten mit 0,1M PBS gewaschen. Nach der Betrachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Präparate vorsichtig mit PBS von den Objektträgern gelöst und über Nacht in mit PBS-gefüllten Rollrandgläschen aufbewahrt. Im nächsten Schritt wurden die Präparate für eine Stunde in eine 1%ige Osmium-Lösung nach Dalton gegeben und anschließend zweimal mit 0,1M PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Präparate für eine weitere Stunde in 1% Uranylacetat in destilliertem Wasser transferiert, bevor sie für dreimal fünf Minuten durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert wurden. Zuletzt erfolgte die Einbettung in EPON und das Zuschneiden der Präparate für die

Elektronenmikroskopie. Die einzelnen Arbeitsschritte können [Abbildung 16](#) entnommen werden.

Arbeitsprotokoll für Elektronenmikroskopie an floating Membranen	
• Postfixierung mit 2% GA in 0,1M PBS	5 min
• Waschen mit 0,1M PBS	3 x 5 min
• auf Objektträger ziehen, mit DAPI Mountain-Medium eindeckeln und mit Fluoreszenzmikroskop fotografieren	
• Präparat vom Objektträger mit PBS lösen und in ein Rollrandgläschen mit PBS transferieren, kann über Nacht bis einige Tage im KS stehen	
• waschen in 0,1M PBS (pH 7.4)	2 x bis über Nacht
• 1% Osmium nach Dalton	1h
• waschen in 0,1M PBS (pH 7.4)	2 x
• 1% Uranylacetat in Aqua dest	1h
• Dehydrierung mit aufsteigender Ethanolreihe (30% - 100% ETH)	3 x 5 min
• Einbettung in EPON	

Abbildung 16: Verwendetes Arbeitsprotokoll für Elektronenmikroskopie an floating Membranen.

Die Elektronenmikroskopie dient der ultrastrukturellen Analyse verschiedener Zellen und extrazellulärer Bestandteile prämakulärer Membranen. Die Aufnahmen wurden in 3000- bis 30000-facher Vergrößerung aufgenommen und im .jpg-Format gespeichert. Die Präparate wurden speziell nach den unterschiedlichen Zelltypen wie Hyalozyten, Myofibroblasten, Fibroblasten und Zellen des retinalen Pigmentepithels sowie deren Lokalisation (z.B. direkt auf der inneren Grenzmembran) untersucht. Dementsprechend wurde auch notiert, ob innere Grenzmembran vorlag. Weitere Merkmale waren die Anzahl der Zellschichten (monolayer, multilayer) und das Vorhandensein von extrazellulären Bestandteilen wie Kollagensträngen, neu gebildetem Kollagen und fibrillären Kollagenpräzipitaten.

Eine Übersicht über die verschiedenen Erkennungsmerkmale der Zell- und Kollagenkomponenten prämakulärer Membranen gibt [Tabelle 3](#).

Zell- und Kollagenkomponenten	Ultrastrukturelle Charakteristika
Zelltypen	
Fibröse Astrozyten	<ul style="list-style-type: none"> • Intrazytoplasmatische, 10 nm dicke Intermediärfilamente • Polarisierung mit Basalmembran • Junktionale Komplexe
Fibroblasten	<ul style="list-style-type: none"> • Massen an rauem endoplasmatischem Retikulum • Prominente Golgi-Komplexe • Fusiformer Zellkern und Zellkörper
Hyalozyten	<ul style="list-style-type: none"> • Lobulärer Zellkern • Vakuolen, Vesikel und Mitochondrien • Zellausläufer • Ausgeprägter Golgi-Apparat • Raues und glattes endoplasmatisches Retikulum
Makrophagen	<ul style="list-style-type: none"> • Multiple pleomorphe intrazytoplasmatische Vesikel • Irregulärer Zellkern
Myofibroblasten	<ul style="list-style-type: none"> • Subplasmalemmale Aggregate zytoplasmatischer Filamente (5-7 nm) • Raues endoplasmatisches Retikulum • Fusiformer Zellkern und Zellkörper
Retinale Pigmentepithelzellen	<ul style="list-style-type: none"> • Intrazytoplasmatische Melaningranula • Polarisierung und Mikrovilli
Kollagentypen	

Fibrilläre Kollagenpräzipitate	<ul style="list-style-type: none"> • Kollagenfibrillen mit Periodizität >> 67 nm (natives Kollagen: Periodizität = 67 nm) • Fibrillendurchmesser ~150 nm • Bandenmuster mit Periodizität von 100-150 nm, aber auch 250 nm (Paige, et al., 1998) • Kombination aus Kollagenfibrillen mit Proteoglykanen oder Glykoproteinen (Ghadially, 2013)
Glaskörperkollagen	<ul style="list-style-type: none"> • Fibrillendurchmesser: 10-16 nm • Periodizität: 22 nm, regelmäßige Anordnung
Kollagenstränge	<ul style="list-style-type: none"> • Bündel aus Kollagenfibrillen (Durchmesser: 2-20 µm) (Lüllmann-Rauch, 2009) • Dicke variiert mit Anzahl und Art der Kollagenfibrillen
Neu gebildetes Kollagen	<ul style="list-style-type: none"> • Fibrillendurchmesser: >16 nm • Periodizität: >22 nm, irreguläre Anordnung

Tabelle 3: In prämakulären Membranen vorhandene Zell- und Kollagentypen und ihre ultrastrukturellen Charakteristika (modifiziert nach (Gandorfer, et al. 2014), (Schumann, et al., 2015)).

3.3.5 Auswertung

Im Anschluss an die jeweilige Fotodokumentation wurden die aufgenommenen Bilder ausgewertet. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden hinsichtlich der Reaktion beurteilt, die elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Hinblick auf zelluläre und extrazelluläre Strukturen.

Als erstes wurde das Zellverteilungsmuster dokumentiert. Dieses konnte homogen verteilt oder sehr dicht gepackt (Cluster-förmig) sein. Nach diesem Beurteilungsmuster wurden alle 2680 Fluoreszenzaufnahmen ausgewertet. Die Aufnahmen in den Modi Phase und Interferenz dienten der Beurteilung der Membranbeschaffenheit und dem Entdecken eventueller Verunreinigungen.

Die Fluoreszenzaufnahmen wurden nach der Beurteilungsskala von „-“ über „(+“ über „+“ bis hin zu „++“ entsprechend der Reaktion auf den verwendeten Antikörper bewertet. Zeigte der Antikörper keinerlei positive Reaktion mit Zellstrukturen, wurde das Präparat mit einem „-“ gekennzeichnet. Fand sich eine leicht positive Reaktion - wenn auch nur schwach – bekam das Präparat die Bewertung „(+“ . War eine deutlich positive Reaktion zu erkennen, wurde das Präparat mit „+“ bewertet. Bei außerordentlich starker positiver Reaktion kam die Bewertung „++“ zum Einsatz.

Bei der Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde der Fokus auf vorhandene, zelluläre und extrazelluläre sichtbare Strukturen gelegt, wie bereits oben beschrieben. Je nachdem wie ausgeprägt und häufig diese vorkamen, wurde ihr Erscheinen mit der Bewertung „-“, „(+“, „+“ oder „++“ versehen.

Die Auswertung der demographischen Daten erfolgte mit SPSS (SPSS Statistics, Version 23.0.0.0, IBM™ Company, Chicago, USA).

3.4 Material

3.4.1 Reagenzien und Rezepturen

4% Paraformaldehyd in 0,1M Phosphatgepufferter Salzlösung mit 0,1% Glutaraldehyd

Die Lösung aus 4% Paraformaldehyd in 0,1M Phosphatgepufferter Salzlösung mit 0,1% Glutaraldehyd diente zur Fixierung der operativ entfernten prämakulären Membran-Präparate.

Sie wurde nach folgendem Schema hergestellt: Im ersten Schritt wurden 2g Paraformaldehyd (MERCK 104005) in 20ml 0,1M PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, engl.: phosphate buffered saline; pH 7,4, hergestellt in hausinterner Apotheke) unter leichtem Rühren erhitzt, wobei die Temperatur von 80°C nicht überschritten werden sollte. Erst als die Lösung klar war, wurde mit dem Rühren aufgehört. Nun wurde die klare Lösung mit dem bereits zuvor verwendeten 0,1M PBS auf 50 ml aufgefüllt und mittels doppeltem Faltenfilter filtriert. Im letzten Schritt wurden der Lösung noch 200µl einer 25%igen Glutaraldehyd-Lösung (FLUKA 49626) hinzugegeben. Das Fixans war nun fertig und konnte für 14 Tage bei 4°C gelagert und verwendet werden, bevor es verworfen wurde.

0,1M PBS Lösung

Zur Aufbereitung der Membranpräparate wurden die Reagenzien 0,1M PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, engl.: phosphate buffered saline; pH 7,4) aus der hausinternen Apotheke und der Inkubationspuffer PBT (0,1M PBS; 6% BSA; 0,1% Triton-X-100 und eventuell 0,1% Na-Azid) verwendet. Die Inhaltsstoffe des Phosphatpuffers 0,1 mol/L (0,1M PBS) sind di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 14,42g, Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat 2,52g und gereinigtes Wasser zu 1000ml. Der pH-Wert von 7,4 wurde dabei mit Natronlauge oder Salzsäure eingestellt.

EPON Ansatz

Der für die Elektronenmikroskopie benötigte EPON-Ansatz wurde wie folgt angesetzt: 9ml Lösung A, 21ml Lösung B und 0,6ml DMP 30 (2%; SERVA 36975). Lösung A setzt sich wiederum aus 62ml Epon 812 (SERVA 21045) und 100ml DDSA (SERVA 20755)

zusammen. Die Inhaltsstoffe der Lösung B sind 100ml Epon 812 (SERVA 21045) und 89ml MNA (SERVA 29452).

Daltons Fixierung

Die verwendete Daltons Fixierung besteht aus 20ml Osmium 2% (OsO₄), 10ml Kalium-Dichromat-KOH 4% (K₂Cr₂O₇), 4ml NaCl 3,4%, 4ml CaCl₂ 1% und 2ml destilliertes Wasser. Die Gesamtmenge der so angesetzten Lösung beträgt dann 40ml.

3.4.2 Immunmarkierungen

Folgende primäre Antikörper fanden Verwendung: **α-smooth muscle actin (α-SMA)** (Mausantikörper, sc-130617, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), **α-SMA** (Kaninchenantikörper, GTX100034, GeneTex, Irvine, USA), **CD45** (Ziegenantikörper, sc-1123, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), **CD64** (Kaninchenantikörper, sc-15364, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), **CD68** (Kaninchenantikörper, sc-9139, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), **Zytokeratin-8 (CK-8)** (Mausantikörper, C5301, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) **Kollagen-1** (Ziegenantikörper, sc-25974, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), **Emmprin/CD-147** (Ziegenantikörper, AF972, R&D Systems, Minneapolis, USA), **Galectin-1** (Mausantikörper, AF1245, R&D Systems, Minneapolis, USA), **Galectin-3** (Mausantikörper, ab7278, ABCAM, Cambridge, UK), **Galectin-3** (Kaninchenantikörper, 5661/31114, LifeSpan BioSciences, Seattle, USA), **glial fibrillary acidic protein (GFAP)** (Mausantikörper, sc-9973, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), **GFAP** (Ziegenantikörper, sc-6870, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA), **IBA 1** (Kaninchenantikörper, 019-19741, Wako Laboratory Chemicals, Neuss, Germany), **Isolectin-B4** (L 2140, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), **Integrin αV** (Kaninchenantikörper, ab 117611, ABCAM, Cambridge, UK), **Integrin αVβ3** (Mausantikörper, ab78289, ABCAM, Cambridge, UK), **Integrin αVβ5** (Mausantikörper, ab24694, ABCAM, Cambridge, UK), **ulex europaeus agglutinin I (UEA I)** (Kaninchenantikörper, LS-C141334, LifeSpan BioSciences, Seattle, USA), **ricinus communis agglutinin I (RCA I)** (Ziegenantikörper, AS-2084, Vector Laboratories, Burlingame, USA) und **transforming growth factor β (TGF-β)** (Mausantikörper, MAB1835, R&D Systems, Minneapolis, USA).

Die Verdünnungen der primären Antikörper variierten je nach Hersteller und Antikörpertyp. Alle Antikörper wurden jedoch mit PBT verdünnt, welches auch als Inkubationspuffer diente.

Mit den insgesamt 20 verschiedenen Antikörpern wurden für die Experimente sechs unterschiedliche Verdünnungen hergestellt. Die nachfolgende [Tabelle 4](#) listet die Antikörper geordnet nach angewandter Verdünnung auf.

1:10	1:50	1:100	1:200	1:250	1:500
RCA I	Kollagen-1	α -SMA (rb)	UEA I	IBA-1	Integrin α V β 3
Emmprin	CD-45	Cy-2	Zytokeratin-8		Integrin α V β 5
Galectin-3 (mo)	CD-64	Cy-3			
Galectin-1	α -SMA (mo)	Cy-5			
	Integrin α V				
	Galectin-3 (rb)				
	Isolectin B4				
	TGF- β				
	CD-68				
	GFAP				

Tabelle 4: Verdünnungen verwendeter primären Antikörper mit PBT.

Als sekundäre Antikörper wurden **Cy2** (Kaninchenantikörper, benötigte Wellenlänge: 508 nm, fluoreszierende Farbe: grün, 715-225-150, Dianova, Hamburg, Germany), **Cy3** (Mausantikörper, benötigte Wellenlänge: 570 nm, fluoreszierende Farbe: rot, 715-165-150, Dianova, Hamburg, Germany) und **Cy5** (Ziegenantikörper, benötigte Wellenlänge: 670 nm, fluoreszierende Farbe: infrarot, 705-175-003, Dianova, Hamburg, Germany) verwendet. [Tabelle 5](#) stellt eine Übersicht der verwendeten sekundären Antikörper dar.

Sekundär Antikörper	Art des gebundenen primären Antikörpers	Benötigte Wellenlänge für Emission	Fluoreszierende Farbe
Cy2 (rb) Dianova 715-225-150	Kaninchenantikörper	508nm	Grüne Farbe
Cy3 (mo) Dianova 715-165-150	Mausantikörper	570nm	Rote Farbe
Cy5 (goat) Dianova 705-175-003	Ziegenantikörper	670nm	Infrarote Farbe

Tabelle 5: Verwendete sekundäre Antikörper und ihre Eigenschaften.

Zur Darstellung der Zellkerne kam der fluoreszierende Zellkernfarbstoff „**4',6-Diamidin-2-phenylindol**“ (DAPI, AKS-38448, Dianova, Hamburg, Germany) zum Einsatz. Insbesondere im Hinblick auf die Auswertung der Immunfluoreszenzbilder ist es hilfreich die Lokalisation der Zellkerne genau zuordnen zu können.

3.4.3 Geräte

Für die Aufbereitung, Weiterverarbeitung und Auswertung der Präparate kamen die nachfolgend genannten Geräte und Computerprogramme zum Einsatz:

- Fluoreszenzmikroskop DM 2500 von Leica (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) mit Mikroskop-Kamera von ProgRes® CF (Jenoptik Optical Systems, Jena)
- Stereomikroskop MS5 von Leica (Leica Microsystems, Wetzlar)
- Transmissions-Elektronenmikroskop EM900 von Zeiss (Carl Zeiss Microscopy, Jena) mit Frame-Transfer-CCD-Kamera von TRS
- Rüttler IKA-VIBRAX-VXR (IKA-Werke, Staufen)
- Grant-bio Vortex Mixer PV-1 (Grant Instruments, Cambridge, United Kingdom)
- Zentrifuge MiniSpin® (Eppendorf, Hamburg)
- Diamantmesser Ultracut R von Leica (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar)
- Standardmikroskop 473012 – 9901 von Zeiss (Carl Zeiss Microscopy, Jena)
- Kühl- und Gefrierschrank (Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe)
- Pipetten Research® in Größen 0,5-10µl, 10-100µl, 50-500µl, 100-1000µl (Eppendorf, Hamburg)
- Pipetten Reference® in Größen 2-20µl und 50-200µl (Eppendorf, Hamburg)
- SuperFrost™ Objektträger (Menzel, Braunschweig)
- Computer-Programm ProgRes® CapturePro 2.8.8 (Jenoptik Optical Systems, Jena)
- Computer-Programm ImageSP
- Bildbearbeitungsprogramm PhotoScape X Version 2.4.1 (MOOII TECH, Seoul, South Korea)
- Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop® CS6 (Adobe Systems GmbH, München)
- SPSS (SPSS Statistics, Version 23.0.0.0, IBM™ Company, Chicago, USA)
- Glasplatten mit 12 Vertiefungen #2417 von Wagner & Munz (Wagner & Munz GmbH, München)

- Hexagonale 200 mesh Kupfer-Grids von Plano (G2450C; Plano GmbH, Wetzlar)

4 Ergebnisse

In diese immunozytochemische und ultrastrukturelle Analyse wurden 28 Augen von 28 Patienten eingeschlossen. Von den 28 Augen wurde bei 16 Augen die Diagnose idiopathische epiretinale Gliose und bei 12 Augen die Diagnose proliferative Vitreoretinopathie gestellt.

4.1 Idiopathische epiretinale Gliose

Von den 16 eingeschlossenen Augen mit idiopathischer epiretinale Gliose wurden 9 rechte Augen und 7 linke Augen operiert und untersucht. Das Alter der 16 Patienten mit idiopathischer epiretinale Gliose betrug zum Zeitpunkt der Operation im Mittel 74 ± 9 SD Jahre (Median: 75,5 Jahre; min - max: 57 - 88 Jahre). Es waren 5 weibliche und 11 männliche Patienten betroffen.

Die präoperative bestkorrigierte Sehschärfe betrug im Mittel $0,49 \pm 0,14$ SD logMAR. Nach Operation zeigte sich ein Visus von $0,29 \pm 0,31$ SD logMAR. Der postoperative Sehschärfeanstieg war nicht signifikant (Wilcoxon Test, $p = 0,105$). Jedoch konnte bei 7 Patienten wegen fehlender Kontrolluntersuchungen die Sehschärfe nicht nachverfolgt werden. Von den 9 nachverfolgten Patienten lag der mittlere Nachbeobachtungszeitraum bei 18 ± 4 SD Monaten. Es zeigte sich bei 8 Patienten eine Visusverbesserung. Nur ein Patient wies eine Sehverschlechterung nach Operation auf. Die Darstellung des Patientenkollektivs ist [Tabelle 6](#) zu entnehmen.

Patient	G	A	S	OP-Datum	Visus in logMAR	
					präOP	postOP
1	m	88	LA	28.08.14	0.5	0.3
2	m	64	LA	17.09.14	0.7	-
3	w	82	LA	04.11.14	0.6	-
4	w	80	RA	11.11.14	0.6	0.4
5	m	62	RA	16.12.14	0.4	0.0
6	m	80	LA	03.02.15	0.4	0.2
7	m	76	RA	03.02.15	0.5	0.4
8	m	80	RA	03.02.15	0.5	-
9	w	85	LA	10.02.15	0.4	-
10	m	72	LA	03.03.15	0.3	-
11	m	57	RA	04.03.15	0.5	1.0
12	m	75	RA	10.03.15	0.4	0.0
13	w	63	RA	13.03.15	0.7	0.3
14	m	81	RA	24.03.15	0.7	-
15	m	73	RA	02.04.15	0.5	-
16	w	66	LA	09.04.15	0.2	0.0

Tabelle 6: Darstellung des Patientenkollektivs mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose G: Geschlecht (m: männlich; w: weiblich), A: Alter zum Zeitpunkt der Operation in Jahren, S: operierte Seite (RA: rechtes Auge; LA: linkes Auge), -: keine Verlaufssehschärfe vorhanden.

4.1.1 Analyse der Zellverteilung und Zellzahl

Die operativ entfernten prämakulären Membranen zeigten unterschiedliche Zellverteilungsmuster. In 9 der insgesamt 16 Membranen (56%) waren die Zellen homogen verteilt. Homogen verteilt bedeutet eine gleichmäßige Ausbreitung der Zellen über die gesamte Membran. In den anderen 7 Präparaten (44%) zeigten sich Clusterformationen. Von Zellcluster spricht man, wenn sich die Zellen zu teils sehr dicht beieinanderliegenden Zellgruppen zusammen lagern. [Abbildung 17](#) zeigt die verschiedenen Zellverteilungsmuster.

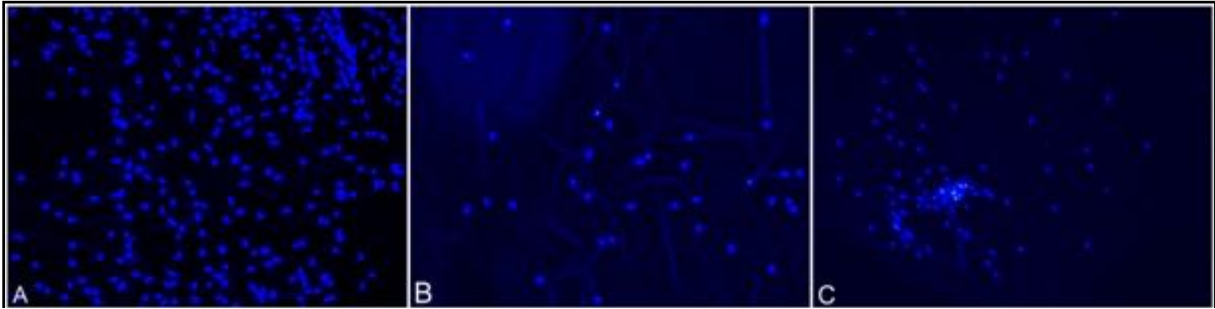


Abbildung 17: Muster verschiedener Zellverteilungen. A) und B) Formen homogener Zellverteilungen. C) Zellcluster als Form inhomogener Zellverteilung. (Vergrößerung A 20-fach, B und C 10-fach).

Die Mehrheit der Präparate bei idiopathischer epiretinale Gliose zeigten viele Zellen, die sich dicht nebeneinander ansiedelten. Eine solche Anordnung wird ‚single layer‘ genannt.

4.1.2 Analyse Zell-spezifischer Antigene

Die Präparate der 16 Augen mit idiopathischer epiretinale Gliose wurden auf 18 verschiedene Antikörper getestet.

Eine starke positive Reaktion zeigte sich für **anti- α -SMA**. Dies zeigt [Abbildung 18](#). Anti- α -SMA stellt ein Myofibroblasten-Marker dar, der an intrazelluläre Aktinfilamente bindet.

Auch für den Mikroglia-Marker **anti-ILB 4** zeigte sich eine deutlich positive Reaktion. Zudem waren die Integrin-Marker **anti-Integrin α V**, **anti-Integrin α V β 3** und **anti-Integrin α V β 5** positiv.

Weitere positive Reaktionen wurden für die **Galectine 1** und **3**, den RPE-Zell-Marker **anti-Emmprin**, den Gliazell-Marker **anti-GFAP**, den Mikroglia-Marker **anti-IBA 1**, den Endothelzell- und Epithelzell-Marker **anti-UEA I**, den RPE-Zell- und Immunzell-Marker **anti-RCA I** sowie die Hyalozyten-Marker **anti-CD45** und **anti-CD64** dokumentiert.

Die Marker für extrazelluläre Matrix, wie der Kollagen-Marker **anti-Kollagen-1** und **anti-TGF- β** , wurden hingegen nur in vereinzelten Präparaten positiv dokumentiert.

Die nachfolgenden [Abbildungen 18 - 25](#) zeigen einige der gefärbten primären Antikörper in Kombination mit dem Zellkernfarbstoff DAPI.

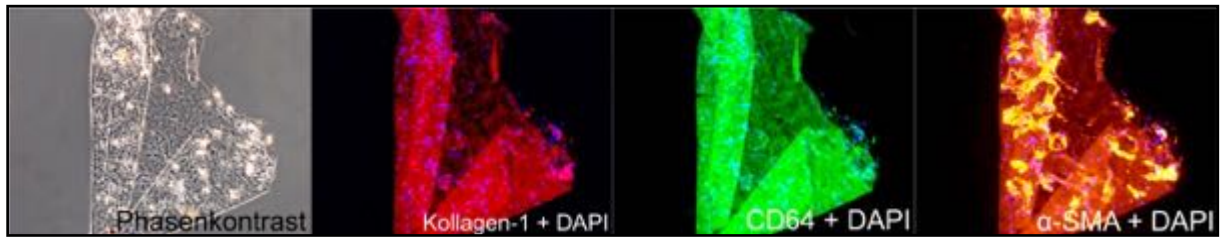


Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 10-fach).

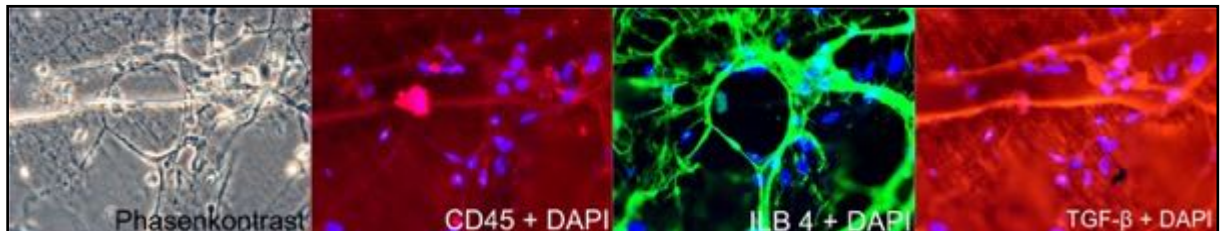


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 40-fach).

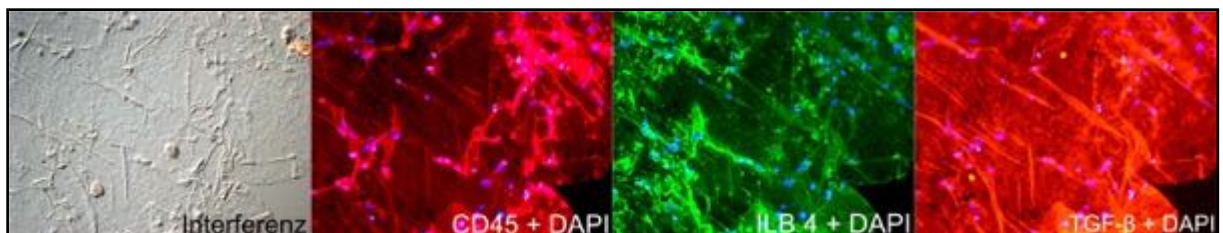


Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 20-fach).

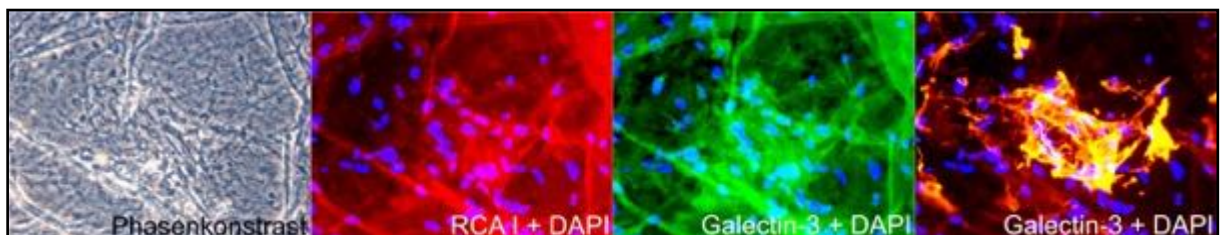


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 40-fach).

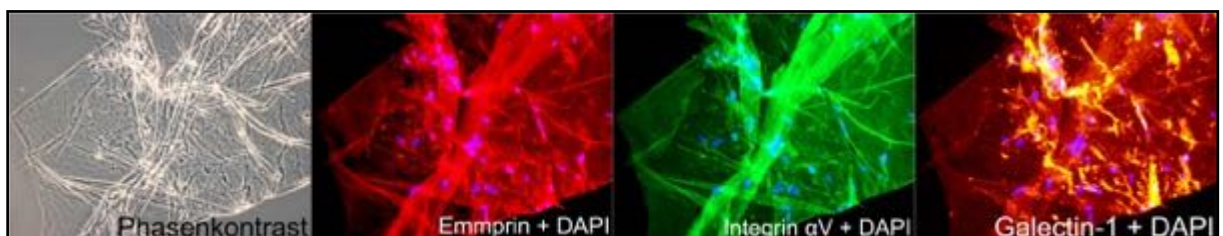


Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 20-fach).

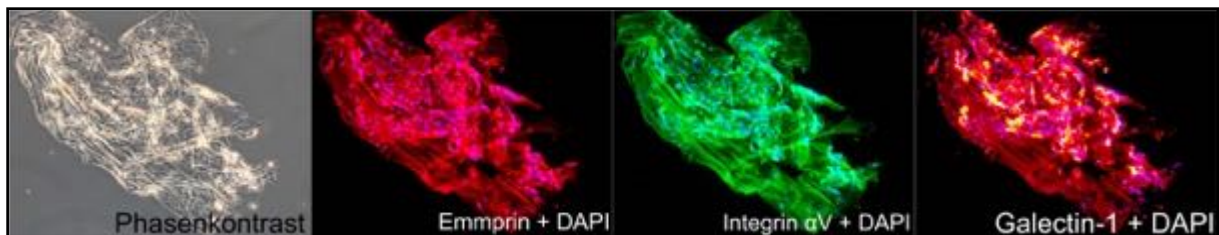


Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 10-fach).

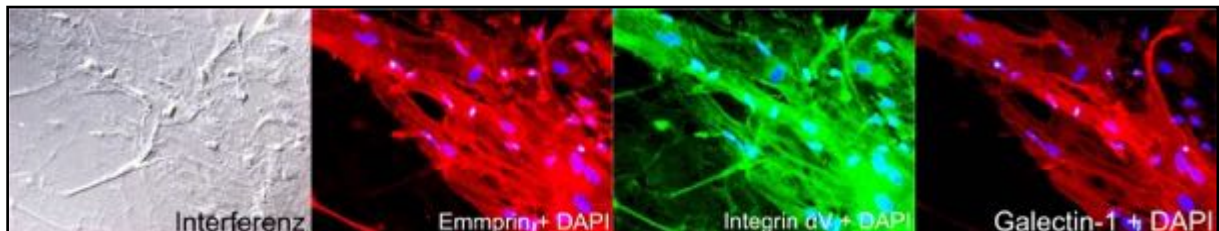


Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 40-fach).

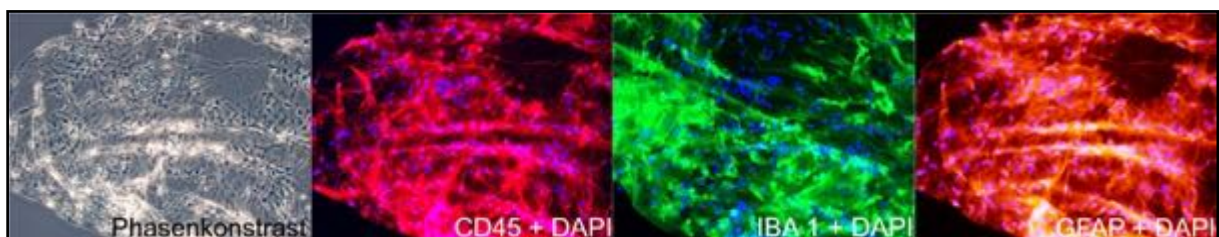


Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 20-fach).

Kolokalisationen

Einige Antikörper wiesen ähnliche Anfärbemuster auf. Für den Myofibroblasten-Marker **anti-α-SMA** konnten Kolokalisationen mit **anti-Integrin αV β5** (Marker für RPE-Zellen, Fibroblasten und Myofibroblasten), **anti-Integrin αV** (RPE-Zell-Marker), **anti-RCA I** (RPE-Zell- und Immunzell-Marker), **anti-Emmprin** (RPE-Zell-Marker), **anti-Kollagen-1** (Marker für extrazelluläre Matrix) und **anti-CD64** (Hyalozyten-Marker) nachgewiesen werden. Außerdem zeigten die primären Antikörper **anti-Galectin-3** und **anti-RCA I**, **anti-Emmprin** und **anti-Integrin αV**, **anti-Galectin-3** und **anti-UEA I** ähnliche Anfärbemuster.

Die folgenden [Abbildungen 26 – 35](#) stellen Beispiele für die oben genannten die Kolokalisationen dar.

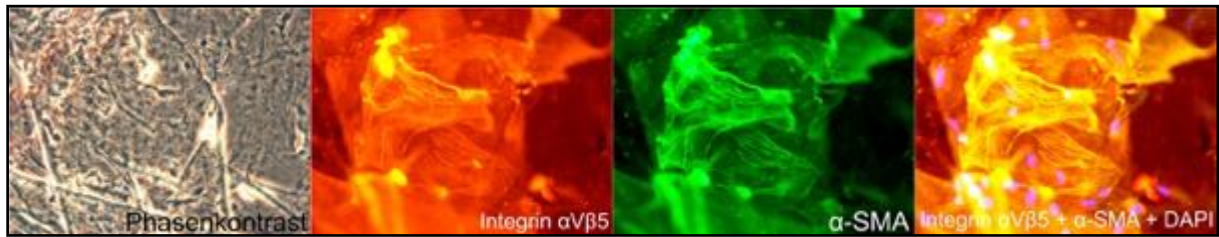


Abbildung 26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-Integrin $\alpha V \beta 5$ und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 40-fach).

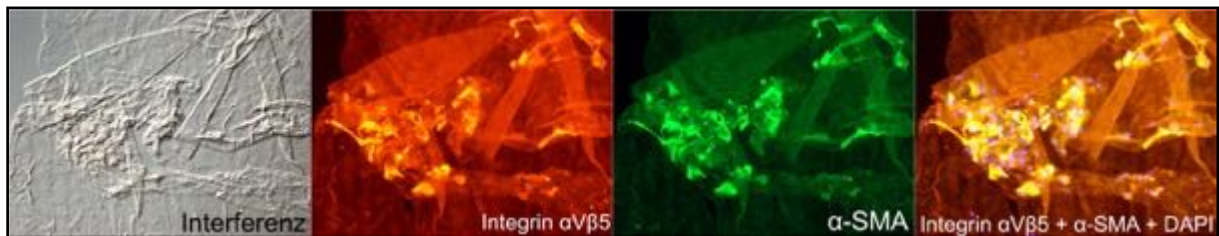


Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-Integrin $\alpha V \beta 5$ und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 20-fach).

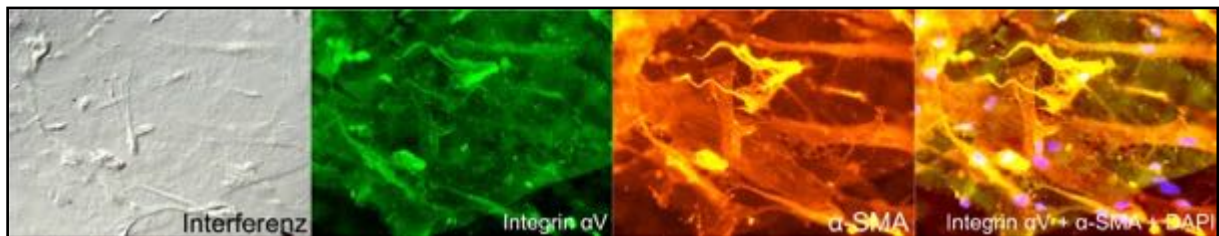


Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-Integrin αV und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 40-fach).

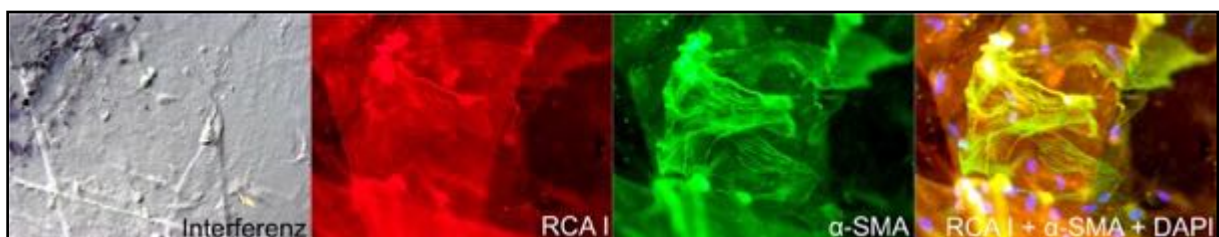


Abbildung 29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-RCA I und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 40-fach).

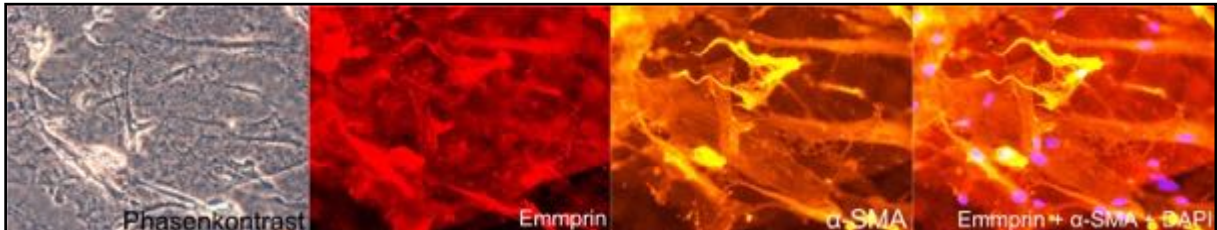


Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-Emmprin und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 40-fach).

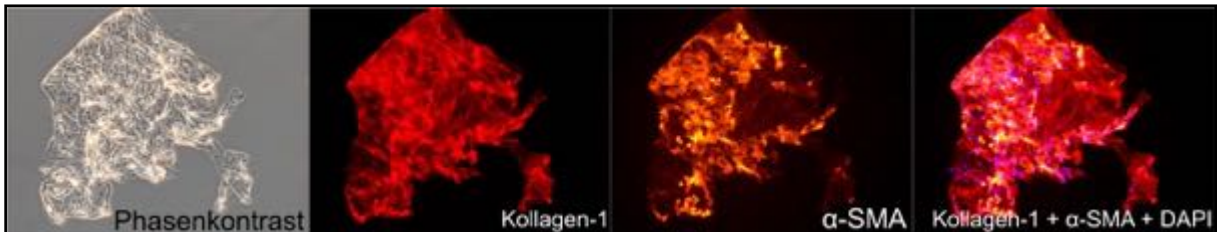


Abbildung 31: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-Kollagen-1 und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 10-fach).

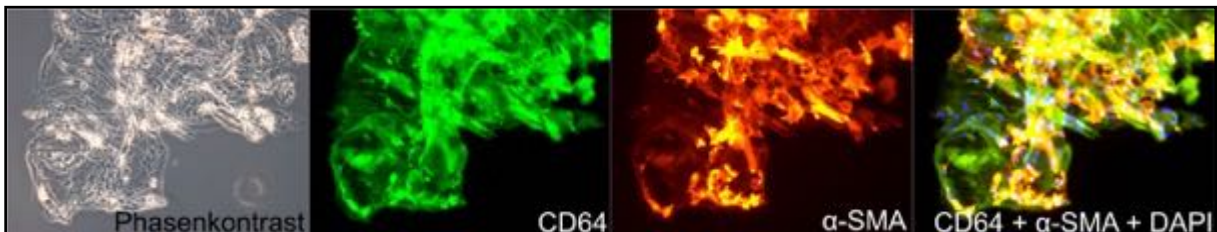


Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-CD64 und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 20-fach).

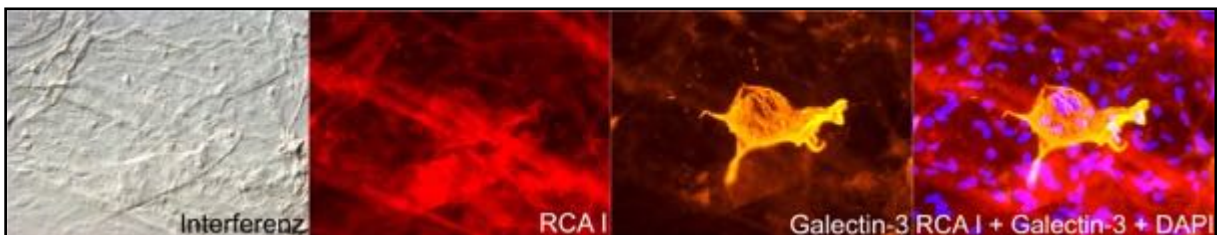


Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-RCA I und anti-Galectin-3. (Vergrößerung: 40-fach).

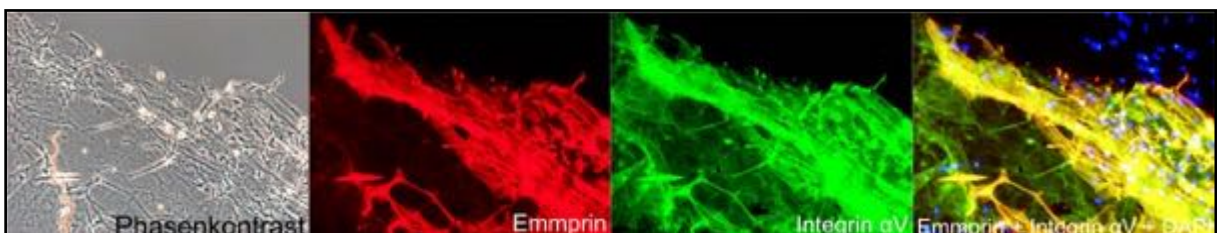


Abbildung 34: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-Emmprin und anti-Integrin α V. (Vergrößerung: 20-fach).

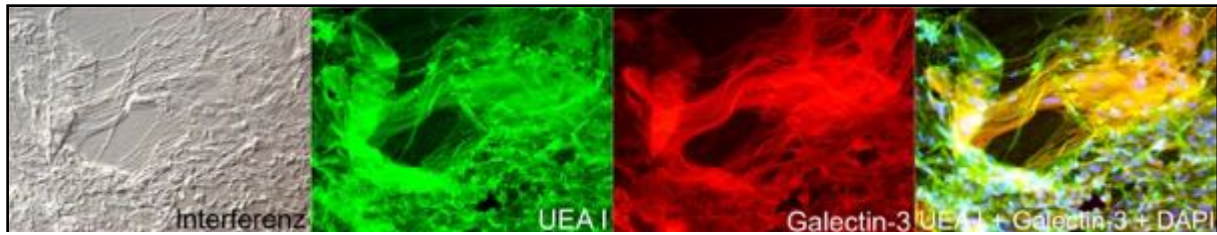


Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-UEA I und anti-Galectin-3. (Vergrößerung: 20-fach).

4.1.3 Analyse ultrastruktureller Bestandteile

Eine Beurteilung zellulärer und extrazellulärer Bestandteile erfolgte bei 16 Präparaten von 4 Patienten mittels Elektronenmikroskopie.

In allen elektronenmikroskopisch untersuchten Präparaten mit idiopathischer epiretinale Gliose lies sich die innere Grenzmembran darstellen. Bei 3 der 4 untersuchten Membranen (75%) konnten Zellen, die sich direkt auf der inneren Grenzmembran befanden, nachgewiesen werden. Dies entspricht einer idiopathischen epiretinale Gliose Typ 2. Bei den übrigen Membranen (25%) zeigte sich zwischen aufgelagerten Zellen und innerer Grenzmembran eine dichte Kollagenschicht, wie bei Typ 1.

Der dominierende Zelltyp in Präparaten bei idiopathischer epiretinale Gliose waren kontraktile Myofibroblasten. Diese sind charakterisiert durch subplasmalemmale Aggregate zytoplasmatischer Filamente, viel raues endoplasmatisches Retikulum und einen fusiformen Zellkern und Zellkörper. Myofibroblasten konnten in allen Präparaten gefunden werden. [Abbildung 36](#) zeigt einen typischen Myofibroblasten, der die darunterliegende Kollagenschicht in deutliche Falten zieht.

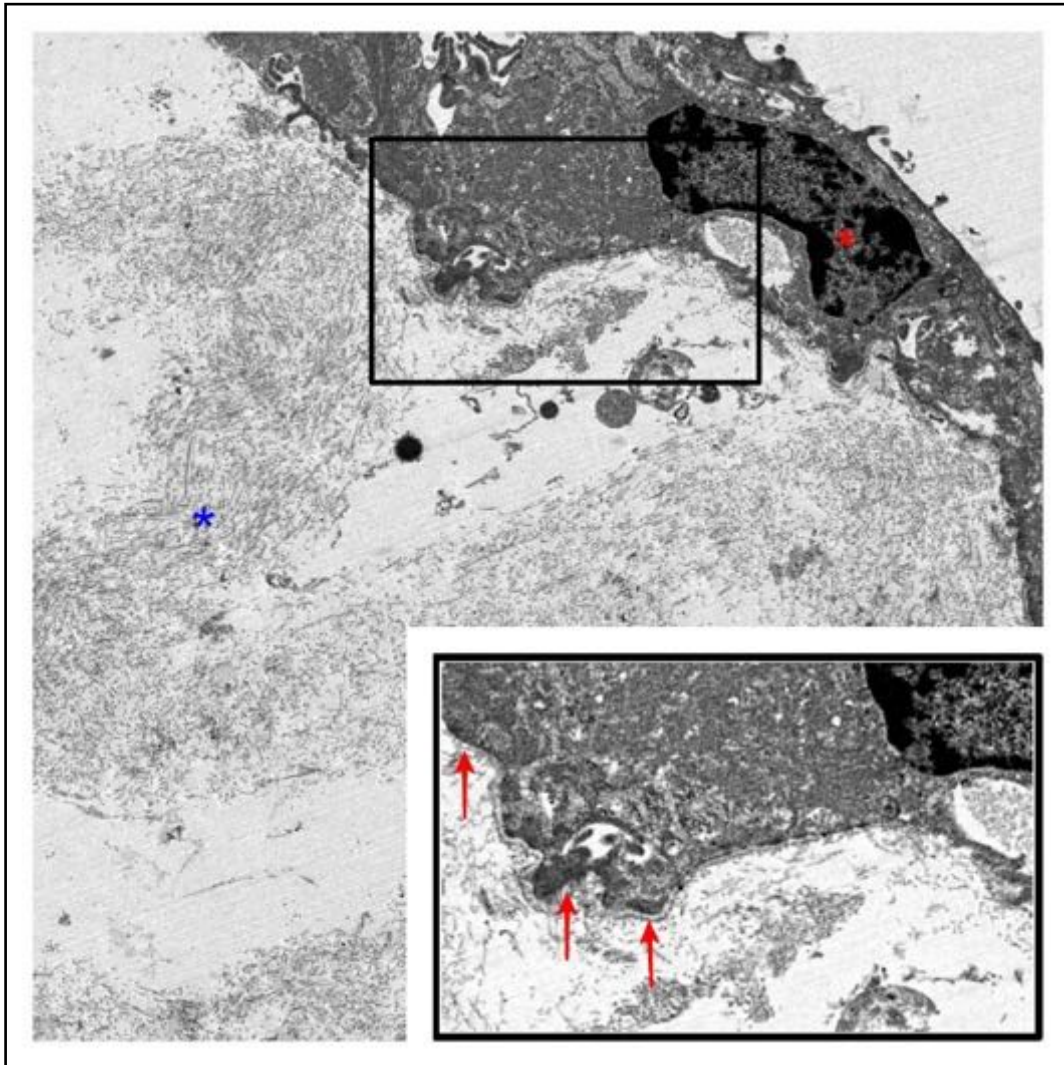


Abbildung 36: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Zu sehen ist ein Myofibroblast (roter Stern * markiert den Zellkern), der die darunterliegende Kollagenschicht (blauer Stern *) in Falten legt. In einem vergrößerten Ausschnitt markieren die roten Pfeile die für Myofibroblasten typischen subplasmalemmalen Verdichtungen. (Eigene Aufnahme; Vergrößerung 4400-fach).

Neben Myofibroblasten fanden sich bei mehr als der Hälfte der Präparate Hyalozyten und Fibroblasten. Hyalozyten sind gekennzeichnet durch einen lobulär geformten Zellkern, zytoplasmatische Vakuolen, Vesikel und Mitochondrien. Außerdem lassen sich oft Zellausläufer, ein ausgeprägter Golgi-Apparat und sowohl raues als auch glattes endoplasmatisches Retikulum erkennen. Fibroblasten zeichnen sich aus durch prominente Golgi-Komplexe, Massen an rauem endoplasmatischem Retikulum und einem fusiformen Zellkern und Zellkörper. [Abbildung 37](#) zeigt einen Hyalozyten, der sich - in Kollagen eingebettet - auf der vitrealen Seite der inneren Grenzmembran

befindet. Zellen des retinalen Pigmentepithels waren in Präparaten von Augen mit idiopathischer epiretinaler Gliose nicht vorzufinden.

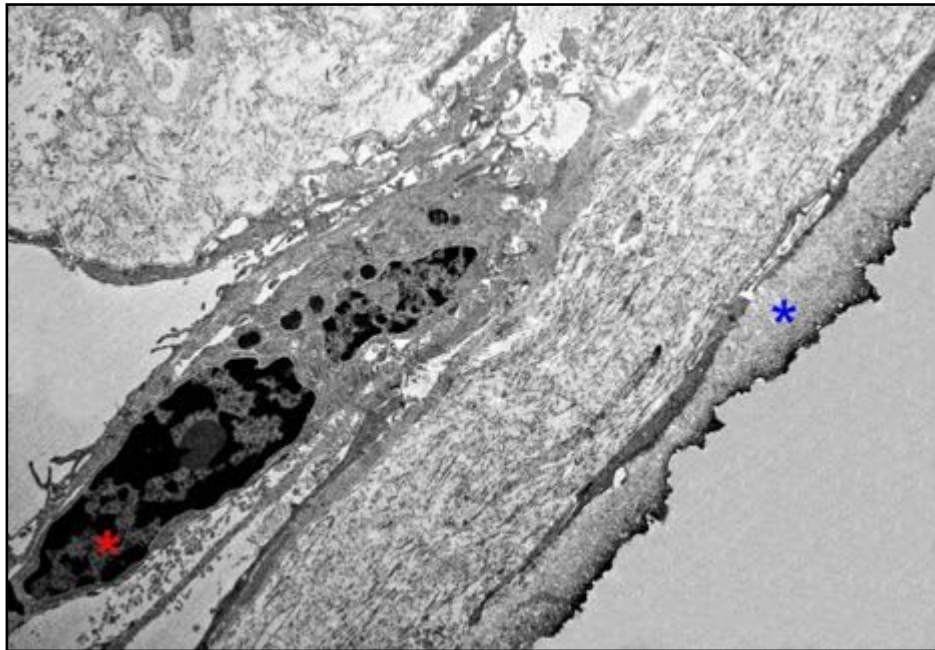


Abbildung 37: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Zu sehen ist ein Hyalozyt (roter Stern * markiert den Zellkern), der sich auf der vitrealen Seite der inneren Grenzmembran (ILM; blauer Stern *) befindet. Zwischen ILM und Hyalozyt befindet sich Kollagen. (Eigene Aufnahme; Vergrößerung 3000-fach).

Die extrazelluläre Matrix zeigte besonders viel Kollagen in Form von neu gebildetem Kollagen (engl. newly formed collagen, NFC). Außerdem fand man bei der Hälfte der Präparate dichte Kollagenstränge (engl.: collagen strands, CS) und fibrilläre Kollagenpräzipitate (engl.: fibrous long spacing collagen, FLSC). [Abbildung 38](#) zeigt sowohl neu gebildetes Kollagen als auch fibrilläre Kollagenpräzipitate.

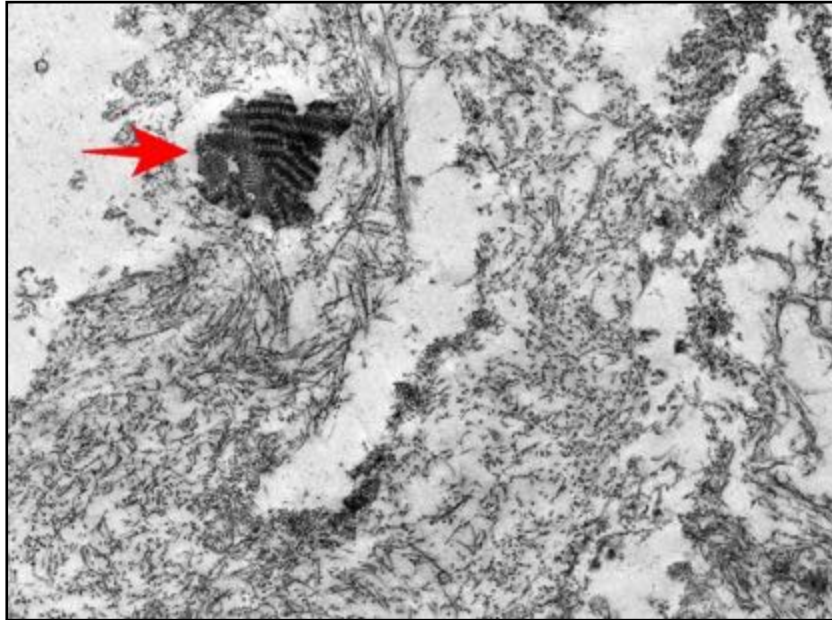


Abbildung 38: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Zu sehen ist neu gebildetes Kollagen (NFC) und fibrilläre Kollagenpräzipitate (FLSC; roter Pfeil). (eigene Aufnahme; Vergrößerung 12000-fach).

Die nachfolgende [Abbildung 39](#) stellt eine Zusammenschau der für die idiopathische epiretinale Gliose typischen Befunde in SD-OCT, Immunfluoreszenzmikroskopie und Elektronenmikroskopie eines Patienten dar.

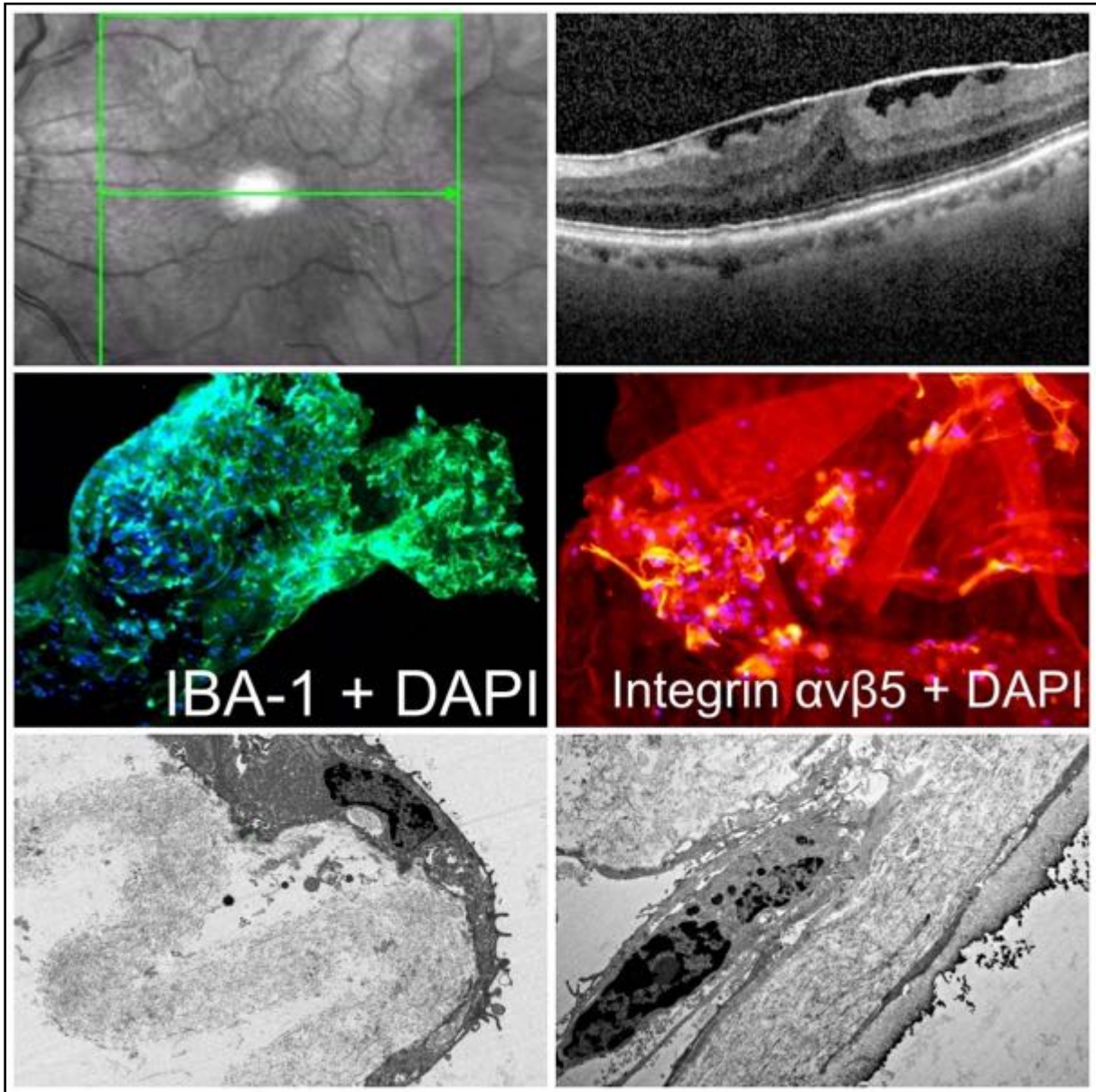


Abbildung 39: Befunde eines Patienten mit idiopathischer epiretinaler Gliose.

1. Reihe: SD-OCT-Aufnahme, in der die prämakuläre Membran in Form einer weißen Linie deutlich zu erkennen ist.

2. Reihe: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.

3. Reihe: Elektronenmikroskopische Aufnahmen. Links: Myofibroblast. Rechts: Hyalozyt.

Alle Aufnahmen stammen von demselben Patienten.

4.2 Proliferative Vitreoretinopathie

Von den 12 eingeschlossenen Augen von 12 Patienten mit Diagnose proliferativer Vitreoretinopathie wurden 6 rechte Augen und 6 linke Augen operiert und ausgewertet. Das mittlere Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Operation betrug 59 ± 23 SD Jahre (Median: 64,5 Jahre; min - max: 21 - 91 Jahre). Die Präparate stammten von 2 Frauen und 10 Männern.

Der präoperative bestkorrigierte Visus betrug im Mittel $1,11 \pm 0,67$ SD logMAR. Postoperativ zeigte sich ein Visus von $1,01 \pm 0,65$ SD logMAR. Die Veränderung der Sehschärfe war nicht signifikant (Wilcoxon Test, $p = 0,799$). Bei einem Patienten konnte jedoch wegen fehlender Kontrolluntersuchungen die Sehschärfe nicht nachverfolgt werden. Der durchschnittliche Nachbeobachtungszeitraum der 11 nachverfolgten Patienten betrug 18 ± 7 SD Monate. Bei 3 Patienten zeigte sich eine Visusverbesserung, 4 Patienten blieben mit der Sehschärfe stabil und bei 4 Patienten bestand nach Operation eine Sehverschlechterung. Die Darstellung des Patientenkollektivs ist [Tabelle 7](#) zu entnehmen.

Patient	G	A	S	OP-Datum	Visus in logMAR		Vorerkrankung
					präOP	postOP	
17	m	54	LA	20.05.14	0.8	-	Re-Ablatio retinae nach Plomben-OP
18	m	61	RA	04.09.14	1.3	1.0	Re-Ablatio nach Vitrektomie bei Riesenrissablatio
19	m	75	RA	25.09.14	1.1	1.2	Makulaforamen nach Ablatio retinae
20	m	48	LA	25.09.14	2.3	2.3	Re-Ablatio retinae nach Vitrektomie
21	m	74	LA	13.10.14	1.3	1.3	Re-Ablatio retinae nach mehrfacher Vitrektomie und Plomben OP
22	w	31	RA	12.02.15	0.7	0.7	Re-Ablatio retinae nach Vitrektomie
23	m	68	LA	30.03.15	2.3	0.3	Re-Ablatio retinae nach Vitrektomie
24	m	21	RA	02.04.15	1.3	1.5	Re-Ablatio retinae nach Vitrektomie
25	m	79	RA	26.05.15	0.4	0.2	Re-Ablatio retinae nach Vitrektomie bei Pseudofoamen
26	m	27	LA	28.05.15	0.1	0.1	Traktionsablatio retinae bei Frühgeborenen-retinopathie
27	m	80	RA	02.06.15	0.7	1.4	Re-Ablatio retinae nach Vitrektomie
28	w	91	LA	17.02.15	1.0	1.1	Re-Ablatio retinae nach Vitrektomie

Tabelle 7: Darstellung des Patientenkollektivs mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. G: Geschlecht (m: männlich; w: weiblich), A: Alter bei OP in Jahren, S: operierte Seite (RA: rechtes Auge; LA: linkes Auge), -: kein Verlaufsvision vorhanden.

4.2.1 Analyse der Zellverteilung und Zellzahl

Bei Präparaten der proliferativen Vitreoretinopathie fanden sich sowohl homogen verteilte Zellmuster als auch Clusterformationen. Bei 9 von 12 Membranen (75%) waren die Zellen homogen verteilt. Clusterformation fanden sich bei 2 von 12 Membranen (17%). Ein Präparat zeigte sich besonders zellarm (Nr. 17). Die Muster verschiedener Zellverteilungen sind [Abbildung 40](#) zu entnehmen.

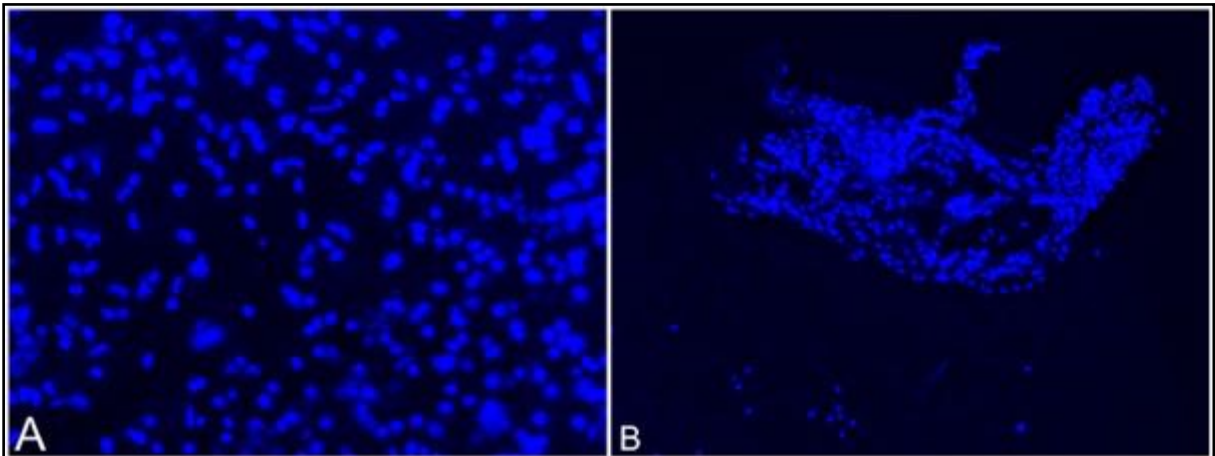


Abbildung 40: Muster verschiedener Zellverteilungen. A) homogene Zellverteilung. B) Clusterformation bzw. inhomogene Zellverteilung (Vergrößerung A 20-fach, B 10-fach).

Im Gegensatz zu den idiopathischen epiretinalen Gliosen zeigten sich die Präparate bei proliferativen Vitreoretinopathie mit sehr vielen, teils sehr dicht beieinanderliegenden und teils auch übereinanderliegenden Zellen. Dies wird als ‚multi layer‘ bezeichnet.

4.2.2 Analyse Zell-spezifischer Antigene

In der immunhistologischen Analyse zeigte sich bei der proliferativen Vitreoretinopathie bei fast allen 20 verwendeten Antikörpern ein positives Färbeverhalten. Auffällig war, dass die Mehrheit der anti-TGF- β -gefärbten Präparate keine positive Reaktion zeigten.

Eine besonders positive Reaktion zeigte sich beim Marker **anti- α -SMA**, welcher Myofibroblasten repräsentiert. Außerdem war eine deutlich positive Reaktion für die retinale Pigmentepithelzell-Marker **anti-Zytokeratin-8**, **anti-Galectine-1** und **-3**, sowie **anti-Emmprin** dokumentiert. Daneben reagierte der Gliazellmarker **anti-GFAP**,

sowie **anti-IBA 1**, **anti-ILB 4**, **anti-RCA I** und **anti-UEA I** deutlich positiv. Eine schwach positive Reaktion zeigten die Präparate auf die Hyalozyten-Marker **anti-CD45** und **anti-CD64** sowie auf die Integrin-Marker **anti-Integrin αV** und **anti-Integrin $\alpha V \beta 3$** . Der Antikörper **anti-TGF- β** , ein Marker für extrazelluläre Matrix und Myofibroblasten, zeigte nur in einzelnen Membranen eine schwach positive Reaktion. Gleiches gilt für **anti-Integrin $\alpha V \beta 5$** , welches einen Marker sowohl für retinale Pigmentepithelzellen, Endothelzellen bei retinaler Neovaskularisation als auch für Fibroblasten und Myofibroblasten darstellt.

Die [Abbildungen 41 - 48](#) zeigen einige der gefärbten primären Antikörper in Kombination mit dem Zellkernfarbstoff DAPI.

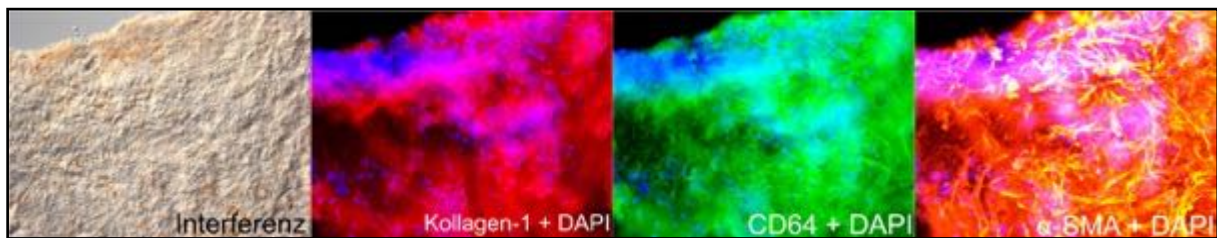


Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 20-fach).

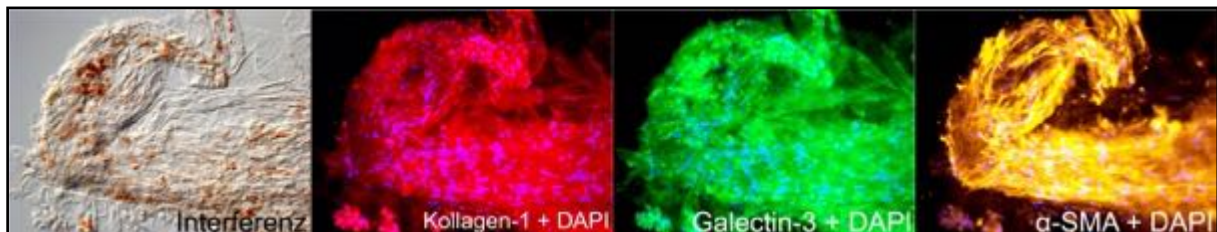


Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 20-fach).

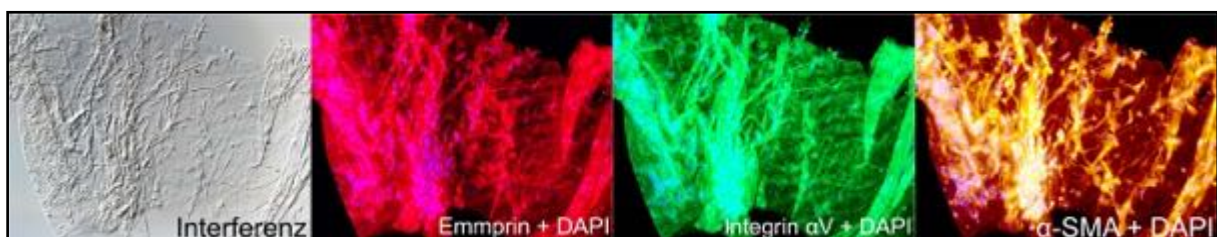


Abbildung 43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 10-fach).

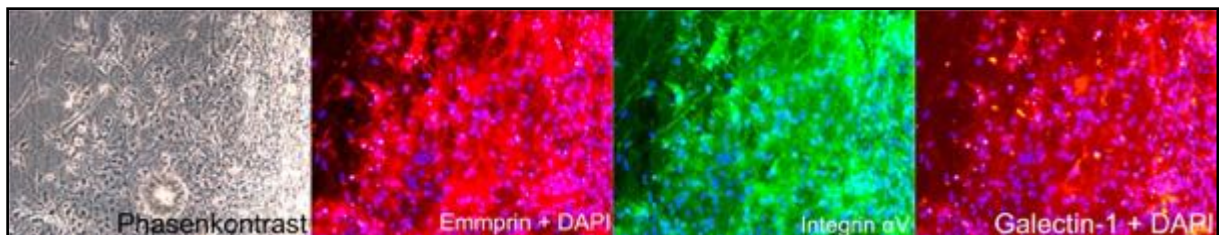


Abbildung 44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 20-fach).

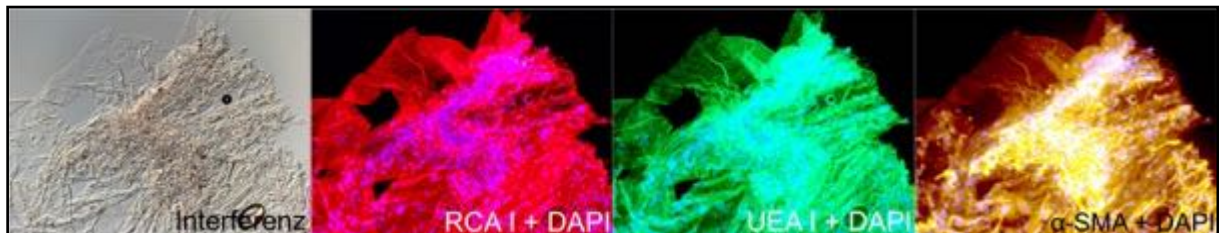


Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 10-fach).

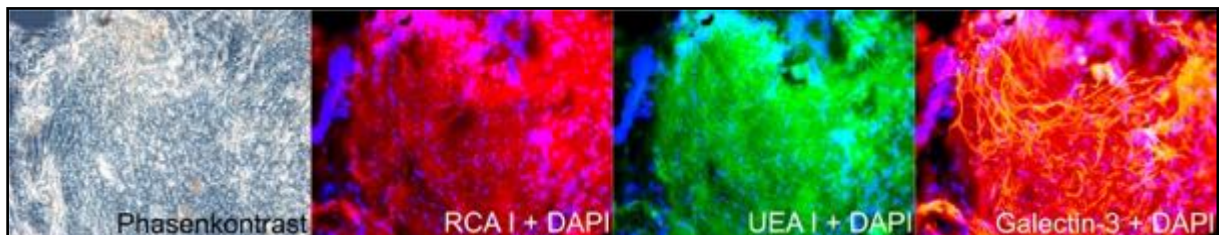


Abbildung 46: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 20-fach).

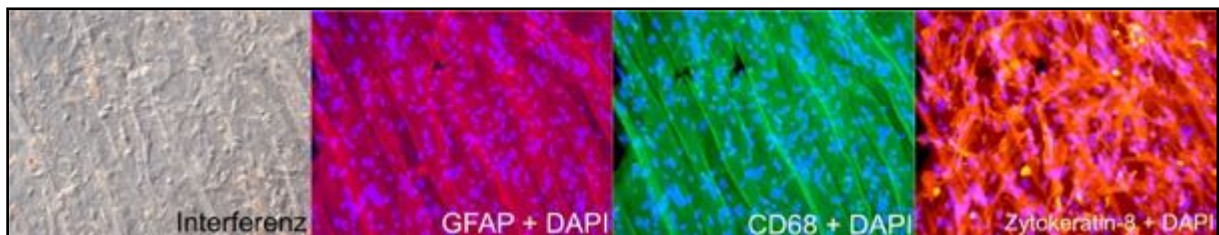


Abbildung 47: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 20-fach).

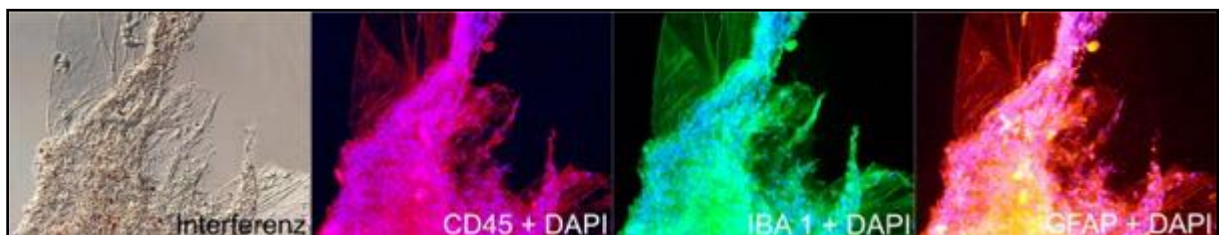


Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 10-fach).

Kolokalisationen

Ähnliche Anfärbemuster fielen für die primären Antikörper **anti- α -SMA**, **anti-RCA I**, und **anti-UEA I** auf. Außerdem wurde häufig eine Kolokalisation von **anti-UEA I** und **anti-Galectin-3** dokumentiert.

Die nachfolgenden [Abbildungen 49 - 52](#) stellen Beispiele für die oben genannten die Kolokalisationen dar.



Abbildung 49: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer PVR-Membran. Kolokalisation von anti-UEA I und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 40-fach).

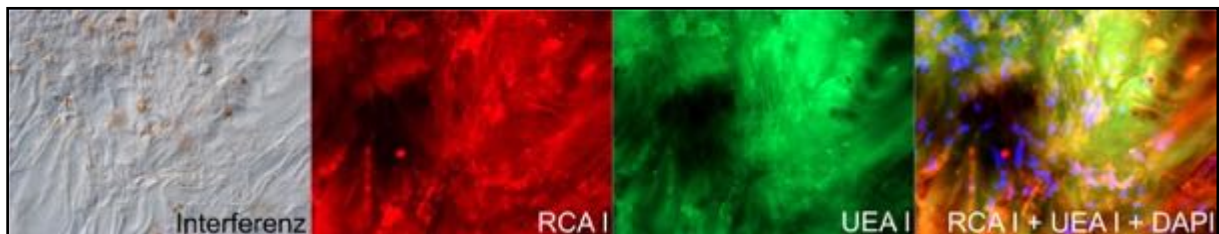


Abbildung 50: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer PVR-Membran. Kolokalisation von anti-RCA I und anti-UEA I. (Vergrößerung: 40-fach).

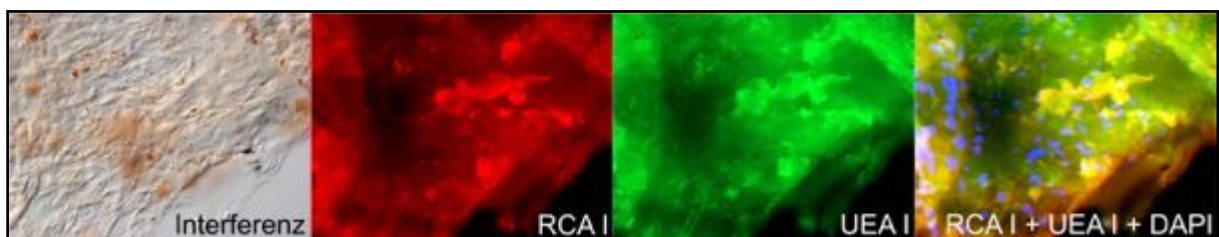


Abbildung 51: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer PVR-Membran. Kolokalisation von anti-RCA I und anti-UEA I. (Vergrößerung: 40-fach).

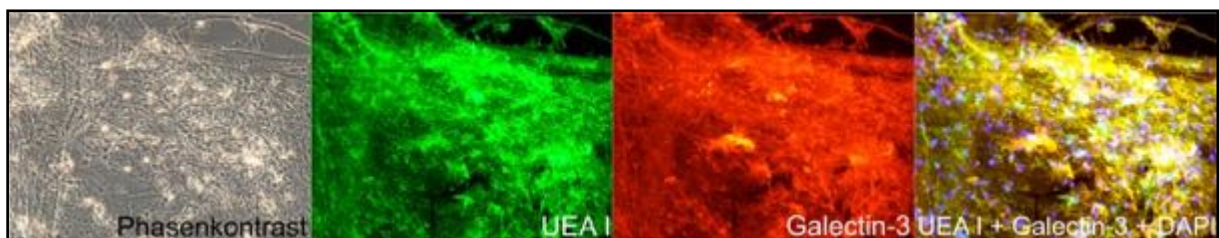


Abbildung 52: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer PVR-Membran. Kolokalisation von anti-UEA I und anti-Galectin-3. (Vergrößerung: 20-fach).

4.2.3 Analyse ultrastruktureller Bestandteile

Eine ultrastrukturelle Analyse erfolgte bei 16 Präparaten von 4 der 12 Patienten mit proliferativer Vitreoretinopathie.

Die innere Grenzmembran lies sich bei 3 von 4 Präparaten darstellen. Meist waren die Zellen des prämakulären Gewebes der inneren Grenzmembran direkt aufgelagert. Die Hauptzelltypen in Membranen bei proliferativer Vitreoretinopathie waren Myofibroblasten und Zellen des retinalen Pigmentepithels. Myofibroblasten fanden sich in allen Präparaten und waren auf Grund ihres fusiformen Zellkerns und der subplasmalemalen Verdichtungen gut zu erkennen. Die Zellen des retinalen Pigmentepithels waren in 3 von 4 Präparaten dokumentiert. Sie sind durch ihre mit Melanin gefüllten intrazytoplasmatischen Vesikel gut von den übrigen Zellen abgrenzbar. [Abbildung 53](#) zeigt eine Zelle des retinalen Pigmentepithels, die der vitrealen Seite der inneren Grenzmembran direkt aufliegt.

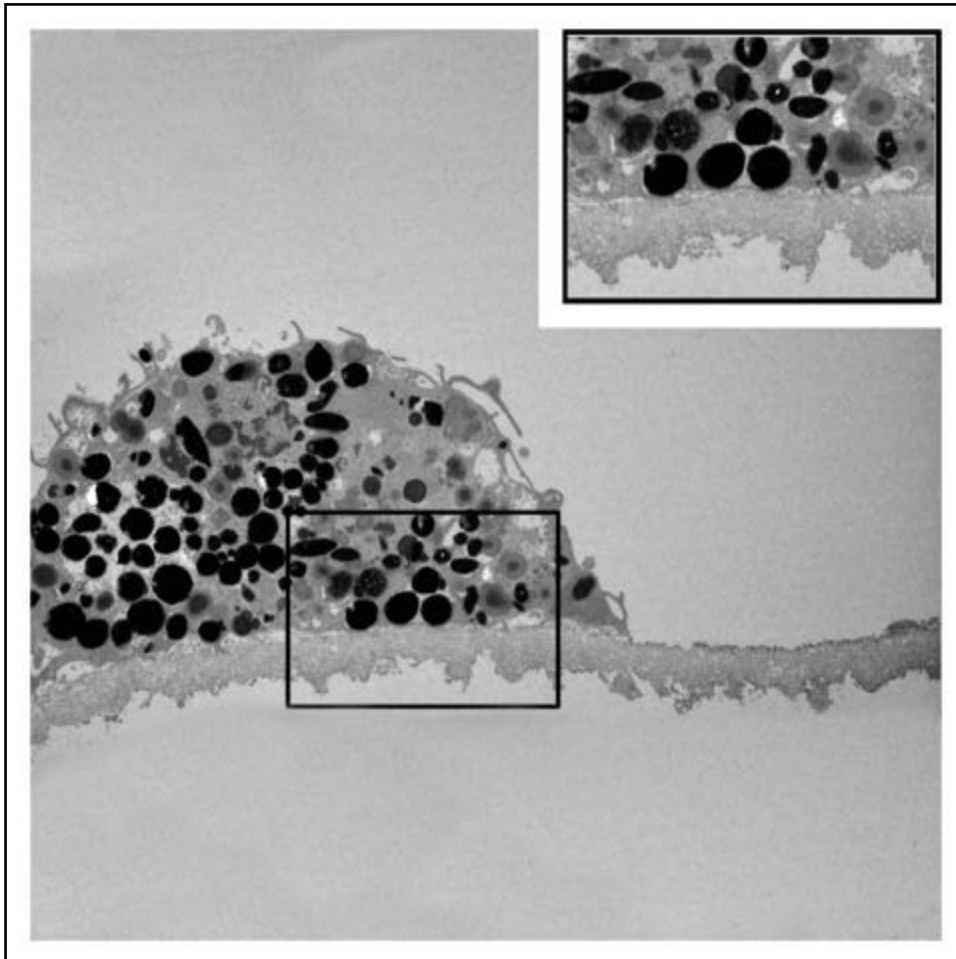


Abbildung 53: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer prämakulären Membran bei proliferativer Vitreoretinopathie. Zu sehen ist eine Zelle des retinalen Pigmentepithels, die direkt auf der inneren Grenzmembran lokalisiert ist. (Eigene Aufnahme; Vergrößerung 3000-fach).

Seltener zeigten sich Fibroblasten und Hyalozyten. [Abbildung 54](#) zeigt einen Fibroblasten mit myofibroblasten-ähnlichen Merkmalen wie den subplasmalemalem Verdichtungen.

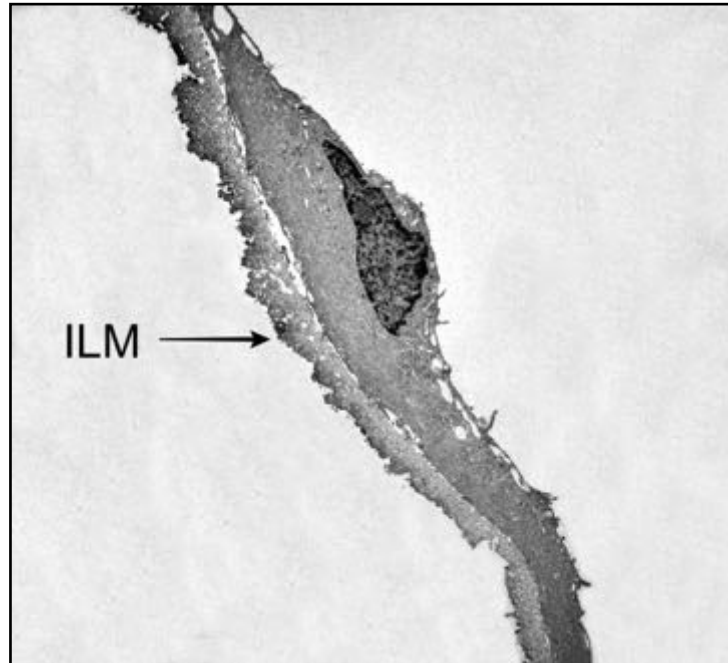


Abbildung 54: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer prämakulären Membran bei proliferativer Vitreoretinopathie. Zu sehen ist ein Fibroblast mit myofibroblasten-ähnlichen Merkmalen und die innere Grenzmembran (ILM). Der Fibroblast befindet sich auf der vitrealen Seite der ILM. (Eigene Aufnahme; Vergrößerung 3000-fach).

In der extrazellulären Matrix fand sich wenig neu gebildetes Kollagen (engl.: newly formed collagen), welches in [Abbildung 55](#) dargestellt ist. Kollagenstränge (engl. collagen strands) und fibrilläre Kollagenpräzipitate (engl.: fibrous long spacing collagen) konnten nicht gefunden werden.

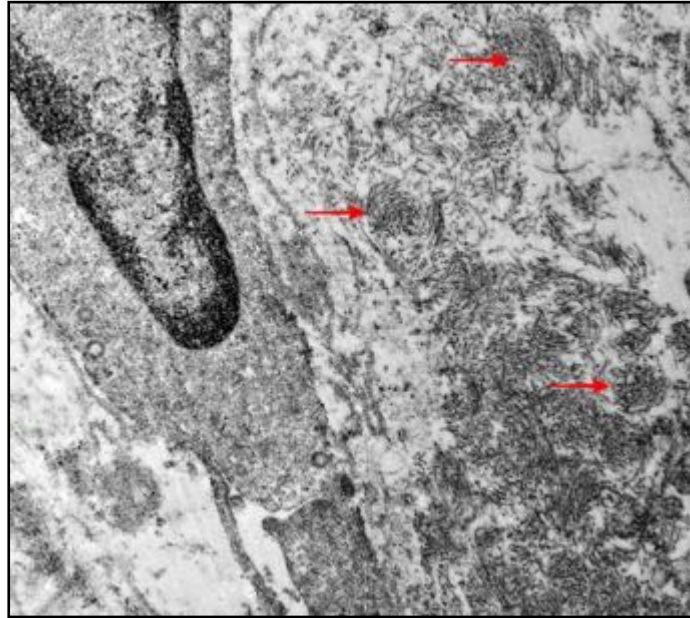


Abbildung 55: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer prämakulären Membran bei proliferativer Vitreoretinopathie. Zu sehen ist eine von neu gebildetem Kollagen (NFC, siehe Pfeile) umgebene Zelle. (Eigene Aufnahme, Vergrößerung 20000-fach).

Abbildung 56 bietet eine Zusammenschau der Befunde bei proliferativer Vitreoretinopathie.

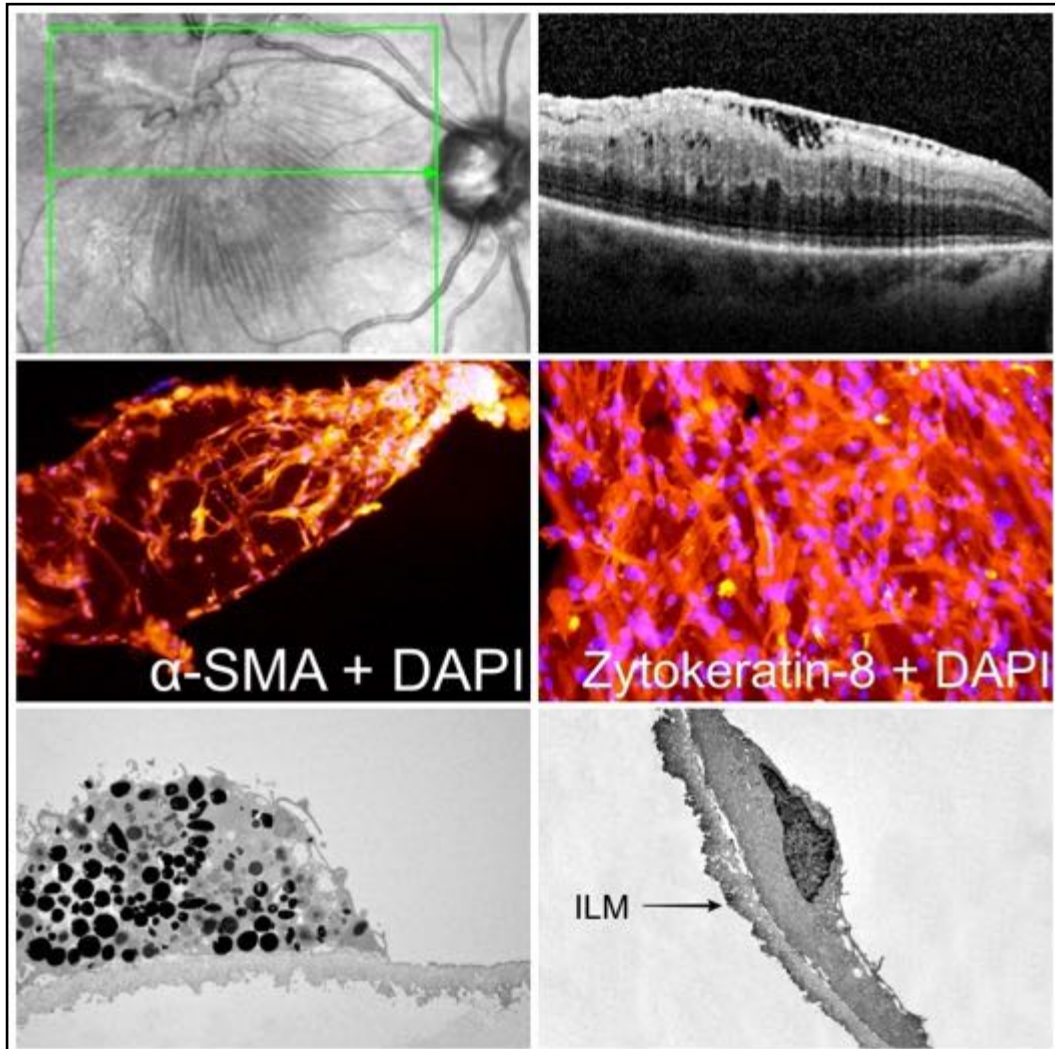


Abbildung 56: Befunde eines Patienten mit proliferativer Vitreoretinopathie.

1. Reihe: SD-OCT-Aufnahme, in der die prämakuläre Membran in Form einer weißen Linie deutlich zu erkennen ist.
2. Reihe: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen.
3. Reihe: Elektronenmikroskopische Aufnahmen. Links: Retinale Pigmentepithelzelle. Rechts: Fibroblast.

4.3 Vergleich nach Grunderkrankung

Die beiden Diagnosegruppen unterschieden sich sowohl hinsichtlich ihrer Altersverteilung als auch bezüglich des gemessenen prä- und postoperativen Visus. Die Patientengruppe der idiopathischen epiretinalen Gliose wies ein mittleres Alter von 74 ± 9 SD Jahren (Median: 75,5 Jahre, min - max: 57 - 88 Jahre) auf. Insgesamt handelte es sich in dieser Gruppe um ältere Patienten.

Die Altersverteilung der Diagnosegruppe mit proliferativer Vitreoretinopathie war im Gegensatz dazu heterogener. Das mittlere Alter lag bei 59 ± 23 SD Jahren (Median: 64,5 Jahre). Das minimale Alter (21 Jahre) und das maximale Alter (91 Jahre) lagen

mit einer Differenz von 70 Jahren deutlich weiter auseinander verglichen mit der Diagnosegruppe der idiopathischen epiretinalen Gliose, welche eine Differenz von 31 Jahren aufwies.

Der präoperativ gemessene Visus betrug in der Diagnosegruppe mit idiopathischer epiretinaler Gliose im Mittel $0,49 \pm 0,14$ SD logMAR und in der Gruppe der proliferativen Vitreoretinopathie $1,11 \pm 0,64$ SD logMAR. Der Verlaufsvisus lag bei $0,33 \pm 0,29$ SD logMAR bei idiopathischer epiretinaler Gliose beziehungsweise bei $1,24 \pm 0,58$ SD logMAR bei proliferativer Vitreoretinopathie.

In beiden Diagnosegruppen konnte sowohl homogene Zellverteilungen als auch Clusterformationen beobachtet werden. Der Anteil der homogenen Zellverteilungen lag bei 56% bei idiopathischer epiretinaler Gliose beziehungsweise bei 75% bei proliferativer Vitreoretinopathie. Die Clusterformationen nahmen einen Prozentsatz von 44% bei idiopathischer epiretinaler Gliose und 17% bei proliferativer Vitreoretinopathie ein. Zudem ließen sich bei der Diagnosegruppe der idiopathischen epiretinalen Gliose eher single layer vorfinden. Die Diagnosegruppe der proliferativen Vitreoretinopathie wies hingegen meist multi layer auf. [Tabelle 8](#) fasst die epidemiologischen Daten noch einmal zusammen.

	Idiopathische epiretinale Gliose	Proliferative Vitreoretinopathie
Mittelwert Alter	74 ± 9 SD Jahre	59 ± 23 SD Jahre
Median Alter	75,5 Jahre	64,5 Jahre
Visusmittelwert in logMAR:		
• präOP	• 0,49 ± 0,14 SD	• 1,11 ± 0,67 SD
• postOP	• 0,29 ± 0,31 SD	• 1,01 ± 0,65 SD
Zellverteilung:		
• homogen	• 56%	• 75%
• Cluster	• 44%	• 17%
single layer / multi layer	single layer	multi layer

Tabelle 8: Vergleich der Patientendaten der beiden Diagnosegruppen „idiopathische epiretinale Gliose“ und „proliferative Vitreoretinopathie“.

4.3.1 Vergleich Zell-spezifischer Antigene

In der immunhistologischen Analyse zeigte sich, dass die einzelnen Diagnosegruppen ein ähnliches Färbeverhalten bezüglich Zell-spezifischer Antigene aufwiesen. Das Gesamtergebnis ist in [Tabelle 9](#) dargestellt.

Anti-	Zielstruktur	Idiopathische epiretinale Gliose	Proliferative Vitreoretinopathie
α-SMA	Myofibroblasten	++	++
CD45	Hyalozyten	+	(+)
CD64	Hyalozyten, Makrophagen	+	(+)
CD68	Makrophagen, Mikroglia	nicht gefärbt	+
Cytokeratin-8	RPE-Zellen	nicht gefärbt	+
Collagen-1	EZM	(+)	(+)
Emmprin/CD147	RPE-Zellen, Müllerzellen, Mikroglia	+	+
Galectin-1	RPE-Zellen	+	+
Galectin-3	RPE-Zellen, Mikroglia	+	+
GFAP	Gliazellen	+	+
IBA 1	Mikroglia, Makrophagen	+	+
Isolectin B4	Mikroglia, Endothelzellen	++	+
Integrin α V	RPE-Zellen, Fibroblasten, Myofibroblasten	+	(+)
Integrin αV β3	RPE-Zellen, Fibroblasten, Myofibroblasten	+	(+)
Integrin αV β5	RPE-Zellen, Fibroblasten, Myofibroblasten	+	-
RCA I	RPE-Zellen, Immunzellen, Endothelzellen, Mikroglia	+	+
TGF-β	EZM, Myofibroblasten	(+)	-
UEA I	Endothelzellen, Epithelzellen	+	+

Tabelle 9: Vergleich der Antikörper-Affinität bei idiopathischer epiretinale Gliose und proliferativer Vitreoretinopathie. RPE-Zellen: Zellen des retinalen Pigmentepithels, EZM: extrazelluläre Matrix, „++“ Expression in 100% der untersuchten Präparate; „+“ Expression in mindestens 80% der untersuchten Präparate; „(+“ Expression in mindestens 40% der untersuchten Präparate; „-“ Expression in maximal 20% der untersuchten Präparate.

In allen Präparaten zeigte sich eine besonders positive Färbung für anti- α -SMA, die anti-Galectine -1 und -3, anti-ILB 4, anti-RCA I, anti-Emmprin, anti-UEA I, anti-IBA 1 und anti-GFAP. Zudem konnte eine leicht positive Reaktion für die Integrine anti-Integrin α V und anti-Integrin α V β 3 sowohl bei den Präparaten der idiopathischen epiretinalen Gliose als auch bei denen der proliferativen Vitreoretinopathie gefunden werden.

Kolokalisationen zwischen anti-Galectin-3 und anti-UEA I waren in beiden Gruppen zu finden.

Die Negativkontrollen zeigten jeweils keine Anfärbung für alle getesteten Antikörper. Dies ist in den nachfolgenden [Abbildungen 56 – 57](#) beispielhaft dargestellt.

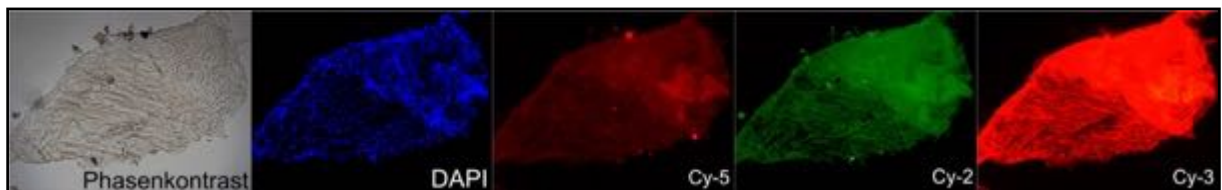


Abbildung 57: Negativkontrolle IgG (Vergrößerung: 10-fach).



Abbildung 58: Negativkontrolle IgG2a (Vergrößerung: 10-fach).

4.3.2 Vergleich ultrastruktureller Bestandteile

Die ultrastrukturellen Bestandteile der Membranen bestätigten die bisherigen Forschungsergebnisse auf diesem Gebiet.

Die prämakulären Membranen bei idiopathischer epiretinaler Gliose sowie die Membranen bei proliferativer Vitreoretinopathie beinhalteten als Hauptzelltyp kontraktile Myofibroblasten. Daneben zeigten sich bei idiopathischer epiretinaler Gliose häufig Hyalozyten sowie neu gebildetes Kollagen, Kollagenstränge und fibrilläre Kollagenpräzipitate. Meist waren die Membranen single layer.

Im Gegensatz dazu fanden sich bei Membranen mit proliferativer Vitreoretinopathie viele Zellen des retinalen Pigmentepithels. Das Zellbild zeigte oft dicht gelagerte, übereinander gelagerte Zellen in Form eines multi layers.

Die vergleichenden Ergebnisse sind in der nachfolgenden [Tabelle 10](#) übersichtlich dargestellt.

Ultrastrukturelle Elemente	Idiopathische epiretinale Gliose	Proliferative Vitreoretinopathie
Innere Grenzmembran (ILM)	+	+
Zellen direkt auf der ILM	+	+
Zelltypen		
Fibroblast	(+)	-
Hyalozyt	(+)	-
Myofibroblast	+	++
Retinale Pigmentepithelzelle	-	+
Kollagentypen		
Fibrilläre Kollagenpräzipitate (FLSC)	(+)	-
Kollagenstränge (CS)	(+)	-
Neu gebildetes Kollagen (NFC)	+	+

Tabelle 10: Vergleich der elektronenmikroskopischen Auswertung von idiopathischer epiretinale Gliose und proliferativer Vitreoretinopathie. „++“ Expression in 100% der untersuchten Präparate; „+“ Expression in mindestens 80% der untersuchten Präparate; „(+“ Expression in mindestens 40% der untersuchten Präparate; „-“ Expression in maximal 20% der untersuchten Präparate.

5 Diskussion

Diese Studie zeigt erstmals einen immunzytochemischen und ultrastrukturellen Vergleich chirurgisch exzidiert prämakulärer Membranen von 16 Augen mit idiopathischer epiretinaler Gliose und 12 Augen mit proliferativer Vitreoretinopathie. Die mittels pars plana Vitrektomie mit Peeling prämakulären Gewebes und innerer Grenzmembran gewonnenen Präparate wurden zuerst für die Flachpräparation aufgearbeitet und anschließend mittels Phasenkontrast-, Interferenz-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie untersucht. Für die immunhistologische Analyse wurden insgesamt 20 primäre Antikörper wie anti- α -smooth muscle actin (α -SMA), anti-Integrine (α v, α v β 3, α v β 5), anti-Galectine (-3, -1), anti-IBA-1 (Mikroglia), anti-Emmprin (CD147), anti-Ricinus communis agglutinin I (RCA I) und anti-Kollagen-1 verwendet. Für die klinische Korrelation erfolgte die Erfassung demographischer Patientendaten sowie eine Auswertung der bestkorrigierten Sehschärfe auch im zeitlichen Verlauf.

5.1 Immunhistologische Färbung von Zell- und Fibrose-spezifischen Antigenen

Unsere Untersuchungen zeigen, dass chirurgisch exzidierte prämakuläre Membranen von Augen mit idiopathischer epiretinaler Gliose und proliferativer Vitreoretinopathie Unterschiede in der Zellzusammensetzung präsentieren.

Die Transdifferenzierung von Vorläuferzellen in Myofibroblasten wurde jedoch bei beiden Entitäten gefunden. Spezifische immunzytochemische Marker, die an fibrotischen Prozessen beteiligt sind, wurden sowohl in Augen mit idiopathischer epiretinaler Gliose als auch in Augen mit proliferativer Vitreoretinopathie beobachtet. Bei beiden Augen wurde eine starke positive Immunoreaktivität von anti- α -SMA und anti-Integrin α v β 3 gefunden. Des Weiteren fand sich eine starke positive Färbung von anti-Galectin1/-3, anti-IBA1, anti-Emmprin, anti-RCA I und anti-Kollagen-1.

5.1.1 Anti- α -smooth muscle actin (anti- α -SMA)

In allen Präparaten beider Patientengruppen ließ sich der Myofibroblastenmarker anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) sehr intensiv nachweisen. Dies ist im Einklang mit

Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die das Vorkommen von Myofibroblasten in prämakulären Membranen bei idiopathischer epiretinaler Gliose und proliferativer Vitreoretinopathie beschreiben (Schumann, et al., 2015), (Schumann, et al., 2014), (Smiddy, et al., 1989), (Smiddy, et al., 1992), (Parapuram, et al., 2009), (Hinz B., 2016), (Chen, et al., 2014).

Myofibroblasten können aus unterschiedlichsten Zellen transdifferenzieren. Beispiele für Vorläuferzellen sind: Fibroblasten, Epithelzellen, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, ortsansässige mesenchymale Progenitorzellen, Fettzellen, Perizyten, Keratozyten, Müllerzellen und Zellen des retinalen Pigmentepithels (Chen, et al., 2014), (Hinz B., 2016), (Parapuram, et al., 2009). Die Myofibroblasten-Transdifferenzierung läuft in mehreren Schritten ab. Zu Beginn entwickelt sich durch neu entstandene Gewebesteifigkeit ein sogenannter Protomyofibroblast (Pellegrin & Mellor, 2007). Dieser ähnelt phänotypisch noch einem Fibroblasten, ist aber bereits migratorisch aktiver als übliche Gewebefibroblasten. Typischerweise weist der Protomyofibroblast „stress fibers“, jedoch noch kein α -SMA auf (Hinz B., 2016), (Pellegrin & Mellor, 2007). „Stress fibers“ sind kontraktile β - und γ -Aktinmyosin-Bündel, die in Nicht-Muskelzellen vorkommen (Pellegrin & Mellor, 2007), (Tojkander, et al., 2012). Unter dem Einfluss profibrotischer Faktoren wie mechanischem Stress oder TGF- β 1 Sekretion, transdifferenziert der Protomyofibroblast zum Myofibroblast und beginnt α -SMA zu exprimieren (Hinz B., 2016), (Pellegrin & Mellor, 2007), (Tojkander, et al., 2012). Durch das in „stress fibers“ eingebaute α -SMA besitzt der Myofibroblast stark kontraktile Eigenschaften (Hinz B., 2016), (Hinz, et al., 2012), wodurch Verzerren und Visusminderung bei den betroffenen Patienten resultieren.

Bereits bekannt ist, dass Myofibroblasten bei der physiologischen Wundheilung und bei der Entstehung von Fibrose eine wichtige Rolle spielen. Unter physiologischen Bedingungen gehen Myofibroblasten nach abgeschlossener Wundheilung in die Apoptose über (Hinz B., 2016). Bleiben Myofibroblasten weiterhin aktiv, führt die Produktion von extrazellulärem Kollagen durch eine Akkumulation extrazellulärer Matrix zur Fibrosebildung (Hinz B., 2016).

Fibrotische Faktoren und Prozesse sind sowohl bei der idiopathischen epiretinalen Gliose als auch bei der proliferativen Vitreoretinopathie beschrieben. Bei beiden Erkrankungen sind Myofibroblasten die vorherrschenden Zellen. Dies stimmt mit der Annahme von Zhao und Kollegen überein, die Myofibroblasten bei allen traktiven

prämakulären Membranen nachweisen und sie pathogenetisch von großer Relevanz beurteilen (Zhao, et al., 2013). Haritoglou und Kollegen bezeichnen Myofibroblasten sogar als den wichtigsten zellulären Bestandteil des vitreomakulären Traktionssyndrom, einer weiteren Unterform traktiver Makulopathien (Haritoglou, et al., 2014).

Der ultrastrukturelle Unterschied zwischen der idiopathischen epiretinalen Gliose und der proliferativen Vitreoretinopathie besteht jedoch darin, dass sich die restlichen vorkommenden Zelltypen unterscheiden. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass die Myofibroblasten bei den zwei von uns untersuchten Krankheitsentitäten aus unterschiedlichen Zellen hervorgehen. Die Vorläuferzellen bei der idiopathischen epiretinalen Gliose sind nach aktuellen Untersuchungen Hyalozyten, Fibroblasten und Gliazellen (Gandorfer, et al., 2014), (Sebag, et al., 2014). Bei der proliferativen Vitreoretinopathie sind hingegen retinale Pigmentepithelzellen als Hauptvorläuferzellen beschrieben (Alge, et al., 2006).

5.1.2 Anti-Integrin αV , anti-Integrin $\alpha V\beta 3$ und anti-Integrin $\alpha V\beta 5$

In unseren Untersuchungen ließen sich die Marker anti-Integrin αV und anti-Integrin $\alpha V\beta 3$ bei beiden untersuchten Entitäten stark positiv nachweisen. Das anti-Integrin $\alpha V\beta 5$ konnte in dieser Arbeit nur in den Membranen der idiopathischen epiretinalen Gliose gefunden werden. Bei idiopathischer epiretinaler Gliose gibt es bisher keine vergleichenden Ergebnisse in der Literatur. Auch bei proliferativer Vitreoretinopathie finden sich diesbezüglich kaum Publikationen. Lediglich Robbins und Kollegen testeten im Jahre 1994 verschiedene Integrine bei Membranen der proliferativen Vitreoretinopathie und konnten anti-Integrin αV positiv nachweisen (Robbins, et al., 1994). In Membranen der proliferativen diabetischen Retinopathie wurden die Integrine $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$ ebenfalls positiv gefunden (Friedlander, et al., 1996).

Integrine sind heterodimere Typ I Transmembranproteine, die aus nicht-kovalent verbundenen α - und β -Untereinheiten bestehen (Alberts, et al., 2002), (Danen, 2000-2013), (Henderson & Sheppard, 2013), (Worthington, et al., 2011). Durch Bindung an die Glykoproteine Laminin, Fibronectin und Kollagen verankern sie das zelluläre Zytoskelett mit der extrazellulären Matrix (Alberts, et al., 2002), (Danen, 2000-2013). Zudem beeinflussen sie Zell-Zell-Adhäsionen (Danen, 2000-2013), (Henderson &

Sheppard, 2013) sowie Signalkaskaden, welche zelluläre Motilität, Proliferation und Differenzierung bestimmen (Danen, 2000-2013), (Henderson & Sheppard, 2013).

In der Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten wird den Integrinen mit der Unterform αV - insbesondere den Subtypen $\alpha V\beta 3$, $\alpha V\beta 5$, $\alpha V\beta 6$ und $\alpha V\beta 8$ – eine wichtige Funktion zugeschrieben (Henderson & Sheppard, 2013), (Hinz B., 2016), (Sarrazy, et al., 2014). Integrine haben indirekt über die Aktivierung von latentem TGF- $\beta 1$ einen profibrotischen Einfluss (Hinz B., 2016), (Hinz, et al., 2012), (Sarrazy, et al., 2014). TGF- $\beta 1$ wird in inaktiver Form in die extrazelluläre Matrix sezerniert und dort gespeichert (Henderson & Sheppard, 2013), (Hinz B., 2016), (Worthington, et al., 2011). Die Integrin-vermittelte Aktivierung von TGF- $\beta 1$, führt zur Neoexpression von α -SMA in Fibroblasten (Hinz, et al., 2012), (Hinz B., 2016), (Rønnov-Jessen & Petersen, 1993), (Wipff, et al., 2007), (Worthington, et al., 2011), (Zhou, et al., 2010). Im Tierversuch an Mäusen wurde bereits gezeigt, dass bei knockout der αV -Integrine in Linsenzellen weniger Myofibroblasten durch epithelial-mesenchymale Transition entstehen (Mamuya, et al., 2014).

5.1.3 Anti-Transforming growth factor beta (Anti-TGF- β)

Das multifunktionelle Zytokin „Transforming Growth Factor beta“ (TGF- β) ließ sich bei einzelnen Präparaten der idiopathischen epiretinalen Gliose und der proliferativen Vitreoretinopathie durch eine positive Immunreaktion nachweisen. In der Literatur ist eine vermehrte Expression der Unterform TGF- $\beta 2$ im Glaskörper und in prämakulären Membranen bei Patienten mit proliferativer Vitreoretinopathie beschrieben (Chen, et al., 2014), (Parapuram, et al., 2009). Dies ist im Einklang mit unseren Ergebnissen. Zudem fanden Chen und Kollegen, dass TGF- $\beta 2$ die epithelial-mesenchymale Transition von Zellen des retinalen Pigmentepithels fördert und somit aktiv zur Myofibroblastenaktivierung in Membranen bei proliferativer Vitreoretinopathie beiträgt (Chen, et al., 2014). Des Weiteren induziert TGF- $\beta 1$ die α -SMA-Expression retinaler Müllergliazellen, wie Bu und Kollegen an idiopathischen prämakulären Membranen nachweisen konnten (Bu, et al., 2015).

TGF- β wird von mehreren Zellen produziert und kontrolliert unzählige zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose (Worthington, et al., 2011). Zudem induziert TGF- β die Expression des eigenen Gens, was zu einer

positiven Rückkopplung führt (Partridge, et al., 2004). Die große Bedeutung des Zytokins lässt sich daran erkennen, dass fast alle menschlichen Zellen Rezeptoren für TGF- β besitzen (Worthington, et al., 2011).

TGF- β wird durch Bindung an das Latenz-assoziierte Propeptid (LAP) als inaktiver LAP-TGF- β -Komplex von den Zellen sezerniert. In der extrazellulären Matrix bindet der inaktive LAP-TGF- β -Komplex an das „latent TGF- β binding protein“ (LTBP), um für die spätere Aktivierung in der extrazellulären Matrix zu verbleiben (Worthington, et al., 2011). Bei der Aktivierung des latenten TGF- β kommt den Integrinen α V β 3, α V β 5, α V β 6 und α V β 8 eine entscheidende Rolle zu (Henderson & Sheppard, 2013), (Worthington, et al., 2011). Sie können durch Bindung an LAP, TGF- β aus seiner Bindung lösen. Das nun aktive TGF- β bindet an zelluläre Rezeptoren und induziert Signalkaskaden wie die vermehrte α -SMA-Expression (Bu, et al., 2015), (Hinz B., 2016), (Parapuram, et al., 2009), (Worthington, et al., 2011). Dadurch wird die Transdifferenzierung von Fibroblasten zu Myofibroblasten begünstigt (Bu, et al., 2015), (Hinz B., 2016), (Partridge, et al., 2004), (Worthington, et al., 2011). Nicht-Integrin-vermittelte Aktivierungsmechanismen wie LAP-Spaltung durch Serin- oder Matrixmetalloproteasen scheinen eine nur sehr geringe Bedeutung zu haben (Annes, et al., 2003), (Worthington, et al., 2011).

5.1.4 Anti-Galectin-1 und Anti-Galectin-3

Anti-Galectin-1 und anti-Galectin-3 ließen sich in unseren Untersuchungen bei Präparaten der idiopathischen epiretinalen Gliose und bei Präparaten der proliferativen Vitreoretinopathie immunzytochemisch stark positiv nachweisen. Auch anderen Arbeitsgruppen gelang der Nachweis von anti-Galectin-1 und anti-Galectin-3 in prämakulären Membranen bei proliferativer Vitreoretinopathie (Abu El-Asrar, et al., 2011), (Alge, et al., 2006), (Priglinger, et al., 2016). Bei idiopathischer epiretinaler Gliose wurden Galectin-Antikörper nach aktuellem Kenntnisstand noch nicht untersucht.

Galectine sind eine profibrotisch wirkende Proteingruppe, die an β -Galactoside binden und mindestens eine Kohlenhydrat-bindende Domäne aufweisen (Argüeso & Panjwani, 2011). Sie kommen im Zellkern, Zytoplasma, an der Zelloberfläche und in der extrazellulären Matrix vor (Argüeso & Panjwani, 2011), (Li, et al., 2014), (Partridge, et al., 2004). Je nach Lokalisation haben sie unterschiedliche Funktionen.

Galectin-1 ist an der Regulation von zellulärer Migration, Proliferation und Differenzierung beteiligt. Verbindungen mit den Matrixproteinen Laminin und Fibronectin sind beschrieben (Alge, et al., 2006), (Traber & Zomer, 2013). Durch eine vermehrte Expression in proliferierenden, dedifferenzierten retinalen Pigmentepithelzellen ist Galectin-1 in der Frühphase fibrotischer Prozesse von Bedeutung (Alge, et al., 2006). Die gesteigerte Expression von Galectin-1 unterstützt in der Pathogenese von proliferativer Vitreoretinopathie die Migration retinaler Pigmentepithelzellen in Laminin und Fibronectin enthaltenen Matrizen. Dies fördert die Entstehung traktiver sub- und prämakulärer Membranen (Alge, et al., 2006).

Intrazelluläres Galectin-3 schützt mithilfe Kohlenhydrat-unabhängiger Mechanismen die Zellen vor der Apoptose und fördert zugleich das Zellwachstum (Argüeso & Panjwani, 2011), (Priglinger, et al., 2016). Extrazelluläres Galectin-3 ist vor allem an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt (Argüeso & Panjwani, 2011), (Priglinger, et al., 2016), (Priglinger, et al., 2013). Zuletzt konnte gezeigt werden, dass Galectin-3 durch Aktivierung von Myofibroblasten besonders in der Frühphase fibrotischer Prozesse von Bedeutung zu sein scheint (Abu El-Asrar, et al., 2011), (Argüeso & Panjwani, 2011). Durch Verlängerung der Verweildauer der TGF- β -Rezeptoren an der Zelloberfläche (Partridge, et al., 2004), verstärkt Galectin-3 die profibrotische Wirkung von aktivem TGF- β , was in einer Neoexpression von α -SMA in Fibroblasten resultiert (Hinz B., 2016). Außerdem wurde beschrieben, dass transdifferenzierte, myofibroblasten-ähnliche retinale Pigmentepithelzellen im Gegensatz zu nativen retinalen Pigmentepithelzellen eine höhere Affinität zu Galectin-3 aufweisen (Priglinger, et al., 2016). Dies führt zu einer positiven Rückkopplung fibrotischer Prozesse. Darüberhinaus nimmt Galectin-3 auch in Integrin-vermittelten Signalwegen wie Zelladhäsion, -migration und -verteilung eine wichtige Funktion ein (Argüeso & Panjwani, 2011), (Partridge, et al., 2004), (Priglinger, et al., 2013).

5.1.5 Anti-Emmprin

Auch der Marker anti-Emmprin ließ sich sowohl bei idiopathischer epiretinaler Gliose als auch bei proliferativer Vitreoretinopathie stark positiv nachweisen. An prämakulären Membranen idiopathischer epiretinaler Gliose wurde dies bisher noch nicht untersucht. Bei proliferativer Vitreoretinopathie gelang einer Arbeitsgruppe

anhand eines in vitro Modells der Nachweis von Emmprin an der Plasmamembran von retinalen Pigmentepithelzellen (Priglinger, et al., 2013).

Emmprin ist ein multifunktionales Transmembranprotein aus der Gruppe der Immunglobuline (Nawroth, et al., 2010). Zusätzlich zur Plasmamembran kann Emmprin auch an der Golgimembran und am endoplasmatischen Retikulum vorkommen (Priglinger, et al., 2013). Die Bezeichnung EMMPRIN steht für *extracellular matrix metalloproteinase inducer*. In anderen Literaturquellen werden auch die Bezeichnungen „Tumor Collagenase Stimulatory Factor“ (TCSF), Hab18G, OX-47, Neurothelin, Basigin oder CD147 synonym verwendet (Nawroth, et al., 2010). Exprimiert wird Emmprin vor allem von Tumorzellen, Zellen des hämatopoetischen Systems, Epithel- und Endothelzellen (Nawroth, et al., 2010). Emmprin fungiert aber nicht nur als Transmembranprotein, sondern kann auch in Form von Mikrovesikeln in die extrazelluläre Matrix sezerniert werden und dort nahegelegene Zellen beeinflussen (Nawroth, et al., 2010). Funktionell sorgt Emmprin für die Expression verschiedener Proteine wie Matrixmetalloproteinasen (MMPs), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Hyaluronsäure (Nawroth, et al., 2010). Daneben kann Emmprin durch die Interaktion mit Integrin $\alpha 3\beta 1$ und Integrin $\alpha 6\beta 1$ die Zelladhäsion, Chemotaxis und Zellproliferation regulieren (Nawroth, et al., 2010). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass Emmprin fibrotische Umbauprozesse, wie sie bei prämakulären Membranen vorkommen, beeinflussen könnte. Im Auge ist Emmprin sowohl an der basolateralen als auch an der apikalen Plasmamembran der retinalen Pigmentepithelzellen zu finden und kommt sowohl bei differenzierten als auch bei dedifferenzierten retinalen Pigmentepithelzellen vor (Bonilha, et al., 2006), (Priglinger, et al., 2013). In diesem Zusammenhang wurde Emmprin als Transmembranrezeptor für Galectin-3 identifiziert (Priglinger, et al., 2013). Aber auch in der Plasmamembran von Müllerzellen und retinaler Mikroglia ist Emmprin lokalisiert (Hanna, et al., 2003), (Priglinger, et al., 2013), (Yin, et al., 2017). Dies könnte die positive Immunreaktivität bei Präparaten der idiopathischen epiretinalen Gliose erklären.

5.1.6 Anti-Isolectin B4 (anti-ILB4), anti-IBA-1 und anti-Ricinus communis agglutinin I (anti-RCA I)

Anti-Isolectin B4 (Anti-ILB4), anti-IBA-1 und anti-Ricinus communis agglutinin I (anti-RCA I) sind Marker für (retinale) Mikrogliazellen und konnten sowohl bei den

Präparaten der idiopathischen epiretinalen Gliose als auch der proliferativen Vitreoretinopathie sehr stark positiv nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit der aktuellen Literatur überein. Über das Vorkommen von Mikrogliazellen bei idiopathischer epiretinaler Gliose ist bisher erst wenig bekannt. In Voruntersuchungen konnten aber bereits mittels Anti-RCA I deren Vorkommen in idiopathischen prämakulären Membranen nachwiesen werden (Oberstein, et al., 2011). Auch bei Präparaten idiopathischer Makulaforamen Stadium III und IV wurden Mikrogliazellen gefunden (Schumann, et al., 2011). Bei der proliferativen Vitreoretinopathie wurde ebenfalls das Vorkommen von Mikrogliazellen in prämakulären Membranen beschrieben (McGillem & Dacheux, 1998), (Oberstein, et al., 2011), (Weller, et al., 1992), (Weller, et al., 1991).

Mikrogliazellen sind mesodermalen Ursprungs, weisen eine amoeboiden Morphologie auf und agieren als ortsansässige Immunzellen des zentralen Nervensystems und der Retina (Kettenmann, et al., 2011), (McGillem & Dacheux, 1998). Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Migration (meist entlang von Blutgefäßen), Proliferation und Phagozytose werden Mikrogliazellen oft als die „Makrophagen des zentralen Nervensystems“ bezeichnet (Kettenmann, et al., 2011). An Hasenaugen konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen physiologisch in 3 Schichten der Retina vorkommen: auf der vitrealen Seite der Nervenfaserschicht, sowie in der inneren und äußeren plexiformen Schicht (McGillem & Dacheux, 1998). Bereits 1991 konnten Weller et al. das Vorhandensein von Mikrogliazellen bei proliferativer Vitreoretinopathie nachweisen (Weller, et al., 1991). Bei der proliferativen Vitreoretinopathie scheinen Mikrogliazellen vor allem phagozytische und lokal immunmodulierende Aufgaben einzunehmen (Weller, et al., 1991). Zudem exprimieren aktivierte Mikrogliazellen das Filament Vimentin und produzieren vermehrt Zytokine wie Interleukin-1 und TGF- β (McGillem & Dacheux, 1998), (Weller, et al., 1991). TGF- β führt wiederum zur Neoexpression von α -SMA in transdifferenzierten Myofibroblasten, die durch Produktion von extrazellulärer Matrix sowie durch ihre kontraktile Fähigkeit zur Pathogenese prämakulärer Membranen beitragen (Hinz B., 2016). Über diesen Mechanismus wirken aktivierte Mikrogliazellen in der vitreoretinalen Grenzfläche profibrotisch. Mögliche Stimuli für die Migration und Proliferation von retinaler Mikroglia könnten Interleukin-1 und -3, Aktivierung durch Müllerzellen, fokale Laserkoagulation, Photorezeptordegeneration und Entzündungen sein (McGillem & Dacheux, 1998), (Weller, et al., 1991).

5.1.7 Anti-Ulex europaeus agglutinin I (Anti-UEA I)

Ulex europaeus agglutinin I (UEA-I) ist ein pflanzliches Glykoprotein, welches aus den Samen der Furze Ginsterpflanze gewonnen wird (Lekowski, et al., 2001). Anti-UEA-I bindet an Endothelzellen, die keinem oxidativen Stress ausgesetzt sind, und kann somit als physiologischer Endothelzellmarker fungieren (Lekowski, et al., 2001).

Bisher wurden bei prämakulären Membranen der idiopathischen epiretinalen Gliose und proliferativen Vitreoretinopathie vor allem die zellulären und extrazellulären Bestandteile beschrieben und den Gefäßen wenig Bedeutung geschenkt. In den prämakulären Membranen der proliferativen Vitreoretinopathie lassen sich jedoch auch kapillare Gefäße nachweisen, die klinisch allerdings äußerst selten in Erscheinung treten (Asiyo-Vogel, et al., 1998). Asiyo-Vogel et al. konnten bei 28.6% der von Ihnen untersuchten Membranen der proliferativen Vitreoretinopathie Endothelzellen durch positive Immunfärbung mit anti-UEA I und anti-Ricinus communis agglutinin I (anti-RCA I) nachweisen (Asiyo-Vogel, et al., 1998). Im Einklang dazu zeigte sich in unseren Untersuchungen bei einzelnen Präparaten der proliferativen Vitreoretinopathie eine positive immunzytochemische Reaktion auf anti-UEA I. Aber auch in Präparaten der idiopathischen epiretinalen Gliose fanden sich vereinzelt positive Reaktionen. Dies gibt Hinweis darauf, dass nicht nur bei der proliferativen Vitreoretinopathie, sondern auch bei der idiopathischen epiretinalen Gliose Endothelzellen beziehungsweise Gefäße vorhanden zu sein scheinen.

5.1.8 Anti-Glial fibrillary acidic protein (Anti-GFAP)

Der Marker anti-GFAP ließ sich bei fast allen Präparaten der idiopathischen epiretinalen Gliose deutlich positiv nachweisen. Bei Präparaten der proliferativen Vitreoretinopathie war anti-GFAP nur vereinzelt positiv.

„Glial Fibrillary Acidic Protein“ (GFAP) ist als Intermediärfilament im Zytoskelett von Makrogliazellen zu finden (Middeldorp & Hol, 2011). Das Vorkommen von Makrogliazellen in idiopathischen prämakulären Membranen wurde bereits in einigen Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt (Gandorfer, et al., 2014), (Haritoglou, et al., 2007), (Zhao, et al., 2013) und stimmt mit der Literatur überein (Bu, et al., 2015), (Feist, et al., 2014), (Kritzenberger, et al., 2011), (Okada, et al., 1995), (Sebag, 2015). In prämakulären Membranen der idiopathischen epiretinalen Gliose scheinen Makrogliazellen wie

Astrozyten oder Müllerzellen als Vorläuferzellen von Myofibroblasten zu fungieren (Bu, et al., 2015), (Feist, et al., 2014), (Zhao, et al., 2013).

Auch in prämakulären Membranen der proliferativen Vitreoretinopathie ließen sich bereits GFAP-positive Zellen nachweisen (Casaroli-Marano, et al., 1999), (Hiscott, et al., 1984), (Hiscott, et al., 1989), (Sethi, et al., 2005), (Yamashita, et al., 1985). Casaroli-Marano und Kollegen postulierten, dass in Membranen der proliferativen Vitreoretinopathie nicht nur Makrogliazellen, sondern auch dedifferenzierte retinale Pigmentepithelzellen GFAP exprimieren können. Gestützt wird die These durch den gleichzeitigen Nachweis von Zellen, die Intermediärfilamente GFAP, Zytokeratine und Vimentin enthielten (Casaroli-Marano, et al., 1999).

5.1.9 Anti-Cytokeratin-8 (Anti-CK-8)

Cytokeratin-8 (CK-8) ist ein Intermediärfilament im Zytoskelett retinaler Pigmentepithelzellen (Casaroli-Marano, et al., 1999), (Sirén, et al., 1990), (Weller, et al., 1991), (Wonodirekso, et al., 1993) und wurde in unserer Arbeit als Marker des retinalen Pigmentepithels nur bei den Präparaten der proliferativen Vitreoretinopathie deutlich positiv nachgewiesen. Dies stimmt mit anderen Arbeiten überein, die retinale Pigmentepithelzellen bei Membranen der proliferativen Vitreoretinopathie als Hauptzelltyp identifizierten. Nach aktuellen Untersuchungen stellen retinale Pigmentepithelzellen bei der proliferativen Vitreoretinopathie die Hauptvorläuferzellen der Myofibroblasten dar (Casaroli-Marano, et al., 1999), (Hinz B., 2016), (Priglinger, et al., 2016).

Bei Präparaten der idiopathischen epiretinalen Gliose konnte keine positive Immunfluoreszenzreaktion für anti-CK-8 gefunden werden.

5.1.10 Anti-Kollagen-1

Der Marker anti-Kollagen-1 konnte bei fast allen Präparaten der idiopathischen epiretinalen Gliose und der proliferativen Vitreoretinopathie nachgewiesen werden. Auch Okada et al. und Kritzenberger et al. konnten Kollagen-1 immunhistochemisch bei idiopathischen prämakulären Membranen nachweisen (Kritzenberger, et al., 2011), (Okada, et al., 1995). Ebenfalls nachgewiesen wurde Kollagen-1 bei prämakulären Proliferationen bei Makulaschichtforamen und Pseudofoamen der Makula (Compera,

et al., 2015). Robbins et al. beschrieben bereits im Jahre 1994, dass Kollagen-1 ein Bestandteil der extrazellulären Matrix von prämakulären Membranen bei proliferativer Vitreoretinopathie ist (Robbins, et al., 1994).

Als wasserunlösliche Proteine bilden die Kollagene einen Großteil der extrazellulären Matrix. Heutzutage sind 26 unterschiedliche Kollagentypen bekannt, von denen 22 im Auge zu finden sind (Ihanamäki, et al., 2004). Im Glaskörper finden sich Kollagen Typ II, VI, IX und V/XI (Bishop, 2009), (Ihanamäki, et al., 2004), (Schumann, et al., 2015). In der Retina lassen sich folgende Kollagentypen nachweisen: I, II, III, IV, V, VI, IX, XIII, XVIII, XXIII und XXIV (Gandorfer, et al., 2009), (Heegaard, 1997), (Ihanamäki, et al., 2004). In prämakulären Membranen sind neben Kollagen Typ I auch die Typen II, III, IV, V und VI zu finden (Bu, et al., 2015), (Kritzenberger, et al., 2011), (Morino, et al., 1990), (Okada, et al., 1995), (Robbins, et al., 1994), (Scheiffarth, et al., 1988). Kollagen Typ I wird überwiegend von Myofibroblasten sezerniert und bildet den Großteil der extrazellulären Matrix (Feist, et al., 2014), (Kritzenberger, et al., 2011).

Bei der idiopathischen epiretinalen Gliose scheint sich die Kollagenzusammensetzung je nach Ausprägungsgrad der prämakulären Membran zu verändern (Kritzenberger, et al., 2011). Im Anfangsstadium der idiopathischen epiretinalen Gliose findet sich vor allem Kollagen Typ VI. Im Gegensatz dazu dominieren bei der fortgeschrittenen Form, dem Macular Pucker, Kollagen Typ I und II. Kollagen VI findet sich seltener. Da fibrilläre Kollagenpräzipitate bei kollagenolytischen Umbauprozessen entstehen und aus Kollagen Typ VI Fibrillen bestehen, erklärt sich dadurch deren häufiges Vorkommen bei idiopathischer epiretinaler Gliose (Kritzenberger, et al., 2011), (Schumann, et al., 2015).

In prämakulären Membranen der proliferativen Vitreoretinopathie lässt sich neben Kollagen I auch vereinzelt Kollagen II nachweisen (Feist, et al., 2014). Eingebettet in Kollagen I-reiche extrazelluläre Matrix lassen sich vor allem retinale Pigmentepithel- und Gliazellen nachweisen (Feist, et al., 2014). Diese stellen nach heutigen Erkenntnissen die Hauptvorläuferzellen der Myofibroblasten bei proliferativer Vitreoretinopathie dar (Feist, et al., 2014).

Darüberhinaus zeigte sich in unserer Arbeit bei Präparaten der idiopathischen epiretinalen Gliose und der proliferativen Vitreoretinopathie häufig eine Kollokalisierung von anti- α -SMA mit anti-Kollagen-1. Da Myofibroblasten die Hauptproduzenten von extrazellulärer Matrix in prämakulären Geweben darstellen, bedeutet dies den

Nachweis eines aktiven Myofibroblasten (Bu, et al., 2015), (Schumann, et al., 2015).

5.1.11 Anti-CD-45 und Anti-CD-64

Im Einklang zu anderen Arbeiten ließen sich auch in unserer Arbeit die beiden Hyalozytenmarker anti-CD-45 und anti-CD-64 bei allen Präparaten der idiopathischen epiretinalen Gliose positiv nachweisen (Schumann, et al., 2014), (Zhao, et al., 2013).

Hyalozyten haben ihren Ursprung im Knochenmark, entsprechen den lokalen Glaskörperzellen und sind zur Phagozytose fähig (Schumann, et al., 2014), (Sebag, 2015), (Zhao, et al., 2013). In gesunden Augen befinden sich Hyalozyten als Monolayer etwa 20-50 µm von der inneren Grenzmembran entfernt in der Glaskörpergrenzmembran (Schumann, et al., 2014), (Sebag, 2015). Durch inkomplette hintere Glaskörperabhebung, die Vitreoschisis, können in Glaskörperkollagen eingebettete Hyalozyten auf der inneren Grenzmembran verbleiben und proliferieren (Sebag, 2015), (Sebag, 2008). Als mögliche Vorläuferzellen für Myofibroblasten spielen sie deshalb eine wichtige Rolle bei der Entstehung vitreoretinaler Erkrankungen (Haritoglou, et al., 2014), (Zhao, et al., 2013).

Bei den Membranen der proliferativen Vitreoretinopathie ließen sich anti-CD45 und anti-CD64 nicht nachweisen. Dies entspricht den bisherigen Annahmen, dass Hyalozyten im Gegensatz zu den Zellen des retinalen Pigmentepithels bei prämakulären Membranen bei proliferativer Vitreoretinopathie kaum eine Rolle spielen (Alge, et al., 2006), (Chen, et al., 2014), (Parapuram, et al., 2009).

5.2 Ultrastrukturelle Beschreibungen

Die ultrastrukturelle Beurteilung der Präparate via Transmissionselektronenmikroskopie zeigte, dass sich die prämakulären Membranen sowohl aus verschiedenen zellulären als auch aus extrazellulären Bestandteilen zusammensetzen. Hiscott et al. beschrieben bereits im Jahre 1983 das Vorkommen von Gliazellen, retinalen Pigmentepithelzellen, Fibroblasten, Hyalozyten und auch fibrotischen Arealen auf prämakulären Membranen in vitro (Hiscott, et al., 1983). Zudem scheint sich die Zusammensetzung der prämakulären Membranen mit zunehmender Krankheitsdauer zu verändern: Während sich erst kurz bestehende Membranen als sehr zellreich, proliferativ und weniger fibrotisch erwiesen, zeigten „ältere“ Membranen

ein gegenteiliges Bild mit mehr Fibrose und weniger zellulären Bestandteilen (Hiscott, et al., 1983). Mit diesem Wissen, kann man die Theorie, dass es sich bei prämakulären Membranen um eine überschießende Wundheilungsstörung handelt, gut nachvollziehen, da auch die physiologische Wundheilung mit dem Einwandern von Myofibroblasten beginnt (Hinz B., 2016), (Kritzenberger, et al., 2011).

Bei der idiopathischen epiretinalen Gliose konnten wir elektronenmikroskopisch neben Myofibroblasten vor allem Hyalozyten und Fibroblasten nachweisen. In der Literatur wird zudem das Vorkommen von Müllerzellen, Mikrogliazellen und Astrozyten beschrieben (Gandorfer, et al., 2014), (Kampik, et al., 1980), (Zhao, et al., 2013). Die Hyalozyten verbleiben während der anomalen altersbedingten hinteren Glaskörperabhebung durch Vitreoschisis in der vitreoretinalen Grenzfläche und beginnen dort zu proliferieren (Sebag, et al., 2014).

Die Präparate der proliferativen Vitreoretinopathie enthielten neben Myofibroblasten vor allem Zellen des retinalen Pigmentepithels. In weiteren Studien konnten zusätzlich Gliazellen und Fibroblasten nachgewiesen werden (Alge, et al., 2006). Den retinalen Pigmentepithelzellen kommt aufgrund ihrer großen Anzahl und ihrer proliferativen Eigenschaften eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Membranen der proliferativen Vitreoretinopathie zu (Alge, et al., 2006). Unter physiologischen Umständen befinden sich retinale Pigmentepithelzellen als Monolayer zwischen der Photorezeptorschicht und der Bruch-Membran. Durch Verletzungen, wie sie bei einer Netzhautablösung entstehen können, gelangen retinale Pigmentepithelzellen unter anderem in die vitreoretinale Grenzfläche (Alge, et al., 2006). Durch Zytokine wie Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Transforming Growth Factor- β (TGF- β) und Platelet-derived Growth Factor (PDGF) können durch epithelial-mesenchymale Transition (EMT) aus retinalen Pigmentepithelzellen Fibroblasten entstehen (Alge, et al., 2006). Diese Fibroblasten weisen ein erhöhtes proliferatives Potenzial auf und können zu Myofibroblasten transdifferenzieren (Alge, et al., 2006), (Hinz B., 2016).

5.3 Anti-proliferative Therapieansätze

Als einziges therapeutisches Vorgehen zur Behandlung prämakulärer Membranen traktiver Makulopathien steht derzeit die operative Intervention mit Entfernung der

inneren Grenzmembran und der prämakulären Gewebes von der Oberfläche der Netzhaut zur Verfügung (Haritoglou, et al., 2014), (Schaub, Enders, & Fauser, 2016). Dieses sogenannte „Peeling“ von innerer Grenzmembran und prämakulären Gewebes ist ein diffiziles Verfahren mit entsprechenden Risiken. Medikamentöse anti-Fibrose Therapiestrategien zur Behandlung oder gar Verhinderung der Entstehung prämakulärer Membranen sind derzeit noch nicht möglich und sind deshalb von besonderem Interesse (Alge, et al., 2006), (Priglinger, et al., 2013).

Aber nicht nur in der Augenheilkunde, sondern auch in vielen anderen Fachbereichen wie der Pulmologie, Hepatologie, Nephrologie und Kardiologie kommt der Anti-Fibrose-Forschung eine wichtige Rolle zu. Deshalb gilt es, pharmakologische Therapieansätze zu finden, sowie Untersuchungen und Ergebnisse aus anderen Fachbereichen zu prüfen, weiter zu entwickeln und auf die Ophthalmologie zu übertragen.

Hemmung der Transdifferenzierung

Da Myofibroblasten in der Pathogenese prämakulärer Membranen als Hauptzelltyp identifiziert wurden, kommt der Hemmung der Transdifferenzierung von Myofibroblasten aus Vorläuferzellen eine wichtige Rolle zu. Ein erster Ansatz lag hierbei in der Hemmung von TGF- β als potenzielle antifibrotische Zielstruktur (Hinz B., 2016). In der epithelial-mesenchymalen Transition von Progenitorzellen zu Myofibroblasten, fördert das Zytokin TGF- β die Neoexpression von α -SMA in Fibroblasten (Hinz B., 2016), (Rønnov-Jessen & Petersen, 1993). Durch Inhibition von TGF- β wurde in mehreren Tierversuchen eine Reduktion der Fibrose gezeigt (Hinz B., 2016), (Møller-Pedersen, et al., 1998). Møller-Pedersen und Kollegen demonstrierten 1998 im Tiermodell, dass die Therapie mit einem TGF- β -Antikörper im Rahmen einer photorefraktiven Keratektomie die epithelial-mesenchymale Transition und stromale Fibrose reduzierte (Møller-Pedersen, et al., 1998).

Des Weiteren scheint der Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDAC-Inhibitor) Trichostatin A einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation retinaler Pigmentepithelzellen und deren TGF- β 2-vermittelte Kontraktion und Migration zu haben, da die Acetylierung bei der Aktivierung von retinalen Pigmentepithelzellen eine entscheidende Rolle spielt (Por, et al., 2016). Auch dieser Ansatz scheint erfolgsversprechend zu sein, muss aber noch klinisch erprobt werden.

TGF- β ist jedoch nicht nur profibrotisch wirksam, sondern reguliert im Rahmen der physiologischen Wundheilung auch die Homöostase von Epidermis-, Gefäß- und Immunzellen (Hinz B., 2013). So wurde gezeigt, dass knock-out Mäuse ohne TGF- β 1 starke Infektionen von Haut und Lunge entwickelten und zudem eine unvollständige Vaskulogenese zeigten (Hinz B., 2016), (Shull, et al., 1992). Außerdem wird den TGF- β -Inhibitoren durch ihre antiproliferative Wirkung auf Epithelzellen auch eine erhöhte Karzinogenität zugeschrieben. Dies sind Gründe, warum trotz vielversprechender Ergebnisse im Tiermodell und auch in der Zellkultur eine anti-fibrotische Therapie mit TGF- β -Inhibitoren nicht empfohlen wird (Henderson & Sheppard, 2013), (Hinz B., 2016).

Hemmung von TGF- β -aktivierenden Integrinen

Neuere Therapieansätze werden in der Hemmung der Signalkaskade von TGF- β gesucht. Eine vielversprechende Möglichkeit scheint die Inhibition von TGF- β -aktivierenden Integrinen zu sein. Hierzu zählen die Integrine α V β 3, α V β 5, α V β 6 und α V β 8 (Henderson & Sheppard, 2013), (Hinz B., 2013), (Hinz B., 2016). Henderson und Sheppard konnten bereits in Tierversuchen an knock-out Mäusen zeigen, dass durch Ausschalten der α V-Integrine in Perizyten eine künstlich induzierte Fibrose in Lunge, Leber und Niere ausblieb (Henderson & Sheppard, 2013), (Hinz B., 2016). Auch Mamuya und Kollegen legten dar, dass durch knockout der α V-Integrine in Linsenzellen von Mäusen weniger Myofibroblasten durch epithelial-mesenchymale Transition entstehen (Mamuya, et al., 2014). Dabei scheint besonders das Integrin α V β 6 eine besondere Rolle zu spielen. Die spezifische Blockade von Integrin α V β 6 lieferte die therapeutisch vielversprechendsten Ergebnisse in Bezug auf Reduktion von Fibrose in Leber, Niere und Lunge (Henderson & Sheppard, 2013). Aus diesem Grund wurde ein humanisierter, monoklonaler Antikörper gegen Integrin α V β 6 mit dem Namen BG00011 (auch STX-100) von Juli 2012 bis März 2017 in einer doppelblinden, randomisierten Studie der Phase 2 an Patienten mit idiopathischer Lungenfibrose getestet (Biogen, 2017). Die aktuellen Ergebnisse dieser Studie stehen derzeit noch aus und werden hoffentlich bald veröffentlicht. Sollten sich hierbei die bisherigen positiven Ergebnisse der Voruntersuchungen bestätigen, stellt eine Testung des Antikörpers in vitreoretinalen Pathologien eine neue interessante Möglichkeit dar. Unerwünschte Nebenwirkungen scheinen Inhibitoren der α V Integrine kaum aufwiesen. Dennoch müssen weitere Untersuchungen folgen, da beispielsweise die Expression von Integrin α V β 6 - gegen

welches BG00011 gerichtet ist - in Hornhautepithelzellen unabdingbar für eine normale Wundheilung ist (Blanco-Mezquita, et al., 2011).

Inhibition von Galectin-3

Daneben stellen Galectin-3-Inhibitoren einen weiteren Therapieansatz zur Reduktion von Fibrose dar. Galectin-3, früher bekannt unter dem Namen Mac-2 Antigen, aktiviert profibrotische Faktoren und ist auf diese Weise an der parenchymalen Fibrose von Leber, Niere, Lunge, Blutgefäßen und Herz beteiligt (Li, et al., 2014), (Traber & Zomer, 2013). Mittels der Galectin-3 bindenden Medikamente GM-CT-01 (Galactomannan) und GR-MD-02 (Galactoarabino-rhamnogalaturonan) konnte im Tierversuch an Mäusen mit nicht-alkoholischer Steatohepatitis (NASH) eine Reduktion von Fibrose erzielt werden (Traber & Zomer, 2013). Vor allem GR-MD-02 zeigte eine signifikante Abnahme der NASH-Aktivität und auch der Kollagenproduktion (Traber & Zomer, 2013). Zudem wurde eine Reduktion der α -SMA Expression, welches in der Leber als Marker für aktivierte, Kollagen-produzierende Sternzellen gilt, dokumentiert (Traber & Zomer, 2013). Hierbei war das positive Outcome unabhängig vom Zeitpunkt der Therapie. GR-MD-02 zeigte sowohl bei frühem als auch spätem Therapiebeginn eine Fibrose-reduzierende Wirkung (Traber & Zomer, 2013). Auch bei anderen fibrotischen Erkrankungen der Leber wie der Thioacetamid-induzierten Leberkrankheit erzielten die Galectin-3-Inhibitoren GM-CT-01 und GR-MD-02 eine Fibrose-reduzierende Wirkung (Traber, et al., 2013). Diese vielversprechenden Ergebnisse lassen auch auf eine positive Wirkung am Auge hoffen, was in zukünftigen Studien getestet werden muss.

5.4 Schlussfolgerungen

Die Pathogenese von prämakulären Membranen, die bei idiopathischer epiretinaler Gliose und bei proliferativer Vitreoretinopathie vorkommen, weist unterschiedliche Entstehungsmechanismen auf. Dies stimmt mit unseren Untersuchungen überein, da wir Unterschiede in der Zellzusammensetzung präsentieren. In unserer Analyse dominierten in prämakulären Membranen von idiopathischer epiretinaler Gliose Myofibroblasten, Gliazellen und Fibroblasten. In prämakulären Membranen bei proliferativer Vitreoretinopathie wurden retinale Pigmentepithelzellen und

Myofibroblasten als vorwiegende Zelltypen gefunden.

Beiden Entitäten ist jedoch die Transdifferenzierung von Vorläuferzellen in Myofibroblasten gemeinsam. An fibrotischen Prozessen beteiligte spezifische immunzytochemische Marker wurden sowohl in Präparaten bei idiopathischer epiretinaler Gliose als auch in Präparaten bei proliferativer Vitreoretinopathie beobachtet. Eine starke positive Immunoreaktivität von anti- α -SMA, anti-Integrin $\alpha\beta 3$, anti-Galectin, anti-IBA1, anti-Emmprin, anti-RCA I und anti-Kollagen-1 wurde bei beiden Entitäten nachgewiesen.

Dies gibt Hinweise darauf, dass diese beiden fibrotischen Erkrankungen trotz unterschiedlicher Pathogenese auch Gemeinsamkeiten aufweisen.

6 Zusammenfassung

Die idiopathische epiretinale Gliose und proliferative Vitreoretinopathie betreffen als traktive Makulopathien die Stelle des schärften Sehens und können bei den betroffenen Patienten Verzerrtsehen und Visusverlust verursachen. Durch die Ausbildung vitreomakulärer Zugkräfte führen sie zu prä-, intra- und subretinalen Veränderungen. Ursächlich hierfür ist die Ausbildung pathologischer, mehrschichtiger Zell- und Kollagenansammlungen, sogenannte prämakuläre Membranen, die sich an der anatomischen Grenze zwischen Glaskörper und innerer Grenzmembran der Netzhaut im Bereich der Makula ausbilden. Die operative Entfernung ist derzeit die einzige erfolgsversprechende Therapieoption. Da medikamentöse anti-Fibrose-Therapiestrategien zur Behandlung oder gar Verhinderung der Entstehung von prämakulären Membranen derzeit noch nicht zur Verfügung stehen, ist die Entwicklung pharmakologischer Therapieansätze von zentraler Bedeutung.

Ziel unserer Arbeit war deshalb, chirurgisch exzidierte prämakuläre von Patienten mit idiopathischer epiretinale Gliose und proliferativer Vitreoretinopathie immunzytochemisch und ultrastrukturell zu untersuchen und zu vergleichen. Dabei kam der Testung neuer anti-fibrotischer Immunmarker eine wesentliche Rolle zu.

Eingeschlossen wurden 28 chirurgisch exzidierte prämakuläre von 28 Patienten (16 Augen mit idiopathischer epiretinale Gliose und 12 Augen mit proliferativer Vitreoretinopathie), die zwischen Mai 2014 und April 2015 in der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München mittels pars plana Vitrektomie und Peeling von ILM und prämakulären Gewebes gewonnenen wurden. Nach Aufarbeitung für die Flachpräparation erfolgte eine Analyse mittels Phasenkontrast-, Interferenz-, Immunfluoreszenz- und Elektronenmikroskopie. Für die Immunzytologie wurden 20 verschiedene primäre Antikörper verwendet. Zudem wurden die klinischen Daten der Patienten retrospektiv ausgewertet und korreliert. Zum Zeitpunkt der Operation betrug das Durchschnittsalter der Patienten mit idiopathischer epiretinale Gliose 74 ± 9 SD Jahre und bei Patienten mit proliferativer Vitreoretinopathie 59 ± 23 SD Jahre. Die bestkorrigierte Sehschärfe betrug präoperativ im Mittel $0,49 \pm 0,14$ SD bei

idiopathischer epiretinaler Gliose beziehungsweise $1,11 \pm 0,67$ SD bei proliferativer Vitreoretinopathie. Postoperativ zeigte sich bei den Patienten mit idiopathischer epiretinaler Gliose eine Verbesserung der mittleren, bestkorrigierten Sehschärfe auf $0,29 \pm 0,31$ SD. Die mittlere, bestkorrigierte Sehschärfe der Patienten mit proliferativer Vitreoretinopathie zeigte postoperativ hingegen eine Verschlechterung auf $1,24 \pm 0,62$ SD.

Unsere immunhistochemischen und ultrastrukturellen Untersuchungen zeigen, dass Unterschiede in der Zellzusammensetzung bei chirurgisch exzidierten prämakulären Membranen von Augen mit idiopathischer epiretinaler Gliose und proliferativer Vitreoretinopathie bestehen. Bei beiden Entitäten wurde jedoch die Transdifferenzierung von Vorläuferzellen in Myofibroblasten gefunden. Spezifische immunhistochemische Marker, die an fibrotischen Prozessen beteiligt sind, wurden sowohl in Augen mit idiopathischer epiretinaler Gliose als auch in Augen mit proliferativer Vitreoretinopathie beobachtet. Bei beiden Augen wurde eine starke positive Immunoreaktivität von anti- α -SMA und anti-Integrin $\alpha\beta 3$ gefunden. Des Weiteren fand sich eine starke positive Färbung von anti-Galectin, anti-IBA1, anti-Emmprin, anti-RCA I und anti-Kollagen-1. Ultrastrukturell fanden sich bei Augen mit idiopathischer epiretinaler Gliose Myofibroblasten, Fibroblasten und Hyalozyten als prädominante Zelltypen, welche eingebettet in Glaskörperkollagen auf der inneren Grenzmembran zu finden waren. Vereinzelt ließen sich auch Makro- und Mikrogliazellen nachweisen. Bei der proliferativen Vitreoretinopathie ließen sich bei allen Präparaten Zellen des retinalen Pigmentepithels sowie Myofibroblasten nachweisen. Diese zeigten sich häufig von neu gebildetem Kollagen umgeben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei idiopathischer epiretinaler Gliose und proliferativer Vitreoretinopathie Unterschiede in der zellulären und extrazellulären Zusammensetzung bestehen. Nach aktuellem Kenntnisstand wird derzeit davon ausgegangen, dass Myofibroblasten der idiopathischen epiretinalen Gliose hauptsächlich aus Gliazellen, Hyalozyten und Fibroblasten transdifferenzieren. Bei der proliferativen Vitreoretinopathie bilden die Zellen des retinalen Pigmentepithels die Hauptvorläuferzellen der Myofibroblasten. Das gemeinsame Vorkommen der Transdifferenzierung von Myofibroblasten aus Vorläuferzellen bei sowohl

idiopathischer epiretinaler Gliose als auch proliferativer Vitreoretinopathie gibt jedoch Hinweise darauf, dass zelluläre Gemeinsamkeiten in der Pathogenese beider Entitäten bestehen. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass man mögliche Therapieansätze bei der proliferativen Vitreoretinopathie auf die idiopathische epiretinale Gliose übertragen kann. Mit dem Ziel, Möglichkeiten zur Anti-Fibrose-Behandlung aufzuzeigen, tragen unsere Ergebnisse zur Entwicklung neuer pharmakologischer Therapieansätze bei.

7 Literaturverzeichnis

1. Abu El-Asrar, A., Missotten, L., & Geboes, K. (2011). Expression of myofibroblast activation molecules in proliferative vitreoretinopathy epiretinal membranes. *Acta Ophthalmologica*, *89*, e115-e121.
2. Abu El-Asrar, A., Struyf, S., Kangave, D., Geboes, K., & Van Damme, J. (2006). Chemokines in proliferative diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy. *European Cytokine Network*, *17*, 155-165.
3. Abu El-Asrar, A., Struyf, S., Van Damme, J., & Geboes, K. (2008). Circulating fibrocytes contribute to the myofibroblast population in proliferative vitreoretinopathy epiretinal membranes. *British Journal of Ophthalmology*, *92*, 699-704.
4. Abu El-Asrar, A., Van den Steen, P., Al-Amro, S., Missotten, L., Opdenakker, G., & Geboes, K. (2007). Expression of angiogenic and fibrogenic factors in proliferative vitreoretinal disorders. *International Ophthalmology*, *27*, 11-22.
5. Ahmadiéh, H., Fegghi, M., Tabatabaei, H., & al., e. (2008). Triamcinolone acetonide in silicone-filled eyes as adjunctive treatment for proliferative vitreoretinopathy: a randomized clinical trial. *Ophthalmology* (115), 1938-1943.
6. Alavi, A., & Cheresh, D. (2008). Integrins in Angiogenesis. In W. Figg, & J. Folkman, *Angiogenesis: An Integrative Approach from Science to Medicine* (S. 63-76). New York: Springer Science & Business Media.
7. Alberts, B., Johnson, A., & Lewis, J. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science.
8. Alge, C., Priglinger, S., Kook, D., Schmid, H., Haritoglou, C., Welge-Lussen, U., et al. (2006). Galectin-1 Influences Migration of Retinal Pigment Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *47*, 415-426.
9. Annes, J., Munger, J., & Rifkin, D. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of cell science*, *116* (2), 217-224.
10. Appiah, A., Hirose, T., & Kado, M. (2005). A review of 324 cases of idiopathic premacular gliosis. *American Journal of Ophthalmology*, *140* (2), 288-294.
11. Araiz, J., Refojo, M., Arroyo, M., & al., e. (1993). Antiproliferative effect of retinoic acid in intravitreal silicone oil in an animal model of proliferative vitreoretinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (34), 522-530.
12. Argüeso, P., & Panjwani, N. (2011). Focus on Molecules: Galectin-3. *Experimental Eye Research*, *92*, 2-3.

13. Arimura, E., Matsumoto, C., Okuyama, S., Takada, S., Hashimoto, S., & Shimomura, Y. (2005). Retinal contraction and metamorphopsia scores in eyes with idiopathic epiretinal membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46 (8), 2961-2966.
14. Asiy-Vogel, M., El-Hifnawi, E., Bopp, S., & Laqua, H. (1998). The vascular component of proliferative vitreoretinopathy membranes: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Retina*, 56-61.
15. Balazs, E., & Denlinger, J. (1982). Aging changes in the vitreous. In R. Sekuler, K. Dismukes, & D. Kline, *Aging an human visual function. Vol 2: Modern Aging Research* (Bd. 2, S. 45-57). New York: Alan R Liss.
16. Banerjee, P., Charteris, D., & Wong, D. (2014). Pharmacotherapy of Proliferative Vitreoretinopathy. In J. Sebag, *Vitreous: in Health and Disease* (S. 523-536). New York: Sebag J.
17. Bauer, P., Zalis, M., Abdshill, H., Deierborg, T., Johansson, F., & Englund-Johansson, U. (2016). Inflamed In Vitro Retina: Cytotoxic Neuroinflammation and Galectin-3 Expression. *PLoS ONE*, 11 (9), e0161723.
18. Behrends, J., Bischofberger, J., Deutzmann, R., Ehmke, H., Frings, S., Grissmer, S., et al. (2012). *Duale Reihe Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
19. Beyazyildiz, Ö., Tirhis, M., Hekimoglu, E., Beyazyildiz, E., Kaymaz, F., Yilmazbas, P., et al. (2016). Histopathological analysis of internal limiting membrane surgically peeled from eyes with epiretinal membrane. *Current Eye Research*, 258-265.
20. Biogen. (11. August 2017). *STX-100 in Patients With Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF)*. Abgerufen am 24. Oktober 2017 von ClinicalTrials.gov: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01371305>
21. Bishop, P. (2009). Vitreous as a substrate for vitreolysis. *Developments in ophthalmology*, 44, 7-19.
22. Blanco-Mezquita, J., Hutcheon, A., Stepp, M., & Zieske, J. (2011). α V β 6 Integrin Promotes Corneal Wound Healing. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52 (11), 8505-8513.
23. Blanks, J., & Johnson, L. (1984). Specific Binding of Peanut Lectin to a Class of Retinal Photoreceptor Cells - A Species Comparison. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 25 (5), 546-557.
24. Blumenkranz, M., Hernandez, E., Ophir, A., & al., e. (1984). 5-fluorouracil: new applications in complicated retinal detachment for an established antimetabolite. *Ophthalmology* (91), 122-130.

25. Bochaton-Paillat, M.-L., Kapetanios, A., Donati, G., Redard, M., Gabbiani, G., & Pournaras, C. (2000). TGF- β 1, TGF- β Receptor II and ED-A Fibronectin Expression in Myofibroblast of Vitreoretinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41 (8), 2336-2342.
26. Bonilha, V., Rayborn, M., Bhattacharya, S., Gu, X., Crabb, J., Crabb, J., et al. (2006). THE RETINAL PIGMENT EPITHELIUM APICAL MICROVILLI AND RETINAL FUNCTION. *Advances in experimental medicine and biology*, 572, 519-524.
27. Boscia, F., Esposito, C., Casamassa, A., de Franciscis, V., Annunziato, L., & Cerchia, L. (2013). The isolectin IB4 binds RET receptor tyrosine kinase in microglia. *Journal of Neurochemistry*, 126 (4), 428-436.
28. Bu, S., Kuijjer, R., van der Worp, R., Postma, G., Renardel de Lavalette, V., Li, X., et al. (2015). Immunohistochemical Evaluation of Idiopathic Epiretinal Membranes and In Vitro Studies on the Effect of TGF- β on Müller Cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56 (11), 6506-6514.
29. Burk, A., & Burk, R. (2005). *Checkliste Augenheilkunde*. (S. 282 – 284). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
30. Burk, A., & Burk, R. (2014). *Checkliste Augenheilkunde*. (S. 290). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
31. Burk, A., & Burk, R. (2014). *Checkliste Augenheilkunde*. (S. 313 – 314). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
32. Casaroli-Marano, R., Pagan, R., & Vilaró, S. (1999). Epithelial–Mesenchymal Transition in Proliferative Vitreoretinopathy: Intermediate Filament Protein Expression in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2062-2072.
33. Chen, X., Xiao, W., Wang, W., Luo, L., Ye, S., & Liu, Y. (2014). The Complex Interplay between ERK1/2, TGF β /Smad, and Jagged/Notch Signaling Pathways in the Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in Retinal Pigment Epithelium Cells. *PLoS One*, 9 (5), e96365.
34. Ciprian, D. (2015). The pathogeny of proliferative vitreoretinopathy. *Romanian Journal of Ophthalmology*, 59 (2), 88-92.
35. Compera, D., Entchev, E., Haritoglou, C., Scheler, R., Mayer, W., Wolf, A., et al. (2015). Lamellar Hole-Associated Epiretinal Proliferation in Comparison to Epiretinal Membranes of Macular Pseudoholes. *American journal of ophthalmology*, 160 (2), 373-384.
36. Coupland, S., & Bechrakis, N. (2008). *Anatomie von Netzhaut, Aderhaut und Glaskörper*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

37. Danen, E. (2000-2013). Integrins: An Overview of Structural and Functional Aspects. *Madame Curie Bioscience Database* .
38. De Bustros, S., Thompson, J., Michels, R., Rice, T., & Glaser, B. (1988). Vitrectomy for idiopathic epiretinal membranes causing macular pucker. *British Journal of Ophthalmology* , 72 (9), 692-695.
39. de Freitas Zanon, C., Sonehara, N., Girol, A., Gil, C., & Oliani, S. (2015). Protective effects of the galectin-1 protein on in vivo and in vitro models of ocular inflammation. *Molecular Vision* , 21, 1036-1050.
40. Dehghan, M., Ahmadi, H., Soheilian, M., & al., e. (2010). Effect of oral prednisolone on visual outcomes and complications after scleral buckling. *European Journal of Ophthalmology* (20), 419-423.
41. Denlinger, J., & Balazs, E. (2014). Hyaluronan and other carbohydrates in the vitreous. *Vitreous in health and disease* , 13-20.
42. Do, D., Cho, M., Nguyen, Q., Shah, S., Handa, J., Campochiaro, P., et al. (2007). Impact of optical coherence tomography on surgical decision making for epiretinal membranes and vitreomacular traction. *Retina* , 27 (5), 552-556.
43. Du, Y., Hirooka, K., Miyamoto, O., Bao, Y., Zhang, B., An, J., et al. (2013). Retinoic Acid suppresses the adhesion and migration of human retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research* , 109, 22-30.
44. Eibl, K., Lewis, G., Betts, K., Linberg, K., Gandorfer, A., Kampik, A., et al. (2007). The Effect of Alkylphosphocholines on Intraretinal Proliferation Initiated by Experimental Retinal Detachment. *Investigative ophthalmology & visual science* , 48 (3), 1305-1311.
45. El-Bradey, M., Cheng, L., Bartsch, D., Niessman, M., El-Musharaf, A., & Freeman, W. (2004). The effect of prinomastat (AG3340), a potent inhibitor of matrix metalloproteinases, on a new animal model of epiretinal membrane. *Retina* , 24 (5), 783-789.
46. Falkenstein, I., Cheng, L., Wong-Staal, F., & al., e. (2008). Toxicity and intraocular properties of a novel long-acting anti-proliferative and anti-angiogenic compound IMS2186. *Current Eye Research* (33), 599-609.
47. Feist, R., King, J., Morris, R., Witherspoon, C., & Guidry, C. (2014). Myofibroblast and extracellular matrix origins in proliferative vitreoretinopathy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* , 252 (2), 347-357.
48. Foos, R., & Wheeler, N. (1982). Vitreoretinal juncture. Synchysis senilis and posterior vitreous detachment. *Ophthalmology* , 89 (12), 1502-1512.

49. Fraser-Bell, S., Guzowski, M., Rohtchina, E., Wang, J., & Mitchell, P. (2003). Five-year cumulative incidence and progression of epiretinal membranes: the Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology*, *110* (1), 34.
50. Friedlander, M., Theesfeld, C., Sugita, M., Fruttinger, M., Thomas, M., Chang, S., et al. (1996). Involvement of integrins alpha V beta 3 and alpha V beta 5 in ocular neovascular diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *93*, 9764-9769.
51. Gamulescu, M., Chen, Y., He, S., Spee, C., Jin, M., Ryan, S., et al. (2006). Transforming growth factor beta2-induced myofibroblastic differentiation of human retinal pigment epithelial cells: regulation by extracellular matrix proteins and hepatocyte growth factor. *Exp Eye Res*, *83*(1), 212-222.
52. Gandorfer, A., & Kampik, A. (2008). *Augenärztliche Differentialdiagnose*. Stuttgart: Kampik A, Grehn F.
53. Gandorfer, A., Haritoglou, C., Scheler, R., Schumann, R., & Kampik, A. (2012). Residual cellular proliferation on the internal limiting membrane in macular pucker surgery. *Retina*, *32*, 477-485.
54. Gandorfer, A., Rohleder, M., & Kampik, A. (2002). Epiretinal pathology of vitreomacular traction syndrome. *British Journal of Ophthalmology*, *86* (8), 902-909.
55. Gandorfer, A., Rohleder, M., Grosselfinger, S., Haritoglou, C., Ulbig, M., & Kampik, A. (2005). Epiretinal pathology of diffuse diabetic macular edema associated with vitreomacular traction. *American journal of ophthalmology*, *139* (4), 638-652.
56. Gandorfer, A., Scheler, R., Haritoglou, C., Schumann, R., Nentwich, M., & Kampik, A. (2009). Pathology of the macular hole rim in flat-mounted internal limiting membrane specimens. *Retina*, *29* (8), 1097-1105.
57. Gandorfer, A., Schumann, R., Haritoglou, C., & Kampik, A. (2014). Pathology of Vitreomaculopathies. In J. Sebag, *Vitreous in Health and Disease* (S. 265-286). New York: J. Sebag.
58. Gandorfer, A., Schumann, R., Scheler, R., Haritoglou, C., & Kampik, A. (2011). Pores of the inner limiting membrane in flat-mounted surgical specimens. *Retina*, *31*, 977-981.
59. Garweg, J., Tappeiner, C., & Halberstadt, M. (2013). Pathophysiology of proliferative vitreoretinopathy in retinal detachment. *Surv Ophthalmol*, *58*(4), 321-329.
60. Ghadially, F. N. (2013). *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix* (Bd. 2). London: Butterworth-Heinemann.
61. Gibran, S., Flemming, B., Stappler, T., Pearce, I., Groenewald, C., Heimann, H., et al. (2008). Peel and peel again. *British Journal of Ophthalmology*, *92* (3), 373-377.

62. Girach, A., & de Smet, M. (2013). *Diseases of the Vitreo-Macular Interface*. Berlin: Springer Science & Business Media.
63. Green, W. (2006). The macular hole: histopathologic studies. *Archives of ophthalmology*, 124 (3), 317-321.
64. Grehn, F. (2008). *Augenheilkunde*. Springer Verlag. (S. 258). Berlin: Grehn, F.
65. Grehn, F. (2011). Netzhaut. In F. Grehn, *Augenheilkunde* (31. Auflage Ausg., S. 219). Berlin: Grehn, F.
66. Grotz, B. (20. Oktober 2016). *Grund-Wissen*. Abgerufen am 20. Oktober 2016 von www.grund-wissen.de: http://www.grund-wissen.de/physik/_images/auge.png
67. Iverson, D., Katsura, H., Hartzler, M., & al., e. (1991). Inhibition of intraocular fibrin formation following infusion of low-molecular-weight heparin during vitrectomy. *Archives of Ophthalmology* (109), 405-409.
68. Gupta, P., Sadun, A., & Sebag, J. (2008). Multifocal retinal contraction in macular pucker analyzed by combined optical coherence tomography/scanning laser ophthalmoscopy. *Retina*, 28 (3), 447-452.
69. Gupta, P., Yee, K., Garcia, P., Rosen, R., Parikh, J., Hageman, G., et al. (2011). Vitreoschisis in macular diseases. *British Journal of Ophthalmology*, 95 (3), 376-380.
70. Hanna, S., Kirk, P., Holt, O., Puklavec, M., Brown, M., & Barclay, A. (2003). A novel form of the membrane protein CD147 that contains an extra Ig-like domain and interacts homophilically. *BMC biochemistry*, 4, 17.
71. Haritoglou, C., Schumann, R., & Wolf, A. (2014). Epiretinale Gliose. *Ophthalmologe*, 111, 485-497.
72. Haritoglou, C., Schumann, R., Kampik, A., & Gandorfer, A. (2007). Glial cell proliferation under the internal limiting membrane in a patient with cellophane maculopathy. *Archives of Ophthalmology*, 125 (9), 1301-1302.
73. Heegaard, S. (1997). Morphology of the vitreoretinal border region. *Acta Ophthalmol Scand Suppl.*, 1-31.
74. Heegaard, S. (1994). Structure of the human vitreoretinal border region. *Ophthalmologica*, 208, 82-91.
75. Heimann, H., & Kellner, U. (2010). *Atlas des Augenhintergrundes*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
76. Henderson, N., & Sheppard, D. (2013). Integrin-mediated regulation of TGF β in fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1832, 891-896.

77. Henrich, P., Monnier, C., Halfter, W., Haritoglou, C., Strauss, R., Lim, R., et al. (2012). Nanoscale Topographic and Biomechanical Studies of the Human Internal Limiting Membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53 (6), 2561-2570.
78. Hinz, B. (2013). It has to be the α : myofibroblast integrins activate latent TGF- β 1. *Nature medicine*, 19 (12), 1567-1568.
79. Hinz, B. (2010). The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *Journal of biomechanics*, 43 (1), 146-155.
80. Hinz, B., Phan, S., Thannickal, V., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., et al. (2012). Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *The American Journal of Pathology*, 180 (4), 1340-1355.
81. Hinz, B. (2016). Myofibroblasts. *Experimental Eye Research*, 56-70.
82. Hirayama, K., Hata, Y., Noda, Y., Miura, M., Yamanaka, I., Shimokawa, H., et al. (2004). The involvement of the rho-kinase pathway and its regulation in cytokine-induced collagen gel contraction by hyalocytes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 45 (11), 3896-3903.
83. Hiscott, P., Grierson, I., & McLeod, D. (1985). Natural history of fibrocellular epiretinal membranes: a quantitative, autoradiographic, and immunohistochemical study. *British Journal of Ophthalmology*, 69 (11), 810-823.
84. Hiscott, P., Grierson, I., Hitchins, C., Rahi, A., & McLeod, D. (1983). Epiretinal Membranes in Vitro. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom*, 89-102.
85. Hiscott, P., Grierson, I., Trombetta, C., Rahi, A., Marshall, J., & McLeod, D. (1984). Retinal and epiretinal glia-an immunohistochemical study. *British Journal of Ophthalmology*, 68 (10), 698-707.
86. Hiscott, P., Morino, I., Alexander, R., Grierson, I., & Gregor, Z. (1989). Cellular Components of Subretinal Membranes in Proliferative Vitreoretinopathy. *Eye*, 3, 606-610.
87. Hoerster, R., Hermann, M., Rosentreter, A., & al., e. (2013). Profibrotic cytokines in aqueous humour correlate with aqueous flare in patients with rhegmatogenous retinal detachment. *British Journal of Ophthalmology* (97), 450-453.
88. Hoffmann, S., He, S., Jin, M., Ehren, M., Wiedemann, P., Ryan, S., et al. (2005). A selective cyclic integrin antagonist blocks the integrin receptors α V β 3 and α V β 5 and inhibits retinal pigment epithelium cell attachment, migration and invasion. *BMC Ophthalmology*, 5 (16).

89. Holthöfer, H., Virtanen, I., Kariniemi, A., Hormia, M., Linder, E., & Miettinen, A. (1982). Uley europaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Laboratory Investigation*, 47 (1), 60-66.
90. Huppelsberg, J., & Walter, K. (2009). *Kurzlehrbuch Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
91. Huppelsberg, J., & Walter, K. (2009). *Kurzlehrbuch Physiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
92. Huppelsberg, J., & Walter, K. (2009). *Kurzlehrbuch Physiologie*. Stuttgart: Gerog Thieme Verlag KG.
93. Ihanamäki, T., Pelliniemi, L., & Vuorio, E. (2004). Collagens and collagen-related matrix components in the human and mouse eye. *Progress in retinal and eye research*, 23 (4), 403-434.
94. Johnson, M. (2005). Perifoveal vitreous detachment and its macular complications. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 103, 537-567.
95. Johnson, M. (2010). Posterior vitreous detachment: evolution and complications of its early stages. *American Journal of Ophthalmology*, 149 (3), 371-382.
96. Johnson, M. (2012). Posterior vitreous detachment: Evolution and role in macular disease. *Retina*, 32, 174-178.
97. Johnson, T., & Johnson, M. (2004). Epiretinal membrane. In M. Yanoff, & J. Duker, *Ophthalmology* (S. 686-687). St. Louis: Mosby: Yanoff M, Duker JS.
98. Jonas, J., Hayler, J., & Panda-Jonas, S. (2000). Intravitreal injection of crystalline cortisone as adjunctive treatment of proliferative vitreoretinopathy. *British Journal of Ophthalmology* (84), 1064-1067.
99. Kampik, A., Green, W., Michels, R., & Nase, P. (1980). Ultrastructural features of progressive idiopathic epiretinal membrane removed by vitreous surgery. *American Journal of Ophthalmology* (90), 797-809.
100. Kampik, A., Kenyon, K., Michels, R., Green, W., & de la Cruz, Z. (1981). Epiretinal and vitreous membranes: comparative study of 56 cases. *Archives of ophthalmology* (99), 1445-1454.
101. Kanski, J., & Bowling, B. (2012). *Klinische Ophthalmologie*. München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag.
102. Kanski, J. (2004). *Klinische Ophthalmologie* (5. Auflage Ausg.). München: Elsevier GmbH.
103. Kampik, A., & Grehn, F. (2002). *Augenärztliche Therapie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

104. Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of Microglia. *Physiological Reviews* , 461-553.
105. Khaja, H., McCannel, C., Diehl, N., & Mohny, B. (2008). Incidence and clinical characteristics of epiretinal membranes in children. *Archives of Ophthalmology* , 126 (5), 632.
106. Khaled, A. (2013). Lectin Binding in Normal Donkey Eyeball. *Veterinary Science Development* , 3 (1).
107. Khan, M., Brady, C., & Kaiser, R. (2015). Clinical management of proliferative vitreoretinopathy: an update. *Retina* (35), 165-175.
108. Kingston, Z., Provis, J., & Madigan, M. (2014). Development and Developmental Disorders of Vitreous. In J. Sebag, *Vitreous: in Health and Disease* (S. 95-111). New York: Sebag J.
109. Kishi, H., Mishima, H., & Yamashita, U. (1994). Growth regulation of retinal pigment epithelial (RPE) cells in vitro. *Curr Eye Res* , 13, 661-668.
110. Kishi, S., & Shimizu, K. (1994). Oval defect in detached posterior hyaloid membrane in idiopathic preretinal macular fibrosis. *American Journal of Ophthalmology* , 118 (4), 451.
111. Kita, T., Sakamoto, T., & Ishibashi, T. (2014). Hyalocytes: Essential Vitreous Cells in Vitreoretinal Health and Disease. In J. Sebag, *Vitreous: in Health and Disease* (S. 151-164). New York: Sebag J.
112. Klein, R., Klein, B., Wang, Q., & Moss, S. (1994). The epidemiology of epiretinal membranes. *Transactions of the American Ophthalmological Society Journal* , 92, 403.
113. Klingberg, F., Hinz, B., & White, E. (2013). The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis. *The Journal of Pathology* , 229 (2), 298-309.
114. Koerner, F., Koerner-Stiefbold, U., & Garweg, J. (2012). Systemic corticosteroids reduce the risk of cellophane membranes after retinal detachment surgery: a prospective randomized placebo-controlled double-blind clinical trial. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* (250), 981-987.
115. Kohno, R., Hata, Y., Kawahara, S., Kita, T., Arita, R., Mochizuki, Y., et al. (2009). Possible contribution of hyalocytes to idiopathic epiretinal membrane formation and its contraction. *British Journal of Ophthalmology* , 93 (8), 1020-1026.
116. Koide, H., Suganuma, T., Murata, F., & Ohba, N. (1986). Ultrastructural localization of lectin receptors in the monkey retinal photoreceptors and pigment epithelium: application of lectin-gold complexes in thin sections. *Experimental Eye Research* , 43 (3), 343-354.

117. Kon, C., Occeleston, N., Charteris, D., Daniels, J., Aylward, G., & Khaw, P. (1998). A prospective study of matrix metalloproteinases in proliferative vitreoretinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39 (8), 1524-1529.
118. Krebs, I., Glittenberg, C., Zeiler, F., & Binder, S. (2011). Spectral domain optical coherence tomography for higher precision in the evaluation of vitreoretinal adhesions in exudative age-related macular degeneration. *The British journal of ophthalmology*, 95 (10), 1415-1418.
119. Kritzenberger, M., Junglas, B., Framme, C., Helbig, H., Gabel, V.-P., Fuchshofer, R., et al. (2011). Different collagen types define two types of idiopathic epiretinal membranes. *Histopathology*, 953-965.
120. Kwok, A., Lai, T., Li, W., Woo, D., & Chan, N. (2004). Indocyanine green-assisted internal limiting membrane removal in epiretinal membrane surgery: a clinical and histologic study. *American Journal of Ophthalmology*, 138 (2), 194-199.
121. Lang, G. (2014). *Augenheilkunde* (5. Auflage Ausg., S 225, Abb. 12.2b). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
122. Lei, H., Velez, G., Cui, J., Samad, A., Maberley, D., Matsubara, J., et al. (2010). N-acetylcysteine suppresses retinal detachment in an experimental model of proliferative vitreoretinopathy. *American Journal of Pathology*, 177 (1), 132-140.
123. Lekowski, R., Collard, C., Reenstra, W., & Stahl, G. (2001). Ulex europaeus agglutinin II (UEA-II) is a novel, potent inhibitor of complement activation. *Protein Science*, 277-284.
124. Li, L., Li, J., & Gao, J. (2014). Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 351 (2), 336-343.
125. Lindner, B. (1966). Acute posterior vitreous detachment and its retinal complications. *Acta Ophthalmologica*, 87, 1-108.
126. Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Taschenlehrbuch Histologie*. (S. 118 – 123). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
127. Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Taschenlehrbuch Histologie*. (S. 572). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
128. Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Taschenlehrbuch Histologie*. (S. 580 – 581). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
129. Lüllmann-Rauch, R. (2009). *Taschenlehrbuch Histologie*. (S. 588 – 589). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

130. Lütjen-Drecoll, E., Kaufman, P., Wasielewski, R., Ting-Li, L., & Croft, M. (2010). Morphology and accommodative function of the vitreous zonule in human and monkey eyes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51, 1554-1564.
131. Mamuya, F., Wang, Y., Roop, V., Scheiblin, D., Zajac, J., & Duncan, M. (2014). The roles of alphaV integrins in lens EMT and posterior capsular opacification. *Journal of cellular and molecular medicine*, 656-670.
132. McCarty, D., Mukesh, B., Chikani, V., Wang, J., Mitchell, P., Taylor, H., et al. (2005). Prevalence and associations of epiretinal membranes in the visual impairment project. *American Journal of Ophthalmology*, 140 (5), 288-294.
133. McGillem, G., & Dacheux, R. (1998). Migration of Retinal Microglia in Experimental Proliferative Vitreoretinopathy. *Experimental Eye Research*, 67 (3), 371-375.
134. Mehta, S., Zhang, R., & Grossniklaus, H. (2014). Cell Proliferation at the Vitreoretinal Interface in Proliferative Vitreoretinopathy and Related Disorders. In J. Sebag, *Vitreous: in Health and Disease* (S. 395-405). New York: Sebag J.
135. Meister, P. (1998). Myofibroblasten. *Pathologe*, 19, 187-193.
136. Messmer, E., Heidenkummer, H., & Kampik, A. (1998). Ultrastructure of epiretinal membranes associated with macular holes. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 236 (4), 248-254.
137. Middeldorp, J., & Hol, E. (2011). GFAP in health and disease. *Progress in neurobiology*, 421-443.
138. Mitchell, P., Smith, E., Chey, T., Wang, J., & Chang, A. (1997). Prevalence and associations of epiretinal membranes. The Blue Mountains Eye Study, Australia. *Ophthalmology*, 104 (6), 1033.
139. Morino, I., Hiscott, P., McKechnie, N., & Grierson, I. (1990). Variation in epiretinal membrane components with clinical duration of the proliferative tissue. *The British journal of ophthalmology*, 74 (7), 393-399.
140. Møller-Pedersen, T., Cavanagh, H., Petroll, W., & Jester, J. (1998). Neutralizing antibody to TGFbeta modulates stromal fibrosis but not regression of photoablative effect following PRK. *Current eye research*, 736-747.
141. Nawroth, A., Hartmann, A., Wild, P., Lehmann, J., Stöhr, R., Gschwend, J., et al. (2010). EMMPRIN (CD147) A prognostic and potentially therapeutic marker in urothelial cancer. *Der Pathologe*, 31, 251-254.
142. Ng, C., Cheung, N., Wang, J., Islam, A., Kawasaki, R., Meuer, S., et al. (2011). Prevalence and risk factors for epiretinal membranes in a multi-ethnic United States population. *Ophthalmology*, 118 (4), 694-699.

143. Niwa, T., Terasaki, H., Kondo, M., Piao, C.-H., Suzuki, T., & Miyake, Y. (2003). Function and morphology of macula before and after removal of idiopathic epiretinal membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44 (4), 1652-1656.
144. Noda, Y., Yamazaki, S., Kawano, M., Goto, Y., Otsuka, S., & Ogura, Y. (2015). Prevalence of epiretinal membrane using optical coherence tomography. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*, 119(7), 445-450.
145. Novak, M., & Welch, R. (1984). Complications of acute symptomatic posterior vitreous detachment. *Am J Ophthalmol*, 97, 308-314.
146. O'Hare, M., Roberts, L., & Lord, J. (1992). Biological activity of recombinant Ricinus communis agglutinin A chain produced in Escherichia coli. *FEBS letters*, 209-212.
147. Oberstein, S., Byun, J., Herrera, D., Chapin, E., Fisher, S., & Lewis, G. (2011). Cell proliferation in human epiretinal membranes: characterization of cell types and correlation with disease condition and duration. *Molecular Vision*, 17, 1794-1805.
148. Okada, M., Ogino, N., Matsumura, M., Honda, Y., & Nagai, Y. (1995). Histological and immunohistochemical study of idiopathic epiretinal membrane. *Ophthalmic research*, 27 (2), 118-128.
149. Okamoto, F., Sugiura, Y., Okamoto, Y., Hiraoka, T., & Oshika, T. (2012). Associations between metamorphopsia and foveal microstructure in patients with epiretinal membrane. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53 (11), 6770-6775.
150. Omarova, S., Charvet, C., Reem, R., Mast, N., Zheng, W., Huang, S., et al. (2012). Abnormal vascularization in mouse retina with dysregulated retinal cholesterol homeostasis. *The Journal of Clinical Investigation*, 122 (8), 3012-3023.
151. Omri, S., Behar-Cohen, F., de Kozak, Y., Sennlaub, F., Verissimo, L., Jonet, L., et al. (2011). Microglia/Macrophages Migrate through Retinal Epithelium Barrier by a Transcellular Route in Diabetic Retinopathy. *The American Journal of Pathology*, 179 (2), 942-953.
152. Ozerdem, U., Mach-Hofacre, B., Cheng, L., Chaidhawangul, S., Keefe, K., McDermott, C., et al. (2000). The effect of prinomastat (AG3340), a potent inhibitor of matrix metalloproteinases, on a subacute model of proliferative vitreoretinopathy. *Current Eye Research*, 20 (6), 447-453.
153. Ozerdem, U., Mach-Hofacre, B., Keefe, K., Pham, T., Soules, K., Appelt, K., et al. (2001). The effect of prinomastat (AG3340), a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, on posttraumatic proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmic Research*, 33 (1), 20-23.

154. Paige, M., Rainey, J., & Goh, M. (1998). Fibrous Long Spacing Collagen Ultrastructure Elucidated by Atomic Force Microscopy. *Biophysical Journal* , 74 (6), 3211-3216.
155. Pastor, J. (1998). Proliferative vitreoretinopathy: an overview. *Survey of Ophthalmology* , 43 (1), 3-18.
156. Parapuram, S., Chang, B., Li, L., Hartung, R., Chalam, K., Nair-Menon, J., et al. (2009). Differential Effects of TGF β and Vitreous on the Transformation of Retinal Pigment Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* , 50 (12), 5965-5974.
157. Partridge, E., Le Roy, C., Di Guglielmo, G., Pawling, J., Cheung, P., Granovsky, M., et al. (2004). Regulation of cytokine receptors by Golgi N-glycan processing and endocytosis. *Science* , 120-124.
158. Pellegrin, S., & Mellor, H. (2007). Actin stress fibres. *Journal of cell science* , 120 (Pt20), 3491-3499.
159. Penn, J. (2008). *Retinal and Choroidal Angiogenesis*. New York: Springer Science & Business Media.
160. Por, E., Greene, W., Burke, T., & Wang, H. (September 2016). Trichostatin A inhibits retinal pigmented epithelium activation in an in vitro model of proliferative vitreoretinopathy. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* , 415-424.
161. Priglinger, C., & Priglinger, S. (2013). Pharmacological approach to treatment of proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmologie* (110), 948-959.
162. Priglinger, C., Obermann, J., Szober, C., Merl-Pham, J., Ohmayer, U., Behler, J., et al. (2016). Epithelial-to-Mesenchymal Transition of RPE Cells In Vitro Confers Increased beta1,6-N-Glycosylation and Increased Susceptibility to Galectin-3 Binding. *PLoS One* , e0146887.
163. Priglinger, C., Szober, C., Priglinger, S., Merl, J., Euler, K., Kernt, M., et al. (2013). Galectin-3 Induces Clustering of CD147 and Integrin- β 1 Transmembrane Glycoprotein Receptors on the RPE Cell Surface. *PLoS ONE* , 8 (7), e70011.
164. Qiao, H., Hisatomi, T., Sonoda, K.-H., Kura, S., Sassa, Y., Kinoshita, S., et al. (2005). The characterization of hyalocytes: the origin, phenotype, and turnover. *British Journal of Ophthalmology* , 89, 513-517.
165. Ramesh, S., Bonshek, R., & Bishop, P. (2004). Immunolocalisation of opticin in the human eye. *British Journal of Ophthalmology* , 88 (5), 697-702.
166. Reim, M., Kirchhof, B., & Wolf, S. (2003). *Diagnosen am Augenhintergrund: vom Befund zur Diagnose; 23 Tabellen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

167. Rice, T., De Bustros, S., Michels, R., Thompson, J., Debanne, S., & Rowland, D. (1986). Prognostic factors in vitrectomy for epiretinal membranes of the macula. *Ophthalmology*, *93* (5), 602-610.
168. Robbins, S., Brem, R., Wilson, D., O'Rourke, L., Robertson, J., Westra, I., et al. (1994). Immunolocalization of Integrins in Proliferative Retinal Membranes. *Investigative ophthalmology & visual science*, *35* (9), 3475-3485.
169. Rouberol, F., & Chiquet, C. (2014). Proliferative vitreoretinopathy: pathophysiology and clinical diagnosis. *J Fr Ophthalmol*, *37*(7), 557-565.
170. Rubsamen, P., Davis, P., Hernandez, E., O'Grady, G., & Cousins, S. (1994). Prevention of experimental proliferative vitreoretinopathy with biodegradable intravitreal implant for the sustained release of fluorouracil. *Arch Ophthalmol*, *112*, 407-413.
171. Ryan, S., Schachat, A., Wilkinson, C., Hinton, D., Sadda, S., & Wiedemann, P. (2013). *Retina* (5.; Volume III Ausg.). Amsterdam: Elsevier Health Science.
172. Rønnov-Jessen, L., & Petersen, O. (1993). Induction of alpha-smooth muscle actin by transforming growth factor-beta 1 in quiescent human breast gland fibroblasts. Implications for myofibroblast generation in breast neoplasia. *Laboratory investigation*, *68*, 696-707.
173. Sakamoto, T., & Ishibashi, T. (2011). Hyalocytes: essential cells of the vitreous cavity in vitreoretinal pathophysiology? *Retina*, *31* (2), 222.
174. Salzmann, J., Limb, G., Khaw, P., Gregor, Z., Webster, L., Chignell, A., et al. (2000). Matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *British Journal of Ophthalmology*, *84* (10), 1091-1096.
175. Sarrazy, V., Koehler, A., Chow, M., Zimina, E., Li, C., Kato, H., et al. (2014). Integrins avb5 and avb3 promote latent TGF-b1 activation by human cardiac fibroblast contraction. *Cardiovascular research*, *102* (3), 407-417.
176. Schaub, F., Enders, P., & Fauser, S. (2016). Proliferative Vitreoretinopathie: therapeutische Strategien. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*.
177. Scheiffarth, O., Kampik, A., Günther, H., & von der Mark, K. (1988). Proteins of the extracellular matrix in vitreoretinal membranes. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, *226* (4), 357-361.
178. Schroder, S., Muether, P., Caramoy, A., & al., e. (2012). Anterior chamber aqueous flare is a strong predictor of proliferative vitreoretinopathy in patients with rhegmatogenous retinal detachment. *Retina* (32), 38-42.

179. Schumann, R. (2015). Glaskörper und vitreoretinale Grenzfläche; Teil 1: Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. *Zeitschrift für praktische Augenheilkunde & augenärztliche Fortbildungen* , 1-9.
180. Schumann, R. (2015). Glaskörper und vitreoretinale Grenzfläche; Teil 2: Trübungen des Glaskörpers, traktive Makulopathien und neue Therapiestrategien. *Zeitschrift für* , 389-399.
181. Schumann, R., Eibl, K., Zhao, F., Scheerbaum, M., Scheler, R., Schaumberger, M., et al. (2011). Immunocytochemical and ultrastructural evidence of glial cells and hyalocytes in internal limiting membrane specimens of idiopathic macular holes. *Investigative ophthalmology & visual science* , 52 (11), 7822-7834.
182. Schumann, R., Gandorfer, A., Ziada, J., Scheler, R., Schaumberger, M., Wolf, A., et al. (2014). Hyalocytes in idiopathic epiretinal membranes: a correlative light and electron microscopic study. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* , 252 (12), 1887-1894.
183. Schumann, R., Gandorfer, A., Eibl, K., Henrich, P., Kampik, A., & Haritoglou, C. (2010). Sequential epiretinal membrane removal with internal limiting membrane peeling in brilliant blue G-assisted macular surgery. *British Journal of Ophthalmology* , 94, 1369-1372.
184. Schumann, R., Gandorfer, A., Kampik, A., & Haritoglou, C. (2015). Klinisch-pathoogische Korrelationen an der vitreoretinalen Grenzfläche. *Ophthalmologe* , 112, 20-28.
185. Schwartz, D., De la Cruz, Z., Green, W., & Michels, R. (1988). Proliferative vitreoretinopathy: ultrastructural study of 20 retroretinal membranes removed by vitreous surgery. *Retina* , 8, 275-281.
186. Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., & Wesker, K. *Prometheus LernAtlas der Anatomie: Kopf, Hals und Neuroanatomie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
187. Sebag, J. (2008). Vitreoschisis. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* (3), 329-332.
188. Sebag, J. (2004). Anomalous posterior vitreous detachment: a unifying concept in vitreo-retinal disease. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology* , 242 (8), 690-698.
189. Sebag, J. (2015). Die vitreoretinale Grenzfläche und ihre Rolle in der Pathogenese vitreomakulärer Erkrankungen. *Der Ophthalmologe* , 112 (1), 10-19.
190. Sebag, J., Wang, M., Nguyen, D., & Sadun, A. (2009). Vitreopapillary adhesion in macular diseases. *Transactions of the American Ophthalmological Society Journal* , 107, 35.

191. Sebag, J., Gupta, P., Rosen, R., Garcia, P., & Sadun, A. (2007). Macular holes and macular pucker: the role of vitreoschisis as imaged by optical coherence tomography/scanning laser ophthalmoscopy. *Transactions of the American Ophthalmological Society Journal*, 105, 121.
192. Sebag, J., Niemeyer, M., & Koss, M. (2014). Anomalous Posterior Vitreous Detachment and Vitreoschisis. In J. Sebag, *Vitreous in Health and Disease* (S. 241-263). New York: Sebag J.
193. Sethi, C., Lewis, G., Fisher, S., Leitner, W., Mann, D., Luthert, P., et al. (2005). Glial remodeling and neural plasticity in human retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 46 (1), 329-342.
194. Sheridan, C., Hiscott, P., & Grierson, I. (2005). Retinal Pigment Epithelium Differentiation and Dedifferentiation. In *Vitreo-retinal Surgery (Essentials of Ophthalmology)* (S. 101-119). Kirchhof, B; Wong D;.
195. Shu, D., & Lovicu, F. (2017). Myofibroblast transdifferentiation: The dark force in ocular wound healing and fibrosis. *Progress in retinal and eye research*, 60, 44-65.
196. Shull, M., Ormsby, I., Kier, A., Pawlowski, S., Diebold, R., Yin, M., et al. (1992). Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*, 359 (3697), 693-699.
197. Sidd, R., Fine, S., Owens, S., & Patz, A. (1982). Idiopathic preretinal gliosis. *American Journal of Ophthalmology*, 94 (1), 44.
198. Sirén, V., Salonen, E.-M., Vaheri, A., Tommila, P., & Immonen, I. (1990). Culture of retinal pigment epithelial cells from subretinal fluid. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 569-572.
199. Smiddy, W., Maguire, A., Green, W., Michels, R., de la Cruz, Z., Enger, C., et al. (1989). Idiopathic epiretinal membranes: Ultrastructural characteristics and clinicopathologic correlation. *Ophthalmology*, 96, 811-820.
200. Smiddy, W., Michels, R., Gilbert, H., & Green, W. (1992). Clinicopathologic study of idiopathic macular pucker in children and young adults. *Retina*, 12 (3), 232-236.
201. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. (1999). *Spektrum.de*. (H. Copyright 1999 Spektrum Akademischer Verlag, Produzent) Abgerufen am 2. November 2016 von www.spektrum.de:
<http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/interferenzmikroskopie/34287>
202. Spitznas, M., & Leuenberger, R. (September 1977). Primäre epiretinale Gliose. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*, 410-420.

203. Stefánsson, E. (2014). Vitreous physiology. *Vitreous in health and disease* , 437-457.
204. Suh, M., Seo, J., Park, K., & Yu, H. (2009). Associations between macular findings by optical coherence tomography and visual outcomes after epiretinal membrane removal. *American Journal of Ophthalmology* , 147 (3), 473.
205. Sundaram, V., Barsam, A., & Virgili, G. (2013). Intravitreal low molecular weight heparin and 5-Fluorouracil for the prevention of proliferative vitreoretinopathy following retinal detachment surgery. *The Cochrane Database of Systemic Reviews* (1), CD006421.
206. Szczesniak, A., Porter, R., Toguri, J., Borowska-Fielding, J., Gebremeskel, S., Siwakoti, A., et al. (25. August 2016). Cannabinoid 2 receptor is a novel anti-inflammatory target in experimental proliferative vitreoretinopathy. *Neuropharmacology* .
207. Takahashi, M., Refojo, M., Nakagawa, M., & al., e. (1997). Antiproliferative effect of retinoic acid in 1% sodium hyaluronate in an animal model of PVR. *Current Eye Research* (16), 703-709.
208. Tojkander, S., Gateva, G., & Lappalainen, P. (2012). Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *Journal of cell science* , 125 (Pt8), 1855-1864.
209. Tozer, K., & Sebag, J. (2014). Vitreous in the Pathobiology of Macular Pucker. In J. Sebag, *Vitreous in Health and Disease* (S. 311-328). New York: Sebag J.
210. Traber, P., & Zomer, E. (2013). Therapy of experimental NASH and fibrosis with galectin inhibitors. *PLoS one* , 8 (12), e83481.
211. Traber, P., Chou, H., Zomer, E., Hong, F., Klyosov, A., Fiel, M., et al. (2013). Regression of fibrosis and reversal of cirrhosis in rats by galectin inhibitors in thioacetamide-induced liver disease. *PLoS one* , 8 (10), e75361.
212. Tual-Chalot, S., Allinson, K., Fruttiger, M., & Arthur, H. (2013). Whole Mount Immunofluorescent Staining of the Neonatal Mouse Retina to Investigate Angiogenesis In vivo. *Journal of Visualized Experiments* , 77, e50546.
213. Turgut, B., Uyar, F., Ustundag, B., & al., e. (2012). The impact of tacrolimus on growth factors in experimental proliferative vitreoretinopathy. *Retina* (32), 232-241.
214. Uchino, E. (2001). Initial stages of posterior vitreous detachment in healthy eyes of older persons evaluated by optical coherence tomography. *Arch Ophthalmol* , 119, 1475-1479.
215. Veloso, A. j., Kadrmas, E., Larrosa, J., & al., e. (1997). 13-cis-retinoic acid in silicone-fluorosilicone copolymer oil in a rabbit model of proliferative

- vitreoretinopathy after retinal detachment surgery. *Experimental Eye Research* (65), 425-434.
216. Vinores, S., Campochiaro, P., & Conway, B. (1990). Ultrastructural and electron-immunocytochemical characterization of cells in epiretinal membranes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 31 (1), 14-28.
217. Wang, M., & Sebag, J. (2010). Combined SD-OCT/SLO imaging of vitreous and vitreo-retinal interface. In *Essentials of Ophthalmology: Medical Retina - Focus on Retinal Imaging* (S. 157-167). Berlin/Heidelberg: Holz, Spaide.
218. Watanabe, A., Arimoto, S., & Nishi, O. (2009). Correlation between metamorphopsia and epiretinal membrane optical coherence tomography findings. *Ophthalmology*, 116 (9), 1788-1793.
219. Weller, M., Esser, P., Heimann, K., & Wiedemann, P. (1992). Idiopathic proliferative vitreoretinopathy. Activation of microglial cells as the deciding factor. *Der Ophthalmologe*, 89 (5), 387-390.
220. Weller, M., Esser, P., Heimann, K., & Wiedemann, P. (1991). Retinal microglia: a new cell in idiopathic proliferative vitreoretinopathy? *Experimental Eye Research*, 275-281.
221. Weller, M., Wiedemann, P., Bresgen, M., & Heimann, K. (1990). Vitronectin: mediator of cell adhesion in proliferative vitreoretinopathy? *Fortschritte der Ophthalmologie: Zeitschrift der deutschen ophthalmologischen Gesellschaft*, 221-225.
222. Wiedemann, P. (1992). Growth factors in retinal diseases: proliferative vitreoretinopathy, proliferative diabetic retinopathy, and retinal degeneration. *Survey of Ophthalmology*, 36 (5), 373-384.
223. Wilkins, J., Puliafito, C., Hee, M., Duker, J., Reichel, E., Coker, J., et al. (1996). Characterization of epiretinal membranes using optical coherence tomography. *Ophthalmology*, 103 (12), 2142.
224. Wipff, P., Rifkin, D., Meister, J., & Hinz, B. (2007). Myofibroblast contraction activates latent TGF-beta 1 from extracellular matrix. *The journal of cell biology*, 179, 1311-1323.
225. Wise, G. (1975). Clinical features of idiopathic preretinal macular fibrosis. *American Journal of Ophthalmology*, 79 (3), 349.
226. Wong, J., Sachdev, N., Beaumont, P., & Chang, A. (2005). Visual outcomes following vitrectomy and peeling of the epiretinal membrane. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 33 (4), 373-378.

227. Wonodirekso, S., Au, C., Hadisaputra, W., Affandi, B., & Rogers, P. (1993). Cytokeratins 8, 18 and 19 in endometrial epithelial cells during the normal menstrual cycle and in women receiving Norplant. *Contraception*, 481-493.
228. Worthington, J., Klementowicz, J., & Travis, M. (2011). TGFbeta: a sleeping giant awoken by integrins. *Trends in biochemical sciences*, 47-54.
229. Wu, W., Hu, D., Mehta, S., & Chang, Y. (2005). Effects of retinoic acid on retinal pigment epithelium from excised membranes from proliferative vitreoretinopathy. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 21 (1), 44-54.
230. Wynn, T. (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *The Journal of Pathology*, 214, 199-210.
231. Yamakiri, K., Sakamoto, T., Noda, Y., & al., e. (2008). One-year results of a multicenter controlled clinical trial of triamcinolone in pars plana vitrectomy. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* (246), 959-966.
232. Yamashita, H., Hori, S., Kitano, S., Ishii, Y., & Masuda, K. (1985). Glial cells in culture of preretinal membrane of proliferative vitreoretinopathy. *Japanese journal of ophthalmology*, 29 (1), 42-53.
233. Yamashita, T., Uemura, A., & Sakamoto, T. (2008). Intraoperative characteristics of the posterior vitreous cortex in patients with epiretinal membrane. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 246 (3), 333-337.
234. Yin, J., Xu, W., Ye, M., Zhang, Y., Wang, H., Zhang, J., et al. (2017). Up-regulated basigin-2 in microglia induced by hypoxia promotes retinal angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*, doi: 10.1111/jcmm.13256.
235. Zernike, F. (1935). Das Phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen Beobachtung. *Physikalische Zeitschrift*, 36, 848-851.
236. Zhao, F., Gandorfer, A., Haritoglou, C., Scheler, R., Schaumberger, M., Kampik, A., et al. (2013). Epiretinal cell proliferation in macular pucker and vitreomacular traction syndrome: analysis of flat-mounted internal limiting membrane specimens. *Retina* (33), 77-88.
237. Zhou, Y., Hagood, J., Lu, B., Merryman, W., & Murphy-Ullrich, J. (2010). Thy-1-integrin alpha v beta 5 interactions inhibit lung fibroblast contraction-induced latent transforming growth factor-beta 1 activation and myofibroblast differentiation. *The Journal of biological chemistry*, 285, 22382-22393.
238. [Anonymous]. (1992). Vitrectomy with silicone oil or sulfur hexafluoride gas in eyes with severe proliferative vitreoretinopathy: results of a randomized clinical trial. Silicone study report 1. *Archives of Ophthalmology* (110), 770-779.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachtes Schema eines menschlichen Augapfels (modifiziert nach (Grotz, 2016)).	8
Abbildung 2: Fundusaufnahme eines gesunden rechten Auges. Innerhalb des oberen und unteren Gefäßbogens liegt die Stelle des schärfsten Sehens, die Makula lutea. Nasal der Makula lutea liegt der Sehnervenaustritt, die Papilla nervi optici (modifiziert nach (Grehn F., 2011)).	9
Abbildung 3: Histologischer Querschnitt durch die Netzhaut (modifiziert nach (Lang, 2014)).	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der konvergenten Signalübertragung der Retina mit Zapfen und Stäbchen als 1. Neurone, Bipolarzellen als 2. Neurone, Ganglienzellen als 3. Neurone und den dazwischen gelegenen Horizontalzellen und amakrinen Zellen (modifiziert nach (Huppelsberg & Walter, Kurzlehrbuch Physiologie, 2009)).	11
Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer inneren Grenzmembran (ILM) mit glatter vitrealer Seite und undulierter retinaler Seite. Vergrößerung 3000-fach (eigene Aufnahme).	13
Abbildung 6: Schematische Darstellung der physiologischen hinteren Glaskörperabhebung von Stadium 0 bis Stadium 4. Abgehobene Bereiche sind jeweils mit * markiert (modifiziert nach (Uchino, 2001)).	16
Abbildung 7: Die anomale hintere Glaskörperabhebung und ihre Folgen (modifiziert nach (Sebag, 2008)).	17
Abbildung 8: Augenhintergrund von 3 rechten Augen in verschiedenen Stadien der idiopathischen epiretinalen Gliose: Gass°0, Gass°1 und Gass°2 (modifiziert aus dem Archiv der Augenlinik der Ludwig-Maximilians-Universität München).	20
Abbildung 9: Zellen der idiopathischen epiretinalen Gliose und ihre Herkunft (modifiziert nach (Gandorfer, et al., 2014)).	23
Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Aufnahme mit schematischer Gegenüberstellung der Typ 1 und Typ 2 prämakulären Membranen (PMM). a: elektronenmikroskopische Aufnahme einer PMM Typ 2, b: elektronenmikroskopische Aufnahme einer PMM Typ 1, c: schematische Darstellung einer PMM Typ 2, d: schematische Darstellung einer PMM Typ 1 (modifiziert nach (Haritoglou, et al., 2014), (Gandorfer, et al., 2012)).	25
Abbildung 11: SD-OCT-Aufnahme eines rechten Auges mit idiopathischer epiretinaler Gliose (modifiziert aus dem Archiv der Augenlinik der Ludwig-Maximilians-Universität München).	27
Abbildung 12: Fundusaufnahme eines rechten Auges mit proliferativer Vitreoretinopathie und damit verbundener subretinaler Proliferation (modifiziert aus dem Archiv der Augenlinik der Ludwig-Maximilians-Universität München).	31
Abbildung 13: Fundusaufnahme eines rechten Auges mit retinalen Sternfalten (siehe Pfeile) bei proliferativer Vitreoretinopathie (PVR). Der Sehnervenkopf ist mit einem Stern markiert. (Modifiziert aus dem Archiv der Augenlinik der Ludwig-Maximilians-Universität München).	32
Abbildung 14: Schema eines möglichen Pathogenesemechanismus der proliferativen Vitreoretinopathie; RPE-Zelle = Zelle des retinalen Pigmentepithels (modifiziert nach (Reim, et al., 2003)).	33
Abbildung 15: verwendetes Arbeitsprotokoll für Immunfluoreszenz an floating Membranen. Die dargestellte Antikörperkombination dient als Beispiel.	47
Abbildung 16: Verwendetes Arbeitsprotokoll für Elektronenmikroskopie an floating Membranen.	49
Abbildung 17: Muster verschiedener Zellverteilungen. A) und B) Formen homogener Zellverteilungen. C) Zellcluster als Form inhomogener Zellverteilung. (Vergrößerung A 20-fach, B und C 10-fach).	61
Abbildung 18: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 10-fach).	62
Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 40-fach).	62
Abbildung 20: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 20-fach).	62
Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 40-fach).	62
Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 20-fach).	62
Abbildung 23: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 10-fach).	63

Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 40-fach).	63
Abbildung 25: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. (Vergrößerung: 20-fach).	63
Abbildung 26: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-Integrin $\alpha V \beta 5$ und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 40-fach).	64
Abbildung 27: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-Integrin $\alpha V \beta 5$ und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 20-fach).	64
Abbildung 28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-Integrin αV und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 40-fach).	64
Abbildung 29: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-RCA I und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 40-fach).	64
Abbildung 30: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-Emmprin und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 40-fach).	65
Abbildung 31: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-Kollagen-1 und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 10-fach).	65
Abbildung 32: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-CD64 und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 20-fach).	65
Abbildung 33: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-RCA I und anti-Galectin-3. (Vergrößerung: 40-fach).	65
Abbildung 34: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-Emmprin und anti-Integrin αV . (Vergrößerung: 20-fach).	65
Abbildung 35: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Kolokalisation von anti-UEA I und anti-Galectin-3. (Vergrößerung: 20-fach).	66
Abbildung 36: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Zu sehen ist ein Myofibroblast (roter Stern * markiert den Zellkern), der die darunter liegende Kollagenschicht (blauer Stern *) in Falten legt. In einem vergrößerten Ausschnitt markieren die roten Pfeile die für Myofibroblasten typischen subplasmalemmalen Verdichtungen. (Eigene Aufnahme; Vergrößerung 4400-fach).	67
Abbildung 37: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Zu sehen ist ein Hyalozyt (roter Stern * markiert den Zellkern), der sich auf der vitrealen Seite der inneren Grenzmembran (ILM; blauer Stern *) befindet. Zwischen ILM und Hyalozyt befindet sich Kollagen. (Eigene Aufnahme; Vergrößerung 3000-fach).	68
Abbildung 38: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose. Zu sehen ist neu gebildetes Kollagen (NFC) und fibrilläre Kollagenpräzipitate (FLSC; roter Pfeil). (eigene Aufnahme; Vergrößerung 12000-fach).	69
Abbildung 39: Befunde eines Patienten mit idiopathischer epiretinale Gliose.	70
Abbildung 40: Muster verschiedener Zellverteilungen. A) homogene Zellverteilung. B) Clusterformation bzw. inhomogene Zellverteilung (Vergrößerung A 20-fach, B 10-fach).	72
Abbildung 41: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 20-fach).	73
Abbildung 42: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 20-fach).	73
Abbildung 43: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 10-fach).	73
Abbildung 44: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 20-fach).	74
Abbildung 45: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 10-fach).	74
Abbildung 46: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 20-fach).	74
Abbildung 47: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 20-fach).	74
Abbildung 48: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Präparates mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. (Vergrößerung 10-fach).	74
Abbildung 49: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer PVR-Membran. Kolokalisation von anti-UEA I und anti- α -SMA. (Vergrößerung: 40-fach).	75

<i>Abbildung 50: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer PVR-Membran. Kolokalisation von anti-RCA I und anti-UEA I. (Vergrößerung: 40-fach).</i>	75
<i>Abbildung 51: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer PVR-Membran. Kolokalisation von anti-RCA I und anti-UEA I. (Vergrößerung: 40-fach).</i>	75
<i>Abbildung 52: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer PVR-Membran. Kolokalisation von anti-UEA I und anti-Galectin-3. (Vergrößerung: 20-fach).</i>	75
<i>Abbildung 53: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer prämakulären Membran bei proliferativer Vitreoretinopathie. Zu sehen ist eine Zelle des retinalen Pigmentepithels, die direkt auf der inneren Grenzmembran lokalisiert ist. (Eigene Aufnahme; Vergrößerung 3000-fach).</i>	77
<i>Abbildung 54: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer prämakulären Membran bei proliferativer Vitreoretinopathie. Zu sehen ist ein Fibroblast mit myofibroblasten-ähnlichen Merkmalen und die innere Grenzmembran (ILM). Der Fibroblast befindet sich auf der vitrealen Seite der ILM. (Eigene Aufnahme; Vergrößerung 3000-fach).</i>	78
<i>Abbildung 55: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer prämakulären Membran bei proliferativer Vitreoretinopathie. Zu sehen ist eine von neu gebildetem Kollagen (NFC, siehe Pfeile) umgebene Zelle. (Eigene Aufnahme, Vergrößerung 20000-fach).</i>	79
<i>Abbildung 56: Befunde eines Patienten mit proliferativer Vitreoretinopathie.</i>	80
<i>Abbildung 57: Negativkontrolle IgG (Vergrößerung: 10-fach).</i>	83
<i>Abbildung 58: Negativkontrolle IgG2a (Vergrößerung: 10-fach).</i>	83

8.2 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Auflistung möglicher pharmakologischer Therapieansätze bei proliferativer Vitreoretinopathie mit pharmakologischem Ansatzpunkt und dazugehörigem pathologischen Vorgang (modifiziert nach (Banerjee, et al., 2014))</i>	37
<i>Tabelle 2: Auflistung verwendeter primärer Antikörper und ihrer Zielstruktur.</i>	46
<i>Tabelle 3: In prämakulären Membranen vorhandene Zell- und Kollagentypen und ihre ultrastrukturellen Charakteristika (modifiziert nach (Gandorfer, et al. 2014), (Schumann, et al., 2015)).</i>	51
<i>Tabelle 4: Verdünnungen verwendeter primären Antikörper mit PBT.</i>	55
<i>Tabelle 5: Verwendete sekundäre Antikörper und ihre Eigenschaften.</i>	55
<i>Tabelle 6: Darstellung des Patientenkollektivs mit Diagnose idiopathische epiretinale Gliose G: Geschlecht (m: männlich; w: weiblich), A: Alter zum Zeitpunkt der Operation in Jahren, S: operierte Seite (RA: rechtes Auge; LA: linkes Auge), -: keine Verlaufssehstärke vorhanden.</i>	60
<i>Tabelle 7: Darstellung des Patientenkollektivs mit Diagnose proliferative Vitreoretinopathie. G: Geschlecht (m: männlich; w: weiblich), A: Alter bei OP in Jahren, S: operierte Seite (RA: rechtes Auge; LA: linkes Auge), -: kein Verlaufsvisus vorhanden.</i>	71
<i>Tabelle 8: Vergleich der Patientendaten der beiden Diagnosegruppen „idiopathische epiretinale Gliose“ und „proliferative Vitreoretinopathie“.</i>	81
<i>Tabelle 9: Vergleich der Antikörper-Affinität bei idiopathischer epiretinale Gliose und proliferativer Vitreoretinopathie. RPE-Zellen: Zellen des retinalen Pigmentepithels, EZM: extrazelluläre Matrix, „++“ Expression in 100% der untersuchten Präparate; „+“ Expression in mindestens 80% der untersuchten Präparate; „(+)“ Expression in mindestens 40% der untersuchten Präparate; „-“ Expression in maximal 20% der untersuchten Präparate.</i>	82
<i>Tabelle 10: Vergleich der elektronenmikroskopischen Auswertung von idiopathischer epiretinale Gliose und proliferativer Vitreoretinopathie. „++“ Expression in 100% der untersuchten Präparate; „+“ Expression in mindestens 80% der untersuchten Präparate; „(+)“ Expression in mindestens 40% der untersuchten Präparate; „-“ Expression in maximal 20% der untersuchten Präparate.</i>	84

8.3 Visus-Umrechnungstabelle

Dezimal	LogMAR	Meter	Fuß
0,10	1,00	6/60	20/200
0,125	0,90	6/48	20/160
0,16	0,80	6/38	20/125
0,20	0,70	6/30	20/100
0,25	0,60	6/24	20/80
0,32	0,50	6/19	20/63
0,40	0,40	6/15	20/50
0,50	0,30	6/12	20/40
0,63	0,20	6/9,5	20/32
0,80	0,10	7/7,5	20/25
1,00	0,00	6/6	20/20
1,25	-0,10	6/4,8	20/16
1,60	-0,20	6/3,8	20/12,5
2,00	-0,30	6/3	20/10

8.4 Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	α -Aktin Filament (engl.: α -smooth-muscle-actin)
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration
APCs	Alkylphosphocholine
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumin)
BSS	balancierte Salzlösung; kammerwasserähnliche Zusammensetzung
C2F6	Schwefelhexafluorid
CB2R	Cannabinoidrezeptor Typ 2
cc	mit Korrektur (lat.: cum correctione)
CD45/64	engl.: cluster of differentiation 45/64
CE	Kataraktextraktion (engl.: cataract extraction)
CK-8	Zytokeratin-8
Coll-1	Kollagen Typ 1
CS	Kollagenstränge (engl.: collagen strands)
CTGF	Bindegewebswachstumsfaktor (engl.: connective tissue growth factor)
Cy2,3,5	Cyaninfarbstoffe 2,3,5 (engl.: cyanine dyes)
DAPI	Fluoreszenzfarbstoff: 4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ERM	epiretinale Membran
ETH	Ethanol
EZM	extrazelluläre Matrix
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor (engl.: fibroblast growth factor)
FLSC	fibrilläre Kollagenpräzipitate (engl.: fibrous long spacing collagen)
GA	Glutaraldehyd
GFAP	saures Gliafaserprotein (engl.: glial fibrillary acidic protein)
HDAC	Histon-Deacetylase
HKL	Hinterkammerlinse
HLA	humanes Leukozyten Antigen (engl.: human leucocyte antigen)
IBA 1	Calcium-bindendes Adapterprotein der Mikroglia/Makrophagen (engl.: ionized calcium-binding adapter molecule 1)

ICAM-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1 (engl.: intracellular adhesion molecule1)
IGF-1	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor Typ 1 (engl.: insulin-like growth factor 1)
IL-1	Interleukin 1
ILB 4	Isolectin B4
ILM	innere Grenzmembran (engl.: inner limiting membrane)
INF γ	Interferon γ
LA	linkes Auge
LAP	Latenz-assoziierte Propeptid
LTBP	latentes TGF- β Bindeprotein (engl.: latent TGF- β binding protein)
max	Maximum
min	Minimum
MMP	Matrixmetalloproteinase
MP	macular pucker (Ausprägungsform der epiretinalen Gliose)
NFC	neu gebildetes Kollagen (engl.: newly formed collagen)
OCT	optische Kohärenztomografie
OP	Operation
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline)
PBT	PBS mit Tween 20; Pufferlösung
PDGF	engl.: platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
postOP	nach der Operation
ppV	pars plana Vitrektomie
präOP	vor der Operation
PRK	photorefraktive Keratektomie
PVD	hintere Glaskörperabhebung (engl.: posterior vitreous detachment)
PVP-Iod	Povidon-Iod
PVR	proliferative Vitreoretinopathie
RA	rechtes Auge
RCA I	Ricinus communis agglutinin I
ROCK	rho-Kinase
RPE	Retinales Pigmentepithel

sc	ohne Korrektur (lat.: sine correctione)
SD	Standardabweichung (engl.: standard deviation)
SD-OCT	Spektral-Domain optische Kohärenztomographie
SF6	Schwefelhexafluorid
TCSF	engl.: tumor collagenase stimulatory factor; synonym verwendet mit Emmprin
TGF- β	engl.: transforming growth factor β
TIMPs	Gewebeinhibitor von Metalloproteinasen (engl.: tissue inhibitors of metalloproteinases)
UEA I	Ulex europaeus agglutinin I
VBR	vitreoretinale Grenzfläche (engl.: vitreoretinal border region)
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl.: vascular endothelial growth factor)

9 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Siegfried Priglinger bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, an der Augenklinik der Universität München zu promovieren.

Ein besonders großer Dank geht an meine Doktormutter Prof. Dr. med. Ricarda Schumann und meine Betreuerin Dr. med. Denise Vogt. Ihre hilfreichen Kritiken, Anregungen und Verbesserungsvorschläge machten diese Arbeit erst möglich.

Liebe Ricarda und liebe Denise, ihr standet mir bei jeder noch so kleinen Unsicherheit stets mit Rat und Antwort zur Seite. Zudem wurde ich von euch von Anfang an herzlich in die Arbeitsgruppe aufgenommen. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht vorstellen können. Vielen Dank.

Weiterhin danke ich Felix Hagenau, der die Lösung zu sämtlichen Computerproblemen wusste und mir dadurch viel Unmut erspart hat. Danke, Felix.

Auch Renate Scheler möchte ich meinen Dank für die gute Betreuung meiner Labortätigkeiten aussprechen.

Zu aller Letzt möchte ich mich noch von ganzem Herzen bei meinen Eltern, Geschwistern und Freunden bedanken. Ihr habt mir immer wieder Mut zugesprochen und fandet auch in schwierigeren Zeiten stets die richtigen Worte der Motivation. An dieser Stelle möchte ich mich auch für eure Nachsicht bedanken, dass ich an vielen Wochenenden mehr Zeit mit meiner Dissertation verbracht habe als mit euch. Vielen Dank dafür.

Stefanie R. Günther

München, 30. Mai 2019

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Stefanie Ricarda Günther, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Analyse immunhistochemischer Fibrosemarker bei idiopathischer epiretinaler Gliose und proliferativer Vitreoretinopathie“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 30.05.2019

Stefanie Ricarda Günther