

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

**CHARAKTERISIERUNG VITREALER HYALOZYTEN
UND IHRE ROLLE BEI DER ENTSTEHUNG TRAKTIVER
MAKULOPATHIEN**

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

vorgelegt von

Felix Hagenau

aus

Düren

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatterin:

Prof. Dr. med. Ricarda G. Schumann

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. med. Carl-Ludwig Schönfeld

Prof. Dr. med. Arnd Gandorfer

Prof. Dr. med. Chris Patrick Lohman

Dekan:

Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 09.07.2020

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

FELIX HAGENAU

Hiermit erkläre ich, die hier vorliegenden Veröffentlichungen im Rahmen einer kumulativen Dissertation mit dem Thema

CHARAKTERISIERUNG VITREALER HYALOZYTEN UND IHRE ROLLE BEI DER ENTSTEHUNG TRAKTIVER MAKULOPATHIEN

eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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 01. August 2019

Felix Hagenau

INHALTSVERZEICHNIS

Eidesstattliche Versicherung	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
Publikationen	6
Einleitung	7
Zusammenfassung der ersten Publikation	14
Summary of the first publication	15
Zusammenfassung der zweiten Publikation	16
Summary of the second publication	17
Zusammenfassung der dritten Publikation	19
Summary of the third publication	20
Referenzen	21
Danksagung	24

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

(SD-)OCT	(Spektral-Domain-) Optische Kohärenztomographie (engl.: Spectral-domain optical coherence tomography)
µm	Mikrometer
nm	Nanometer
CD	cluster of differentiation (Oberflächenmerkmale von Zellen)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
DMÖ	Diabetisches Makulaödem
ERM	epiretinale Membran
ILM	innere Grenzmembran (engl.: internal limiting membrane)
IMF	idiopathisches Makulaforamen
LHEP	lamellar hole-associated epiretinal proliferation (dt.: isoreflektive prämakuläre Zellproliferation)
LMU	Ludwig-Maximilians Universität
VEGF	vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor (engl.: Vascular endothelial growth factor)
α-SMA	α-Aktin Filament (engl.: α-smooth-muscle-actin)

PUBLIKATIONEN

1. CELLS AT THE VITREORETINAL INTERFACE IN SMALL FULL-THICKNESS MACULAR HOLES

Ricarda G. Schumann; **Felix Hagenau**; Christos Haritoglou; Armin Wolf; Markus M. Schaumberger; Anselm Kampik; Arnd Gandorfer

Retina. 35(6):1158–1165, JUN 2015

DOI: 10.1097/IAE.0000000000000441

PMID: 25621947

Publication Date: 2015/06/01

Impact Factor : 2.276

Top-Journal

2. VITRECTOMY FOR DIABETIC MACULAR EDEMA: OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY CRITERIA AND PATHOLOGY OF THE VITREOMACULAR INTERFACE

Felix Hagenau; Denise Vogt; Jean Ziada; Stefanie R. Guenther; Christos Haritoglou; Armin Wolf; Siegfried G. Priglinger; Ricarda G. Schumann

Am J Ophthalmol. 2019 Apr;200:34-46.

DOI: 10.1016/j.ajo.2018.12.004.

PMID: 30557531

Epub 2018 Dec 14.

Impact Factor: 3.184

Top-Journal

3. PREMACULAR CELL PROLIFERATION PROFILES IN TANGENTIAL TRACTION VITREO-MACULOPATHIES SUGGEST A KEY ROLE FOR HYLOCYTES

Ricarda G. Schumann, **Felix Hagenau**; Stefanie R. Guenther; Armin Wolf; Siegfried G. Priglinger; Denise Vogt

Ophthalmologica. 2019 Apr 4:1-7.

DOI: 10.1159/000495853. [Epub ahead of print]

PMID: 30947188

Impact Factor : 1.226

Standard-Journal

EINLEITUNG

Traktive Netzhauterkrankungen bezeichnen in der Augenheilkunde Pathologien, die durch Proliferation und Traktion die Integrität und somit Funktion der Netzhaut und hierdurch den Seheindruck beeinflussen. Finden diese Veränderungen im Bereich der Makula, also der Stelle des schärfsten Sehens, statt, so spricht man von traktiven Makulopathien. Zum Formenkreis der traktiven Makulopathien gehört das vitreomakuläre Traktionssyndrom, die idiopathische oder sekundäre epiretinale Gliose und die verschiedenen Makulaforamina. Histopathologisch sind diese Makulopathien durch Zell- und Kollagenproliferationen auf der vitrealen Seite der inneren Grenzmembran charakterisiert, welche oft mehrschichtig ausgebildet sind.¹⁻² Diese Veränderungen im Bereich der zentralen Netzhaut sind in der Bevölkerung funduskopisch bei etwa jedem dritten über Vierzigjährigen zu finden und können zu deutlichen Sehbeeinträchtigungen führen.³ So kann es durch epiretinale Membranbildung und den daraus folgenden Netzhautveränderungen neben der Sehschärfenreduktion zum Verzerrtsehen, sogenannten Metamorphopsien, kommen. Die Betroffenen können durch diese Veränderungen in ihrer Lebensqualität beeinträchtigt sein. In ausgeprägten Fällen kommt es zu Arbeitsunfähigkeit und schwerer Sehbehinderung. Aktuell wird davon ausgegangen, dass altersbedingte Veränderungen des Glaskörpers und der vitreomakulären Grenzfläche für die Entstehung dieser Pathologien verantwortlich sind.^{1,4}

Die vitreomakuläre Grenzfläche bezeichnet zusammenhängende anatomische Strukturen im hinteren Bereich des Auges und setzt sich zusammen aus der hinteren Glaskörperrinde (posterior vitreous cortex), der inneren Grenzmembran (Membrana limitans interna/inner limiting membrane, ILM) und einer diese beiden verbindenden Schicht aus extrazellulärer Matrix.⁵ Die innere Grenzmembran ist eine der sechs Basalmembranen des Auges. Sie besteht vor allem aus Lamininen und Kollagenen und ist adhärent mit den Endfüßen der Müller-Zellen.⁵⁻⁷

Die hintere Glaskörperrinde besteht hauptsächlich aus lamellär angeordneten Kollagenfibrillen von etwa 100 µm Dicke.⁸ Die hier prädominierenden Zellen werden

als Hyalozyten bezeichnet. Sie sind eine Gruppe von Zellen, die vor allem im Bereich des hinteren Glaskörpers und der Glaskörperrinde vorkommen.⁷ In der Vergangenheit wurden diese Zellen als „Wanderzellen“ oder „subhyaloide Zellen“ bezeichnet.^{9,10} Nach ihrer Erstbeschreibung im 19. Jahrhundert bestand lange Unklarheit über ihre Herkunft. Heute werden sie als spindelförmige Zellen mesenchymalen Ursprungs beschrieben, die aus der Monozyten-Makrophagen-Linie hervorgehen. Hyalozyten lassen sich unter anderem durch die Antigene CD45 und CD64 charakterisieren.^{11,12} Sie spielen aufgrund ihrer Kollagen-synthetisierenden Eigenschaft und ihrer Transdifferenzierung zu Myofibroblasten eine wichtige Rolle im Pathomechanismus verschiedener proliferativer Erkrankungen der vitreomakulären Grenzfläche.^{13,14}

Zur Therapie traktiver Membranen im Makulabereich gibt es keine medikamentöse Option im klinischen Alltag. Die derzeit einzige therapeutische Möglichkeit umfasst eine mikrochirurgische Operation der vitreomakulären Grenzfläche mittels Pars-plana-Vitrektomie mit Entfernung der Membranen. Dabei werden der Glaskörper und die epiretinalen Zell- und Kollagenproliferationen entfernt. Um Rückstände zu vermeiden und Re-Proliferationen zu verhindern, wird zusätzlich auch die ILM entfernt. Das operative Vorgehen in der Makulachirurgie ist ein diffiziles Verfahren, das nur von erfahrenen Operateuren durchgeführt werden kann.^{15,16}

Vor diesem Hintergrund ist das Ziel dieser kumulativen Dissertation, pathologische Veränderungen und Zellproliferationen der vitreomakulären Grenzfläche bei verschiedenen traktiven Makulopathien darzustellen und Hyalozyten, als wesentliche Komponente der Glaskörperrinde, immunzytochemisch und ultrastrukturell zu analysieren. Basis dafür war die Materialgewinnung der epiretinalen Membranen und der ILM durch eine Vitrektomie mit Entfernung dieser Membranen in der Augenklinik der Universität München. Das vom Patienten gewonnene Gewebe wurde dann im Labor für Pathologie und Elektronenmikroskopie der Universität der LMU München fixiert und später für die Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie, Fluoreszenzmikroskopie und/oder Transmissionselektronenmikroskopie aufgearbeitet. Insgesamt wurden Präparate von 57 Augen von 56 Patienten in die Studien eingeschlossen. Die Analyse der Membranen umfasste den Zeitraum von 2013-2017. Die Analyse dieser Gewebe erfolgte mittels Flachpräparation als Vorbereitung für Phasenkontrast- und Interferenzmikroskopie. Dafür wurde das gewonnene Gewebe

unter dem Lichtmikroskop auf einen Objektträger gebracht und mit Glaspipetten ausgebreitet. Anschließend erfolgte die Zellkernfärbung mittels 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) und die immunzytochemische Färbung mit verschiedenen primären und den fluoreszierenden sekundären Antikörpern. Dadurch war die Testung eines einzelnen Präparates mit bis zu drei primären Antikörpern möglich. Für die Vorbereitung der Transmissionselektronenmikroskopie wurden die Präparate nach der Postfixation mit Osmiumtetroxid in Epon-Kunstharz eingebettet und im Serienschnittverfahren mit dem Ultramikrotom in 60 nm dicke Schnitte aufbereitet.

Die erste Arbeit mit dem Titel „Cells at the vitreomacular interface in small full-thickness macular holes“ bezieht sich auf die vitreomakuläre Grenzfläche in durchgreifenden Makulaforamina. Durchgreifende Makulaforamina können in primäre (idiopathische) und sekundäre Makulaforamina eingeteilt werden. Idiopathische Makulaforamina (IMF) werden nach der neueren Klassifikation der International Vitreomacular Traction Study Group nach der Größe und der vitreomakulären Interaktion in klein ($\leq 250 \mu\text{m}$, small), mittel ($> 250 \mu\text{m}$ und $\leq 400 \mu\text{m}$, medium) und groß ($> 400 \mu\text{m}$, large) sowie mit oder ohne Vorliegen einer vitreomakulären Traktion eingeteilt.¹⁷

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Patienten mit kleinem IMF eingeschlossen, da bis zu diesem Zeitpunkt unklar war, ob und wie stark zelluläre Komponenten eine Rolle in der Pathogenese des IMF spielen könnten. Des Weiteren ist auch für das operative Vorgehen relevant, ob epiretinale Zellveränderungen an der vitreomakulären Grenzfläche vorliegen, die folglich eine Progression der Erkrankung fördern könnten.

Ziel der durchgeführten Studie war die Charakterisierung der Zelltypen und Zellverteilung auf der ILM in der Subgruppe der kleinen IMF mit $\leq 250 \mu\text{m}$ Durchmesser. Hierfür analysierten wir die ILM von 20 Patienten mit durchgreifendem IMF in einer Zeitperiode, in der keine alternativen Therapieoptionen zugelassen waren. Die Präparate wurden für die Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie sowie für die Fluoreszenzmikroskopie mit 15 sekundären Antikörpern aufgearbeitet. Erstmals konnte gezeigt werden, dass der Durchmesser eines Makulaforamens mit der Zelldichte und dem Vorkommen von Zellclustern an der vitreomakulären Grenzfläche positiv korreliert. Die nachgewiesenen, hauptsächlich einzeln auf der vitrealen Seite der ILM vorkommenden Zellen, wiesen Merkmale von Zellen glialer Herkunft auf.

Hyalozyten konnten vorrangig in Zellcluster-Arealen dargestellt werden. Mittels kombinierter Immunelektronenmikroskopie konnten zahlreiche Studien transdifferenzierte Hyalozyten mit der Expression von α -SMA im Bereich von Zellclustern bereits nachweisen.^{12,18-20} Diese transdifferenzierten Hyalozyten haben sowohl das Potential zu proliferieren als auch tangential Zugkräfte auszuüben. Somit können sie ein bestehendes Makulaforamen konsolidieren und zur Progredienz der Erkrankung beitragen. Diese frühen zellulären Veränderungen an der vitreomakulären Grenzfläche sind mit der uns zur Verfügung stehenden retinalen Bildgebung mittels Optischer Kohärenz-Tomographie (OCT) nicht darstellbar. Unsere Ergebnisse erklären, warum bei IMF nach Vitrektomie ohne Peeling der ILM vermehrt Rezidive und ausgeprägte epiretinale Membranen auftreten können.

Die Rationale der Vitrektomie mit Peeling der ILM bei IMF liegt in der Entfernung der tangentialen, traktiven Kräfte, hervorgerufen durch die hintere Glaskörperwand und epiretinale Zellproliferationen. Dies ermöglicht einen Verschluss des Makulaforamens. Die Entfernung der ILM ist dabei umso wichtiger für den Therapieerfolg, je größer der Durchmesser des IMF präoperativ gemessen wird.

Die zweite Publikation mit dem Titel „*Vitreotomy for diabetic macular edema: optical coherence tomography criteria and pathology of the vitreomacular interface*“ befasst sich ebenfalls mit pathologischen Veränderungen der vitreomakulären Grenzfläche, hier im Rahmen des Diabetischen Makulaödems (DMÖ).

Das Diabetische Makulaödem ist die häufigste Ursache eines schweren Sehverlustes im Rahmen der Diabetischen Retinopathie.²¹ Die Therapieoptionen umfassen derzeit intravitreale Injektionen von anti-vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (Anti-VEGF) oder Steroiden, die Vitrektomie und/oder die retinale Laserbehandlung.²²⁻²⁷ Dabei sind pathologische Veränderungen an der vitreomakulären Grenzfläche sowohl für die Entstehung als auch für den Verlauf der Erkrankung von zentraler Bedeutung.^{14,28-30} Vor Einführung der intravitrealen Pharmakotherapie stellten die Pars-plana-Vitrektomie und Laser-Photokoagulation die wichtigsten Therapieprinzipien des Diabetischen Makulaödems dar.³¹ In den aktuellen europäischen Leitlinien wird die Vitrektomie als Therapie der Wahl beim Diabetischen Makulaödem mit traktiven Veränderungen empfohlen.²² Aktuelle Studien konnten einen positiven Nutzen der

Vitrektomie mit Entfernung der ILM auch ohne in der OCT erkennbare epiretinale Membranen zeigen.³²

Ziel der Studie war es, diese Veränderungen im Bereich der vitreomakulären Grenzschicht auf zellulärer und extrazellulärer Ebene in Augen mit traktivem und nicht-traktivem Diabetischen Makulaödem zu charakterisieren und mit Kriterien der OCT sowie mit klinischen Daten zu korrelieren. Dies wurde mit Hilfe von Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie, Immunzytochemie und Transmissionselektronenmikroskopie durchgeführt. Es wurden mittels Pars-plana-Vitrektomie Präparate der ERM und ILM aus 27 Augen von 26 Patienten gewonnen und mittels Flachpräparation vorbereitet. Anschließend erfolgte die Zellkernfärbung mit DAPI zur Beurteilung der Zelldichte und des Zellverteilungsmusters sowie die immunzytochemischen Färbungen mit insgesamt 12 primären und drei sekundären Antikörpern.

Neben der Aufarbeitung der Präparate zur Untersuchung der Zellzusammensetzung und Ultrastruktur mittels Transmissionselektronenmikroskopie waren die Erhebung klinischer Daten sowie die Analyse der Optischen Kohärenztomographie (OCT) wichtige Säulen dieser Arbeit.

Die OCT-Analyse ermöglichte eine genauere Unterscheidung der verschiedenen Ödemtypen und eine Korrelation zu anderen Ergebnissen. Zusätzlich wurden typische Biomarker beachtet, die auch in der klinischen Praxis einen wichtigen Stellenwert besitzen.

Insgesamt konnte in dieser Studie die Existenz starker pathologischer fibrozellulärer Veränderungen im Bereich der vitreomakulären Grenzfläche in allen Augen mit Diabetischem Makulaödem unabhängig vom Ödemtyp nachgewiesen werden. Diese Veränderungen äußern sich in der Bildung mehrschichtiger Membranen, die hauptsächlich aus in Kollagen-Strängen eingebetteten Hyalozyten und Myofibroblasten bestehen. Die auch bei den Makulaforamina nachgewiesenen CD-45 positiven Hyalozyten spielen eine wichtige Rolle in der Synthese der extrazellulären Matrix. Sie können im aktivierten Zustand den Wachstumsfaktor VEGF produzieren und sind in der Lage, in Myofibroblasten zu transdifferenzieren.³³⁻³⁵ Dies konnte in dieser Studie durch die Kolokalisation von CD45 und α -SMA bestätigt werden. Die kontraktile Eigenschaften der Myofibroblasten konnten durch die Kolokalisation von α -SMA und

Kollagen Typ I gezeigt werden. Es bestand jedoch kein Unterschied in der Zellzusammensetzung traktiver und nicht-traktiver Makulaödeme.

Der Zeitpunkt einer chirurgischen Intervention, vor allem in der Therapie des nicht-traktiven Diabetischen Makulaödems, wird weiterhin kontrovers diskutiert. Die in dieser Studie immunzytochemisch und ultrastrukturell nachgewiesenen Veränderungen im Bereich der vitreomakulären Grenzfläche beim Diabetischen Makulaödem sprechen für eine frühere chirurgische Intervention im Zusammenspiel der therapeutischen Optionen. Auch die Analyse der funktionellen Parameter zeigte eine signifikante Verbesserung der Sehkraft von etwa drei Zeilen über einen mittleren Beobachtungszeitraum von 17 Monaten.

Vorkommen und Zusammensetzung von Zellproliferationen im Bereich der vitreomakulären Grenzfläche bei traktiven Makulopathien wurde auch in der dritten Publikation mit dem Titel „*Premacular cell proliferation profiles in tangential traction vitreo-maculopathies suggest a key role for hyalocytes*“ untersucht. Schwerpunkt waren hier neben den in der OCT visualisierbaren hyperreflektiven epiretinalen Membranen auch die eher isoreflektiven prämakulären Zellproliferationen. Diese Zellproliferationen wurden erstmals im parafovealen Bereich bei Makulaschichtforamina entdeckt und somit als lamellar hole-associated epiretinal proliferation (LHEP) bezeichnet.^{36,37} Im Gegensatz zu epiretinalen Membranen zeigen diese Proliferationen keine Hinweise auf traktive Eigenschaften.³⁸⁻⁴⁰ Man findet sie jedoch nicht nur bei Makulaschichtforamina, sondern auch assoziiert mit anderen traktiven Makulopathien wie der idiopathischen epiretinalen Gliose und durchgreifenden Makulaforamina.^{41,42}

Um diese zwei Proliferationstypen, die prämakulären Proliferationen (LHEP) und epiretinalen Membranen (ERM) in verschiedenen traktiven Makulopathien zu vergleichen, wurden 10 Präparate aus 10 Augen aufgearbeitet. Darunter waren drei Patienten mit idiopathischer epiretinaler Gliose, vier Patienten mit Makulaschichtforamen und drei Augen mit durchgreifendem Makulaforamen. Das durch Vitrektomie mit Peeling gewonnene Gewebe wurde mittels Flachpräparation und DAPI-Färbung für die Phasenkontrast- und Interferenzmikroskopie vorbereitet sowie anschließend auf 10 verschiedene primäre Antikörper getestet. Die

ultrastrukturelle Analyse erfolgte mittels Transmissionselektronenmikroskopie. In der Studie konnte eine ähnliche Zellzusammensetzung der prämakulären Proliferationen in allen drei untersuchten Makulopathien nachgewiesen werden. Sowohl in der OCT als auch durch den fehlenden immunzytochemischen Nachweis von Myofibroblasten konnten keine Hinweise auf traktive Eigenschaften dieser homogenen Zellproliferationen dargestellt werden. Als dominierender Zelltyp präsentierten sich Zellen glialer Herkunft, die sich in der ultrastrukturellen Analyse oft dicht aneinander, ohne Einbettung in extrazelluläre Matrix, zeigten. Im Gegensatz dazu bestätigte die Untersuchung der epiretinalen Membranen in den verschiedenen Makulopathien das Vorkommen von Hyalozyten und Myofibroblasten und somit eine deutlich unterschiedliche Zellzusammensetzung verglichen mit den homogenen prämakulären Proliferationen. Diese sowohl traktiven als auch nicht traktiven Proliferationen konnten in topographisch engem Zusammenhang nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten sich in der ultrastrukturellen Analyse mit dem Nachweis von Lipofuszin-Akkumulationen innerhalb der Hyalozyten Hinweise auf degenerative Prozesse im Bereich der vitreomakulären Grenzfläche, die möglicherweise eine Rolle in der Entwicklung traktiver Makulopathien spielen.

Zusammenfassend konnte in allen drei Publikationen die zentrale Rolle der Hyalozyten in der Pathogenese und dem klinischen Verlauf von traktiven Erkrankungen der Makula dargelegt werden. Die Vorgänge, die zu traktiven Makulopathien führen, werden in hohem Maße durch die Veränderung der vitreoretinalen Grenzschicht und Transdifferenzierung vitrealer Hyalozyten beeinflusst. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Arbeiten belegen, dass die Vitrektomie bei verschiedenen traktiven Makulopathien frühzeitig empfohlen werden kann. Die Entfernung der inneren Grenzmembran ist dabei zentraler Bestandteil des operativen Vorgehens beim Vorkommen epiretinaler Zellmembranen. Darüber hinaus ist es wichtig, die wissenschaftliche Erforschung von Erkrankungen der Makula weiterhin auch auf die vitreoretinale Grenzfläche und die pathologischen Veränderungen des Glaskörpers zu lenken.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERSTEN PUBLIKATION

Ziel der Arbeit war die Analyse der vitreomakulären Grenzfläche in Augen mit durchgreifendem Makulaforamen. Dafür wurde die innere Grenzmembran von 20 Patienten mit einem durchgreifenden Makulaforamen mit einem Durchmesser $<250\ \mu\text{m}$ mittels Pars-plana-Vitrektomie entfernt. Die Präparate wurden mittels Flachpräparation für die nachfolgende Phasenkontrast- und Interferenzmikroskopie sowie Immunzytochemie vorbereitet. Es wurden insgesamt 13 Antikörper zur Detektion verschiedener Zelltypen wie Gliazellen, Hyalozyten, Makrophagen oder Zellen des retinalen Pigmentepithels und verschiedene Kollagene und alpha-smooth muscle actin (α -SMA) genutzt. Die klinischen Daten wurden inklusive der retinalen Bildgebung mittels Optischer Kohärenztomographie zur Ausmessung des Foramendurchmessers dokumentiert.

Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die Größe des Foramendurchmessers positiv mit der Zelldichte auf der ILM korreliert ($p=0,019$). Die dort beobachteten Zellen waren hauptsächlich einzeln auf der Membran vorkommend, Zellcluster wurden bei fünf Patienten gesehen. Die Immunfärbung zeigte Gliazellen als quantitativ größte Zellpopulation. In den Bereichen von Zellclustern wurde eine stark positive Reaktion auf α -SMA sowie dem Proliferationsmarker Ki-67 gefunden.

Zusammenfassend konnten Gliazellen als Hauptzelltyp auf der ILM bei durchgreifenden Makulaforamina kleiner $250\ \mu\text{m}$ ohne höhere Proliferationsaktivität nachgewiesen werden. In manchen Augen wurden Zellcluster mit der Fähigkeit der Proliferation und Traktion gefunden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Notwendigkeit einer verbesserten Bildgebung der vitreomakulären Grenzfläche mittels Optischer Kohärenztomographie zur Visualisierung der Zellcluster und möglicher tangentialer Traktionen

SUMMARY OF THE FIRST PUBLICATION

The objective was the analysis of the vitreomacular interface in eyes with full thickness macular holes. The internal limiting membrane of 20 patients with a full thickness macular hole with a diameter $<250\ \mu\text{m}$ was harvested by pars plana vitrectomy. The specimen were then prepared by flat mount preparation for phase contrast and interference microscopy and immunocytochemistry. A total of 13 antibodies were used for the detection of different cell types such as glial cells, hyalocytes, macrophages or cells of the retinal pigment epithelium and different collagens as well as alpha-smooth muscle actin (α -SMA). Retinal imaging using optical coherence tomography to measure the diameter of the macular hole and clinical data was documented.

It was shown for the first time that the size of the macular hole diameter correlates positively with the cell density on the ILM ($p=0.019$). The cells detected there were mainly single cells. Cell clusters were seen in five patients. The immunocytochemistry revealed that glial cells predominate to a large extent. A strongly positive signal to α -SMA and the proliferation marker Ki-67 was found in the areas of cell clusters. In summary, glial cells could be detected as the main cell type at the ILM in severe macular holes smaller than $250\ \mu\text{m}$ without higher proliferation activity. In some eyes, cell clusters with the ability to proliferate and induce traction were found. The results of this work show the need for improved imaging of the vitreomacular interface using optical coherence tomography to visualize cell clusters and possible tangential tractions.

ZUSAMMENFASSUNG DER ZWEITEN PUBLIKATION

Ziel der Arbeit war die Analyse der vitreomakulären Grenzfläche bei Patienten mit Diabetischem Makulaödem sowie die Korrelation dieser mit klinischen Daten und Auswertungen der Optischen Kohärenztomographie (OCT). Hierfür wurden 27 Augen von 26 Patienten eingeschlossen, die in der Augenklinik der LMU München eine Pars-plana-Vitrektomie mit Peeling epiretinalen Gewebes und der inneren Grenzmembran (ILM) erhalten hatten. Der Einschluss erfolgte retrospektiv mit Hilfe des Registers des Labors für Histopathologie und Elektronenmikroskopie.

Die Analyse des durch die Operation gewonnenen Gewebes bestand aus Phasenkontrast- und Interferenzmikroskopie, immunzytochemischer Färbung mit 12 primären Antikörpern und der ultrastrukturellen Darstellung mittels Transmissionselektronenmikroskopie.

Mit Hilfe der OCT wurden die Ödeme genauer nach Vorkommen von sponge-like diffuse retinal thickening (SDRT), zystoiden Veränderungen (CME) und subretinaler Abhebung (SRD) klassifiziert sowie Eigenschaften und Biomarker der vitreoretinalen Grenzfläche wie hyperreflektive epiretinale Membranen oder eine verdickte hintere Glaskörperrinde erfasst.

Unabhängig vom Ödemtyp zeigten sich CD-45 positive Hyalozyten, kontraktile α -SMA positive Myofibroblasten und Gliazellen als dominierender Zelltyp. Ebenso unabhängig waren die pathologischen Umbauvorgänge im ultrastrukturellen Bereich. So konnten häufig mehrschichtige Kollagenmembranen dargestellt werden, in die Hyalozyten und Myofibroblasten eingebettet waren. Auch Zeichen einer abgelaufenen Vitreoschisis, einer pathologischen Ablösung des hinteren Glaskörpers von der Netzhaut mit Verbleib von Glaskörperkollagen-Residuen auf der Netzhaut, konnten häufig beobachtet werden.

Auf der retinalen Seite der ILM-Präparate fanden sich nur kleine Zellfragmente ohne Hinweis auf größere Destruktionen durch ein ILM-peeling.

In Bezug auf die Analyse klinischer Parameter zeigte sich ein Anstieg der bestkorrigierten Sehschärfe im Mittel um drei Zeilen bei einem mittleren Beobachtungszeitraum von 17 ± 10 Monaten.

Zusammenfassend konnte man in allen Augen unabhängig vom Typ des Diabetischen Makulaödems pathologische Veränderungen im Bereich der vitreoretinalen Grenzfläche darstellen. Diese Veränderungen manifestierten sich in ausgeprägten fibrozellulären Membranen, was auf pathologische Umbauvorgänge der hinteren Glaskörperrinde und auf Transdifferenzierung von Hyalozyten in Myofibroblasten hinweist. Die Ergebnisse sprechen insgesamt für eine frühe operative Intervention mittels Pars-plana-Vitrektomie mit Peeling auch in Augen ohne ausgeprägte traktive Komponente in der OCT-Darstellung.

SUMMARY OF THE SECOND PUBLICATION

The purpose of this study was to analyze the vitreomacular interface in diabetic macular edema and to correlate it with clinical data and evaluations of optical coherence tomography (OCT). With the help of the register of the Laboratory of Histopathology and Electron Microscopy 27 eyes of 26 patients, who received a pars plana vitrectomy including peeling of epiretinal tissue and the inner limiting membrane (ILM) at the Eye Clinic of the LMU Munich, were chosen to be included in this study.

The analysis of the tissue obtained by surgery consisted of phase contrast and interference microscopy, immunocytochemical staining with 12 primary antibodies and ultrastructural imaging by transmission electron microscopy. OCT was used to classify edema more precisely according to the presence of sponge-like diffuse retinal thickening (SDRT), cystoid changes (CME) and subretinal detachment (SRD) as well as properties and biomarkers of the vitreoretinal interface such as hyperreflective epiretinal membranes or a thickened posterior vitreous cortex. Regardless of the type of edema, CD-45 positive hyalocytes, contractile α -SMA positive myofibroblasts and glial cells were the dominant cell types. The pathological remodelling processes were equally independent in the ultrastructural analysis. Thus,

multi-layered collagen membranes, in which hyalocytes and myofibroblasts were embedded, could be visualized frequently. In addition, signs of an elapsed vitreoschisis, an anomalous posterior vitreous detachment with persistence of vitreous collagen residues on the retinal side of the ILM, were often visible.

Only small cell fragments were found on the retinal side of the ILM specimen without evidence of major destruction by ILM peeling.

The analysis of clinical parameters revealed that the best corrected visual acuity increased by an average of three lines over a mean observation period of 17 ± 10 months.

In summary, pathological changes at the vitreoretinal interface could be observed in all eyes irrespective of the DME type. These changes manifested themselves in distinct fibrocellular membranes, indicating pathologic remodeling of the posterior vitreous cortex and trans-differentiation of hyalocytes into myofibroblasts. The results speak in favor of an early surgical intervention by pars plana vitrectomy with peeling even in eyes without a pronounced tractive component in the OCT imaging.

ZUSAMMENFASSUNG DER DRITTEN PUBLIKATION

Ziel dieser interventionellen, klinisch-pathologischen Fallserie war die immunzytochemisch und ultrastrukturelle Charakterisierung von epiretinalem Gewebe aus Augen mit tangential traktiver Makulopathie. Dafür wurde abermals das epiretinale Gewebe mittels Pars-Plana-Vitrektomie mit Peeling gewonnen. Eingeschlossen wurden insgesamt 10 Augen, davon drei mit epiretinale Gliose, vier mit Makulaschichtforamen und drei mit durchgreifendem Makulaforamen. Mit Hilfe von Aufnahmen der Optischen Kohärenztomographie erfolgte zudem eine Einteilung nach Vorhandensein von epiretinalem Gewebe ohne Hinweis auf traktive Eigenschaften oder epiretinale Membran. Die Aufarbeitung des Gewebes erfolgte für die Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie sowie für die Immunzytochemie, hierfür mit 10 primären Antikörpern. Anschließend wurde die Ultrastruktur mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie dargestellt.

Die Analyse der Zellzusammensetzung zeigte als dominierenden Zelltyp in den epiretinale Proliferationen Gliazellen, wohingegen in epiretinale Membranen hauptsächlich Hyalozyten zu finden waren. Es konnten autofluoreszierende Granula im Bereich der epiretinale Proliferationen dargestellt werden. Ultrastrukturell setzten sich die epiretinale Proliferationen aus dichten Gliazellansammlungen neben Hyalozyten unabhängig der grundlegenden Erkrankung zusammen. Epiretinale Membranen charakterisierten sich durch das Vorkommen von traktiven Myofibroblasten, eingebettet in Kollagenstränge, im Gegensatz zu epiretinale Proliferationen ohne traktive Komponente.

Insgesamt zeigten alle drei Arten der traktiven Makulopathien ähnliche Zellzusammensetzungen der epiretinale Proliferationen. Diese nicht-traktiven Proliferationen stehen in direktem topographischem Zusammenhang mit traktiven epiretinale Membranen. Das Vorkommen von Hyalozyten weist auf eine wichtige Rolle dieser Zellen in der Entwicklung von pathologischen, degenerativen Prozessen im Bereich der vitreomakulären Grenzfläche hin.

SUMMARY OF THE THIRD PUBLICATION

The purpose of this interventional, clinical-pathological case series was to characterize cell composition and ultrastructure of epiretinal tissue from eyes with a tangential tractive maculopathy. The epiretinal tissue was obtained by pars plana vitrectomy with peeling. A total of 10 eyes were included, three with macular pucker, four with lamellar macular holes and three with full thickness macular holes. OCT images were used to differentiate between epiretinal tissue with no indication of tractive properties and epiretinal membranes. The tissue was processed for interference and phase contrast microscopy as well as immunocytochemistry using 10 primary antibodies. The ultrastructure was visualized by transmission electron microscopy. Cell analysis showed glial cells as the dominant cell type in epiretinal proliferations, whereas hyalocytes were mainly found in epiretinal membranes. Autofluorescent granules in the area of epiretinal proliferation were shown. Ultrastructurally, epiretinal proliferations consisted of dense glial cell accumulations neighbouring hyalocytes regardless of the underlying disease. Epiretinal membranes were characterized by the presence of tractive myofibroblasts embedded in collagen strands as contrasted to epiretinal proliferations without traction.

All three types of tractive maculopathies showed similar cell compositions of epiretinal proliferations. These non-tractive proliferations are directly related to tractive epiretinal membranes. The occurrence of hyalocytes indicates an important role of these cells in the development of pathological degenerative processes at the vitreomacular interface.

REFERENZEN

1. Sebag J. Anomalous posterior vitreous detachment: a unifying concept in vitreo-retinal disease. *Graefes Arch Clin Exp* 2004; 242: 690-698.
2. Gandorfer A, Rohleder M, Kampik A. Epiretinal pathology of vitreomacular traction syndrome. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 902-909.
3. Smiddy WE, Maguire AM, Green WR, et al. Idiopathic epiretinal membranes: Ultrastructural characteristics and clinicopathologic correlation. *Ophthalmology* 1989; 96: 811-820.
4. Johnson MW. Perifoveal vitreous detachment and its macular complications. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2005; 103: 537-567.
5. Heegard S. Morphology of the vitreoretinal border region. *Acta Ophthalmol Scand Suppl.* 1997;(222):1-31.
6. Hogan MJ, Alvarado JA, Weddel JE. *Histology of the human eye: an atlas and textbook.* Philadelphia: WB Saunders; 1971. p. 488.
7. J. Sebag (ed.), *Vitreous: in Health and Disease*, DOI 10.1007/978-1-4939-1086-1_11, Springer Science+Business Media New York 2014.
8. Balazs EA. Molecular Morphology of the vitreous body. In: Smelser GK, editor. *The structure of the eye.* New York: Academic; 1961. p. 293-310.
9. Schwalbe G. *Lehrbuch der Anatomie des Auges.* Erlangen: E Besold; 1887. p. 288.
10. Balazs EA. In: *Acta XVIII. Concilium ophthalmologicum*, vol. 2. Brussels: 1958. p. 1296.
11. Lazarus HS, Hageman GS. In situ characterization of the human hyalocyte. *Arch Ophthalmol.* 1994 Oct;112(10):1356-62.
12. Schumann RG, Eibl KH, Zhao F, et al. Immunocytochemical and Ultrastructural Evidence of Glial Cells and Hyalocytes in Internal Limiting Membrane Specimens of Idiopathic Macular Holes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011;52(11):7822-7834. doi: 10.1167/iovs.11-7514.
13. Gandorfer A, Rohleder M, Kampik A. Epiretinal pathology of vitreomacular traction syndrome. *Br J Ophthalmol.* 2002 Aug; 86(8):902-9.
14. Gandorfer A, Rohleder M, Grosselfinger S, et al. Epiretinal pathology of diffuse diabetic macular edema associated with vitreomacular traction. *Am J Ophthalmol.* 2005 Apr;139(4):638-52.
15. Inoue Y, Kadonosono K, Yamakawa T, et al. Surgically-induced inflammation with 20-, 23-, 25-gauge vitrectomy systems: an experimental study. *Retina* 2009; 29: 477-480.
16. Hisatomi T, Notomi S, Tachibana T, et al. Ultrastructural changes of the vitreoretinal interface during long-term follow-up after removal of the internal limiting membrane. *Am J Ophthalmol* 2014; 158: 550-556.

17. Duker JS, Kaiser PK, Binder S, et al. The International Vitreomacular Traction Study Group classification of vitreomacular adhesion, traction, and macular hole. *Ophthalmology*. 2013 Dec;120(12):2611-2619. doi: 10.1016/j.ophtha.2013.07.042. Epub 2013 Sep 17.
18. Schumann RG, Schaumberger MM, Rohleder M, et al. Ultrastructure of the vitreomacular interface in full-thickness idiopathic macular holes: a consecutive analysis of 100 cases. *Am J Ophthalmol* 2006;141:1112–1119.
19. Gandorfer A, Scheler R, Haritoglou C, et al. Pathology of the macular hole rim in flat-mounted internal limiting membrane specimens. *Retina* 2009;29:1097–1105.
20. Gandorfer A, Scheler R, Schumann R, et al. Interference microscopy delineates cellular proliferation on flat mounted internal limiting membrane specimens. *Br J Ophthalmol* 2009;93:120–122.
21. Yau JWY, Rogers SL, Kawasaki R, et al. Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2012;35:556–564.
22. Schmidt-Erfurth U, Garcia-Arumi J, Bandello F, et al. Guidelines for the management of diabetic macular edema by the European Society of Retina Specialists (EURETINA). *Ophthalmologica* 2017;237(4):185–222.
23. Bressler SB, Melia M, Glassmann AR, et al. Ranibizumab plus prompt or deferred laser for diabetic macular edema in eyes with vitrectomy before anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Retina* 2015;35(12):2516–2528.
24. Browning DJ, Lee C, Stewart MW, et al. Vitrectomy for center-involved diabetic macular edema. *Clin Ophthalmol* 2016;10:735–742.
25. Jackson TL, Nicod E, Angelis A, et al. Pars plana vitrectomy for diabetic macular edema. A systematic review, meta-analysis, and synthesis of safety literature. *Retina* 2017; 37(5):886–895.
26. Jackson TL, Johnston RL, Donachie PH, et al. The Royal College of Ophthalmologists' National Ophthalmology Database Study of vitreoretinal surgery: Report 6, Diabetic vitrectomy. *JAMA Ophthalmol* 2016;134(1):79–85.
27. Patelli F, Radice P, Giacomotti E. Diabetic macular edema. *Dev Ophthalmol* 2014;54:164–173.
28. Loukovaara S, Nurkkala H, Tamene F, et al. Quantitative proteomics analysis of vitreous humor from diabetic retinopathy patients. *J Proteome Res* 2015;14:5131–5143.
29. Ophir A, Martinez MR. Epiretinal membranes and incomplete posterior vitreous detachment in diabetic macular edema, detected by spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(9):6414–6420.
30. Matsunaga N, Ozeki H, Hirabayashi Y, et al. Histopathologic evaluation of the internal limiting membrane surgically excised from eyes with diabetic maculopathy. *Retina* 2005; 25(3):311–316.
31. Gandorfer A. Diffuse diabetic macular edema: pathology and implications for surgery. *Dev Ophthalmol* 2007;38:88–95.

32. Yamamoto T, Naoko A, Takeuchi S. Vitrectomy for diabetic macular edema: the role of posterior vitreous detachment and epimacular membrane. *Am J Ophthalmol* 2001;132(3):369–377.
33. Ziada J, Hagenau F, Compera D, et al. Vitrectomy for intermediate age-related macular degeneration associated with tangential vitreomacular traction: a clinicopathologic correlation. *Retina* 2018;38(3):531–540.
34. Hata Y, Sassa Y, Kita T, et al. Vascular endothelial growth factor expression by hyalocytes and its regulation by glucocorticoid. *Br J Ophthalmol* 2008;92:1540–1544.
35. Sakamoto T, Ishibashi T. Hyalocytes: essential cells of the vitreous cavity in vitreoretinal pathophysiology. *Retina* 2011;31:222–228.
36. Pang CE, Spaide RF, Freund KB. Epiretinal proliferation seen in association with lamellar macular holes: a distinct clinical entity. *Retina*. 2014 Aug;34(8):1513–23.
37. Pang CE, Spaide RF, Freund KB. Comparing functional and morphologic characteristics of lamellar macular holes with and without lamellar hole-associated epiretinal proliferation. *Retina*. 2015 Apr;35(4):720–6.
38. Haouchine B, Massin P, Tadayoni R, et al. Diagnosis of macular pseudoholes and lamellar macular holes by optical coherence tomography. *Am J Ophthalmol*. 2004 Nov;138(5):732–9.
39. Witkin AJ, Ko TH, Fujimoto JG, et al. Redefining lamellar holes and the vitreomacular interface: an ultrahigh-resolution optical coherence tomography study. *Ophthalmology*. 2006 Mar; 113(3):388–97.
40. Parolini B, Schumann RG, Cereda MG, Haritoglou C, Pertile G. Lamellar macular hole: a clinicopathologic correlation of surgically excised epiretinal membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Nov;52(12):9074–83.
41. Itoh Y, Levison AL, Kaiser PK, et al. Prevalence and characteristics of hyporeflective preretinal tissue in vitreomacular interface disorders. *Br J Ophthalmol*. 2016 Mar;100(3):399–404.
42. Bae K, Lee SM, Kang SW, et al. Atypical epiretinal tissue in full-thickness macular holes: pathogenic and prognostic significance. *Br J Ophthalmol*. 2019 Feb;103(2):251-256. doi: 10.1136/bjophthalmol-2017-311810. Epub 2018 Apr 26.

DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau Professor Dr. med. Ricarda Schumann bedanken. Liebe Ricarda, ohne Deine Inspiration, Deine Hilfsbereitschaft, Dein Engagement, Dein Wissen, Deine Zeit und Deine Ausdauer wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen.

Herrn Professor Dr. med. Siegfried Priglinger und Herrn Professor Dr. med. Anselm Kampik danke ich für die Möglichkeit der Promotion an der Augenklinik der LMU München.

Eine große Hilfe im Labor war zudem Frau Renate Scheler. Vielen Dank für Deine Unterstützung.

Meine lieben Mitdoktoranden und nun Kollegen Dr. med. Denise Vogt, Dr. med. Jean Ziada und Dr. med. Stefanie Günther, Euch gilt mein Dank für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor und die zahlreichen kleinsten Hilfen, die ihr mir gegeben habt. Ohne Euch hätte es sicher nicht so viel Spaß gemacht!

Für jedwede Hilfen bei Design und Layout darf ich mich bei einem meiner langjährigsten und besten Freunde bedanken, Kai Orkisz.

Abschließend möchte ich meiner Familie meine tiefste Dankbarkeit aussprechen. Ich schätze mich als ungemein glücklich, Euch zu haben. Danke für das Netz und den doppelten Boden.