

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

**Immunzytochemische und immunelektronenmikroskopische
Charakterisierung der vitreoretinalen Grenzfläche
bei Patienten mit primärer und sekundärer traktiver Makulopathie**

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

vorgelegt von
Jean Ziada
aus Aleppo, Syrien

2018

Zur Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: PD Dr. med. Ricarda G. Schumann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Arnd Gandorfer
Prof. Dr. Christos Haritoglou

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

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.2018

Eidesstattliche Versicherung

Jean Ziada

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende kumulative Dissertation mit dem Thema:

„Immunzytochemische und immunelektronenmikroskopische Charakterisierung der vitreoretinalen Grenzfläche bei primärer und sekundärer traktiver Makulopathie“

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, 12.09.2017

Ort, Datum

Jean Ziada

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
Publikationsliste	7
Einführung	8
Zusammenfassung I	14
Veröffentlichung I	17
Zusammenfassung II	18
Veröffentlichung II	21
Literaturverzeichnis	22
Danksagung	25

Abkürzungsverzeichnis

α -SMA	α -Aktin Filament (engl.: α -smooth-muscle-actin)
AMD	Altersbedingte Makuladegeneration (engl.: Age-related macular degeneration)
BCVA	Bestkorregierte Sehschärfe (engl.: Best-corrected visual acuity)
Cd	Kollagenfibrillen (engl.: Collagen fibrils)
CLEM	Korrelative Licht- und Elektronenmikroskopie (engl.: Correlative light and electron microscopy)
CNV	Choroidale Neovaskularisation (engl.: Choroidal neovascularization)
Col	Natives Glaskörperkollagen (engl.: Native vitreous collagen)
Col-I/II/III	Kollagen-Type I/II/III (engl.: Collagen type I/II/III)
CRALBP	Zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein (engl.: Cellular retinaldehyde-binding protein)
DAPI	Fluoreszenzfarbstoff: 4',6-Diamidino-2-Phenylindole
ERM	Epiretinale Membran (engl.: Epiretinal membrane)
F	Weiblich (engl.: Female)
FLSC	Engl.: Fibrous long-spacing collagen
FU	Nachbeobachtung (engl.: Follow-up)
GFAP	Fibrilläres saures Gliaprotein (engl.: Glial fibrillary acidic protein)
Hy	Hyalozyten (engl.: Hyalocytes)
IgG/G2a	Immunglobulin Klasse G/G2a
ILM	Innere Grenzmembran (engl.: Internal limiting membrane)
IOL	Intraokularlinse (engl.: Intraocular lens)
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
M	Männlich (engl.: Male)
N	Zellkern (engl.: Cell nuclei)
NFC	Neugebildetes Kollagen (engl.: Newly formed collagen)
NVC	Natives Glaskörperkollagen (engl.: Native vitreous collagen)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
My	Myofibroblasten (engl.: Myofibroblastes)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: Phosphat-buffered saline)

PMM	Prämakuläre Membran (engl.: Premacular membrane)
ppV	Pars-plana-Vitrektomie (engl.: Pars plana vitrectomy)
PVD	Hintere Glaskörperabhebung (engl.: Posterior vitreous detachment)
RPE	Retinales Pigmentepithel (engl.: Retinal pigment epithel)
SD-OCT	Spektral-Domain-optische Kohärenztomographie (engl.: Spectral-domain optical coherence tomography)
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (engl.: Vascular endothelial growth factor)
VMA	Vitreomakuläre Adhäsion (engl.: Vitreomacular adhesion)
VMT	Vitreomakuläre Traktion (engl.: Vitreomacular traction)

Publikationsliste

Veröffentlichung I:

Ziada J, Hagenau F, Compera D, Wolf A, Scheler R, Priglinger S, Schumann RG. *Vitrectomy for intermediate age-related macular degeneration associated with tangential traction: a clinicopathologic correlation*. Retina 2018;38(3):531-540.

Impact Factor: 3.700

Top-Journal

Veröffentlichung II:

Schumann RG, Gandorfer A, **Ziada J**, Scheler R, Schaumberger MM, Wolf A, Kampik A, Haritoglou C. *Hyalocytes in idiopathic epiretinal membranes: a correlative light and electron microscopic study*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2014;252(12):1887-1894.

Impact Factor: 2,349

Standard-Journal

Einführung

Die vorliegende kumulative Dissertation basiert auf immunzytochemischen und elektronmikroskopischen Untersuchungen der vitreoretinalen Grenzfläche bei traktiven Makulopathien der Netzhaut. Anhand von zwei Originalarbeiten, welche sich mit den zellulären Komponenten epiretinaler Membranen bei primärer epiretinaler Gliose und bei sekundärer epiretinaler Gliose bei Patienten mit altersbedingter Makuladegeneration beschäftigen, werden die Untersuchungsergebnisse vorgelegt, die im Rahmen der Forschungstätigkeit in der Arbeitsgruppe für Vitreoretinale Pathologie und Elektronenmikroskopie an der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München erhoben wurden.

Die Forschungsprojekte wurden bereits im Sommer 2013 begonnen und hatten zum Ziel, das Verständnis für die Entstehung traktiver Makulopathien weiter zu verbessern, die Abgrenzung gegenüber anderen Netzhauterkrankungen zu optimieren sowie das operative Vorgehen in der Makulachirurgie weiterzuentwickeln. Zur Durchführung der vorgestellten Forschungsarbeiten wurden unter der Leitung von Frau PD Dr. Ricarda Schumann in der Zeit von Juni 2013 bis Juni 2015 insgesamt 54 Präparate von 54 Augen von 53 Patienten mit idiopathischen epiretinalen Membranen und sekundären epiretinalen Membranen bei altersbedingter Makuladegeneration in Einzelprojekten aufgearbeitet und analysiert. Insbesondere die Befunde der hochauflösenden Spektral-Domain-optischen Kohärenztomographie (SD-OCT), klinische Untersuchungsbefunde und intraoperative Beobachtungen wurden retrospektiv dokumentiert und korreliert.

In der Retinologie umfassen die traktiven Makulopathien eine heterogene Gruppe von Netzhauterkrankungen, welche die Stelle des schärfsten Sehens betreffen. Zu den traktiven Makulopathien gehören insbesondere die epiretinale Gliose und die vitreomakuläre Traktion, die als primäre aber auch als sekundäre Veränderungen an der vitreoretinalen Grenzfläche vorkommen können. Als wesentliches Merkmal zeigen alle traktiven Makulopathien pathologische, mehrschichtige Zell- und Kollagenansammlungen, die sich an der anatomischen Grenze zwischen Glaskörper und innerer Grenzmembran (ILM) der Netzhaut im Bereich der Makula ausbilden. Diese werden als epiretinale Membranen bezeichnet.¹⁻⁵

Epiretinale Membranen besitzen eine hohe Prävalenz in der Bevölkerung. Fast jeder Dritte über 45-Jährige weist funduskopisch sichtbare epiretinale Membranen auf.⁶ Durch die Ausbildung vitreomakulärer Zugkräfte an der Grenzfläche zwischen Glaskörper und Netzhaut entstehen bei diesen traktiven Makulopathien schwere epiretinale, intra- und subretinale Veränderungen.⁷⁻⁹ Da sich Myofibroblasten in epiretinalen Membranen aktiv kontrahieren

können, verursachen sie eine schwere Faltenbildung der Netzhaut an der Stelle des schärfsten Sehens.¹⁰⁻¹⁵ Dadurch verlieren Betroffene nicht nur massiv an Sehschärfe, sondern sehen in hohem Maße verzerrt, so dass beispielsweise Lesen, Schreiben oder Autofahren im Alltag nicht mehr möglich sind. Eine schwere, dauerhafte Sehbehinderung ist die Folge. Derzeit ergibt sich als einziges therapeutisches Vorgehen die mikrochirurgische Intervention mit Entfernung der ILM und der sowohl primären als auch sekundären epiretinalen Membranen von der Oberfläche der Netzhaut.¹⁶⁻²² Da die ILM eine dünne, transluzide Struktur von nur 4-10 µm Dicke darstellt, ist dieses sogenannte „Peeling“ von ILM und epiretinalem Gewebe während der Makulachirurgie ein diffiziles Verfahren mit entsprechenden Risiken.^{23,24}

Die Pathogenese epiretinaler Membranen hängt eng zusammen mit den altersbedingten Veränderungen des Glaskörpers. Eine partielle hintere Glaskörperabhebung mit Vitreoschisis wurde in der Hälfte der Augen mit idiopathischem Makular Pucker beobachtet.^{15,25} In diesem Zusammenhang kann eine insuffiziente, altersbedingte Separation des hinteren Glaskörpers von der inneren Grenzmembran zu einer Spaltung der Glaskörperrinde führen, die zum Verbleib fibrillärer Glaskörperkollagene an der Oberfläche der Netzhaut im Makulabereich führt.^{1,7}

Seit einigen Jahren wird der Zusammenhang zwischen Alterungsprozessen des Glaskörpers und Traktionskräften an der vitreomakulären Grenzfläche im Bezug auf die Pathophysiologie der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) intensiv erforscht.²⁶⁻³⁰ Anhand von Ultraschalluntersuchung konnte nachgewiesen werden, dass eine inkomplette, hintere Glaskörperabhebung mit einer höheren Inzidenz bei Augen mit AMD vorkommt, verglichen mit gleichaltrigen Kontrollaugen ohne AMD.²⁷ Krebs und Kollegen demonstrierten mittels optischer Kohärenztomographie (OCT) und ultraschallbasierter Analyse eine signifikant höhere Inzidenz von kompletter, hinterer Glaskörperabhebung in Augen mit nicht-exsudativer AMD im Vergleich zu Augen mit exsudativer AMD.²⁸ Andererseits wurde eine partielle Glaskörperabhebung mit vitreomakulärer Traktion (VMT) häufiger in Augen mit exsudativer AMD gegenüber solchen mit nicht-exsudativer AMD beobachtet. In Anbetracht der Entstehung choroidaler Neovaskularisation (CNV) zeigte sich eine eindeutige topische Korrelation zwischen vitreomakulärer Adhäsion (VMA) und dem Entstehungsort der CNV.^{9,29,30} Demnach lässt sich schlussfolgern, dass sowohl Glaskörperveränderungen als auch vitreomakuläre Traktion bei der Pathogenese der altersbedingten Makuladegeneration eine wichtige Rolle spielen.

Die Charakterisierung der einzelnen Zelltypen und die Bestimmung ihrer Herkunft gestalten sich bisher jedoch durch die Transdifferenzierung epiretinaler Zellen im Zellverband

schwierig. Heute unterscheidet man retinale Gliazellen wie Astrozyten, Mikrogliazellen und Müller-Zellen von extraretinalen Zellen wie Fibrozyten und Makrophagen, Hyalozyten und retinalen Pigmentepithelzellen.¹⁰⁻¹² Allerdings ist der derzeitige Wissensstand über Zellformationen wie auch über Komponenten der extrazellulären Matrix, die in sekundären traktiven Membranen bei Augen mit nicht-exsudativer AMD vorkommen begrenzt.

Die erste Publikation „*Vitrectomy for intermediate age-related macular degeneration associated with tangential traction: a clinicopathologic correlation*“, hatte das Ziel mittels Immun- und Elektronenmikroskopie morphologische Charakteristika von sekundären epiretinalen Membranen und ILM in Augen mit intermediärer AMD zu beschreiben. Dabei sollte die Rolle des Glaskörpers und die vorhandene Zellformationen im sekundären epiretinalen Gewebe dieser Fälle dargestellt werden. Diese sollten sowohl mit klinischen Daten als auch mit den morphologischen Veränderungen in der optischen Kohärenztomographie korreliert werden.

Zu diesem Zweck wurden 27 Präparate aus sekundären ERM und ILM während der Pars-plana-Vitrektomie (ppV) von 26 Patienten mit intermediärer AMD gewonnen. Mittels Flachpräparation wurden alle eingeschlossenen Gewebeproben für die Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie sowie Immunhistologie aufgearbeitet. Zur immunhistologischen Untersuchung wurden 14 primäre Antikörper in Dreierkombination verwendet. Die Ultrastrukturanalyse erfolgte durch die Transmissionselektronenmikroskopie. Die klinisch relevanten Daten und die Befunde der SD-OCT-Aufnahmen wurden retrospektiv erhoben und analysiert. Außerdem wurde der Glaskörperstatus intraoperativ von Chirurgen beurteilt und registriert.

Aus histopathologischer Sicht demonstrierten die Ergebnisse der vorliegenden Studie im Wesentlichen fibrozelluläre Proliferationen aus prädominierenden Hyalozyten, Glaskörperkollagene und Myofibroblasten, welche eine ausgeprägte kontraktile Funktion besitzen. Eine Vitreoschisis, welche durch die Ultrastrukturanalyse in allen eingeschlossenen Präparaten vorhanden war, spielt eine relevante Rolle bei der Zellformation traktiver Membranen. Zudem konnte bei einer Folgeuntersuchung nach durchschnittlich 19 Monaten eine klinisch signifikante Visusverbesserung nach Entfernung traktiver Membranen nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde im postoperativen Verlauf in keinem der Augen mit intermediärer AMD eine Konversion in die neovaskuläre Form beobachtet. Demzufolge stellt die chirurgische Intervention zur Membranentfernung bei traktiver Makulopathie in Augen mit intermediäre AMD eine Therapiealternative dar, die sowohl einen funktionellen als auch anatomischen Erfolg erwarten lassen darf.

Gleichzeitig wurde mit dieser Arbeit der hohe Stellenwert der korrelativen Mikroskopie in Bezug auf die pathohistologischen Aspekte wie auch die Determination verschiedener Zellformationen und die phänotypischen Zelltransdifferenzierungen in der vitreoretinalen Grenzfläche verdeutlicht. Eine alleinige immunzytochemische Analyse liefert im Gegensatz zur elektronenmikroskopischen Untersuchung keine Informationen über ultrastrukturelle Einzelheiten, wohingegen die alleinige Elektronenmikroskopie weder quantitative Darstellung noch Verteilungsmuster verschiedener Zelltypen gewährleistet. Die Anwendung von nur einer Methode ist daher in ihrer Aussage beschränkt. Durch die Kombination beider Methoden wird ein entsprechend besseres Verständnis der Zelldifferenzierung epiretinalen Gewebes gewährleistet.³¹ Die Korrelative Mikroskopie war um, die im Jahr 2010 eingeführte, Flachpräparation von chirurgisch gewonnenen Präparaten der inneren Grenzmembran (ILM) und epiretinaler Membranen um die Anwendung von FluoroNanogold™ (Fab'-fragments, Nanoprobes, Yaphank, NY, USA) für die Durchführung immunelektronenmikroskopischer Untersuchungen erweitert worden.³²⁻³⁴ Diese Methode wurde in der Aufarbeitung von ILM und epiretinalen Membranen bisher nicht beschrieben. Sie konnte nun erstmals in der Routinepräparation für die Augenheilkunde etabliert werden.

Die zweite Publikation der vorgelegten kumulativen Dissertation „*Hyalocytes in idiopathic epiretinal membranes: a correlative light and electron microscopic study*“ hatte zum Ziel, durch korrelative Immunelektronenmikroskopie die Ultrastruktur von idiopathischen epiretinalen Membranen mit fluoreszenzmikroskopischen Antikörperfärbungen zu vergleichen.

In diesem Kontext wurde anhand immunzytochemischer Untersuchungen von Flachpräparaten aus epiretinalen Gewebeproben eine positive Immunreaktion von Anti-CD-45 Zellen in Augen mit traktiver Makulopathie beobachtet. Diese positive Immunfärbung wurde auf die Zellexpression von Hyalozyten zurückgeführt, welche aus der hämatopoetischen Zellreihe stammen.^{15,35} Zudem stellen Hyalozyten eine aus Monozyten bzw. Makrophagen ausdifferenzierte Zellkomponente dar und haben eine wesentliche Funktion bei der Pathogenese traktiver Makulopathie inne. Der morphologische Zellaufbau der Hyalozyten durch Elektronenmikroskopie wurde bereits anhand von Tierversuchen beschrieben.³⁶⁻⁴⁰ Allerdings ist dadurch die Ultrastruktur von immunpositiven Anti-CD-45 Zellen, sowie deren Relation zum Glaskörper, in der menschlichen vitreoretinalen Grenzfläche nicht gänzlich abgeklärt.

Die chirurgisch gewonnenen Präparate aus ERM und ILM stammten aus 27 Augen von 27 Patienten mit symptomatischer idiopathischer epiretinaler Gliose. Klinisch relevante Daten wurden retrospektiv erhoben, der Glaskörperstatus wurde intraoperativ von Chirurgen evaluiert

und erfasst. Zur Durchführung experimenteller Untersuchungen wurden die Gewebeproben analog zur Publikation I durch Flachpräparation zur Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie sowie Immunhistologie aufgearbeitet. Letztere erfolgte anhand einer Kombination der drei Primärantikörpern Anti-CD-45, Anti- α -SMA und Anti-Vimentin. Das hierbei verwendete FluoroNanogold™ (Fab' Fragmente, Nanoprobes, Yaphank, New York, USA) fungierte als sekundärer Antikörper, welcher zu den primären Antikörpern hinzugefügt wurde. Das FluoroNanogold™ besteht aus einer 1,4 nm Goldclusterverbindung mit einem Fluoresceinanteil. Es wird sowohl unter dem Fluoreszenz- als auch Elektronenmikroskop sichtbar, indem sich Goldpartikel und Fluorescein-Moleküle an einzelne Antikörperfragmente anheften und somit visualisiert werden. Die Ultrastrukturanalyse erfolgte mithilfe eines Transmissionselektronenmikroskops.

Dank der korrelativen Immunelektronenmikroskopie konnte die Ultrastruktur der CD-45 positiven Zellen in epiretinalem Gewebe erstmals als Hyalozyten identifiziert werden. Zusätzlich konnte aufgrund einer Glaskörperabhebung mit Vitreoschisis, der ultrastrukturellen Eigenschaft sowie der histotopographischen Lokalisation positiver CD45-Zellen die Schlüsselrolle von Hyalozyten in epiretinale Zellformation festgestellt werden.

Schwerpunkt der Untersuchungen war die immunzytochemische und ultrastrukturelle Charakterisierung extrazellulärer Matrix-Komponenten und epiretinaler Zellen des epiretinalen Gewebes an der vitreoretinalen Grenzfläche sowie die Korrelation dieser Ergebnisse mit klinischen Befunden und retinaler Bildgebung bei Patienten mit traktiven Makulopathien vor und nach Vitrektomie mit Membran-Peeling.

Mithilfe der hier vorgestellten Forschungsprojekte konnten wichtige Erkenntnisse zur Transdifferenzierung von epiretinalen Zellen zu α -smooth muscle actin-positiven Myofibroblasten gewonnen werden. Die Forschungsarbeiten haben ergeben, dass sich Myofibroblasten epiretinaler Membranen aus retinalen Müller-Zellen und Hyalozyten transdifferenzieren können. Sie treten in großer Menge auf und besitzen nicht nur starke kontraktile Eigenschaften, sondern sind auch für eine exzessive Produktion kollagener extrazellulärer Matrix verantwortlich. In epiretinalem Gewebe konnten α -smooth muscle actin-positiv Myofibroblasten in Co-Lokalisation von neu gebildetem Kollagen Typ I bei allen Formen traktiver Makulopathien nachgewiesen werden. Durch die Etablierung der Korrelativen Mikroskopie von chirurgisch exzidierten epiretinalen Membranen ist es gelungen, zelluläre und fibrozelluläre Proliferationen bei idiopathischen und sekundären Formen der traktiven Makulopathien immunhistologisch zu charakterisieren.

Die vorgelegten Arbeiten zeigen, dass die Flachpräparation in Kombination mit der Korrelativen Mikroskopie der konventionellen Schnittpräparation in der Darstellung von Zellverteilung und Zellzahl sowie in der Darstellbarkeit von zellspezifischen Antigenen durch eine verbesserte topographische Darstellung von zellulären und extrazellulären Komponenten überlegen ist. Des Weiteren erlaubt die Elektronenmikroskopie dabei eine Darstellung der Ultrastruktur der mit NanogoldTM-Partikeln markierten zellmembran-assoziierten und intrazytoplasmatischen Antigenen mit einer bis zu 120000-fachen Vergrößerung. Auf diese Weise konnte eindeutig die Beteiligung von Hyalozyten, den vieldiskutierten Glaskörperzellen, im Zellverbund epiretinaler Membranen demonstriert werden. Die Proliferation von Hyalozyten und ihre Transdifferenzierung spielen eine zentrale Rolle bei der pathologischen Entstehung epiretinalen Gewebes an der vitreoretinalen Grenzfläche. Die Zusammensetzung der epiretinalen Zellen und ihre kontraktilen Eigenschaften bestimmen dabei, wie stark die tangentielle Traktion auf retinale Schichten ist. Hyalozyten und Fibroblasten dominieren in idiopathischen und sekundären epiretinalen Proliferationen.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass die immunzytochemische und ultrastrukturelle Charakterisierung des epiretinalen Gewebes sowie die Darstellung der topographischen Verteilung epiretinaler Zellen an der vitreoretinalen Grenzfläche wichtigen Aufschluss über die Pathogenese verschiedener traktiver Makulopathien geben und wesentlich zu einer individuell angepassten Empfehlung des therapeutischen Vorgehens im klinischen Alltag beitragen.

Ziada J, Hagenau F, Compera D, Wolf A, Scheler R, Priglinger S, Schumann RG. Vitrectomy for intermediate age-related macular degeneration associated with tangential traction: a clinicopathologic correlation.

***Retina* 2018;38(3):531-540.**

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der Forschungsarbeit bestand darin, die Zellformation und die morphologischen Charakteristika der in sekundären epiretinalen Membranen und ILM vorkommenden Zelltypen in Augen mit intermediärer altersbedingter Makuladegeneration (AMD) zu beschreiben. Zusätzlich sollte die damit verknüpfte Rolle des Glaskörpers erläutert werden und diese sowohl mit den klinischen Daten als auch morphologischen Veränderungen in der SD-OCT korreliert werden. Vergangene Studien belegten die signifikante Rolle einer altersbedingten hinteren Glaskörperabhebung mit Vitreoschisis genauso wie einer vitreomakulären Traktion bei der Pathogenese und Progression der altersbedingten Makuladegeneration. Allerdings war bisher nur wenig bekannt über die Differenzierung gewebsspezifischer Zellformation und Kollagenorganisation in sekundären Traktionsmembranen in Augen mit AMD.

Die durch die Pars-plana-Vitrektomie gewonnenen epiretinalen Membranen und ILM der vorliegenden Studie stammen aus 27 Augen von 26 Patienten mit intermediärer AMD. Die durch die Flachpräparation aufgearbeiteten Gewebeproben wurden durch die Interferenz-, Phasenkontrastmikroskopie sowie Immunhistologie untersucht. Dabei wurden alle Präparate mit einer Dreierkombination aus 14 unterschiedlichen Primärantikörpern behandelt. Anschließend erfolgte die Ultrastrukturanalyse mithilfe von Transmissionselektronenmikroskopie. Klinisch relevante Daten sowie SD-OCT-Aufnahmen der Makula wurden retrospektiv erhoben und analysiert. Zusätzlich wurde der Glaskörperstatus intraoperativ registriert. Die immunhistologischen Untersuchungen zeigten positive Immunreaktionen der Zellmarker für Hyalozyten, Glaskörperkollagene und Myofibroblasten. Letztere schienen durch ihre kontraktile Eigenschaft die Fläche zwischen ILM und Kollagenen der Glaskörperrinde unter Spannung zu setzen. Des Weiteren konnte nach chirurgischer Intervention während einer Nachbeobachtungszeit von durchschnittlich 19 Monaten (Median: 17 Monate) ein signifikanter Visusanstieg (Snellen) von $20/72 \pm 20/36$ auf $20/41 \pm 20/32$ ($P < 0,001$) festgestellt werden. Im Verlauf wurde in dieser Subgruppe an Augen keine Konversion in die neovaskuläre AMD dokumentiert.

Demnach lässt sich schlussfolgern, dass Hyalozyten, Glaskörperkollagene und Myofibroblasten die Zellformation sekundären epiretinalen Gewebes in Augen mit intermediärer AMD prädominieren. Eine Vitreoschisis mit den damit begleitenden Glaskörperkollagenen beeinflusst die Komposition des epiretinalen Zellverbundes dieser Fälle. Die Elimination tangentialer Traktion aus Augen mit intermediärer AMD erzielt sowohl einen funktionellen als auch einen strukturellen Profit.

SUMMARY

The aim of this research was to describe the cell formation and the morphological characteristics of the premacular membranes and ILM in eyes with intermediate age-related macular degeneration (AMD). Additionally this study should prove the role of the vitreous associated with these cases and to correlate with both clinical data and morphological changes in SD-OCT. Previous studies demonstrated the significant role of age-related posterior vitreous detachment (PVD) with vitreoschisis as well as vitreomacular traction in the pathogenesis and progression of age-related macular degeneration. However, little is known about the differentiation of tissue-specific cell formation and collagen organization in secondary traction membranes in eyes with AMD. The epiretinal membranes and ILM were obtained by pars plana vitrectomy from 27 eyes of 26 patients with intermediate AMD. The tissue samples prepared by the flat preparation were examined by interference microscopy, phase contrast microscopy and immunohistology. All specimens were treated with a triple combination of 14 different primary antibodies. Ultrastructure analysis was performed using transmission electron microscopy. Clinically relevant data as well as SD-OCT images of the macula were collected and analysed retrospectively. In addition, the state of the vitreous was registered intraoperatively. The immunohistological examinations showed positive immune reactions of the cell markers for hyalocytes, vitreous collagen and myofibroblasts. The latter appear to span the area between ILM and collagen of the vitreous cortex by their contractile features. Furthermore, a significant increase in best-corrected visual acuity (Snellen) from $20/72 \pm 20/36$ to $20/41 \pm 20/32$ ($P < 0.001$) was observed after surgical intervention during a mean follow-up of 19 months (median, 17 months). No conversion to the neovascular AMD was documented in this subgroup of eyes. In conclusion, hyalocytes, vitreous collagen and myofibroblasts predominate the cell formation of secondary epiretinal tissue in eyes with intermediate AMD. A vitreoschisis with the associated vitreous collagen influences the composition of epiretinal cell formation in these cases. The elimination of tangential traction from eyes with intermediate AMD achieves functional as well as structural profit.

Veröffentlichung I

Ziada J, Hagenau F, Compera D, Wolf A, Scheler R, Priglinger S, Schumann RG. Vitrectomy for intermediate age-related macular degeneration associated with tangential traction: a clinicopathologic correlation. *Retina* 2018;38(3):531-540.

doi: 10.1097/IAE.0000000000001573.

Schumann RG, Gandorfer A, Ziada J, Scheler R, Schaumberger MM, Wolf A, Kampik A, Haritoglou C. Hyalocytes in idiopathic epiretinal membranes: a correlative light and electron microscopic study.

Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2014;252(12):1887-1894.

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Studie war es, mittels korrelativer Mikroskopie und deren innovativer Erweiterung durch FluoroNanogoldTM, die morphologische Ultrastruktur von in idiopathischen epiretinalen Membranen präserter Zellformation zu determinieren. Angesichts histopathologischer Forschungsarbeiten wurde eine positive zelluläre CD-45 Immunfärbung in epiretinalen Gewebe von Augen mit Macular Pucker beobachtet. Diese wurde auf die Zellexpression von Hyalozyten zurückgeführt, deren elektronenmikroskopische Ultrastruktur aus Tierversuchen bekannt ist. Allerdings war die Ultrastruktur von immunpositiven Anti-CD-45 Zellen, sowie deren Relation zum Glaskörper, in der menschlichen vitreoretinalen Grenzfläche nicht vollständig abgeklärt.

Die zur Flachpräparation bereitgestellten epiretinalen Membranen und ILM der vorliegenden Arbeit wurden durch chirurgisches Membran-Peeling an 27 Augen von 27 Patienten mit idiopathischen epiretinalen Membranen gewonnen. Alle eingeschlossenen Präparate wurden mit Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie sowie Immunhistologie untersucht. Dabei wurde eine Kombination der drei Primärantikörpern Anti-CD-45, Anti- α -SMA und Anti-Vimentin verwendet. Die FluoroNanogoldTM-partikel dienten als Sekundärantikörper. Der Glaskörperstatus wurde intraoperativ vermerkt und die Patientendaten wurden retrospektiv erhoben. Die Ultrastrukturuntersuchung fand unter dem Transmissionselektronenmikroskop statt. Die Ergebnisse dieser experimentellen Arbeit wiesen positive CD-45-Zellen auf, deren ultrastrukturelle Komposition den Hyalozyten entspricht. Diese zeichnen sich durch einen ovalen Zellkern, dichte Zellgranula und dünne zytoplasmatische Ausstülpungen aus. Die Ultrastrukturanalyse zeigte, dass sich CD-45-Zellen an nativen Glaskörperkollagenen positionieren und von neugebildeten Kollagensträngen wie auch von mehrschichtiger Proliferation von Myofibroblasten umgeben sind. Zusätzlich konnten positive Immunreaktionen für Anti-Vimentin- und α -SMA-Zellmarker nachgewiesen werden, deren Zellfragmente sich sowohl an der retinalen als auch an der vitrealen Seite der ILM befinden.

Schließlich lässt sich feststellen, dass sich epiretinale Zellen in idiopathischen epiretinalen Membranen mit morphologischen Charakteristika von Hyalozyten als CD-45 positive Zellen identifizieren. Die Hyalozyten spielen eine zentrale Rolle im epiretinalen Zellverbund in

Zusammenhang mit einer Glaskörperabhebung mit Vitreoschisis, ihrer ultrastrukturellen Konstruktion wie auch topographischer Lokalisation. Die korrelative Mikroskopie mit innovativer Applikation von FluoroNanogoldTM steuert wesentlich zu einer besseren Interpretation histopathologischer Aspekte an der vitreoretinalen Grenzfläche bei.

SUMMARY

The aim of this study was to determine the morphological ultrastructure of cell formation present in idiopathic epiretinal membranes by means of correlative microscopy and its innovative enhancement by FluoroNanogold™. In view of histopathological research, cellular anti-CD-45 immunostaining was seen in epiretinal tissue of eyes with macular pucker. These cells were related to the proliferation of hyalocytes, whose electron microscopic ultrastructure is known by animal experimentations. However, the ultrastructure of positive anti-CD-45 cells, as well as their relation to the vitreous, is not fully understood in the human vitreoretinal interface. The epiretinal membranes and ILM provided for the flat preparation were obtained by surgical membrane peeling from 27 eyes of 27 patients with idiopathic epiretinal membranes. All included specimens were examined by interference and phase contrast microscopy as well as immunohistology. A combination of three primary antibodies anti-CD-45, anti- α -SMA and anti-vimentin was used. The particles of FluoroNanogold™ served as secondary antibodies. The state of the vitreous was recorded intraoperatively and the patient data were collected in retrospect. The ultrastructure investigation was carried out using transmission electron microscopy.

The results of this experimental work showed positive CD-45 cells, whose ultrastructural composition corresponds to the hyalocytes. These are characterised by an oval cell nucleus, dense cell granules and thin cytoplasmic protuberances. Ultrastructural analysis showed that CD-45 cells are positioned on native vitreous collagen and are surrounded by newly formed collagen strands as well as by multilayer proliferation of myofibroblasts. In addition, positive immunostainings were detected for anti-vimentin and α -SMA cell markers, whose cell fragments are located on the retinal and vitreal side of the ILM. Finally, epiretinal cells in idiopathic epiretinal membranes with morphological characteristics of hyalocytes identify as CD-45 positive cells. The hyalocytes play a central role in the epiretinal cell complex as regards of posterior vitreous detachment (PVD) with Vitreoschisis, its ultrastructural construction as well as topographical localisation. The correlative microscopy with innovative application of FluoroNanogold™ contributes a major proportion to a better interpretation of histopathological aspects at the vitreoretinal interface.

Veröffentlichung II

Schumann RG, Gandorfer A, Ziada J, Scheler R, Schaumberger MM, Wolf A, Kampik A, Haritoglou C. Hyalocytes in idiopathic epiretinal membranes: a correlative light and electron microscopic study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2014;252(12):1887-1894.

doi: 10.1007/s00417-014-2841-x.

Literaturverzeichnis

1. Sebag J. Anomalous posterior vitreous detachment: a unifying concept in vitreo-retinal disease. *Graefes Arch Clin Exp* 2004; 242: 690-698.
2. Johnson MW. Perifoveal vitreous detachment and its macular complications. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2005; 103: 537-567.
3. Green WR. The macular hole: histopathologic studies. *Arch Ophthalmol* 2006; 124: 317-321.
4. Sebag J, Gupta P, Rosen RR, et al. Macular holes and macular pucker: the role of vitreoschisis as imaged by optical coherence tomography/scanning laser ophthalmoscopy. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2007; 105: 121-129.
5. Gandorfer A, Rohleder M, Kampik A. Epiretinal pathology of vitreomacular traction syndrome. *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 902-909.
6. Ng Ch, Cheung N, Wang JJ, et al. Prevalence and risk factors for epiretinal membranes in a multi-ethnic United States population. *Ophthalmology* 2011; 118: 694-699.
7. Sebag J. Vitreochisis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2008; 246: 329-332.
8. Sebag J, Wang MY, Nguyen D, et al. Vitreopapillary adhesion in macular diseases. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2009; 107: 35-46.
9. Krebs I, Glittenberg C, Zeiler F, et al. Spectral domain optical coherence tomography for higher precision in the evaluation of vitreoretinal adhesions in exudative age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2011; 95: 1415-1418.
10. Kampik A, Green WR, Michels RG, et al. Ultrastructural features of progressive idiopathic epiretinal membrane removed by vitreous surgery. *Am J Ophthalmol* 1980; 90: 797-809.
11. Kampik A, Kenyon KB, Michels RG, et al. Epiretinal and vitreous membranes: comparative study of 56 cases. *Arch Ophthalmol* 1981; 99: 1445-1454.
12. Smiddy WE, Maguire AM, Green WR, et al. Idiopathic epiretinal membranes: Ultrastructural characteristics and clinicopathologic correlation. *Ophthalmology* 1989; 96: 811-820.
13. Messmer EM, Heidenkummer HP, Kampik A. Ultrastructure of epiretinal membranes associated with macular holes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1998; 236: 248-254.
14. Hiscott PS, Grierson I, Trombetta CJ, et al. Retinal and epiretinal glia - an immunohistochemical study. *Br J Ophthalmol* 1984; 68: 698-707.
15. Zhao F, Gandorfer A, Haritoglou C, et al. Epiretinal cell proliferation in macular pucker and vitreomacular traction syndrome: Analysis of flat-mounted internal limiting membrane specimens. *Retina* 2013; 33: 77-88.

16. Park DW, Dugel PU, Garda J, et al. Macular pucker removal with and without internal membrane peeling: pilot study. *Ophthalmology* 2003; 110: 62-64.
17. Bovey EH, Uffer S, Acharche F. Surgery for epimacular membrane: impact of retinal internal membrane removal on functional outcome. *Retina* 2004; 24: 728-735.
18. Roller AB, Mahajan VB, Boldt HC, Abramoff MD, et al. Effects of vitrectomy on age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2010; 117: 1381-1386.
19. Jousseaume AM, Kirchhof B. Surgery for age-related macular degeneration. Still an option in the age of pharmacotherapy? *Klin Monbl Augenheilkd* 2014; 231: 874-882.
20. Schulze S, Neugebauer A, Kroll P. Appearance of age-related macular degeneration in vitrectomized and nonvitrectomized eyes: an intraindividual case study. *Acta Ophthalmol* 2012; 90: 244-247.
21. Kimura S, Morizane Y, Toshima S, et al. Efficacy of vitrectomy and inner limiting membrane peeling in age-related macular degeneration resistant to anti-vascular endothelial growth factor therapy, with vitreomacular traction or epiretinal membrane. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2016; 254: 1731-1736.
22. Mason JO 3rd, Patel SA. Efficacy of vitrectomy and epiretinal membrane peeling in eyes with dry age-related macular degeneration. *Clin Ophthalmol* 2015; 9: 1999-2003.
23. 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.
24. 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.
25. Gupta P, Yee KM, Garcia P, et al. Vitreoschisis in macular disease. *Br J Ophthalmol* 2011; 95: 376-380.
26. Sebag J. Vitreous in Age-Related Macular Degeneration Therapy—The Medium Is the Message. *Retina* 2015; 35: 1715-1718.
27. Weber-Krause B, Eckardt U. Incidence of posterior vitreous detachment in eyes with and without age-related macular degeneration. An ultrasonic study. *Ophthalmologe* 1996; 93: 660-665.
28. Krebs I, Brannath W, Glittenberg C, et al. Posterior vitreomacular adhesion: a potential risk factor for exudative age-related macular degeneration? *Am J Ophthalmol* 2007; 144: 741-746.
29. Robison CD, Krebs I, Binder S, et al. Vitreomacular adhesion in active and end-stage age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2009; 148: 79-82.

30. Lee SJ, Lee CS, Koh HJ. Posterior vitreomacular adhesion and risk of exudative age-related macular degeneration: paired eye study. *Am J Ophthalmol* 2009; 147: 621-626.
31. Hisatomi T, Enaida H, Sakamoto T, et al. A new method for comprehensive bird's-eye analysis of the surgically excised internal limiting membrane. *Am J Ophthalmol* 2005; 139: 1121-1112.
32. Robinson JM, Takizawa T. Correlative fluorescence and electron microscopy in tissues: immunocytochemistry. *J Microsc* 2009; 235: 259-272.
33. Takizawa T, Robinson JM. Ultrathin cryosections: an important tool for immunofluorescence and correlative microscopy. *J Histochem Cytochem* 2003; 51: 707-714.
34. Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. A method for correlative light and electron microscopy for yeast cells. *Micron* 2014; 61: 51-63.
35. 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: 7822-7834.
36. Qiao H, Hisatomi T, Sonoda KH, et al. The characterisation of hyalocytes: the origin, phenotype and turnover. *Br J Ophthalmol* 2005; 89: 513-517.
37. Ogawa K. Scanning electron microscopic study of hyalocytes in the guinea pig eye. *Arch Histol Cytol* 2002; 65: 263-268.
38. Saga T, Tagawa Y, Takeuchi T, et al. Electron microscopic study of cells in vitreous of guinea pig. *Jpn J Ophthalmol* 1984; 28: 239-247.
39. Uerara M, Imagawa T, Kitagawa H. Morphological studies of the hyalocytes in the chicken eye: scanning electron microscopy and inflammatory response after the intravitreal injection of carbon particles. *J Anat* 1996; 188: 661-669.
40. Salu P, Claeskens W, de Wilde A, et al. Light and electron microscopic studies of the rat hyalocyte after perfusion fixation. *Ophthalmic Res* 1985; 17: 125-130.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. med. Ricarda Schumann für die Überlassung des Themas. Ihr Vertrauen sowie ihre stets freundliche konstruktive Kritik und uneingeschränkte Förderung führten zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit. Ricarda, ich bin Dir für deine umfangreiche Mühe und grenzenlosen Beistand sehr dankbar.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Priglinger und Herrn Prof. Dr. med. Kampik für die Möglichkeit der Durchführung meiner medizinischen Dissertation an der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität.

Außerdem möchte ich Frau Renate Scheler, nicht nur für die Einarbeitung und Mithilfe bei der Aufbereitung der Präparate danken, sondern auch für ihre Anregungen und stets liebevolle Geduld.

Ich danke zudem meinen Mitdoktoranden und wertvollen Kollegen Frau Dr. med. Denise Vogt und Herrn Felix Hagenau für die umsichtigen Ratschläge und den wissenschaftlichen Erfahrungsaustausch. Mit Euch hat die Arbeit großen Spaß gemacht.

Schließlich möchte ich mich insbesondere bei meiner Familie ganz herzlich bedanken. Ihr habt mich auf meinem bisherigen Lebensweg unaufhörlich warmherzig unterstützt, motiviert und ermutigt.