

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

Schicht- und Pseudofoamina der Netzhaut
Immunzytochemische und elektronenmikroskopische
Untersuchungen epiretinaler Membranen

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

vorgelegt von

Enrico Entchev

aus München

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Bernhard Lachenmayr
Prof. Dr. med. Thomas Anton Berninger

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Denise Vogt

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

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	1
2	Hintergrund	2
2.1	Anatomische und pathophysiologische Grundlagen.....	2
2.1.1	Glaskörper	3
2.1.2	Vitreoretinale Grenzfläche	5
2.1.3	Netzhaut	5
2.1.4	Alterungsprozess des Glaskörpers, hintere Abhebung und Komplikationen.....	8
2.1.5	Epiretinale Membranen	12
2.2	Schichtforamina und Pseudoforamina der Makula.....	15
2.2.1	Pathogenese	15
2.2.2	Klassifikation.....	18
2.2.3	Retinale Bildgebung.....	24
2.2.4	Klinischer Verlauf.....	26
2.2.5	Therapie der Schichtforamina und Pseudoforamina	27
3	Patienten und Methoden	29
3.1	Patientenkollektiv.....	29
3.2	Befundung der optischen Kohärenztomographie	29
3.3	Chirurgisches Vorgehen und Materialgewinnung.....	30
3.4	Flachpräparation mit Zellkernfärbung für Phasen- und Interferenzkontrastmikroskopie....	32
3.5	Flachpräparation für die Immunfluoreszenzmikroskopie	34
3.6	Serienschnittpräparation für Immunelektronenmikroskopie und ultrastrukturelle Analyse	38
3.7	Material/Materialien.....	41
3.7.1	Antikörper.....	41
3.7.2	Puffer und Reagenzien	42
3.7.3	Chemikalien	44
3.7.4	Geräte	45
3.7.5	Software	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	Epiretinale Membranen in der optischen Kohärenztomographie	46
4.2	Beobachtungen bei Flachpräparation, Phasen- und Interferenzkontrastmikroskopie.....	47
4.3	Zellzahl und Fläche	48
4.4	Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie	49

4.5	Ergebnisse der Immunelektronenmikroskopie	56
5	Diskussion	66
5.1	Pathogenese epiretinaler Membranen	66
5.2	Differentialdiagnose Pseudofovenen versus Schichtfovenen.....	71
5.3	Heterogenität der Schichtfovenen.....	74
5.4	Therapeutische Relevanz.....	79
5.5	Limitationen	80
5.6	Schlussfolgerung.....	81
6	Zusammenfassung.....	83
7	Literaturverzeichnis	85
8	Anhang.....	VIII
8.1	Abbildungsverzeichnis	VIII
8.2	Tabellenverzeichnis	XI
8.3	Publikationen.....	XII
8.4	Eidesstattliche Erklärung	XIII
8.5	Danksagung	XIV

Abkürzungsverzeichnis

α-SMA	α-Smooth Muscle Antigen
BCVA	bestkorrigierte Sehschärfe (engl.: best corrected visual acuity)
CD45/-64	Cluster of Differentiation 45/ -64 (immunphänotypisches Oberflächenmerkmal Nummer 45 bzw. 64)
ELM	äußere Grenzmembran (engl.: external limiting membrane)
ERM	epiretinale Membran
EZM	Extrazellulärmatrrix
FLSC	fibrous long spacing collagen
GAG	Glykosaminoglykane
GFAP	saures Gliafaserprotein (engl.: glial fibrillary acidic protein)
ILM	innere Grenzmembran (engl.: inner limiting membrane)
IS/OS	Grenzbereich zwischen innerem und äußerem Photorezeptorsegment (engl.: inner/outer segment)
Koll	Kollagen
Kolok	Kolokalisation
LHEP	Schichtforamen-assoziierte epiretinale Proliferation (engl.: lamellar macular hole associated epiretinal proliferation)
LMH	Schichtforamen (engl.: lamellar Macular Hole)
MPH	Pseudofoamen (engl.: macular pseudo Hole)
OCT	optische Kohärenztomographie (engl.: optical coherence tomography)
PVD	hintere Glaskörperabhebung (engl.: posterior vitreous detachment)
ppV	Pars Plana Vitrektomie
RPE	retinales Pigmentepithel
VMA/T	vitreomakuläre Adhäsion/Traktion
VPA	vitreopapilläre Adhäsion
VRA/T	vitreoretinale Adhäsion/Traktion

1 Einleitung und Zielsetzung

Das Schichtforamen und das Pseudofoamen sind Netzhauterkrankungen an der Stelle des schärfsten Sehens, der Makula. Bei beiden Entitäten ist die zentrale Vertiefung der Makula, die Fovea, erweitert und kann auf den Untersucher wie ein Loch wirken, daher die Bezeichnung als „-foramen“ (*lat.: Loch*). Ursächlich für diese Veränderung sind nach heutigem Wissensstand vor allem Zugkräfte, welche auf die Makula wirken, daher zählt man Schicht- und Pseudofoamina zu den traktiven Makulopathien. Die Traktion entsteht durch Kontraktion einer epiretinalen Membran und im Rahmen der altersbedingten Glaskörperabhebung. Epiretinale Membranen sind pathologische Häutchen auf der Makula, die bei Kontraktion auch die darunterliegende Netzhaut verziehen können, sodass betroffene Patienten ihre Umwelt verzerrt sehen und an sogenannten Metamorphopsien leiden. Die Pathogenese der Membranen selbst ist bislang nur teilweise geklärt. Hierbei scheinen die retinale Zellantwort auf Traktion und degradiertes Kollagen im Rahmen der altersbedingten Glaskörperabhebung eine Rolle zu spielen. Epiretinale Membranen treten bei allen Pseudofoamina und den meisten Schichtfoamina auf.

Für die Diagnostik der Entitäten und assoziierter Membranen ist die optische Kohärenztomographie als bildgebendes Verfahren unverzichtbar. Sie ermöglicht in Echtzeit Schnittbilder von der Netzhaut eines Patienten, ist dabei nicht-invasiv und mit geringem Aufwand durchzuführen. Die Genauigkeit der Diagnosestellung ist von der Technologie und ihrem Fortschritt abhängig. Mit der Zeit wurde die Darstellung der Netzhaut immer höher auflösend und lieferte so mehr Details und neue Erkenntnisse, welche neue Forschungsansätze eröffnen und die gängige Klassifikation der Erkrankungen infrage stellen. Vor ein paar Jahren wurden epiretinale Membranen entdeckt, die sich von den bis dahin bekannten traktiven Membranen unterschieden. Sie zeigten keine Anzeichen von Kontraktilität und wiesen einen niedrigeren Brechungsindex auf. Da sie stark gehäuft bei Schichtfoamina auftreten, hat sich die Bezeichnung „Schichtfoamen-assoziierte-epiretinale-Proliferation“ etabliert. Die verbesserte Bildgebung entfachte außerdem eine Diskussion um die Abgrenzung der Entitäten voneinander – man sah, dass manche Veränderungen der Fovea sowohl Merkmale vom Schicht- als auch Pseudofoamen aufweisen.

Die meisten Erkenntnisse der letzten Jahre stammen aus klinischen Studien mittels optischer Kohärenztomographie, während experimentelle Studien zu epiretinalen Membranen rar sind. Um Pseudo- und Schichtfoamen deutlicher voneinander abgrenzen zu können, untersuchten wir erstmals die traktiven Membranen von Pseudofoamina histopathologisch sowie ultrastrukturell und verglichen sie mit Membranen von Schichtfoamina. Mit der Gewebsanalyse verfolgten wir außerdem das Ziel, die Pathogenese der Membranen weiter aufzuklären.

2 Hintergrund

2.1 Anatomische und pathophysiologische Grundlagen

Das Auge ermöglicht uns einen visuellen Eindruck der Umwelt. Es lässt sich in zwei funktionelle Einheiten einteilen: einen Sensor und einen Projektor. Die Netzhaut ist der Sensor, welcher die elektromagnetische Strahlung, das Licht, aufnimmt und aus ihr Information generiert; der optische Apparat ist der Projektor, welcher das Licht optimal auf die Netzhaut wirft, um bei unterschiedlichen Bedingungen stets ein scharfes Bild zu ermöglichen. Die wichtigsten anatomischen Strukturen sind in **Abb. 1** illustriert.

Die einfallenden Lichtstrahlen werden durch Hornhaut und Linse so gebrochen, dass ihr Brennpunkt genau auf der Netzhaut liegt. Dadurch wird das Bild auf der Netzhaut scharf. Die Iris fungiert als Blende. Durch ihre ringförmige Muskulatur vergrößert oder verkleinert sie je nach Lichtverhältnis die Weite der Pupille. Der Fokus kann durch Modulation der Brechkraft der elastischen Linse verändert werden. Das geschieht durch Kontraktion oder Relaxation der Muskulatur des Ziliarkörpers. Der Ziliarkörper wird eingeteilt in die pars plicata, an der über die Zonulafasern die Linse aufgehängt ist, und die stabilisierende pars plana, über die der Muskel nach posterior ausläuft. Die Pars plana wird später noch als operativer Zugang zur Netzhaut relevant werden.

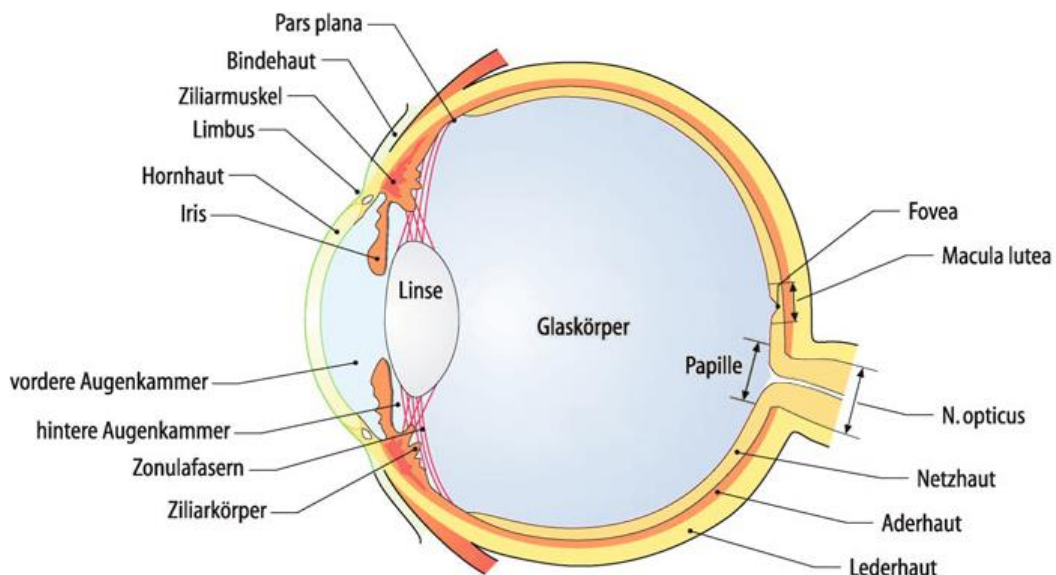


Abbildung 1: Schemazeichnung zur Anatomie des Auges. (Modifiziert nach Grehn, F., 2012. Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Auges, in: Grehn, F. (Hrsg.), *Augenheilkunde*, 31. Auflage, Heidelberg: Springer, S.4, Abb.2.1.)

2.1.1 Glaskörper

Die Prozesse im Rahmen der altersbedingten Glaskörperabhebung sind entscheidend für die Pathogenese von epiretinalen Membranen, Schicht- und Pseudoforamina. Um diese zu verstehen, werden zunächst Aufbau und Struktur des normalen Glaskörpers erläutert. Dieser hat bei normalsichtigen eine durchschnittliche Länge von 16mm und ein Volumen von 4ml (Larsen 1971; Sebag 1989a) (**Abb. 2**). Er wird untergliedert in Glaskörperrinde, -kern und -basis. Er fungiert als natürliche Tamponade der Netzhaut, die keine feste anatomische Verbindung zum unterliegenden retinalen Pigmentepithel (RPE) hat, sondern allein aufgrund einer losen Verbindung mit den Photorezeptoraußensegmenten sowie aufgrund hydrostatischer, osmotischer und ionischer Kräfte adhäriert.

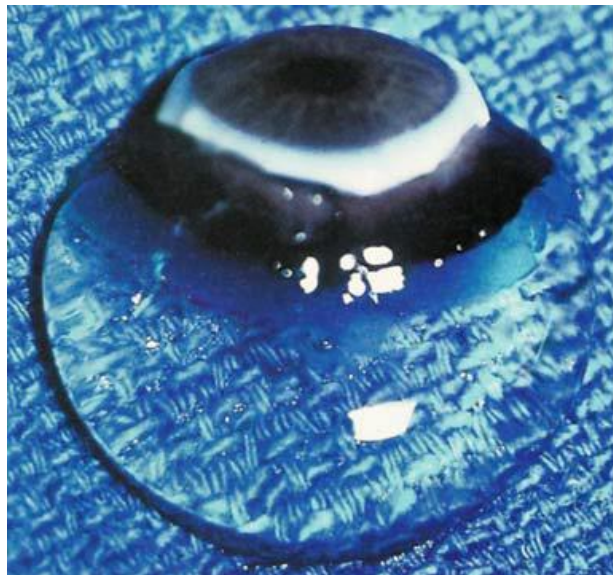


Abbildung 2: Glaskörperpräparat eines neun Monate alten Kindes auf einem OP-Tuch. Er ist klar transparent und von gallertiger Konsistenz (Sebag 2005).

Die besondere innere Struktur des Glaskörpers gewährleistet eine streuungsarme Transmission des Lichts vom vorderen Augenabschnitt zur Netzhaut und ermöglicht so ein präzises Bild der Umwelt.

Der Glaskörper besteht zu 98% aus Wasser und 2% aus extrazellulärer Matrix (EZM). Die EZM setzt sich aus Glykosaminoglykanen, Kollagenfibrillen und einem geringen Anteil nicht-kollagenbildender Proteinen zusammen.

Die Glykosaminoglykane (GAG) binden als großmolekulare Polyanionen das Wasser an sich und sorgen für Quelldruck. Hauptanteil der GAGs macht das freie Hyaluronan aus, eine kleine Fraktion an GAGs bilden Heparan- und Chondroitinsulfat, diese sind in Proteoglykanen gebunden. Kollagenfibrillen von 7-28nm Durchmesser durchziehen in sagittaler Ausrichtung die Masse von Hyaluronsäuremolekülen, kleine Seitenketten zwischen den Fibrillen, vornehmlich Kollagen Typ IX

und Chondroitinsulfate, stabilisieren ihre Position im dreidimensionalen Raum (Seery & Davison 1991; Mayne 2003; Sebag & Balazs 1985; Sebag 1987a; Sebag & Balazs 1989; Vaughan 1988; Scott 1992; Wu et al. 1992; Bishop et al. 2004). Die Ausrichtung und der Abstand zwischen den Fibrillen vermindert die Streuung des einfallenden Lichts und erhöht die Transparenz des Glaskörpers (Sebag & Yee 2007). Mit 75% stellt Kollagen Typ II den Hauptbestandteil der Fibrillen dar und ist das vorherrschende Protein im Glaskörper (Seery & Davison 1991; Bishop 2000; Sebag & Yee 2007; Mayne et al. 1999). Da es in dieser hohen Konzentration im Auge nur im Glaskörper vorkommt, eignet sich Kollagen Typ II zum immunhistologischen Nachweis von Glaskörpermaterial.

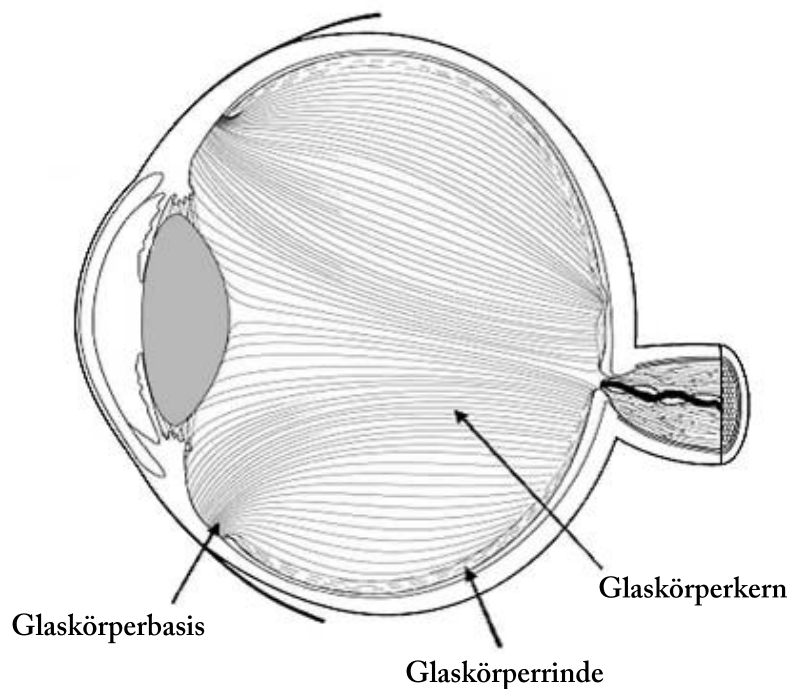


Abbildung 3: Verlauf der Kollagenfibrillen im Glaskörper. An Basis, Fovea und um die Papille sind die Fibrillen besonders konzentriert. Die Papille selbst wird von Fibrillen und Rinde ausgespart. Schemazeichnung (modifiziert nach Le Goff & Bishop 2008)

Die Glaskörperperipherie ist histologisch betrachtet keine scharf demarkierte Schicht, sondern es besteht ein fließender Übergang zum Kern. Im Kern verlaufen die Kollagenfibrillen in sagittaler Ausrichtung, in der Rinde verlaufen sie bogenförmig, parallel zur Netzhaut (**Abb. 3**). Vom Kern zur Rinde hin nimmt der Hyaluronsäureanteil zwischen den Fibrillen ab und sie kommen dichter nebeneinander zu liegen. Die Rinde ist ein Kondensat aus Kollagenfibrillen, ähnlich einer Milchhaut.

In Immunhistochemie und im 3-D OCT stellen sich die Fibrillen der Rinde zu Schichten organisiert dar. Diese sind potentielle Dissektionsebenen und spielen eine Rolle bei der physiologischen Glaskörperabhebung im Alter, Vitreoschisis und Vitrektomie (Sebag et al. 2009).

2.1.2 Vitreoretinale Grenzfläche

Einige der Fibrillen der Rinde spleißen nach außen aus und verankern den Glaskörper in seiner Umgebung (Green & Sebag 2001). Besonders fibrillenreiche und feste Adhäsionen finden sich an Fovea und ihrer näheren Umgebung (Perifovea), peripapillär, entlang größerer retinaler Gefäße und an der hinteren Linsenkapsel. Der größte Teil der Fibrillen inseriert lotrecht im Bereich der Ora serrata und bildet die 2-4,5mm breite Basis, die stärkste Anheftung des Glaskörpers (Hogan 1963; Le Goff & Bishop 2008). Unter Aussparung der Papille bedeckt die Glaskörperrinde mit einer Dicke von 100-200µm die gesamte Retina, ihre dünnste Stelle liegt über der Makula (Sebag 1989b; Sebag 1992). Angrenzende Struktur ist die Basallamina der Netzhaut, die sogenannte innere Grenzmembran (inner limiting membrane, ILM). Sie besteht größtenteils aus Kollagen Typ IV, Glykoproteinen -vornehmlich Laminin-, Proteoglykanen -vornehmlich Fibronectin- und einem geringen Anteil an Koll Typ I (Russell et al. 1991).

Die vitreoretinale Adhäsion wird durch Laminin und Fibronectin vermittelt, die an Kollagen Typ IV, Typ II und Typ I sowie an Hyaluronsäuremoleküle binden (Kohno et al. 1987; Russell et al. 1991; Gandorfer, Scheler, Haritoglou, et al. 2009). Die innere Grenzmembran weist zum Glaskörper hin eine glatte Oberfläche auf, die retinale Seite ist unduliert (Foos 1972), hieran lässt sich die Orientierung eines Präparats gut erkennen.

2.1.3 Netzhaut

Die Netzhaut oder Retina (lat. *rete*: das Netz), bedeckt den gesamten Augenhintergrund. Hier findet die Transformation von der optischen Information der Lichtstrahlen, über chemische Reaktionen der Photorezeptoren, zu einer elektrischen Information statt. Sie besteht aus einem Netzwerk an Neuronen, welches die elektrische Information bereits prozessiert, beispielsweise durch Generierung von Kontrast. Über den Sehnerv wird die Information ans Gehirn weitergeleitet.

Bei Betrachtung des Augenhintergrunds mit dem Ophthalmoskop (Funduskopie) fällt sofort die Papille als scharf begrenztes, leuchtend gelbes Oval auf. Sie ist die Austrittsstelle des Sehnerven (Nervus opticus). Die Papille besitzt keine Photorezeptoren, sie ist der sogenannte „blinde Fleck“ im Gesichtsfeld. Außerdem imponieren die zentralen Netzhautgefäße mit Arteria und Vena centralis retinae, die sich in einen oberen und unteren Gefäßbogen aufteilen.

Eingefasst von den Gefäßbögen ist der wichtigste Teil der Netzhaut: die Makula lutea, lateinisch für gelber Fleck. Die Makula ist ein rundes, graugelbliches Areal im Zentrum der Netzhaut von 3-5 mm Durchmesser. Ihr zentraler Bereich ist etwas dunkler als die restliche Retina, weil das unterliegende Pigmentepithel besonders pigmenthaltig ist (Spaide & Curcio 2011). Die Makula ist zudem reich an

Photorezeptoren und beherbergt in ihrem Zentrum den Punkt des schärfsten Sehens, die sogenannte Fovea (lat. Grube).

Die Fovea ist eine Vertiefung der Makula mit einem Durchmesser von 1,5mm. An dieser Stelle weist die Netzhaut die höchste Dichte an Photorezeptoren auf. Die Rezeptoren der Fovea sind ausschließlich Zapfen; sie ermöglichen das Farbsehen. Dem Untersucher stellt sie sich meist als unscharf begrenzter roter Punkt inmitten der Makula dar (**Abb. 4**).

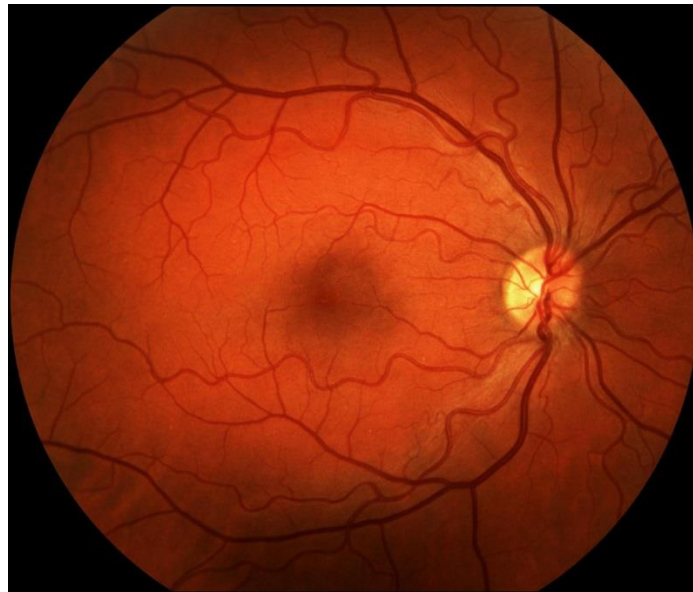


Abbildung 4: Netzhaut in der Funduskopie. Mittig im Bild das dunkle Zentrum der Makula mit der roten Fovea in ihrer Mitte. Rechts die Papille und mit den zentralen Netzhautgefäßen, die sich in einen oberen und unteren Gefäßbogen aufteilen. URL: „<http://www.myretinalinstitute.com/images/default-album/normal-macula.jpg?sfvrsn=0;>“ (26.05.18)

Funktionell setzt sich die Netzhaut aus drei bis vier Ebenen von Neuronen zusammen: 1. Neuron sind die Photorezeptoren, in Form von Stäbchen oder Zapfen, 2. Neuron die Bipolarzellen, 3. Neuron die Ganglienzellen. Bei den Stäbchen ist die Ganglienzelle das 4. Neuron; davor ist noch die Amakrinzelle als 3. Neuron geschaltet (Benninghoff & Drenckhahn 2008) (**Abb. 5**).

Die Nervenzellen sind in Schichten geordnet. Ihre Zellkörper bilden die sogenannten Körnerzellschichten, respektive die Ganglienzellschicht. Dazwischen liegen die plexiformen Schichten mit den Axonen und Synapsen der Neurone (**Abb. 6**).

Bemerkenswert ist der inverse Aufbau der Netzhaut. Die Photorezeptoren sind dem Licht abgewandt und liegen am weitesten außen dem Pigmentepithel an, während die Ganglienzellen als innerste Zellschicht der Netzhaut dem Licht zugewandt sind. Über alle Schichten hinweg findet sich die Gliazelle der Retina, die Müllerzelle (**Abb. 5**).

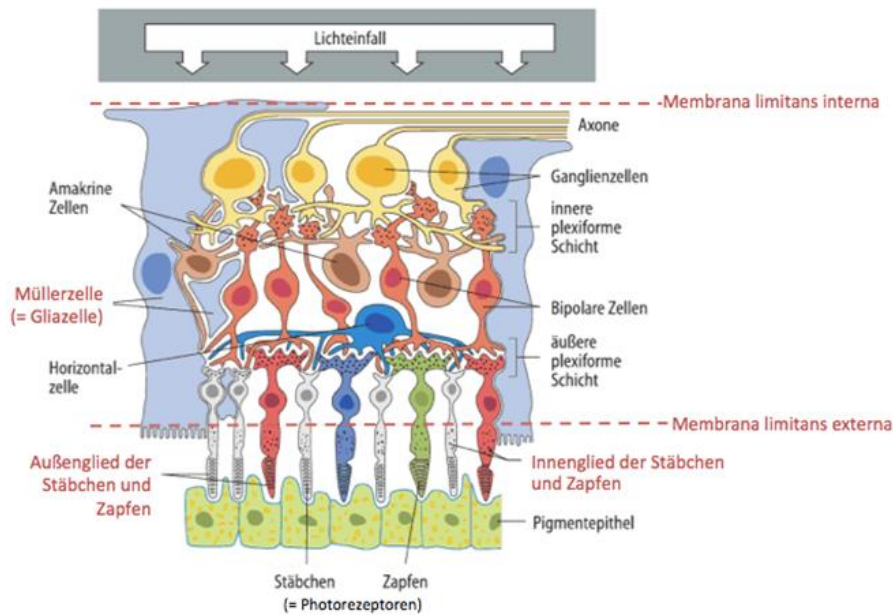


Abbildung 5: Funktioneller Aufbau der Netzhaut, Schemazeichnung. (Modifiziert nach Gratzl, M., 2005. Sinnesorgane, in: Junqueira, L.C.U., Carneiro, J., Gratzl, M. (Hrsg.), *Histologie*, 6. Auflage, Heidelberg: Springer, S.424, Abb.23.24.)

Die Netzhaut erstreckt sich bis über den Ziliarkörper und die Hinterseite der Iris. Sie ist dort zu einem zweischichtigen Pigmentepithel reduziert und besitzt keine Photorezeptoren (Benninghoff & Drenckhahn 2008). Dieser Teil wird pars caeca retinae, der „blinde“ Teil der Netzhaut genannt. Der Übergang zum photorezeptiven Teil, die pars optica retinae, ist mittels Spaltlampenmikroskop als gezackter Rand sichtbar, lateinisch Ora serrata. Die Ora serrata liegt etwa 2 mm hinter dem Ziliarkörper.

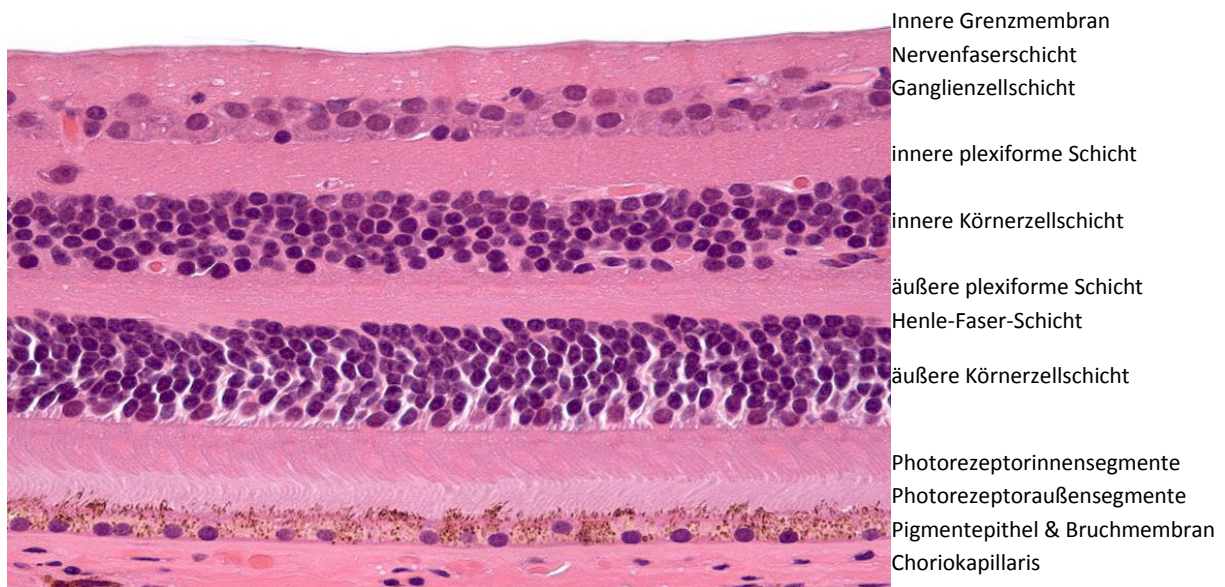


Abbildung 6: Histologisches Präparat der Netzhaut in HE-Färbung, Mikrophotographie. Mit freundlicher Genehmigung von Ralph C. Eagle, Jr., MD, Direktor der Pathologie, Wills Eye Hospital, Philadelphia

2.1.4 Alterungsprozess des Glaskörpers, hintere Abhebung und Komplikationen

Der Alterungsprozess des Glaskörpers spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese traktiver Retinopathien und epiretinaler Membranen. Mit zunehmendem Alter kommt es zur Verflüssigung (Synchysis) des Glaskörpers. Erste Veränderungen lassen sich schon ab dem Kindesalter nachweisen, ein signifikantes Ausmaß nimmt die Synchysis ab dem mittleren Lebensalter an (O'Malley 1976; Oksala 1978; Balazs & Denlinger 1984; Kishi & Shimizu 1990). Die Synchysis nimmt ihren Anfang im Zentrum (Sebag 1987b; Sebag 1987a; Balazs & Denlinger 1982; Foos & Wheeler 1982), häufig auch direkt prämakulär (Worst 1977; Kishi & Shimizu 1990; Itakura & Kishi 2011), insbesondere bei myopen Augen (Itakura et al. 2013). Die Gründe für die Verflüssigung finden sich auf molekularer Ebene. Die Kollagenfibrillen im Glaskörper verlieren ihre strenge Organisation und aggregieren zu mikroskopisch sichtbaren geschlängelten Fasern. Durch die Aggregation des Kollagengerüsts entstehen amorphe Räume, in denen sich unorganisiert das hydrophile Hyaluronan sammelt. Es bilden sich Lakunen, die mit der Zeit größer werden und konfluieren (Sebag & Balazs 1985; Sebag 1987a; Sebag & Balazs 1989)(**Abb. 7**). Als Ursachen für die Degradation von Kollagenfibrillen und Hyaluronan gelten licht- und metabolisch induzierte freie Radikale (Andley & Chakrabarti 1983; Ueno et al. 1987; Akiba et al. 1994; Kakehashi et al. 1994; Hikichi 1997), enzymatischer Abbau (Los et al. 2003), der Verlust von Kollagen Typ IX von der Oberfläche der Fibrillen (Bishop et al. 2004), sowie altersbedingte Änderungen des Hormonprofils (Smith et al. 1982; Smith 1984).

Auch die Fibrillen der Rinde sind von der Degradation betroffen, ferner kommt es zu einer Abnahme von Laminin an der ILM, was eine Schwächung der vitreoretinalen Adhäsionen zur Folge hat. Die Verflüssigung (Synchysis) führt zum Verlust der prallelastischen Konsistenz und Schrumpfung des Glaskörpers (Syneresis).



Abbildung 7: Dunkelfeldmikroskopaufnahme des Glaskörpers eines 88-Jährigen. Die Kollagenfibrillen im Glaskörperkern sind aggregiert und geschlängelt, zwischen ihnen sind ausgedehnte Lakunen. Der obere Teil des Bildes zeigt den hinteren Pol des Auges, im unteren Teil ist unscharf angeschnitten die Sklera mit Übergang zur Kornea zu erkennen. (modifiziert nach Sebag & Balazs 1985)

Die Syneresis und das simultane Aufweichen der vitreoretinalen Adhäsionen bewirken die Ablösung des Glaskörpers von der Netzhaut, der sogenannten altersbedingten Glaskörperabhebung oder auch posterior vitreous detachment (PVD). Sie beginnt am hinteren Pol des Auges an der Perifovea (Johnson 2005), vornehmlich im superioren Quadranten (Uchino et al. 2001). Die PVD ist in den meisten Fällen ein schleichender, asymptomatischer Prozess, der sich über Jahre hinzieht (Johnson 2005; Casuso et al. 2001; Niwa et al. 2005). Der physiologische Verlauf umfasst folgende Stadien: Nach der initialen Trennung von Glaskörperinnenschicht und ILM an der Perifovea, hebt sich der Glaskörper komplett von der Makula ab. Die Abhebung schreitet nach anterior bis zur Basis fort. In einem letzten Schritt löst sich die Rinde von der Papille (Johnson 2005; Gaudric et al. 1999), hierbei wird die PVD am ehesten symptomatisch (**Abb. 8 E**). Der entstehende retrokortikale Raum füllt sich kontinuierlich mit verflüssigtem Glaskörper und Kammerwasser, wahrscheinlich über das präpapilläre Loch der Rinde. Die Verschiebung von Flüssigkeit in den retrokortikalen Raum verdrängt den Glaskörper und ist wesentlicher Faktor für seinen „Kollaps“ (Sebag 1989b, pp.80–95). Das Zusammenspiel von Rotationskräften durch Augenbewegungen und der Trägheit der Flüssigkeiten treibt die PVD weiter voran (Johnson 2005; Sebag & Yee 2007).

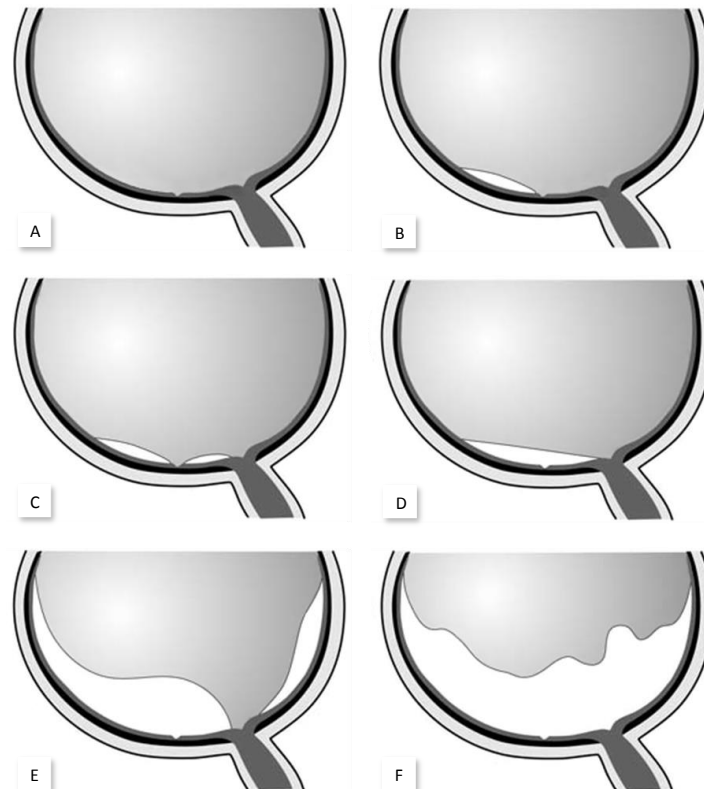


Abbildung 8: Schematische Darstellung der hinteren Glaskörperabhebung

(A) Angehefteter Glaskörper. (B) Beginnende Abhebung an der Perifovea mit dem superioren Quadranten als Prädilektionsstelle. (C) Vollständige Abhebung von der Perifovea bei bestehender fovealer Anheftung. (D) Abhebung von der Fovea. (E) Fortschreiten der Abhebung nach anterior bei bestehender papillärer Anheftung. (F) Abhebung von der Papille, Glaskörperabhebung komplettiert (modifiziert nach Johnson 2005).

Ist die Abhebung vollständig abgelaufen, spricht man von kompletter PVD (**vgl. Abb. 8F**), adhäriert der Glaskörper hingegen noch irgendwo posterior der Basis, spricht man von inkompletter PVD (**vgl. Abb. 8 B-E**). Die PVD betrifft und überschreitet nicht die Basis, da die Kollagenfibrillen hier zahlreicher als an den anderen vitreoretinalen Anheftungen vorhanden sind und mit Insertion unter der ILM besonders tief verankert sind (Wang et al. 2003). Die PVD korreliert positiv mit dem Grad der Verflüssigung des Glaskörpers und dem Lebensalter (Foos & Wheeler 1982; O'Malley 1976). Sie tritt in myopen Augen früher als in emmetropen und hyperopen Augen ein (Yonemoto et al. 1994; Morita et al. 1995).

Weichen die vitreoretinalen Adhäsionen nicht in ausreichendem Maße auf, kommt es im Prozess der Glaskörperabhebung zu unterschiedlichen Komplikationen, die Sebag 2004 erstmals mit dem Begriff der anormalen PVD überschrieb (Sebag 2004). Er teilt mögliche Komplikationen in zwei Gruppen ein: partielle PVD und Vitreoschisis. Partielle PVD bedeutet, dass der Glaskörper mit der gesamten Dicke seiner Rinde von der Netzhaut abgehoben ist, aber noch an einzelner Stelle adhäriert. In Abgrenzung zur inkompletten PVD, die ein physiologisches Durchgangsstadium der hinteren Glaskörperabhebung darstellt, ist Sebags partielle PVD als Status persistierender vitreoretinaler Adhäsion definiert.

Vitreoschisis bezeichnet eine komplette, aber unsaubere Abhebung des Glaskörpers, weil ein Teil der Rinde auf der Netzhaut verbleibt.

Die partielle PVD kann zwei Formen annehmen. 1. Posteriore Abhebung bei peripherer Adhäsion, dies kann Risse in der Retina oder ihre Ablösung zur Folge haben. 2. Periphere Abhebung bei posteriorer Adhäsion.

Die Vitreoschisis als zweite Komplikation der anormalen PVD, bei der durch Spaltbildung in der Glaskörperrinde vitreales Material auf der Netzhaut zurückbleibt, kann nach Sebag wiederum zwei Formen annehmen, je nach Lokalisation des Spalts in der Rinde. 1. Bei Vitreoschisis innerhalb der annähernd einreihigen Hyalozyten verbleibt eine relativ dicke, zellreiche Membran zurück, die zentripetal kontrahieren und Makula Pucker verursachen kann. 2. Bei Vitreoschisis außerhalb der Hyalozyten verbleibt eine dünnere, zellarme Membran, die zentrifugalen Zug entwickeln und möglicherweise ein Makulaforamen begünstigen kann (Sebag 2004).

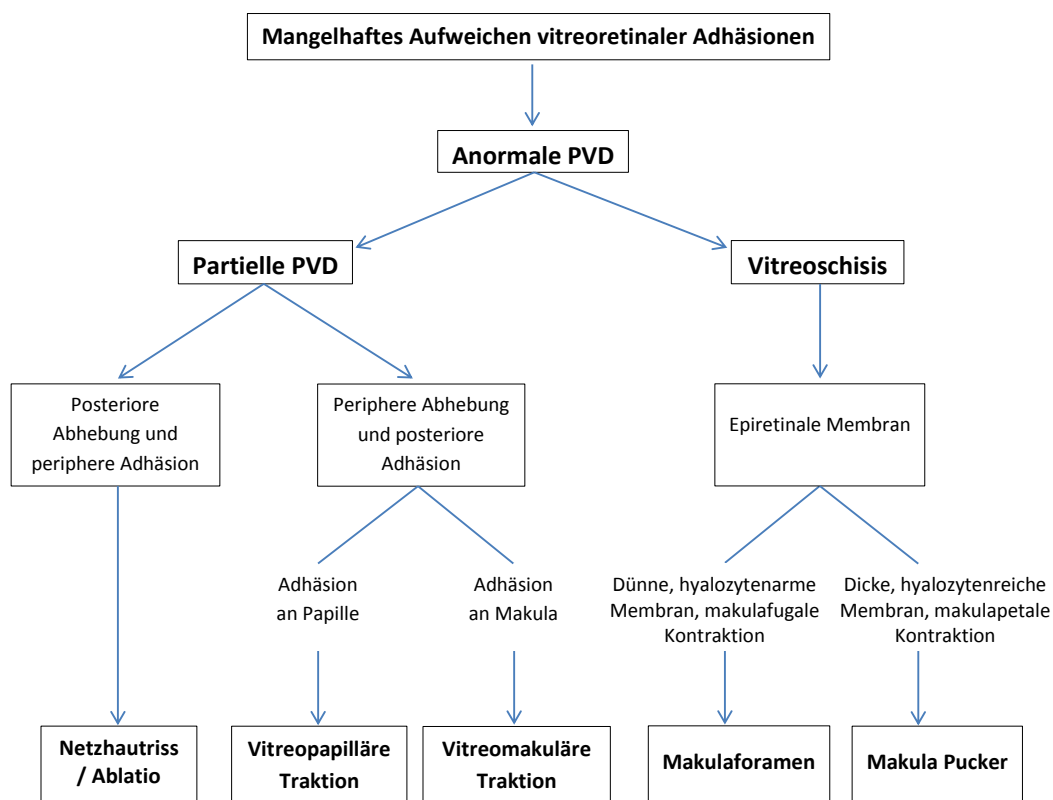


Abbildung 9: Anormale PVD, graphische Darstellung (modifiziert nach Sebag 2004).

Partielle PVD: Die Glaskörperrinde adhärirt noch an einzelnen Stellen, hat sich sonst aber in ihrer gesamten Dicke abgehoben. **Vitreoschisis:** Unsaubere Abhebung der Glaskörperrinde mit Rückständen auf der Netzhaut, jedoch keine Adhäsionen.

2.1.5 Epiretinale Membranen

Beide Komplikationen, partielle PVD und Vitreoschisis, können eine weitere Pathologie nach sich ziehen, die epiretinale Membran (ERM). Epiretinale Membranen sind typisch für Schichtforamina und ursächlich für die Entstehung von Pseudoforamina, ferner finden sie sich bei Makulaforamina, chronischem Makulaödem, Makula Pucker, dem vitreoretinalen Traktionssyndrom und diabetischer Retinopathie.

Die partielle PVD mit posteriorer Adhäsion ist ein wesentlicher Faktor in der Pathogenese von ERM. Persistierende vitreoretinale Adhäsion (VRA) überträgt bei fortschreitender Schrumpfung und Abhebung des Glaskörpers Zug auf die darunter liegende Netzhaut, sogenannte vitreoretinale Traktion (VRT). Da der Glaskörper im Bereich der Fovea besonders fest verankert ist, stellt sich die VRA meist als vitreomakuläre Adhäsion und die Traktion als vitreomakuläre Traktion (VMT) dar. Bei einer einzigen Anheftungsstelle wirkt die Kraft lotrecht auf die Netzhaut, bei VMT also in anterior-posteriorer Richtung. Bei gleichzeitiger vitreopapillärer Adhäsion ändert sich der Hauptvektor der Zugkraft um eine tangentielle Komponente und verläuft schräg.

Vitreomakuläre Traktion fördert die Bildung epiretinaler Membranen. Gliazellen, insbesondere Müllerzellen, die ubiquitär in der Netzhaut vorkommen, reagieren auf Dehnungsstress mit Aktivierung, gesteigerter Proliferation und Migration. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus sind dehnungsaktivierte Ca^{2+} Kanäle (Bringmann et al. 2006; Bringmann & Wiedemann 2009; Lindqvist et al. 2010). Weitere Ursachen werden diskutiert. Epiretinale Membranen verstärken ihrerseits die vitreoretinale Adhäsion und damit die anterior-posteriore Traktion (Odrobina et al. 2011).

Neben Traktion gilt die Vitreoschisis als zweiter Hauptfaktor für die Entstehung von epiretinalen Membranen. Zum einen können mit den Glaskörperresten Hyalozyten aus der Glaskörperrinde auf der Netzhaut verbleiben (Sebag 2004). Zum anderen scheinen die Glaskörperreste auf nicht näher geklärte Weise selbst als Stimulus für Aktivierung und Proliferation von Zellen zu wirken und als Matrize deren Migration zu begünstigen (Schumann et al. 2006; Gandorfer et al. 2011; Parolini et al. 2011).

Zu Beginn der ERM-Genese finden sich vereinzelte Zellen, im Verlauf bilden sich Zellansammlungen und schließlich ein Zellrasen (Schumann et al. 2011). In epiretinalen Membranen assoziiert mit unterschiedlichen Retinopathien konnten bislang folgende Zelltypen nachgewiesen werden: Gliazellen (Müllerzellen, fibröse Astrozyten, Mikroglia), Hyalozyten, Fibrozyten, Myofibroblasten, retinales Pigmentepithel (RPE) und vereinzelt Leukozyten (Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophile) (Bringmann & Wiedemann 2009; Schumann & Gandorfer 2014; Viores et al. 1990; Kampik et al. 1980; Kampik 1981; William E Smiddy et al. 1989; Gandorfer et al. 2005; Schumann et al. 2006; Schumann et al. 2011; Messmer et al. 1998; Hiscott, Grierson & McLeod 1984; Hiscott, Grierson,

Trombetta, et al. 1984; Oberstein et al. 2011). Am häufigsten finden sich Gliazellen, Hyalozyten, Myofibroblasten und Fibroblasten (Parolini et al. 2011; Compera, Entchev, Haritoglou, et al. 2015; Compera, Entchev & Schumann 2015). Nicht zelluläre Bestandteile von ERM sind vor allem Kollagene und weitere Proteine der EZM wie Laminin, Tenascin, Fibronectin und Vitronectin (Bringmann & Wiedemann 2009).

Epiretinale Membranen übertragen Zugkräfte passiv, können aber auch selbst aktiv kontrahieren. Dies erfolgt durch intrazelluläre kontraktile Filamente. Die kontraktile Filamente lassen sich mit anti- α -SMA (smooth muscle actin) nachweisen und sind kennzeichnend für Myofibroblasten (Hirayama et al. 2004; Kohno et al. 2009; Schumann et al. 2011). Myofibroblasten zeigen Charakteristika sowohl von Fibroblasten als auch von glatten Muskelzellen. Durch die α -SMA haltigen Aktinfilamente entwickeln sie kontraktile Kräfte; in vitro erwiesen sich Myofibroblasten sogar stärker als glatte Muskelzellen (Dallon & Ehrlich 2010).

Epiretinale Membranen sind typischerweise kontraktile. Sie werden auch traktive ERM genannt. In der Funduskopie können die durchsichtigen Membranen durch einen glitzernden Reflex auffallen. Häufig sieht man eine feine Fältelung als Zeichen der Kontraktion. In der OCT stellen sie sich als homogen hell-reflektive Bande vor der ILM dar, die vielerorts zu Falten aufgeworfen ist (**Abb. 11**). Da sich die Kontraktion auch auf tiefere Netzhautschichten überträgt, klagen betroffene Patienten oft über Metamorphopsien.

Mit Verbesserung der Qualität und Auflösung der OCTs wurde vor wenigen Jahren ein weiterer Typ epiretinale Membranen bestätigt, dessen Existenz funduskopisch bislang nur vermutet werden konnte. Diese Membran zeigt im OCT mäßig-reflektives Material und keine Faltenbildung (Witkin et al. 2006; Parolini et al. 2011)(**Abb. 10**). Sie ist nicht kontraktile, betroffene Patienten haben keine Metamorphopsien. Anfangs noch atypische oder dichte ERM genannt, hat sich mittlerweile der Terminus LHEP (lamellar hole-associated epiretinal proliferation) etabliert (Parolini et al. 2011; Pang et al. 2014), da diese Membranen stark gehäuft bei Schichtforamina auftreten. Vereinzelt wurden sie auch bei anderen Entitäten sowie in idiopathischer Form gefunden (Schumann et al. 2015; Itoh et al. 2016; Lai et al. 2016).

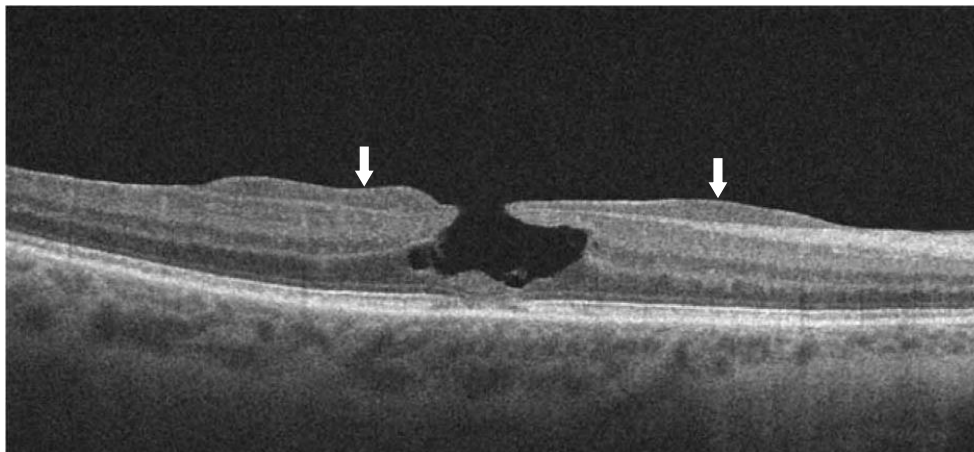


Abbildung 10: Lamellar hole-associated epiretinal proliferation (LHEP) (Pfeile): nicht kontraktiles Gewebe, das sich häufig bei Schichtforamina findet. Im OCT stellt sich die Proliferation als hypo- bis isodense unregelmäßige Bande dar (modifiziert nach Choi et al. 2017 Abb. 2.A.).

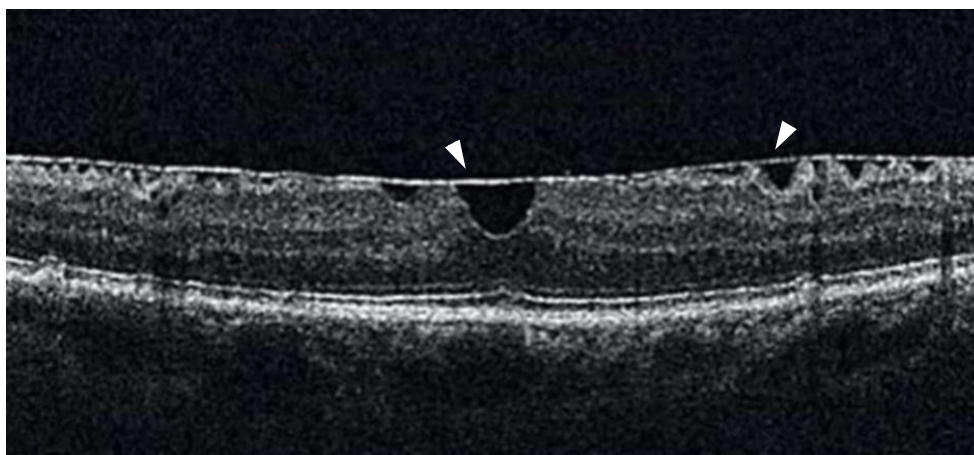


Abbildung 11: Traktive epiretinale Membran (Pfeilspitzen): die „typische“, kontraktile Membran zeichnet sich als hyperreflektive Bande über der Netzhaut ab und wirft sie in Falten (modifiziert nach Byon et al. 2015 Abb. 4b).

2.2 Schichtforamina und Pseudoforamina der Makula

Das Schichtforamen wurde erstmals von J. Donald M. Gass in einer Fallstudie im Jahr 1969 erwähnt. Er untersuchte eine Patientin über mehrere Jahre funduskopisch und angiographisch, die als Komplikation einer Kataraktextraktion ein chronisches zystoides Makulaödem entwickelt hatte. Nach dem Tod der Patientin durfte er seine Überlegungen histopathologisch verifizieren. 1975 definierte Gass schließlich das Schichtforamen und eine weitere noch unbenannte kontraktionsbedingte Veränderung der Fovea in Abgrenzung zum Makulaforamen als eigene Entitäten (Gass & Norton 1969; Gass 1975). Die unbenannte Pathologie bezeichnete Gass als „pseudomacular hole“, da sie in der biomikroskopischen Untersuchung einem Makulaforamen täuschend ähnlich sah. Somit ist er auch Erstbeschreiber des Pseudoforamens (Gass 1975). Im Englischen ist heutzutage der Begriff *macular pseudohole* (MPH) gebräuchlicher.

Das Schichtforamen ist ein Substanzdefekt der Fovea mit intraretinaler Spaltbildung, der sich nicht bis in die äußeren Netzhautschichten erstreckt. Meist findet sich um die Fovea eine durchgehende Schicht epiretinaler Proliferation in Form einer Membran, die die Fovea selbst fast immer ausgespart. Die Membran kann „typisch“ kontraktile und „atypisch“ nicht-kontraktile, „Schichtforamen-assoziierte“ Eigenschaften aufweisen, sowohl in Reinform, als auch als Mischtyp.

Das Pseudoforamen ist eine pathologische Konfigurationsänderung der Fovea, die durch eine epiretinale Membran aus kontraktilem Gewebe hervorgerufen wird. Es kommt zu keinem Substanzverlust und die Netzhautschichten sind intakt. Die Fovea selbst wird nicht von der Membran überspannt. Diese liegt der umgebenden Netzhaut (Perifovea) auf.

2.2.1 Pathogenese

Gass hatte beobachtet, dass die spontane Eröffnung der zystoiden Räume eines Makulaödems nach innen in der Retraktion des umgebenden retinalen Gewebes, der Erweiterung der fovealen Grube und in einem Substanzdefekt der Fovea mündete. Als Hauptabgrenzungsmerkmal zum durchgreifenden Makulaforamen stellte er heraus, dass sich der foveale Defekt nicht bis in die äußeren Netzhautschichten erstreckte.

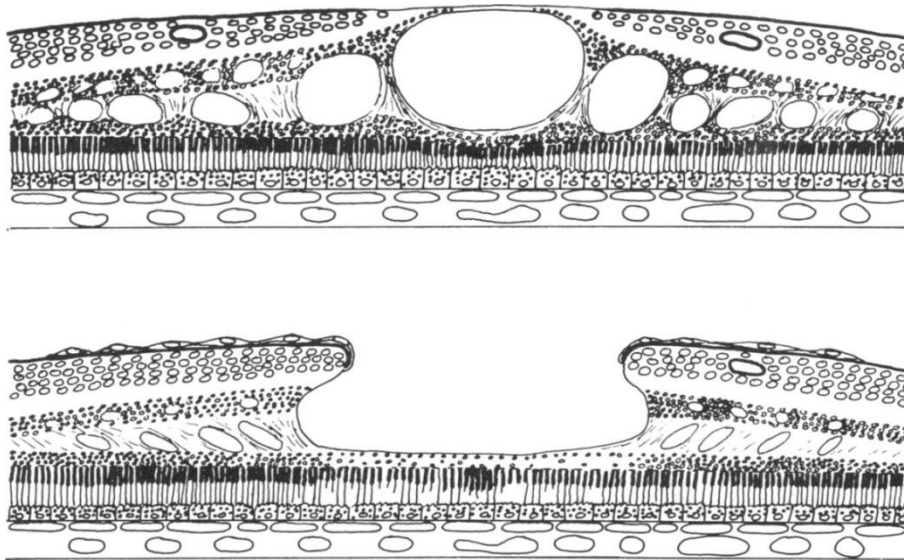


Abbildung 12: So stellte sich Gass basierend auf seinen biomikroskopischen und angiographischen Beobachtungen das zystoide Makulaödem und das Schichtforamen im Querschnitt vor. **Oben:** zystoide Makulaödem mit intraretinalen Pseudozysten als Vorläuferläsion des Schichtforamens. **Unten:** Schichtforamen mit Pseudozysten und epiretinaler Membran. Schemazeichnung (Gass 1975)

Im Jahr 2000 bestätigte Takahashi Gass' Untersuchungen anhand des OCTs. Er betonte erstmals die Rolle der vitreomakulären Traktion in der Pathogenese, die Gass noch verkannt hatte (Takahashi & Kishi 2000). Trotz kontinuierlicher Weiterentwicklung von OCTs mit verbesserter Auflösung werfen Ätiologie und Pathogenese bis heute noch viele Fragen auf. Eine erste Vorläuferläsion des Schichtforamens scheint die Pseudozyste zu sein, ein unphysiologischer Hohlraum in der fovealen Netzhaut, der im Gegensatz zu einer echten Zyste nicht mit Epithel ausgekleidet ist. Reißt diese Pseudozyste nach innen auf, entsteht ein Schichtforamen. (Takahashi & Kishi 2000; Haouchine et al. 2001). Pseudozysten, die zu Schichtforamina progrediert sind, wurden beim zystoiden Makulaödem beschrieben (Gass 1975; Trempe et al. 1981; Unoki et al. 2009; Tsukada et al. 2011). Auch am Beginn der Entwicklung des durchgreifenden Makulaforamens steht eine Pseudozyste (Johnson & Gass 1988; Gaudric et al. 1999; Haouchine et al. 2001; Azzolini et al. 2001), und so gibt es die häufig zitierte Hypothese von Haouchine et al., dass das Schichtforamen auch ein abortiertes Makulaforamen sein könnte (Haouchine et al. 2001; Haouchine et al. 2004).

Klar ist, dass bei der Abdeckung von Pseudozysten und der lateralen Spaltbildung traktive Kräfte die entscheidende Rolle spielen: Anterior-posteriorer und schräger Zug im Prozess der normalen und anormalen Glaskörperabhebung (Takahashi & Kishi 2000; Tanner et al. 2001; Haouchine et al. 2001; Kakehashi et al. 1996; Romano et al. 2012; Compera, Cereda, et al. 2017), sowie tangentialer Zug bei Kontraktion einer epiretinalen Membran (Garretson et al. 2008; Romano et al. 2012), die sich bei der großen Mehrheit der Schichtforamina finden. Valide Zahlen zur Häufigkeit von begleitenden epiretinalen Membranen bei Schichtforamina sind 62% (Haouchine et al., 2004), 82% (Theodosiadis

et al. 2009), 70,8% (Tanaka et al. 2011), 77% (Parravano et al. 2013) und 95% (Schumann et al. 2015). Über die Rolle der nicht kontraktiven LHEP-Membranen in der Pathogenese der LMH weiß man bislang ebenso wenig, wie über die Pathogenese dieser atypischen Proliferationen selbst. Neuerdings gibt es die Hypothese, dass bei LMH mit LHEP weniger traktive Kräfte sondern eher degenerative Prozesse im Vordergrund stehen (Govetto et al. 2016) und dass dieses Schichtforamen eine eigene Entität (Pang et al. 2015) oder eine eigene Untergruppe (Itoh et al. 2016; Compera, Schumann, et al. 2017) darstellen könnte.

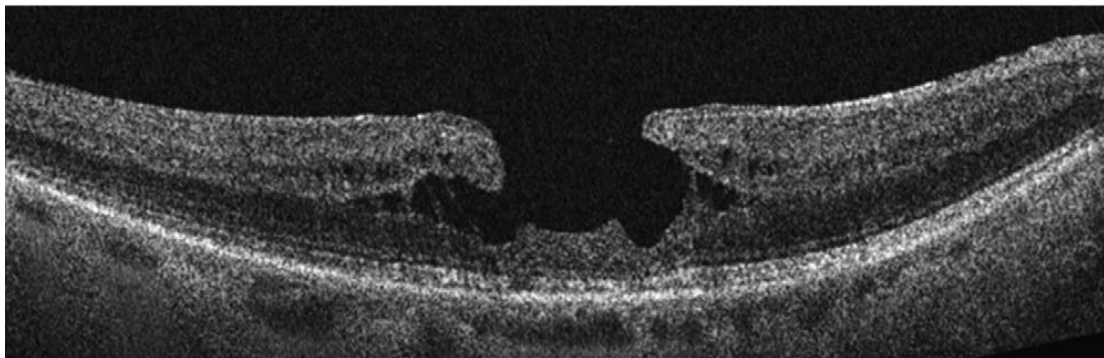


Abbildung 13: Schichtforamen in der hochauflösenden SD-OCT. Makula mit deutlichem Substanzdefekt, intraretinaler Spaltbildung, und vereinzelt Pseudozysten. An den Fovearändern liegt etwas LHEP auf, in der Peripherie zeigt sich angedeutet eine kontraktile epiretinale Membran als schmales, hyperreflektives Band. Aus heutiger Sicht war Gass' damalige Vorstellung verblüffend präzise, vgl. **Abb. 12**. (Modifiziert nach Gaudric et al. 2013, Fig. 6)

Die Pathogenese des Pseudoforamens ist nach heutigem Wissen monokausal: Ursächlich für die veränderte Konfiguration der Fovea ist eine kontraktile epiretinale Membran. Diese kontrahiert zentripetal und wirft die darunterliegende Netzhaut in Falten. Die Ränder der Fovea werden angehoben, die foveale Grube wird steiler und ihr Durchmesser verringert sich. Zudem bewirkt das Anheben der Perifovea eine höhere Dicke im Zentrum der Fovea (Allen & Gass 1976; Haouchine et al. 2004; Chen & Lee 2008; Gaudric et al. 2013). Die epiretinalen Membranen können unizentripetal oder polyzentripetal kontrahieren (Gaudric et al. 2013). Unizentripetale Kontraktion bewirkt radiäre Netzhautfalten. Polyzentripetale Kontraktion bewirkt ein unregelmäßiges Faltenmuster in der Funduskopie und ein unruhiges Bild in der OCT. Die Fovea ist hier häufig steiler, asymmetrisch verzogen und weist einen intraretinalen Spalt auf (Gaudric et al. 2013)(vgl. **Abb. 20**). Die Ursache für das Auftreten der kontraktiven Membran selbst ist noch nicht hinreichend erforscht. Zur Pathogenese der kontraktiven ERM siehe **Abschnitt 2.1.5.** und **Abschnitt 5.2.1.**

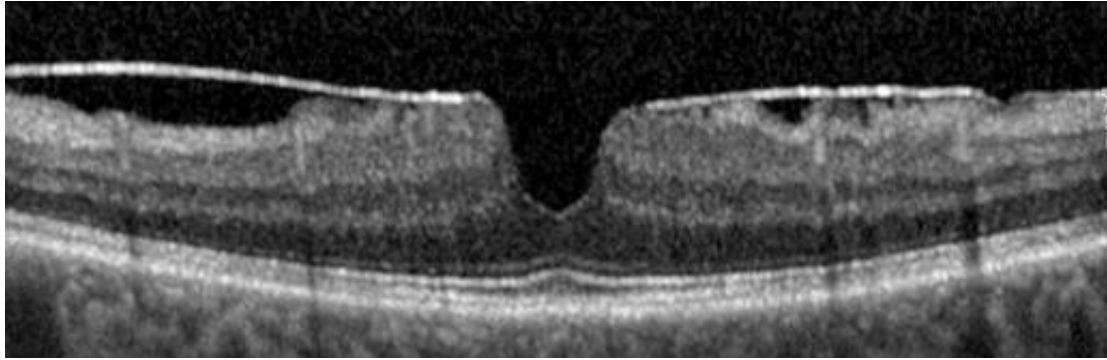


Abbildung 14: Pseudoforamen in der SD-OCT (Haritoglou & Schumann 2017). Die Netzhaut ist unter der kontraktiven Membran in Falten geworfen, die Fovea ist steil aufgestellt und ihre Ränder sind angehoben.

2.2.2 Klassifikation

Hinsichtlich der Symptomatik unterscheiden sich Schicht- und Pseudoforamen nur tendenziell. Die klinische Untersuchung und weiterführende apparative Diagnostik ermöglichen die Differenzierung der beiden Entitäten, die Graduierung und den Ausschluss anderer Makulopathien, wie dem durchgreifenden Makulaforamen.

Die klinische Untersuchung ist der erste Schritt in der Diagnosestellung. Mit einfachen Mitteln können hier bereits wegweisende Befunde erhoben werden. Die fachgerechte Erhebung des Visus beinhaltet die Überprüfung des Fern- und Nahvisus' für jedes Auge einzeln, bei bestmöglicher Korrektur. Metamorphopsien werden anhand des Amsler-Gitters überprüft. Hierzu fixiert der Patient einen schwarzen Punkt in der Mitte eines quadratischen Rastergitters. Nimmt er das Gitter als verzogen wahr, ist der Test positiv und ein Hinweis auf eine pathologische Veränderung der Makula, wie sie zum Beispiel durch eine kontraktile epiretinale Membran verursacht wird.

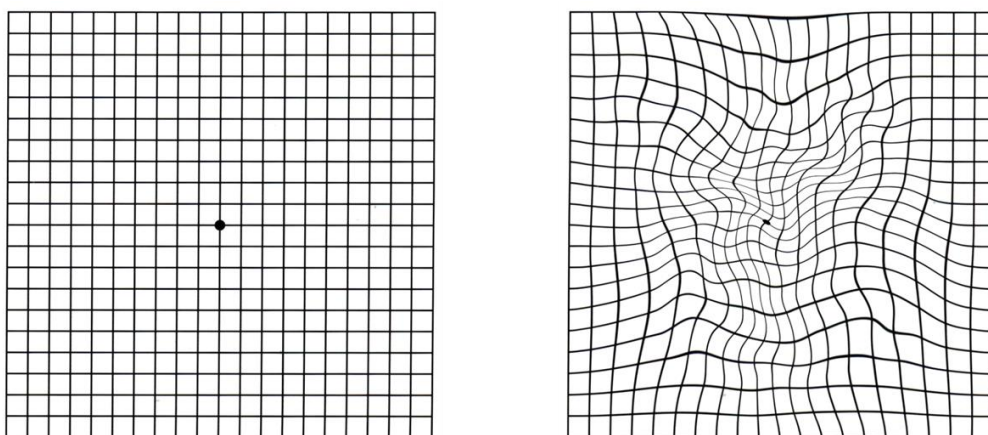


Abbildung 15: Amsler-Gitter-Test

Links: Amsler-Gitter zur Vorlage für den Patienten, das er/sie bei unbeeinträchtigter Makula auch so wahrnimmt. **Rechts:** Wahrnehmung des Patienten mit Metamorphopsie infolge einer kontraktiven epiretinalen Membran (eigene Grafik)

Routinemäßig schließt sich die biomikroskopische Untersuchung des Augenhintergrunds (Fundus) durch die indirekte Ophthalmoskopie an, auch Funduskopie genannt. Um eine Affektion der fovealen Photorezeptoren auszuschließen, wie sie beim durchgreifenden Makulaforamen vorkommt, führt der Untersucher bei der Funduskopie den Watzke-Allen-Test durch. Hierfür stellt der Untersucher den Lichtstrahl der Spaltlampe so schmal ein, dass er für den Patienten als Linie wahrnehmbar ist, und schwenkt ihn langsam über die Makula. Im Falle eines Schicht- oder Pseudoformamens sieht der Patient korrekterweise eine durchgängige Linie, der Test ist negativ (**Abb. 17 links**). Sieht der Patient eine unterbrochene Linie, ist der Test positiv, und der Netzhautdefekt erstreckt sich bis in die äußeren Schichten (**Abb. 17 rechts**).

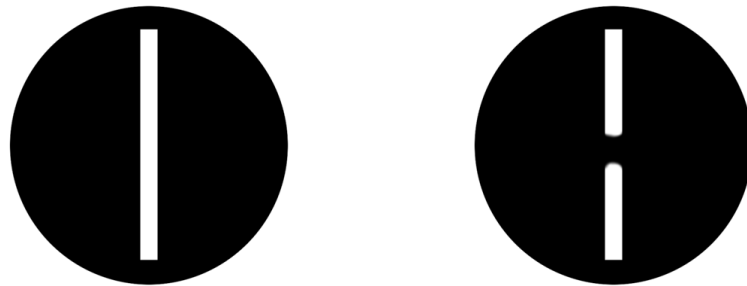


Abbildung 16: Watzke-Allen-Test

Der weiße Balken stellt den Lichtstrahl aus Sicht des Patienten dar. **Links:** Der Lichtstrahl wird als durchgängig erkannt, Test negativ. **Rechts:** Der Lichtstrahl wird unterbrochen wahrgenommen, Test positiv. Ein positiver Test zeigt einen Schaden der äußeren Netzhautschichten an und ist ein Hinweis auf ein durchgreifendes Makulaforamen (eigene Grafik).

In der biomikroskopischen Beurteilung der Makula können sich dem Untersucher beim Schichtforamen typischerweise folgende Auffälligkeiten präsentieren:

- a. eine scharf begrenzter, facettenartiger Bereich im Zentrum der Makula
- b. ein zarte Transparenz oder ein leichter Reflex am Grund des Foveadefekts, als Hinweis auf eine intakte Photorezeptorschicht
- c. das Fehlen eines Schleiers um die Makula herum, der auf Mikrozysten oder subretinale Flüssigkeit und eine lokale Abhebung der Netzhaut hindeutet, wie sie sich beim Makulaforamen finden kann
- d. das Fehlen von weiß-gelblichen Ablagerungen auf dem retinalen Pigmentepithel im Defekt, wie beim Makulaforamen

(Gass 1975; Smiddy & Gass 1995; Massin et al. 1999)

Zudem kann biomikroskopisch eine traktive ERM oder eine LHEP zu sehen sein. Eine traktive ERM kann als grau-weißliche Abblassung der Makula zu erkennen sein, mit einer feinen Fältelung, die eine glitzernde Reflexion erzeugt. LHEP hingegen sind mangels Faltenbildung und gelblicher Farbe, welche sich von der Makula (gelber Fleck) nicht abhebt, nur schwer zu erkennen (Pang et al. 2014).

Beim Pseudofoamens können sich folgende Auffälligkeiten zeigen:

- a. ein grau-weißer Schleier über der Netzhaut, der die Fovea ausspart – die kontraktile epiretinale Membran
- b. eine oval-runde, scharf begrenzte Fovea, die wie ausgestanzt wirkt
- c. eine feine Fältelung der Netzhautoberfläche durch die kontraktile Membran

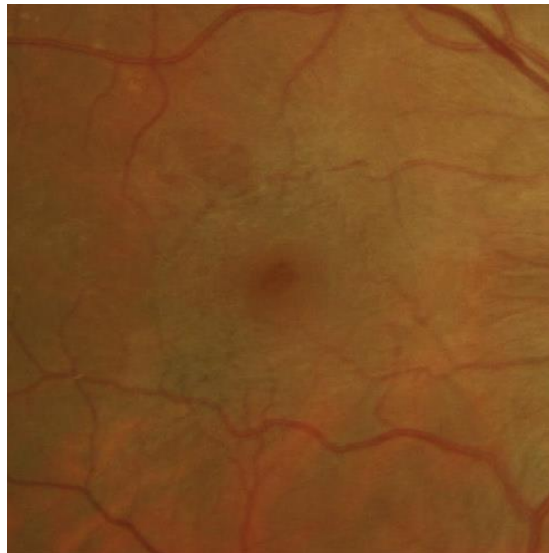


Abbildung 17: Fundusfotographie eines Pseudofoamens (Gaudric et al. 2013). Die Makula ist durch die aufliegende epiretinale Membran abgeblasst, die unbedeckte Fovea wirkt dadurch umso röter. Zeichen der Kontraktion ist die ovale Form der Fovea und die Fältelung der Netzhautoberfläche, besonders gut rechts und oberhalb der Fovea zu erkennen.

Die funduskopische Untersuchung liefert erste Hinweise. Das aussagekräftigste diagnostische Instrument ist die OCT. Mehrere Studien haben gezeigt, dass auch erfahrene Untersucher ein Schichtforamen klinisch nicht sicher erkennen (Haouchine et al. 2004; Witkin et al. 2006). Die Kohärenztomographie hingegen weist eine hohe Sensitivität und Spezifität auf.

Haouchine et al. stellten erste OCT-Diagnosekriterien für das Schichtforamen auf (Haouchine et al. 2004). Auf dieser Grundlage entwickelten Witkin et al. vier Diagnosekriterien, die ohne Messungen auskamen und nur noch rein morphologische Merkmale berücksichtigten (illustriert in **Abb. 18**). Diese Kriterien konnten sich gegen vereinzelte Gegenvorschläge (Garretson et al. 2008; Androudi et al. 2009) behaupten und werden bis heute zur Diagnosestellung des Schichtforamens herangezogen (Witkin et al. 2006). Vor wenigen Jahren bekräftigte ein Expertengremium ihre Gültigkeit erneut (Duker et al. 2013).

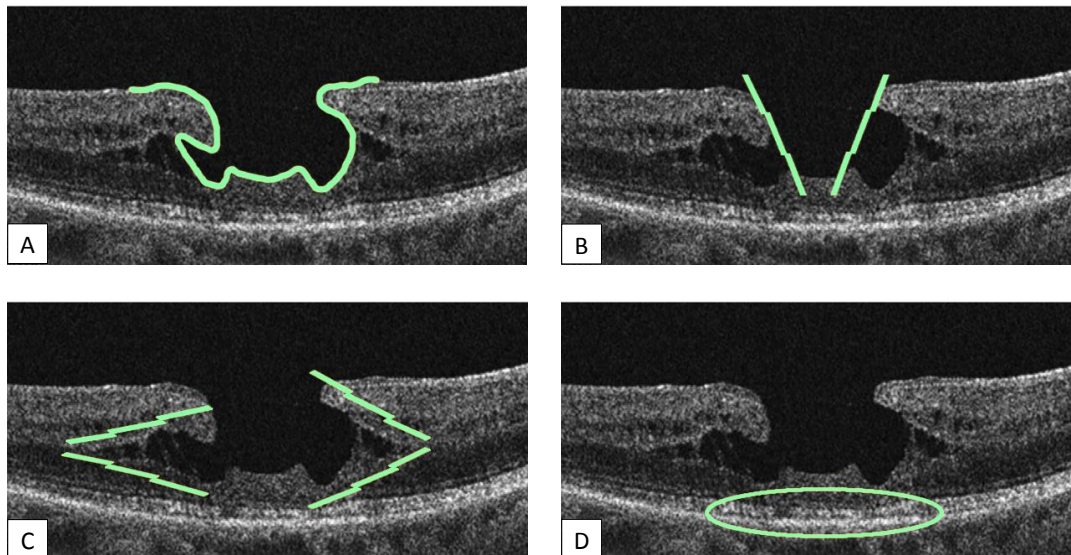


Abbildung 18: Schichtforamen. Illustration der Diagnosekriterien von Witkin et al. anhand ein und derselben OCT-Aufnahme (Modifiziert nach Gaudric et al. 2013 , Fig. 6)
A unregelmäßige foveale Kontur. **B** Riss der inneren Fovea. **C** intraretinale Spaltbildung zwischen inneren und äußeren Netzhautschichten. Meist zwischen OPL und ONL (Duker et al. 2013). **D** Fehlen eines durchgreifenden Defekts bei intakten Photorezeptoren im Bereich des fovealen Defekts.

Obwohl es für das Pseudofovenum lange keine offiziellen, verbindlichen OCT-Kriterien gab, schien eine einheitliche Diagnosestellung unproblematisch (Suzuki et al. 2003; Haouchine et al. 2004; Chen & Lee 2008). 2013 jedoch, postulierten Gaudric et al., dass ein intraretinaler Spalt auch beim Pseudofovenum vorhanden sein kann und nicht vorschnell ein Schichtfovenum diagnostiziert werden soll und stellten damit einige ältere Publikationen infrage. Hauptunterschied zum Schichtfovenum sei, dass es bei Pseudofovenum zu keinem Substanzverlust kommt (Gaudric et al. 2013)(**Abb. 24**). Im selben Jahr formulierte das Expertengremium um Jay Duker - darunter auch Alain Gaudric - vier Leitkriterien zur Diagnostik des Pseudofovens in der OCT, die sich im Wesentlichen an den Ergebnissen der Studie von Haouchine orientierten (Duker et al. 2013; Haouchine et al. 2004)(**Abb. 22**):

- a. verdickte Parafovea
- b. epiretinale Membran mit ausgesparter Fovea
- c. steil aufgestellte Fovea mit normaler oder fast-normaler zentralen Dicke
- d. kein Gewebeverlust

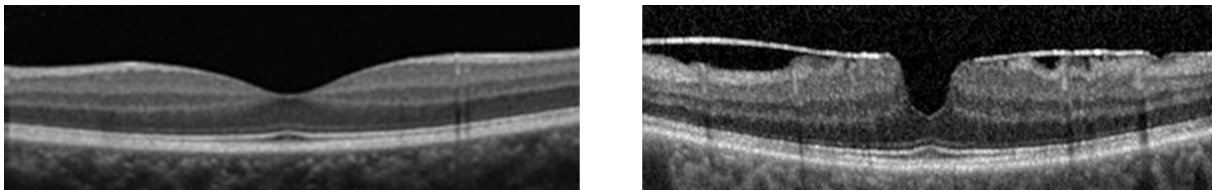


Abbildung 19: Normale Fovea und Pseudofovenum. Im direkten Vergleich mit dem OCT-Bild einer normalen Fovea lassen sich die Diagnosekriterien gut erkennen. **Links:** normale Fovea **Rechts:** Pseudofovenum. Die kontraktile Membran wirft die Netzhaut deutlich in Falten (Haritoglou & Schumann 2017)

Begleitend zur kontraktile Membran wurden in wenigen Fällen Schichtfovenum-assoziierte epiretinale Proliferationen gefunden. Schumann et al. konnten bei 3 von 27 untersuchten Pseudofovenum LHEP in Kombination mit typischen ERM nachweisen (Schumann et al. 2015), in einer anderen Untersuchung zeigten 2 von 20 Pseudofovenum LHEP-Material (Purtskhvanidze et al. 2018).

Trotz klar definierter Diagnosekriterien ist die Abgrenzung zwischen Schicht- und Pseudofovenum im klinischen Alltag nicht immer einfach. Insbesondere die von Gaudric beschriebenen Pseudofovenum mit Spalt können ein Grenzfall sein (**Abb. 20**). So lässt sich auch mittels hoch-auflösender SD-OCT ein Gewebeverlust bei intraretinaler Aufspaltung manchmal nicht eindeutig ausschließen. Ein Gewebeverlust ist per definitionem aber ein Ausschlusskriterium für die Diagnose Pseudofovenum. Auch die Frage ab wann die Kontur der Fovea unregelmäßig ist – erstes Diagnosekriterium für das

Schichtforamen – bedarf der Diskussion. Andere Autoren verstehen diesen Grenzfall eher als „traktives Schichtforamen“ als Untergruppe von Schichtforamina (Govetto et al. 2016).

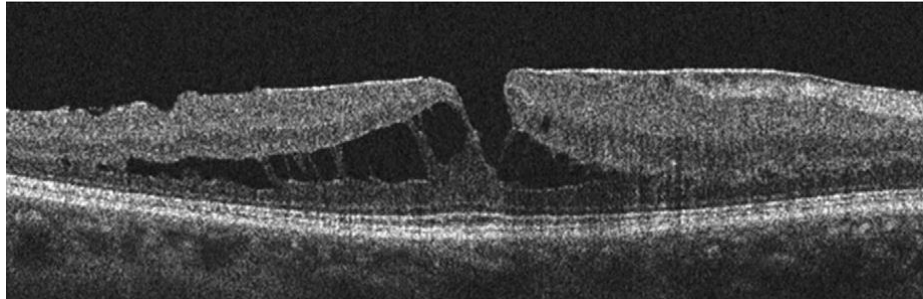


Abbildung 20: Pseudoforamen mit intraretinaler Aufspaltung nach Gaudric (Gaudric et al. 2013). Sind die Schichten hier durch die kontraktile Membran nur aufgedehnt, oder ist womöglich auch schon Gewebe zugrunde gegangen? Ist die Fovea hier nur steil aufgestellt, charakteristisch für das Pseudoforamen, oder bereits unregelmäßig konturiert?

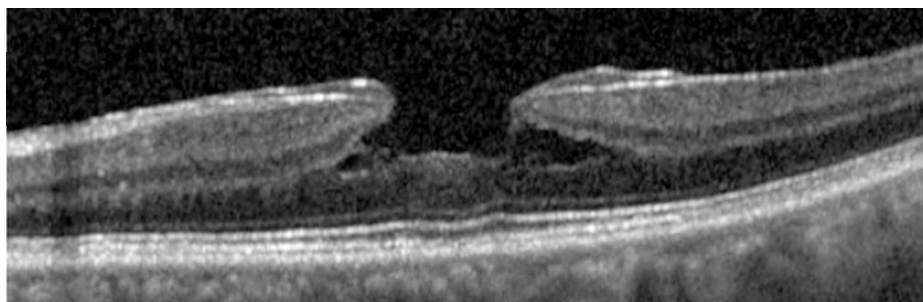


Abbildung 21: Schichtforamen mit LHEP und Gewebeverlust (Compera, Schumann, et al. 2017)

2.2.3 Retinale Bildgebung

Bildgebende Verfahren der Netzhaut wie Ultraschall, optische Kohärenztomographie (OCT: optical coherence tomography), Fluoreszenzangiographie und Retinotomographie sind in der Augenheilkunde nicht mehr wegzudenken. Die optische Kohärenztomographie ist unter den bildgebenden Verfahren von herausragender Bedeutung wird in der klinischen Routine am häufigsten eingesetzt.

Für die Diagnostik und Verlaufskontrolle von Schicht- und Pseudofovenen ist sie unverzichtbar, da die Klassifikation beider Entitäten wie oben dargelegt anhand von OCT-Kriterien erfolgt. Obwohl nicht-invasiv, liefert sie nahezu instantan ein detailgenaues Schnittbild des Augenhintergrunds mit Glaskörper, Glaskörperrinde, Netzhaut und Aderhaut (Choroidea).

Seit die OCT im Jahr 1991 von Huang et al. erstmals *in vitro* und zwei Jahre später von Fercher et al. erstmals *in vivo* angewendet wurde, wurde die Technik kontinuierlich weiterentwickelt und verbessert (Huang et al. 1991; Fercher et al. 1993). Heutzutage ist die SD-OCT (spectral-domain-) mit einer Auflösung von 5-6 μm und bis zu 85.000 A-Scans pro Sekunde (Spectralis OCT2, Heidelberg Engineering GmbH) der Goldstandard. Vorgängertechnologien hatten eine geringere Auflösung (TD-OCT) und waren langsamer und dadurch anfälliger für Bewegungsartefakte (TD- und UHR-OCT) (Schuman 2008; Sano et al. 2009). Die ersten *in vivo* Aufnahmen mit der SD-OCT wurden 2002 von Wojtkowski et al. angefertigt (Wojtkowski et al. 2002); in die klinischen Institute hielt die Neuerung erst einige Jahre später Einzug (Michalewski et al. 2007; Koizumi et al. 2008; Chang et al. 2008; Schuman 2008).

Grob vereinfacht gesagt funktioniert die optische Kohärenztomographie wie Echographie, bloß nicht mit Ultraschallwellen, sondern mit elektromagnetischen Wellen kurz außerhalb des sichtbaren Spektrums – mit „Licht“. Die SD-OCT basiert auf Interferometrie und Fourier-Analyse. Die verwendete Strahlung im nahe-infraroten Bereich (780 – 1400 nm) ist unschädlich für die Netzhaut. Um eine hohe Auflösung zu gewährleisten hat sie eine weite Bandbreite, sowie eine geringe Kohärenzlänge (\rightarrow „coherence“). Photosensoren registrieren das Interferenzmuster nach Aufspaltung in sein Frequenzspektrum (\rightarrow „spectral-“) durch ein Beugungsgitter. Die Fourier-Analyse des gewonnenen Datensatzes ermöglicht die Verarbeitung einer großen Datenmenge in sehr kurzer Zeit und damit hochauflösende, zwei- und dreidimensionale Bilder der Netzhaut (Schuman 2008).

Der Kontrast der Banden in der OCT ergibt sich durch Unterschiede des Brechungsindex' („refraktiver Index“) der Netzhautschichten. Der jeweilige Index wird aus den Streuungs- und Reflektionseigenschaften der Gewebeschichten ermittelt.

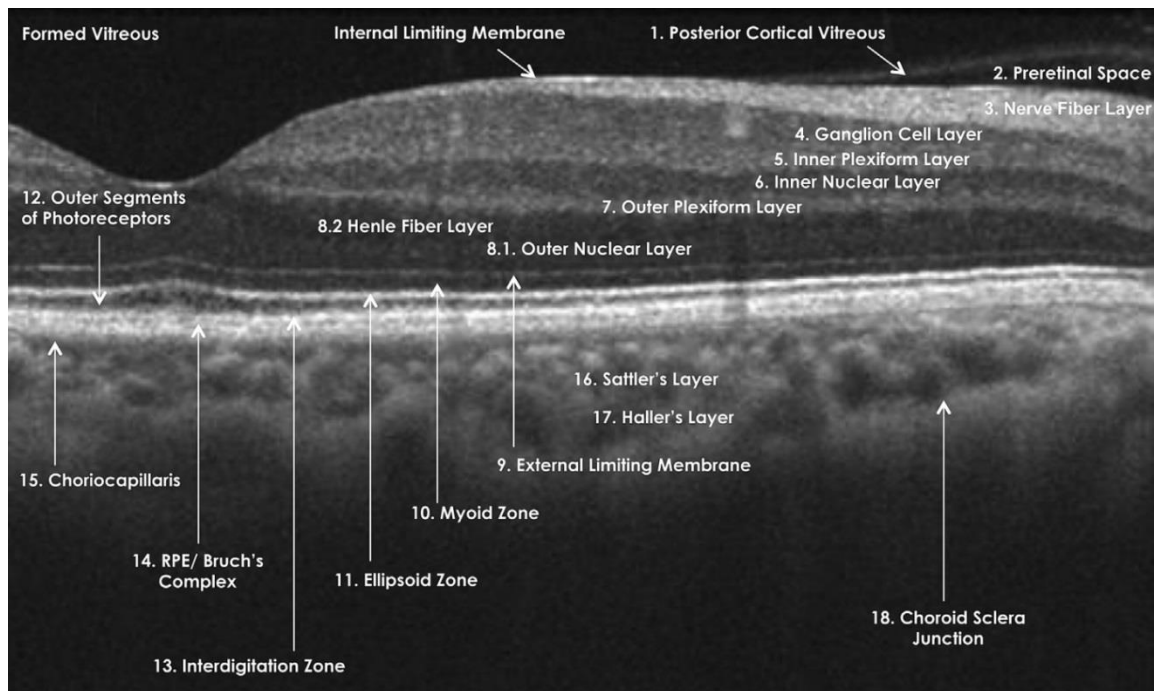


Abbildung 22: OCT der Netzhaut mit beschrifteten Banden.

Nicht-selbsterklärende Bezeichnungen sind: **8.2. Henle-Faser-Schicht:** Axone der Photorezeptoren.

13. Interdigitationszone: Kontaktzone der Photorezeptoraußensegmente mit dem Retinalen Pigmentepithel.

14. RPE/Bruch-Komplex: Retinales Pigmentepithel und die Bruchmembran, Grenze zur Aderhaut, nur bei Pathologien als getrennte Banden zu sehen. **16. Sattler- & 17. Haller-Schicht:** Historisch bedingte Nomenklatur, die Choroidalgefäße unterschiedlichen Kalibers beschreiben soll. Die Banden 9- 11 werden im Text erläutert. (Modifiziert nach Staurenghi et al. 2014)

Die Banden in der OCT korrelieren größtenteils mit den histologisch sichtbaren Netzhautschichten (**vgl. Abb. 22 mit Abb. 6**). Lediglich auf zellulärer Ebene, bei den Photorezeptoren, herrschte noch bis vor Kurzem keine Klarheit, welchen Strukturen die Banden zuzuschreiben sind (Gloesmann et al. 2003; Srinivasan et al. 2008; Spaide & Curcio 2011; Staurenghi et al. 2014). Unregelmäßigkeiten in den OCT-Banden der äußeren Netzhaut (**vgl. Abb. 22, Bande 9- 11**) sind entscheidend für die Differentialdiagnose von Makula-, Schicht- und Pseudoforamen. Zudem scheinen Schäden in diesem Bereich besonders bedeutsam für Verlauf und Prognose der genannten Makulopathien zu sein. Die kritischsten Strukturen seien hier kurz erläutert:

Die äußere Grenzmembran (ELM, external limiting membrane, membrana limitans externa) trägt ihren Namen aus historischen Gründen. Sie ist keine Membran oder Brenzung, sondern entspricht der Zone, in der Müllerzellen und Photorezeptoren ineinandergreifen (**vgl. Abb. 22 Bande 9**).

Die Myoide Zone liegt im Bereich der Photorezeptoren. Sie entspricht dem myoiden Teil des Photorezeptorinnensegments, der nur wenige Mitochondrien enthält und sich hyporeflektiv darstellt (**vgl. Abb. 22 Bande 10**).

Die Ellipsoide Zone liegt ebenso im Bereich der Photorezeptoren. Das anatomische Korrelat ist der ellipsoide Teil des Photorezeptorinnensegments, welcher zahlreiche, dicht gepackte Mitochondrien

enthält. Diese Bande auf dem OCT-Bild wurde bis vor Kurzem noch als „Grenzfläche von innerem und äußerem Segment der Photorezeptoren (IS/OS)“ bezeichnet, was jedoch als widerlegt gilt. Viele der zitierten Artikel entstanden vor dieser neuen Erkenntnis, andere Autoren verwenden heute noch die Abkürzung IS/OS. Aus Gründen der Praktikabilität wird in der vorliegenden Arbeit „IS/OS“ synonym zu „ellipsoide Zone“ verwendet (vgl. **Abb. 22 Bande 11**).

In der Diagnostik der Netzhauterkrankungen werden weitere Verfahren wie die Mikroperimetrie und die Autofluoreszenzmessung eingesetzt. Auf sie wird hier nicht weiter eingegangen, da sie kein Bestandteil der Routinediagnostik für Schicht- und Pseudofovenen sind, sondern allenfalls bei differentialdiagnostischen Überlegungen Anwendung finden (Haritoglou et al. 2014).

2.2.4 Klinischer Verlauf

Das Schichtfovenen gilt unbehandelt über einen mittelfristigen Zeitraum als stabil und nur langsam voranschreitend. Die einzige Langzeitstudie zu Schichtfovenen ergab einen relativ stabilen Verlauf (Purtskhvanidze et al. 2018). In einzelnen Fällen jedoch progrediert der foveale Defekt zu einem durchgreifenden Makulafovenen (Witkin et al. 2006; Castro & Duker 2010; Tanaka et al. 2011; Bottoni et al. 2013; Lai et al. 2016). Theodossiadis et al. beobachteten 41 Patienten über einen Zeitraum von durchschnittlich drei Jahren. Bei der letzten Untersuchung hatte sich die BCVA von 11 (27%) der Patienten verschlechtert und es klagten nunmehr 39 Patienten über Metamorphopsien, bei Studienbeginn waren es noch 31 Patienten (Theodossiadis et al. 2009). Sogar bei stark myopen Augen blieb die BCVA, wie auch die Morphologie des Defekts im OCT, über ein Jahr unverändert, einer der 24 Patienten entwickelte allerdings ein durchgreifendes Makulafovenen (Tanaka et al. 2011).

Verlaufsstudien der letzten fünf Jahre berücksichtigten auch Schichtfovenen mit dem seit Kurzem (Parolini et al. 2011) beschriebenen atypischen epiretinalen Material (LHEP). Die Studienlage zur Stabilität von LMH mit LHEP ist kontroverser als bei typischen LMH. Die Debatte wird dadurch verschärft, dass Schichtfovenen mit LHEP bereits bei Studienbeginn größere Netzhautdefekte, häufiger Unregelmäßigkeiten in der ellipsoiden Zone („IS/OS“) und häufig eine schlechtere BCVA aufweisen als Schichtfovenen mit typischem epiretinalen Material (Parravano et al. 2013; Govetto et al. 2016; Choi et al. 2017; Parolini et al. 2011; Pang et al. 2014; Pang et al. 2015; Schumann et al. 2015; Lai et al. 2016; Itoh et al. 2016; dell’Omo et al. 2017).

Einige Autoren stellten einen stabilen Verlauf von LMH mit LHEP nach morphologischen (Pang et al. 2014; Pang et al. 2015), funktionellen (Schumann et al. 2015) oder allen Parametern fest (Bottoni et al. 2013; dell’Omo et al. 2017), bei einer maximalen Studiendauer von 33 Monaten (dell’Omo et al.

2017).

Weitere Autoren berichteten eine leichte Zunahme des atypischen Materials bei gleichbleibender Sehschärfe, und bewerteten den Verlauf als relativ stabil (Govetto et al. 2016), oder als unklar (Itoh et al. 2016).

Andere Veröffentlichungen zeigten die Progression morphologischer Parameter (Zampedri et al. 2017; Compera, Schumann, et al. 2017) sowie die Zunahme von LHEP bei einer maximalen Studiendauer von 40 Monaten (Compera, Schumann, et al. 2017) und befanden den Verlauf als nicht stabil.

Studien zum natürlichen Verlauf des Pseudofoamens gibt es kaum. Das mag daran liegen, dass Patienten mit Pseudofoamina meist eine gute Sehschärfe haben - die beste unter den membranassoziierten Makulopathien (Chen & Lee 2008; Schumann et al. 2015). Durch Metamorphopsien wird das subjektive Empfinden der Patienten dennoch stark beeinträchtigt.

Greven et. al beobachteten 36 Pseudofoamina von 34 Patienten über ein Jahr. In diesem Zeitraum veränderte sich die Sehschärfe nicht signifikant. Bei 23 Augen stellten er und seine Mitarbeiter Veränderungen der Makula anhand von Fundusphotographien fest (Greven et al. 1998). Eine neuere Studie von Pseudofoamina mit guten Ausgangsparametern von Byon et al., zeigte über die Laufzeit von zwei Jahren keine signifikante Veränderung der Sehschärfe (Byon et al. 2015).

Vereinzelt wurden Fälle von spontaner Ablösung einer kontraktiven Membran (Greven et al. 1988; Nomoto et al. 2013; Walter & Flynn 2015) und anschließender Rückbildung des Pseudofoamens (Walter & Flynn 2015) beschrieben.

2.2.5 Therapie der Schichtfoamina und Pseudofoamina

Die einzige verfügbare Therapie von Schichtfoamen und Pseudofoamen ist die Operation. Hierbei wird der Glaskörper entfernt (Vitrektomie) und die ILM mit aufliegender epiretinaler Membran von der Netzhaut abgezogen (Peeling). Ziel der Vitrektomie ist es, vitreoretinale Adhäsionen zu lösen und so die vitreal bedingte Traktion aufzuheben. Zudem wird mit dem Glaskörper ein Reservoir von Zellen entfernt, welche an der epiretinalen Membranbildung entscheidend beteiligt sind, die Hyalozyten. Das Peeling der epiretinalen Membran hat zum Ziel die tangentielle Traktion zu eliminieren.

Es hat sich gezeigt, dass auch bei größter Sorgfalt Reste von Glaskörpermaterial und epiretinaler Proliferation auf der Netzhaut zurückbleiben, welche Ausgangspunkt für Reproliferation sind. Darum wird zusätzlich zur ERM auch die innere Grenzmembran im Bereich der Makula gepeelt (Shimada et al. 2009; Schumann et al. 2010; Gandorfer et al. 2012; Chang et al. 2017; Schechet et al. 2017).

Die Indikationsstellung zur OP ist noch nicht standardisiert und ist Diskussionsgegenstand unter den Autoren. Grundsätzlich herrscht Konsens darüber, dass bei einer deutlichen Verschlechterung des Visus, Metamorphopsien und einer subjektiven Beeinträchtigung der Lebensqualität des Patienten eine OP ernsthaft in Erwägung gezogen werden sollte (Parolini et al. 2011; Sun et al. 2013; Haritoglou et al. 2014).

Meist wird in der gleichen Sitzung der therapeutische Eingriff mit einer prophylaktischen Katarakt-OP kombiniert und eine Kunstlinse eingesetzt, da ein Großteil der Patienten nach einem intraokulären Eingriff wie der Vitrektomie im Verlauf eine Katarakt entwickelt (Garretson et al. 2008; Androudi et al. 2009; Lee et al. 2012; Sun et al. 2013).

3 Patienten und Methoden

3.1 Patientenkollektiv

Für diese Arbeit wurden die operativ entfernten epiretinalen Membranen und inneren Grenzmembranen von 26 Augen von 26 Patienten mit Schicht- und Pseudofoamen untersucht. Die Operationen wurden im Zeitraum von Januar 2011 bis März 2013 von erfahrenen Ophthalmochirurgen an der Augenklinik der LMU München durchgeführt. Die Diagnose Schicht- oder Pseudofoamen wurde nach Sichtung aller OCT-Bilder präoperativ von einem Oberarzt gestellt. Die Empfehlung zur Operation wurde abgegeben bei Beeinträchtigung der subjektiven Lebensqualität des Patienten durch Metamorphopsien oder fortschreitender Visusverschlechterung. Retrospektiv wurden die OCT-Bilder durch drei Untersucher reevaluiert und die endgültige Diagnose festgelegt. Das gepeelte Material von 12 Schicht- und 14 Pseudofoamina wurde im histopathologischen Labor derselben Klinik im Zeitraum von März bis November 2014 in Flachpräparation mittels Phasenkontrast-, Interferenz- und Immunfluoreszenzmikroskopie sowie in Serienschnittpräparation mittels Immunelektronenmikroskopie analysiert und fotografisch dokumentiert. Ein kontaminiertes Präparat wurde von der Studie ausgeschlossen, sodass zur Auswertung das Material von 11 Schicht- und 14 Pseudofoamina verblieben.

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Ludwigs-Maximilian-Universität bewilligt und im Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Patienten gaben ihre informierte Zustimmung (informed consent) zur Teilnahme an der Studie.

3.2 Befundung der optischen Kohärenztomographie

Die Diagnosen Schicht- oder Pseudofoamen wurden vor der Indikation zur Vitrektomie mit Peeling der ERM von einem erfahrenen Oberarzt der Augenklinik der LMU München gestellt. Die Validierung der Diagnosen und die genaue Klassifikation der epiretinalen Membranen in traktive oder atypische (=LHEP) epiretinale Membran wurde retrospektiv von Prof. Dr. med. Ricarda Schumann, Dr. med. Denise Vogt und mir vorgenommen. Hierfür wurde jedes Bild aus dem Satz der präoperativen OCT-Untersuchung (Spectralis OCT, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland) unter der Verwendung des Heidelberg Eye Explorers (Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet.

Das Schichtforamen wurde diagnostiziert, wenn der foveale Defekt die Kriterien von Duker et al. erfüllte: 1. Unregelmäßige foveale Kontur. 2. Riss der inneren Fovea. 3. Intraretinale Spaltbildung zwischen inneren und äußeren Netzhautschichten. 4. Fehlen eines durchgreifenden Defekts bei intakten Photorezeptoren im Bereich des fovealen Defekts (Duker et al. 2013).

Die Diagnose Pseudofoamen wurde gestellt, wenn die Fovea folgenden Merkmale aufwies: 1. Verdickte Parafovea. 2. Epiretinale Membran welche die Fovea ausspart. 3. Steil aufgestellte Fovea mit normaler oder fast-normaler zentralen Dicke. 4. Kein Substanzverlust in der Fovea (Duker et al. 2013; Haouchine et al. 2004).

Eine homogene, hyperreflektive Bande auf der ILM mit Faltenbildung wurde als traktive Membran klassifiziert; eine inhomogene, hyporeflektive Bande auf der ILM wurde als LHEP-Membran klassifiziert, entsprechend vorherigen Publikationen (Parolini et al. 2011; Pang et al. 2014; Pang et al. 2015; Schumann et al. 2015). Anhand der präoperativen OCT-Untersuchung wurde außerdem der Glaskörperstatus (Status der Abhebung, ggf. Adhäsion) nach Sebag & Johnson erhoben (Sebag 2004; Johnson 2005).

3.3 Chirurgisches Vorgehen und Materialgewinnung

Die Vitrektomie ist ein standardisiertes Operationsverfahren der Ophthalmochirurgie, das neben der Therapie von epiretinalen Membranen bei Schicht- und Pseudofoamen, bei vielen weiteren Krankheiten Anwendung findet. Andere Indikationen sind Glaskörperblutung, proliferative diabetische Retinopathie, komplizierte Ablatio retinae, Perforationstrauma, proliferative Vitreoretinopathie und schwerwiegende Infektion des Glaskörpers (Endophthalmitis)(Grehn 2012; Spraul & Lang 2014).

Die Operation erfolgt in Rückenlage und meist in Lokalanästhesie. Der Operateur sitzt oberhalb des Kopfes und blickt mittels Mikroskop durch die Pupille des Patienten auf die Netzhaut. Zwei Lidspanner halten das Auge offen, die Hornhaut wird gegen Austrocknung regelmäßig beträufelt. Der Zugang zum Glaskörper im Augeninneren erfolgt über drei Trokare von 23 Gauge (= 0,6mm) Außendurchmesser, die in Inzisionen temporal und nasal oben sowie temporal unten 3,5 - 4 mm hinter dem Limbus (Übergang von Hornhaut in die Sklera) gesetzt werden. An dieser Stelle perforieren sie die Pars plana des Ziliarkörpers, weshalb die Operation auch Pars-Plana-Vitrektomie (ppV) genannt wird. Die Pars plana ist der schonendste und sicherste Zugang zum Augeninneren. Über die beiden oberen Trokare werden eine Lichtquelle und das Vitrektom eingebracht und geführt. Das Vitrektom ist ein Schneide-Aspirationsgerät – ein Rohr mit meist seitlicher Saugöffnung, in dem ein weiteres Rohr oszilliert. Angesaugte Glaskörpersubstanz wird vom Vitrektom zerkleinert und

schließlich abgesaugt. An den unteren Trokar ist ein Infusionsschlauch angeschlossen, über den kontinuierlich Kochsalzlösung (buffered saline solution, BSS) eingefüllt wird, damit das Auge während der Operation tonisiert bleibt. Für einen sicheren Sitz wird der Schlauch per Naht fixiert (Grehn 2012; Burk & Burk 2014).

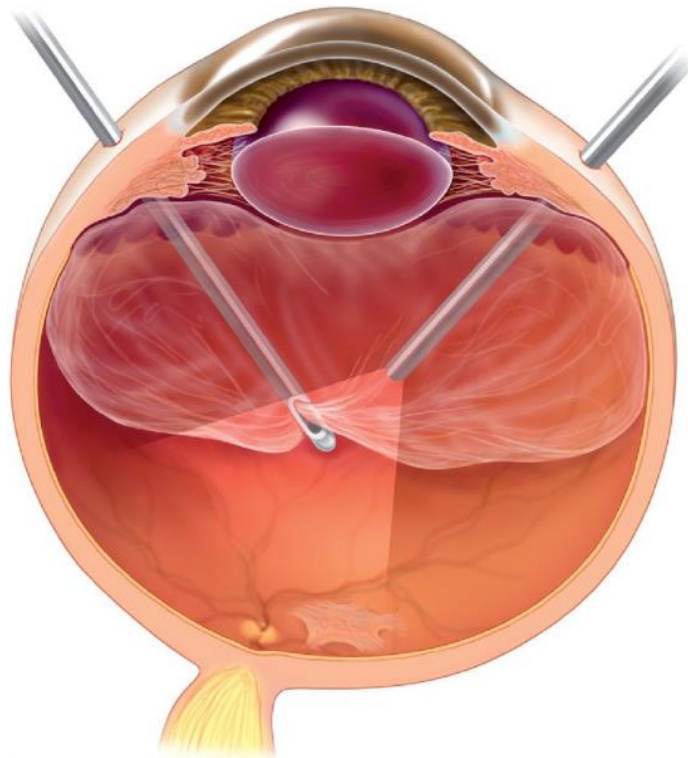


Abbildung 23: Entfernung des Glaskörpers mittels Vitrektom sowie Endoillumination des Auges mittels fiberoptischer Lichtquelle. Der dritte Trokar mit dem Infusionsschlauch ist nicht dargestellt. (Schemazeichnung aus: Spraul, C. & Lang, G., 2014. Operative Therapie: Vitrektomie, in: Lang, G., Esser, J. Gareis, O. (Hrsg.), *Augenheilkunde*, 5. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S.220, Abb. 11.9a)

Nach Austausch des Glaskörpers durch Kochsalzlösung wird das Vitrektom herausgezogen und eine feine Greifzange eingebracht. Mit dieser werden epiretinale Membran und innere Grenzmembran von der Netzhaut um die Fovea herum abgezogen, etwa in 1,5-fachem Papillendurchmesser. Gegebenenfalls kann der Operateur die ILM zu besserer Darstellung mit Brillantblau anfärben (Schumann et al. 2010). Die unphysiologische epiretinale Membran beschränkt sich auf die Makula und ließe sich theoretisch als Ganzes abziehen, die ILM hingegen ist eine durchgängige anatomische Schicht der Netzhaut. Im Optimalfall erfolgt das Peeling sequentiell, in der Praxis jedoch häufig in einem Arbeitsgang, da sich die Membranen erfahrungsgemäß nicht immer voneinander trennen lassen. Aus diesen Gründen erhält der Operateur beim Peeling genau genommen keine ganze Membran, sondern nur Teilstücke der ILM und auch der ERM.

Für anschließende Laboruntersuchungen werden die Membranstücke zur Fixierung in ein beschriftetes Probengefäß mit gepufferter 2% Paraformaldehyd-Lösung (vgl. **Abschnitt 3.7.2, Tab.9**) gegeben.

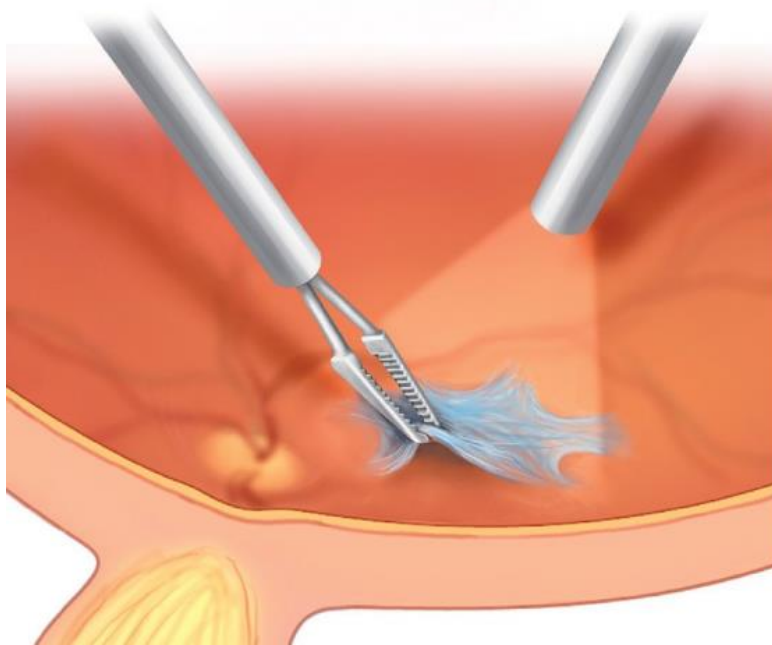


Abbildung 24: Peeling der epiretinalen Membran mittels Eckart-Pinzette. (Schemazeichnung aus: Spraul, C. & Lang, G., 2014. Operative Therapie: Vitrektomie, in: Lang, G., Esser, J. Gareis, O. (Hrsg.), *Augenheilkunde*, 5. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S.220, Abb. 11.9c)

Bei allen Patienten wurde eine 23-Gauge Pars-plana-Vitrektomie mit sequentiellem Peeling der ERM und ILM durchgeführt. 4 der 25 Patienten waren bereits pseudophak, bei 19 der übrigen 21 Patienten wurde in derselben Sitzung eine Vorderkammerlinse implantiert. Als Tamponademedium wurde ein Luft-Gas-Gemisch (15% C₂F₆), Luft oder BSS verwendet. Die Patienten wurden dazu angehalten postoperativ zwei Tage lang in Bauchlage, beziehungsweise möglichst mit dem Gesicht nach unten zu verweilen.

3.4 Flachpräparation mit Zellkernfärbung für Phasen- und Interferenzkontrastmikroskopie

Die Flachpräparation hat seit ihrer Einführung durch Hisatomi et. al die konventionelle Serienschnittpräparation Aufbereitungstechnik der ILM verdrängt, da sie ihr in mehreren Punkten überlegen ist (Hisatomi et al. 2005; Hisatomi 2006). Jede Membran, beziehungsweise jedes Teilstück davon, wird hierfür unter dem Lichtmikroskop aus dem Probengefäß gefischt, auf einem Objektträger

mit sehr dünnen Nadeln ausgebreitet und steht anschließend für die verschiedenen mikroskopischen und immunhistologischen Untersuchungen zur Verfügung. Aufgrund der Aufsicht auf das Präparat, kann die Fläche und Zellzahl bestimmt, sowie die Verteilung von Zellen und Antigenen über das gesamte Präparat beurteilt werden. Schnittpräparate hingegen, zeigen nur einen nicht-repräsentativen Ausschnitt des Ganzen (Gandorfer et al. 2009a).

Hisatomi et. al untersuchten ILM-Flachpräparate mittels Licht- und Fluoreszenzmikroskopie; die Arbeitsgruppe um Arnd Gandorfer erweiterte die Methoden für eine höhere Detailgenauigkeit um Phasen- und Interferenzkontrastmikroskopie; Ricarda Schumann führte an flach präparierten ILM erstmals die Bestimmung der Zellviabilität durch (Hisatomi et al. 2005; Hisatomi 2006; Gandorfer et al. 2009a; Gandorfer et al. 2009b; Schumann et al. 2011). Die Phasenkontrastmikroskopie ermöglicht bei dünnen, lichtdurchlässigen Präparaten die Darstellung der Innenstruktur. Die Interferenzkontrastmikroskopie stellt die Oberfläche des Präparats besonders plastisch dar, wie bei einem Relief (**vgl. Abb. 26 E und F**). Anfangs als Präparationstechnik für die innere Grenzmembran angewandt, hat sich die Flachpräparation auch für epiretinale Membranen als praktikabel erwiesen (Parolini et al. 2011). Für die oben genannte Fluoreszenzmikroskopie beispielsweise, können die üblichen Protokolle der Immunhistologie unverändert angewandt werden (Gandorfer et al. 2009b).

Die erste Sichtung der Membranstücke beinhaltete den Ausschluss von Verunreinigungen und Fremdpartikeln, die Beurteilung der Zellverteilung sowie die Messung der Zellzahl und der Gesamtfläche. Dies erfolgte in Flachpräparation unter dem Auflicht-, Phasenkontrast- und Interferenzkontrastmikroskop.

Die Membranstücke wurden unter dem Stereomikroskop (Leica MS5, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar) mit einer feinen Nadel aus dem Probengläschen gefischt. Die Nadel hatten wir durch Erhitzen und Auseinanderziehen eines dünnen Glasröhrchens über dem Bunsenbrenner selbst hergestellt. Die Membranstücke wurden in eine 12-Loch-Mikrotiterplatte in 70-100µl PBS gegeben und auf dem Shaker für 10 Minuten geschwenkt. Dieser Vorgang wird als „Waschen“ bezeichnet. Anschließend wurden sie unter dem Stereomikroskop auf einem Objektträger in einem Tropfen DAPI (DAPI, SCR-038448; Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) flach ausgebreitet und mit einem Deckglas versehen. DAPI ist ein gängiger Fluoreszenzfarbstoff, der Zellkerne anfärbt, anhand derer sich die Zellzahl in übersichtlicher Weise bestimmen lässt und hier zugleich als Trägermedium fungiert.

Das gesamte Präparat wurde unter dem Mikroskop (Leica DM 2500; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) in 50- und 200-facher Vergrößerung gesichtet. Phasen- und Interferenzkontrast sowie die fluoreszierenden Zellkerne wurden durch entsprechende Einstellungen am Gerät dargestellt. Die Fotodokumentation erfolgte mittels angeschlossener Kamera (ProgRes CF; Jenoptik AG, Jena, Deutschland). Anschließend wurden die Membranen vom Objektträger gelöst und

zur Fixierung bis zur weiteren Untersuchung wieder in das Probengefäß mit PFA gegeben. Mittels Bildverarbeitungsprogrammen wurde die Gesamtfläche (Photoshop CS6; Adobe Systems Software Ireland Ltd., Dublin, Irland), die Zellzahl (Image J; <http://www.imagej.net>, Wayne Rasband) und daraus die Zelldichte der gepeelten Membranen errechnet.

3.5 Flachpräparation für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Der laborchemische Nachweis von Zellen und Proteinen der extrazellulären Matrix, welcher Aufschluss über die Pathogenese von traktiven wie Schichtforamen-assoziierten epi-retinalen Membranen geben soll, erfolgt nach klassischen Methoden der Immunhistologie, die auf flach präparierte ERM und ILM angewandt werden.

Die in der Probe nachzuweisende Struktur ist das Antigen. Gegen dieses humane Antigen gerichtet ist ein mono- oder polyklonaler Antikörper, der in anderen Spezies gezüchtet wird, vornehmlich Mäusen, Ratten, Kaninchen, und weiteren. Gibt man den Antikörper auf die Probe, dockt er an das Antigen nach dem sogenannten „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ an und bildet den Antigen-Antikörper-Komplex. Ist der Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, wird unter dem Fluoreszenzmikroskop die Zielstruktur sichtbar, weil der Farbstoff dort akkumuliert, wo sich viele Antigen-Antikörper-Komplexe bilden. Dieses Verfahren nennt sich direkte Immunfluoreszenz.

Da es sehr viele verschiedene Antigene und komplementäre Antikörper gibt, ist aus praktischen und wirtschaftlichen Gründen die indirekte Immunfluoreszenz gebräuchlicher. Hierbei werden zwei Antikörper eingesetzt. Der Primärantikörper ist gegen das nachzuweisende Antigen der Probe gerichtet. Der Sekundärantikörper trägt den Fluoreszenzfarbstoff und ist gegen den konstanten Teil (Fc-Fragment) des Primärantikörpers gerichtet. Der konstante Teil ist bei den Antikörpern einer Spezies (z.B. Maus, Ratte, Kaninchen) gleich, daher passt ein Sekundärantikörper auf mehrere Primärantikörper. Um mehrere Antigene in einem Versuchsansatz zu untersuchen, setzt man Paare von Primär- und Sekundärantikörpern unterschiedlicher Spezies ein, unter der Verwendung von verschiedenfarbig fluoreszierenden Sekundärantikörpern.

Die Immunelektronenmikroskopie ist eine erweiterte Anwendung des immunologischen Antigennachweises. Das Elektronenmikroskop arbeitet nicht mit Licht, deshalb sind die Antikörper nicht mit Fluoreszenzfarbstoff, sondern Nanogoldpartikeln markiert, die sich im Bild als kleine, schwarze Punkte darstellen. Das Antigen wird entsprechend nicht mittels Intensität von Fluoreszenz, sondern mittels Aggregation der schwarzen Punkte nachgewiesen.

Für die immunhistologische Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden die größten Membranstücke unter dem Stereomikroskop erneut aus dem Probengefäß gefischt und auf einem

Objektträger flach präpariert, dieses Mal jedoch mit einem Tropfen PBS als Trägermedium. Kleinere Stücke wurden für eventuelle Nachuntersuchungen im Gläschen belassen. Die Membranstücke auf dem Objektträger wurden anschließend in fünf möglichst gleich große Stücke zerteilt und jeweils in ein gesondertes Nöpfchen einer 12-Loch-Mikrotiterplatte mit einem Tropfen PBS gegeben. An vier Teilen wurden die immunhistologischen Nachweise geführt, das Fünfte diente als Negativkontrolle. Eventuelle Reste auf dem Objektträger wurden wieder ins Probengefäß gegeben.

Nach zweimaligem Waschen für zehn Minuten in 0,1 M PBS wurden 100µl 0,1% Pepsin zur enzymatischen Demaskierung zugegeben. Dabei wird die Antigen-Antikörper-Reaktion verstärkt. Zwischen allen Arbeitsschritten wurde das alte Reagenz ohne das Membranstück mit einer Mikrotitrierpipette abgesaugt, „abgezogen“. Nach zehn Minuten Reaktionszeit bei Raumtemperatur wurde zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde zum Blocken unspezifischer Reaktionen für zwei bis drei Stunden mit auf 1:20 verdünntem Normalserum (Esel) in PBTA (0,1M PBS; 0,5% BSA; 0,1% Triton™ X-100, und 0,1% Natriumazid) bei Raumtemperatur inkubiert.

Im nächsten Schritt wurden die Primärantikörper appliziert. Hierbei kam pro Membranstück eine Kombination von drei aus insgesamt zehn Primärantikörpern zum Einsatz, je einer der Spezies Kaninchen, Maus und Ziege à 2µl verdünnt mit 94µl PBT, sodass sich eine Verdünnung von 1:50 ergab.

Für den Nachweis von Gliazellen verwendeten wir anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein), für Hyalozyten anti-CD45 und anti-CD64, für Myofibroblasten anti-α-SMA (α-smooth muscle antigen), und für den Nachweis extrazellulärer Matrix die Antikörper anti-Kollagen Typ I, Typ II und Typ III.

Für die Negativkontrollen wurden alle drei Primärantikörper weggelassen und stattdessen nur 100µl PBT eingefüllt. Alternativ wurden zwei weggelassen und ein Primärantikörper zur Isotypenkontrolle mit einem der in **Tab. 8 (vgl. Abschnitt 3.7.1)** gelisteten Immunglobuline ersetzt, in derselben Verdünnung von 1:50: 2µl Antikörper auf 98µl PBT. Das weitere Verfahren war für alle Membranstücke gleich.

Tabelle 1: Zielstrukturen der verwendeten Antikörper

Antigen	Lokalisation
CD45	Hyalozyten
CD64	Hyalozyten
α-SMA	Aktin der Myofibroblasten
GFAP	Gliazellen (Müllerzellen, Astrozyten, Mikroglia)
Kollagen I	neu gebildetes Kollagen
Kollagen II	natives Glaskörperkollagen
Kollagen III	etabliertes Kollagen der Extrazellulärmatrix

Nach einer Inkubationszeit von mindestens 12 Stunden wurde am folgenden Tag zweimal mit PBS zehn Minuten gewaschen. Die Waschgänge dienen dazu überschüssige Antikörper und Reagenzien zu

entfernen um ein möglichst präzises Ergebnis zu erhalten. Es folgte die Applikation der Sekundärantikörper. Komplementär zu den Spezies der Primärantikörper wurden pro Membranstück die drei Sekundärantikörper anti-Kaninchen, anti-Maus und anti-Ziege appliziert, je à 1µl, gelöst in 97µl PBS, entsprechend einer Lösung von 1:100. Markiert waren sie mit den Fluoreszenzfarbstoffen AlexaFluor®488 (AlexaFluor®488-anti-Kaninchen), Indocarbocyanin 3 (Cy3-anti-Maus) und Indodicarbocyanin (Cy5-Anti-Ziege). AlexaFluor488 ist eine Variante des in der Histologie bekannten Fluoreszenzfarbstoffs Cy2. Alternativ zu AlexaFluor488-anti-Kaninchen und Cy3-anti-Maus setzten wir bei jedem der Membranstücke je einmal entweder AlexaFluor®546 oder Fluorescein ein. Diese fluoreszieren praktisch im selben Frequenzspektrum wie AlexaFluor®488 (Fluorescein) und Cy3 (AlexaFluor®546) und sind zusätzlich mit Nanogold-Partikeln (FluoroNanogold® „FNG“) versehen. Das macht sie zu einer praktischen 2-in-1 Lösung für die Immunfluoreszenz und die sich später anschließende Immunelektronenmikroskopie.

Tabelle 2: Fluoreszenzfarbstoffe und ihre charakteristischen Spektren

Farbstoff	Frequenzspektrum	
AlexaFluor488 „Cy2“	Absorptionsmaximum	493nm
	Emissionsmaximum	519nm
Fluorescein	Amax.	494nm
	Emax.	518nm
Cy 3, Indocarbocyanin	Amax.	550nm
	Emax.	570nm
AlexaFluor546	Amax.	556nm
	Emax.	573nm
Cy 5, Indodicarbocyanin	Amax.	650nm
	Emax.	670nm

Das Applikationsschema der Antikörperkombinationen ist in **Tabelle 4** aufgezeigt

Nach zweistündiger Inkubation folgten zwei weitere Waschgänge in PBS à zehn Minuten, dann die sogenannte Postfixierung mit 2% Glutaraldehyd für fünf Minuten zur Steigerung der Haltbarkeit von Probe und Antigen-Antikörper-Komplex und schließlich noch zwei zehnminütige Waschgänge in PBS. Zuletzt wurden die Membranstücke aus der Mikrotiterplatte genommen, jedes auf einem eigenen beschrifteten Objektträger in einem Tropfen DAPI flach präpariert und mit einem Deckglas versehen.

Es folgte das Mikroskopieren und die Fotodokumentation am Fluoreszenzmikroskop Leica DM 2500 in 100-facher Vergrößerung für Übersichtsaufnahmen und 400-facher Vergrößerung für Details. Zusätzlich wurden erneut Aufnahmen der Zellkerne sowie Phasen- und Interferenzkontrastaufnahmen angefertigt, um die immunhistochemischen Funde mit der lichtmikroskopischen Struktur des Präparats zu korrelieren und eventuelle Artefakte oder Verschmutzungen besser erkennen zu können.

Tabelle 3: Protokoll zur Aufbereitung der Membranen für die Immunfluoreszenzmikroskopie

Arbeitsschritt	Reagens	Inkubationszeit
Waschen	0,1M PBS	10min
Enzymatische Antigendemaskierung	1% Pepsin in 0,1M PBS	10min
2x Waschen	0,1M PBS	2x 10min
Blockieren unspezifischer Antikörperbindung	PBTA	2-3h
Primärantikörper - Applikation & Inkubation	Dreifachkombination von Primärantikörpern in PBTA	12h
2x Waschen	0,1M PBS	2x 10min
Sekundärantikörper – Applikation & Inkubation	Cy2/ Fluorescein+FNG, Cy3/ Alexaflour 546+FNG, Cy5 – jeweils in PBS	1-2h
2x Waschen	0,1M PBS	2x 10min
Postfixierung	2% Glutaraldehyd	5min
2x Waschen	0,1M PBS	2x 10min

Temperatur bei Inkubation ist wenn nicht anders angegeben Raumtemperatur.

Die Auswertung der Fotografien am Fluoreszenzmikroskop erfolgte durch Prof. Dr. med. Ricarda Schumann, Dr. med. Denise Vogt und mich. Wir stuften die Intensität der Immunreaktion respektive der Fluoreszenz ein in: „stark positiv ++“, „positiv +“, „schwach (+)“ und „keine -“. Die Negativkontrollen und Bereiche ohne Immunreaktion dienten dabei als Referenz. Grenzfälle wurden mit der nächstniedrigeren Intensität bewertet.

Tabelle 4: Applikationsschema der Antikörperkombinationen

		1.AK	2.AK	1.AK	2.AK	1.AK	2.AK
	Spezies	Maus	Anti Maus	Kaninchen	Anti Kaninchen	Ziege	Anti Ziege
		Ziel	Farbstoff	Ziel	Farbstoff	Ziel	Farbstoff
Membranstück							
1		α SMA	Cy3	GFAP	Fluorescein FNG	Koll1	Cy5
2		CD 45	AlexaFluor546 FNG	CD64	AlexaFluor488	GFAP	Cy5
3		CD 64	Cy3	Koll3	AlexaFluor488	CD45	Cy5
4		α SMA	Cy3	Koll2	Fluorescein FNG	CD45	Cy5

Membranstück 5 diente der Negativkontrolle. Antikörper für die Isotypenkontrolle sind in **Tabelle 8 (vgl. Abschnitt 3.7.1)** angeführt.

3.6 Serienschmittpräparation für Immunelektronenmikroskopie und ultrastrukturelle Analyse

Im Anschluss kamen die beschrifteten Objektträger für ein paar Stunden in die „feuchte Kammer“, eine Schachtel, in der am Boden neben den Objektträgern nasse Zellstofftücher ausgelegt waren. Die hohe Luftfeuchtigkeit in dem geschlossenen Behältnis verhindert das Austrocknen der Membranen und erleichtert das Ablösen des Deckglases vom angetrockneten DAPI Mounting Medium. Unter dem Stereomikroskop wurde an die Deckgläser ein paar Tropfen PBS gegeben bis sie leicht zu entfernen waren, schließlich die Membranen abgenommen und zum Waschen für zehn Minuten in PBS in beschriftete Rollrandgläser gegeben. Alle nachfolgenden Arbeitsschritte wurden soweit nicht anders angegeben in diesen Gefäßen durchgeführt; das alte Reagenz wurde zwischen den Schritten abgezogen. Auf das Waschen folgte die Postfixierung mit 2% Glutaraldehyd in 0,1 M PBS für fünf Minuten.

Das mit den Sekundärantikörpern applizierte FluoroNanogold® wurde gemäß den Herstellervorgaben „verstärkt“, eine chemische Vergrößerung der Goldpartikel von 1,4 nm auf 3-20 nm:

Überschüssige Aldehyde wurden mit einer PBS-Lösung dreimalig für fünf Minuten und zweimal mit Aqua bidest. je fünf Minuten gewaschen. Die Verstärkung von Fluoronanogold® mit dem GoldEnhance™EM-Kit von Nanoprobes® erfolgte mit den mitgelieferten Lösungen „A“ – „D“ des Herstellers. Hierzu wurde unter dem Abzug je 10µl der Verstärkerlösung A mit der Aktivatorlösung B (positiver Effektor) vermischt, nach einer Wartezeit von zehn Minuten die gleiche Menge Initiatorlösung C und Pufferlösung D hinzugegeben. Mit einem weiteren fünfminütigen Waschgang in Aqua dest. war die Goldverstärkung abgeschlossen. Die weitere Vorbereitung für die Elektronenmikroskopie erfolgte entsprechend dem Standardprotokoll des Labors für die Einbettung in Epoxidharz.

Die Membranstücke wurden für eine Stunde in Dalton-Fixans (2% Osmiumtetroxid, mit Kaliumdichromat gepuffert) inkubiert. Das enthaltene Osmium fixiert vor allem Lipide, und bewirkt eine bessere Kontrastierung in den EM-Aufnahmen. Aufgrund seiner Toxizität und Flüchtigkeit fanden alle Arbeiten unter dem Abzug statt. Nach zwei Waschgängen à zehn Minuten in PBS wurden die Präparate noch einmal für eine Stunde mit 2% Uranylacetat fixiert und blockkontrastiert, und schließlich mit Ethanol in einer Reihe aufsteigender Konzentrationen dehydriert, von 70% bis 100% Ethanol in 10% Schritten für jeweils fünf Minuten.

Mit 100% Propylenoxid als Zwischenmedium wurde zweimalig für 15 Minuten inkubiert. Zur Infiltration der Epoxidharze wurden die Membranstücke für eine Stunde bei Raumtemperatur in eine Mischung von Propylenoxid und Einbettmedium („Epon“) im Verhältnis 1:1 gegeben. Für leichtere

Handhabung wurden die viskösen Medien auf 30°C erwärmt. Dieser Schritt wurde wiederholt mit einem Verhältnis von 1:2, inkubiert wurde über Nacht. Das Einbettmedium wurde für jede Anwendung aus 9 ml der Lösung A und 21 ml der Lösung B von und 0,6ml des Beschleunigers DMP-30 angemischt. Die Lösungen A und B waren im Vorfeld aus Glycidether-100 (\cong EPON®812) und den Härtern DDSA bzw. MNA angemischt worden (**vgl. Abschn. 3.7.2, Tab. 9**). Mit einem Glasspatel wurde das Membranstück in einem Tropfen der zähen Lösung aus dem Rollrandglas gehoben und in eine mit reinem Epon gefüllte Silikonmatrize gelassen. In der Matrize wurde die Probe für den Serienschnitt positioniert und orientiert. Zur Beschriftung wurde noch ein klein bedruckter Schnipsel Papier in ausreichendem Abstand zur Probe eingelassen. Für vier Stunden wurde bei Raumtemperatur in reinem Epon inkubiert, um eventuelle Luft einschüsse entweichen zu lassen. Es folgte die Polymerisation des Einbettmediums im Inkubator bei 60°C für mindestens 24 Stunden. Anschließend wurden die einzelnen Förmchen herausgelöst, mit einem Skalpell getrimmt und am Ultramikrotom Leica R mit einem Diamantmesser geschnitten. Zur orientierenden Sichtung der Präparate wurden zunächst 1 μ m starke Semi-Dünnschnitte angefertigt. Diese wurden auf einen Objektträger gezogen, zur Anfärbung mit einer wässrigen Lösung mit 2% Toluidinblau und 2% Natrium-Borax betropft und daraufhin unter dem Diskussionsmikroskop (Carl Zeiss 4724108) begutachtet. Von geeigneten Präparaten wurden 60 nm starke Ultradünnschnitte angefertigt und unter selbigem Lichtmikroskop auf Kupfergrids positioniert.

Abschließend wurde ein weiteres Mal mit Schwermetallsalzen kontrastiert. Die Grids wurden mit 2% Uranylacetat betropft, 15 Minuten inkubiert, mit Aqua bidest. gespült. Danach wurde 2,6% Bleicitrat aufgetropft, zehn Minuten inkubiert, mit Aqua bidest. gespült und für schließlich für mehrere Stunden an der Luft getrocknet. Beide Lösungen der Schwermetallsalze waren zentrifugiert und filtriert worden.

Unter dem Transmissionselektronenmikroskop Zeiss EM 900 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) wurden die Präparate bei 3000- bis 12000-facher Vergrößerung systematisch abgesucht, analysiert und fotodokumentiert.

Tabelle 5: Protokoll zur Aufbereitung der Membranen für die Elektronenmikroskopie

Arbeitsschritt	Reagens	Inkubationszeit
Postfixierung	2% Glutaraldehyd in 0,1M PBS	2h
3x Waschen	0,1M PBS	3x 5min
2x Waschen	Aqua bidest.	2x 5min
Goldverstärkung	Lösung „A“-„D“ GoldEnhance™EM-Kit	10min
Waschen	Aqua dest.	5min
Osmierung	Dalton-Fixans	1h
2x Waschen	0,1M PBS	2x 10min
Postfixierung, Kontrastierung	2% Uranylacetat	1h
Dehydratation	70% Ethanol	5min
	80% “	5min
	90% “	5min
	100% “	5min
Dehydratation, Vorbereitung zur Einbettung	100% Propylenoxid	2x 15min
Infiltration	Propylenoxid + Epon, Verhältnis 1:1	1h
	Propylenoxid + Epon, Verhältnis 1:2	12h
Einbettung	100% Epon*	4h
Polymerisation, Aushärtung	100% Epon	>24h bei 60°C
Trimmen & Semidünnschnitt		~
Koloration	2% Toluidinblau + 2% Na-Borax	~
Ultradünnschnitt		~
Kontrastierung	2% Uranylacetat	15min
Spülen	Aqua bidest	
Kontrastierung	2,6% Bleicitrat (nach Reynolds)	10min
Spülen	Aqua bidest.	
Trocknen		>4h

*Epon ist die gebräuchliche Bezeichnung für das Einbettmedium.

Temperatur bei Inkubation ist wenn nicht anders angegeben Raumtemperatur.

Die Auswertung der Fotografien am Elektronenmikroskop erfolgte durch Prof. Dr. med. Ricarda Schumann, Dr. med. Denise Vogt und mich. Neben der Ultrastruktur der Membranen wurde auch die Immunreaktion mit FluorNanogold beurteilt, mit dem Ziel fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Aufnahmen zu korrelieren.

3.7 Material/Materialien

3.7.1 Antikörper

Tabelle 6: Primärantikörper

Antikörper (Klonalität)	Hersteller	Registriernummer (SKU)
Maus-IgG _{2a} -anti-smooth-muscle-actin (SMA) (mono)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland	sc-130617
Maus-IgG ₁ -anti-CD45 (mono)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland	sc-20056
Maus-IgG ₁ -anti-CD64 (mono)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland	sc-1184
Kaninchen-IgG-anti-gliial-fibrillary-acidic-protein (GFAP) (poly)	(Dako) Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland	Z 0334
Kaninchen-IgG-anti-CD64 (poly)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland	sc-15364
Kaninchen-IgG-anti-Kollagen II A1 (poly)	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim, Deutschland	2150-0060
Kaninchen-IgG-anti-Kollagen III A1 (poly)	Bio-Rad AbD Serotec GmbH, Puchheim, Deutschland	2150-0100
Ziege-IgG-anti-Kollagen I A1 (poly)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland	sc-25974
Ziege-IgG-anti-GFAP (poly)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland	sc-6170
Ziege-IgG-anti-CD45 (poly)	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland	sc-1123

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Antikörper (Klonalität)	Hersteller	Registriernummer (SKU)
Ziege-F(ab')-anti-Maus-IgG-FluoroNanogold-AlexaFluor546 (poly)	Nanoprobes Inc. Yaphank, NY, USA	7402
Esel-IgG-anti-Maus-IgG-Cy3 (poly)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	715-165-150
Esel-IgG-anti-Kaninchen-IgG-AlexaFluor488 (poly)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	711-485-152
Ziege-F(ab')-anti-Kaninchen-IgG-FluoroNanogold-Fluorescein (poly)	Nanoprobes Inc. Yaphank, NY, USA	7004
Esel-IgG-anti-Ziege-IgG-Cy5 (poly)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	705-175-003

Tabelle 8: Antikörper der Isotypkontrolle

Antikörper (Klonalität)	Hersteller	Registriernummer (SKU)
Maus IgG (poly)	(GeneTex) BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland	35009
Maus IgG ₁ (mono)	(DAKO) Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland	X0931
Maus IgG _{2a} (mono)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	M5409
Maus IgG _{2a} (mono)	(DAKO) Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co. KG, Hamburg, Deutschland	X0943
Kaninchen IgG	(GeneTex) BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland	35035

3.7.2 Puffer und Reagenzien

Tabelle 9: Herstellung verwendeter Puffer und Reagenzien

„2% Paraformaldehyd“ (2% Paraformaldehyd; 0,1% Glutaraldehyd)	Paraformaldehyd 0,1M PBS Bei max. 79°C unter Rühren auflösen 25% Glutaraldehyd 0,1 M PBS	1g 20ml 400µl ad 50g
1% Pepsin	Pepsin 0,1 M PBS	10µg ad 1g
6% BSA	BSA 0,1m PBS	1,2g 18,8g
PBTA (phosphate buffered triton azide)	0,1 M PBS 0,5% BSA 0,1% Triton X-100 0,1% Na-Azid	100ml 500µg 100µl 100mg
2% Glutaraldehyd	25% Glutaraldehyd 0,1M PBS	8ml ad 100ml
2% Osmium	Osmiumtetroxid 0,1M PBS 12h ruhen lassen	1g 49g
Kalilauge (5N KOH)	KOH Aqua bidest.	28g 72g
4% Kaliumdichromat-KOH Puffer	K ₂ Cr ₂ O ₇ Aqua dest. 5N KOH bis pH 7,4 zugeben Aqua bidest.	4g 80ml 6-8ml ad 100g

Dalton-Fixans	2% Osmium 4% K ₂ Cr ₂ O ₇ -KOH Puffer 3,4% NaCl 1% CaCl ₂ Aqua bidest.	15ml 7,5ml 3ml 3ml 1,5ml
2% Uranylacetat	Uranylacetat•2H ₂ O 0,1M PBS 1 Minute zentrifugieren Überstand abpipettieren und durch 200nm Filterpapier filtrieren	1g 49g
Einbettmedium „Epon“	Lösung A Lösung B DMP-30	9ml 21ml 0,6ml
Lösung A	Glycidether-100 (≙EPON®812) DDSA	62ml 100ml
Lösung B	Glycidether-100 (≙EPON®812) MNA	100ml 89ml
2% Toluidinblau, 2% Na-Borax	Toluidinblau O di-Natriumtetraborat Aqua bidest. Filtration durch Faltenfilter	1g 1g 48g
2,6% Bleicitrat	Bleinitrat Natriumcitrat Aqua bidest. 30 Min Schütteln 1 M NaOH Aqua bidest. 1 Minute zentrifugieren Überstand abpipettieren und durch 200nm Filterpapier filtrieren	1,33g 1,76g 30ml 8ml ad 50ml

3.7.3 Chemikalien

Tabelle 10: Chemikalien, Hersteller und Registriernummer

Chemikalie	Hersteller	Registriernummer (SKU)
„Borax“, di-Natriumtetraborat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	106306
1,2-Propylenoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	807027
Aqua bidest.	Apotheke des Klinikums der Universität München, Innenstadt	
Bleinitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	15334
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	A9647
BSA (bovine serum albumine)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	A9647
DAPI (ImmunoSelect® Anti Fading Mounting Medium; 4',6 Diamidin-2-phenylindol)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	SCR-038448
DDSA (Dodecylsuccininanhydrid)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	20755
DMP-30 (Tris-2,3,6-[dimethylaminomethyl]phenol)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	36975
Ethanol 99,9%, unvergällt	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	100983
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	49626
Glycidether100 (≙EPON®812)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	21045
GoldEnhance™EM-Kit [Lösung A-D nicht näher spezifiziert]	Nanoprobes Inc. Yaphank, NY, USA	2113
Kaliumdichromat K ₂ Cr ₂ O ₇	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	104864
Kaliumhydroxid KOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	105033
Kalziumchlorid CaCl ₂	Apotheke des Klinikums der Universität München, Innenstadt	
MNA (Methyl-Norbornen-2,3-Dicarboxylanhydrid)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	29452
Natriumazid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	S8032
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	S4641
Natriumhydroxid NaOH 1M	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	A6579
Normalserum (Esel)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	017-000-121
Osmiumtetroxid OsO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	124505
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	104005
PBS	Apotheke des Klinikums der Universität München, Innenstadt	
Pepsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	P7000
Toluidinblau O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland	115930
Triton-X	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	X100
Uranylacetat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland	77870

3.7.4 Geräte

Tabelle 11: Geräte und Hersteller

Gerät	Hersteller
Shaker IKA-VIBRAX-VXR	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
„Wobbler“, Vortex Mixer PV-1	Grant Instruments Ltd., Shepreth, England
Inkubator B-30	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Digitale Präzisionswaage Scout Pro SPU202	Ohaus Corp., Parsippany, New Jersey, USA
Stereomikroskop Leica MS5	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lichtmikroskop Leica DM2500	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Digitale Kamera ProgRes CF	Jenoptik AG, Jena, Deutschland
Ultramikrotom Leica R	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Diamantmesser Ultra One Knife 160-136-0004	Drukker International, Cuijk, Niederlande (eingestellt)
Lichtmikroskop Zeiss 4724108	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Elektronenmikroskop Zeiss EM EM900	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Kamera des Elektronenmikroskops Slow-scan CCD-Camera for TEM 2K-Wide-angle, Typ7899	Tröndle Restlichtverstärkersysteme (TRS), Albert Tröndle, Moorenweis, Deutschland
Pipette Eppendorf Research	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.7.5 Software

Tabelle 12: Anwendung, Programm und Anbieter

Anwendung	Programm; Anbieter
Retrospektive Datenerhebung	i.s.h.med; Cerner Health Services GmbH, Deutschland IS-H; SAP SE & Co. KG, Walldorf, Deutschland
OCT Befundung	Heidelberg Eye Explorer; Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bildausgabe Elektronenmikroskopkamera	ImageSP, TRS Tröndle Restlichtverstärkersysteme, Albert Tröndle, Moorenweis, Deutschland
Bestimmung der Zellzahl	Image J; Wayne Rasband, Washington, USA
Bildbearbeitung	Photoshop Creative Suite 6; Adobe Systems Software Ireland Ltd., Dublin, Irland GIMP 2.8.x; http://www.gimp.org

4 Ergebnisse

4.1 Epiretinale Membranen in der optischen Kohärenztomographie

Das epiretinale Gewebe konnte anhand von hoch-auflösender spectral-domain OCT wie folgt zugeordnet werden. Schichtforamen-assoziierte epiretinale Proliferation (LHEP) fand sich bei 3 von 11 Augen mit LMH (27%), sie lag im Randbereich des fovealen Defekts. Eine traktive ERM fand sich bei 3 von 11 Augen mit LMH (27%). Bei 5 der 11 untersuchten Schichtforamina (46%) stellten wir eine Kombination von LHEP und konventioneller ERM fest.

Die epiretinalen Membranen von 14 Augen mit MPH waren alle traktive ERM (100%), ohne Anzeichen von LHEP.

Die Beurteilung des Glaskörperstatus' ergab eine vitreomakuläre Adhäsion bei einem LMH und keinem MPH.

3 LMH und ein MPH wiesen eine partielle PVD auf, bei den restlichen Augen war der Glaskörper komplett abgehoben.

In **Abbildung 25** auf der folgenden Seite sind exemplarisch je vier SD-OCT Befunde von Schicht- und Pseudofoforamina dieser Studie gegenübergestellt:

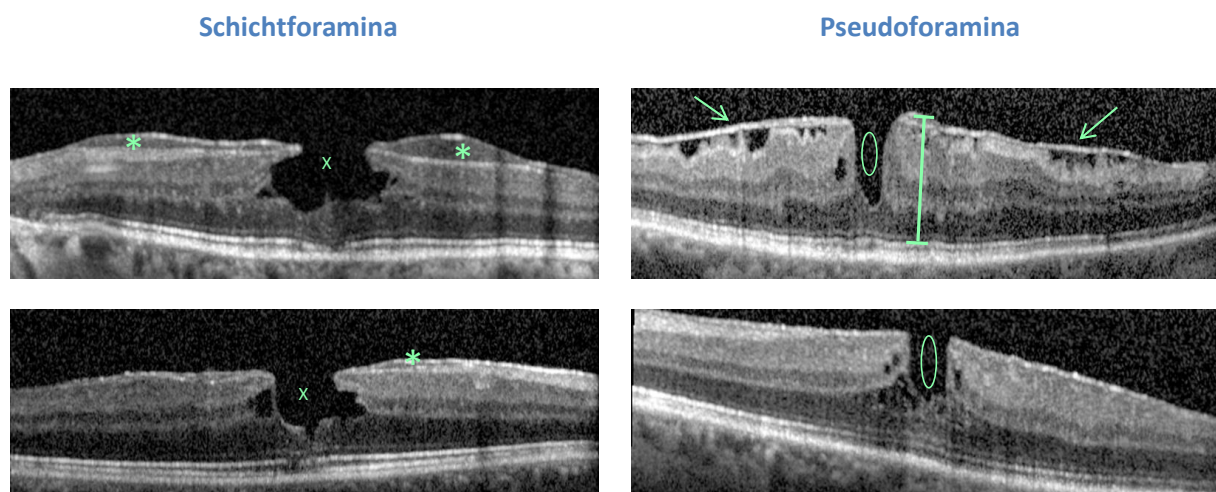


Abbildung 25: Schicht- und Pseudofoforamina dieser Studie in direkter Gegenüberstellung.

Links: Die Schichtforamina zeigen eine unregelmäßige foveale Kontur mit Substanzdefekt **X**. Begleitend finden sich Schichtforamen-assoziierte epiretinale Proliferationen (LHEP) *****.

Rechts: Pseudofoforamina mit steil aufgestellter Fovea, glatter Kontur, ohne Substanzverlust **O**. Die hyperreflektiven traktiven Membranen **N** finden sich bei jedem Pseudofoforamen und sind besonders deutlich über geraffter Netzhaut zu erkennen. Die parafoveale Dicke ist typischerweise erhöht **I**.

4.2 Beobachtungen bei Flachpräparation, Phasen- und Interferenzkontrastmikroskopie

Ein OP-Präparat zeigte bakterielle Kontamination und wurde von der Studie ausgeschlossen, verblieben noch 25 Präparate von 25 Patienten. Ein erster Eindruck der Zellverteilungsmuster konnte gewonnen werden, die genaue Bewertung erfolgte erst nach Anfärben der Zellen mit DAPI (siehe Punkt „Zellzahl und Fläche“).

Membranen, welche anhand der präoperativen OCT als LHEP klassifiziert wurden, waren vergleichsweise dick, von ungleichmäßiger Stärke und wiesen eine herabgesetzte Translumineszenz sowie gelbliche Pigmentierung auf. Zellproliferationen waren leicht zu erkennen. Bei der Ausbreitung und Flachpräparation mit den gläsernen Nadeln unter dem Stereomikroskop fielen sie durch ihre lockere und empfindliche Konsistenz auf. Sie ließen sich mäßig gut entfalten, limitierend war hier die empfindliche Konsistenz.

Traktiv klassifizierte Membranen waren farblos, transparent und von mittlerer Dicke. Zellproliferationen waren leicht zu erkennen. In der Handhabung erwiesen sie sich zähelastisch und robust; limitierend bei der Entfaltung dieser Membranen war die hohe Rückstellkraft der Falten.

Stücke der ILM waren klar transparent, mit spärlichen, versprengten Zellproliferationen sowie von sehr dünner und gleichmäßiger Stärke. Sie waren mehrfach gefaltet, mit auffallend geraden Falzen, wie bei einem Blatt Papier oder einem Laken, stellenweise waren die Stücke eingerollt. Die Handhabung lässt sich mit der von Seidenpapier vergleichen: Falze und Einrollungen mit gewisser Rückstellkraft, das Material selbst unelastisch und kaum widerstandsfähig.

4.3 Zellzahl und Fläche

Aus Fläche und Zellzahl der gepeelten Membranen wurde die Zelldichte errechnet.

Die Zelldichte der Membranen von Augen mit LMH belief sich auf 295 ± 200 Zellen pro mm^2 (Spannweite 91 – 714 Zellen/ mm^2). Bei 9 von 11 Augen dieser Gruppe verteilten sich die Zellen in einer gleichmäßigen Schicht über die Probe. Das Zellverteilungsmuster der übrigen 2 LMH dominierten Zellhaufen.

Präparate von MPH wiesen eine Dichte von 348 ± 255 Zellen pro mm^2 auf (Spannweite 13 – 853 Zellen/ mm^2). Bei 9 von 14 Augen waren die Zellen gleichmäßig und mehrschichtig verteilt, bei 4 von 14 waren sie in Haufen angeordnet. Ein MPH zeigte einzelne, über die ILM verstreute Zellen.

Die unterschiedliche Zelldichte von LMH und MPH war statistisch nicht signifikant.

4.4 Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie

Die immunzytochemische Analyse der flach präparierten Membranen von Schichtforamina ergab eine stark positive Reaktion auf anti-GFAP, anti-CD45 und anti-CD64, sowie anti-Kollagen I und III. Für anti-Kollagen II zeigte sich eine positive Fluoreszenzreaktion. In mehreren Proben zeigten sich anti-CD64, anti-Kollagen I und anti-Kollagen II kolokalisiert mit anti-GFAP.

Augen mit MPH hingegen färbten sich stark positiv auf anti- α -SMA an, sowie positiv auf anti-GFAP, anti-CD45, anti-CD64 und anti-Kollagen I. Anti-CD45 und anti- α -SMA waren häufig kolokalisiert. Intensive α -SMA-Reaktionen zeigten sich bei unseren Präparaten in stark gefalteten Bereichen der Membranen, die sich offenbar nicht flach präparieren ließen. BILD

Keine der Negativkontrollen zeigte eine Fluoreszenz die über die Grundfluoreszenz der ungebundenen Sekundärantikörper hinausging.

Tabelle 13: Ergebnis der Fluoreszenzmikroskopie: Intensität der Immunreaktionen

Antigen	Lokalisation	Intensität der Fluoreszenz	
		LMH	MPH
CD45	Hyalozyten	++	+
CD64	Hyalozyten	++	+
α -SMA	Aktin der Myofibroblasten	(+)	++
GFAP	Gliazellen (Müllerz., Astrozyten, Mikroglia)	++	+
Kollagen I	neu gebildetes Kollagen	++	+
Kollagen II	Glaskörperkollagen	+	(+)
Kollagen III	etabliertes Kollagen der Extrazellulärmatrix	++	(+)
		Kolok GFAP mit CD64, Koll1 oder Koll2	Kolok α SMA mit CD45

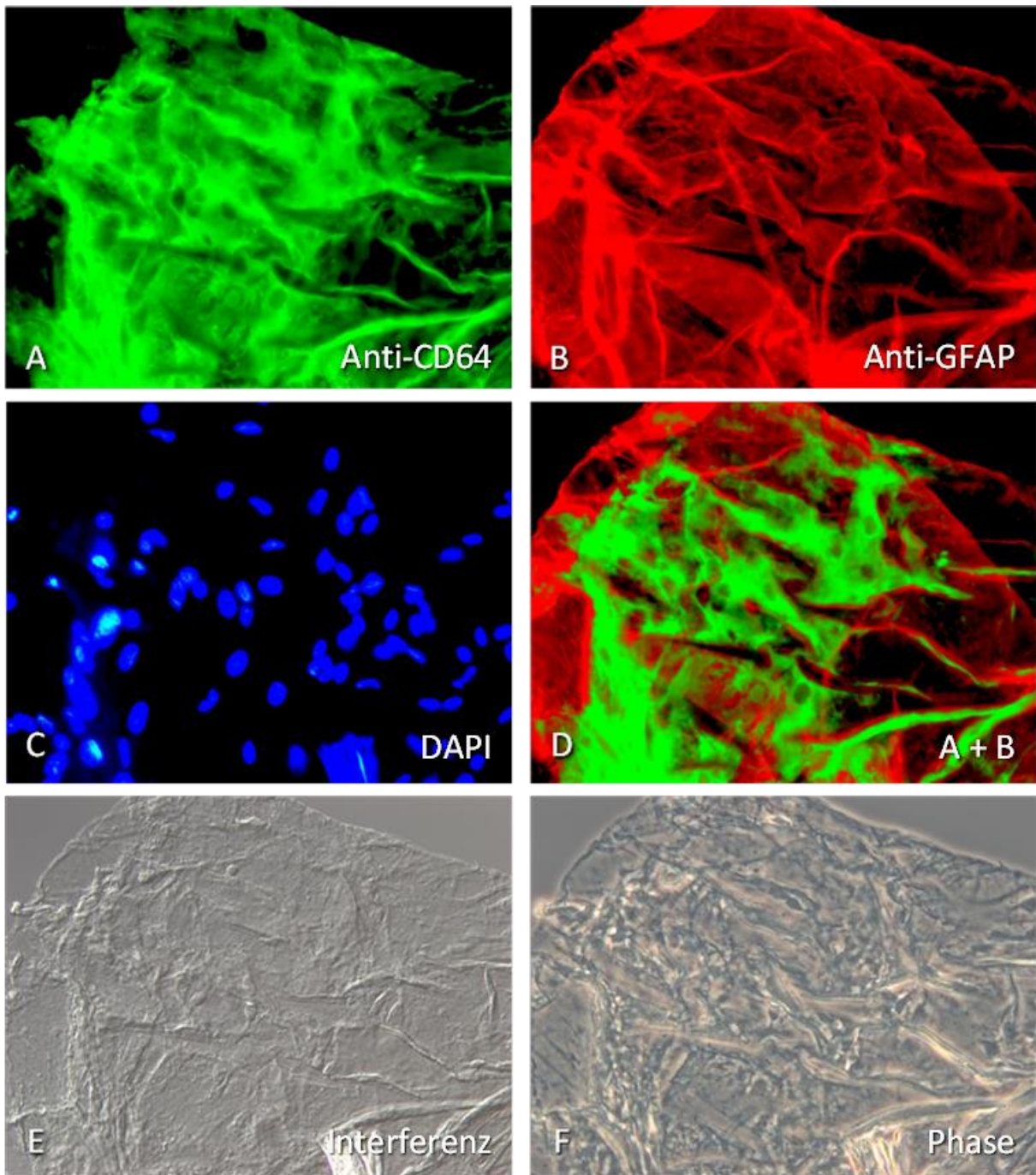


Abbildung 26: Epiretinale Membran eines Schichtforamens. 400-fache Vergrößerung.

Zellreiche Membran mit positiver Reaktion auf Anti-CD64 (Cluster of differentiation Nr. 64, kennzeichnendes Oberflächenmerkmal eines Zelltyps) in (A) und Anti-GFAP (Glial fibrillary acidic protein = saures Gliafaserprotein) in (B). Anti-CD64 färbt typischerweise nicht den Zellkern an. Dies wird beim Abgleich mit der Zellkernfärbung DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, interagiert mit DNA) in (C) noch deutlicher. Aufgrund der Zelldichte des Präparats lassen sich anhand von Anti-CD64 (A) keine einzelnen Zellen voneinander abgrenzen, die Reaktion erscheint konfluierend. Die positive Reaktion auf Anti-GFAP (B) zeigt die faserige Struktur des Präparats und vermittelt einen Eindruck seiner Dreidimensionalität. Dieser wird durch die Mikrophotographien des Interferenz-(E) und Phasenkontrasts (F) ergänzt. Besonders ist hier die direkte Lagebeziehung von Anti-CD64 als klassischem Hyalozytenmarker und Anti-GFAP als indirektem Gliazellmarker, illustriert im Summationsbild (D). Untypische Färbemuster sind ein Hinweis auf Transdifferenzierung.

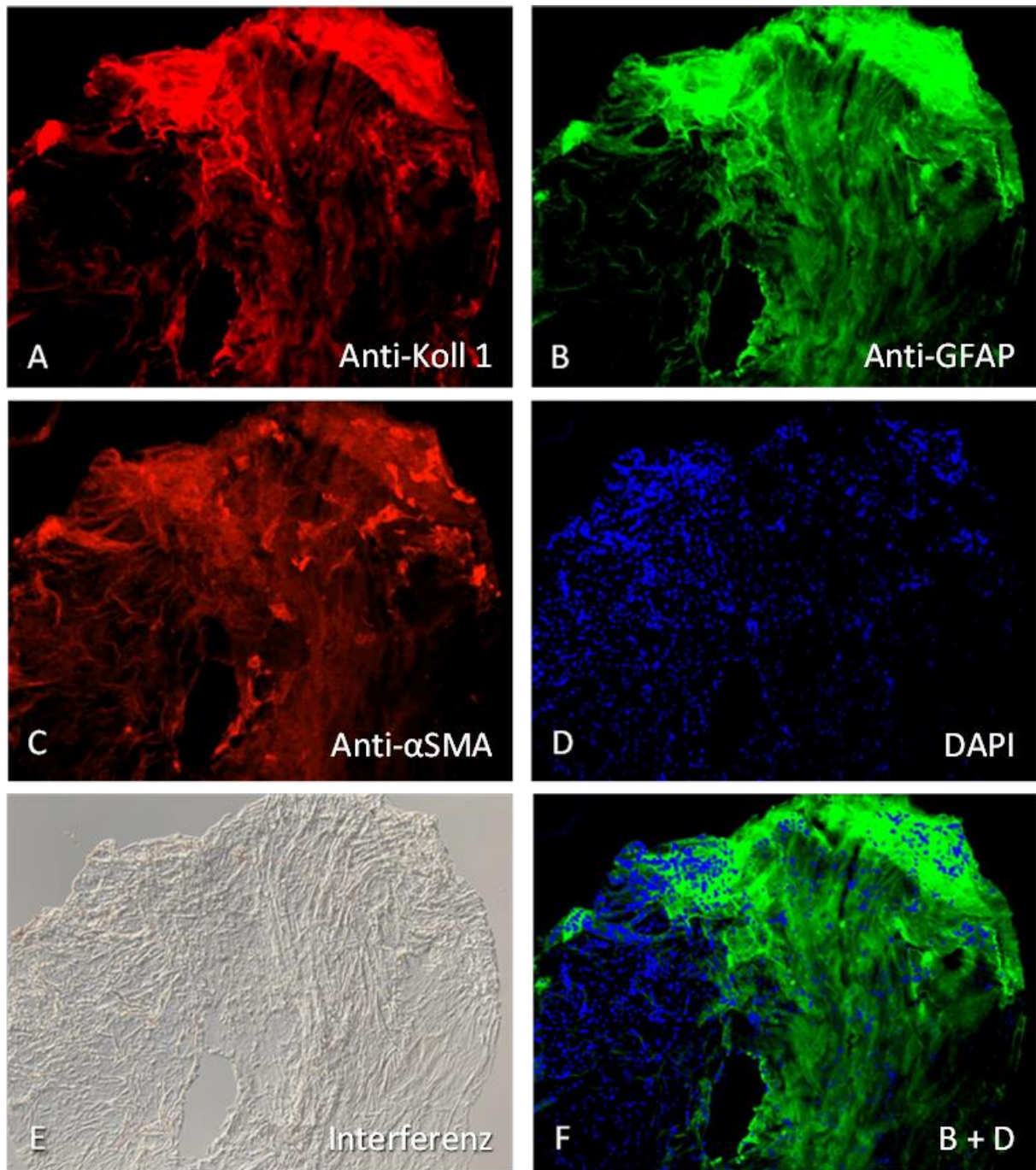


Abbildung 27: Epiretinale Membran eines Pseudoforamens. 100-fache Vergrößerung.

Zellreiche Membran mit komplexer Faltung. Positive Reaktion auf Anti-Kollagen Typ I (A) und Anti-GFAP (saures Gliafaserprotein) (B) in Kolokalisation, deutlich im oberen Bereich des Präparats. Im Kontrast dazu die vereinzelt α -SMA- (smooth muscle actin)-positiven Zellen (C). Die Überlagerung der Mikrophotographien von Anti-GFAP (B) und der Zellkernfärbung DAPI (D) im Bild (F), zeigt die Mehrheit der Zellen außerhalb der positiven Reaktion, dementsprechend handelt es sich hierbei um einen anderen Zelltyp, möglicherweise Gliazellen mit untypischem Färbeverhalten, wie es im Rahmen der Transdifferenzierung vorkommen kann.

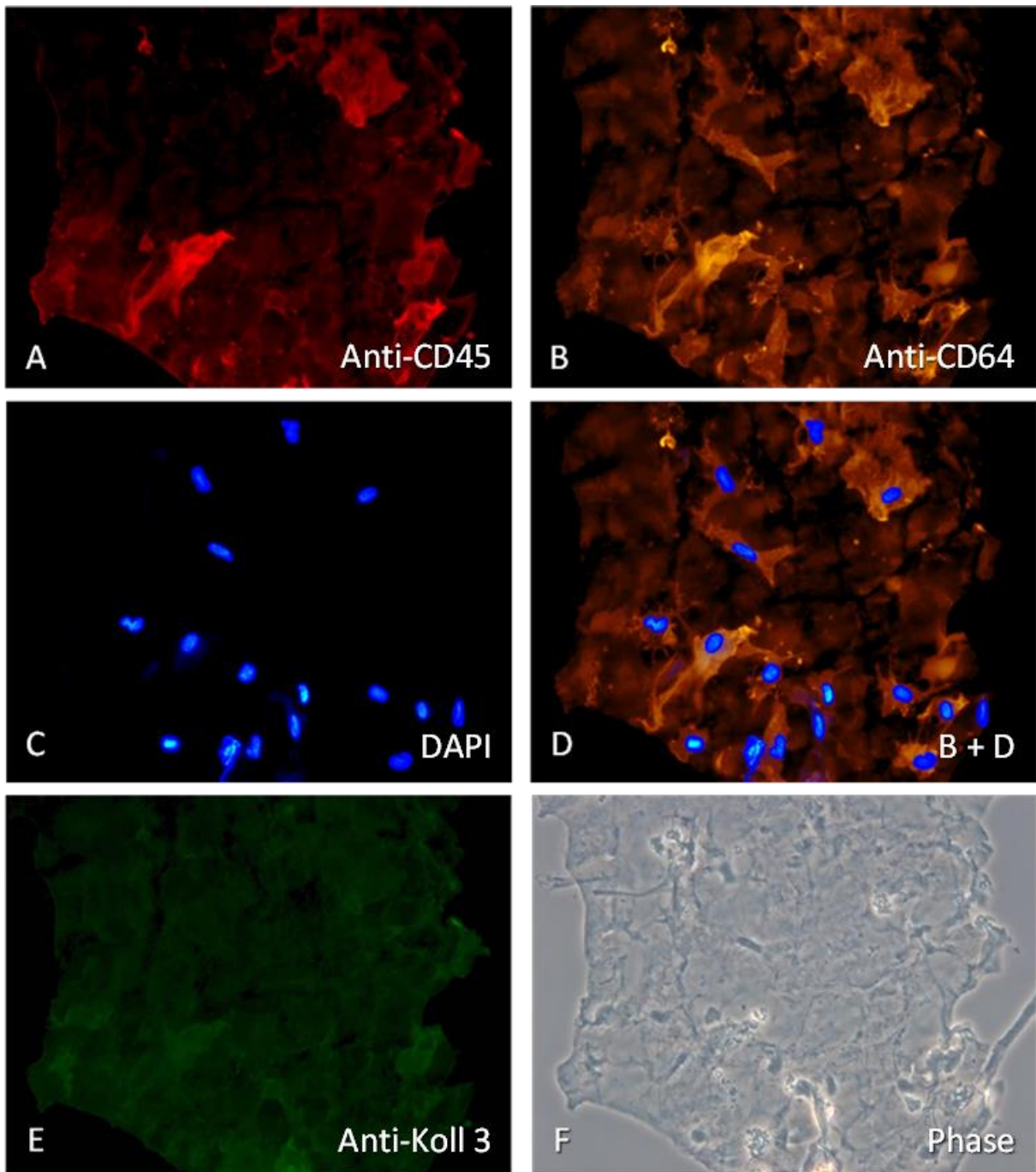


Abbildung 28: Innere Grenzmembran (ILM) eines Pseudoforamens mit epiretinaler Proliferation. 400-fache Vergrößerung.

Zellarmes, flach ausgebreitetes Präparat, entsprechend einer ILM mit epiretinaler Proliferation. Anti-CD45 (A) und Anti-CD64 (B) als Hyalozytenmarker sind deutlich positiv. Die geringe Anzahl an Zellen in diesem Präparat, illustriert durch die Zellkernfärbung DAPI (C), ermöglicht die Identifikation einzelner Zellen in den Antikörperfärbungen. Auffällig sind die „überschneidenden“ Kolokalisationsmuster beider Hyalozytenantikörper. CD64-positive Zellen sind auch CD45-positiv, die Reaktion geht aber deutlich über CD45-positive Zellen hinaus. So ist jedem Zellkern in (C) eine CD64-positive Zelle zuzuordnen (B), veranschaulicht im Summationsbild (D). CD45-positive Zellen (A) machen jedoch nur einen kleineren Teil aller Zellen aus, vgl. (C) sowie Phasenkontrast in (F). Nebenbefundlich zeigt sich eine negative Reaktion auf Anti-Kollagen Typ 3 (E) in deutlichem Kontrast zu den Reaktionen in (A) und (B).

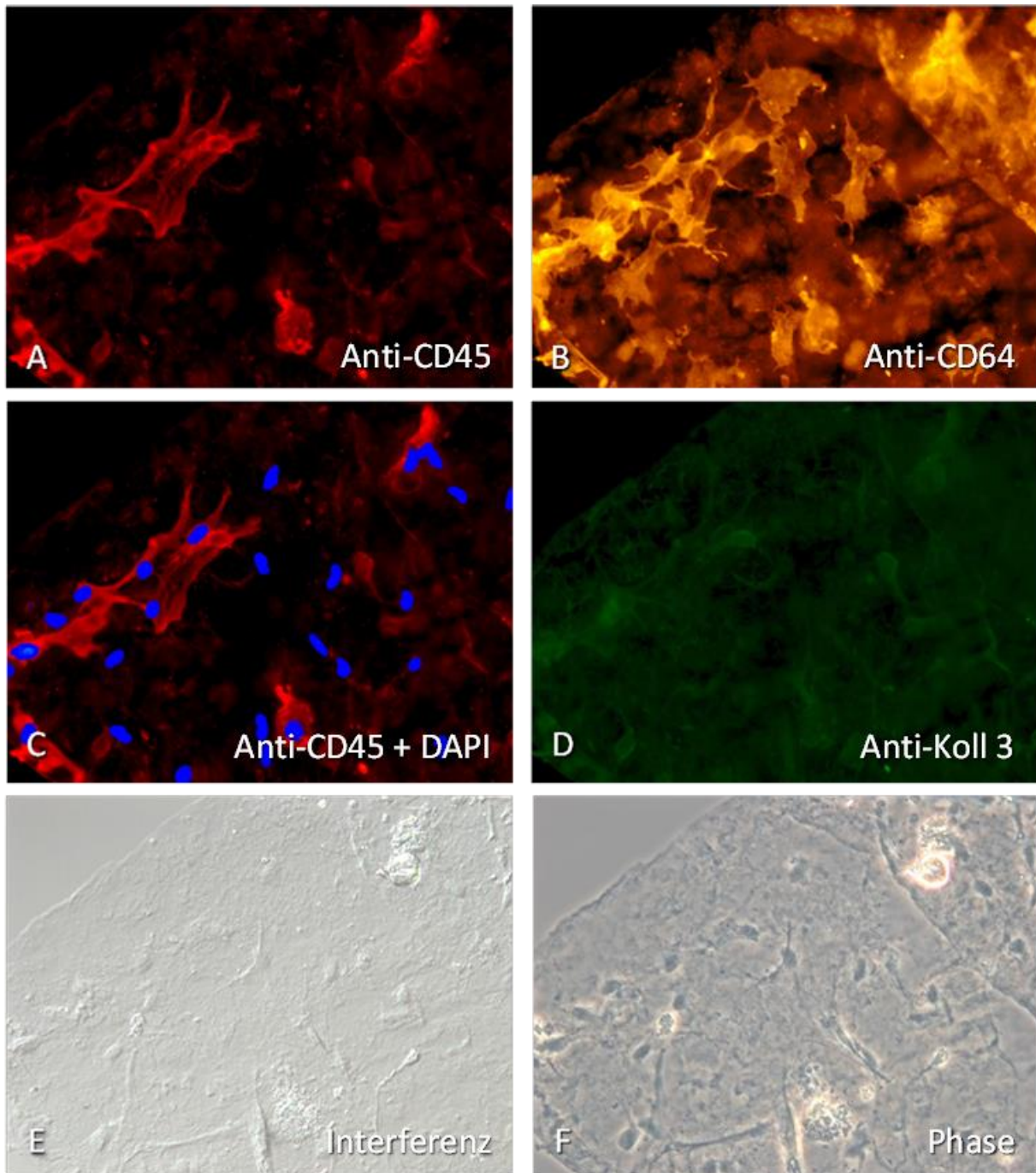


Abbildung 29: Innere Grenzmembran (ILM) mit epiretinaler Proliferation eines Pseudofoamens. Es handelt sich um einen anderen Ausschnitt desselben Präparats aus Abbildung 28. 400-fache Vergrößerung

Deutliche Reaktion der Hyalozytenmarker Anti-CD45 (A) und Anti-CD64 (B), in überschneidender Kolokalisation. Das Summationsbild (C) von Anti-CD45 und den mit DAPI angefärbten Zellkernen (nicht einzeln dargestellt), veranschaulicht, dass nur ein Teil der Zellen CD45-positiv ist. Alle Zellen zeigen eine positive Reaktion auf Anti-CD64 (B).

In dieser höheren Vergrößerung zeigt sich auch die schwache Reaktion von Anti-Kollagen Typ 3 (D). Es lassen sich hier zwar Zellstrukturen ausmachen, vergleiche auch die Interferenz- (E) und Phasenkontrastaufnahmen (F), allerdings zeigt sich keine spezifische Reaktion im Sinne einer Farbstoffakkumulation.

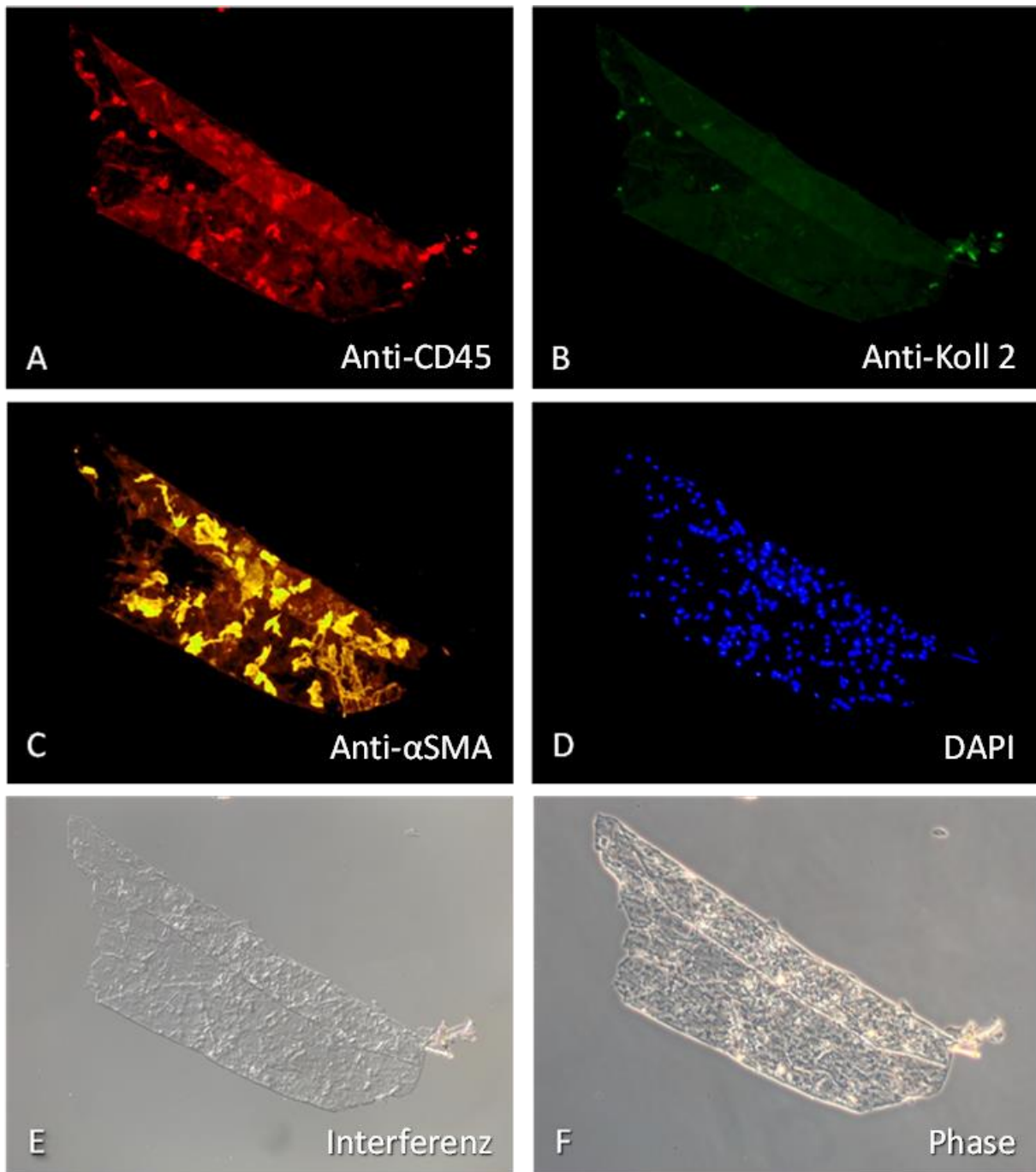


Abbildung 30: ILM eines Pseudoforamens mit epiretinale Proliferation. 100-fache Vergrößerung.

Zellreiches, aber einfach gefaltetes Präparat. Zentral ist eine mäßige, aber positive Reaktion auf den Hyalozytenmarker Anti-CD45 (A) zu sehen. Die hell aufleuchtenden Punkte an Rändern des Präparats in (A) sind Artefakte. Das typische Glaskörperkollagen Kollagen Typ II ließ sich hier nicht anfärben (B). Auch hier leuchten am Rand des Präparats lediglich Artefakte auf.

Anti- α -SMA (smooth muscle actin) (C) zeigt eine starke Reaktion in Kolokalisation mit Anti-CD45 (vgl. A). Interferenzkontrast-(E) und Phasenkontrastdarstellung (F) zeigen in plastischer Weise, dass die Membran einfach gefaltet ist. Dennoch ließ sie sich bei der Präparation unter dem Mikroskop nicht entfalten. Eine Beobachtung, die wir bei allen stark Anti- α -SMA positiven Präparaten machen konnten.

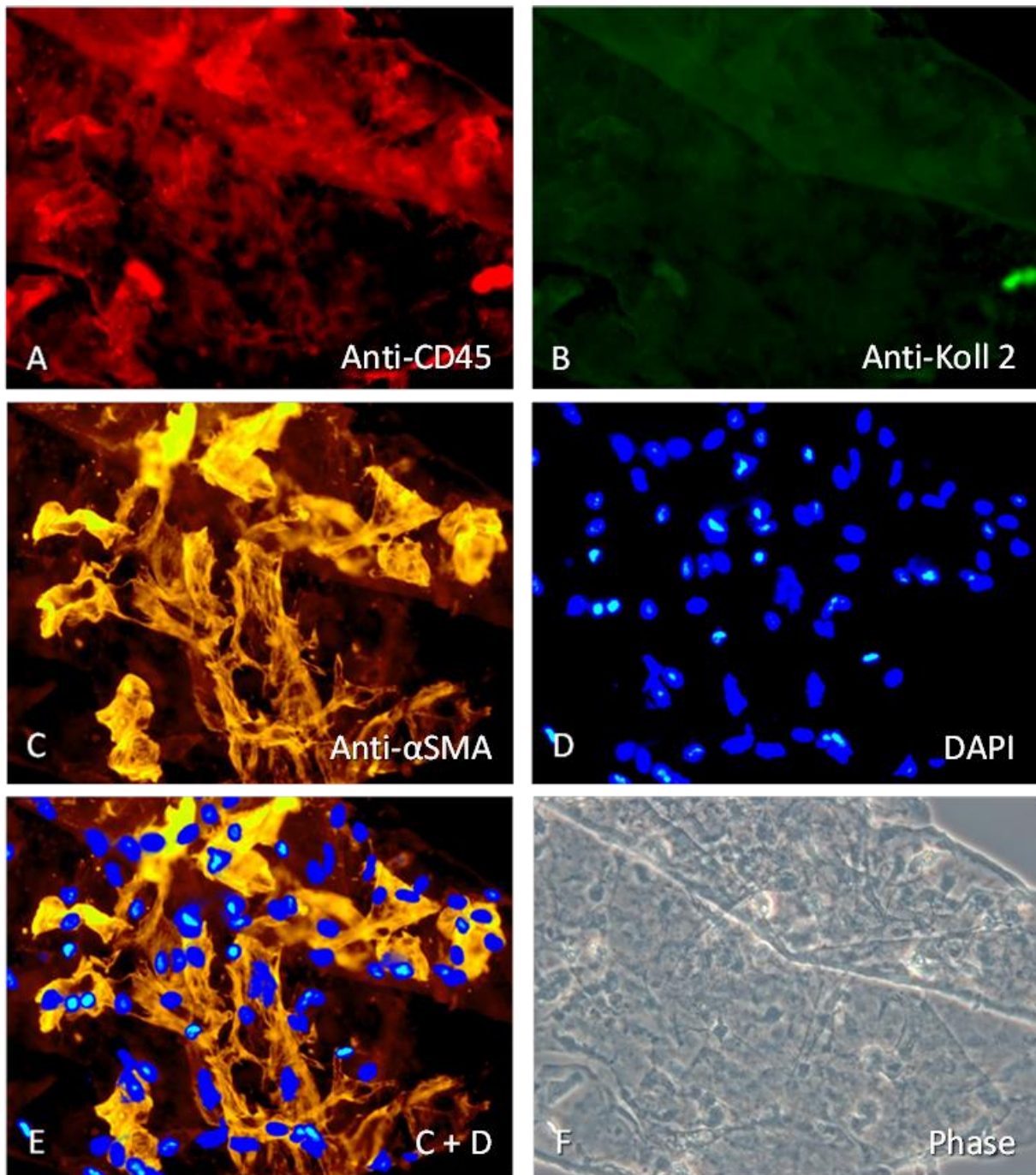


Abbildung 31: Innere Grenzmembran (ILM) eines Pseudoforamens mit epiretinale Proliferation. Detailaufnahme des Präparats aus Abbildung 30. 400-fache Vergrößerung.

Die hohe Vergrößerung veranschaulicht die Kolokalisation von Anti-CD45 (A) und Anti- α -SMA (smooth muscle actin) (C). Die Reaktion von Anti- α -SMA (E) ist ausgeprägter und färbt mehr Zellen an, wie der Vergleich mit der Zellkernfärbung DAPI (D) zeigt. In Summation (E) fällt auf, dass nicht alle Zellen eine positive Reaktion auf Anti- α -SMA zeigten.

Das typische Glaskörperkollagen Typ 2 (B) zeigt keine positive Reaktion. Die Phasenkontrastdarstellung (F) veranschaulicht den Zellreichtum und die einfache Faltung des Präparats. Die Zusammenschau mit der ausgeprägten Reaktion auf das kontraktile α -smooth-muscle-actin (C), erklärt warum sich diese eigentlich einfache Faltung unter dem Mikroskop nicht öffnen ließ.

4.5 Ergebnisse der Immunelektronenmikroskopie

In 9 von 11 LMH Präparaten und allen 14 MPH Präparaten wurden anteilig Stücke der ILM gefunden. Sie ist als durchgängige kollagenfaserhaltige Schicht zu erkennen, mit einer charakteristischen Innen- und Außenseite. Die nach innen gewandte vitreale Seite hat eine glatte Oberfläche und stellt sich im Serienschnitt als gerade Begrenzung dar. Aufliegende Kollagenstränge von Glaskörperresten können klar von der ILM abgegrenzt werden. Die nach außen gewandte retinale Seite der Grenzmembran hat eine raue Oberfläche und ist mit der Nervenfaserschicht verzahnt. Im Ultradünnschnitt für die Elektronenmikroskopie stellt sie sich als gewellt dar.

Bei den Membranen von Schichtforamina waren Fibroblasten und Hyalozyten die vorherrschenden Zelltypen, teilweise fanden sich Myofibroblasten. Fibroblasten zeichnen sich durch einen spindelförmigen Zellkörper wie Zellkern aus, durch reichhaltiges raues endoplasmatisches Retikulum (RER) und durch einen ausgeprägten Golgi-Apparat. Häufig waren sie der wesentliche Bestandteil von Zellhaufen („Cluster“), den kleineren Teil machten Hyalozyten aus. Vereinzelt fanden sich Nanogold-GFAP-positive Fibroblasten. Diese Zellhaufen fanden sich ausschließlich bei Membranen von Schichtforamina und hierbei nur auf Membranen mit LHEP.

Hyalozyten waren die zweithäufigste Zelle in ERM von Schichtforamina. Charakteristisch für sie ist eine unregelmäßige Zellform mit schlanken Fortsätzen, ein lobulierter Zellkern und zahlreiche intrazelluläre Einschlüsse wie Vesikel, Lyso- und Phagosomen sowie Vakuolen. Darüber hinaus weisen sie ein ausgeprägtes glattes endoplasmatisches Retikulum auf. Wie bei den Fibroblasten ist auch ihr RER und Golgi-Apparat prominent.

Vereinzelt fanden sich Myofibroblasten in den Membranen, nicht aber in den Zellhaufen. Die Merkmale von Myofibroblasten werden weiter unten im Abschnitt zum Pseudofoamen erläutert.

Die extrazelluläre Matrix wurde von nativem Glaskörperkollagen dominiert. Klassisch dafür ist die regelmäßige Anordnung der vergleichsweise kurzen, unregelmäßig gestreiften Fibrillen, die einen Durchmesser von maximal 16 nm haben. Es reagierte positiv auf Nanogold-Kollagen Typ II. Weitere Kollagentypen waren das neu-geformte Glaskörperkollagen, zu erkennen an unregelmäßiger Anordnung und einem Fibrillendurchmesser von über 16 nm, und meist darin eingebettet das fibrous long spacing collagen (FLSC), zu erkennen als dunkler Fleck mit gleichmäßiger Streifung (Periodizität: 100 nm) inmitten lockerer Fasern (**vgl. Abb. 36 unten**). Bei manchen Präparaten von LHEP-Membranen waren die drei Kollagentypen chaotisch in den Zellproliferationen verstreut. Natives Glaskörperkollagen war zeigte sich öfter zwischen epiretinalen Zellen und ILM geschichtet.

Die Membranen der Pseudofoamina wiesen überwiegend Myofibroblasten und etwas weniger Hyalozyten auf, teilweise fanden sich Fibroblasten. Die Zellen proliferierten in mehreren Schichten,

Zellhaufen gab es keine. Myofibroblasten sind gekennzeichnet durch Anhäufungen von intrazellulären, subplasmalemalen (direkt an der Zellmembran gelegen) 5 - 7 nm starken Filamenten und weiteren intrazellulären Filamenten mit kontraktilen Eigenschaften. Ihr Zellkörper und Zellkern ist spindelförmig und ähnelt dahingehend den Fibroblasten, das RER ist jedoch nur mäßig ausgeprägt. Ihre Kontraktilität zeigte sich daran, dass die Zellen unterliegende ILM in Falten geworfen hatten und diese überspannten. Vereinzelt zeigten sie eine positive Reaktion auf Nanogold-CD45.

Die extrazelluläre Matrix wurde dominiert von nativem Glaskörperkollagen; es fand sich mäßig viel FLSC, jedoch deutlich mehr als bei LMH, und mäßig neu-geformtes Kollagen. Das native Glaskörperkollagen war häufig zwischen epiretinale Zellen und die ILM geschichtet. FLSC war ausschließlich in nativem GK-Kollagen eingebettet.

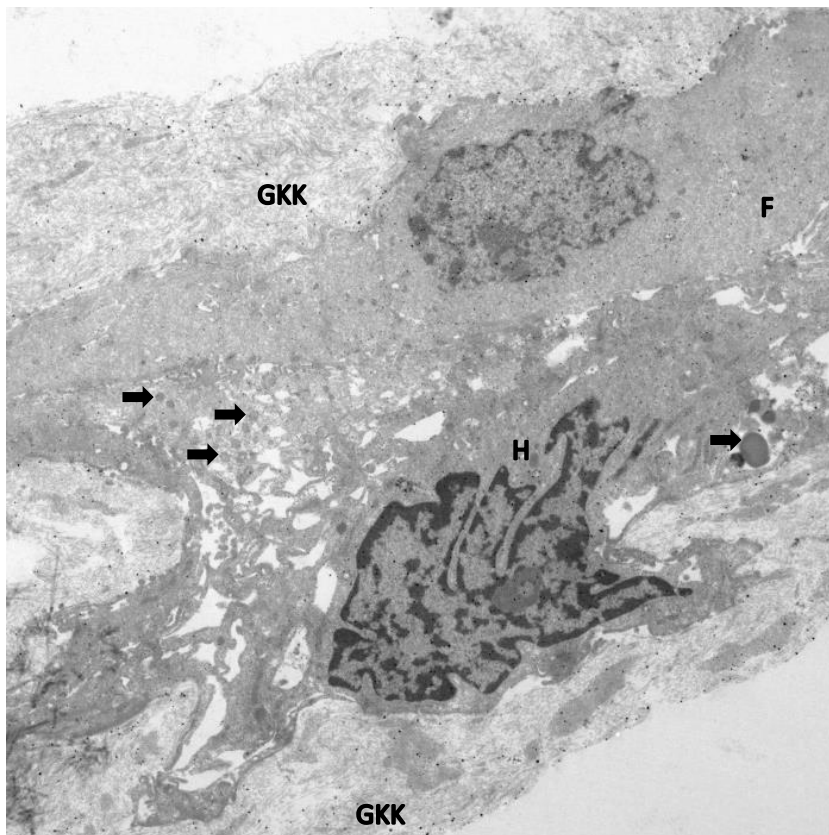
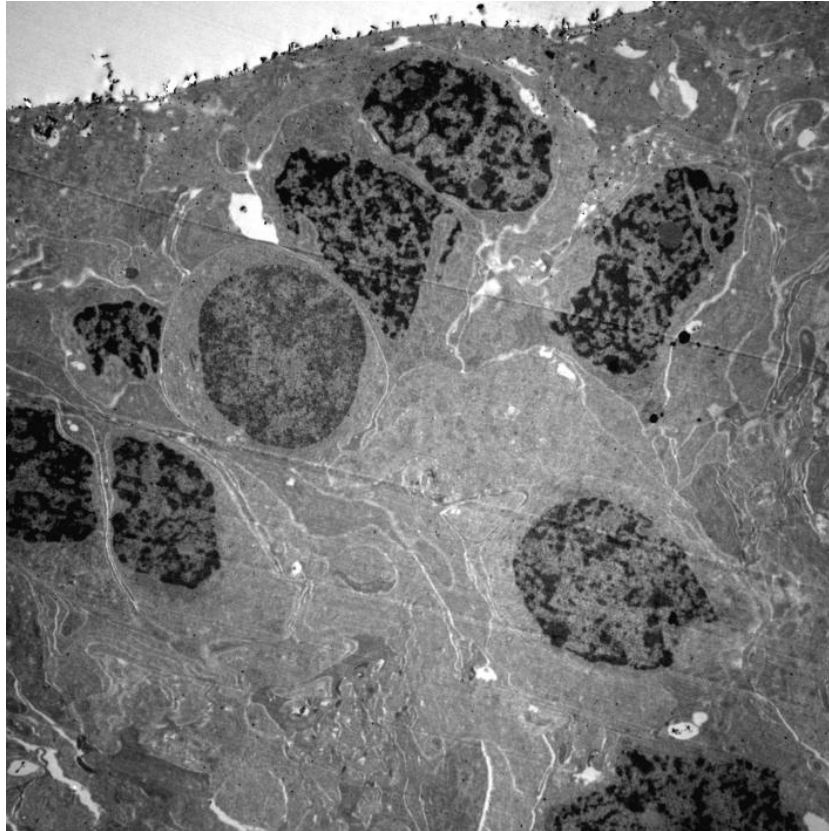


Abbildung 32: ERM von Schichtforamina **Oben:** Zellhaufen aus fibroblastenartigen Zellen und Gliazellen. 15000-fach.
Unten: Mehrschichtige Zellproliferation in chaotischer Organisation. Die obere Zelle ist ein Fibroblast **F**, zu erkennen an der langgezogenen Form und dem dichten, faserigen Zytosol. Die untere Zelle ist ein Hyalozyt **H**, charakterisiert durch den lobulierten Zellkern, viele Vesikel und Zelleinschlüsse ➡, sowie durch schlanke Fortsätze. An den Rändern ist Glaskörperkollagen **GKK** zu sehen. 60000-fach.

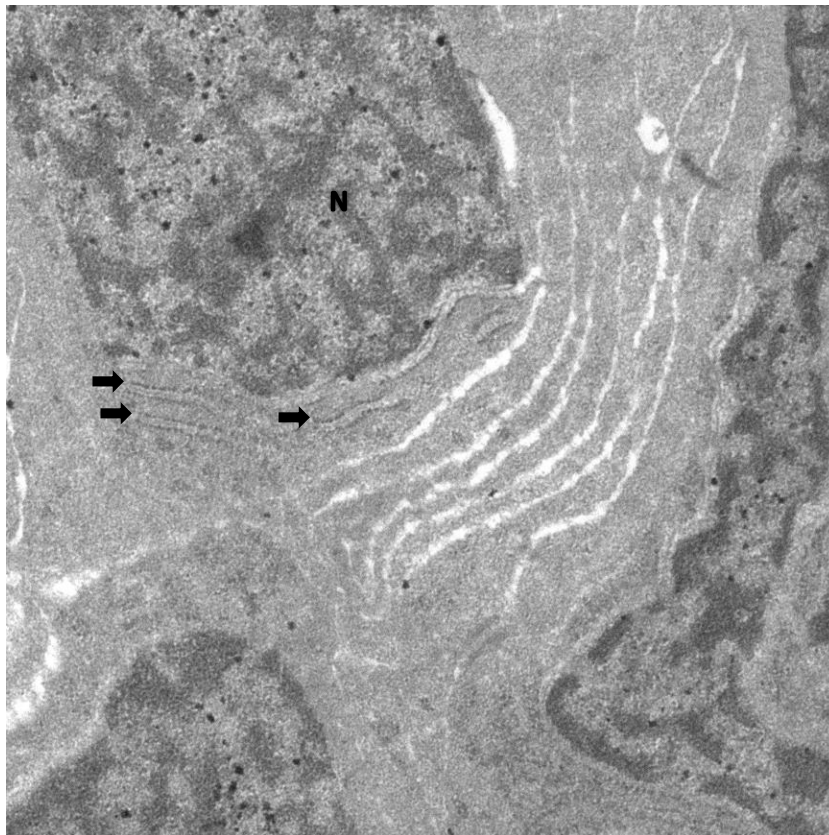
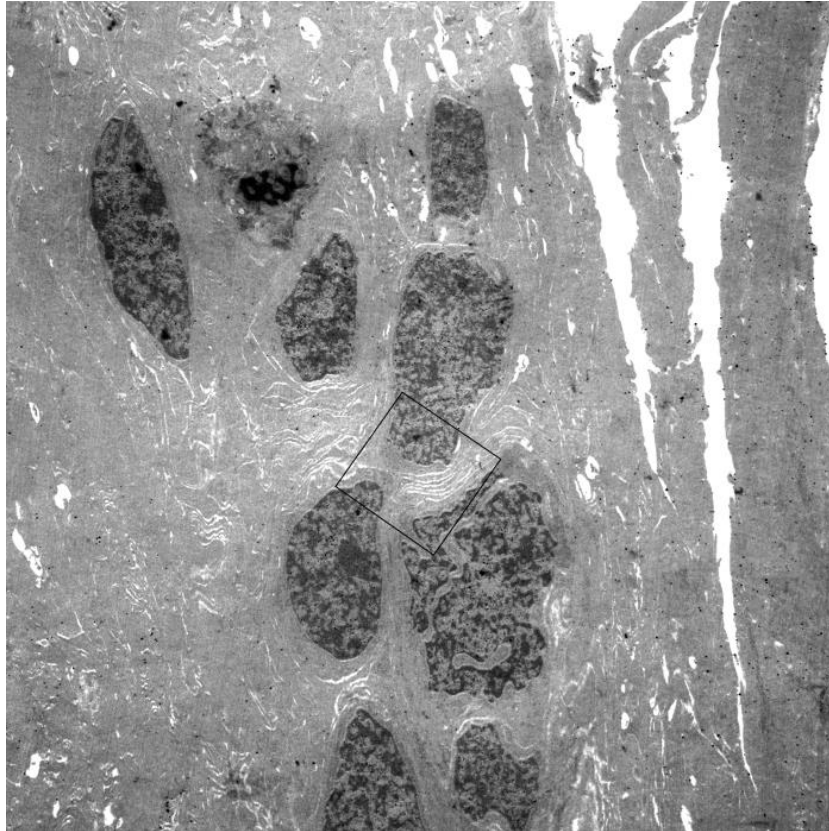


Abbildung 33: ERM eines Schichtforamens **Oben:** Zellhaufen aus Fibroblasten und Hyalozyten. 8000-fach.
Unten: Detailvergrößerung vom Rauhen Endoplasmatischen Retikulum ➔ eines Fibroblasten, in nächster Nähe zum Zellkern (N). 120000-fach.

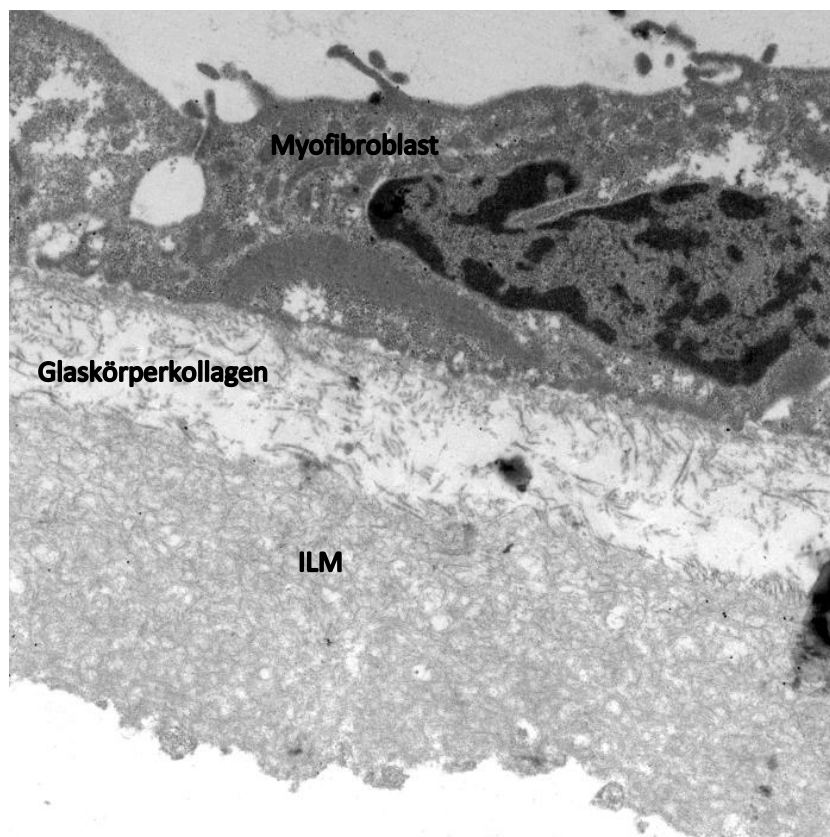
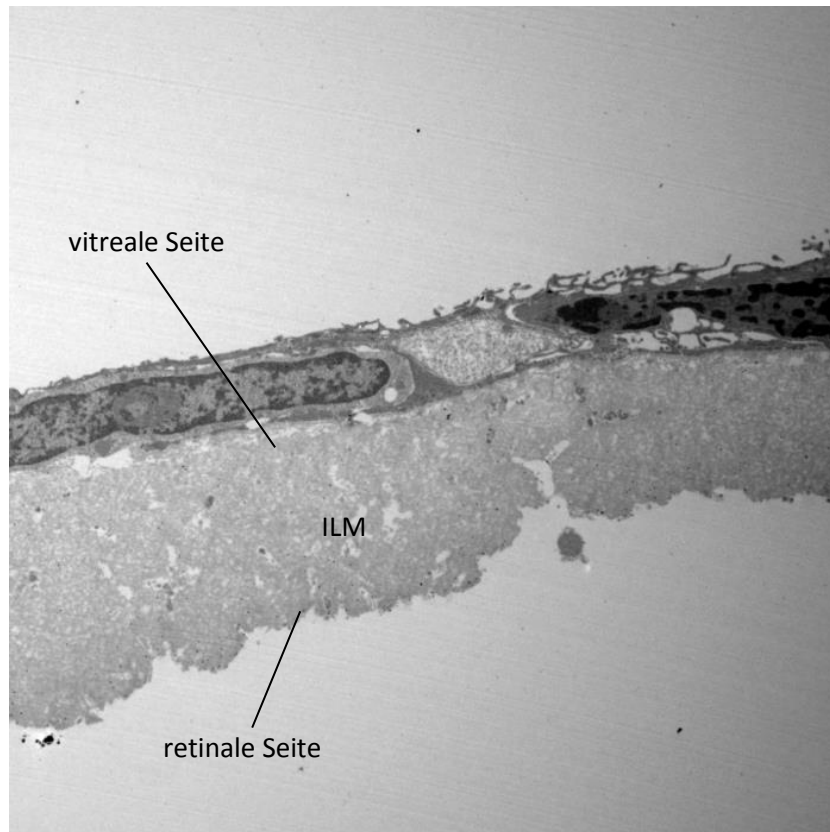


Abbildung 34: Oben: Epiretinale Proliferation eines Schichtforamens auf der inneren Grenzmembran (ILM) mit der charakteristischen glatten, vitrealen Seite und der gewellten retinalen Seite am unteren Bildrand. 5000-fach. Unten: Epiretinal proliferierender Myofibroblast auf der ILM eines Pseudoformens. Dazwischen eingeschlossen sind locker angeordnete Fasern von Glaskörperkollagen, hier besonders deutlich sichtbar, da die ILM präparationsbedingt etwas abgehoben ist. Der Myofibroblast weist charakteristische, subplasmalemmalen Verdichtungen auf. 90000-fach.

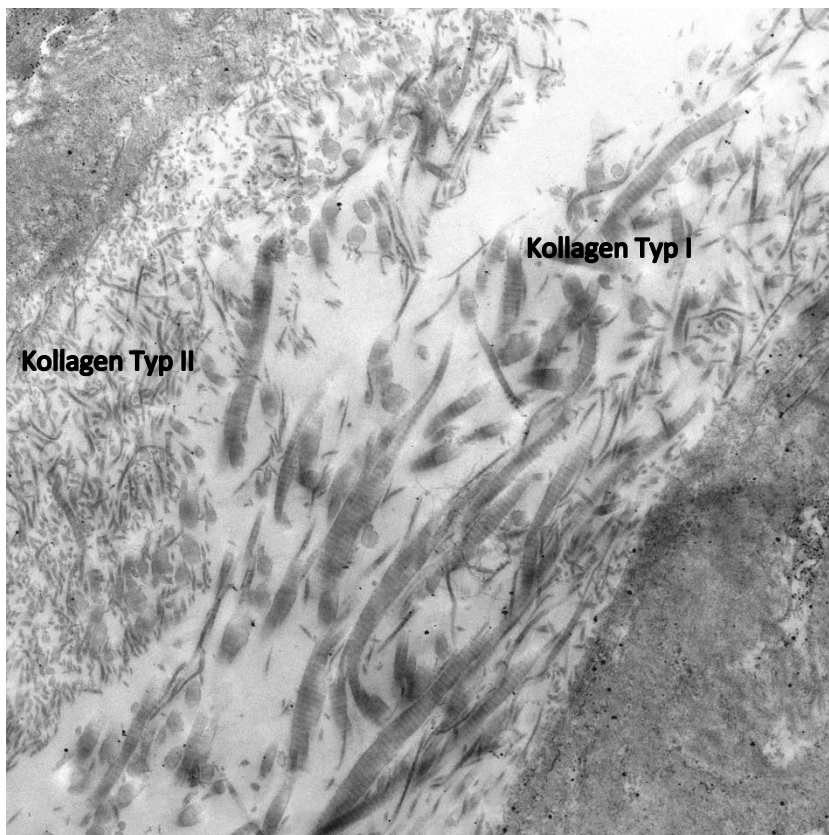
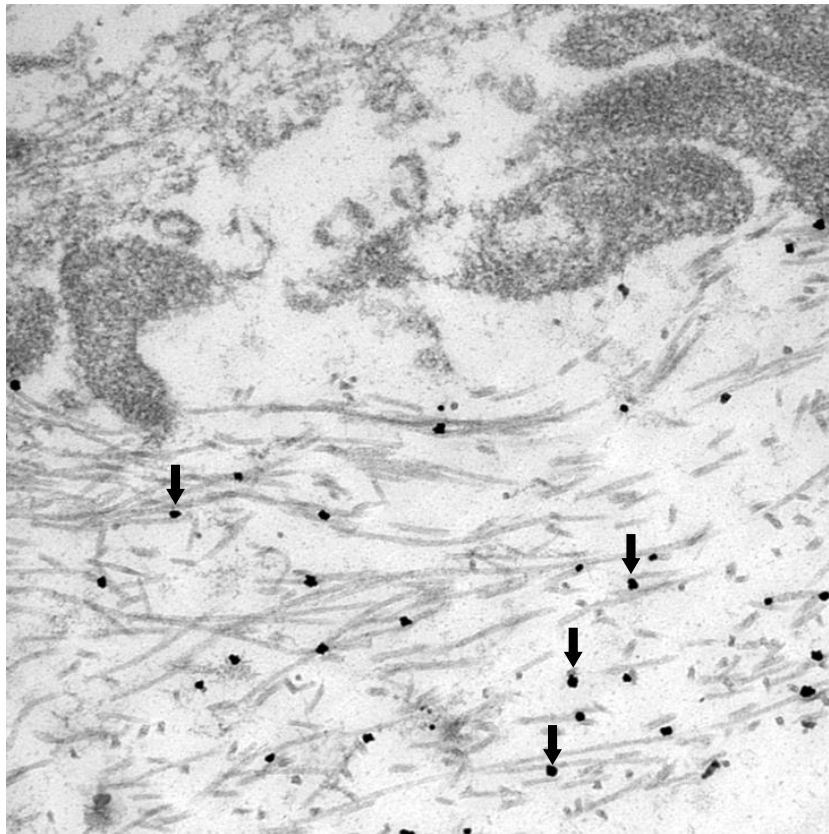


Abbildung 35: ERM von Schichtforamina. **Oben:** Positive Nanogold-Reaktion (↓) auf Kollagen Typ II, das charakteristische Glaskörperkollagen. 200000-fach

Unten: Verschiedene Kollagentypen zwischen zwei Zellausläufern. Mittig Kollagen Typ I, das mit einem Fibrillendurchmesser von 50 - 200nm deutlich dicker als das links angrenzende Kollagen Typ II ist. 110000-fach.

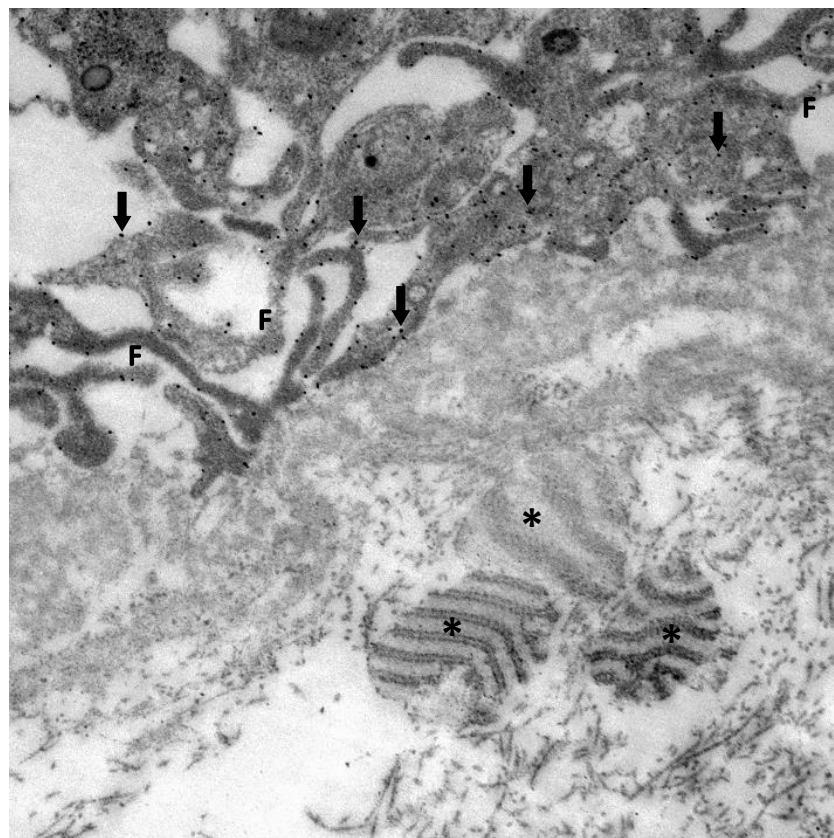
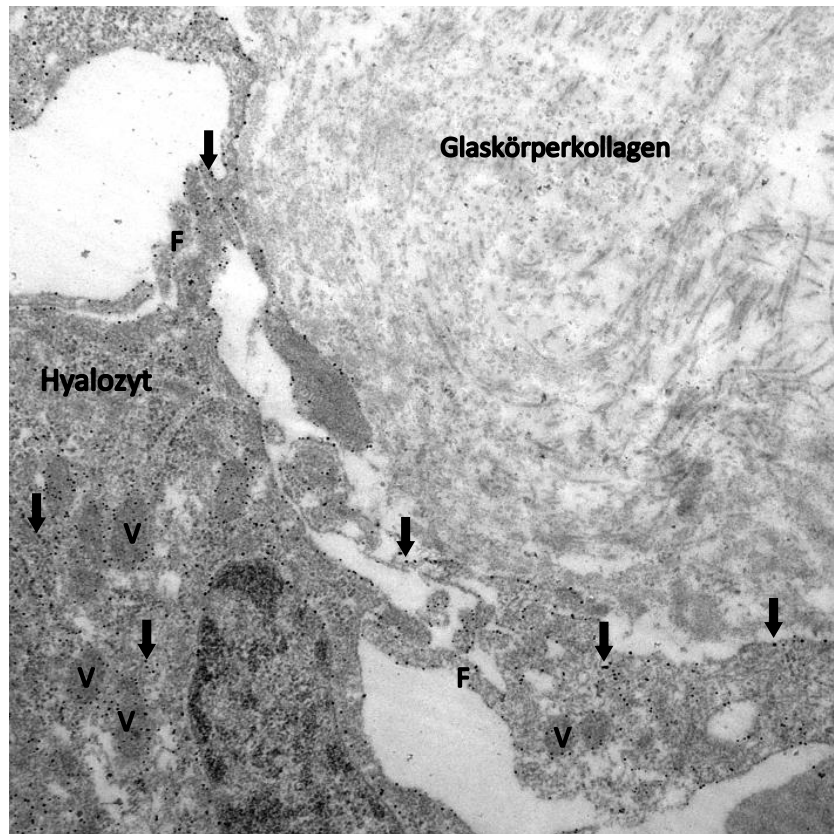


Abbildung 36: ERM eines Schichtforamens. **Oben:** Hyalozyt mit kurzen, feinen Fortsätzen (F) und Vesikeln (V), neben reichlich Glaskörperkollagen. Nachweis von CD45-Expression mittels Nanogold-Markierung (↓), zu sehen als schwarze Pünktchen. 90000-fach. **Unten:** Aus demselben Präparat, jedoch an anderer Stelle stammt diese Detailaufnahme der feinen Zellfortsätze des C45-positiven Hyalozyten. Neben verdichteten Kollagensträngen fällt vor allem das breit gestreifte fibrous long spacing Kollagen (FLSC) (*) auf, welches in nativem Glaskörperkollagen eingebettet ist. 100000-fach.

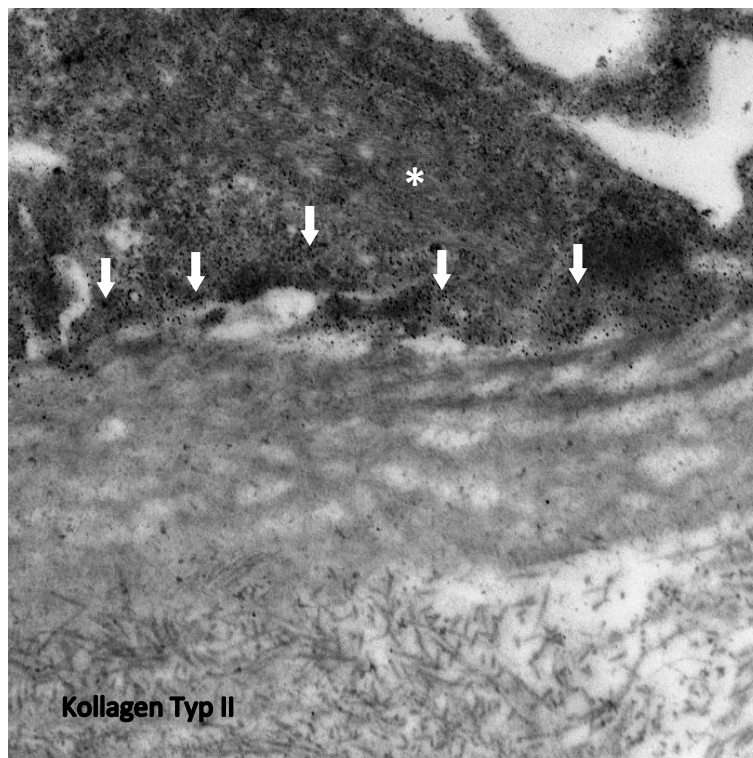
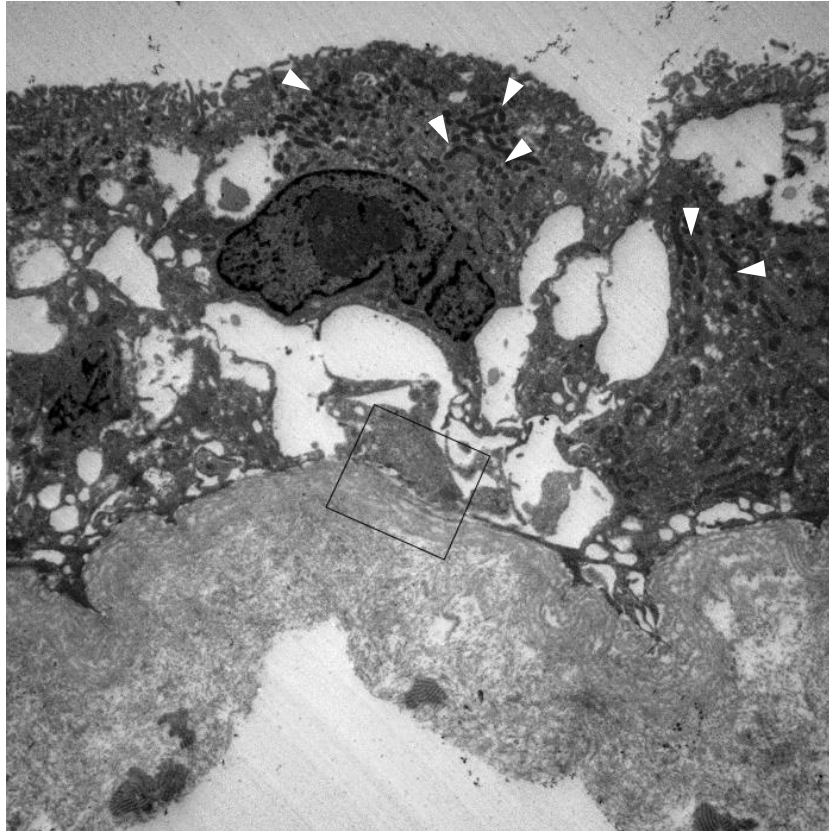


Abbildung 37: ERM eines LMH. **Oben:** GFAP positive Zelle auf Strängen dichten Glaskörperkollagens. Das Kollagen wird nach unten hin lockerer und weist fibrous long spacing collagen (FLSC) auf. Die Zelle ist sehr aktiv, erkennbar an den großen Mengen von Glykogen (▼), das sich im Zytosol v.a. über dem Zellkern in Form von homogen dunkler Punkte und Würste darstellt. Ferner ist der Nukleolus sehr ausgeprägt. Die Zelle entbehrt charakteristische Merkmale, erinnert jedoch an eine Müllerzelle mit ihren zahlreichen Fortsätzen. Es handelt sich höchstwahrscheinlich um einen durch Transdifferenzierung entstandenen Fibroblasten. 10000-fach.

Unten: Die Detailvergrößerung zeigt die positive Reaktion auf Nanogold-GFAP (↓) und angedeutet intrazelluläre Filamente (*). Darunter dichte Kollagenstränge und der Übergang zu deutlich erkennbaren Kollagenfibrillen vom Typ II. 110000-fach.

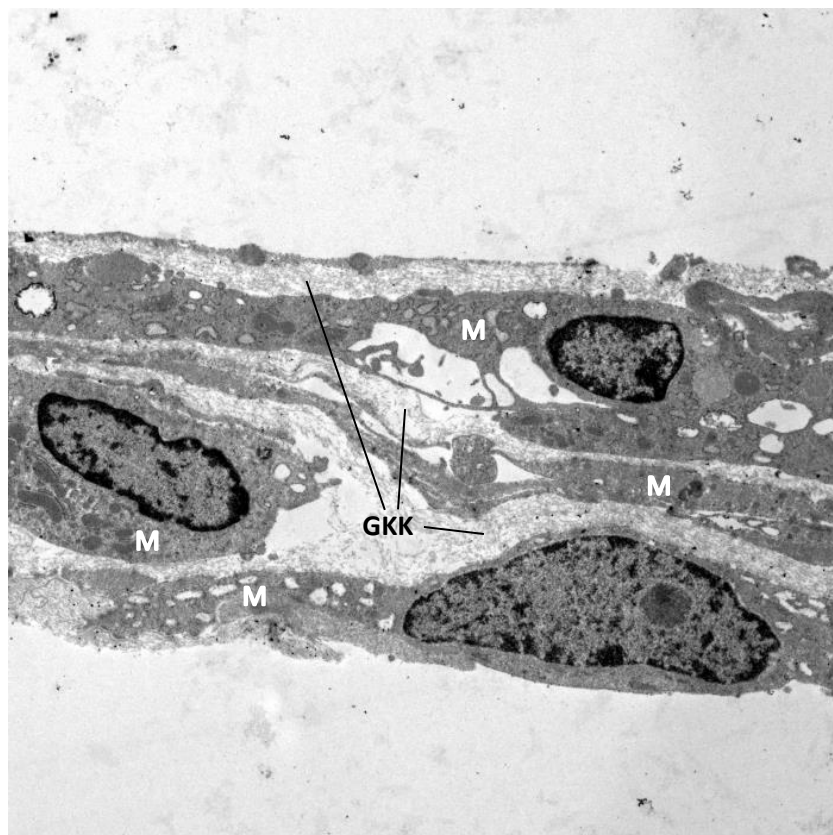
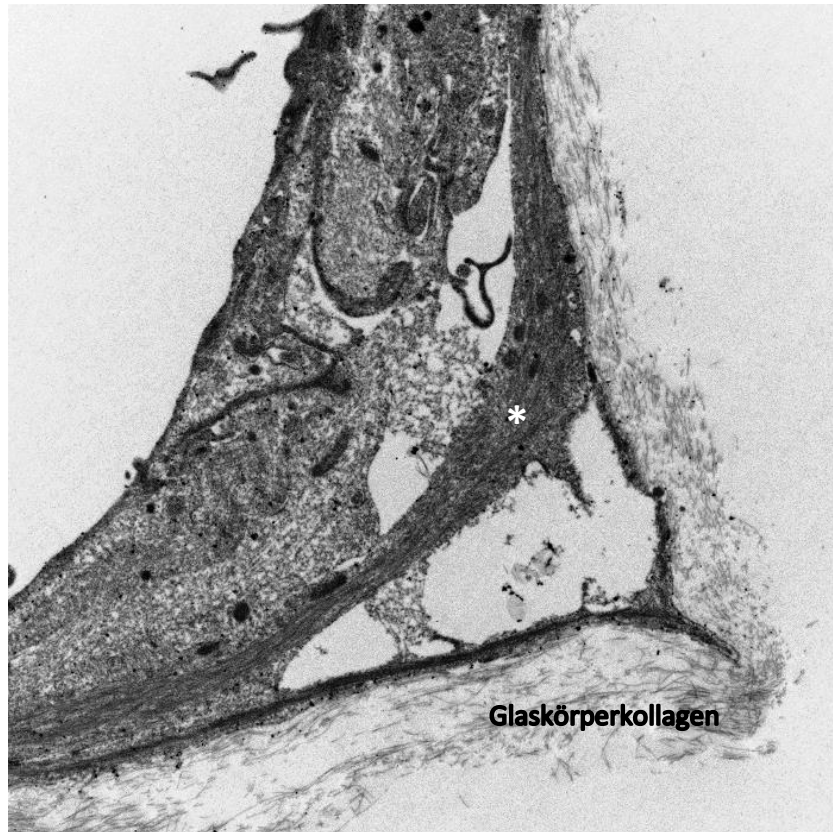


Abbildung 38: ERM von Pseudofoamina. **Oben:** Myofibroblast mit charakteristischen Strängen intrazellulärer Filamente (*). Die Kontraktion der Zelle ist deutlich an der Verformung des unterliegenden Strangs aus Glaskörperkollagen und der Überbrückung der Falte zu erkennen. 90000-fach.
Unten: Typischer Fund in den kontraktile ERM von Pseudofoamina - mehrschichtig organisierte Myofibroblasten(M), dazwischen Glaskörperkollagen (GKK). 15000-fach.

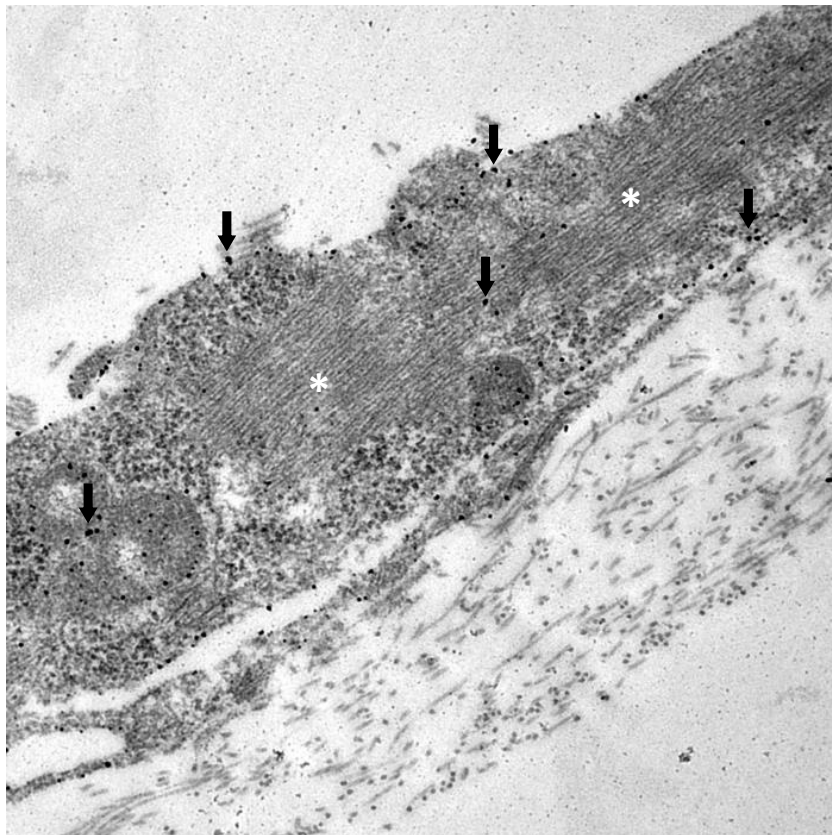
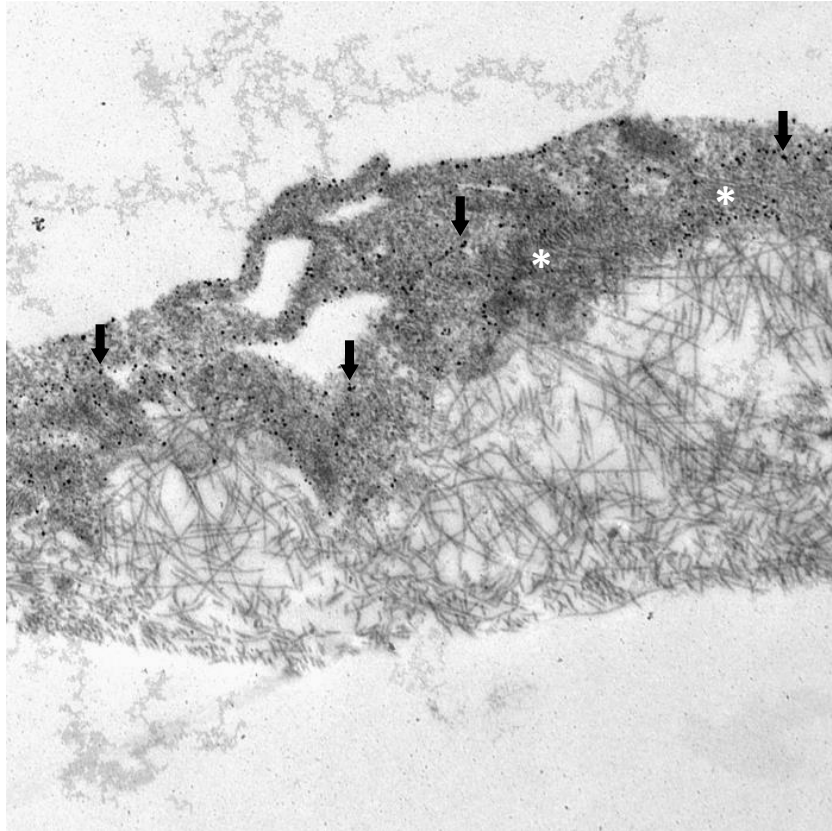



Abbildung 39: ERM eines Pseudoformens (Aus Abb. 38 unten). Nanogold-CD45-positive  Zellfortsätze eines Myofibroblasten. **Oben:** Die Kontraktilität zeigt sich in Form des Fortsatzes und im Verlauf der langen Fibrillen von Glaskörperkollagen. 100000-fach.

Unten: Intrazelluläre Filamente (*) desselben Präparats in höherer Vergrößerung. 120000-fach.

5 Diskussion

Dies ist die erste Arbeit in der die epiretinalen Membranen von Schicht- und Pseudofoamina nach immunhistologischer und ultrastruktureller Analyse gegenübergestellt werden. In der Literatur finden sich nur zwei Untersuchungen zu epiretinalen Proliferationen bei Schichtfoamina (Parolini et al. 2011; Pang et al. 2016). Zur Histologie von epiretinalen Membranen bei Pseudofoamina gab es bislang noch keine Untersuchung.

Im Folgenden wird der aktuelle Forschungsstand zu epiretinalen Membranen, Schicht- und Pseudofoamina und die Einordnung der neu gewonnenen Erkenntnisse diskutiert. Hierbei wird zuerst auf die epiretinalen Membranen eingegangen, deren Pathogenese nach wie vor ein großes Dunkelfeld darstellt. Pseudofoamina in „Lehrbuchform“ sind unstrittig die veränderte Konfiguration der Fovea infolge einer kontraktiven epiretinalen Membran. Es gibt jedoch traktiv bedingte Schichtdefekte deren Einordnung als Pseudo- oder Schichtfoamen Schwierigkeiten bereitet. Der Differentialdiagnose und möglichen Klassifikation dieser Defekte ist deshalb ein eigener Abschnitt gewidmet. Anschließend wird die Heterogenität von Schichtfoamina hinsichtlich ihrer Pathogenese, Morphologie und assoziierten epiretinalen Membranen diskutiert. Schließlich wird im Abschnitt zur therapeutischen Relevanz der neuen Erkenntnisse der Bezug zur klinischen Praxis hergestellt.

5.1 Pathogenese epiretinaler Membranen

Die Pathogenese epiretinaler Membranen bietet der Forschung nach wie vor noch viele zu klärende Fragen. Die hintere Glaskörperabhebung (PVD) kann in mehrerlei Hinsicht wesentlich zur Entstehung der Membranen beitragen. Zum einen sind traktive Kräfte, die durch Schrumpfung und Abhebung entstehen, ein Faktor. Müllerzellen als ubiquitäre Mediator-, Regulator- und Stabilisatorzellen der Netzhaut reagieren auf Traktion mit Aktivierung, Proliferation sowie De- und Transdifferenzierung (Bringmann et al. 2006; Lindqvist et al. 2010; Bringmann & Wiedemann 2012). Bei der partiellen PVD mit posteriorer Adhäsion im Rahmen einer anormalen PVD treten traktive Kräfte verstärkt auf (**vgl. Abschnitt 2.1.4**). Ein weiterer Faktor sind Residua nach der Glaskörperabhebung, wie unten dargelegt.

Posteriore Adhäsion überträgt die zunehmenden traktiven Kräfte des weiterhin schrumpfenden Glaskörpers und häufig auch tangential Kräfte bei extramakulärer Adhäsion, zum Beispiel an der Papille (VPA). Epiretinale Membranen könnten durch eine überschießende Entzündungsreaktion und Regeneration nach traktiv bedingten Mikrotraumata der Makula entstehen (Bringmann & Wiedemann 2009; Luna et al. 2016). Odrobina et al. untersuchten den natürlichen Verlauf von Augen

mit Vitreomakulärem Traktionssyndrom, bei dem die Makula starken anterior-posterioren Zug erfährt, und konnten dabei die Entstehung einer ERM beobachten (Odrobina et al. 2011).

Auf der ILM verbliebenes Glaskörpermaterial nach Vitreoschisis sowie kompletter Glaskörperabhebung scheint einen Proliferationsreiz für Zellen und eine Matrice für ihre Migration darzustellen (Hikichi et al. 1995; Schumann et al. 2006; Gandorfer et al. 2011; Parolini et al. 2011). Dafür sprechen die Funde von nativem Glaskörperkollagen zwischen epiretinalen Proliferationen und der ILM, bei uns und anderen Autoren (Parolini et al. 2011; Schumann et al. 2011; Compera, Entchev, Haritoglou, et al. 2015), sowie das Auftreten von FLSC (Fibrous Long Spacing Collagen), als Zeichen von Kollagenabbau.

Epiretinale Membranen bilden sich aber auch bei angeheftetem Glaskörper (Garretson et al. 2008; Parolini et al. 2011; Lee et al. 2012). Einige Studien deuten darauf hin, dass dies der seltenere Fall ist (Garretson et al. 2008; Androudi et al. 2009; Lee et al. 2012), andere Autoren fanden ERM mehrheitlich (Parolini et al. 2011) oder ausschließlich (Odrobina et al. 2011) bei angeheftetem Glaskörper.

Das zeigt, dass Vitreoschisis für die Pathogenese von epiretinalen Membranen nur eine untergeordnete Rolle spielen kann (Parolini et al. 2011). Die Glaskörperrinde ist von der altersbedingten Degeneration des Glaskörpers nicht ausgenommen, deshalb ist eher die altersbedingte Degradation der Kollagene an der vitreoretinalen Grenzfläche und weniger eine „postvitreoschitische Reaktion“ der Stimulus für epiretinale Zellproliferation. Mit Sicherheit spielen auch Zytokine eine Rolle, ihr Einfluss wurde bisher nur begrenzt und nicht an humanen Zellen erforscht (Vinores et al. 2003; Noda et al. 2004; Hirayama et al. 2004; Nishitsuka et al. 2007; Kohno et al. 2009; Bringmann & Wiedemann 2009).

Mittels Immunfluoreszenzhistologie wiesen wir in den epiretinalen Membranen von Schicht- und Pseudofoamina GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) nach. Das Intermediärfilament gilt als typisch für Gliazellen. Allerdings weiß man, dass auch Fibroblasten GFAP exprimieren können (Hainfellner et al. 2001). Das 8 - 9 nm dicke Filament verleiht den Zellfortsätzen Stabilität und ist essentiell für die Motilität der Zellen. Als Strukturprotein der Glia scheint es eine wichtige Rolle bei Protektion und Regeneration von Neuronen einzunehmen (Eng et al. 2000). Die Gliazellen der Netzhaut umfassen Müllerzellen, die spezifischen Gliazellen der Retina, sowie Astrozyten und Mikroglia. Müllerzellen machen die größte Fraktion retinaler Glia aus. Im Normalzustand ist Expression von GFAP vor allem für Astrozyten charakteristisch, welche die Vaskularisation der Netzhaut moderieren und in der Nervenfaserschicht und Ganglienzellschicht lokalisiert sind (Bringmann & Wiedemann 2012). Müllerzellen exprimieren GFAP im Ruhezustand lediglich im Zytosol ihrer Endfüße (Fisher & Lewis 2003; Ponsioen et al. 2010; Luna et al. 2016). Stress, zum Beispiel durch Dehnung, Oxidation, etc., aktiviert die Müllerzellen und bewirkt eine starke Hochregulation des Proteins (Lewis & Fisher 2003;

Bringmann & Wiedemann 2012). Sie kommen in jeder Schicht zwischen innerer Grenzmembran und den Photorezeptoren vor und erfüllen essentielle Funktionen: Sie stabilisieren die Netzhaut mechanisch und fixieren retinale Gefäße, sie versorgen die Neurone mit Nährstoffen und beseitigen deren Abfallprodukte, erhalten die lokale Homöostase und Blut-Netzhaut-Schranke aufrecht, regulieren den Blutfluss sowie Erregbarkeit der Neurone, und modulieren Immun- und Entzündungsreaktionen (Bringmann et al. 2006; Ponsioen et al. 2010; Bringmann & Wiedemann 2012). Reaktive Müllerzellen können auch lokale Apoptose und Degeneration von Neuronen und Photorezeptoren induzieren und sich zu Progenitorzellen entdifferenzieren (Bringmann et al. 2006). Wie Gliazellen überhaupt die innere Grenzmembran überwinden können und Bestandteil von epiretinalen Membranen werden können, war länger Gegenstand einer Debatte. Man dachte, dass Gliazellen die ILM nur durch Poren oder Lücken überwinden könnten (Wolter 1964; Roth & Foos 1972; William E. Smiddy et al. 1989). Gandorfer et al. zeigten jedoch wie selten Poren in der ILM sind und folgerten, dass epiretinale Proliferationen sich aus anderen Quellen speisen müssten, nämlich der Proliferation und Transdifferenzierung ansässiger Hyalozyten (Gandorfer et al. 2011). Die Arbeitsgruppe um Grierson und Hiscott zeigte am Kaninchen, dass sich Gliazellen bei entzündlichen Prozessen ihren Weg aktiv durch die ILM bahnen (Hiscott et al. 1988; Grierson et al. 1996).

Bei Membranen von Schichtforamina war GFAP häufig kolokalisiert mit Kollagen Typ I und II. Die Zellen könnten in das Kollagen eingebettet gewesen sein oder es selbst gebildet haben. Ponsioen et al. haben gezeigt, dass humane Müllerzellen *in vitro* unter anderem die Kollagene I – VII und damit klassische Kollagene von ILM und Glaskörper selbst synthetisieren können (Ponsioen et al. 2008). Allerdings können auch Hyalozyten Kollagen Typ II synthetisieren (Nishitsuka et al. 2007).

Bemerkenswert ist die Kolokalisation von CD64 und GFAP vor allem bei LMH-Präparaten (**vgl. Abb. 26**), denn CD64 ist ein klassischer Marker für Hyalozyten (Lazarus & Hageman 1994), während GFAP den Gliazellen zugeschrieben wird. Schumann et al. erbrachten 2011 erstmalig Beweise für humane GFAP-positive Hyalozyten, dies konnte wenig später bestätigt werden (Schumann et al. 2011; Parolini et al. 2011; Zhao et al. 2013). Hyalozyten stammen vom Knochenmark ab und werden der Monozytenlinie zugeordnet (Balazs et al. 1964; Sebag 1992; Lazarus & Hageman 1994; Qiao et al. 2005), daher ist eine Präsentation phagozytierter GFAP-positiver Zellreste denkbar, auch eine Entdifferenzierung in eine Vorläuferzelle mit Merkmalen von sowohl Glia- als auch Glaskörperzellen wurde diskutiert (Schumann et al. 2011; Parolini et al. 2011). Eine andere Interpretation für die Kolokalisation von GFAP und CD64 ist, dass der Vorgang von den Gliazellen ausging. Man weiß, dass sich entdifferenzierte Müllerzellen zu anderen Zelltypen ausdifferenzieren können, zum Beispiel zu Myofibroblasten (Guidry 2005) und möglicherweise auch Neuronen-ähnlichen Zellen (Bringmann et al. 2006). Eine Transdifferenzierung zu Hyalozyten ist vor diesem Hintergrund denkbar, ebenso wie

die Präsentation von CD64 infolge der Phagozytoseaktivität der Müllerzellen.

Ein weiterer interessanter Befund ist, dass CD45 und CD64 nur teilweise kolokalisiert waren (vgl. **Abb. 28 & 29**). Beides sind Hyalozytenmarker (Lazarus & Hageman 1994; Schumann et al. 2014), sodass eine Co-Expression und Kolokalisation zu erwarten gewesen wäre. Möglicherweise gibt es verschiedene Hyalozytenpopulationen oder die Expression variiert je nach Aktivitätszustand der Zelle. Sind die Müllerzellen durch eine Stresssituation aktiviert, ermöglichen sie Leukozyten die Migration vom Blut in die Netzhaut (Bringmann et al. 2006). Alle Leukozyten exprimieren CD45 (Nakano et al. 1990), das früher den Namen *leukocyte common antigen* (LCA) trug, sodass die fehlende Kolokalisation auch auf zwei unterschiedliche Zelltypen zurückzuführen sein könnte. Wir halten dies jedoch für unwahrscheinlich, da sich CD45 bei Pseudofoamaria kolokalisiert mit dem Antigen α -SMA zeigte, das von Leukozyten nicht exprimiert wird.

Die ERM der Pseudofoamaria färbten sich in unserer Studie am stärksten auf α -SMA (α -Smooth Muscle Actin) an. Aktinfilamente haben maßgeblichen Anteil an der Kontraktilität von Muskelzellen und Myofibroblasten. Die α -Isoform ist charakteristisch für Myofibroblasten (Nagamoto et al. 2000). Sie sind beim Gesunden nicht an der vitreoretinalen Grenzfläche zu finden. Ihr Auftreten ist Ausdruck eines reaktiven Prozesses. Myofibroblasten zeigten in vitro größere Kontraktionskräfte als glatte Muskelzellen (Dallon & Ehrlich 2010). Guidry et al. stellten an Zellkulturen von Schweine-Müllerzellen fest, dass reaktive Müllerzellen im Rahmen der Transdifferenzierung zu Myofibroblasten weniger GFAP exprimieren und im Gegenzug beginnen α -SMA zu exprimieren. Reife Myofibroblasten sind schließlich negativ auf GFAP und stark positiv auf α -SMA (Guidry et al. 2009). Zwischen GFAP-Reaktivität und klinischer Kontraktion der Membranen scheint eine inverse Korrelation zu bestehen (Sramek et al. 1989). Schumann et al. konnten auch bei hypozellulären Membranen α -SMA-positive Zellen nachweisen und folgerten daraus, dass es keiner lang anhaltender Zellproliferation bedarf und die Transdifferenzierung schon früh im Krankheitsverlauf erfolgen kann (Schumann et al. 2011).

GFAP zeigte sich weniger positiv als in ERM von LMH und nie kolokalisiert mit α -SMA. Die schwächere Expression von GFAP und fehlende Kolokalisation mit α -SMA könnte auch Ausdruck der fortgeschrittenen Transdifferenzierung von Müllerzellen zu Myofibroblasten sein. Intensive α -SMA-Reaktionen zeigten sich bei unseren Präparaten in stark gefalteten Bereichen der Membranen, die sich nicht entfalten und flach präparieren ließen (vgl. **Abb. 32**). Dies deckt sich mit der Beobachtung von Kohno et al. bei denen sich α -SMA hauptsächlich in kontrakten Bereichen der untersuchten Membranen fand. In der Studie der japanischen Arbeitsgruppe waren GFAP und α -SMA ebenso nicht kolokalisiert. Die Stimulation von Rinder-Hyalozyten in Zellkultur mit Zytokinen ergab eine starke Expression von α -SMA sowie eine Kontraktion des Einbettmediums, daraus folgerten sie, dass die Glaskörperzellen wahrscheinlich auch verantwortlich für Kontraktion von epiretinalen Membranen seien (Kohno et al. 2009). Hirayama et al. waren Jahre zuvor in einer ähnlichen Studie mit

vergleichbarem Ergebnis ebenso zu diesem Schluss gekommen (Hirayama et al. 2004). Einige Autoren räumten ein, dass sich ausdifferenzierte Myofibroblasten weder mit Gliazellmarkern (Guidry et al. 2009), noch mit Antikörpern gegen Monozyten (Kohno et al. 2009), was für Hyalozyten spräche, anfärbten.

Ob Myofibroblasten von Glia- oder Glaskörperzellen abstammen, war also bislang nicht abschließend geklärt. Die Transdifferenzierung beider Zelltypen wurde bis fast zum letzten Schritt nachgewiesen, deshalb durfte angenommen werden, dass sich sowohl Müllerzellen als auch Hyalozyten in Myofibroblasten transdifferenzieren können. Allerdings präsentierten Zhao et al. in einzelnen Fällen erstmals die Kollokalisierung von α -SMA und CD163 (Zhao et al. 2013), einem weiteren Marker für Mono- und Hyalozyten (Sakamoto 2003). Damit wiesen sie erstmals nach, dass ausdifferenzierte Myofibroblasten von Hyalozyten stammen (Zhao et al. 2013). In unserer Studie waren α -SMA und CD45 häufig kollokalisiert, was zuvor noch nicht beobachtet wurde. Dies bestätigt den Schluss von Zhao et al., dass Myofibroblasten sich aus Hyalozyten entwickeln können. Wie bereits erwähnt, ist CD45 auch ein gängiger Marker von Leukozyten, allerdings ist eine Expression von α -SMA bei Leukozyten unseres Wissens nicht bekannt, deshalb gehen wir davon aus, dass die doppelt positiven Zellen transdifferenzierte Hyalozyten sind. Dies bedeutet nicht, dass sich Myofibroblasten nicht auch aus Müllerzellen entwickeln können. Die von Guidry et al. gelieferten Indizien sind deutlich und seine Schlussfolgerung plausibel (Guidry et al. 2009), darum sind wir der Meinung, dass ausdifferenzierte Myofibroblasten ihren Ursprung sowohl in Hyalozyten als auch Müllerzellen haben können. Eine weitere Bestätigung dieser Hypothese insbesondere an humanen Müllerzellen ist wünschenswert.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Extrazellulärmatrix der untersuchten epiretinalen Membranen zeigte natives Glaskörperkollagen, neu-geformtes Kollagen und Fibrous Long Spacing Collagen (FLSC). FLSC ist ein Präzipitat von degradierten Kollagenfibrillen, das sich als Zeichen eines Abb- und Umbauprozesses der extrazellulären Matrix häufig in pathologischem Gewebe findet (Kajikawa et al. 1980; Dingemans & Teeling 1994; Eyden & Tzaphlidou 2001). Meist war es umgeben von neu geformtem Glaskörperkollagen und häufig zwischen epiretinaler Proliferation und ILM geschichtet, deswegen glauben wir, dass es sich hierbei um einen Umbauprozess von Glaskörperkollagen handelt, möglicherweise aus der prämakulären Rinde (Parolini et al. 2011).

Vereinzelt fanden wir Myofibroblasten, die positiv auf Nanogold-CD45 waren. Die Kollokalisierung mit α -SMA in der Immunhistochemie und der Fund CD45-positiver Myofibroblasten in der Immunelektronenmikroskopie bestätigen vor dem Hintergrund weiterer Veröffentlichungen (Hirayama et al. 2004; Kohno et al. 2009; Zhao et al. 2013) aus unserer Sicht, dass Hyalozyten zu Myofibroblasten transdifferenzieren können. Wir schließen die Expression dieses Antigens an der vitreoretinalen Grenzfläche und epiretinalen Membranen durch Leukozyten, die klassischerweise ebenso CD45-positiv sind, aus, da wir dafür weder immunhistologische noch ultrastrukturelle

Anhaltspunkte fanden. Entsprechend ist auch die überschneidende Kolokalisation von CD45 mit CD64 durch den Aktivationszustand, die Zellpopulation und den Differenzierungsgrad zu erklären und nicht durch das Vorhandensein anderer Zelltypen wie Leukozyten.

5.2 Differentialdiagnose Pseudofoamen versus Schichtfoamen

Es gibt Grenzfälle, in denen die Differentialdiagnose von Schicht- und Pseudofoamina entsprechend der aktuell gültigen Klassifikation schwerfällt. Gaudric sprach sich dafür aus, dass traktiv bedingte Schichtdefekte den Pseudofoamina zuzuordnen sind. Sie zeigten in der OCT intraretinale Pseudozysten, einen spitzwinkligen Spalt und zugleich alle typischen Merkmale eines Pseudofoamens: eine traktive ERM, eine aufgewölbte und verdickte Parafovea infolge des Zugs bei normaler zentraler fovealer Dicke, eine steil aufgestellte Fovea und keinen Gewebeverlust. Die en-face-OCT enthüllte mehrere Kontraktionszentren, klassische Pseudofoamina hingegen zeigten nur einen Fokus. Der Autor führte die Spaltbildung auf die multifokale Kontraktion der Membran zurück. Er betonte, dass der Spalt nur eine Aufdehnung der Henle-Fasern darstellt, keinen Gewebeverlust. „Pseudofoamina mit Spalt“ sprachen in seiner Studie genauso gut auf das Peeling der traktiven Membran an, wie die Vergleichsgruppe von Pseudofoamina ohne Spalt, deshalb seien sie den Pseudofoamina zuzuordnen. Manche Autoren würden sich jedoch von dem Spalt dazu verleiten lassen, sie fälschlicherweise als Schichtfoamen zu klassifizieren (Gaudric et al. 2013). Purtskhvanidze et al. folgen Gaudrics Einteilung und bestätigen seinen Standpunkt. In einer Interventions-Kontrollstudie mit einem Beobachtungszeitraum von mindestens 5 Jahren verglichen sie Schicht-, Pseudo- und Pseudofoamina mit Spalt. Pseudofoamina mit und ohne Spalt zeigten von Beginn an ähnliche Werte, während sich Schichtfoamina durch schlechtere Werte, eine stärkere Tendenz zur Progression und ein weniger gutes Ansprechen auf das Peeling von ERM und ILM auszeichneten (Purtskhvanidze et al. 2018).

Demgegenüber steht die Auffassung, dass traktiv bedingte Schichtdefekte keine Pseudofoamina sondern Schichtfoamina mit traktiver Komponente seien, Govetto et al. nannten sie deshalb „traktive Schichtfoamina“. Diese Kategorisierung erfolgte in ihrer deskriptiven Studie ausschließlich nach morphologischen Kriterien im OCT, ohne Korrelation mit funktionellen Parametern. Für die Diagnosestellung orientierten sie sich an Witkins und Dukers Kriterien. Ausschlaggebend für die Einordnung als Schichtfoamen war die intraretinale Spaltbildung zwischen äußerer plexiformer und nukleärer Schicht (Govetto et al. 2016).

Es ist fraglich, ob es bei der Aufdehnung der Henle-Fasern wirklich zu keinem Substanzverlust kommt, wie Gaudric et al. postulierten. Bei ausgeprägten Befunden (vgl. **Abb. 20**) ist es

unwahrscheinlich, dass die Henle-Faser-Schicht nur aufgedehnt wird. Vom Zerreißen von Fasern sollte ausgegangen werden, insbesondere da die ERM multifokal kontrahiert. Ein moderater Gewebeverlust kann anhand der OCT nicht ausgeschlossen werden, der per definitionem aber ein Ausschlusskriterium für die Diagnose Pseudofoamens wäre. Ferner zeigen „Pseudofoamina mit Spalt“ häufig eine unregelmäßig konturierte Fovea – typisch für Schichtfoamina. Nach rein morphologischen Kriterien ist Govettos Kategorisierung des traktiv bedingten Schichtdefekts gut nachvollziehbar. Die guten postoperativen morphologischen und vor allem funktionellen Ergebnisse bei Gaudric und Purtskhvanidze sind allerdings starke Hinweise dafür, dass diese Makulopathie als Form des Pseudofoamens zu betrachten und behandeln ist. Morphologische Kriterien scheinen hier weniger ins Gewicht zu fallen oder erst bei deutlicher Ausprägung relevant zu werden.

Vielleicht ist eine strikte Trennung der Entitäten nicht möglich und die strittigen Grenzfälle stellen eine Übergangsform dar. In ihrer Interventions-Kontroll-Studie definierten Romano et al. in ihrem Konzept einen Typ Schichtfoamen, der sich aus Pseudofoamina entwickelt (Romano et al. 2012). Auch andere Autoren konnten diese Beobachtung machen (Michalewski et al. 2011; Pang et al. 2015). Pang et al. dokumentierten über den Zeitraum von 39 Monaten die Genese eines Pseudofoamens, das sich zu einem „traktiven“ Schichtfoamen mit moderatem Gewebeverlust weiterentwickelte (Pang et al. 2015). Wie die Arbeitsgruppe von Gaudric, sehen auch Romano und Kollegen einen Zusammenhang zwischen multifokal kontrahierenden ERM und der Spaltbildung (Romano et al. 2012). Bei dieser Art des Schichtfoamens dominiere der tangentielle Zug durch eine kontraktile epiretinale Membran. In der Genese von Schichtfoamina, bei denen eine Pseudozyste als Vorläuferläsion beobachtet werden kann, dominiere der anterior-posteriore Zug infolge der Glaskörperabhebung (Romano et al. 2012). Wir halten diese Einschätzung für zutreffend. Neben den indirekten Hinweisen aus zahlreichen Untersuchungen (**vgl. Abschnitt 2.2.1**) gibt es zwei Studien, die bildlich die Genese eines Schichtfoamens infolge anterior-posterioren Zugs dokumentieren (Michalewska et al. 2012; Compera, Cereda, et al. 2017).

Die Immunfluoreszenzmikroskopie von Membranen von Pseudofoamina zeigte eine deutlich schwächere Expression von GFAP als bei ERM von LMH. Gliazellen oder transdifferenzierte Hyalozyten scheinen an Schichtfoamen-assoziierten Proliferationen wie auch an traktiven Membranen beteiligt zu sein. Der Unterschied in der Expression könnte ein Zeichen dafür sein, dass die Stressreaktion der Müllerzellen bei Pseudofoamina weniger stark ist und GFAP weniger hochreguliert wird. Das Pseudofoamen ist eine traktionsbedingte Konfigurationsänderung der Fovea und weist keinen Substanzdefekt auf, Gaudric et al. zufolge höchstens einen intraretinalen Riss (Gaudric et al. 2013). Das Schichtfoamen ist dagegen von einem kavitären Substanzdefekt geprägt und weist deshalb womöglich mehr und stärker reaktive Müllerzellen auf.

In der ultrastrukturellen Analyse ließen Membranen von Schichtforamina eine Prädominanz von Fibroblasten und Hyalozyten erkennen, die zu zahlreichen Zellhaufen („Clustern“) aggregiert waren. Entgegen unseren Erwartungen nach den GFAP-positiven Funden in der Immunhistochemie, fanden wir mittels Elektronenmikroskop keine Zellen, die typische Merkmale von Gliazellen aufwiesen, zum Beispiel zahlreiche, radiäre Zellfortsätze, ein ausgeprägtes Zytoskelett, intrazelluläre Faserstränge, eine Vielzahl an Vesikeln und weiteren Charakteristika. Anhand der Korrelation von Ultrastruktur und immunelektronenmikroskopischer Nanogold-Markierung entsprachen die GFAP-positiven Zellen am ehesten Fibroblasten. Es ist bekannt, dass auch sie das saure Gliafaserprotein exprimieren können (Hainfellner et al. 2001). Nicht alle „Fibroblasten“ waren bei uns positiv auf Nanogold-GFAP, womöglich Zeichen unterschiedlicher Populationen und Aktivitätszustände. Es ist dennoch denkbar, dass die GFAP-positiven Zellen Gliazellen waren und aufgrund von Ent- oder Transdifferenzierung ultrastrukturell nicht mehr als solche zu erkennen waren. Vor allem die Müllerzelle übernimmt in der Netzhaut vielfältige Funktionen (**vgl. Abschnitt 5.1**). Auch Hyalozyten können, wie oben beschrieben, GFAP exprimieren und infolge Aktivierung und Transdifferenzierung ultrastrukturell nicht mehr als solche zu identifizieren sein. Der Einsatz von weiteren Antikörpern könnte bei der Differenzierung der Zellen hilfreich sein.

Traktive Membranen von Pseudofoamina hingegen zeigten eine Prädominanz von Myofibroblasten, die mehrschichtig angeordnet waren. Teile der ILM, die an dieser Membran hafteten, waren in Falten geworfen. Für epiretinale Membranen von Pseudofoamina gibt es noch keine anderen Studien, allerdings gibt es Studien zu idiopathischen traktiven epiretinalen Membranen und kontraktiven Proliferationen in Assoziation mit anderen Retinopathien, die einen hohen Anteil oder eine Prädominanz von Myofibroblasten nachwiesen (Gandorfer et al. 2002; Gandorfer et al. 2005; Kohno et al. 2009; Schumann et al. 2006; Schumann et al. 2010; Schumann et al. 2011).

Die Verteilung der Kollagene (bei Schicht- und Pseudofoamina) ergab, dass die Kollagene bei Schichtforamina zum Teil chaotisch in den Zellhaufen verstreut waren, während sie bei Pseudofoamina in Schichten geordnet waren. Das dominierende native Glaskörperkollagen lag bei Pseudofoamina häufiger zwischen ERM und ILM geschichtet.

5.3 Heterogenität der Schichtforamina

Schichtforamina entstehen nach aktuellem Wissensstand vor allem durch Traktion. Der Prozess der Glaskörperabhebung übt anterior-posterioren und eventuell schrägen Zug aus, traktive ERM üben tangentialen Zug aus (Takahashi & Kishi 2000; Tanner et al. 2001; Haouchine et al. 2001; Kakehashi et al. 1996; Garretson et al. 2008; Romano et al. 2012; Compera, Cereda, et al. 2017). Vorläuferläsion scheint die Pseudozyste der Makula zu sein. Wenn diese traktionsbedingt nach innen aufreißt, entsteht ein Schichtforamen (Takahashi & Kishi 2000; Haouchine et al. 2001). Pseudozysten kommen auch beim zystoiden Makulaödem und in der Entwicklung von Makulaforamina vor (Gass 1975; Trempe et al. 1981; Unoki et al. 2009; Tsukada et al. 2011; Johnson & Gass 1988; Gaudric et al. 1999; Haouchine et al. 2001; Azzolini et al. 2001). Vitreopapilläre Adhäsion im Rahmen einer anormalen Glaskörperabhebung scheint die Entstehung mehrerer Pseudozysten und eines größeren Defekts zu begünstigen (Wang et al. 2009; Romano et al. 2012).

Das Makulaforamen ist durch einen größeren, durchgreifenden Netzhautdefekt gekennzeichnet, im Gegensatz zum Schichtforamen sind hier alle Schichten betroffen. Aufgrund dieser Beobachtung stellten Haouchine et al. die häufig als Fakt zitierte Theorie auf, dass das LMH auch ein abortiertes Makulaforamen sein könnte (Haouchine et al. 2001; Haouchine et al. 2004). Dabei ist es naheliegender, dass das LMH kein alternativer Endpunkt in der Entwicklung eines Makulaforamens ist, sondern beide Entitäten in frühen Stadien eine Pseudozyste als Ausdruck eines traktiven oder degenerativen Prozesses aufweisen. Dieser Prozess kann seinen Lauf wohl in verschiedene Richtungen nehmen. Schichtforamina können sich zu Makulaforamina entwickeln (Witkin et al. 2006; Castro & Duker 2010; Tanaka et al. 2011; Bottoni et al. 2013; Lai et al. 2016) und auch für den entgegengesetzten Fall gibt es Belege: Caramoy und Kollegen beobachteten mittels SD-OCT den Verschluss eines durchgreifenden Makulaforamens und die subsequente Entstehung eines Schichtforamens mit epiretinaler Membran innerhalb von drei Monaten. Der Befund war beim letzten Kontrolltermin weitere drei Monate später unverändert (Caramoy et al. 2011). Eine andere Gruppe berichtete über den spontanen Verschluss eines Makulaforamens mit ERM, das sich im Verlauf von zwei Jahren zu einem Schichtforamen entwickelte (García Fernández & Castro Navarro 2012). Compera et al. konnten sogar die Entwicklung eines Schichtforamens zu einem Makulaforamen und wieder zurück beobachten. Ein Patient entwickelte kurz nach inkompletter PVD mit VPA ein Schichtforamen mit LHEP. Im Nachgang einer Katarakt-OP progredierte der Schichtdefekt zu einem Makulaforamen, welches sich im Laufe eines Monats wieder zu einem LMH verschloss. Interessanterweise breitete sich die Schichtforamen-assoziierte epiretinale Proliferation im Verlauf bis in die Fovea aus (Compera, Cereda, et al. 2017).

Diese Beobachtung an LMH mit LHEP ist aus zwei anderen Studien bekannt (Pang et al. 2014; Lai et al. 2016). Möglicherweise stellt auch die Beschreibung eines intraretinalen Höckers („intraretinal bump“) durch Govetto et al. bei den als „degenerativ“ bezeichneten Schichtforamina derartiges LHEP-Material dar; die Reflektivität des Höckers entspricht der von LHEP-Material am Rande der Fovea und zeigt große Parallelen mit den OCT-Aufnahmen von Pang. (Govetto et al. 2016; Pang et al. 2014). Diese Funde von intrafovealer Proliferation sind bemerkenswert, denn die konventionellen, traktiven epiretinalen Membranen umgeben die Fovea ausnahmslos.

Schichtforamen-assoziierte epiretinale Proliferation ist eine vergleichsweise junge Entdeckung, die erst mit der Evolution der Kohärenztomographie zur hochauflösenden SD-OCT gemacht werden konnte (Parolini et al. 2011). Im Gegensatz zur konventionellen kontraktiven Membran zeigt sie keine Anzeichen von Traktion. Sie kommt exklusiv und in Kombination mit typischem, traktivem epiretinalen Material vor (Parolini et al. 2011; Pang et al. 2014; Schumann et al. 2015; Compera, Entchev & Schumann 2015; Compera, Entchev, Haritoglou, et al. 2015; Itoh et al. 2016; dell’Omo et al. 2017; Purtskhvanidze et al. 2018), stark gehäuft bei Schichtforamina, aber auch bei anderen Entitäten wurde sie schon ausgemacht, so bei idiopathischen ERM (Itoh et al. 2016), beim Makulaforamen (Itoh et al. 2016; Lai et al. 2016; Lai & Yang 2018) und in einzelnen Fällen sogar beim Pseudofoforamen (Schumann et al. 2015; Purtskhvanidze et al. 2018), hier natürlich in Kombination mit traktiven ERM. Aus diesem Grund wurde in einer Veröffentlichung vorgeschlagen „lamellar hole associated epiretinal proliferation“ zu ersetzen durch die inklusivere Bezeichnung „macular defect associated epiretinal proliferation (MDEP)“ (Lai et al. 2016).

Die Herkunft von LHEP und ihre Bedeutung für Verlauf und Therapie der Schichtforamina ist noch nicht klar. Man weiß, dass LMH bei denen LHEP dominieren, größere Netzhautdefekte und häufiger Unregelmäßigkeiten in der ellipsoiden Zone aufweisen und dass betroffene Patienten eine geringere Sehschärfe als Patienten mit LMH ohne LHEP erreichen (Parravano et al. 2013; Govetto et al. 2016; Choi et al. 2017; Parolini et al. 2011; Pang et al. 2014; Pang et al. 2015; Schumann et al. 2015; Lai et al. 2016; Itoh et al. 2016; dell’Omo et al. 2017).

Unter dem Stereomikroskop fielen LHEP-Membranen durch ihre locker-fluffige Konsistenz und ihre gelbliche Färbung auf. Im Gegensatz dazu waren die „klassischen“, traktiven Membranen der Pseudo- und auch der Schichtforamina robuster und zäh-elastisch sowie transparent. Dies deckt sich mit intraoperativen Beobachtungen und in-vitro-Untersuchungen vorheriger Studien (Parolini et al. 2011; Pang et al. 2014; Schumann et al. 2015; Lai et al. 2016; Pang et al. 2016). Das gelbe Pigment der Schichtforamen-assoziierten Proliferation ist noch nicht in einem experimentellen Ansatz untersucht worden. Möglicherweise ist es ein Xanthophyll (Pang et al. 2014). Xanthophylle kommen in der Makula in Form von Lutein und Zeaxanthin („Makulapigment“) vor. Sie schützen die Netzhaut vor der ionisierenden Wirkung des absorbierten blauen und ultravioletten Lichts und sind farbgebend

für den „gelben Fleck“, ferner scheinen sie die Sehfähigkeit unter verschiedenen Bedingungen zu verbessern (Krinsky et al. 2003; Stringham & Hammond 2008; Renzi & Hammond 2010; Yao et al. 2013). Lai und Kollegen fanden gelbes Pigment bei größeren Netzhautdefekten, Schichtforamina mit LHEP und durchgreifenden Makulaforamina, aber nur vereinzelt bei LMH ohne LHEP (Lai et al. 2016). Im Gegensatz zu unseren Beobachtungen fanden Pang et al. in einer Membran, die ausschließlich aus LHEP bestand, überwiegend Gliazellen (Pang et al. 2016). Dieser Fund ist aus mehreren Gründen begrenzt aussagekräftig. Zum einen handelt es sich um ein einzelnes Präparat. Davon fertigten die Autoren Paraffinschnitte an, färbten diese mit HE und PAS und betrachteten sie unter dem Lichtmikroskop. Da sie auf diese Weise keine Hyalozyten oder Fibroblasten ausmachen konnten, setzten sie lediglich Antikörper gegen Gliazellen ein. Ein sicherer Ausschluss anderer Zellen kann unserer Meinung nach nur mittels immunhistochemischer Verfahren oder bei höherer Vergrößerung, wie im Elektronenmikroskop, erfolgen, gerade in einem Umfeld, in dem die Transdifferenzierung von Zellen bekannt ist. Ferner weisen die beiden präsentierten Abbildungen der Immunhistochemie eine sehr starke beziehungsweise schwache Reaktion auf, beide mit untypisch homogenem Reaktionsmuster, möglicherweise Zeichen einer unspezifischen Reaktion (Pang et al. 2016). In der Studie von Parolini et al. wurden an epiretinalen Membranen von LMH wie bei uns Fibroblasten und Hyalozyten nachgewiesen, ferner fibröse Astrozyten, welche bei uns hingegen nur spärlich bei einem Präparat zu sehen waren, und keine Gliazellen (Parolini et al. 2011). Die unterschiedlichen Funde sind ein Hinweis auf die Heterogenität epiretinaler Membranen bei Schichtforamina.

Vor dem Hintergrund, dass Schichtforamina mit LHEP größere Netzhautdefekte aufweisen, dass die Proliferation auch in den fovealen Defekt hineinreichen kann und dass sie wahrscheinlich Makulapigment enthält, ist es plausibel, dass LHEP Ausdruck eines degenerativen Prozesses ist.

Die Arbeitsgruppe von Pang, Spaide und Freund hält es für möglich, dass das Gewebe eine Wundreaktion ist, welches die defekte Fovea stabilisiert. Diesem Gedanken folgend, wäre ein Peeling des Materials kontraproduktiv (Pang et al. 2014). Genau das hat die Arbeitsgruppe jedoch zwei Jahre später bei einer Patientin mit LHEP, welche bis in den Schichtdefekt reichte, gemacht. Bei der letzten postoperativen Untersuchung nach zwei Monaten zeigte sich das Schichtforamen bis auf einen Defekt in der ellipsoiden Zone verschlossen und die Sehschärfe der Patientin verbessert (Pang et al. 2016). Lai und seine Kollegen machten die Beobachtung, dass durchgreifende Makulaforamina mit LHEP kleiner als solche ohne LHEP sind und dass sie sich im Verlauf mehrfach vorübergehend verschlossen. Die Forscher zogen daraus den Schluss, dass LHEP eine Reaktion des Gewebes ist um das Makulaforamen zu versiegeln, während konventionelle ERM den Schichtdefekt bedingen und vergrößern können (Lai et al. 2016).

Die Proliferation nimmt mit der Zeit zu (Itoh et al. 2016; Govetto et al. 2016; Compera, Cereda, et al. 2017). Einige Autoren kommen zu dem Schluss, dass das LMH mit LHEP eine stabile Erkrankung ist (Bottoni et al. 2013; Pang et al. 2014; Pang et al. 2015; Schumann et al. 2015; dell’Omo et al. 2017), andere befinden sie für instabil (Zampedri et al. 2017; Compera, Schumann, et al. 2017), andere Autoren wiederum schließen indifferent und bewerten sie als „relativ stabil“ (Govetto et al. 2016; Purtskhvanidze et al. 2018).

Schichtforamina ohne LHEP werden deutlicher als stabile verlaufende (Theodosiadis et al. 2009; Tanaka et al. 2011; Bottoni et al. 2013) Erkrankung eingestuft, was auch daran liegt, dass die untersuchten Parameter, wie oben beschrieben, bei Studienbeginn besser sind.

Für die Einordnung von LMH mit LHEP gibt es verschiedene Vorschläge. Pang et al. sieht sie als eigenständige Entität (Pang et al. 2015), andere Autoren als Subtyp des Schichtforamens (Itoh et al. 2016; Compera, Schumann, et al. 2017). Govetto et al. stellten eine neue Klassifikation von Schichtforamina zur Debatte und unterteilten sie in „traktive“ und „degenerative“. Für ihre Einteilung differenzierten sie nach mehreren Kriterien. Traktive LMH seien durch eine kontraktile ERM, klar begrenzte, spitzwinklige intraretinale Spaltbildung zwischen äußerer plexiformer und äußerer nukleärer Schicht mit Gewebebrücken und zystoiden Räumen als Ausdruck tangentialer Traktion charakterisiert. Die Kontur des Defekts erinnere an einen stilisierten Schnurrbart. Schäden der äußeren Netzhautschichten träten vergleichsweise selten auf. Die ellipsoide Zone zeigte am Endpunkt ihrer Studie nur bei 7 von 43 „traktiven“ LMH Unregelmäßigkeiten. Degenerative LMH hingegen zeigten kein Zeichen von Traktion, einen runden, unscharf begrenzten, kavitären Defekt, der sich auf keine spezifische Schicht beschränke, außerdem Schichtforamen-assoziierte epiretinale Proliferation und häufig einen Höcker von homogener Reflektivität im fovealen Defekt. Die Kontur erinnere an einen Zylinderhut. Als weiteren Ausdruck der degenerativen Genese träten Schäden der äußeren Netzhautschichten vergleichsweise häufig auf. Unregelmäßigkeiten der ellipsoiden Zone fanden sich am Studienendpunkt bei allen 48 „degenerativen“ LMH (Govetto et al. 2016). Die Autoren merkten an, dass die Fovea von 11 von 102 Studienteilnehmern Merkmale beider Kategorien aufwies, blieben eine weitere Ausführung jedoch schuldig. Dennoch ist ihre Darstellung ein brauchbares Konzept um die Variabilität von Schichtforamina zu erklären und zu klassifizieren. Ein paar Jahre zuvor gab es bereits ähnliche Überlegungen (Casparis & Bovey 2011; Romano et al. 2012). Der Interpretation von Casparis und Bovey zufolge stellen Schichtforamina mit „pseudoschitischem Aussehen“ also scharf begrenzter, spitzwinkliger, intraretinaler Spaltbildung, entsprechend den „traktiven LMH“, eine frühe Form der Erkrankung dar, während Schichtforamina mit glatter Kontur, rundem, kavitärem Defekt sowie häufigerem und tieferem Netzhautschaden, entsprechend dem „degenerativen LMH“, eine chronische Form der Erkrankung seien (Casparis & Bovey 2011). Romano et al. postulierten ebenso einen traktiven Typ, der infolge multifokal

kontrahierender ERM womöglich als exazerbiertes Pseudofoamen entsteht, und zwei Typen LMH, welche dem degenerativen Typ von Govetto entsprechen. Der eine sei durch starken anterior-posterioren Zug im Rahmen der Glaskörperabhebung bedingt, der andere durch einen abortiven Prozess in der Pathogenese eines Makulaforamens (Romano et al. 2012).

In Zusammenschau mit den anderen oben aufgeführten Veröffentlichungen zu LMH mit LHEP, ist unserer Meinung nach das Konzept des degenerativen LMH plausibel, insbesondere, da die Netzhautdefekte in Assoziation mit LHEP größer und tiefergehend sind. Das „traktive“ Schichtfoamen bedarf, wie in **Abschnitt 5.2.** diskutiert, einer genauen Abgrenzung zum Pseudofoamen.

Neben der neu beschriebenen Form von Schichtforamina mit LHEP beziehungsweise degenerativen Schichtforamina, macht auch ein bestehendes Problem mit den aktuellen Diagnosekriterien nach Duker et al. eine Revision derselben dringend notwendig. Hierbei geht es um das vierte Kriterium, das für die Diagnosestellung das „Fehlen eines durchgreifenden Defekts bei intakten Photorezeptoren im Bereich des fovealen Schichtdefekts“ vorsieht (Duker et al. 2013). Bei genauer Anwendung dieses Kriteriums dürften die meisten Schichtforamina nicht als solche diagnostiziert werden. Zahlreiche Autoren geben an, nach Duker oder bei älteren Publikationen nach Witkin (Witkin et al. 2006) zu diagnostizieren – Duker übernahm Witkins Kriterien unverändert – , präsentieren aber in den Ergebnissen Schichtforamina mit Defekten in den äußeren Netzhautschichten (Lee et al. 2012; Reibaldi et al. 2012; Romano et al. 2012; Sun et al. 2013; Bottoni et al. 2013; Schumann et al. 2015; Govetto et al. 2016; Compera, Schumann, et al. 2017; Choi et al. 2017). Möglicherweise werten einige Autoren eine Unterbrechung der ellipsoiden Zone nicht als durchgreifenden Defekt, dennoch bedeutet eine Unterbrechung in diesem Bereich einen Schaden der Photorezeptoren, die per definitionem intakt sein sollten. Die Vielzahl an Publikationen mit dieser Problematik zeigt, dass jenes Kriterium überholt ist und einer Anpassung bedarf. Casparis und Bovey äußerten bereits Zweifel daran, dass die Photorezeptoren wirklich intakt sein müssen, da Unregelmäßigkeiten ein gewöhnlicher Befund bei länger bestehenden LMH seien (Casparis & Bovey 2011). Auch Romano et al. machten auf diese Unstimmigkeit aufmerksam. Nur 33% ihrer Schichtforamina mit VPA zeigten in der OCT eine intakte ellipsoide Zone (IS/OS) und intakte äußere Grenzmembran (Romano et al. 2012). Man bedenke, dass Witkin die Kriterien 2006 noch ohne hochauflösende OCT entwickelte. Jenes vierte Diagnosekriterium soll das Schichtfoamen vom durchgreifenden Makulafoamen abgrenzen. Es sollte eine Präzisierung dahingehend erfolgen, wie groß ein Defekt der äußeren Netzhautschichten bei ansonsten erfüllten Diagnosekriterien sein darf.

5.4 Therapeutische Relevanz

Die Frage der Abgrenzung und Einteilung der oben beschriebenen Entitäten sowie Misch- oder Übergangsformen nach Morphologie und zugrundeliegender Pathogenese ist keine akademische, sondern hat auch therapeutische Konsequenz.

Traktive Membranen sollen nach Möglichkeit gepeelt werden. Dieser kausale Therapieansatz verhindert das Fortschreiten der traktionsbedingten Spaltbildung und beseitigt die Metamorphopsien. Die genaue Indikationsstellung zur OP ist noch nicht standardisiert und ist wie die Diagnosestellung selbst Diskussionsgegenstand unter den Autoren. Grundsätzlich herrscht Konsens darüber, dass bei einer deutlichen Verschlechterung des Visus, Metamorphopsien und einer subjektiven Beeinträchtigung der Lebensqualität des Patienten eine OP ernsthaft in Erwägung gezogen werden sollte (Parolini et al. 2011; Sun et al. 2013; Haritoglou et al. 2014). Im richtigen Zeitfenster verbessert die Operation den Visus der Patienten in der Mehrheit der Fälle. LHEP Membranen sind an sich „indolent“ und könnten belassen werden. Die Proliferation nimmt mit der Zeit zu, scheint aber mehr Ausdruck des zugrundeliegenden Defekts als Ursache dafür zu sein. Die Indikationsstellung zum Peeling bei LHEP Membranen richtet aktuell sich nach den traktiven Anteilen in der epiretinalen Membran, die häufig begleitend auftreten. Für die Detektion traktiver Anteile hat sich die en-face OCT als sehr nützlich erwiesen (Gaudric et al. 2013; Vogt et al. 2017). Je intakter die äußeren Netzhautschichten sind, desto besser die Aussicht auf Verbesserung durch die Operation (Inoue et al. 2010; Itoh et al. 2012; Reibaldi et al. 2012; Parravano et al. 2013; Mitamura et al. 2013; Sun et al. 2013; Itoh et al. 2013; Pang et al. 2015; Choi et al. 2017), daher sollte auch bei nicht-aktiv bedingter Makulopathie nicht zu lange gewartet werden. Interessanterweise scheint dabei die äußere Grenzmembran eine besonders kritische Zone für die Regenerationsfähigkeit der Sehschärfe zu sein (Wakabayashi et al. 2009; Reibaldi et al. 2012; Parravano et al. 2013; Schumann et al. 2015). Die ELM ist die Zone in der Müllerzellen und Photorezeptoren ineinandergreifen. Möglicherweise benötigen die Photorezeptorzellen den Kontakt zu den Müllerzellen, die in der Netzhaut wichtige regulatorische Aufgaben übernehmen, um sich nach Verletzung zu organisieren (Mitamura et al. 2013). Bei der Indikationsstellung sollte selbstverständlich erwogen werden, dass der Eingriff neben den üblichen Operationsrisiken auch einige spezielle Risiken birgt. Dazu zählen die sehr seltenen iatrogenen Verletzungen der Netzhaut wie Netzhautforamen und ablatio retinae. Weniger selten ist mit einer Inzidenz von über 3% ist die Entstehung eines durchgreifenden Makulaforamens (Garretson et al. 2008; Casparis & Bovey 2011; Parolini et al. 2011; Figueroa et al. 2011; Sun et al. 2013). Häufigste Komplikation ist die Katarakt; die Linse reagiert sehr empfindlich auf intraokulare Manipulation. Ein beträchtlicher Teil der Patienten entwickelt nach Vitrektomie eine behandlungsbedürftige Linsentrübung. In einigen Interventionsstudien zur Pars Plana Vitrektomie

mit Peeling epiretinaler Membranen trat diese Komplikation sogar bei mehr als der Hälfte der präoperativ phaken Patienten auf (Garretson et al. 2008; Androudi et al. 2009; Lee et al. 2012; Sun et al. 2013). Aus diesem Grund wird bei bestehender Linsentrübung, nach ausführlicher Beratung und Einholung des informed consent des Patienten, eine kombinierte Operation durchgeführt und eine Hinterkammerlinse eingesetzt.

Die Erfahrungen mit durchgreifenden Makulaforamina zeigen, dass durch Vitrektomie und Peeling der ILM auch massivere Defekte noch an der Progression gehindert werden können und eine Verbesserung morphologischer und teilweise funktioneller Parameter erzielt werden kann. In einem geringen Teil der Fälle können sich epiretinale Membranen spontan ablösen, infolgedessen bessert sich die Morphologie der Fovea in der OCT und der Visus der Patienten (Theodossiadis et al. 2009; Nomoto et al. 2013; Walter & Flynn 2015; Kida et al. 2017; Purtskhvanidze et al. 2018). Auf dieses Ereignis zu hoffen kann höchstens nur eine Option sein, wenn noch keiner der oben genannten Gründe für eine Operation spricht.

5.5 Limitationen

Ungeachtet dessen, dass die vorliegende Arbeit mit größter Gewissenhaftigkeit und Sorgfalt erstellt wurde, sind folgende Einschränkungen anzuführen. Die Ergebnisse sind aufgrund der Größe des Kollektivs untersuchter epiretinaler Membranen von begrenzter Aussagekraft. Zudem limitiert die geringe Größe der Membranen die Anzahl der einsetzbaren Antikörper. Darüber hinaus variiert die Größe der Präparate selbst, zum einen bedingt durch das Peeling, zum anderen kann es bei der Bergung der Membran aus dem Auginneren und der Verfrachtung in das Probengefäße zu Verlust von Material kommen.

5.6 Schlussfolgerung

Epiretinale Membranen von Schicht- und Pseudofoamina weisen eine komplexe Histologie auf. Die konventionelle Attribution der Antigene zu bestimmten Zellen ist immer wieder zu hinterfragen. GFAP wird klassischerweise Gliazellen zugeschrieben, die korrelative Mikroskopie und mehrere Studien zeigten jedoch auch Expression bei Hyalozyten und Fibroblasten. Hyalozyten exprimieren CD45 zum Teil auch noch wenn sie sich zu einem Myofibroblasten transdifferenziert haben. Für die Transdifferenzierung von Gliazellen zu Myofibroblasten gibt es deutliche Hinweise. Aktivierte Glia- und Glaskörperzellen sind die zentralen Spieler bei epiretinalen Membranen. Beide können Glaskörperkollagen synthetisieren, beide können zu Myofibroblasten als Hauptbestandteil traktiver Membranen transdifferenzieren. Ferner nehmen aktivierte Fibrozyten, Fibroblasten, die wir häufig bei Membranen von Schichtfoamina fanden, eine zentrale Rolle ein.

Das Zellmilieu epiretinaler Membranen ist geprägt von Proliferation, De- und Transdifferenzierung, auch die extrazelluläre Matrix weist durch ein unruhiges Verteilungsmuster der Kollagene und dem Auftreten von FLSC deutliche Zeichen eines reaktiven Prozesses und der Reorganisation auf.

Die kontraktilen Proliferationen der Pseudofoamina scheinen in Zelltyp, extrazellulärer Matrix und Verteilungsmuster denen anderer Retinopathien zu gleichen. Wieso manche traktive Membranen ein Pseudofoamen zur Folge haben und andere nicht, ist unklar. Nicht nur die Pathogenese der assoziierten Makulopathien, sondern auch der epiretinalen Membranen selbst ist unklar. Der Einsatz weiterer Antikörper in der korrelativen Mikroskopie flachpräparierter epiretinaler Membranen kann dazu beitragen, die komplexen Prozesse von De- und Transdifferenzierung aufzuklären und die Membranen weiter zu analysieren.

Die makroskopische Konstante in der Pathogenese von epiretinalen Membranen, Schicht- und Pseudofoamina ist die Traktion. Hauptursache für Traktion an der Makula ist die normale und insbesondere die anormale altersbedingte Glaskörperabhebung. Epiretinale Membranen entstehen durch traktionsbedingte Reaktionen der Netzhautzellen und sind durch Ausübung tangentialen Zugs selbst an der Entstehung von Schicht- und Pseudofoamen maßgeblich beteiligt. Degradiertes Glaskörperkollagen oder Reste bei Vitreoschisis sind ein weiterer Faktor in der Entstehung von ERM. Schichtfoamina scheinen zu entstehen, wenn die Zugkräfte zusätzlichen einen anterior-posterioren Vektor aufweisen, bedingt durch die PVD, und bei Spontanruptur von Pseudozysten bei zystoidem Makulaödem. Pseudofoamina hingegen sind ausschließlich durch tangentielle Kontraktion einer ERM bedingt. Wir gehen davon aus, dass bei multifokaler Kontraktion einer epiretinalen Membran ebenso anterior-posterior wirkende Kräfte (Scherkräfte) auftreten und auf diese Weise traktive Schichtdefekte unabhängig vom Einwirken des Glaskörpers entstehen können. Diese Pathologie ist nach aktuellen Diagnosekriterien am ehesten als Pseudofoamen zu kategorisieren. Allerdings gibt es

Übergangsformen von Pseudo- zu Schichtforamen; insbesondere persistierender multifokaler Zug einer epiretinalen Membran hat früher oder später einen Substanzverlust infolge von Stress und reaktiven Vorgängen der Netzhautzellen. Die Membranen von Pseudoforamina scheinen denen von anderen traktiven Makulopathien zu gleichen. Dadurch ist eine Übergangsform von Pseudo- zu Schichtforamen umso mehr denkbar.

Das Peeling kontraktile Membranen stellt die kausale Therapie von Pseudoforamina und traktiv bedingten Schichtdefekten dar, derzeit der einzig verfügbare Ansatz. Auch für Schichtforamina ist dies die einzige Behandlungsmöglichkeit. Ihre Membranen weisen traktive Anteile, aber häufig auch nicht-kontraktile, Schichtforamen assoziierte epiretinale Proliferation (LHEP) auf, in manchen Fällen besteht die ERM ausschließlich aus LHEP. Dieses Gewebe findet sich meist bei Schichtforamina und ist mit einem größeren, kavitären Netzhautdefekt assoziiert. Dabei ist sie nicht Ursache für den Defekt, sondern Ausdruck eines zugrundeliegenden degenerativen Prozesses. Die Indikation zum Peeling ist hier zurückhaltender zu stellen, orientiert sich aber am Vorhandensein kontraktile Membrananteile, um eine traktiv bedingte Progression zu verhindern.

Eine Reihe neuer Erkenntnisse seit Etablierung der SD-OCT macht eine neue Klassifikation traktiver Makulopathien obligat: Die Problematik, dass Schichtforamina in Diskrepanz zu den aktuell gültigen Diagnosekriterien häufig Defekte in den äußeren Netzhautschichten wie der ellipsoiden Zone aufweisen. Die Entdeckung von LHEP und Beschreibung degenerativer Schichtforamina sowie die offenkundige Schwierigkeit, traktive Schichtdefekte und Übergangsformen zwischen den Entitäten in das aktuelle System einzuordnen.

6 Zusammenfassung

Die Verbesserung der optischen Kohärenztomographie in den letzten Jahren hat neue Details zu Schicht-, Pseudofoamina und assoziierten Membranen geliefert. Man erkannte, dass es neben den kontraktiven epiretinalen Proliferationen, die sich in der OCT als hyperreflektives Band darstellten, auch einen weiteren Typ Membran gibt. Dieser zeigte sich in der OCT als hyporeflektives Band und wies keinerlei Zeichen von Kontraktion auf. Er findet sich vornehmlich bei Schichtfoamina, deshalb die Bezeichnung als „Schichtfoamen-assoziierte-epiretinale-Proliferation“.

Die hochauflösende SD-OCT brachte außerdem mit sich, dass Schicht- und Pseudofoamen gemäß den aktuellen Diagnosekriterien nicht immer klar voneinander abgegrenzt werden können.

Wir untersuchten erstmals systematisch die epiretinalen Membranen von Pseudofoamina in einem experimentellen Ansatz und verglichen sie mit den Membranen von Schichtfoamina. Unser Ziel war es neue Erkenntnisse zur Pathogenese beider Makulopathien und ihrer epiretinalen Proliferationen zu gewinnen sowie Unterschiede und Gemeinsamkeiten auszumachen, welche für die Differentialdiagnostik von Bedeutung sind. Hierfür untersuchten wir die operativ entfernten epiretinalen Membranen einschließlich inneren Grenzmembranen von 25 Augen von 25 Patienten, die sich auf 11 Schicht- und 14 Pseudofoamina verteilten, auflichtmikroskopisch, mittels Phasen- und Interferenzkontrastmikroskopie, in Zellkernfärbung, sowie mittels Immunfluoreszenz- und der Transmissionselektronenmikroskopie. Um Ultrastruktur und Fluoreszenz korrelieren zu können setzten wir Immunogold ein.

In dieser Studie applizierten wir die Antikörper auf flach präparierte Membranen, eine Methode, welche aussagekräftiger als die konventionelle Serienschnittpräparation ist. Wir setzten Antikörper gegen Gliazellen (Anti-GFAP), Glaskörperzellen (Anti-CD45 und Anti-CD64), kontraktile Filamente (Anti- α -SMA) und Kollagene (Anti-Kollagen Typ I-III) ein. Immunogold wurde auf Gliazellen (Anti-GFAP-Nanogold), Glaskörperzellen (Anti-CD45-Nanogold) und einem typischen Glaskörperkollagen (Anti-Kollagen Typ II- Nanogold) angewandt. Ferner färbten wir die Zellkerne mit DAPI an, um nach Messung der Membranfläche die Zelldichte zu ermitteln. Die Spanne der Zelldichte war bei beiden Entitäten groß, ein Zeichen für die Heterogenität der gepeelten Membranen. Manche Membranen waren voller Zellhaufen, während andere nur eine dünne Zellschicht oder spärlich Zellen aufwiesen. Die Immunfluoreszenzmikroskopie brachte neben zu erwartenden Färbemustern einige interessante Funde hervor. GFAP als Gliazellmarker fand sich teilweise kolokalisiert mit dem Hyalozytenmarker CD64 und kennzeichnete transdifferenzierte Hyalozyten. Mittels Immunogold konnten wir GFAP-positive Fibroblasten ausmachen. CD45 als Hyalozytenmarker zeigte sich bei der Fluoreszenz kolokalisiert mit α -SMA und in der Immunelektronenmikroskopie teilweise auf Myofibroblasten. Die ultrastrukturelle Analyse ergab eine Dominanz von Zellaggregationen aus Fibroblasten und

Hyalozyten bei Membranen von Schichtforamina, während die ERM von Pseudofoamina von kontraktiven, in Schichten geordneten Myofibroblasten geprägt war. Die extrazelluläre Matrix zeigte deutliche Anzeichen von Umbauprozessen der Kollagene. Insgesamt stellen sich die epiretinalen Membranen von Schicht- und Pseudofoamina als Orte von lebhafter Zellproliferation mit aktiven „Blastenzellen“ dar, die zum Teil reich an Glykogen waren. In diesem Milieu scheint die Ent- und Transdifferenzierung von Zellen, insbesondere von Hyalozyten die Regel zu sein und den Einsatz weiterer Antikörper und Analysemethoden nötig zu machen. Diese Studie zeigte ferner, dass traktive Membranen von Pseudofoamina den traktiven Membranen von Schichtforamina und idiopathischen traktiven Membranen gleichen. In mehreren klinischen SD-OCT-Studien wird die Möglichkeit einer Progression von Pseudofoamina zu Schichtforamina postuliert. Die histopathologische Entsprechung traktiver Membranen von Pseudofoamina zu anderen traktiven Membranen, wie in Schichtforamina, lässt diese Hypothese plausibel erscheinen.

Für die traktiven Makulopathien ist eine neue Klassifikation dringend notwendig. Es gilt noch zu klären, wie traktiv bedingte Schichtdefekte einzuordnen sind. Eine neue Klassifikation sollte ferner der degenerativen Genese von Schichtforamina mit LHEP Rechnung tragen und auch eine praktikable Abgrenzung zum durchgreifenden Makulafornen ermöglichen, da sich äußere Netzhautdefekte im Verlauf bei einem Großteil der Schichtforamina finden.

Trotz dass Schichtforamina mit LHEP größere Substanzdefekte als LMH mit konventionellen Membranen aufweisen, orientiert sich die Empfehlung zur Vitrektomie und Peeling der epiretinalen Membran an dem Vorhandensein von traktiven Anteilen. LHEP ist Ausdruck eines zugrundeliegenden degenerativen Prozesses und nicht ursächlich dafür. Die Lösung der tangentialen Traktion verhindert die Progression der Spaltbildung und beseitigt die für Patienten sehr störenden Metamorphopsien. Bei Fehlen von traktiven Anteilen sollte die Indikation zurückhaltend gestellt werden, da mit dem Eingriff nicht selten die Komplikation einer Linsentrübung einhergeht und die -geringe- Gefahr besteht, einen durchgreifenden Makuladefekt zu provozieren. Eine kritische Schwelle für das Zuwarten scheint jedoch die äußere Grenzmembran zu sein. Defekte, die über die ELM hinausgehen, haben eine schlechtere Prognose und geringere Chancen auf Verbesserung der Sehschärfe des Patienten. Weitere klinische Studien sind notwendig, um den Rahmen für die Indikation auf ein Zeitfenster einzugrenzen, in dem Risiko und Nutzen der Operation, als bislang einzig verfügbarer Therapie, in optimalem Verhältnis stehen.

7 Literaturverzeichnis

- Akiba, J., Ueno, N. & Chakrabarti, B., 1994. Mechanisms of photo-induced vitreous liquefaction. *Current eye research*, 13(7), pp.505–12.
- Allen, A.W. & Gass, J.D.M., 1976. Contraction of a Perifoveal Epiretinal Membrane Simulating a Macular Hole. *American Journal of Ophthalmology*, 82(5), pp.684–691.
- Andley, U.P. & Chakrabarti, B., 1983. Role of singlet oxygen in the degradation of hyaluronic acid. *Biochemical and biophysical research communications*, 115(3), pp.894–901.
- Androudi, S., Stangos, A. & Brazitikos, P.D., 2009. Lamellar Macular Holes: Tomographic Features and Surgical Outcome. *American Journal of Ophthalmology*, 148(3), p.420–426.e1.
- Azzolini, C., Patelli, F. & Brancato, R., 2001. Correlation between optical coherence tomography data and biomicroscopic interpretation of idiopathic macular hole. *American Journal of Ophthalmology*, 132(3), pp.348–355.
- Balazs, E.A. et al., 1964. Studies on the structure of the vitreous body. *Experimental Eye Research*, 3(1), pp.57–71.
- Balazs, E.A. & Denlinger, J.L., 1982. Aging changes in the vitreous. In R. Sekuler, D. Kline, & K. Desmukes, eds. *Aging and human visual function. Vol2: Modern Aging Research*. New York: Liss, pp. 45–57.
- Balazs, E.A. & Denlinger, J.L., 1984. The Vitreous. In H. Davson, ed. *The Eye*. London: Academic Press, pp. 533–589.
- Benninghoff & Drenckhahn, 2008. Visuelles System. In D. Drenckhahn & J. Waschke, eds. *Taschenbuch Anatomie*. Elsevier GmbH, pp. 529–531.
- Bishop, P.N. et al., 2004. Age-related changes on the surface of vitreous collagen fibrils. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(4), pp.1041–1046.
- Bishop, P.N., 2000. Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel. *Progress in retinal and eye research*, 19(3), pp.323–44.
- Bottoni, F. et al., 2013. The natural history of lamellar macular holes: A spectral domain optical coherence tomography study. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 251(2), pp.467–475.
- Bringmann, A. et al., 2006. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in retinal and eye research*, 25(4), pp.397–424.
- Bringmann, A. & Wiedemann, P., 2009. Involvement of Müller glial cells in epiretinal membrane formation. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 247(7), pp.865–883.
- Bringmann, A. & Wiedemann, P., 2012. Müller Glial Cells in Retinal Disease. *Ophthalmologica*, 227(1), pp.1–19.
- Burk, A. & Burk, R., 2014. Netzhaut- und Glaskörperchirurgie. In A. Burk & R. Burk, eds. *Checkliste Augenheilkunde*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, pp. 505–507.
- Byon, I.S. et al., 2015. Natural History of Idiopathic Epiretinal Membrane in Eyes with Good Vision Assessed by Spectral-Domain Optical Coherence Tomography. *Ophthalmologica*, 234(2), pp.91–

100.

- Caramoy, A., Fauser, S. & Kirchhof, B., 2011. Spontaneous progression of a full-thickness macular microhole to a lamellar macular hole in spectral domain optical coherence tomography. *GMS ophthalmology cases*, 1(Figure 1), p.Doc02.
- Casparis, H. & Bovey, E.H., 2011. Surgical treatment of lamellar macular hole associated with epimacular membrane. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 31(9), pp.1783–90.
- Castro, L.C. & Duker, J.S., 2010. Spontaneous Progression of a Long-Standing Lamellar Macular Hole into a Full-Thickness Macular Hole. *Ophthalmic Surgery, Lasers, and Imaging*, 265(21), p.2788.
- Casuso, L.A. et al., 2001. Long-term follow-up of unoperated macular holes. *Ophthalmology*, 108(6), pp.1150–1155.
- Chang, L.K., Koizumi, H. & Spaide, R.F., 2008. Disruption of the photoreceptor inner segment-outer segment junction in eyes with macular holes. *Retina*, 28(7), pp.969–975.
- Chang, W.-C. et al., 2017. Vitrectomy with or without internal limiting membrane peeling for idiopathic epiretinal membrane: A meta-analysis. K. Mori, ed. *PloS one*, 12(6), p.e0179105.
- Chen, J.C. & Lee, L.R., 2008. Clinical spectrum of lamellar macular defects including pseudoholes and pseudocysts defined by optical coherence tomography. *The British journal of ophthalmology*, 92, pp.1342–1346.
- Choi, W.S., Merlau, D.J. & Chang, S., 2017. VITRECTOMY FOR MACULAR DISORDERS ASSOCIATED WITH LAMELLAR MACULAR HOLE EPIRETINAL PROLIFERATION. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, p.1.
- Compera, D., Cereda, M.G., et al., 2017. DEVELOPMENT AND PROGRESSION OF A LAMELLAR MACULAR HOLE WITH LAMELLAR HOLE-ASSOCIATED EPIRETINAL PROLIFERATION. *Retinal cases & brief reports*, p.1.
- Compera, D., Entchev, E., Haritoglou, C., et al., 2015. Lamellar Hole-Associated Epiretinal Proliferation in Comparison to Epiretinal Membranes of Macular Pseudoholes. *American journal of ophthalmology*, 160(2), p.373–384.e1.
- Compera, D., Schumann, R.G., et al., 2017. Progression of lamellar hole-associated epiretinal proliferation and retinal changes during long-term follow-up. *British Journal of Ophthalmology*, p.bjophthalmol-2016-310128.
- Compera, D., Entchev, E. & Schumann, R.G., 2015. Correlative Microscopy of Lamellar Hole-Associated Epiretinal Proliferation. *Journal of Ophthalmology*, 2015, pp.1–8.
- Dallon, J.C. & Ehrlich, H.P., 2010. Differences in the mechanism of collagen lattice contraction by myofibroblasts and smooth muscle cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(2), pp.362–369.
- dell’Omo, R. et al., 2017. Role of Lamellar Hole–Associated Epiretinal Proliferation in Lamellar Macular Holes. *American Journal of Ophthalmology*, 175, pp.16–29.
- Dingemans, K.P. & Teeling, P., 1994. Long-Spacing Collagen and Proteoglycans in Pathologic Tissues. *Ultrastructural Pathology*, 18(6), pp.539–547.
- Duker, J.S. et al., 2013. The International Vitreomacular Traction Study Group Classification of Vitreomacular Adhesion, Traction, and Macular Hole. *Ophthalmology*, 120(12), pp.2611–2619.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S. & Lee, Y.L., 2000. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research*, 25(9–10), pp.1439–51.

- Eyden, B. & Tzaphlidou, M., 2001. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy. *Micron*, 32(3), pp.287–300.
- Fercher, A.F. et al., 1993. In vivo optical coherence tomography. *American journal of ophthalmology*, 116(1), pp.113–4.
- Figueroa, M.S., Noval, S. & Contreras, I., 2011. Macular structure on optical coherence tomography after lamellar macular hole surgery and its correlation with visual outcome. *Canadian journal of ophthalmology. Journal canadien d'ophtalmologie*, 46(6), pp.491–7.
- Fisher, S.K. & Lewis, G.P., 2003. Müller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: a review and reconsideration of recent data. *Vision Research*, 43(8), pp.887–897.
- Foos, R.Y., 1972. Vitreoretinal juncture; topographical variations. *Investigative ophthalmology*, 11(10), pp.801–8.
- Foos, R.Y. & Wheeler, N.C., 1982. Vitreoretinal juncture. Synchysis senilis and posterior vitreous detachment. *Ophthalmology*, 89(12), pp.1502–12.
- Gandorfer, A. et al., 2005. Epiretinal pathology of diffuse diabetic macular edema associated with vitreomacular traction. *American Journal of Ophthalmology*, 139(4), pp.638–652.
- Gandorfer, A., Scheler, R., Schumann, R., et al., 2009. Interference microscopy delineates cellular proliferations on flat mounted internal limiting membrane specimens. *The British journal of ophthalmology*, 93(1), pp.120–2.
- Gandorfer, A., Scheler, R., Haritoglou, C., et al., 2009. Pathology of the macular hole rim in flat-mounted internal limiting membrane specimens. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 29(8), pp.1097–105.
- Gandorfer, A. et al., 2011. Pores of the inner limiting membrane in flat-mounted surgical specimens. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 31, pp.977–981.
- Gandorfer, A. et al., 2012. Residual cellular proliferation on the internal limiting membrane in macular pucker surgery. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 32(3), pp.477–85.
- Gandorfer, A., Rohleder, M. & Kampik, A., 2002. Epiretinal pathology of vitreomacular traction syndrome. *The British Journal of Ophthalmology*, 86(8), pp.902–909.
- García Fernández, M. & Castro Navarro, J., 2012. Spontaneous closure of stage IV idiopathic full-thickness macular hole and late reopening as a lamellar macular hole: a case report. *Journal of medical case reports*, 6(1), p.169.
- Garretson, B.R. et al., 2008. Vitrectomy for a Symptomatic Lamellar Macular Hole. *Ophthalmology*, 115(5), pp.884–887.
- Gass, J.D., 1975. Lamellar macular hole: a complication of cystoid macular edema after cataract extraction: a clinicopathologic case report. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 73, pp.231–50.
- Gass, J.D. & Norton, E.W., 1969. Follow-up study of cystoid macular edema following cataract extraction. *Transactions - American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology. American Academy of Ophthalmology and Otolaryngology*, 73(4), pp.665–82.
- Gaudric, A. et al., 1999. Macular hole formation: new data provided by optical coherence tomography. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 117(6), pp.744–51.

- Gaudric, A. et al., 2013. Macular pseudoholes with lamellar cleavage of their edge remain pseudoholes. *American Journal of Ophthalmology*, 155(4), p.733–742.e4.
- Gloesmann, M. et al., 2003. Histologic correlation of pig retina radial stratification with ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(4), pp.1696–1703.
- Le Goff, M.M. & Bishop, P.N., 2008. Adult vitreous structure and postnatal changes. *Eye*, 22(10), pp.1214–1222.
- Govetto, A. et al., 2016. Lamellar Macular Hole: Two Distinct Clinical Entities? *American Journal of Ophthalmology*, 164, pp.99–109.
- Green, W.R. & Sebag, J., 2001. *Vitreous and the vitreo-retinal interface* 3rd ed. S. J. Ryan & C. Wilkinson, eds., St. Louis: Mosby.
- Grehn, F., 2012. *Augenheilkunde* 31st ed., Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Greven, C.M., Madison Slusher, M. & Cxyz, C.N., 1998. The natural history of macular pseudoholes. *American Journal of Ophthalmology*, 125(3), pp.360–366.
- Greven, C.M., Slusher, M.M. & Weaver, R.G., 1988. Epiretinal Membrane Release and Posterior Vitreous Detachment. *Ophthalmology*, 95(7), pp.902–905.
- Grierson, I. et al., 1996. Non-vascular vitreoretinopathy: The cells and the cellular basis of contraction. *Eye*, 10(6), pp.671–684.
- Guidry, C., 2005. The role of Müller cells in fibrocontractive retinal disorders. *Progress in Retinal and Eye Research*, 24(1), pp.75–86.
- Guidry, C., King, J.L. & Mason, J.O., 2009. Fibrocontractive Müller Cell Phenotypes in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(4), p.1929.
- Hainfellner, J.A. et al., 2001. Fibroblasts can express glial fibrillary acidic protein (GFAP) in vivo. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 60(5), pp.449–61.
- Haouchine, B. et al., 2004. Diagnosis of macular pseudoholes and lamellar macular holes by optical coherence tomography. *American Journal of Ophthalmology*, 138(5), pp.732–739.
- Haouchine, B., Massin, P. & Gaudric, A., 2001. Foveal pseudocyst as the first step in macular hole formation. *Ophthalmology*, 108(1), pp.15–22.
- Haritoglou, C. & Schumann, R.G., 2017. [Indications and surgical approach for lamellar macular holes and pseudoholes]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*, 114(12), pp.1117–1121.
- Haritoglou, C., Schumann, R.G. & Wolf, A., 2014. Epiretinale Gliose. *Der Ophthalmologe*, 111(5), pp.485–497.
- Hikichi, T., 1997. Cross-linking of vitreous collagen and degradation of hyaluronic acid induced by bilirubin-sensitized photochemical reaction. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 41(3), pp.154–159.
- Hikichi, T. et al., 1995. Relationship between premacular cortical vitreous defects and idiopathic premacular fibrosis. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 15(5), pp.413–6.
- Hirayama, K. 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), p.3896.
- Hisatomi, T. et al., 2005. A New Method for Comprehensive Bird's-eye Analysis of the Surgically Excised Internal Limiting Membrane. *American Journal of Ophthalmology*, 139(6), pp.1121–1122.
- Hisatomi, T., 2006. Cellular Migration Associated With Macular Hole. *Archives of Ophthalmology*, 124(7), p.1005.
- Hiscott, P.S., Grierson, I., Trombetta, C.J., et al., 1984. Retinal and epiretinal glia--an immunohistochemical study. *The British journal of ophthalmology*, 68(10), pp.698–707.
- Hiscott, P.S. et al., 1988. The role of inflammation in the development of epiretinal membranes. *Current eye research*, 7(9), pp.877–92.
- Hiscott, P.S., Grierson, I. & McLeod, D., 1984. Retinal pigment epithelial cells in epiretinal membranes: an immunohistochemical study. *The British journal of ophthalmology*, 68(10), pp.708–15.
- Hogan, M.J., 1963. The Vitreous, its structure, and relation to the ciliary body and retina. Proctor Award Lecture. *Investigative ophthalmology*, 2, pp.418–45.
- Huang, D. et al., 1991. Optical coherence tomography. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5035), pp.1178–81.
- Inoue, M. et al., 2010. Inner Segment/Outer Segment Junction Assessed by Spectral-Domain Optical Coherence Tomography in Patients with Idiopathic Epiretinal Membrane. *American Journal of Ophthalmology*, 150(6), pp.834–839.
- Itakura, H. et al., 2013. Observation of Posterior Precortical Vitreous Pocket Using Swept-Source Optical Coherence Tomography. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(5), p.3102.
- Itakura, H. & Kishi, S., 2011. Aging changes of vitreomacular interface. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 31(7), pp.1400–4.
- Itoh, Y. et al., 2013. Correlation Between Foveal Cone Outer Segment Tips Line and Visual Recovery After Epiretinal Membrane Surgery. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(12), p.7302.
- Itoh, Y. et al., 2016. Prevalence and characteristics of hyporeflexive preretinal tissue in vitreomacular interface disorders. *British Journal of Ophthalmology*, 100(3), pp.399–404.
- Itoh, Y. et al., 2012. Significant Correlation Between Visual Acuity and Recovery of Foveal Cone Microstructures After Macular Hole Surgery. *American Journal of Ophthalmology*, 153(1), p.111–119.e1.
- Johnson, M.W., 2005. Perifoveal vitreous detachment and its macular complications. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 103(4), pp.537–67.
- Johnson, R.N. & Gass, J.D., 1988. Idiopathic macular holes. Observations, stages of formation, and implications for surgical intervention. *Ophthalmology*, 95(7), pp.917–24.
- Kajikawa, K., Nakanishi, I. & Yamamura, T., 1980. The effect of collagenase on the formation of fibrous long spacing collagen aggregates. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 43(5), pp.410–7.

- Takehashi, A., Schepens, C.L. & Trempe, C.L., 1996. Vitreomacular observations. II. Data on the pathogenesis of idiopathic macular breaks. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 234(7), pp.425–33.
- Takehashi, A., Ueno, N. & Chakrabarti, B., 1994. Molecular Mechanisms of Photochemically Induced Posterior Vitreous Detachment. *Ophthalmic Research*, 26(1), pp.51–59.
- Kampik, A., 1981. Epiretinal and Vitreous Membranes. Comparative Study of 56 Cases. *Archives of Ophthalmology*, 99(8), p.1445.
- Kampik, A. et al., 1980. Ultrastructural Features of Progressive Idiopathic Epiretinal Membrane Removed by Vitreous Surgery. *American Journal of Ophthalmology*, 90(6), pp.797–809.
- Kida, T. et al., 2017. Long-term evaluation of spontaneous release of epiretinal membrane and its possible pathogenesis. *Clinical Ophthalmology*, Volume 11, pp.1607–1610.
- Kishi, S. & Shimizu, K., 1990. Posterior precortical vitreous pocket. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 108(7), pp.979–82.
- Kohno, R. et al., 2009. Possible contribution of hyalocytes to idiopathic epiretinal membrane formation and its contraction. *British Journal of Ophthalmology*, 93(8), pp.1020–1026.
- Kohno, T. et al., 1987. Immunofluorescent studies of fibronectin and laminin in the human eye. *Investigative ophthalmology & visual science*, 28(3), pp.506–14.
- Koizumi, H. et al., 2008. Three-dimensional evaluation of vitreomacular traction and epiretinal membrane using spectral-domain optical coherence tomography. *American journal of ophthalmology*, 145(3), pp.509–517.
- Krinsky, N.I., Landrum, J.T. & Bone, R.A., 2003. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annual review of nutrition*, 23(1), pp.171–201.
- Lai, T.-T., Chen, S.-N. & Yang, C.-M., 2016. Epiretinal proliferation in lamellar macular holes and full-thickness macular holes: clinical and surgical findings. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 254(4), pp.629–638.
- Lai, T.-T. & Yang, C.-M., 2018. LAMELLAR HOLE-ASSOCIATED EPIRETINAL PROLIFERATION IN LAMELLAR MACULAR HOLE AND FULL-THICKNESS MACULAR HOLE IN HIGH MYOPIA. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 38(7), pp.1316–1323.
- Larsen, J.S., 1971. The sagittal growth of the eye. 3. Ultrasonic measurement of the posterior segment (axial length of the vitreous) from birth to puberty. *Acta ophthalmologica*, 49(3), pp.441–53.
- Lazarus, H.S. & Hageman, G.S., 1994. In situ characterization of the human hyalocyte. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 112(10), pp.1356–62.
- Lee, S.J. et al., 2012. Long-term surgical outcomes after vitrectomy for symptomatic lamellar macular holes. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 32(9), pp.1743–8.
- Lewis, G.P. & Fisher, S.K., 2003. Up-Regulation of Glial Fibrillary Acidic Protein in Response to Retinal Injury: Its Potential Role in Glial Remodeling and a Comparison to Vimentin Expression. In *International review of cytology*. pp. 263–290.
- Lindqvist, N. et al., 2010. Retinal Glial (Müller) Cells: Sensing and Responding to Tissue Stretch. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(3), pp.1683–90.

- Los, L.I. et al., 2003. Age-Related Liquefaction of the Human Vitreous Body: LM and TEM Evaluation of the Role of Proteoglycans and Collagen. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(7), p.2828.
- Luna, G. et al., 2016. Astrocyte structural reactivity and plasticity in models of retinal detachment. *Experimental eye research*, 150, pp.4–21.
- Massin, P. et al., 1999. Visual outcome of surgery for epiretinal membranes with macular pseudoholes. *Ophthalmology*, 106(3), pp.580–5.
- Mayne, R., 2003. Morphology and Chemical Composition of Connective Tissue: The Eye. In *Connective Tissue and Its Heritable Disorders*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 145–157.
- Mayne, R. et al., 1999. VIT-1: the second member of a new branch of the von Willebrand factor A domain superfamily. *Biochemical Society Transactions*, 27(6), pp.832–835.
- Messmer, E.M., Heidenkummer, H.P. & Kampik, A., 1998. Ultrastructure of epiretinal membranes associated with macular holes. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 236(4), pp.248–54.
- Michalewska, Z. et al., 2012. Non-full-thickness macular holes reassessed with spectral domain optical coherence tomography. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 32(5), pp.922–9.
- Michalewski, J. et al., 2011. Evolution from macular pseudohole to lamellar macular hole — spectral domain OCT study. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 249(2), pp.175–178.
- Michalewski, J. et al., 2007. Morphologically functional correlations of macular pathology connected with epiretinal membrane formation in spectral optical coherence tomography (SOCT). *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 245(11), pp.1623–1631.
- Mitamura, Y. et al., 2013. Photoreceptor Impairment and Restoration on Optical Coherence Tomographic Image. *Journal of Ophthalmology*, 2013, pp.1–7.
- Morita, H., Funata, M. & Tokoro, T., 1995. A clinical study of the development of posterior vitreous detachment in high myopia. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 15(2), pp.117–24.
- Nagamoto, T., Eguchi, G. & Beebe, D.C., 2000. Alpha-smooth muscle actin expression in cultured lens epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 41(5), pp.1122–9.
- Nakano, A. et al., 1990. Expression of leukocyte common antigen (CD45) on various human leukemia/lymphoma cell lines. *Acta pathologica japonica*, 40(2), pp.107–15.
- Nishitsuka, K. et al., 2007. Hyaluronan production regulation from porcine hyalocyte cell line by cytokines. *Experimental Eye Research*, 85(4), pp.539–545.
- Niwa, H. et al., 2005. Macular hole development in fellow eyes of patients with unilateral macular hole. *American journal of ophthalmology*, 140(3), pp.370–5.
- Noda, Y. et al., 2004. Functional properties of hyalocytes under PDGF-rich conditions. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(7), pp.2107–2114.
- Nomoto, H. et al., 2013. Quantification of changes in metamorphopsia and retinal contraction in eyes with spontaneous separation of idiopathic epiretinal membrane. *Eye (Basingstoke)*, 27(8), pp.924–930.

- O'Malley, P., 1976. The pattern of vitreous syneresis: a study of 800 autopsy eyes. In A. Irvine & O. P, eds. *Advances in vitreous surgery*. Springfield: Charles C Thomas, pp. 17–33.
- Oberstein, S.Y.L. et al., 2011. Cell proliferation in human epiretinal membranes: characterization of cell types and correlation with disease condition and duration. *Molecular vision*, 17(July), pp.1794–805.
- Odrobina, D. et al., 2011. Long-term evaluation of vitreomacular traction disorder in spectral-domain optical coherence tomography. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 31(2), pp.324–31.
- Oksala, A., 1978. Ultrasonic findings in the vitreous body at various ages. *Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie. Albrecht von Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology*, 207(4), pp.275–80.
- Pang, C.E. et al., 2016. LAMELLAR HOLE-ASSOCIATED EPIRETINAL PROLIFERATION: A Clinicopathologic Correlation. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 36(7), pp.1408–12.
- Pang, C.E., Spaide, R.F. & Freund, K.B., 2015. Comparing Functional and Morphologic Characteristics of Lamellar Macular Holes With and Without Lamellar Hole-Associated Epiretinal Proliferation. *Retina*, 35(4), pp.720–726.
- Pang, C.E., Spaide, R.F. & Freund, K.B., 2014. Epiretinal proliferation seen in association with lamellar macular holes: a distinct clinical entity. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 34(8), pp.1513–23.
- Parolini, B. et al., 2011. Lamellar macular hole: A clinicopathologic correlation of surgically excised epiretinal membranes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(12), pp.9074–9083.
- Parravano, M. et al., 2013. Functional and structural assessment of lamellar macular holes. *The British journal of ophthalmology*, 97(3), pp.291–6.
- Ponsioen, T.L. et al., 2008. Human retinal Müller cells synthesize collagens of the vitreous and vitreoretinal interface in vitro. *Molecular vision*, 14(March), pp.652–660.
- Ponsioen, T.L., Hooymans, J.M.M. & Los, L.I., 2010. Remodelling of the human vitreous and vitreoretinal interface - A dynamic process. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29(6), pp.580–595.
- Purtskhvanidze, K. et al., 2018. Long-term follow-up of lamellar macular holes and pseudoholes over at least 5 years. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 256(6), pp.1067–1078.
- Qiao, H. et al., 2005. The characterisation of hyalocytes: the origin, phenotype, and turnover. *The British journal of ophthalmology*, 89(4), pp.513–7.
- Reibaldi, M. et al., 2012. Foveal microstructure and functional parameters in lamellar macular hole. *American Journal of Ophthalmology*, 154(6), p.974–980.e1.
- Renzi, L.M. & Hammond, B.R., 2010. The effect of macular pigment on heterochromatic luminance contrast. *Experimental Eye Research*, 91(6), pp.896–900.
- Romano, M.R. et al., 2012. Vitreo-papillary adhesion as a prognostic factor in pseudo- and lamellar macular holes. *Eye*, 26(6), pp.810–815.
- Roth, A.M. & Foos, R.Y., 1972. Surface Structure of the Optic Nerve Head. *American Journal of Ophthalmology*, 74(5), pp.977–985.
- Russell, S.R., Shepherd, J.D. & Hageman, G.S., 1991. Distribution of glycoconjugates in the human

- retinal internal limiting membrane. *Investigative ophthalmology & visual science*, 32(7), pp.1986–95.
- Sakamoto, T., 2003. [Cell biology of hyalocytes]. *Nippon Ganka Gakkai zasshi*, 107(12), p.866–82; discussion 883.
- Sano, M. et al., 2009. Restored Photoreceptor Outer Segment and Visual Recovery After Macular Hole Closure. *American Journal of Ophthalmology*, 147(2), p.313–318.e1.
- Schechet, S.A., DeVience, E. & Thompson, J.T., 2017. THE EFFECT OF INTERNAL LIMITING MEMBRANE PEELING ON IDIOPATHIC EPIRETINAL MEMBRANE SURGERY, WITH A REVIEW OF THE LITERATURE. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 37(5), pp.873–880.
- Schuman, J.S., 2008. Spectral domain optical coherence tomography for glaucoma (an AOS thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 106, pp.426–58.
- Schumann, R.G. et al., 2015. EPIRETINAL MEMBRANE CHARACTERISTICS CORRELATE WITH PHOTORECEPTOR LAYER DEFECTS IN LAMELLAR MACULAR HOLES AND MACULAR PSEUDOHOLE. *Retina*, 35(4), pp.727–735.
- Schumann, R.G. 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), pp.1887–1894.
- Schumann, R.G. et al., 2011. Immunocytochemical and ultrastructural evidence of glial cells and hyalocytes in internal limiting membrane specimens of idiopathic macular holes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(11), pp.7822–7834.
- Schumann, R.G. et al., 2010. Sequential epiretinal membrane removal with internal limiting membrane peeling in brilliant blue G-assisted macular surgery. *The British journal of ophthalmology*, 94(10), pp.1369–72.
- Schumann, R.G. et al., 2006. Ultrastructure of the vitreomacular interface in full-thickness idiopathic macular holes: a consecutive analysis of 100 cases. *American journal of ophthalmology*, 141(6), pp.1112–1119.
- Schumann, R.G. & Gandorfer, A., 2014. Pathophysiology of Vitreo-Macular Interface. In A. Girach & M. D. de Smet, eds. *Diseases of the Vitreo-Macular Interface*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 43–53.
- Scott, J.E., 1992. The chemical morphology of the vitreous. *Eye*, 6(6), pp.553–555.
- Sebag, J., 1987a. Age-related changes in human vitreous structure. *Graefe's Archive Ophthalmology*, 225, pp.89–93.
- Sebag, J., 1987b. Ageing of the vitreous. *Eye*, 1(2), pp.254–262.
- Sebag, J., 1992. Anatomy and pathology of the vitreo-retinal interface. *Eye (London, England)*, 6 (Pt 6)(6), pp.541–52.
- Sebag, J., 2004. Anomalous posterior vitreous detachment: A unifying concept in vitreo-retinal disease. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 242(8), pp.690–698.
- Sebag, J., 2005. Molecular biology of pharmacologic vitreolysis. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 103, pp.473–494.
- Sebag, J., 1989a. Structure of the Vitreous. In *The Vitreous*. New York, NY: Springer New York, pp. 35–

58.

- Sebag, J., 1989b. *The Vitreous: Structure, Function and Pathobiology*, New York, NY: Springer-Verlag.
- Sebag, J. et al., 2009. Vitreopapillary adhesion in macular diseases. *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 107(October 2016), pp.35–44.
- Sebag, J. & Balazs, E.A., 1985. Human vitreous fibres and vitreoretinal disease. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom*, 104(February), pp.123–8.
- Sebag, J. & Balazs, E.A., 1989. Morphology and ultrastructure of human vitreous fibers. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 30(8), pp.1867–1871.
- Sebag, J. & Yee, K.M.P., 2007. Chapter 16 Vitreous : From Biochemistry to Clinical Relevance. , 1(October 2016), pp.1–79.
- Seery, C.M. & Davison, P.F., 1991. Collagens of the bovine vitreous. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 32(5), pp.1540–1550.
- Shimada, H. et al., 2009. Double staining with brilliant blue G and double peeling for epiretinal membranes. *Ophthalmology*, 116(7), pp.1370–6.
- Smiddy, W.E. et al., 1989. Idiopathic epiretinal membranes: ultrastructural characteristics and clinicopathologic correlation. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 25(5 Suppl), pp.811–20.
- Smiddy, W.E. et al., 1989. Ultrastructural Studies of Vitreomacular Traction Syndrome. *American Journal of Ophthalmology*, 107(2), pp.177–185.
- Smiddy, W.E. & Gass, J.D., 1995. Masquerades of macular holes. *Ophthalmic surgery*, 26(1), pp.16–24.
- Smith, T.J., 1984. Dexamethasone regulation of glycosaminoglycan synthesis in cultured human skin fibroblasts. Similar effects of glucocorticoid and thyroid hormones. *Journal of Clinical Investigation*, 74(6), pp.2157–2163.
- Smith, T.J. et al., 1982. Regulation of glycosaminoglycan synthesis by thyroid hormone in vitro. *Journal of Clinical Investigation*, 70(5), pp.1066–1073.
- Spaide, R.F. & Curcio, C.A., 2011. Anatomical correlates to the bands seen in the outer retina by optical coherence tomography: literature review and model. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 31(8), pp.1609–19.
- Spraul, C. & Lang, G., 2014. Operative Therapie: Vitrektomie. In G. Lang, J. Esser, & O. Gareis, eds. *Augenheilkunde*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, pp. 218–221.
- Sramek, S.J. et al., 1989. Immunostaining of Preretinal Membranes for Actin, Fibronectin, and Glial Fibrillary Acidic Protein. *Ophthalmology*, 96(6), pp.835–841.
- Srinivasan, V.J. et al., 2008. Characterization of outer retinal morphology with high-speed, ultrahigh-resolution optical coherence tomography. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(4), pp.1571–1579.
- Starengi, G. et al., 2014. Proposed lexicon for anatomic landmarks in normal posterior segment spectral-domain optical coherence tomography: The IN??OCT consensus. *Ophthalmology*, 121(8), pp.1572–1578.
- Stringham, J.M. & Hammond, B.R., 2008. Macular pigment and visual performance under glare

- conditions. *Optometry and vision science : official publication of the American Academy of Optometry*, 85(2), pp.82–8.
- Sun, J.P. et al., 2013. Surgical treatment of lamellar macular hole secondary to epiretinal membrane. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 251(12), pp.2681–2688.
- Suzuki, T. et al., 2003. Optical coherence tomography and focal macular electroretinogram in eyes with epiretinal membrane and macular pseudohole. *American Journal of Ophthalmology*, 136(1), pp.62–67.
- Takahashi, H. & Kishi, S., 2000. Tomographic features of a lamellar macular hole formation and a lamellar hole that progressed to a full-thickness macular hole. *American Journal of Ophthalmology*, 130(5), pp.677–679.
- Tanaka, Y. et al., 2011. Natural history of lamellar macular holes in highly myopic eyes. *American Journal of Ophthalmology*, 152(1), pp.96–99.
- Tanner, V. et al., 2001. Optical coherence tomography of the vitreoretinal interface in macular hole formation. *British Journal of Ophthalmology*, 85(9), pp.1092–1097.
- Theodossiadis, P.G. et al., 2009. Evolution of lamellar macular hole studied by optical coherence tomography. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 247(1), pp.13–20.
- Trempe, C.L., Takahashi, M. & Topilow, H.W., 1981. Vitreous changes in retinal branch vein occlusion. *Ophthalmology*, 88(7), pp.681–7.
- Tsukada, K. et al., 2011. Lamellar macular hole formation in chronic cystoid macular edema associated with retinal vein occlusion. *Japanese Journal of Ophthalmology*, 55(5), pp.506–513.
- Uchino, E., Uemura, A. & Ohba, N., 2001. Initial stages of posterior vitreous detachment in healthy eyes of older persons evaluated by optical coherence tomography. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 119(10), pp.1475–9.
- Ueno, N. et al., 1987. Effects of visible-light irradiation on vitreous structure in the presence of a photosensitizer. *Experimental eye research*, 44(6), pp.863–70.
- Unoki, N. et al., 2009. Lamellar macular hole formation in patients with diabetic cystoid macular edema. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 29(8), pp.1128–1133.
- Vaughan, L., 1988. D-periodic distribution of collagen type IX along cartilage fibrils. *The Journal of Cell Biology*, 106(3), pp.991–997.
- Vinores, S.A. et al., 2003. Photoreceptor-specific overexpression of platelet-derived growth factor induces proliferation of endothelial cells, pericytes, and glial cells and aberrant vascular development: An ultrastructural and immunocytochemical study. *Developmental Brain Research*, 140(2), pp.169–183.
- Vinores, S.A., Campochiaro, P.A. & Conway, B.P., 1990. Ultrastructural and electron-immunocytochemical characterization of cells in epiretinal membranes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 31(1), pp.14–28.
- Vogt, D. et al., 2017. Makulaschichtforamen mit hyporeflektivem epiretinalem Gewebe. *Der Ophthalmologe*, 114(12), pp.1100–1109.
- Wakabayashi, T. et al., 2009. Foveal Microstructure and Visual Acuity after Retinal Detachment Repair. Imaging Analysis by Fourier-Domain Optical Coherence Tomography. *Ophthalmology*, 116(3), pp.519–528.

- Walter, S.D. & Flynn, H.W., 2015. SPECTRAL DOMAIN OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY DOCUMENTATION OF MACULAR PSEUDOHOLE EVOLUTION AND SPONTANEOUS RESOLUTION. *Retinal Cases & Brief Reports*, 10(4), p.1.
- Wang, J. et al., 2003. Age-Dependent Changes in the Basal Retinovitreal Adhesion. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(5), p.1793.
- Wang, M.Y. et al., 2009. Vitreo-papillary adhesion in macular hole and macular pucker. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 29(5), pp.644–50.
- Witkin, A.J. et al., 2006. Redefining Lamellar Holes and the Vitreomacular Interface: An Ultrahigh-Resolution Optical Coherence Tomography Study. *Ophthalmology*, 113(3), pp.388–397.
- Wojtkowski, M. et al., 2002. In vivo human retinal imaging by Fourier domain optical coherence tomography. *Journal of biomedical optics*, 7(3), pp.457–63.
- Wolter, J.R., 1964. PORES IN THE INTERNAL LIMITING MEMBRANE OF THE HUMAN RETINA. *Acta Ophthalmologica*, 42(5–6), pp.971–974.
- Worst, J.G., 1977. Cisternal systems of the fully developed vitreous body in the young adult. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom*, 97(4), pp.550–4.
- Wu, J.J., Woods, P.E. & Eyre, D.R., 1992. Identification of cross-linking sites in bovine cartilage type IX collagen reveals an antiparallel type II-type IX molecular relationship and type IX to type IX bonding. *The Journal of biological chemistry*, 267(32), pp.23007–14.
- Yao, Y. et al., 2013. Lutein supplementation improves visual performance in Chinese drivers: 1-year randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrition*, 29(7–8), pp.958–964.
- Yonemoto, J. et al., 1994. The age of onset of posterior vitreous detachment. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 32(2), pp.67–70.
- Zampedri, E. et al., 2017. Spectral-domain optical coherence tomography findings in idiopathic lamellar macular hole. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 255(4), pp.699–707.
- Zhao, F. et al., 2013. Epiretinal cell proliferation in macular pucker and vitreomacular traction syndrome: analysis of flat-mounted internal limiting membrane specimens. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 33(1), pp.77–88.

8 Anhang

8.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Schemazeichnung zur Anatomie des Auges. (Modifiziert nach Grehn, F., 2012. Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Auges, in: Grehn, F. (Hrsg.), *Augenheilkunde*, 31. Auflage, Heidelberg: Springer, S.4, Abb.2.1.)2
- Abbildung 2:** Glaskörperpräparat eines neun Monate alten Kindes auf einem OP-Tuch. Er ist klar transparent und von gallertiger Konsistenz (Sebag 2005).3
- Abbildung 3:** Verlauf der Kollagenfibrillen im Glaskörper. An Basis, Fovea und um die Papille sind die Fibrillen besonders konzentriert. Die Papille selbst wird von Fibrillen und Rinde ausgespart. Schemazeichnung (modifiziert nach Le Goff & Bishop 2008).....4
- Abbildung 4:** Netzhaut in der Funduskopie. Mittig im Bild das dunkle Zentrum der Makula mit der roten Fovea in ihrer Mitte. Rechts die Papille und mit den zentralen Netzhautgefäßen, die sich in einen oberen und unteren Gefäßbogen aufteilen. URL: „<http://www.myretinalinstitute.com/images/default-album/normal-macula.jpg?sfvrsn=0;>“ (26.05.18).....6
- Abbildung 5:** Funktioneller Aufbau der Netzhaut, Schemazeichnung. (Modifiziert nach Gratzl, M., 2005. Sinnesorgane, in: Junqueira, L.C.U., Carneiro, J., Gratzl, M. (Hrsg.), *Histologie*, 6. Auflage, Heidelberg: Springer, S.424, Abb.23.24.)7
- Abbildung 6:** Histologisches Präparat der Netzhaut in HE-Färbung, Mikrophotographie. Mit freundlicher Genehmigung von Ralph C. Eagle, Jr., MD, Direktor der Pathologie, Wills Eye Hospital, Philadelphia7
- Abbildung 7:** Dunkelfeldmikroskopaufnahme des Glaskörpers eines 88-Jährigen. Die Kollagenfibrillen im Glaskörperkern sind aggregiert und geschlängelt, zwischen ihnen sind ausgedehnte Lakunen. Der obere Teil des Bildes zeigt den hinteren Pol des Auges, im unteren Teil ist unscharf angeschnitten die Sklera mit Übergang zur Kornea zu erkennen. (modifiziert nach Sebag & Balazs 1985)9
- Abbildung 8:** Schematische Darstellung der hinteren Glaskörperabhebung (A) Angehefteter Glaskörper. (B) Beginnende Abhebung an der Perifovea mit dem superioren Quadranten als Prädilektionsstelle. (C) Vollständige Abhebung von der Perifovea bei bestehender fovealer Anheftung. (D) Abhebung von der Fovea. (E) Fortschreiten der Abhebung nach anterior bei bestehender papillärer Anheftung. (F) Abhebung von der Papille, Glaskörperabhebung komplettiert (modifiziert nach Johnson 2005). 10
- Abbildung 9:** Anormale PVD, graphische Darstellung (modifiziert nach Sebag 2004). Partielle PVD: Die Glaskörperinnenseite adhärirt noch an einzelnen Stellen, hat sich sonst aber in ihrer gesamten Dicke abgehoben. Vitreoschisis: Unsaubere Abhebung der Glaskörperinnenseite mit Rückständen auf der Netzhaut, jedoch keine Adhäsionen. 11
- Abbildung 10:** Lamellar hole-associated epiretinal proliferation (LHEP) (Pfeile): nicht kontraktiles Gewebe, das sich häufig bei Schichtforamina findet. Im OCT stellt sich die Proliferation als hypobis isodense unregelmäßige Bande dar (modifiziert nach Choi et al. 2017 Abb. 2.A.). 14
- Abbildung 11:** Traktive epiretinale Membran (Pfeilspitzen): die „typische“, kontraktile Membran

zeichnet sich als hyperreflektive Bande über der Netzhaut ab und wirft sie in Falten (modifiziert nach Byon et al. 2015 Abb. 4b).....	14
Abbildung 12: So stellte sich Gass basierend auf seinen biomikroskopischen und angiographischen Beobachtungen das zystoide Makulaödem und das Schichtforamen im Querschnitt vor. Oben: zystoide Makulaödem mit intraretinalen Pseudozysten als Vorläuferläsion des Schichtforamens. Unten: Schichtforamen mit Pseudozysten und epiretinaler Membran. Schemazeichnung (Gass 1975)	16
Abbildung 13: Schichtforamen in der hochauflösenden SD-OCT. Makula mit deutlichem Substanzdefekt, intraretinaler Spaltbildung, und vereinzelt Pseudozysten. An den Fovearändern liegt etwas LHEP auf, in der Peripherie zeigt sich angedeutet eine kontraktile epiretinale Membran als schmales, hyperreflektives Band. Aus heutiger Sicht war Gass' damalige Vorstellung verblüffend präzise, vgl. Abb. 12. (Modifiziert nach Gaudric et al. 2013, Fig. 6)	17
Abbildung 14: Pseudofoamen in der SD-OCT (Haritoglou & Schumann 2017). Die Netzhaut ist unter der kontraktile Membran in Falten geworfen, die Fovea ist steil aufgestellt und ihre Ränder sind angehoben.	18
Abbildung 15: Amsler-Gitter-Test Links: Amsler-Gitter zur Vorlage für den Patienten, das er/sie bei unbeeinträchtigter Makula auch so wahrnimmt. Rechts: Wahrnehmung des Patienten mit Metamorphopsie infolge einer kontraktile epiretinalen Membran (eigene Grafik).....	18
Abbildung 16: Watzke-Allen-Test Der weiße Balken stellt den Lichtstrahl aus Sicht des Patienten dar. Links: Der Lichtstrahl wird als durchgängig erkannt, Test negativ. Rechts: Der Lichtstrahl wird unterbrochen wahrgenommen, Test positiv. Ein positiver Test zeigt einen Schaden der äußeren Netzhautschichten an und ist ein Hinweis auf ein durchgreifendes Makulaforamen (eigene Grafik).	19
Abbildung 17: Fundusfotographie eines Pseudofoamens (Gaudric et al. 2013). Die Makula ist durch die aufliegende epiretinale Membran abgeblasst, die unbedeckte Fovea wirkt dadurch umso röter. Zeichen der Kontraktion ist die ovale Form der Fovea und die Fältelung der Netzhautoberfläche, besonders gut rechts und oberhalb der Fovea zu erkennen.....	20
Abbildung 18: Schichtforamen. Illustration der Diagnosekriterien von Witkin et al. anhand ein und derselben OCT-Aufnahme (Modifiziert nach Gaudric et al. 2013 , Fig. 6) A unregelmäßige foveale Kontur. B Riss der inneren Fovea. C intraretinale Spaltbildung zwischen inneren und äußeren Netzhautschichten. Meist zwischen OPL und ONL (Duker et al. 2013). D Fehlen eines durchgreifenden Defekts bei intakten Photorezeptoren im Bereich des fovealen Defekts.	21
Abbildung 19: Normale Fovea und Pseudofoamen. Im direkten Vergleich mit dem OCT-Bild einer normalen Fovea lassen sich die Diagnosekriterien gut erkennen. Links: normale Fovea Rechts: Pseudofoamen. Die kontraktile Membran wirft die Netzhaut deutlich in Falten (Haritoglou & Schumann 2017)	22
Abbildung 20: Pseudofoamen mit intraretinaler Aufspaltung nach Gaudric (Gaudric et al. 2013). Sind die Schichten hier durch die kontraktile Membran nur aufgedehnt, oder ist womöglich auch schon Gewebe zugrunde gegangen? Ist die Fovea hier nur steil aufgestellt, charakteristisch für das Pseudofoamen, oder bereits unregelmäßig konturiert?	23
Abbildung 21: Schichtforamen mit LHEP und Gewebeverlust (Compera, Schumann, et al. 2017).....	23
Abbildung 22: OCT der Netzhaut mit beschrifteten Banden. Nicht-selbsterklärende Bezeichnungen sind: 8.2. Henle-Faser-Schicht: Axone der Photorezeptoren. 13. Interdigitationszone: Kontaktzone der Photorezeptoraußensegmente mit dem Retinalen Pigmentepithel. 14.	

RPE/Bruch-Komplex: Retinales Pigmentepithel und die Bruchmembran, Grenze zur Aderhaut, nur bei Pathologien als getrennte Banden zu sehen. 16. Sattler- & 17. Haller-Schicht: Historisch bedingte Nomenklatur, die Choroidalgefäße unterschiedlichen Kalibers beschreiben soll. Die Banden 9- 11 werden im Text erläutert. (Modifiziert nach Staurenghi et al. 2014)	25
Abbildung 23: Entfernung des Glaskörpers mittels Vitrektom sowie Endoillumination des Auges mittels fiberoptischer Lichtquelle. Der dritte Trokar mit dem Infusionsschlauch ist nicht dargestellt. (Schemazeichnung aus: Spraul, C. & Lang, G., 2014. Operative Therapie: Vitrektomie, in: Lang, G., Esser, J. Gareis, O. (Hrsg.), <i>Augenheilkunde</i> , 5. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S.220, Abb. 11.9a)	31
Abbildung 24: Peeling der epiretinalen Membran mittels Eckart-Pinzette. (Schemazeichnung aus: Spraul, C. & Lang, G., 2014. Operative Therapie: Vitrektomie, in: Lang, G., Esser, J. Gareis, O. (Hrsg.), <i>Augenheilkunde</i> , 5. Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, S.220, Abb. 11.9c)	32
Abbildung 25: Schicht- und Pseudofoamena dieser Studie in direkter Gegenüberstellung. Links: Die Schichtfoamena zeigen eine unregelmäßige foveale Kontur mit Substanzdefekt X. Begleitend finden sich Schichtfoamena-assoziierte epiretinale Proliferationen (LHEP) *. Rechts: Pseudofoamena mit steil aufgestellter Fovea, glatter Kontur, ohne Substanzverlust 0. Die hyperreflektiven traktiven Membranen ∇ finden sich bei jedem Pseudofoamena und sind besonders deutlich über geraffter Netzhaut zu erkennen. Die parafoveale Dicke ist typischerweise erhöht I.	46
Abbildung 26: Epiretinale Membran eines Schichtfoamens. 400-fache Vergrößerung.....	50
Abbildung 27: Epiretinale Membran eines Pseudofoamens. 100-fache Vergrößerung.	51
Abbildung 28: Innere Grenzmembran (ILM) eines Pseudofoamens mit epiretinale Proliferation. 400-fache Vergrößerung.....	52
Abbildung 29: Innere Grenzmembran (ILM) mit epiretinale Proliferation eines Pseudofoamens. Es handelt sich um einen anderen Ausschnitt desselben Präparats aus Abbildung 28. 400-fache Vergrößerung.....	53
Abbildung 30: ILM eines Pseudofoamens mit epiretinale Proliferation. 100-fache Vergrößerung. .	54
Abbildung 31: Innere Grenzmembran (ILM) eines Pseudofoamens mit epiretinale Proliferation. Detailaufnahme des Präparats aus Abbildung 30. 400-fache Vergrößerung.	55
Abbildung 32: ERM von Schichtfoamena Oben: Zellhaufen aus fibroblastenartigen Zellen und Gliazellen. 15000-fach. Unten: Mehrschichtige Zellproliferation in chaotischer Organisation. Die obere Zelle ist ein Fibroblast F, zu erkennen an der langgezogenen Form und dem dichten, faserigen Zytosol. Die untere Zelle ist ein Hyalozyt H, charakterisiert durch den lobulierten Zellkern, viele Vesikel und Zelleinschlüsse , sowie durch schlanke Fortsätze. An den Rändern ist Glaskörperkollagen GKK zu sehen. 60000-fach.	58
Abbildung 33: ERM eines Schichtfoamens Oben: Zellhaufen aus Fibroblasten und Hyalozyten. 8000-fach. Unten: Detailvergrößerung vom Rauhen Endoplasmatischen Retikulum eines Fibroblasten, in nächster Nähe zum Zellkern (N). 120000-fach.....	59
Abbildung 34: Oben: Epiretinale Proliferation eines Schichtfoamens auf der inneren Grenzmembran (ILM) mit der charakteristischen glatten, vitrealen Seite und der gewellten retinalen Seite am unteren Bildrand. 5000-fach. Unten: Epiretinale proliferierender Myofibroblast auf der ILM eines Pseudofoamens. Dazwischen eingeschlossen sind locker angeordnete Fasern von Glaskörperkollagen, hier besonders deutlich sichtbar, da die ILM präparationsbedingt etwas abgehoben ist. Der Myofibroblast weist charakteristische, subplasmalemmale Verdichtungen	

auf. 90000-fach.....	60
Abbildung 35: ERM von Schichtforamina. Oben: Positive Nanogold-Reaktion () auf Kollagen Typ II, das charakteristische Glaskörperkollagen. 200000-fach Unten: Verschiedene Kollagentypen zwischen zwei Zellausläufern. Mittig Kollagen Typ I, das mit einem Fibrillendurchmesser von 50 - 200nm deutlich dicker als das links angrenzende Kollagen Typ II ist. 110000-fach.....	61
Abbildung 36: ERM eines Schichtforamens. Oben: Hyalozyt mit kurzen, feinen Fortsätzen (F) und Vesikeln (V), neben reichlich Glaskörperkollagen. Nachweis von CD45-Expression mittels Nanogold-Markierung (), zu sehen als schwarze Pünktchen. 90000-fach. Unten: Aus demselben Präparat, jedoch an anderer Stelle stammt diese Detailaufnahme der feinen Zellfortsätze des C45-positiven Hyalozyten. Neben verdichteten Kollagensträngen fällt vor allem das breit gestreifte fibrous long spacing Kollagen (FLSC) (*) auf, welches in nativem Glaskörperkollagen eingebettet ist. 100000-fach.	62
Abbildung 37: ERM eines LMH. Oben: GFAP positive Zelle auf Strängen dichten Glaskörperkollagens. Das Kollagen wird nach unten hin lockerer und weist fibrous long spacing collagen (FLSC) auf. Die Zelle ist sehr aktiv, erkennbar an den großen Mengen von Glykogen (), das sich im Zytosol v.a. über dem Zellkern in Form von homogen dunkler Punkte und Würste darstellt. Ferner ist der Nukleolus sehr ausgeprägt. Die Zelle entbehrt charakteristische Merkmale, erinnert jedoch an eine Müllerzelle mit ihren zahlreichen Fortsätzen. Es handelt sich höchstwahrscheinlich um einen durch Transdifferenzierung entstandenen Fibroblasten. 10000-fach. Unten: Die Detailvergrößerung zeigt die positive Reaktion auf Nanogold-GFAP () und angedeutet intrazelluläre Filamente (*). Darunter dichte Kollagenstränge und der Übergang zu deutlich erkennbaren Kollagenfibrillen vom Typ II. 110000-fach.	63
Abbildung 38: ERM von Pseudoforamina. Oben: Myofibroblast mit charakteristischen Strängen intrazellulärer Filamente (*). Die Kontraktion der Zelle ist deutlich an der Verformung des unterliegenden Strangs aus Glaskörperkollagen und der Überbrückung der Falte zu erkennen. 90000-fach. Unten: Typischer Fund in den kontraktilem ERM von Pseudoforamina - mehrschichtig organisierte Myofibroblasten(M), dazwischen Glaskörperkollagen (GKK). 15000-fach.	64
Abbildung 39: ERM eines Pseudoforamens (Aus Abb. 38 unten). Nanogold-CD45-positiv () Zellfortsätze eines Myofibroblasten. Oben: Die Kontraktilität zeigt sich in Form des Fortsatzes und im Verlauf der langen Fibrillen von Glaskörperkollagen. 100000-fach. Unten: Intrazelluläre Filamente (*) desselben Präparats in höherer Vergrößerung. 120000-fach.....	65

8.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zielstrukturen der verwendeten Antikörper	35
Tabelle 2: Fluoreszenzfarbstoffe und ihre charakteristischen Spektren.....	36
Tabelle 3: Protokoll zur Aufbereitung der Membranen für die Immunfluoreszenzmikroskopie	37
Tabelle 4: Applikationsschema der Antikörperkombinationen	37
Tabelle 5: Protokoll zur Aufbereitung der Membranen für die Elektronenmikroskopie.....	40
Tabelle 6: Primärantikörper	41
Tabelle 7: Sekundärantikörper.....	41

Tabelle 8: Antikörper der Isotypkontrolle.....	42
Tabelle 9: Herstellung verwendeter Puffer und Reagenzien.....	42
Tabelle 10: Chemikalien, Hersteller und Registriernummer.....	44
Tabelle 11: Geräte und Hersteller.....	45
Tabelle 12: Anwendung, Programm und Anbieter	45
Tabelle 13: Ergebnis der Fluoreszenzmikroskopie: Intensität der Immunreaktionen.....	49

8.3 Publikationen

Compera, D., Entchev, E. & Schumann, R.G., 2015. Correlative Microscopy of Lamellar Hole-Associated Epiretinal Proliferation. *Journal of Ophthalmology*, 2015, pp.1–8.

Compera, D., Entchev, E., Haritoglou, C., et al., 2015. Lamellar Hole-Associated Epiretinal Proliferation in Comparison to Epiretinal Membranes of Macular Pseudoholes. *American journal of ophthalmology*, 160(2), p.373–384.e1.

8.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Schicht- und Pseudofoamina der Netzhaut – Immunzytochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen epiretinaler Membranen“

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 vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Neuried, den 23.04.19

Enrico Entchev

8.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Ricarda Schumann für die Überlassung des Themas sowie für die kompetente Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit. Ich bin ihr außerordentlich dankbar für die große Geduld, mit der sie meine Arbeit begleitet hat, die kritischen und hilfreichen Anregungen und den positiven Umgang.

Weiterhin danke ich ihr und Dr. Denise Vogt für die Möglichkeit an zwei Publikationen mitgewirkt zu haben.

Besonderer Dank gebührt Renate Scheler, ohne deren tatkräftige Anleitung, kritische Anmerkungen und große Hilfsbereitschaft diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden habe ich das Gelingen dieser Arbeit zu verdanken. Danke an meine Mutter und meinen Vater für ihr Vertrauen, den bedingungslosen Rückhalt und die außergewöhnliche Unterstützung. Danke an meine Tante und meinen Onkel für ihre außergewöhnliche Hilfe. Danke an meinen Bruder und meine Freundin für den Rückhalt und das Dach über dem Kopf, danke dafür auch an alle beteiligten Biedersteiner.