

Aus der Augenklinik und Poliklinik

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vostand: Prof. Dr. med. S.G. Priglinger

***Prämakuläre Zellen als Quelle neuronaler Wachstumsfaktoren  
bei großen idiopathischen Makulaforamina***

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Luca Mautone

aus

Meran, Italien

Jahr

2023

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Frau Prof. Dr. med. Ricarda Gisela Schumann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Antje Grosche  
Prof. Dr. Kirsten Eibl-Lindner  
Prof. Dr. Christos Haritoglou

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Frau Dr. med. Denise Vogt

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.01.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract (English)</b> .....	<b>6</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>7</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>11</b>
1.1 Grundlagen .....	11
1.1.1 Vitreoretinale Grenzfläche und innere Grenzmembran .....	11
1.1.2 Glaskörperinnenschicht und extrazelluläre Matrix .....	12
1.1.3 Altersbedingte hintere Glaskörperabhebung .....	14
1.2 Idiopathische durchgreifende Makulaforamina .....	16
1.2.1 Definition und Klassifikation .....	16
1.2.2 Pathogenese der Makulaforamina .....	18
1.2.3 Epidemiologie und Risikofaktoren .....	20
1.2.4 Symptome und Diagnosestellung .....	21
1.2.5 Therapie des idiopathischen Makulaforamens .....	22
1.3 Prämakuläre Veränderungen bei Makulaforamina .....	26
1.3.1 Epiretinale Membranen .....	26
1.3.2 Prämakuläre Zellansammlungen in der Immunzytochemie .....	27
1.3.3 Fibrozelluläre Membranen in der Elektronenmikroskopie .....	30
1.4 Fragestellung .....	32
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>33</b>
2.1 Patientenkollektiv .....	33
2.2 Probengewinnung .....	34
2.3 Fixierung und Lagerung der Probe .....	35
2.4 Flat-mount Technik .....	36
2.5 Phasenkontrast- und Interferenzmikroskopie .....	37
2.6 Immunfluoreszenz .....	38
2.6.1 Zellkernfärbung und Zellzählung .....	38
2.6.2 Immunpräparation .....	39
2.6.3 Negativkontrollen .....	44
2.6.4 Bilddokumentation .....	44
2.7 Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie .....	46
2.7.1 Semidünnschnitt- und Ultradünnschnittpräparation .....	46
2.7.2 Bilddokumentation der Elektronenmikroskopie .....	49
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
3.1 Allgemeine Patientencharakteristika .....	50
3.2 Lichtmikroskopische Analyse der Fläche und Zellzahl der Präparate .....	54

3.3	Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse .....	57
3.3.1	Zellspezifische Antigene.....	61
3.3.2	Wachstumsfaktoren.....	65
3.3.3	Kolokalisation von Antigenen .....	66
3.3.4	Poren der inneren Grenzschichtmembran .....	70
3.4	Negativkontrollen.....	74
3.5	Transmissionselektronenmikroskopische Analyse.....	76
3.5.1	Topografische Merkmale der inneren Grenzmembran.....	76
3.5.2	Zell- und Kollagenverteilung an der inneren Grenzmembran.....	82
3.5.3	Besondere Merkmale .....	86
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>88</b>
4.1	Zusammensetzung prämakulärer Membranen .....	89
4.1.1	Vorkommen und Lokalisation der neurotrophen Faktoren .....	89
4.1.2	Neuriten in prämakulären Membranen.....	90
4.1.3	Zelluläre Komponenten prämakulärer Membranen.....	91
4.1.4	Müllerzellen und Neuriten in prämakulären Proliferationen.....	92
4.1.5	Retinaler Debris an der inneren Grenzmembran .....	94
4.1.6	Nicht-zelluläre Komponenten prämakulärer Membranen.....	95
4.2	Bedeutung der Ergebnisse für das operative Vorgehen .....	96
4.2.1	Chirurgische Alternativen bei großen Makulaforamina .....	96
4.2.2	Anatomische und funktionelle Rehabilitation bei Makulaforamina .....	97
4.2.3	Die Rolle der Müllerzellen bei der Rehabilitation.....	98
4.2.4	Potential für die ILM Flap Technik.....	99
4.2.5	ILM-Flap-Komponenten und das Remodelling der Makula .....	102
4.2.6	Poren der ILM.....	104
4.3	Limitationen .....	106
4.4	Schlussfolgerung.....	108
4.5	Publikation der Dissertation.....	109
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
	<b>Anhang A: Laborausstattung, Reagenzien und Rezepturen.....</b>	<b>115</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>119</b>
	<b>Affidavit .....</b>	<b>120</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>121</b>
	<b>Publikationsliste .....</b>	<b>122</b>

## Zusammenfassung

### **Prämakuläre Zellen als Quelle neuronaler Wachstumsfaktoren bei großen idiopathischen Makulaforamina**

**Ziel:** Nachweis und Lokalisation von neuronalen Wachstumsfaktoren und Beschreibung der zellulären und extrazellulären Charakteristika der inneren Grenzmembran (ILM) bei großen idiopathischen Makulaforamina (FTMF) mit einem Durchmesser von  $> 400 \mu\text{m}$ .

**Material und Methoden:** Im Rahmen der konventionellen Makulaforamenoperation mit Peeling der ILM wurden bei 24 Augen von 24 Patienten mit großen FTMF die ILM-Präparate chirurgisch gewonnen und histopathologisch aufbereitet. Die ILM-Präparate wurden mittels flat-mount-Technik als Flachpräparate für die Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie vorbereitet und anschließend für die immunzytochemische Analyse zur Fluoreszenzmikroskopie von neuronalen Wachstumsfaktoren sowie Glia- und Ganglienzellmarkern verwendet. Licht- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen folgten für die topographische Beschreibung der Zell- und Kollagenverteilung der ILM.

**Ergebnisse:** Die immunzytochemischen Untersuchungen ergaben den Nachweis von Gliazell-abgeleitetem neurotrophem Faktor (GDNF) und ziliarem neurotrophem Faktor (CNTF). Dazu wurde die positive Expression von fibrillärem saurem Gliaprotein (GFAP), Vimentin, Neurofilament und Melanopsin nachgewiesen. Das zelluläre Retinaldehyd-bindende Protein (CRALBP), wurde ebenfalls beobachtet. Beide neurotrophen Wachstumsfaktoren wurden kolokalisiert mit Anti-Vimentin- und Anti-GFAP-Antikörpern. Zellen wurden ausschließlich auf der vitrealen Seite der ILM gefunden, dagegen kamen Zellreste ausschließlich auf der retinalen Seite vor.

**Schlussfolgerung:** In großen FTMF zeigen prämakuläre Zellen auf der vitrealen Seite der ILM eine positive Immunreaktivität für neurotrophe Wachstumsfaktoren. Die Kolokalisation mit Glia- und Ganglienzellen weist auf Wachstumsfaktoren-produzierende Zellvorkommen auf der ILM hin, die potenziell für das foveale Remodelling nach Makulaforamenchirurgie insbesondere bei der ILM-Flap-Technik von Bedeutung sein könnten.

## Abstract (English)

### **Premacular cells as source of neurotrophic factors in large idiopathic macular holes**

**Aim:** To describe presence and localization of neurotrophic growth factors and histopathologic characteristics of internal limiting membrane (ILM) specimens removed from large idiopathic full-thickness macular holes (FTMH) (diameter > 400  $\mu\text{m}$ ).

**Material & Methods:** During conventional macular hole surgery, specimens were harvested by ILM peeling from 24 eyes of 24 patients with large idiopathic FTMH, interference and phase-contrast microscopy of flat-mounts were performed and followed by immunostaining with fluorescence microscopy. Primary antigens directed against neurotrophic growth factors were used, as well as antigens to glial and subpopulations of ganglion cells. Light and transmission electron microscopy was performed to demonstrate topographic features of the ILM and characteristics of cells and collagen.

**Results:** Immunofluorescence microscopy demonstrated the presence of glial derived neurotrophic factor (GDNF) and ciliary neurotrophic factor (CNTF). Moreover, vimentin, glial fibrillary acidic protein (GFAP), neurofilament, calretinin and melanopsin immunoreactivity were present. In addition, cellular retinaldehyd-binding protein (CRALBP) was detected. Colocalization of anti-GFAP and anti-vimentin with neurotrophic factors were found. Ultrastructural analysis localized cells on the vitreal side of the ILM, exclusively. Cell fragments on the retinal side were rare.

**Conclusion:** In large FTMH, the ILM presents positive immunolabelling of neurotrophic factors. Their colocalization with glial and ganglion cell markers suggests a premacular cell composition as source of these neurotrophic factors. Consequently, premacular cells of the ILM potentially play an important role in the retinal remodeling after macular surgery, in particular when using the ILM flap technique.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Interaktion vitreoretinaler Adhäsionsmoleküle. ....	12
Abbildung 2: Kollagenfibrillenstruktur des Glaskörpers.....	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der PVD-Stadien. ....	15
Abbildung 4: Makulaforamen Klassifikation nach Gass.....	17
Abbildung 5: Darstellung eines durchgreifenden Makulaforamen ohne Traktion. ....	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Wirksamkeit der <i>Inverted ILM Flap</i> Technik. ....	23
Abbildung 7: Verschluss eines Makulaforamens mittels <i>ILM Flap</i> Technik. ....	24
Abbildung 8: Schematische Darstellung <i>Inverted vs. Temporal Inverted ILM Flap</i> Technik und intraoperative Darstellung des ILM-Peelings.....	25
Abbildung 9: Beispiel eines durchgreifenden Makulaforamens mit Traktion .....	53
Abbildung 10: Heterogenität in der Zelldichte und Verteilung.....	56
Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahmen von Immunfluoreszenz an flat-mount Präparaten. ....	62
Abbildung 12: Kolokalisation von Anti-GFAP und Anti-Vimentin.....	63
Abbildung 13: Kolokalisation von Anti-GFAP und Anti-GDNF.....	63
Abbildung 14: Kolokalisation von Anti-CRALBP und Anti-Calretinin. ....	64
Abbildung 15: Artefakte in der Anti-Calretinin-Färbung.....	64
Abbildung 16: Kolokalisation von Anti-Calretinin und Anti-GDNF. ....	68
Abbildung 17: Kolokalisation von Anti-Melanopsin und Anti-GDNF.....	68
Abbildung 18: Kolokalisation von Anti-CNTF und Anti-Vimentin.....	69
Abbildung 19: Poren der inneren Grenzmembran. ....	72
Abbildung 20: Umschriebene Ausdünnung der inneren Grenzmembran in der Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie.....	72
Abbildung 21: Vergleich zwischen iatrogen verursachtem ILM-Riss und ILM- Foramina.....	73
Abbildung 22: Beispiele von Negativkontrollen. ....	75
Abbildung 23: Beispiel von Artefakten in der Immunfluoreszenz. ....	75
Abbildung 24: Innere Grenzschichtmembran mit ihren zwei unterschiedlichen Seiten .....	81
Abbildung 25: Debris auf der retinalen Seite der inneren Grenzmembran und mehrschichtige Zellansammlung auf der vitrealen Seite. ....	84
Abbildung 26: Zellpopulationen und Kollagene. ....	85
Abbildung 27: EM-Präparate mit weiteren Zufallsbefunden.....	87

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Skala zur Vermessung der Präparatefläche.</b> .....	37
<b>Tabelle 2: Primäre Antikörper und ihre Zielstrukturen.</b> .....	39
<b>Tabelle 3: Schritte der Immunfluoreszenzvorbereitung.</b> .....	41
<b>Tabelle 4: Daten der verwendeten primären Antikörper.</b> .....	42
<b>Tabelle 5: Daten der verwendeten sekundären Antikörper.</b> .....	43
<b>Tabelle 6: Vorbereitungsschritte für die Elektronenmikroskopie.</b> .....	48
<b>Tabelle 7: Allgemeine Patientendaten.</b> .....	52
<b>Tabelle 8: Fläche, Zellzahl und Zelldichte der Präparate der inneren Grenzmembran.</b> .....	55
<b>Tabelle 9: Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen.</b> .....	59
<b>Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunfluoreszenz.</b> .....	60
<b>Tabelle 11: Übersicht der Kollokalisierungen.</b> .....	66
<b>Tabelle 12: Vorkommen von Poren der inneren Grenzmembran.</b> .....	71
<b>Tabelle 13: Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.</b> .....	78
<b>Tabelle 14: Übersicht über Zellen und Kollagene in der Elektronenmikroskopie.</b> .....	79
<b>Tabelle 15: Allgemeine Ergebnisse der Transmissionselektronenmikroskopie.</b> .....	80
<b>Tabelle 16: Zellen und Kollagene in der Elektronenmikroskopie.</b> .....	82

## Abkürzungsverzeichnis

<b>BDNF</b>	Gehirn abgeleiteter neurotropher Faktor ( <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> )
<b>bFGF</b>	Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor ( <i>Basis Fibroblast Growth Factor</i> )
<b>CNTF</b>	Ziliärer neurotropher Faktor ( <i>Ciliary Neurotrophic Factor</i> )
<b>CRALBP</b>	Zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein ( <i>Cellular Retinaldehyde-Binding Protein</i> )
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol
<b>DONFL-Erscheinung</b>	Erscheinung der dissoziierten Fasern von der retinalen Nervenfaserschicht ( <i>Dissociated Optic Nerve Fiber Layer</i> )
<b>EM</b>	Elektronenmikroskopie
<b>ERM</b>	Epiretinale Membran
<b>FLSC</b>	Fibröses Kollagen mit langem Bänderungsmuster ( <i>Fibrous Long Spacing Collagen</i> )
<b>FTMF</b>	Durchgreifendes Makulaforamen ( <i>Full Thickness Macular Hole</i> )
<b>GAGs</b>	Glykosaminoglykane
<b>GDNF</b>	Gliazellen abgeleiteter neurotropher Faktor ( <i>Glia Cell-Derived Neurotrophic Factor</i> )
<b>GFAP</b>	Fibrilläres saures Gliaprotein ( <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> )
<b>GA</b>	Glutaraldehyd
<b>GK</b>	Glaskörper
<b>IC</b>	Immunzytochemie
<b>IF</b>	Immunfluoreszenz
<b>ILM</b>	Innere Grenzmembran, Membrana limitans interna ( <i>Inner Limiting Membrane</i> )
<b>ILMFT</b>	ILM Flap-Technik ( <i>Inner Limiting Membrane Flap Technique</i> )
<b>MF</b>	Makulaforamen
<b>IMF</b>	Idiopathisches Makulaforamen
<b>NGF</b>	Nervenwachstumsfaktor ( <i>Neuronal Growth Factor</i> )
<b>NH</b>	Netzhaut
<b>NF</b>	Neurofilament
<b>NFC</b>	Neu gebildetes Kollagen ( <i>Newly Formed Collagen</i> )
<b>NVC</b>	Natives vitreales Kollagen ( <i>Native Vitreous Collagen</i> )
<b>OCT</b>	Optische Kohärenztomografie
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PPV</b>	Pars plana Vitrektomie
<b>PVD</b>	Hintere Glaskörperabhebung ( <i>Posterior Vitreous Detachment</i> )

<b>SD-OCT</b>	<i>Spectral-Domain</i> Optische Kohärenztomographie
<b>VMI</b>	Vitreomakuläre Grenzfläche ( <i>Vitreomacular Interface</i> )
<b>VRI</b>	Vitreoretinale Grenzfläche ( <i>Vitreoretinal Interface</i> )
<b>VIM</b>	Vimentin
<b>VMT</b>	Vitreomakuläre Traktion

# 1. Einleitung

## 1.1 Grundlagen

### 1.1.1 Vitreoretinale Grenzfläche und innere Grenzmembran

Als vitreoretinale Grenzfläche (VRI) bezeichnet man die anatomische Grenze zwischen Retina und Glaskörper (GK). Sie setzt sich aus der inneren Grenzmembran (*Inner Limiting Membrane*, ILM) und der hinteren Glaskörperrinde zusammen, die vorrangig locker durch Glykoproteine miteinander verbunden sind[1], [2].

Die ILM ist die Basalmembran der Müllerzellen[3]. Neben ihrem Hauptbestandteil Kollagen Typ IV enthält sie andere Komponenten, wie z.B. Laminine, Nidogene, Heparansulfat, Proteoglykane, Perlekan und Agrin[4].

Die ILM wird anatomisch in drei Teile unterteilt:

1. Äußere *Lamina lucida* (in Kontakt zu den Müllerzell-Endplatten der Retina)
2. *Lamina densa* (in der Mitte)
3. Innere *Lamina lucida* (angrenzend an die extrazelluläre Matrix der Glaskörperrinde)

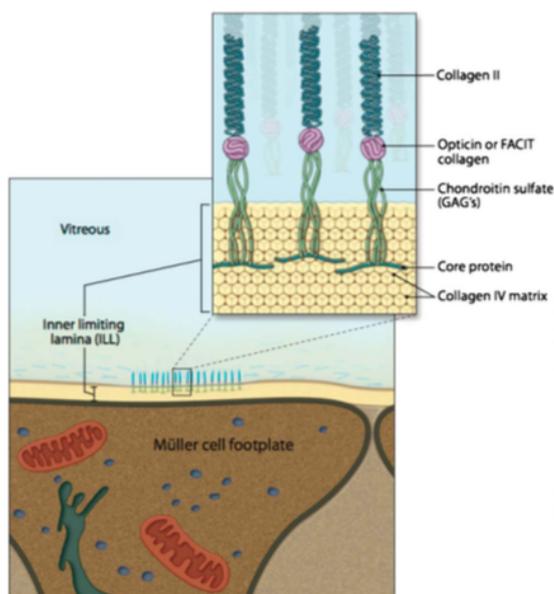
Die eindeutige Verteilung dieser Schichten geht jedoch mit dem Alter verloren. Zudem unterliegt die ILM physiologischen altersbedingten Veränderungen, da ihre Dicke mit fortschreitendem Alter zunimmt und ihre Elastizität abnimmt[5].

Wie in der **Abbildung 24** dargestellt, besitzt die ILM eine glatte vitreale und eine undulierte retinale Seite[3]. Letztere ist nur im Bereich der peripheren Retina glatt. Im Bereich der Makula nehmen die Undulationen der retinalen Seite zu[6].

Die Dicke der nativen, humanen und nicht dehydrierten ILM in vivo beträgt circa  $3488 \pm 460$  nm. Im Bereich der vitreomakulären Grenzfläche ist die ILM über der Fovea am dünnsten ( $138 \pm 80$  nm) und wird mit zunehmendem Abstand von der Fovea wieder dicker (bis  $> 4000$  nm)[6].

### 1.1.2 Glaskörperinnere und extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix befindet sich zwischen der hinteren GK-Rinde und der ILM. Sie erfüllt eine Art Kleberfunktion zur Aufrechterhaltung des Kontaktes zwischen den verschiedenen extrazellulären Komponenten[1]. Die Zusammensetzung der vitreoretinalen Adhäsion ist noch nicht vollständig bekannt, jedoch wird dem Proteoglykan, bestehend aus einem Kernprotein (*core protein*) und Chondroitinsulfat Glykosaminoglykane (GAGs), eine zentrale Rolle zugesprochen. Eine Kette aus verschiedenen Molekülen, dem Kernprotein, Chondroitinsulfat Glykosaminoglykane (GAGs) und Opticin, verbindet die Kollagen-IV-Fibrillen der ILM mit den Filamenten aus Kollagen Typ II des GK[2], [7]. Eine schematische Anordnung der oben genannten Moleküle wird in **Abbildung 1** dargestellt.



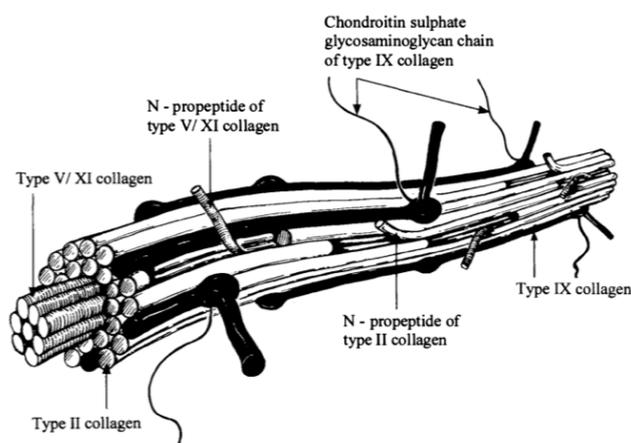
**Abbildung 1: Interaktion vitreoretinaler Adhäsionsmoleküle.**

(Abbildung aus Russel SR, 2012, [7])

Der GK ist eine gelartige Masse, die den Großteil des Auges füllt. Er besteht hauptsächlich aus Flüssigkeit[1]. Seine anterioren anatomischen Grenzen sind die Linsenrückfläche, der Ziliarkörper und die Ora serrata. Posterior wird der GK von der Retina einschließlich des Sehnervenkopfs begrenzt[3].

Trotz der einfachen makroskopischen Anatomie besitzt der GK eine komplizierte molekulare Zusammensetzung: Von der GK-Basis verlaufen Kollagenfasern parallel in antero-posteriorer Richtung, welche nicht verzweigen[3]. Ihre Dicke beträgt circa 7-28 nm. Mikroskopisch bestehen diese

Fasern aus Kollagenfibrillen Typ II (circa 75%), Kollagen IX (circa 15%) und einem Hybrid-Kollagen aus Typ V/XI (circa 10%). Diese sind wie in **Abbildung 2** dargestellt organisiert: Ein Gerüst aus Kollagen V/XI ist umgeben von Kollagen II und XI, welches die Kollagenfasern gleichzeitig verbindet und voneinander trennt. Diese abstanderhaltende Funktion zwischen den Kollagenfasern ist essentiell für die Aufrechthaltung der Gelstruktur und Transparenz. Diese abstandhaltende Funktion (*spacing*) wird auch von Molekülen wie Opticin und Hyaluronan unterstützt. Hyaluronan ist stark hydrophil und gilt als der Hauptspieler für die gelartigen Eigenschaften des GK [1].



**Abbildung 2: Kollagenfibrillenstruktur des Glaskörpers.**

(Abbildung aus Bishop P, 1996, [8])

Die Glaskörperrinde verbindet den GK mit der ILM. Ihre Zusammensetzung besteht aus hochkonzentrierten, parallelverlaufende Kollagensträngen, hauptsächlich aus Kollagenen Typ II, V/XI und IX[2]. Die durchschnittliche Dicke der GK-Rinde beträgt 100-300  $\mu\text{m}$ [9]. Zusätzlich enthält die GK-Rinde zelluläre Komponenten[3], insbesondere Hyalozyten.

Anders als an der Glaskörperbasis, an der die Kollagenfasern der GK-Rinde senkrecht durch die ILM einstrahlen und direkte Haftungsstellen mit der Retina unter der ILM bilden, verlaufen die Kollagenstränge der GK-Rinde am posterioren Pol parallel zur ILM[3], [9].

### 1.1.3 Altersbedingte hintere Glaskörperabhebung

Die altersbedingte Glaskörperveränderung erfolgt hauptsächlich in drei Schritten:

1. *Synchisis*, die altersbedingte Glaskörperverflüssigung[10],
2. *Syneresis*, die Entstehung von Arealen aus dicht gepackten Kollagenfibrillen[10], und
3. durch die Abschwächung der Adhäsionsmoleküle[9].

Der Verflüssigungsprozess des GK beginnt bereits in jungen Jahren an und schreitet mit zunehmendem Alter fort: Ca. 20% des Glaskörpers eines Teenagers und ca. 50% eines 70-Jähriger sind bereits verflüssigt. Alterungsprozesse der verschiedenen GK Komponenten führen zum Zusammenbruch der Glaskörperstruktur. So entstehen die sogenannten *liquid pockets* (Flüssigkeitstaschen), Areale aus verflüssigten GK mit einer reduzierten Dichte von fragmentierten Kollagenfibrillen. Dadurch entstehen an ihren Rändern Glaskörpertrübungen (*visual floaters*), optisch dichte Bündel aus dichten und geschmolzenen Kollagenfasern[9], [11], die klinisch als subjektive, im Gesichtsfeld schwimmende, durchsichtige Fäden wahrgenommen werden.

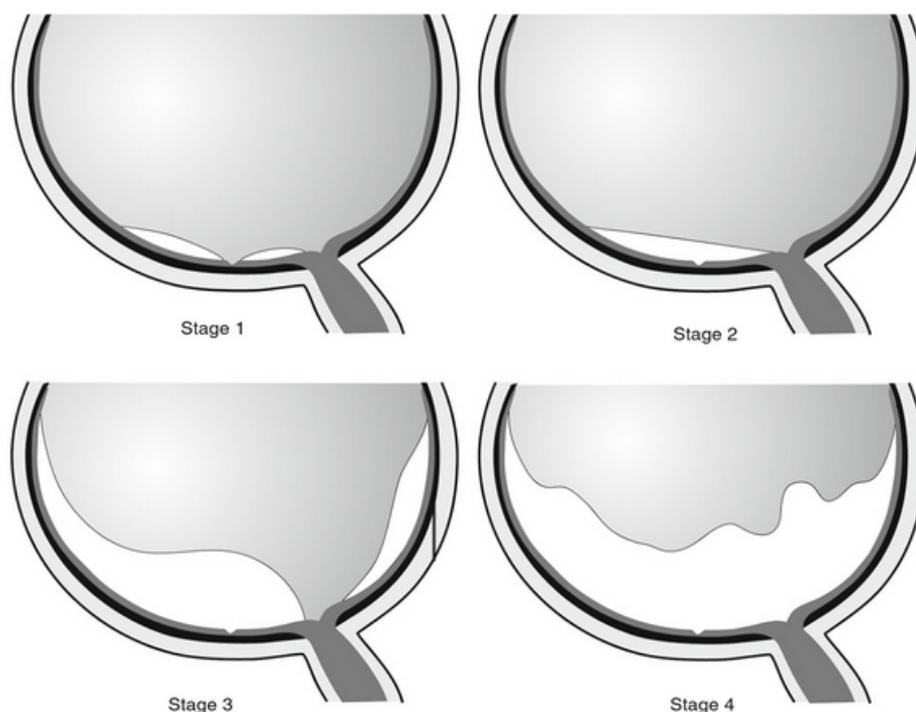
Die Mechanismen dahinter, die zu diesem Prozess führen, sind noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass sowohl die Synchisis als auch Syneresis eine Konsequenz der altersbedingten Destabilisierung des Glaskörpers sind. Mehrere Ursachen dieses Prozesses wurden bisher identifiziert:

- Verlust von Kollagen Typ IX, der für die Aufrechthaltung des Zwischenraumes zwischen den Kollagen II Fibrillen essentiell ist[12].
- Kollagenschäden, die durch die entstandenen freien Radikale der Strahlenbelastung des sichtbaren Lichts verursacht sind[10].
- Hyaluronan-Verlust oder Hyaluronan-Interaktionsveränderung mit den Kollagenfibrillen, die zur Verflüssigung des GK führt[10].
- Enzymatische Kollagenschädigung und -fragmentierung durch Matrix-Metalloproteinasen und anderen Enzyme[11].
- Glaskörperverflüssigung durch reduzierte Synthese von Hyaluronan[13].

Infolgedessen kollabiert das Glaskörpergel. Dies hat wiederum zur Folge, dass Zugkräfte auf die vitreoretinale Grenzfläche ausgeübt werden, die zur kompletten Ablösung der hinteren Glaskörperinnenseite der ILM führen. Dieser Prozess wird auch als hintere Glaskörperabhebung (oder

*posterior vitreous detachment*, PVD) bezeichnet. Dabei dringt der verflüssigte Glaskörperanteil in den retrokortikalen/präretinalen Raum ein und verursacht eine Trennung der Glaskörperrinde von der Netzhautoberfläche. Diese Trennung beginnt am posterioren Pol und schreitet in Richtung Peripherie fort. Sie kann sowohl asymptomatisch oder mit Wahrnehmung von Photopsien oder Glaskörpertrübungen (*Mouches volantes*) stattfinden. Die einzelnen Stadien der PVD nach Johnson sind in **Abbildung 3** schematisch dargestellt[13]:

- Stage 0: keine PVD
- Stage 1: perifoveoläre PVD mit vitreomakulärer Adhäsion
- Stage 2: Abhebung der GK-Rinde von der Makula
- Stage 3: PVD mit persistierender vitreopapillärer Adhäsion
- Stage 4: komplette PVD ohne GKR-Anhaftung an der Papille



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der PVD-Stadien.**

(Abbildung aus Johnson MW, 2010, [13])

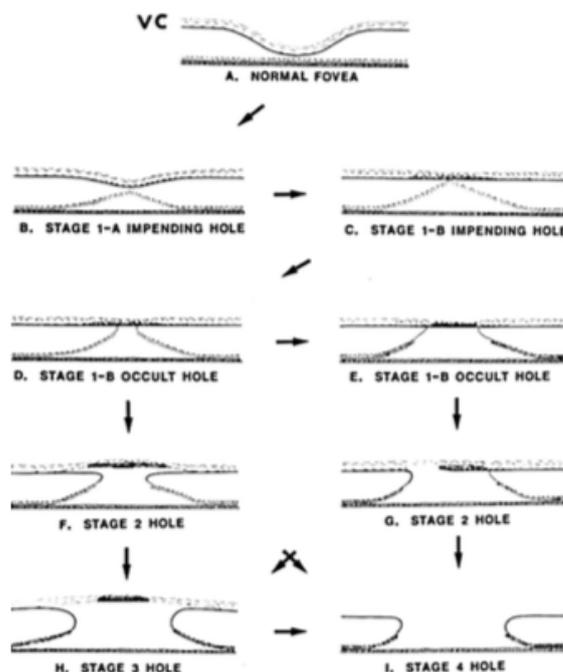
## 1.2 Idiopathische durchgreifende Makulaforamina

### 1.2.1 Definition und Klassifikation

Das idiopathische Makulaforamen (MF) gehört zur Gruppe der traktiven Makulopathien. Die *International Vitromacular Study Group* bezeichnete das durchgreifende Makulaforamen (FTMF) als „*anatomischer Defekt in der Fovea, der alle Netzhautschichten von der inneren Grenzmembran bis zum retinalen Pigmentepithel spaltet*“[14]. Dies ist eine anatomische Definition, die auf bildgebenden Untersuchungen mittels *Spectral-Domain* optischer Kohärenztomographie (SD-OCT) beruht. Eine SD-OCT Darstellung eines durchgreifenden Makulaforamens ist in **Abbildung 5** und **Abbildung 9** dargestellt.

Zu den wichtigsten Klassifikationen von Makulaforamina gehören:

- 1) Die Gass-Klassifikation[15]: Gass führte eine klinische Klassifikation ein, welche auf den anatomischen Strukturabweichungen der Makula auf Basis der biomikroskopischen Untersuchung beruhte. Er beschrieb vier Stadien:
  - Stadium 1: Beim Stadium 1 MF, wie in der **Abbildung 4** dargestellt, besteht keine vitreo-foveale Ablösung und die Photorezeptorschicht ist intakt:
    - Stadium 1-A: Fundoskopisch macht sich ein gelber Punkt (*yellow spot*[15]) in der Makula bemerkbar.
    - Stadium 1-B: Biomikroskopisch wird ein gelblicher Ring sichtbar. Gass bezeichnete diesen Zustand als drohendes MF (*impending macular hole*[15]).
  - Stadium 2: Hier tritt ein durchgreifender Defekt der Makula bei posterior noch anhaftendem Glaskörper auf. Ein solcher Defekt mit einem Durchmesser bis zu 400 µm wird als Stadium 2 MF eingestuft.
  - Stadium 3: Ähnlich dem Stadium 2, aber mit einem Durchmesser über 400 µm.
  - Stadium 4: Ein MF mit vollständiger Ablösung des posterioren GK von Makula und Papille, unabhängig vom Durchmesser des MF.



**Abbildung 4: Makulaforamen Klassifikation nach Gass.**

(Abbildung aus Gass JDM, 1995, [15])

2) Die Klassifikation der *International Vitromacular Study Group*[14] wurde 2013 eingeführt. Im Gegensatz zur Einteilung von Gass nach biomikroskopischen Befunden, stützt sich die neuere Einteilung auf OCT-Untersuchungen basierend auf drei Kriterien:

- Durchmesser der Läsion:
  - Klein: < 250  $\mu\text{m}$
  - Mittelform: 250 - 400  $\mu\text{m}$
  - Groß: > 400  $\mu\text{m}$
- An- oder Abwesenheit einer Vitreomakulären Traktion (VMT).
- Ätiologie:
  - Primäres, idiopathisches Makulaforamen (IMF)
  - Sekundäres MF

## 1.2.2 Pathogenese der Makulaforamina

Bei der Pathogenese der Makulaforamina spielt die inkomplette hintere Glaskörperabhebung (*Anomalous Posterior Vitreous Detachment*, anomale PVD) eine wichtige Rolle[1], [16]. Dabei entstehen Zugkräfte an der Makula, die für die Entstehung eines Makulaforamens wesentlich sind:

1. Die antero-posteriore Traktion[17]. Eine unvollständige hintere PVD kann eine antero-posteriore Zugkraft auf die Fovea ausüben. Dieses Phänomen wird vitreomakuläre Traktion genannt und kann zur Schädigung der *Müller cell cones* führen. Dies resultiert in eine Spaltung der Makula, die zu einem durchgreifenden MF fortschreiten kann. Wenn durch die Traktion die *Müller cell cones* in der Mitte der Foveola beschädigt werden, entsteht eine Dehiszenz wegen zentrifugaler Verlagerung der Fotorezeptoren oder durch Verlust von Foveagewebe in Form eines Operculum[3], [15], [17].
2. Die tangentielle Traktion. Diese wird durch die Bewegung des verflüssigten GK durch die Augenbewegungen verursacht, durch Entstehung und Kontraktion einer zellhaltigen epiretinalen Membran (ERM) nach Vitreoschisis oder durch zelluläre Reorganisationsprozesse (*cellular remodeling*) der hinteren Glaskörperrinde[16]. Als Ursache der tangentialen Traktion wird insbesondere die Vitreoschisis diskutiert. Dabei bleibt der hintere Teil der GK-Rinde an der ILM haften. Wenn die Spaltung der GK-Rinde sich posterior der Hyalozyten entwickelt, bleibt eine dünne und hypozelluläre Membran auf der Makula, die als Gerüst für die Entstehung einer ERM aus migrierten Zellen, wie Hyalozyten, Fibroblasten und Gliazellen dient. Diese Zellen organisieren sich und transdifferenzieren zu kontraktionsfähigen Zellen, den Myofibroblasten, welche zu einer Kontraktion der ERM führen. Dadurch entsteht eine tangentielle zentrifugale Traktion auf die Makula, die zur Entwicklung eines Foramens führen kann[3], [14], [16], [18]. Unklar bleibt, wie diese Zellen die Oberfläche der ILM erreichen. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass retinale Zellen durch Poren in der ILM die vitreale Seite erreichen[19]. Nach einer anderen Hypothese migrieren Hyalozyten aus der GK-Rinde auf die ILM und transdifferenzieren dort[20].

Nach der fovealen Spaltung kommt es meist zu einer Ansammlung von intraretinaler Flüssigkeit in den Rändern der Foramens und somit zu einer Verdickung und Abhebung des Foramenrandes

---

vom retinalen Pigmentepithel[21]. Diese Abhebung der Ränder könnte, ähnlich wie bei einer Netzhautabhebung, zur Schädigung der fovealen Zellen führen[17].

### 1.2.3 Epidemiologie und Risikofaktoren

Die Prävalenz des MF variiert stark in der Bevölkerung[22], [23]. Europäische Wissenschaftler beschreiben ein Vorkommen von 3,3 pro 1000 Patienten. Die Mehrheit davon sind Frauen[22], [24]–[26] und das Durchschnittsalter liegt über 65 Jahre bei der Erstdiagnose[24]. Die geschätzte Inzidenzrate von IMF ist bei ca. 7,4 - 8,69 von 100.000 Individuen[24], [25]. Die Inzidenzrate eines IMF am Partnerauge bei schon betroffenen Patienten ist mit 15,6% nach 5 Jahren hoch[27]. Wenn in der Vorgeschichte am Partnerauge ein IMF bestand und eine VMT am betroffenen Auge vorliegt, ist das Risiko, innerhalb von 5 Jahren auch am zweiten Auge ein FTMF zu entwickeln, deutlich erhöht (insgesamt 19,5%, bei VMT 35,5%)[28].

Verschiedene Risikofaktoren sind bekannt:

- Alter (nur 3% der IMF Patienten sind jünger als 55 Jahre[26])
- Makulaforamen am Partnerauge (11,7% der Patienten sind beidseits betroffen [25])
- Positive Familienanamnese [29].
- Pseudophakie[23].
- Weibliches Geschlecht [26], [30].

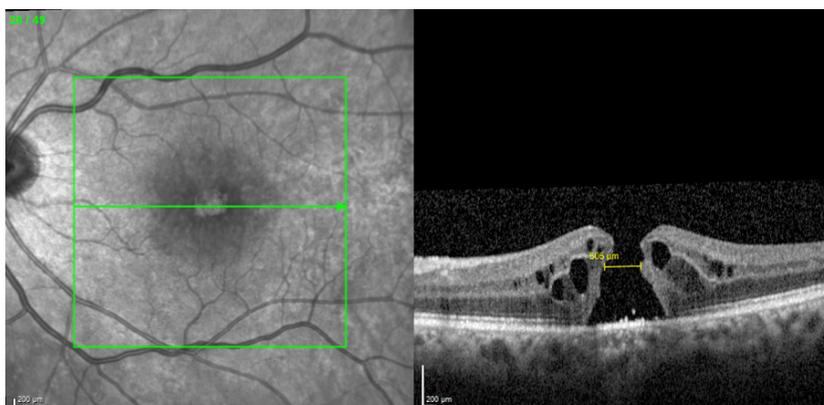
Im Gegensatz dazu haben Patienten mit vollständiger PVD und Weiß-Ring ein niedriges Risiko, ein FTMF zu entwickeln (1%)[31].

## 1.2.4 Symptome und Diagnosestellung

Zu den häufigsten Symptomen zählen verschwommenes Sehen und Visusverlust. Beim binokularen Sehen oder in frühen Stadien kann eine Sehverschlechterung jedoch anfangs auch un bemerkt bleiben[31]. Ein weiteres wichtiges Symptom ist die Wahrnehmung von Metamorphopsien[32].

Während der biomikroskopischen Untersuchung kann der *Watzke-Allen* Test zur Diagnose eingesetzt werden[31]. Bei der Durchführung dieses Tests wird mit der Spaltlampe ein schmaler Lichtstrahl auf das Foramen gerichtet: Ist der Test negativ, wird vom Patienten der Lichtstrahl als durchgängig und gerade erkannt. Es besteht kein durchgreifender Makuladefekt. Das *Watzke-Allen* Test ist hingegen positiv, wenn der Lichtstrahl als unterbrochen wahrgenommen wird. Es liegt ein durchgreifender Makuladefekt vor.

In den vergangenen Jahren hat die OCT-Untersuchung eine führende Rolle in der Diagnose und Differentialdiagnose der Makulaforamina eingenommen. Auf diese Weise wurde die Gass-Klassifikation der Makulaforamina im klinischen Alltag von der OCT-basierten Klassifikation verdrängt[33]. Bei der Messung des Durchmessers des Makulaforamens sollte *minimum hole width* bestimmt werden (siehe **Abbildung 5**)[14]. Es ist der OCT Scan auszuwählen, der den breitesten Defektbereich abbildet. Die Messpunkte werden dann an die Stelle des kleinsten Durchmessers gesetzt, der sich meist in der Mitte der retinalen Schichten befindet.



**Abbildung 5: Darstellung eines durchgreifenden Makulaforamens ohne Traktion.**

Patient 13, linkes Auge. Rechts konfokale Scanning-Laser-Ophthalmoskopie des Fundus oculi, links *spectral domain* optische Kohärenztomographie mit Darstellung eines großen Makulaforamens mit 505 µm Durchmesser (*minimum hole width*) ohne vitreomakuläre Traktion.

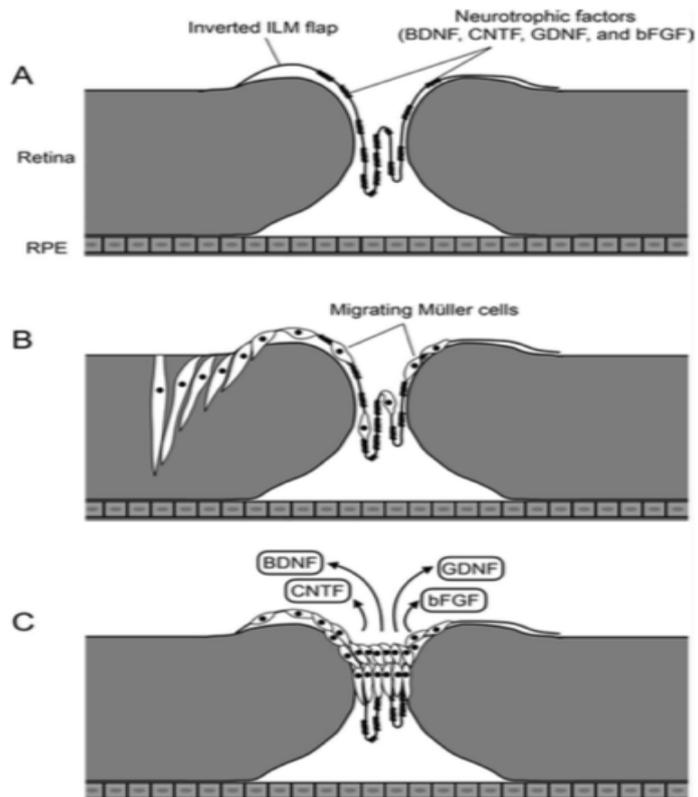
### 1.2.5 Therapie des idiopathischen Makulaforamens

Die Grundlage der aktuellen operativen Behandlungsmöglichkeiten ist die pars plana Vitrektomie (PPV). Seit der Einführung dieser Methode 1991 durch Kelly und Wendel[34] wurde das operative Vorgehen weiter verbessert. Zunächst wurde die Entfernung der ILM eingeführt, das sogenannte ILM-Peeling[35]. Eine Metaanalyse der *Cochrane Collaboration* fand zwar keinen signifikanten Unterschied im postoperativen Visus und in der Komplikationshäufigkeit zwischen den Augen mit oder ohne ILM-Peeling, aber es konnte gezeigt werden, dass das zusätzliche ILM-Peeling zu signifikant höheren Verschlussraten bei MF des Stadiums 3 und 4 nach Gass führte[36]. Eine Metaanalyse von über 5000 Augen zeigte ebenfalls, dass die postoperative MF Wiederöffnungsrate bei Augen, die mittels PPV und ILM-Peeling behandelt worden waren, signifikant niedriger war, verglichen mit Augen, die ohne ILM-Peeling operiert wurden[37].

Des Weiteren publizierte eine polnische Arbeitsgruppe 2010 eine neue Technik zur Behandlung von idiopathischen MF, die *Internal Limiting Membrane Flap Technique* (ILMFT). Anders als beim ILM-Peeling wird hierbei die ILM nicht komplett entfernt, sondern an den Rändern des MF über oder in den Makuladefekt gelegt[38], wie in **Abbildung 6** schematisch dargestellt. Mittlerweile existiert eine Vielzahl von chirurgischen Modifikationen dieser Methode, die mehrheitlich bei sehr großen, persistierenden oder sekundären MF breite Anwendung findet[39]–[43]. Durch dieses Verfahren konnte eine höhere anatomische Verschlussrate großer IMF erzielt werden, verglichen mit der Standard ILM-Peeling Methode (98% vs. 88%)[38]. Ein Beispiel der postoperativen Entwicklung der Makulaarchitektur mit OCT ist in **Abbildung 7** gezeigt.

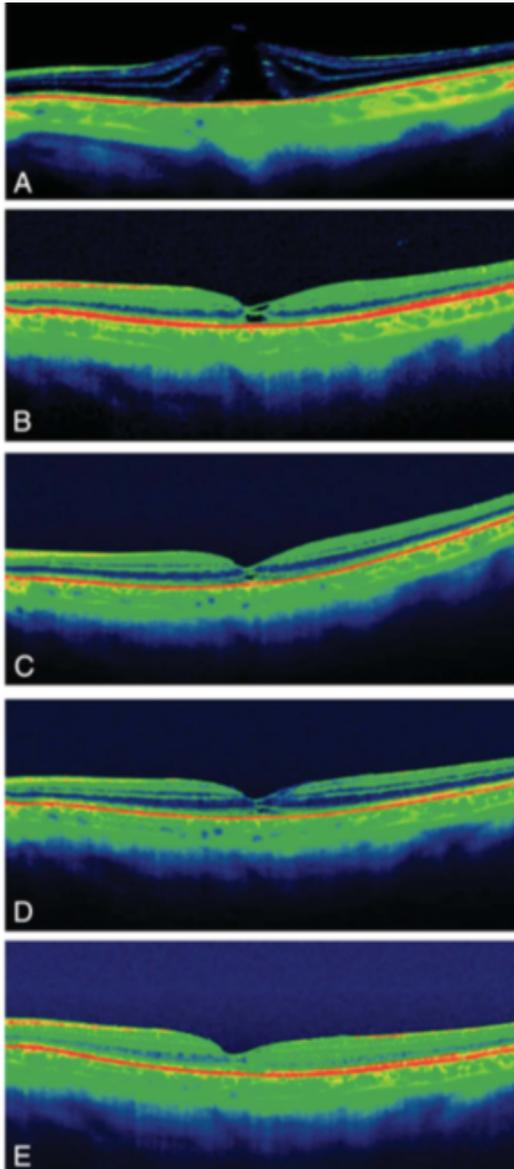
Bei einer der jüngsten Weiterentwicklungen der ILMFT wird nur ein kleiner ILM-Anteil temporal der Makula invertiert und in das Makulaloch hineingelegt. Dabei bleiben die nasalen, superioren und inferioren Teile der ILM unberührt. Dieser neue Eingriff wird *Temporal Inverted Internal Limiting Membrane Flap Technique* genannt (siehe **Abbildung 8**)[44]. So konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu einem größeren Flap die gleichen anatomischen und funktionellen Ergebnisse mit einem kleineren ILM-Flap erreicht werden können. Dies führt zur Hypothese, dass die Größe des ILM-Flaps keinen signifikanten Einfluss auf das operative Ergebnis hat[44].

Darüber hinaus kamen neben dem ILM Flap für große MF auch andere Füllmaterialien zum Einsatz: das freie ILM Transplantat, das autologe Retinatransplantat, die Amnionmembran oder die hintere Linsenkapsel[45]–[50].



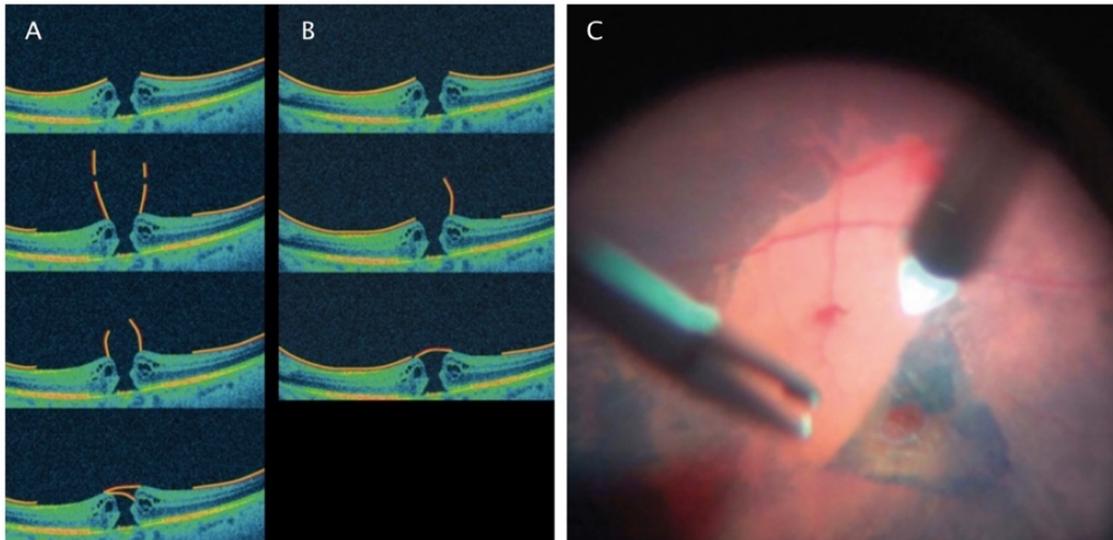
**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Wirksamkeit der *Inverted ILM Flap* Technik.**

Übertragung von Wachstumsfaktoren auf dem ILM-Flap ins Makulaforamen (A) mit darauffolgender Auslösung der Migration von Müllerzellen ins Makulaforamen (B), welche sich vermehren und Wachstumsfaktoren produzieren (C) (Abbildung aus Shiode Y, 2017, [51]). GDNF = Gliazellen abgeleiteter neurotropher Faktor. CNTF = Ziliarer neurotropher Faktor. BDNF = Gehirn abgeleiteter neurotropher Faktor. bFGF = Basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktors.



**Abbildung 7: Verschluss eines Makulaforamens mittels ILM Flap Technik.**

Optische Kohärenztomographie, Makulabefund eines Patienten (A) präoperativ, (B) 1 Woche, (C) 3 Monate, (D) 6 Monate und (E) ein Jahr nach der Operation. Die *Flap closure* Erscheinung entwickelt sich zum anatomischen Verschluss der Makula (Abbildung aus Boninska K, 2018, [52]).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung *Inverted* vs. *Temporal Inverted ILM Flap* Technik und intraoperative Darstellung des ILM-Peelings.**

(A) und (B) optische Kohärenztomographie, (C) intraoperatives Foto des Fundus oculi. Ein schematischer Vergleich zwischen den zwei Techniken wird gezeigt: *Inverted ILM Flap Technique* (A) und *Temporal Inverted ILM Flap Technique* (B) (Modifizierte Abbildungen aus Michalewska Z, 2015, [44]). Bild der Durchführung eines *Inverted ILM Flap* (C) (Abbildung aus Michalewska Z, 2015, [44]).

## **1.3 Prämakuläre Veränderungen bei Makulaforamina**

### **1.3.1 Epiretinale Membranen**

Prämakuläre Zellansammlungen können bei allen traktiven Makulopathien vorkommen. Wenn diese Zellkompositionen mehrschichtig auf der Makulaoberfläche vorliegen und traktive Eigenschaften aufweisen, werden sie als epiretinale Membranen bezeichnet. Die Begriffe „epiretinal“ und „präretinal“ werden synonym verwendet. Gleiches gilt für die Bezeichnungen „epimakulär“ und „prämakulär“[53]. Meist sind neben zellulären Komponenten auch extrazelluläre Kollagenbestandteile in diesen Membranen enthalten[54]. Epiretinale Membranen werden anhand der Ätiologie in idiopathische oder sekundäre ERM unterteilt[54].

Im OCT präsentieren sich ERM als eine hyperreflektive Schicht oder Linie auf der Netzhautoberfläche,[54]. Einzelne prämakuläre Zellen lassen sich im OCT nicht darstellen. Zu den nichtzellulären Komponenten von ERM gehören die Kollagene Typ I, II, II, IV und VI. Die Kollagene Typ I, II und III machen den Großteil des nativen vitrealen Kollagens aus. Neu gebildetes Kollagen besteht vorrangig aus Typ IV und VI[54].

### 1.3.2 Prämakuläre Zellansammlungen in der Immunzytochemie

In ERM sind folgende Zelltypen beschrieben worden[54]:

- Fibroblasten und Myofibroblasten: Sie produzieren Kollagen und tragen zur Kontraktion der ERM bei.
- Hyalozyten: Diese mononukleären Phagozyten, welche in der hinteren Glaskörperrinde lokalisiert sind, können sich zu Myofibroblasten transdifferenzieren und somit ebenfalls zur Kontraktion der ERM beitragen. Hyalozyten können im Rahmen der Vitreoschisis bei pathologischer hinterer Glaskörperabhebung auf der ILM-Oberfläche verbleiben.
- Gliazellen: Es gibt verschiedene Subtypen retinaler Gliazellen, die häufig in Makulaforamina vorkommen.
  - Makroglia wie Müllerzellen und Astrozyten
  - Mikroglia.
- Makrophagen: Diese Zellen sind monozytären Ursprungs und kommen selten in idiopathischen ERM vor. Sie können verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren sezernieren zur Förderung der zellulären Dedifferenzierung.
- Retinale Pigmentepithelzellen: Sie sind keine typischen Bestandteile von idiopathischen ERM, können jedoch in sekundären ERM vorkommen. RPE-Zellen können sich ebenfalls zu Myofibroblasten transdifferenzieren.

In der Vergangenheit wurde prämakuläre Zellansammlungen bei idiopathischen Makulaforamina sowohl immunzytochemisch als auch elektronenmikroskopisch untersucht[18]–[20], [55]–[58]. Dazu wurden häufig zellspezifische Antikörperfärbungen gegen Epitope der prämakulären Zellen verwendet, sowie die ultrastrukturellen Eigenschaften der Zellen mittels transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen beschrieben[18], [20], [55], [57], [59]–[64].

Für diese Studien wurde die flat-mount Technik eingesetzt. Diese Methode der Flachpräparation wurde erstmals in 2005 von einer japanischen Gruppe zur Untersuchung der ILM beschrieben und ermöglicht eine Beobachtung des Präparats von oben[65]. Ein Jahr später wurde diese neue Technik erstmals für die Untersuchung der ILM bei MF verwendet[66].

Das fibrilläre saure Gliaprotein (*Glial Fibrillary Acidic Protein*, GFAP) ist ein Bestandteilprotein der Intermediärfilamente der Gliazellen, z.B. Astrozyten und Müllerzellen. Bei IMF wurden

prämakuläre Zellen beschrieben, die in Immunfärbungen für Hyalozyten-Marker und GFAP positiv waren[18]. Es wurde angenommen, dass GFAP-positive Zellen aktivierte und migrierte Müllerzellen seien. GFAP diene hier als Marker für reaktive Müllerzellen, Gliazellen-assoziierte Umbauvorgänge, retinalen Stress und Netzhautverletzungen[60].

Vimentin (VIM) ist ein Intermediärfilament-assoziiertes Protein der Gliazellen. Dieses wird nach retinaler Beschädigung erhöht produziert. In einem Modell mit Vimentin und GFAP knockout Mäusen zeigte sich keine Hypertrophie und extraretinale Migration der Müllerzellen, welches eigentlich eine der klassischen Folgen einer Schädigung der Netzhaut ist. Deshalb ist VIM, besonders in Koexpression mit GFAP, ein guter Marker für aktivierte Müllerzellen[18], [59].

Das zelluläre Retinaldehyd-bindende Protein (*Cellular Retinaldehyde-Binding Protein*, CRALBP) ist ein Retinoid bindendes Protein, welches sich sowohl in Müllerzellen als auch im retinalen Pigmentepithel befindet. Es spielt eine wichtige Rolle in der Optimierung der Kinetik verschiedener Vorgänge, die am Sehen beteiligt sind[67]. CRALBP positive Zellen im VI von IMF wurden bereits nachgewiesen und die Koexpression dieses Markers mit GFAP wies auf Müllerzellen hin[18], [20].

Das Neurofilament Protein (NF) befindet sich in den Dendriten und Axonen der Ganglien- und horizontalen Zellen und ist das Hauptprotein ihres Zytoskeletts. In humanen neurodegenerativen Erkrankungen und in experimentellen Modellen kumuliert NF bei Schädigung der Neuronen, z.B. nach einer Netzhautablösung[61], [68].

Calretinin ist ein calciumbindendes zytosolisches Protein, welches von Ganglien-, Amakrine- und Horizontalzellen der menschlichen Retina exprimiert wird[61].

Melanopsin befindet sich in den Dendriten und Axonen der intrinsischen Fotorezeptoren der retino-hypothalamischen Bahn. Melanopsin ist ein Photopigment dieser Zellen, die den zirkadianen Rhythmus beeinflussen. In einem Rattenmodell mit Netzhautdegeneration waren diese Zellen am Remodelling beteiligt [61].

Die neurotrophen Wachstumsfaktoren *Glial cell Derived Neurothropic Growth Factor* (GDNF) und *Ciliary Neurothropic Factor* (CNTF) werden von Gliazellen abgeleitet. Beide haben eine protektive Wirkung sowohl auf Photorezeptoren, als auch auf retinale Neuronen und können bei aktivierten Gliazellen nach Schädigung des Gewebes abgegeben werden[51].

GDNF übt eine protektive Wirkung auf Photorezeptoren aus und wurde als neuroprotektiv bei Retinitis pigmentosa, retinaler Ischämie sowie Glaukom beschrieben[69]. Dieser Effekt findet direkt und indirekt durch Induktion der Expression von anderen Wachstumsfaktoren in Müllerzellen statt, die sich positiv auf das Überleben von Photorezeptoren auswirken[69].

CNTF ist Teil der Interleukin-6 Zytokine und wird von verschiedenen Netzhautzellen, besonders Müllerzellen, produziert. Wie GDNF spielt CNTF beim Überleben von retinalen Ganglienzellen und Photorezeptoren eine wichtige Rolle [69]. Eine Förderung der neuronalen Regenerationsprozesse aktivierter Gliazellen durch CNTF wurde nachgewiesen[70].

Der Wirkmechanismus von GDNF und CNTF in der retinalen Neuroprotektion ist eng verknüpft, da stimulierte Müllerzellen die vom Gehirn abgeleiteten Wachstumsfaktoren CNTF und GDNF produzieren[69]. Beide Wachstumsfaktoren wurden mittels Immunfluoreszenz in der ILM von Affenaugen mit MF nachgewiesen [51]. In derselben Studie war ihre Expression in migrierenden Müllerzellen verstärkt vorhanden[51].

### 1.3.3 Fibrozelluläre Membranen in der Elektronenmikroskopie

Verschiedene Kollagentypen und Zellpopulationen der prämakulären Membranen wurden bisher beschrieben[64]. Die Identifikation dieser Bestandteile in der Transmissionselektronenmikroskopie erfolgt in der Regel nach bereits publizierten Kriterien wie folgt:

- Natives Glaskörperkollagen (NVC, *Native Vitreous Collagen*) besteht aus 16 nm langen, regelmäßig organisierten Kollagenfibrillen[58], [63].
- Neu formiertes Kollagen (NFC *Newly formed Collagen*) hat eine Struktur aus unorganisierten Fibrillen, die größer als 16 nm sind, und befindet sich zwischen den Zellen an der ILM[18], [63].
- Der Kollagenstrang besteht aus dicht aneinanderlegenden Kollagenfibrillen, die in einer faserförmigen Struktur organisiert sind. Kollagenstränge bestehen aus NFC[18].
- Das fibröse Kollagen mit langem Bänderungsmuster (FLSC, *Fibrous Long Spacing Collagen*) zeigt einen größeren Abstand der Periodizität des Bänderungsmusters als das native Kollagen in der Transmissionselektronenmikroskopie. Sein Durchmesser beträgt ca. 150 nm und seine Periodizität des Bänderungsmusters zirka 250 nm[71].
- Als Zelldebris werden Fragmente von retinalen Zellen auf der retinalen Seite der Retina bezeichnet. Diese unterscheiden sich in der Morphologie von den Endplatten der Müllerzellen[55], [57].
- Fibroblasten enthalten ein großes, raues endoplasmatisches Retikulum und markante Golgi-Komplexe. Bei diesen Zellen sind die intrazytoplasmatischen Filamente abwesend[18].
- Myofibroblasten besitzen viele subplasmalemmale zytoplasmatische Filamente, Nuclei fusiformes und ein raues, endoplasmatisches Retikulum. Sie sind in charakteristischen Aggregaten organisiert[18], [57].
- Hyalozyten sind durch dichte Granula und Vakuolen im Zytoplasma charakterisiert. Manche davon zeigten zytoplasmatische intermediäre Filamente. In einer vorherigen Studie waren Hyalozyten hauptsächlich in einer Schicht von Kollagen zu finden[63].
- Fibrinöse Astrozyten stellen sich als große, spindelförmige Zellen mit interdigitierenden, zytoplasmatischen Fortsätzen und 10 nm dicken Filamenten im Zytoplasma dar[62].
- Typisch für Makrophagen sind die intrazellulären Lysosomen, die fehlende Zellenpolarität und die unspezifische Zellenoberfläche[62].

- 
- Retinale Pigmentepithelzellen (RPE-Zellen) haben die Eigenschaft der Mikrovilli. Diese Strukturen befinden sich nur auf einer Seite der Zelle, da diese eine bestimmte Polarität haben[62].

## 1.4 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die vitreomakuläre Grenzfläche bei großen idiopathischen Makulaforamina mit einem Durchmesser von  $>400\ \mu\text{m}$  immunzytochemisch und ultrastrukturell zu beschreiben. Durch konventionelles Peeling der inneren Grenzmembran chirurgisch gewonnene ILM Präparate sollen auf zelluläre und extrazelluläre Bestandteile sowie auf das Vorkommen von neurotrophen Wachstumsfaktoren untersucht werden. Folgende Merkmale der ILM Präparate sollen untersucht werden:

- Fläche der ILM-Präparate.
- Zelldichte und Zellzahl in den ILM-Präparaten.
- Topografische Verteilung von Zellen und Kollagen.
- Vorkommen von Glia- und Ganglienzellen.
- Vorkommen und Lokalisation von neurotrophen Wachstumsfaktoren.

Die Identifizierung von Komponenten, die das retinale Remodeling nach Makulaforamenoperation beeinflussen könnten, hat insbesondere bei der Suche nach dem optimalen chirurgischen Vorgehen eine aktuelle Relevanz.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patientenkollektiv

Für diese Studie wurden chirurgisch gewonnene ILM-Präparate im Labor für Vitreoretinale Pathologie und Elektronenmikroskopie an der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität histopathologisch untersucht. Das Gewebematerial wurde konsekutiv während einer konventionellen Makulaforamenoperation von 24 Augen mit großem idiopathischem MF (Durchmesser > 400 µm) gewonnen. Die Patienten waren in der Augenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München zwischen Januar 2014 und April 2016 operiert worden. Das operative Vorgehen am Patienten wurde durch diese Studie nicht beeinflusst und entsprach dem konventionellen ILM-Peeling während der Makulaforamenoperation. Allgemeine Patientendaten (Geschlecht, Alter) wurden neben behandlungsspezifischen Daten (Seite des Auges, Linsenstatus) erfasst.

Ein positives Ethikvotum für die Datenerhebung, die operative Entfernung und die histopathologische Präparation des Gewebematerials liegt von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München vor (No 471–14). Die Studie entspricht der Deklaration von Helsinki und damit den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen.

## 2.2 Probengewinnung

Durchgeführt wurde eine 23g (gauge) Standard pars plana Vitrektomie. Während der PPV wurde zunächst der Glaskörper mittels eines Sogs mit dem Vitrektom von der Papille in Richtung Peripherie abgelöst. Danach folgte eine intraoperative Färbung der ILM mit dem Farbstoff *Brillant Blau* zur besseren Darstellung der ILM. Anschließend wurde die ILM mittels einer Eckardt-Pinzette vorsichtig abgelöst. Dieser Schritt wird als ILM-Peeling bezeichnet. Zur Aufrechterhaltung des Augennendruckes fand die gesamte Prozedur unter konstanter intraokularer BSS-Infusion durch ein geschlossenes System statt. Im Anschluss wurde eine C2F6-Gastamponade verwendet. Postoperativ erfolgte die Verordnung einer speziellen Kopflagerung mit dem Gesicht nach unten für 2-3 Tage.

### 2.3 Fixierung und Lagerung der Probe

Nach dem operativen Peeling der ILM wurden die Präparate für den Transport ins Labor in Alcon BSS Plus® (Freiburg im Breisgau, Deutschland) eingelegt. In der Mehrzahl der Fälle standen mehrere ILM-Fragmente pro Patient für die histopathologischen Untersuchungen zur Verfügung. Nach dem Transport erfolgte sofort die Fixierung mittels Paraformaldehyd-Lösung (PFA) mit 0,1% Glutaraldehyd (GA) für die Fluoreszenzmikroskopie und in 4%-iger GA-Lösung für die Elektronenmikroskopie. Die ILM-Präparate wurden für mindestens 24h bei 4°C gelagert. Die auf diese Weise fixierten Proben wurden zuerst für die Immunfluoreszenzmikroskopie und darauffolgend für die Licht- und Elektronenmikroskopie (EM) aufgearbeitet. Die direkt in Glutaraldehyd gelagerten Proben wurden ausschließlich für elektronenmikroskopische Untersuchungen bearbeitet.

## 2.4 Flat-mount Technik

Zur phasenkontrast-, interferenz- und immunfluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Präparate wurde die Flachpräparation, die sogenannte flat-mount Technik, eingesetzt. Bei der flat-mount Technik wurde die Membran aus dem Fixierungsmedium mit einem Glashäkchen und einem Tropfen 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) auf einen Objektträger übertragen. Anschließend wurde das Präparat mit Hilfe eines Glashäkchens vorsichtig flach ausgebreitet und mit einem Deckglas zugedeckt. Die Flachpräparate wurden dann am Fluoreszenzmikroskop in Aufsicht untersucht. Dies ermöglichte eine Analyse der Anzahl und Verteilung verschiedener Elemente, wie z.B. der Zellen, auf der kompletten Fläche einer ILM-Membran.

Nach erfolgreicher Dokumentation und Untersuchung am ILM-Flachpräparat wurde das Gewebe postfixiert und für die EM-Aufnahmen vorbereitet. In zwei Fällen konnten die Proben nach der immunzytochemischen Analyse aufgrund der zu kleinen Größe der Präparate nicht weiterverwendet werden. In diesen zwei Fällen wurden die kleinen ILM-Fragmente für die EM benutzt.

## 2.5 Phasenkontrast- und Interferenzmikroskopie

Phasenkontrast- und Interferenzmikroskopie sind zwei verschiedene lichtmikroskopische Techniken zur Untersuchung der epiretinalen Membranen bzw. der ILM, welche mit der flat-mount Technik vorbereitet wurden.

Die Phasenkontrastmikroskopie ist eine kontrastverstärkende optische Technik zur Herstellung von kontrastreichen Bildern von transparenten Proben wie der ILM. Die Phasenkontrastmikroskopie wandelt Veränderungen der Phase in Änderungen der Amplitude von Lichtwellen beim Durchgang von Körpern um. Dieses Mechanismus führt zur Erhöhung des Kontrastes[58].

Die Interferenzmikroskopie nutzt die Höhenunterschiede einer Oberfläche zur Darstellung von Körpern. Das Licht des Mikroskops (DM 2500, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) wird in zwei Strahlen geteilt und nach dem Durchgang durch das Objekt erneut auf dem Plan zusammengelegt. Aufgrund der Interferenzeffekte werden dann undurchsichtige Objekte als Intensitätsdifferenzen sichtbar[58], [72].

Die Phasenkontrastübersichtsaufnahmen wurden mit der Software Photoshop® CS 6 (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland) zusammengesetzt und zur Ausmessung der Fläche von den Proben verwendet. Die Skala für die Konversion, von den in den Bildern gemessenen Pixeln in Metern, ist in **Tabelle 1** dargestellt.

<u>Vergrößerung</u>	<u>Pixel</u>	<u>nm</u>
5x	549	1000,0000
10x	1094	1000,0000
20x	1098	500,0000
40x	444	100,0000

**Tabelle 1: Skala zur Vermessung der Präparatefläche.**

Skala für die Konversion von den in den Bildern gemessenen Pixeln in Metern zur Vermessung der Präparatefläche.

## 2.6 Immunfluoreszenz

### 2.6.1 Zellkernfärbung und Zellzählung

Zur Detektion von Zellkernen wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Dianova, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die ILM wurde in einen Tropfen dieses Farbstoffs auf einem Objektträger ausgebreitet und mit einem Deckglas bedeckt. Die flach ausgebreiteten ILM-Präparate wurden mit polarisiertem Blaulicht mikroskopiert. Für die Analyse der Zellzahlen wurden die DAPI-Übersichtsaufnahmen verwendet. Die dargestellten Zellkerne wurden entweder manuell oder mit der Hilfe der automatisierten Software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) gezählt. Zur Übersicht wurden zunächst Aufnahmen mittels Phasenkontrast- und Interferenzmikroskopie erstellt und danach mit polarisiertem Licht zur Detektion von DAPI-positiven Zellkernen untersucht. Auf diese Weise war eine Berechnung der Zelldichte und Messung der Membranflächen möglich.

## 2.6.2 Immunpräparation

**Tabelle 2** zeigt die primären Antikörper, die bei den immunzytochemischen Färbungen zur Anwendung kamen. Die Schritte der Immunfluoreszenzvorbereitung sind schematisch in **Tabelle 3** dargestellt. Jede zu analysierende ILM wurde in eine eigene halbkugelförmige Kerbe von einem Kunststofftablett, das als Färbekammer diente, übertragen. Jeder Schritt erfolgte unter sanften Schwingungen der Rüttelmaschine.

<u>Zellspezifisches Antigen</u>	<u>Zielstruktur</u>
<b>Vimentin (VIM)</b>	Intermediärfilamente der Gliazellen
<b>Fibrilläres saures Gliaprotein (GFAP)</b>	
<b>Neurofilament (NF)</b>	Retinale Ganglienzellen
<b>Zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein (CRALBP)</b>	Müller- und retinale Pigmentepithelzellen
<b>Calretinin</b>	Retinale Ganglienzellen, Amakrine- und Horizontalzellen
<b>Melanopsin</b>	Dendriten und Axone von retinalen Ganglienzellen
<b>Gliazellen abgeleiteter neurotropher Wachstumsfaktor (GDNF)</b>	Neuronaler Wachstumsfaktor
<b>Ziliärer neurotropher Faktor (CNTF)</b>	Neuronaler Wachstumsfaktor

**Tabelle 2: Primäre Antikörper und ihre Zielstrukturen.**

Die immunzytochemische Färbung begann mit zwei Waschvorgängen von je 10 Minuten mit 0,1 M PBS-Lösung. Danach erfolgte die enzymatische Demaskierung mittels 0,1% Pepsin in 0,1 M PBS-Puffer. Nach 15 Minuten wurden die Proben erneut zweimal mit PBS-Lösung gespült, bevor sie 90 Minuten im PBT-Puffer inkubiert wurden. Ab diesem Schritt lag die Kunststoffplatte in einer nach Laborschema aufgebauten Feuchtkammer auf dem IKA-Vibrax-VXR-Rüttler (IKA Werke, Staufen, Deutschland). Anschließend wurden die in PBT-Puffer verdünnten primären Antikörper in der gewünschten Kombination auf die Membranen gegeben (siehe **Tabelle 4**). Dabei wurden die primären Antikörper über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die ILM-Präparate erneut

dreimal für je 10 Minuten gewaschen und Sekundärantikörper zugegeben. Jede Membran bekam die gleiche 100 µl PBS-Lösung mit C2, C3 und C5 Fluorochrom markierten Antikörpern in einer 1:100 Verdünnung (siehe **Tabelle 5**). Sowohl Arbeitsschritte als auch Inkubation der Sekundärantikörper erfolgten unter Abdunkelung, um eine Schwächung des Fluoreszenzsignals zu verhindern. Zum Schluss wurden die Proben je viermal 10 Minuten lang mit PBS-Lösung gewaschen, in einen DAPI-Tropfen auf einem SuperFrost™ Objektträger (Menzel, Braunschweig, Deutschland) übertragen, flach ausgebreitet und mit einem Deckglas abgedeckt.

<u>Schritt</u>	<u>Zeit</u>
1. Auswaschen in 0,1 M PBS (pH 7.4)	2 x 10 Minuten
2. Enzymatische Demaskierung mit 0,1% Pepsin in 0,1 M PBS-Puffer	15 Minuten
3. Auswaschen in 0,1 M PBS (pH 7.4)	2 x 5 Minuten
4. Inkubationspuffer (PBT)	1,5 Stunden
5. Hinzugabe primärer Antikörper in PBT	Über Nacht
6. Auswaschen in 0,1 M PBS (pH 7.4)	3 x 10 Minuten
7. Hinzugabe sekundärer Antikörper (1:100) in 0,1 M PBS	1,5 Stunden
8. Auswaschen in 0,1 M PBS (pH 7.4)	4 x 10 Minuten
Übertragung des Präparates auf Objektträger, Eindecken mit DAPI Mountain-Medium und Fotografieren	

**Tabelle 3: Schritte der Immunfluoreszenzvorbereitung.**

<b><u>Antigen</u></b>	<b><u>Verdünnung in PBS</u></b>	<b><u>Daten der primären Antikörper</u></b>
<b><u>Zellspezifische Antigene</u></b>		
<b>Vimentin (VIM)</b>	1:40	Ziege, V 4630, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland.
<b>Fibrilläres saures Gliaprotein (GFAP)</b>	1:50	Kaninchen, Z 0334, Dako, Jena, Deutschland. Maus, sc-9973, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland.
<b>Neurofilament (NF)</b>	1:50	Maus, M 0726, Dako, Jena, Deutschland.
<b>Retinaldehyd-bindendes Protein (CRALBP)</b>	1:50	Ziege, sc-18757, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland.
<b>Calretinin</b>	1:50	Kaninchen, GTX103261, GeneTex, Eching, Deutschland.
<b>Melanopsin</b>	1:20	Kaninchen, GTX19383, GeneTex, Eching, Deutschland.
<b><u>Neurotrophe Wachstumsfaktoren</u></b>		
<b>Gliazellen abgeleiteter neurotropher Wachstumsfaktor (GDNF)</b>	1:50	Kaninchen, sc-328, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland. Ziege, sc-328-G, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland.
<b>Ziliärer neurotropher Faktor (CNTF)</b>	1:50	Kaninchen, HPA0196, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland.

Tabelle 4: Daten der verwendeten primären Antikörper.

<u>Sekundärantikörper</u>	<u>Verdünnung in PBS</u>	<u>Zielspezies</u>	<u>Daten der Antikörper</u>
<b>Cy 3</b>	1:100	Maus	715-165-150, Dianova, Hamburg, Deutschland. Emission bei 570 nm Rote Farbe
<b>Cy 2</b>		Kaninchen	715-225-150, Dianova, Hamburg, Deutschland. Emission bei 508 nm Grüne Farbe
<b>Cy 5</b>		Ziege	705-175-003, Dianova, Hamburg, Deutschland. Emission bei 670 nm Infrarote Farbe

**Tabelle 5: Daten der verwendeten sekundären Antikörper.**

### 2.6.3 Negativkontrollen

Als Negativkontrollen für die Immunfluoreszenz sind zwei unterschiedliche Methoden genutzt worden:

- Durchführung der immunzytochemischen Untersuchung mittels Isotypkontrollen der gleichen Art der verwandten primären Antikörper als Primärantikörper.
- Durchführung der immunzytochemischen Untersuchung ohne Primärantikörper.

Die Daten der Isotypkontrollen sind in Anhang A „Laboraustattung, Reagenzien und Rezepturen“ dargestellt. Ein Beispiel von Negativkontrolle ist in der **Abbildung 22** gezeigt.

### 2.6.4 Bilddokumentation

Zur Aufnahme der Bilder wurden das Fluoreszenzmikroskop (DM 2500, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit der Mikroskop-Kamera (ProgRes® CF, Jenoptik Optical Systems, Jena, Deutschland) und die Software ProgRes® CapturePro v2.8.8 (Jenoptik Optical Systems, Jena, Deutschland) verwendet. Jede Stelle der ILM-Präparate wurde in Phasen-, Interferenz- und Fluoreszenzmikroskopie fotografiert, ohne das Präparat zwischen den Aufnahmen zu bewegen.

Zur Darstellung der unterschiedlichen eingesetzten Antikörper wurden drei verschiedene Wellenlängen-Filter benutzt: 508 nm (Cy2), 570 nm (Cy3) und 670 nm (Cy5). DAPI wurde mit einem zusätzlichen Filter (460 nm) detektiert.

Angefertigt wurde eine Anzahl an Bildern in verschiedenen Vergrößerungen: 50-, 100-, 200- und 400-fach. Ausgewertet wurden:

1. Anwesenheit positiver Zellen für die untersuchten Marker.
2. Kolokalisation der untersuchten Marker.
3. Zelldichte der ILM.
4. Größe der ILM.
5. Vorkommen von Poren.

Zur Darstellung von möglichen Koloalitionen der Marker wurden Bilder der gleichen Stelle, die mit verschiedenen Wellenlängen-Filtern aufgenommen wurden, mittels Adobe Photoshop® CS 6 (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland) überlagert.

Die Aufnahmen der jeweiligen Fluorochrome wurden parallel untersucht. Zur Beschreibung der Anwesenheit positiver Zellen wurde folgende semiquantitative Skala benutzt:

- - : Keine positiven Zellen für den Marker.
- (+) : Wenige positive Zellen für den Marker.
- + : Mittlere Anzahl an positiven Zellen für den Marker.
- ++ : Große Anzahl an positiven Zellen für den Marker.

Die Analyse der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte in Eigenregie und wurde anschließend von zwei erfahrenen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe reevaluiert und verglichen.

## 2.7 Licht- und Transmissionselektronenmikroskopie

### 2.7.1 Semidünnschnitt- und Ultradünnschnittpräparation

Eine schematische Darstellung des Vorbereitungsprotokolls von den EM-Proben befindet sich in der **Tabelle 6**. Die Aufarbeitung der Proben für die Elektronenmikroskopie in den Schritten 11-13 wurde aufgrund der Verwendung von gesundheitsschädlichen Substanzen unter Aufsicht und der Mitarbeit des Laborpersonals durchgeführt.

Nach einer Fixierung von mindestens 24h in 4%-iger GA-Lösung wurden die Membranen unter leichtem Rütteln im 0,1 M PBS gewaschen und für eine Stunde in 1%iger Osmium-tetroxid-Lösung unter den Abzug gelegt. Anschließend fand ein erneuter Waschschrift im 0,1 M PBS statt. Diesem folgten zwei Dehydrierungsschritte, erst mit einer 30%-, dann mit einer 50% -haltigen Ethanol-Lösung, für jeweils 15min. Über Nacht erfolgte die Blockkontrastierung der ILM mit 1% Koamylacetat in 70% Ethanol. Der Dehydrierungsprozess wurde am Folgetag mit einer Alkohol-Verdünnungsreihe fortgesetzt:

- 70% Ethanol 15 Minuten.
- 90% Ethanol 15 Minuten.
- 100% Ethanol 2 x 15 Minuten.

Gleichzeitig wurde die Epon-Mischung angesetzt und 1:1 zu 100%igem Ethanol zugegeben. Die Proben wurden sofort in das hergestellte Gemisch über Nacht eingebettet und am nächsten Tag in die Einbettformen gelegt. Dabei wurde auch die auf einem Stück Papier gedruckte Probennummer vergeben und ausgerichtet. Schließlich blieb die Einbettform mit den ILM-Präparaten für 5 Stunden auf dem Rüttler, bevor sie 2 Tage lang zur Polymerisation im Wärmeofen (Mettler B30, Mettler, Schwabach) bei 58°C eingelagert wurde.

Die auf diese Weise in Epon eingebetteten Proben wurden am Leica Ultracut (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) geschnitten. Dabei wurden 1 µm dicke Semidünnschnitte (nach einer Methylenblau-Färbung zur topographischen Orientierung und Qualitätskontrolle der Schnitte) verwendet und danach ca. 60-70 nm Ultradünnschnitte zur EM-Untersuchung hergestellt. Nach dem Schneiden von circa 4-5 Semi-Schnitten wurden diese auf ein *Grid* (gitterförmiger Probehälter, Pano, Wetzlar, Deutschland) übertragen.

Zum Abschluss fand die Kontrastierung statt. Nach einem 15-minütigen Bad in 2% Uranylacetat in destilliertem Wasser wurden die *Grids* mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurden sie in Bleicitrat 2-mal für jeweils 10 und 15 Minuten gelassen. Nach einer weiteren Waschung mit destilliertem Wasser wurden die Präparate bei Raumtemperatur für mindestens einen Tag getrocknet.

Die Proben wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss EM 900, Zeiss, Jena, Deutschland) ausgewertet und mit dessen Kamera (Slow-scan CCD-Camera for TEM, TRS, Moorenweis, Deutschland) fotografiert. Die Stellen von Interesse wurden in verschiedenen Vergrößerungen aufgenommen. Hierbei wurden die folgenden Membraneigenschaften dokumentiert: Anwesenheit, Art und Lokation (auf der retinalen oder vitrealen Seite der ILM), Vorkommen der Zellen und Kollagene, Anwesenheit von nativen vitrealen Kollagenen, neu formiertes Kollagen und fibröses Kollagen mit langem Bänderungsmuster.

<b><u>Schritt</u></b>	<b><u>Zeit</u></b>
1. 4% GA-Fixierung	Mindestens 24 Stunden
2. Aufwaschen in 0,1 M PBS (pH 7.4)	
3. 1% Osmiumtetroxid –Lösung	1 Stunde, unter Abzug
4. Aufwaschen in 0,1 M PBS (pH 7.4)	1 Stunde, unter Abzug
5. Dehydrierung: 30% Ethanol 50% Ethanol	Je 15 Minuten
6. Blockmaskierung mit 1% Koamylacetat in 70% Ethanol	Über Nacht
7. Verdünnungsreihe: 70% Ethanol 90% Ethanol 100% Ethanol	15 Minuten 15 Minuten 2 x 15 Minuten
8. Epon-Mischung + 100% Ethanol (1:1)	Über Nacht
9. Proben einbetten und ruhen lassen	5 Stunden
10. Lagerung im Wärmeofen bei 58°C	2 Tage
11. Herstellung der ultradünnen Schnitten mit Ultracut	
12. Übertragung der Schnitte auf <i>Grids</i>	
13. Kontrastierung: 2% Uranylacetat im destillierten Wasser Aufwaschen im destillierten Wasser Bleicitrat im destillierten Wasser Aufwaschen im destillierten Wasser	15 Minuten  10 und 15 Minuten
14. Abtrocknen der Proben bei Raumtemperatur	Mindestens 24 Stunden
15. Untersuchung mit Elektronenmikroskop	

**Tabelle 6: Vorbereitungsschritte für die Elektronenmikroskopie.**

### **2.7.2 Bilddokumentation der Elektronenmikroskopie**

Auch die elektronenmikroskopische Auswertung war semiquantitativ:

- - : Gesuchtes Merkmal abwesend.
- (+) : Gesuchtes Merkmal selten beobachtet.
- + : Gesuchtes Merkmal mit mittlerer Häufigkeit beobachtet.
- ++ : Gesuchtes Merkmal häufig beobachtet.

Die Analyse der mikroskopischen Aufnahmen erfolgte in Eigenregie und wurde anschließend von zwei erfahrenen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe reevaluiert und verglichen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Allgemeine Patientencharakteristika

In die vorliegende Studie wurden die Präparate der inneren Grenzmembran von 24 Augen eingeschlossen, die mittels pars plana Vitrektomie mit ILM-Peeling von 24 Patienten gewonnen wurden. Die ILM-Präparate von 17 Augen wurden immunfluoreszenz-, interferenz- und phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Eine zusätzliche, ultrastrukturelle Untersuchung wurde mittels Transmissionselektronenmikroskopie bei ILM-Präparaten von 12 dieser 17 Augen durchgeführt. Die ILM Präparate von 7 Augen wurden ausschließlich mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Die Daten sind in der **Tabelle 7** gezeigt.

Die Entscheidung zur immunzytochemischen und/oder elektronenmikroskopischen Untersuchung richtete sich dabei ausschließlich nach der Größe der chirurgisch gewonnenen ILM-Präparate. Je kleiner das ILM-Präparat, desto schwieriger ist die Durchführung der immunzytochemischen Präparationsschritte. Aus diesem Grund wurden sehr kleine Präparate bei 7 Augen ausschließlich für die Elektronenmikroskopie aufgearbeitet.

Das Patientenkollektiv bestand zu 75% aus Frauen (18/24) und das durchschnittliche Alter betrug ca. 69 Jahre (SD  $\pm$  7 Jahre, 51 - 82 Jahre).

Für die Durchführung dieser Studie wurde das Material von nur einem Auge pro Patienten benutzt. Das am häufigsten operierten Auge war das linke (58%; 14/24). Präoperativ waren 15 Augen phak und 9 pseudophak (62% und 38%). Eine kombinierte Operation mit PPV, Peeling und Phakoemulsifikation mit Hinterkammerlinsenimplantation erfolgte bei allen 15 pseudophaken Augen, während die 9 bereits pseudophaken Augen ausschließlich mit ILM-Peeling und PPV behandelt wurden.

<u>Patient</u>	<u>Alter/Geschlecht</u>	<u>Auge</u>	<u>Präoperativer Linsenstatus</u>	<u>Makulforamens stadium</u>	<u>Makulaforamendurchmesser [µm]</u>	<u>VMT vorhanden</u>	<u>Untersuchungsmethoden</u>
1	74/F	OD	Phak	IV	574	-	TEM
2	68/M	OD	Phak	IV	433	-	IC + TEM
3	74/F	OD	Phak	IV	657	-	IC + TEM
4	51/F	OS	Phak	IV	400	-	IC + TEM
5	74/F	OD	Phak	IV	548	-	IC + TEM
6	74/F	OD	Phak	III	608	+	IC + TEM
7	58/F	OS	IOL	IV	429	-	IC + TEM
8	68/F	OS	Phak	IV	526	-	IC + TEM
9	59/F	OD	Phak	IV	435	-	IC + TEM
10	71/F	OS	Phak	III	413	+	TEM
11	80/F	OS	Phak	IV	463	-	IC + TEM
12	65/F	OS	Phak	IV	577	-	TEM
13	69/F	OS	IOL	IV	505	-	IC

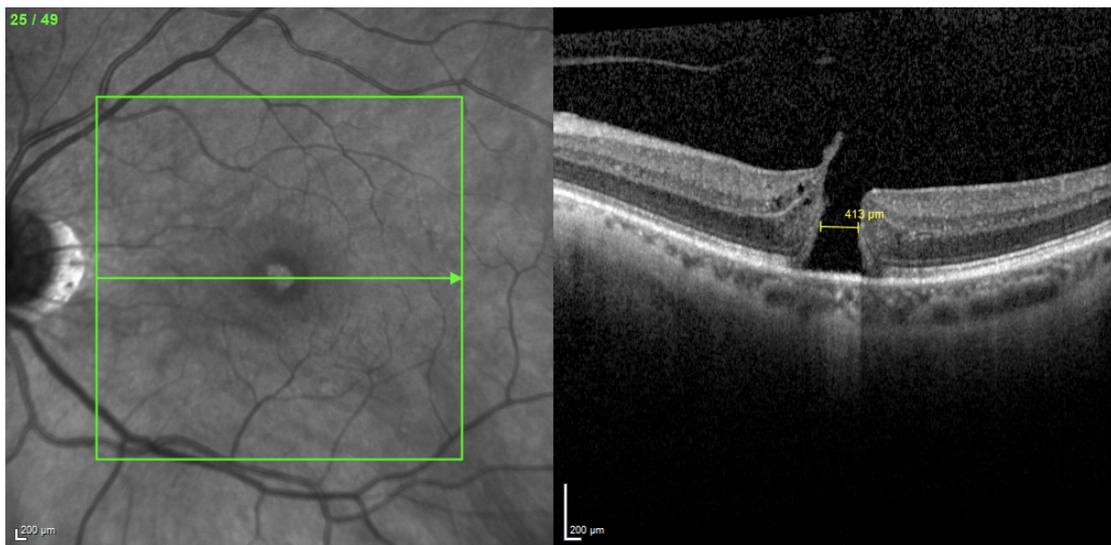
14	77/M	OS	IOL	IV	400	-	TEM
15	82/F	OS	Phak	III	544	-	TEM
16	68/M	OD	Phak	IV	636	-	IC
17	66/F	OS	IOL	IV	422	-	IC
18	77/M	OS	IOL	IV	508	-	TEM
19	63/M	OD	Phak	IV	537	-	IC + TEM
20	79/F	OD	IOL	IV	650	-	IC
21	63/F	OS	Phak	IV	415	-	IC + TEM
22	67/M	OD	IOL	IV	487	-	IC
23	71/F	OS	IOL	IV	522	-	TEM
24	69/F	OS	IOL	IV	544	-	IC + TEM

**Tabelle 7: Allgemeine Patientendaten.**

M = männlich. F = weiblich. OD = Oculus dexter, rechtes Auge. OL = Oculus sinister, linkes Auge. Phak = mit eigener Linse. IOL = Intraokularlinse.

VMT = vitreomakuläre Traktion. IC = Immunzytochemie, TEM = Transmissionselektronenmikroskopie.

Die mittels SD-OCT gemessenen Makulaforaminadurchmesser waren alle größer als 400  $\mu\text{m}$ , mit einem durchschnittlichen Durchmesser von  $506,08 \pm 78,52 \mu\text{m}$  (Median 506,5  $\mu\text{m}$ ; Range 400 - 657  $\mu\text{m}$ ). Drei von 24 (12%) Augen zeigten ein MF im Stadium 3 nach Gass und 21 von 24 Augen (88%) ein MF des Stadiums 4 nach Gass. Eine VMT war bei 2 der 3 Augen mit MF Stadium 3 zu erkennen, wie in der **Abbildung 9** dargestellt.



**Abbildung 9: Beispiel eines durchgreifenden Makulaforamens mit Traktion**

Patient 10, linkes Auge. Links: Konfokale Scanning-Laser-Ophthalmoskopie des Fundus oculi; Rechts: *spectral domain* optische Kohärenztomographie mit Darstellung eines großen Makulaforamens mit Traktion.

## 3.2 Lichtmikroskopische Analyse der Fläche und Zellzahl der Präparate

Die Ergebnisse der Lichtmikroskopie sind in der **Tabelle 8** dargestellt. Bei den mittels Immunfluoreszenz untersuchten Präparaten (17/24 Augen) wurden Fläche und Zelldichte durch Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie sowie DAPI-Zellkernfärbung gemessen.

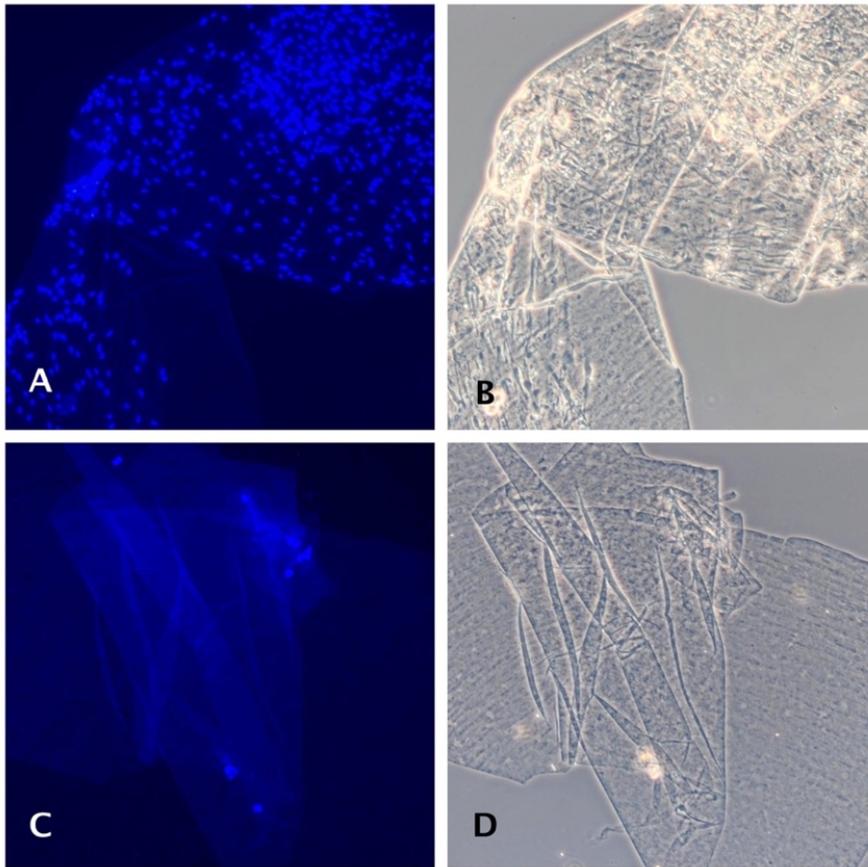
Während der Aufarbeitung der Proben wurden große Zellenansammlungen als trüb-weißliche und leicht prominente Auflagerung auf der flachen und homogenen ILM unter dem Stereomikroskop bereits mit niedrigeren Vergrößerungen wahrgenommen. Kleine Zellenansammlungen oder einzelne Zellen konnten nur in der Lichtmikroskopie und mittels Zellkernfärbung sichtbar gemacht werden.

Die Zellanzahl betrug  $172,47 \pm 184,61$  Zellen (Median 68 Zellen; Range 4 - 579 Zellen) mit einer Zelldichte von  $48,82 \pm 54,68$  Zellen/mm<sup>2</sup> (Median 34 Zellen/mm<sup>2</sup>; Range 2 – 198 Zellen/mm<sup>2</sup>). Die Fläche der untersuchten ILM-Präparate lag durchschnittlich bei  $4,52 \pm 3,14$  mm<sup>2</sup> (Median 2,93 mm<sup>2</sup>; Range 0,73 – 9,60 mm<sup>2</sup>).

Es wurde eine heterogene Zellenverteilung auf den Präparaten beobachtet: Manche Stellen der Membranen zeigten eine dichte Ansammlung an Zellen, während andere Areale wiederum zellreicher oder ohne Zellenansammlungen waren. Unterschiedlich war auch die Zellenverteilung: vereinzelt, in Clustern, in regelmäßigen Abständen voneinander stehend und auf konfluierende oder nichtkonfluierende Weise disponiert. **Abbildung 10** stellt ein Beispiel der Heterogenität von Zelldichte und Verteilung dar: Der Patient 5 zeigte eine Zellpopulation mit nebeneinanderstehenden konfluierenden und nichtkonfluierenden Zellen. Im Gegensatz dazu befanden sich deutlich weniger Zellen auf dem Präparat vom Patient 17 mit einzelnen Zellen.

<u>Patient</u>	<u>Fläche (mm<sup>2</sup>)</u>	<u>Zellzahl</u>	<u>Zellen/mm<sup>2</sup></u>
2	3,86	200	52
3	1,92	295	154
4	9,57	50	5
5	2,93	579	198
6	8,26	31	4
7	2,65	185	70
8	2,26	68	30
9	1,01	59	58
11	7,43	413	56
13	1,85	4	2
16	7,16	529	74
17	2,10	6	3
19	4,36	254	58
20	2,61	23	9
21	9,60	153	16
22	8,61	58	7
24	0,73	25	34

**Tabelle 8: Fläche, Zellzahl und Zelldichte der Präparate der inneren Grenzmembran.**



**Abbildung 10: Heterogenität in der Zelldichte und Verteilung.**

(A) und (B): Patient 5, rechtes Auge, 100x Vergrößerung; (C) und (D): Patient 17, linkes Auge, 100x Vergrößerung. DAPI-Aufnahme (A) und (C). Phasenkontrastmikroskopie (B) und (D). (A) und (B) zeigen eine Schwankung in der Zelldichte, welche diffus und zum Teil konfluierend auf dem Präparat vorkamen, (C) und (D) zeigen ein zellarmes Präparat.

### 3.3 Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse

Sowohl alle zellspezifischen Antigene als auch alle Wachstumsfaktoren stellten sich in den immunzytochemischen Untersuchungen als positiv heraus (siehe **Tabelle 9**).

Die untersuchten Zellepitope waren in der semiquantitativen Auswertung allgemein mäßig exprimiert, aber in variablem Ausmaß. Die Wachstumsfaktoren zeigten sich dagegen homogen und durchschnittlich häufiger vorkommend. Die semiquantitativen Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen sind in **Tabelle 10** zusammengefasst.

<b>Patient</b>	<b>NF</b>	<b>CRALBP</b>	<b>GFAP</b>	<b>VIM</b>	<b>Melanopsin</b>	<b>Calretinin</b>	<b>GDNF</b>	<b>CNTF</b>	<b>Negativkontrolle</b>	<b>Kolokalisation</b>
2	+					++	++			Calretin + GDNF
3	+	+	++							-
4	+	-	+	+			(+)		-	GFAP + VIM
5		+	-			+				Calretinin + CRALBP
6		-	-			-			-	-
7			+	+			++			GFAP + GDNF GFAP + Vim
8			+	+			++			GFAP + GDNF
9	+				+		++		-	Melanopsin + GDNF
11	(+)			++				++		VIM + CNTF
13									-	-
16	(+)			+				++		VIM + CNTF
17	-					-	+			-
19	+	-	+	+			++	++		GFAP + VIM
20	+	(+)	+	+			+			GFAP + GDNF GFAP + Vim

21	-			+				++		VIM + CNTF
22	-			+				++		-
24	-				+		+			Melanopsin + GDNF

**Tabelle 9: Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen.**

NF = Neurofilament. CRALBP = Zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein. VIM = Vimentin. GDNF = Gliazellen abgeleiteter neurotropher Wachstumsfaktor. CNTF = Ziliärer neurotropher Faktor.

<b><u>Zellspezifisches Antigen</u></b>	<b><u>Zielstruktur</u></b>	<b><u>n=</u></b>	<b><u>-</u></b>	<b><u>(+)</u></b>	<b><u>+</u></b>	<b><u>++</u></b>	<b><u>Anteil positiv</u></b>	<b><u>Insgesamte Immunreaktivität</u></b>
<b>Vimentin (VIM)</b>	Intermediärfilamente der Gliazellen	9	0	0	9	0	100%	+
<b>Fibrilläres saures Gliaprotein (GFAP)</b>	Intermediärfilamente der Gliazellen	8	2	0	5	1	75%	+
<b>Nerurofilament (NF)</b>	Retinale Ganglienzellen	12	4	2	6	0	67%	+
<b>Zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein (CRALBP)</b>	Müller- und retinale Pigmentepithelzellen	6	1	3	2	0	84%	(+)
<b>Calretinin</b>	Retinale Ganglienzellen, Amakrine- und Horizontalzellen	4	2	0	1	1	50%	+
<b>Melanopsin</b>	Dendriten und Axone von retinalen Ganglienzellen	2	0	0	2	0	100%	+
<b>Gliazellen abgeleiteter neurotropher Wachstumsfaktor (GDNF)</b>	Neuronaler Wachstumsfaktor	9	0	1	3	5	100%	++
<b>Ziliärer neurotropher Faktor (CNTF)</b>	Neuronaler Wachstumsfaktor	5	0	0	0	5	100%	++

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Immunfluoreszenz.

### 3.3.1 Zellspezifische Antigene

Vimentin war in allen Präparaten zu finden. Positive Zellen für diesen Gliazellmarker war mittelhäufig positiv (+, 8/9) und häufig positiv (++, 1/9) in den untersuchten Proben (vgl. **Abbildung 12** und **Abbildung 18**). Es wurde kein extrazelluläres Vorkommen beobachtet.

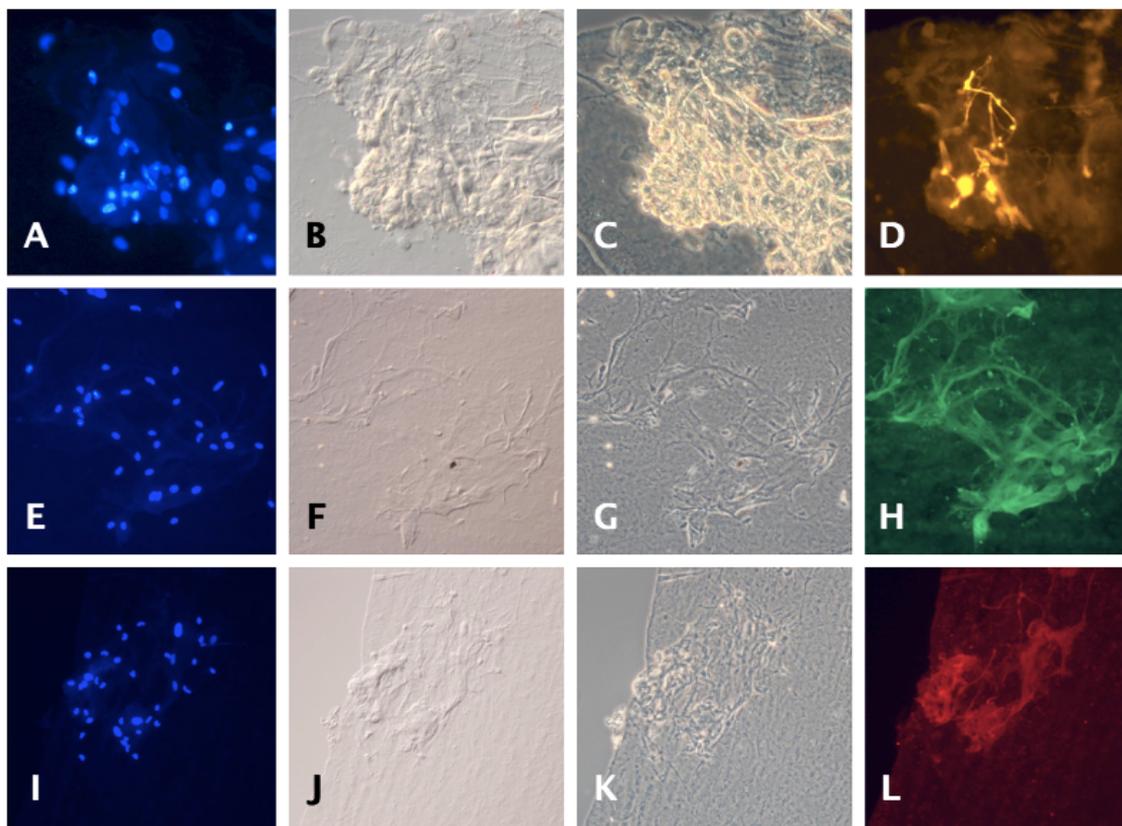
Das saure Gliafaserprotein, GFAP, ein anderer Marker für gliale Zellen, wurde in 6 von 8 Proben (75%) nachgewiesen. Anders als bei Vimentin zeigte sich sowohl ein intra-, als auch extrazelluläres Vorkommen. Die Positivität für dieses Epitop ist in **Abbildung 12** und **Abbildung 13** dargestellt. Bezüglich der Häufigkeit des Epitops sind GFAP-positive Zellen ein häufiger Bestandteil epi-retinaler Zellen (+ in 5/6 und ++ in 1/6 Proben, jeweilig 83% und 17%).

Das Neurofilament Protein wies ein positives Signal in 8 von 12 Fällen auf (67%). In 2 der 8 positiven ILM-Präparate war dieser Gliazellmarker selten positiv ((+), 25%). Bei den restlichen 6 Augen waren die positiven Zellen für dieses Epitop oft vorkommend (+, 75%). Die Auswertung des Signals von NF zeigte sich zum Teil schwierig aufgrund des starken Signals des Hintergrunds. Ein Beispiel von Positivität für NF wird in der **Abbildung 11**, Bild D, gezeigt.

CRALBP, vorkommend in RPE- und Müllerzellen, wurde in 5 von 6 Augen (84%) positiv gefunden. CRALBP ist als Beispiel in **Abbildung 14** dargestellt. Die beobachtete Expression dieses Proteins in den Proben ist heterogen: In 3 von 5 Augen kam es selten vor ((+), 60%). In den restlichen positiven Präparaten konnte CRALBP mit mittlerer Häufigkeit nachgewiesen werden (+, 40%).

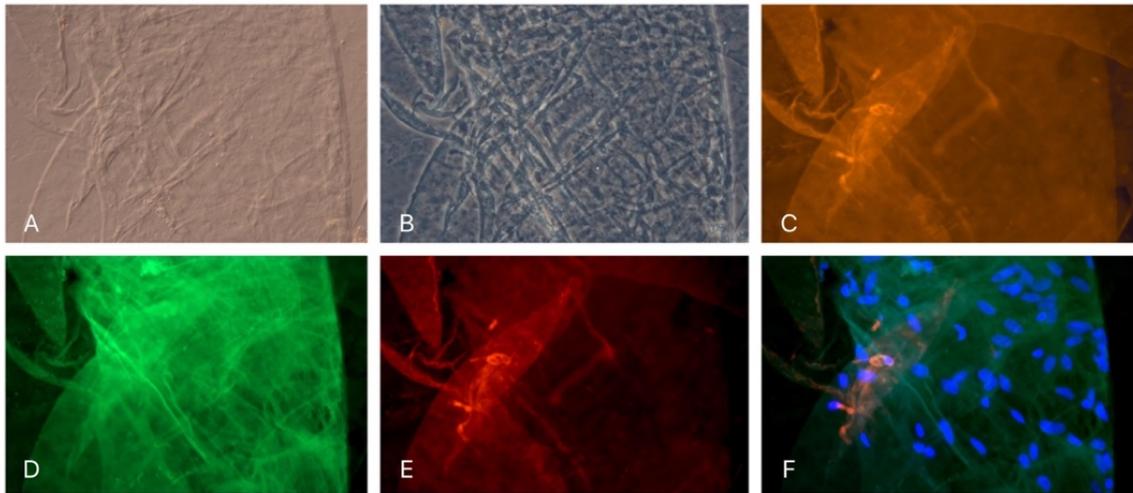
Calretinin wurde in der Hälfte der Präparate gefunden (2/4, einmal + und ++). Dieser Marker für retinale Ganglien-, Amakrine- und Horizontalzellen war am stärksten extrazellulär in Form von positiven Granula beobachtet worden. Eine weitere Besonderheit von Calretinin ist die verstärkte Expression mit gleich großen und konzentrierten, hyperreflektiven Granula in den Zellfortsätzen (siehe **Abbildung 16**). In den Präparaten 6 und 17 wurde eine starke extrazelluläre Expression dieses Epitops gefunden (siehe **Abbildung 15**). Trotz der Verwendung von Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie blieb das morphologische Korrelat, und somit der Ursprung dieser positiven Granula, unklar. Bei fehlenden positiven Zellen und bei reichlich vorkommenden Artefakten auf beiden Proben wurden die Präparate als negativ gewertet.

Ein positiver Nachweis von Melanopsin fand sich in allen untersuchten Proben (n=2). Fast alle Zellen der Proben waren positiv (+) in der Immunfluoreszenz für diesen Ganglienzellenmarker (siehe **Abbildung 17**).



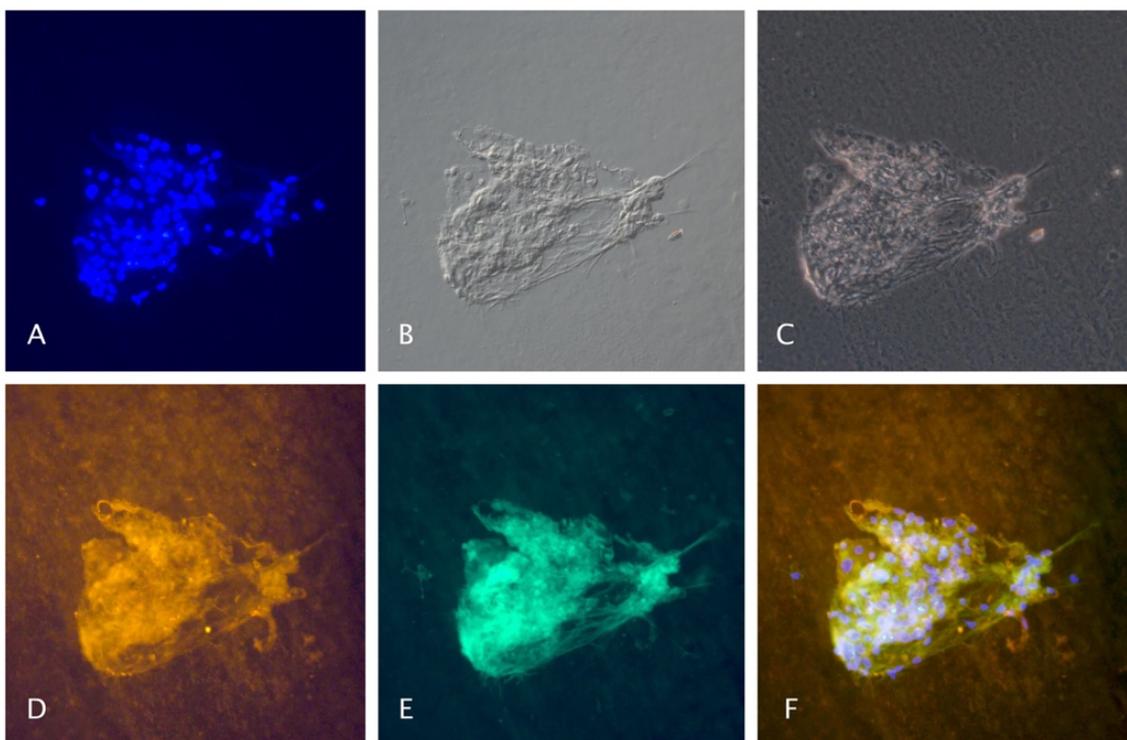
**Abbildung 11: Mikroskopische Aufnahmen von Immunfluoreszenz an flat-mount Präparaten.**

Patient 3, rechtes Auge, x400 Vergrößerung, (A-D). Patient 11, linkes Auge, x200 Vergrößerung, (E-H). Patient 2, rechtes Auge, x200 Vergrößerung, (I-L). DAPI (A), (E) und (I). Phasenkontrastmikroskopie (B), (F) und (J). Interferenzmikroskopie (C), (G) und (K). Anti-NF (D). Anti-CNTF (H). Anti-GDNF (L). Zellen sind für die untersuchten Epitope positiv (D), (H) und (L). Die positiven Strukturen korrelieren mit den mittels DAPI dargestellten Zellkernen (A), (E) und (I) und den Zellkonturen der Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie (B), (C), (F), (G), (J) und (K).



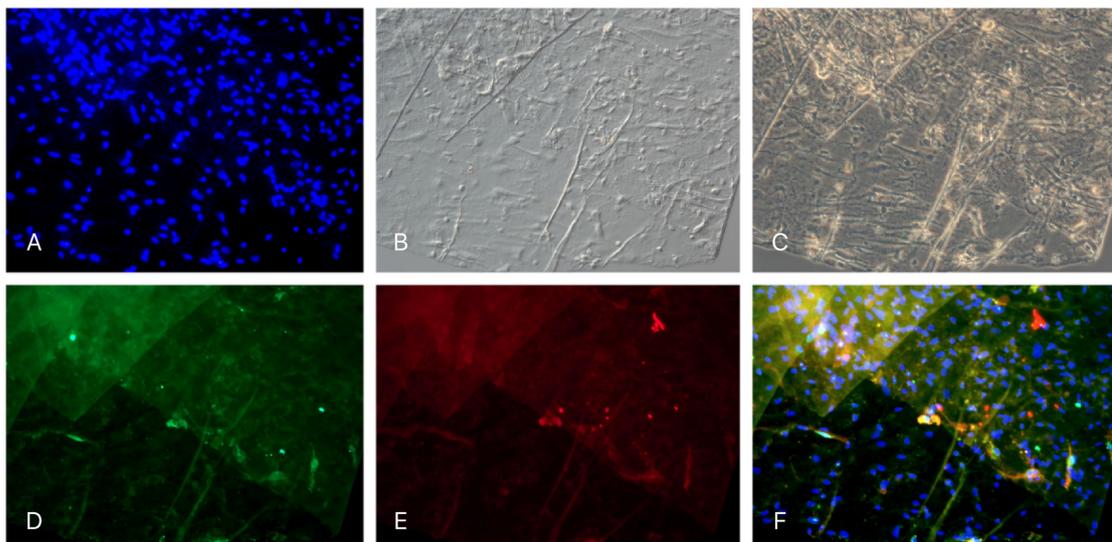
**Abbildung 12: Kolokalisation von Anti-GFAP und Anti-Vimentin.**

Patient 19, rechtes Auge, 400x Vergrößerung. Interferenzmikroskopie (A), Phasenmikroskopie (B), Anti-GFAP (C), Anti-GDNF (D), Anti-VIM (E), Zusammengesetzt DAPI, Anti-GFAP, Anti-GDNF und Anti-Vimentin (F). Kolokalisation von Anti-GFAP mit Anti-Vimentin positiven Zellen.



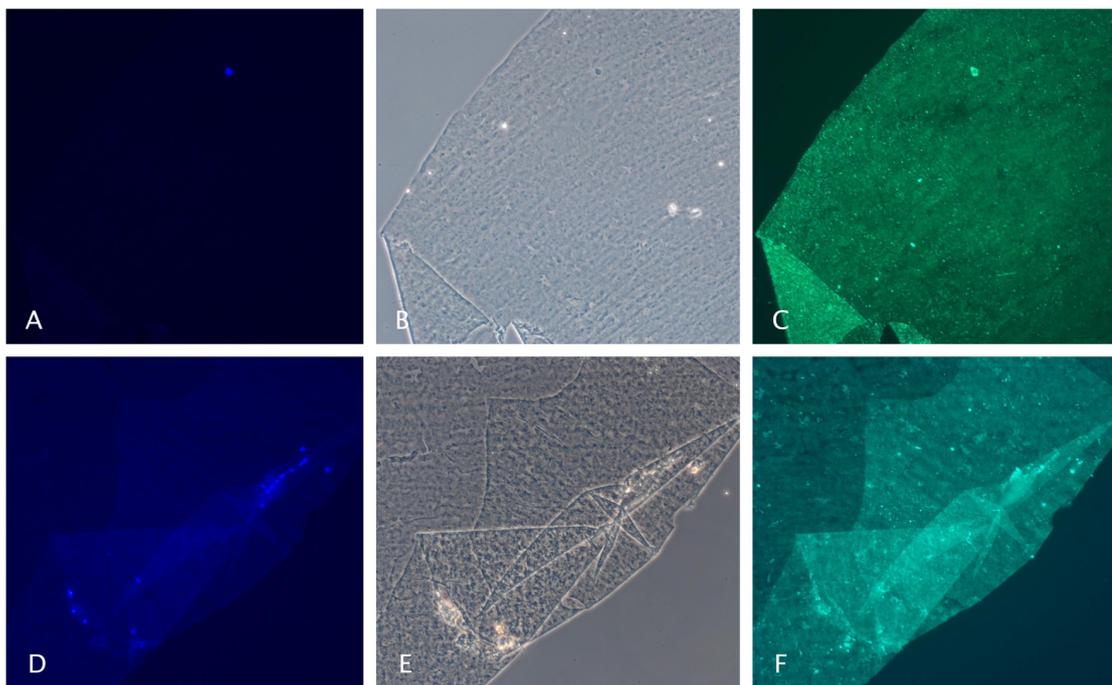
**Abbildung 13: Kolokalisation von Anti-GFAP und Anti-GDNF.**

Patient 8, linkes Auge, 200x Vergrößerung. DAPI (A), Interferenz- (B) und Phasenkontrastmikroskopie (C), Anti-GFAP (D) und Anti-GDNF (E), Zusammengesetzt DAPI, Anti-GFAP und Anti-GDNF (F). Anti-GDNF, sowie Anti-GFAP, sind in einem Zellcluster kolokalisiert.



**Abbildung 14: Kolokalisation von Anti-CRALBP und Anti-Calretinin.**

Patient 5, rechtes Auge, 200x Vergrößerung. DAPI (A), Interferenz- (B) und Phasenkontrastmikroskopie (C), Anti-Calretinin (D), Anti-CRALBP (E), Zusammengesetzt Anti-DAPI, Calretinin und Anti-CRALBP (F). Kolokalisation von Anti-Calretinin mit Anti-CRALBP positiven Zellen.



**Abbildung 15: Artefakte in der Anti-Calretinin-Färbung.**

Patient 17, linkes Auge, 200x Vergrößerung, (A-C). Patient 6, rechtes Auge, 100x Vergrößerung, (D-F). DAPI-Färbung (A) und (D), Phasenkontrastmikroskopie (B) und (E) und Anti-Calretinin (C) und (F). In beiden Präparaten ist keine Zelle für den Calretinin positiv, alle positive Strukturen korrelieren zu nichtzellulären Strukturen, welche entweder Artefakte oder nicht zuzuordnen sind.

### 3.3.2 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren-exprimierende Zellen wurden in jeder untersuchten Probe gefunden (n=13). CNTF wurde in allen Präparaten und in fast allen Zellen exprimiert (++, in 5/5). Wie bei CNTF wurde GDNF in allen untersuchten Proben nachgewiesen, wobei der Anteil der positiven Zellen im Vergleich zu anderen Wachstumsfaktoren variabler war ((+) in 1/9, + in 3/9 und ++ in 5/9). Beide Wachstumsfaktoren kamen hauptsächlich intrazellulär vor (siehe **Abbildung 13**, **Abbildung 16**, **Abbildung 17**, **Abbildung 18**), und auch in Form von extrazellulären Granulationen (siehe **Abbildung 11**, Bild H und L). Durch Phasenkontrast- und Interferenzmikroskopie konnten falsch positive Ergebnisse aufgrund von Artefakten ausgeschlossen werden. Diese extrazellulären Granula wurden häufiger bei GDNF als bei CNFT beobachtet.

### 3.3.3 Kolokalisation von Antigenen

Durch die gleichzeitige Färbung von drei verschiedenen primären Antikörpern pro Präparat fielen mehrere Kolokalisationen der gesuchten Epitope auf. Viele dieser Kolokalisationen wurden mit der Unterstützung von Interferenz- und Phasenkontrastmikroskopie sowie DAPI-Färbung zur möglichen gemeinsamen Struktur zugeordnet. Die untersuchten Kombinationen und deren Ergebnisse sind in **Tabelle 11** aufgelistet.

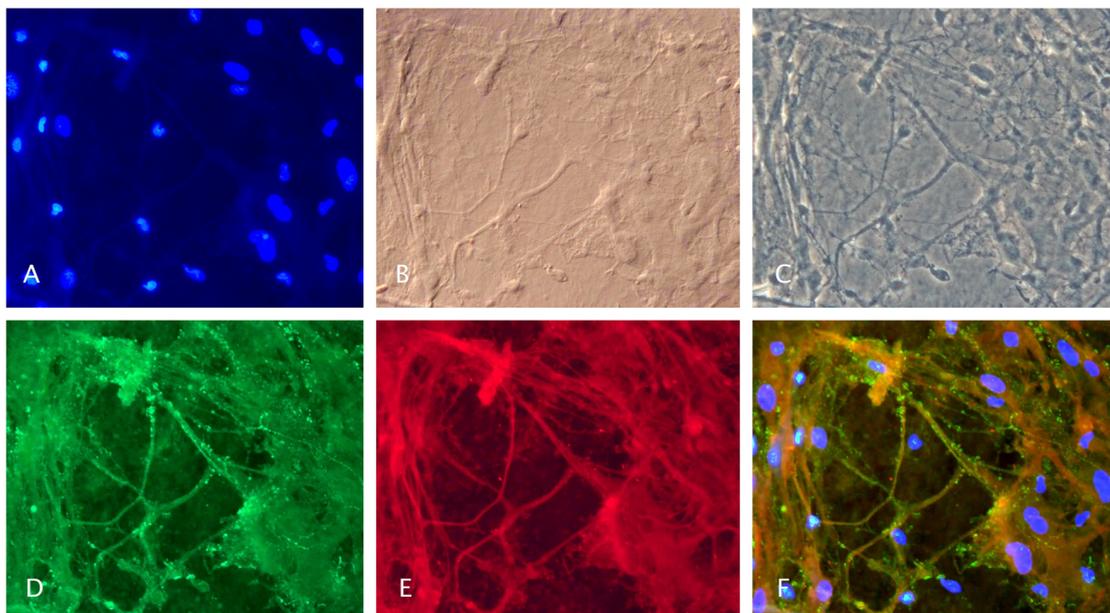
<u>Kolokalisation</u>	<u>Häufigkeit der Kolokalisation</u>
<b>Calretinin + CRALPB</b>	1/2 (50%)
<b>Calretinin + GDNF</b>	1/2 (50%)
<b>GFAP + GDNF</b>	3/5 (60%)
<b>Melanopsin + GDNF</b>	2/2 (100%)
<b>Vimentin + GFAP</b>	4/5 (80%)
<b>Vimentin + CNTF</b>	3/5 (60%)

**Tabelle 11: Übersicht der Kolokalisationen.**

Eine gleichzeitige, zelluläre Expression von Calretinin und CRALBP wurde nur in einem Auge gefunden (1/2). Dabei handelte es sich um eine Minderheit der auf der ILM vorkommenden Zellen (siehe **Abbildung 14**). Eine weitere Kolokalisation von Calretinin mit GDNF fand sich nur auf der Membran des Patienten 2. Hier konnten sowohl im Zellsoma als auch in den –fortsätzen positive Epitope beobachtet werden (siehe **Abbildung 16**).

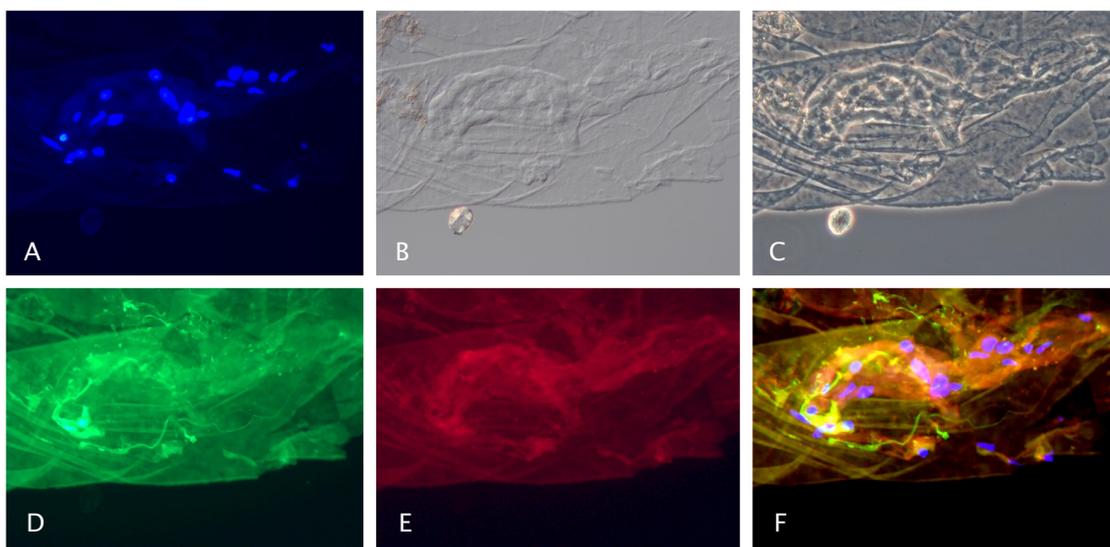
Der neurotrophe Wachstumsfaktor GDNF wurde auch in GFAP- oder Melanopsin-positiven Zellen exprimiert. Die Kolokalisation mit GFAP zeigte sich in zirka 60% (3/5) der durchgeführten Immunfluoreszenz-Untersuchungen. In ähnlicher Weise wurde die gleichzeitige Expression dieses Wachstumsfaktors mit dem Ganglienzellmarker Melanopsin in allen ausgewerteten Proben (2/2) beschrieben. Als Beispiele für diese zwei Kolokalisation dient die **Abbildung 13** des Patienten 8 und die **Abbildung 17** des Patienten 24.

Weitere Kollokalisierungen betreffen Vimentin. Einerseits fand sich eine Kollokalisierung von Vimentin mit GFAP in 80% der Fälle (4/5). **Abbildung 12** zeigt hier die innerhalb der Zellen auftretende Kollokalisierung. Andererseits fand sich eine Kollokalisierung von Vimentin mit dem neuronalen Wachstumsfaktor CNTF (3/5 Patienten, 60%), siehe **Abbildung 18**.



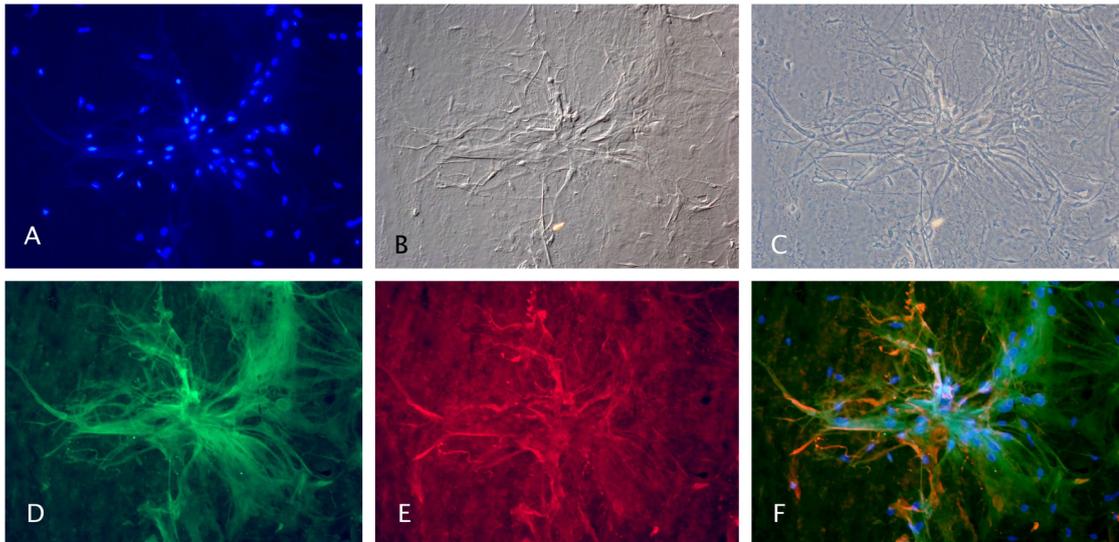
**Abbildung 16: Kolokalisation von Anti-Calretinin und Anti-GDNF.**

Patient 2, rechtes Auge, 400x Vergrößerung. DAPI (A), Interferenz- (B) und Phasenkontrastmikroskopie (C), Anti-Calretinin (D), Anti-GDNF (E), Zusammengesetzt DAPI, Anti-Calretinin und Anti-GDNF (F). Zelluläre Kolokalisation von Anti-Calretinin und Anti-GDNF.



**Abbildung 17: Kolokalisation von Anti-Melanopsin und Anti-GDNF.**

Patient 24, linkes Auge, 400x Vergrößerung. DAPI (A), Interferenz- (B) und Phasenmikroskopie (C), Anti-Melanopsin (D) Anti-GDNF (E), Zusammengesetzt DAPI, Anti-Melanopsin und Anti-GDNF (F). Anti-Melanopsin-positive Strukturen sind mit Anti-GFAP-positiven Strukturen kolokalisiert.



**Abbildung 18: Kolokalisation von Anti-CNTF und Anti-Vimentin.**

Patient 11, linkes Auge, 200x Vergrößerung. DAPI (A), Phasenkontrast- (B) und Interferenzmikroskopie (C), Anti-CNTF (D), Anti-Vimentin (E), Zusammengesetzt DAPI, Anti-Vimentin und Anti-CNTF (F). Anti-CNTF und Anti-Vimentin kolokalisieren in einem Zellcluster.

### 3.3.4 Poren der inneren Grenzsichtmembran

Runde bzw. ovale Membranareale mit einer erhöhten Transparenz im Vergleich zum umgebenden Gewebe wurden erstmals in Präparaten der ILM in großer Anzahl gefunden und als Poren bezeichnet (siehe **Abbildung 19**). Ihre Anwesenheit wurde mittels Immunfluoreszenz, Interferenz- und Phasenmikroskopie nachgewiesen. In den immunzytochemischen Aufnahmen zeigten sich die Poren als rundliche, homogene Areale mit einer erniedrigten Farbmission und regelmäßigen Rändern. Im Gegenteil zu den durch Manipulation entstandenen durchgreifenden Löchern (Artefakte) mit unregelmäßiger scharfkantiger Form (siehe **Abbildung 21**), war die Hintergrundfarbe des Objektträgers eindeutig nicht darstellbar.

In der Phasenkontrastmikroskopie stellen sich diese auffälligen Areale mit glatter Oberfläche und ohne randbetonten Zellbesatz dar. Poren lassen sich einfach von der rauen Oberfläche der Umgebung differenzieren. Als morphologischen Wechselbezug in der Interferenzmikroskopie lassen sich gräuliche Areale mit der im Hintergrund ähnlich gräulicher Farbe in Korrelation bringen. Insbesondere bei größerem Durchmesser war eine rundliche dunkelgraue, leicht bläuliche Struktur ohne Korrelation mit den anderen lichtmikroskopischen Aufnahmen zu sehen (siehe **Abbildung 19**). An den Rändern der Poren wurden keine Zellenproliferationen mit einem Bezug zur Pore selbst beobachtet. Poren wurden auf 65% (11/17), der mittels flat-mount Technik und Immunfluoreszenzmikroskopie untersuchten Membranen gefunden.

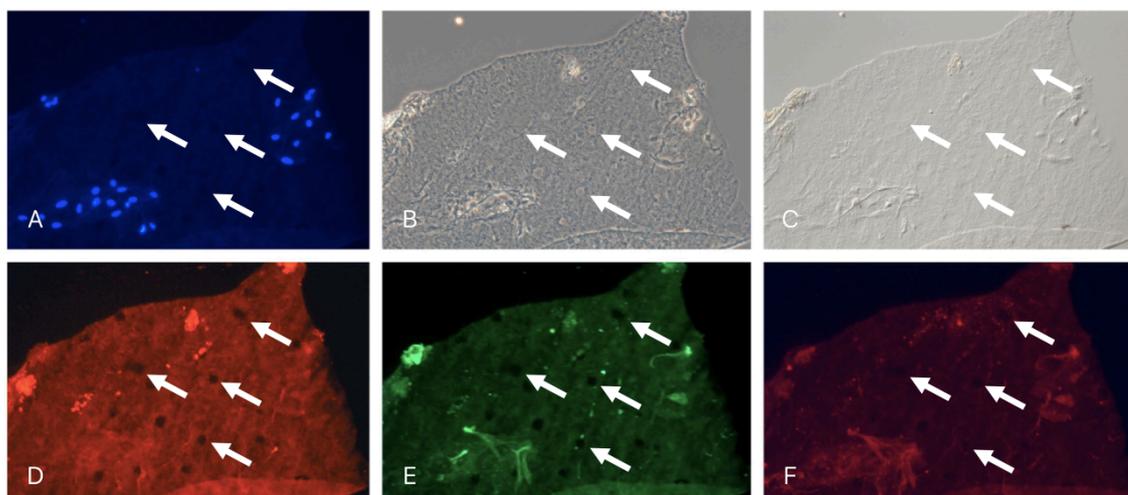
Die morphologische Erscheinung einer solchen Pore wurde auch in der EM-Untersuchung gefunden. In dieser ultrastrukturellen Schnittdarstellung traten mehrere, bogenförmige, tiefe Ausdünnungen auf der retinalen Seite der ILM auf. 72% (13/18) der Augen hatten diese morphologische Charakteristik in der Elektronenmikroskopie (siehe **Abbildung 20**).

Die mit Methylenblau-Färbung gefertigten Semidünnschnitte für die Lichtmikroskopie in Vorbereitung der Ultradünnschnitte für die TEM zeigten die ILM Präparate mit Poren mehrere Verschmälerungen der ILM (vgl. **Abbildung 20**). Die Ergebnisse sind in **Tabelle 12** aufgelistet. 80% (4/5) der Proben mit Poren in der Elektronenmikroskopie wiesen korrelierende histologische Erscheinungen in der durchgeführten Lichtmikroskopie auf. Alle ILM-Präparate mit Poren (4/4) in der Methylenblau-Färbung zeigten diese auch in der IF. Acht der 11 (73%) ILM-Präparate, die mittels EM und IF untersucht wurden, wiesen Poren in beiden Untersuchungen auf.

<u>Patient</u>	<u>Poren in LM</u>	<u>Poren in TEM</u>	<u>Poren in IF</u>
1	/	-	/
2	/	+	+
3	/	/	-
4	+	+	+
5	/	-	-
6	/	+	+
7	/	+	-
8	(+)	+	+
9	-	(+)	+
10	/	(+)	/
11	/	+	-
12	/	+	/
13	/	/	-
14	/	-	/
15	/	-	/
16	/	/	-
17	/	/	+
18	/	(+)	/
19	+	+	+
20	/	/	+
21	(+)	(+)	+
22	/	/	+
23	/	-	/
24	/	+	+
<b>Insgesamt</b>	4/5 (80%)	13/18 (72%)	11/17 (65%)

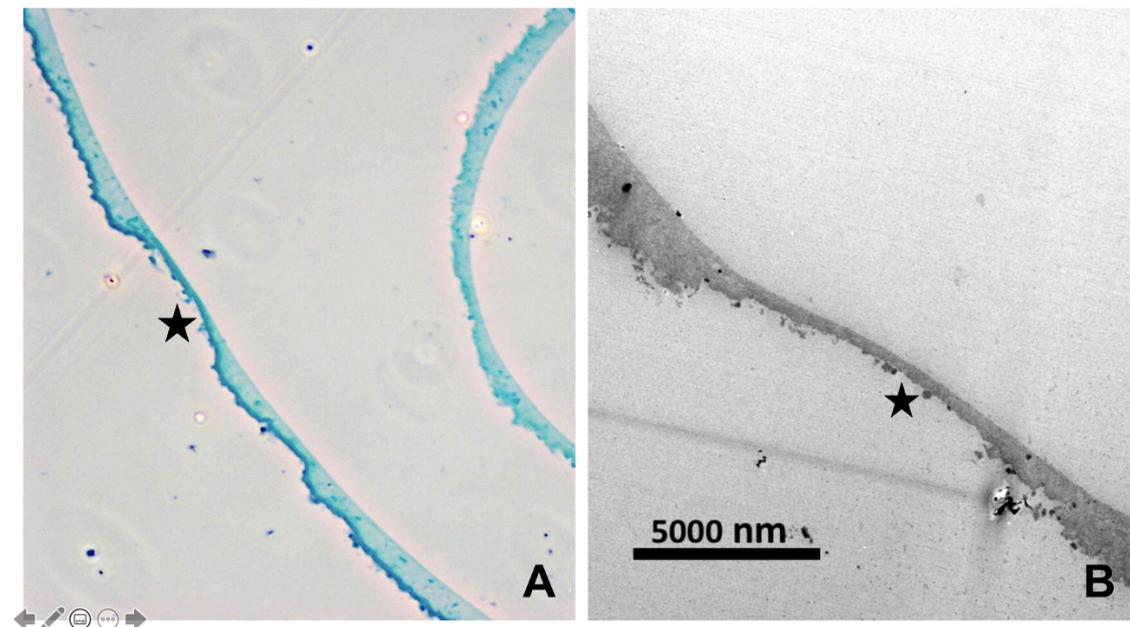
**Tabelle 12: Vorkommen von Poren der inneren Grenzmembran.**

Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Lichtmikroskopie (LM) sowie Immunfluoreszenzmikroskopie (IF).



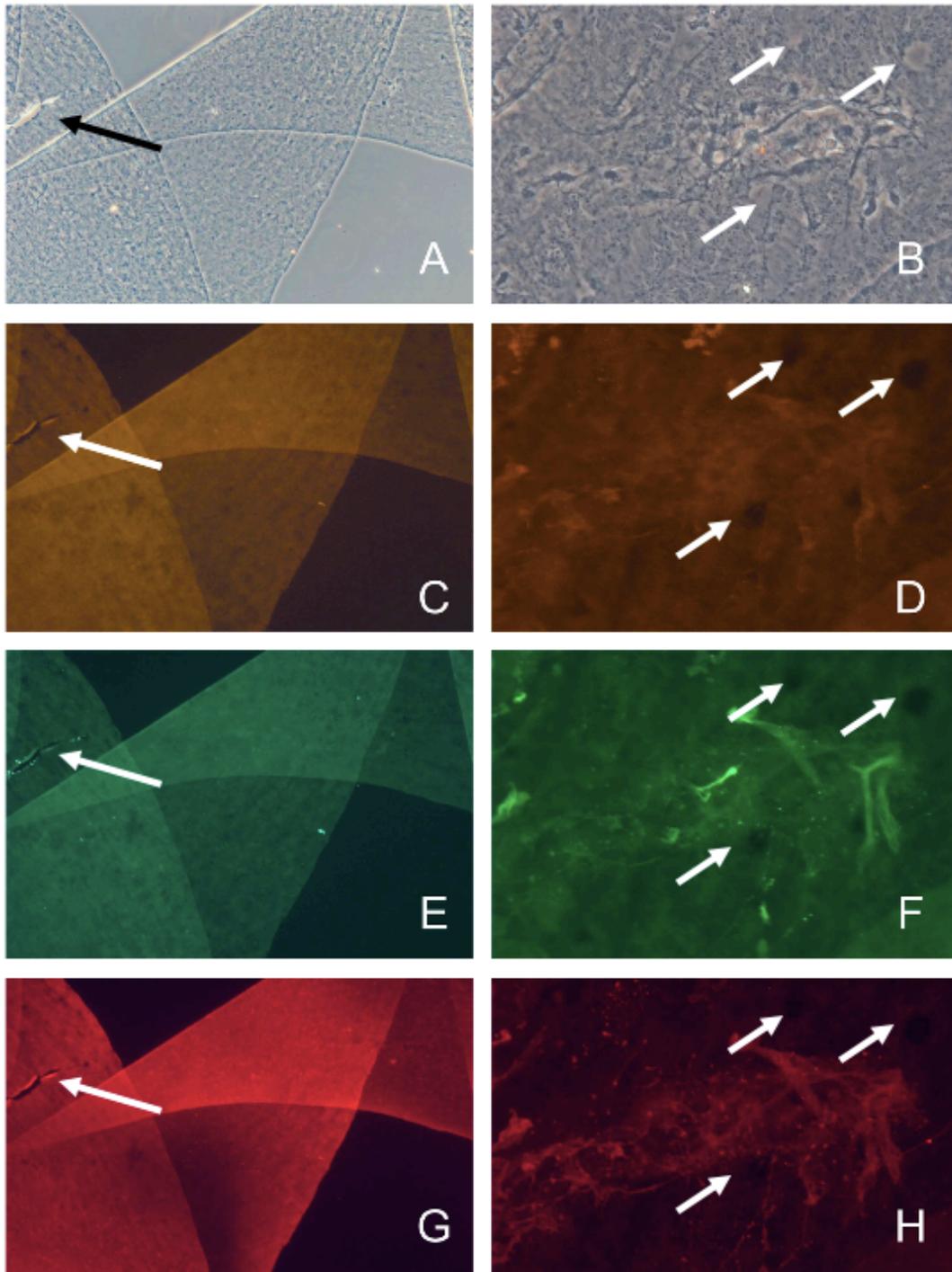
**Abbildung 19: Poren der inneren Grenzmembran.**

Patient 9, rechtes Auge, x200 Vergrößerung. DAPI (A), Phasenkontrast- (B) und Interferenzmikroskopie (C), Anti-NF (D), Anti-Melanopsin (E), Anti-GDNF (F). In den Bildern D-F stellen sich die Poren als korrespondierende schwarze und rundliche Signaldefekte der Immunfluoreszenz dar (Pfeil). Diese sind auch in der DAPI-Färbung zu sehen (A). In der Phasenkontrastmikroskopie sind die Poren zum Teil mit einer zentralen Insel gefüllt und die Farbe ähnelt der des Hintergrundes (B). In der Interferenzmikroskopie sind die Poren als runde Vertiefungen zu sehen (C).



**Abbildung 20: Umschriebene Ausdünnung der inneren Grenzmembran in der Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie.**

Patient 4, linkes Auge. Poren der inneren Grenzschichtmembran (ILM, Stern) in der (A) Lichtmikroskopie der Semidünnschnitte, Methylenblau-Färbung, 100x Vergrößerung und (B) Transmissionselektronenmikroskop, 4.400x Vergrößerung. Der Stern markiert die retinale Seite der ausgedünnnten ILM, die mit dem Auftreten von Poren in der Fluoreszenzmikroskopie korreliert.



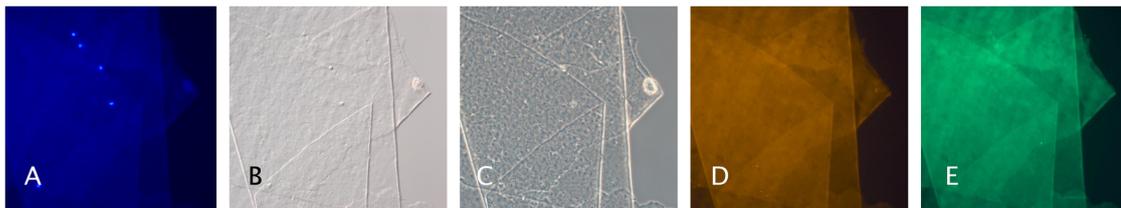
**Abbildung 21: Vergleich zwischen iatrogen verursachtem ILM-Riss und ILM-Foramina.**

Patient 21, linkes Auge, 100x Vergrößerung, Phasenkontrastmikroskopie (A), Immunfluoreszenz mit Anti-Neurofilament (C), Anti-CNTF (E), Anti-Vimentin (G). Patient 9, rechtes Auge, 400x Vergrößerung, Phasenkontrastmikroskopie (B), Immunfluoreszenz mit Anti-NF (D), Anti-Melanopsin (F), Anti-GDNF (H). Vergleich zwischen iatrogenem Riss (Pfeil mit langem Schaft) der inneren Grenzschichtmembran (ILM) (A), (C), (E) und (G) mit Poren der ILM (Pfeile mit kurzem Schaft) (B), (D), (F) und (H).

### 3.4 Negativkontrollen

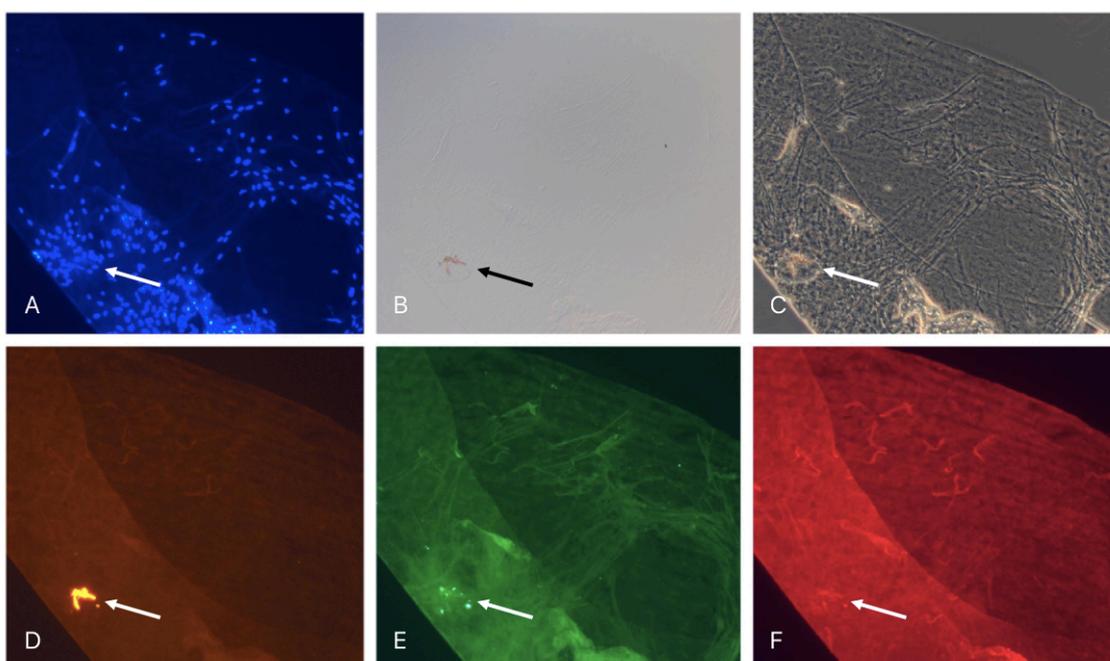
Zum Ausschluss falsch positiver Strukturen wurden Negativkontrollen durchgeführt wie in **Abbildung 22** dargestellt.

Zusätzlich konnte mit Hilfe der Kombination von lichtmikroskopischen und immunzytochemischen Aufnahmen von der gleichen Stelle im selben Präparat eine genaue Zuordnung des Zell- und Kollagenstrukturen durchgeführt werden. Artefakte präsentierten sich unspezifisch positiv insbesondere in der Interferenzmikroskopie. In der Phasenkontrastmikroskopie zeigten einige Artefakte einen orangefarbenen Halo um ihre Konturen. Eine Multimodale Darstellung eines Artefaktes ist in der **Abbildung 23** dargestellt.



**Abbildung 22: Beispiele von Negativkontrollen.**

Patient 4, linkes Auge, 200x Vergrößerung. DAPI (A), Interferenz- (B), Phasenkontrastmikroskopie (C), Anti-IgG1 (D) und mit Anti-IgG (E). Die Negativkontrolle zeigt keine falsch positive oder unspezifische Reaktivität der verwendeten Antikörper.



**Abbildung 23: Beispiel von Artefakten in der Immunfluoreszenz.**

Patient 16, rechtes Auge, 100x Vergrößerung. DAPI (A), Interferenz- (B) und Phasenmikroskopie (C). Immunfärbung mit Anti-NF (D), Anti-CNTF (E) und Anti-VIM (F). Ein Artefakt zeigte sich für alle gesuchten Epitope positiv (Pfeil). Die Phasenkontrast- (C) und Interferenzmikroskopie (B) demaskierten das Artefakt.

## 3.5 Transmissionselektronenmikroskopische Analyse

### 3.5.1 Topografische Merkmale der inneren Grenzmembran

Die topographischen Charakteristika der ILM wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Die Ergebnisse der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen sind in der **Tabelle 13** dargestellt und in **Tabelle 14** sowie **Tabelle 15** und zusammengefasst.

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie konnte die ILM von 18 aus 19 (95%) Augen identifiziert werden. Bei Patient 3 wurde keine innere Grenzschichtmembran, sondern nur eine Ansammlung an Zellen und Kollagen gefunden. Dabei handelte es sich entweder um einen Verlust der ILM während der Präparation für die Elektronenmikroskopie oder um eine Dislokation der ILM auf dem EM-Untersuchungsgrid.



19	+	(+)	Multi	-	-	+	++	-	-	-	+	-	-	-
21	+	-	Single	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
23	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-

**Tabelle 13: Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Untersuchungen.**

ILM = Innere Grenzschichtmembran. Single = Einschichtige Organisation von Zellen. Multi = Mehrschichtige Organisation von Zellen. RPE-Zellen = Retinale Pigmentepithel-Zellen. NVC = Natives vitreales Kollagen. NFC = Neu formiertes Kollagen. FLSC = Fibröses Kollagen mit langem Bänderungsmuster.

<u>Zellpopulation / Kollagen</u>	-	(+)	+	++	<u>Anteil positiv</u>	<u>Insgesamt</u>
Retinale Debris	10	5	4	0	9/19 (47%)	+
Fibrinöse Astrozyten	16	0	3	1	4/19 (21%)	(+)
Myofibroblasten	13	0	5	1	6/19 (32%)	(+)
Fibroblasten	12	0	6	1	7/19 (37%)	(+)
Hyalozyten	13	1	3	2	6/19 (32%)	(+)
RPE-Zellen	19	0	0	0	0/19	-
Makrophagen	19	0	0	0	0/19	-
Kollagenstränge	15	0	4	0	4/19 (21%)	(+)
NVC	10	0	8	1	9/19 (47%)	+
NFC	16	0	0	0	0/19	-
FLSC	16	0	0	0	0/19	-

**Tabelle 14: Übersicht über Zellen und Kollagene in der Elektronenmikroskopie.**

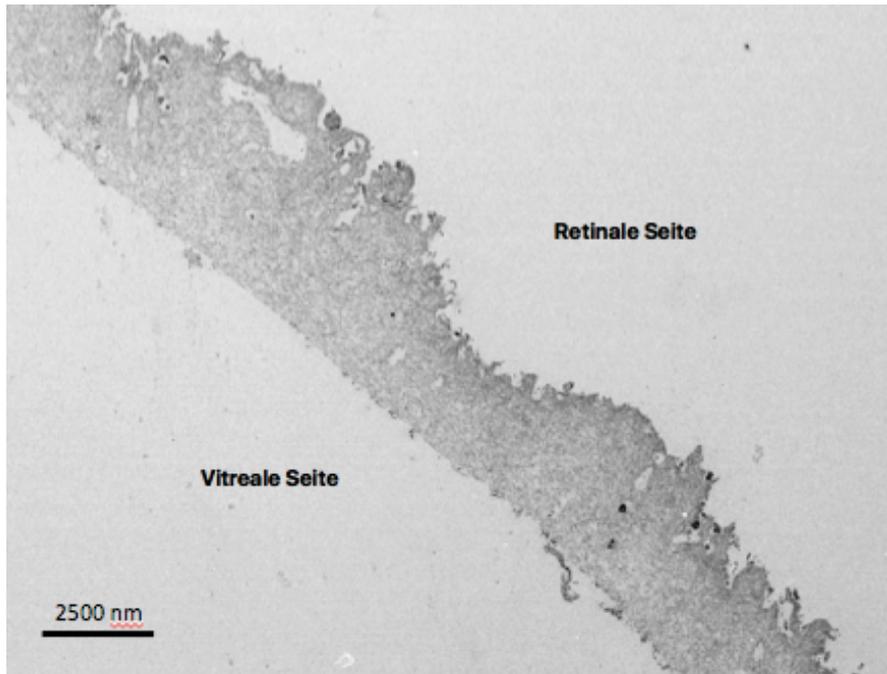
RPE-Zellen = Retinale Pigmentepithel-Zellen. NVC = Natives vitreales Kollagen. NFC = Neu formiertes Kollagen. FLSC = Fibröses Kollagen mit langem Bänderungsmuster.

Für die ILM wurde eine charakteristische Topographie nachgewiesen: Die glatte, vitreale und die unregelmäßig undulierte, retinale Seite (siehe **Abbildung 24**). Eine Vermessung der Dicke der gepeelten ILM wurde nicht durchgeführt, da der Präparationsschritt der Alkohol-Dehydratation, ein zentraler Schritt in der Vorbereitung für die Elektronenmikroskopie, die Messwerte signifikant verfälschen kann. Zellulärer Debris an der retinalen Seite der ILM wurde bei 8/19 Präparaten nachgewiesen. Ganze Zellen oder große Zellfragmente wurden nicht auf der retinalen Seite der ILM dargestellt (siehe **Abbildung 24**, **Abbildung 25**, Bild A und B; **Abbildung 26** Bild A, C, E und F).

<u>Merkmale der Präparate</u>	<u>Häufigkeit</u>
<b>ILM</b>	18/19 (95%)
<b>Zellen</b>	10/19 (53%)
<b>Einschichtige Organisation von Zellen</b>	3/10 (30%)
<b>Mehrschichtige Organisation von Zellen</b>	7/10 (70%)
<b>Retinaler Debris</b>	9/19 (47%)
<b>Zellen auf retinaler Seite</b>	0/19 (0%)

**Tabelle 15: Allgemeine Ergebnisse der Transmissionselektronenmikroskopie.**

ILM = Innere Grenzschichtmembran.



**Abbildung 24: Innere Grenzschichtmembran mit ihren zwei unterschiedlichen Seiten**  
Patient 19, rechtes Auge, Transmissionselektronenmikroskopie, Vergrößerung x4.400. Innere Grenzschichtmembran mit glatter vitrealer und unregelmäßiger retinaler Fläche.

### 3.5.2 Zell- und Kollagenverteilung an der inneren Grenzmembran

Zell- und Kollagenansammlungen fanden sich nur auf 53% der Membranen (10/19) und befanden sich ausschließlich auf der vitrealen Seite. Dagegen traten retinaler Debris, kleinste Zellreste auf der retinalen Seite der ILM in 47% (9/19 Augen) der Fälle auf (siehe **Abbildung 25**). Retinaler Debris zeigte sich heterogen in der Kontur, Größe und internen Organisation (vgl. **Abbildung 25**, Bild A und B). Das Auftreten ist ebenfalls variabel: Debris auf der retinalen Seite kam in 55% der Fälle selten ((+), 5/9 Augen) und in 44% der Fälle (+, 4/9 Augen) mit mittlerer Häufigkeit vor. Ein starkes Vorhandensein wurde nicht beschrieben. Die Zellen waren in 70% der Präparate (7/10 Präparaten mit anwesenden Zellen) in mehrschichtiger Architektur (= *multi-layer*), zusammen mit Kollagen und Debris organisiert. Der Unterschied zur einschichtigen Organisation von Zellen (= *single-layer*) ist in **Abbildung 25**, Bild C und D beispielgebend zu sehen.

<u>Zellpopulation / Kollagen</u>	-	(+)	+	++	<u>Anteil positiv</u>	<u>Insgesamt</u>
<b>Retinale Debris</b>	10	5	4	0	9/19 (47%)	+
<b>Fibrinöse</b>	16	0	3	1	4/19 (21%)	(+)
<b>Myofibroblasten</b>	13	0	5	1	6/19 (32%)	(+)
<b>Fibroblasten</b>	12	0	6	1	7/19 (37%)	(+)
<b>Hyalozyten</b>	13	1	3	2	6/19 (32%)	(+)
<b>RPE-Zellen</b>	19	0	0	0	0/19	-
<b>Makrophagen</b>	19	0	0	0	0/19	-
<b>Kollagenstränge</b>	15	0	4	0	4/19 (21%)	(+)
<b>NVC</b>	10	0	8	1	9/19 (47%)	+
<b>NFC</b>	16	0	0	0	0/19	-
<b>FLSC</b>	16	0	0	0	0/19	-

**Tabelle 16: Zellen und Kollagene in der Elektronenmikroskopie.**

RPE-Zellen = Retinale Pigmentepithel-Zellen. NVC = Natives vitreales Kollagen. NFC = Neu formiertes Kollagen. FLSC = Fibröses Kollagen mit langem Bänderungsmuster.

Die am häufigsten dokumentierte Zellpopulation waren die Fibroblasten, gefolgt von Hyalozyten, Myofibroblasten und fibrinöse Astrozyten. Andere Zellgruppen, wie retinale Pigmentzellen und

Makrophagen, wurden in dieser Patientenkohorte nicht nachgewiesen. Die Charakteristika der Zellpopulationen sind unter dem Kapitel 1.3.3 Fibrozelluläre Membranen in der Elektronenmikroskopie beschrieben, Beispiele der gefundenen Zellen werden in **Abbildung 26** gezeigt.

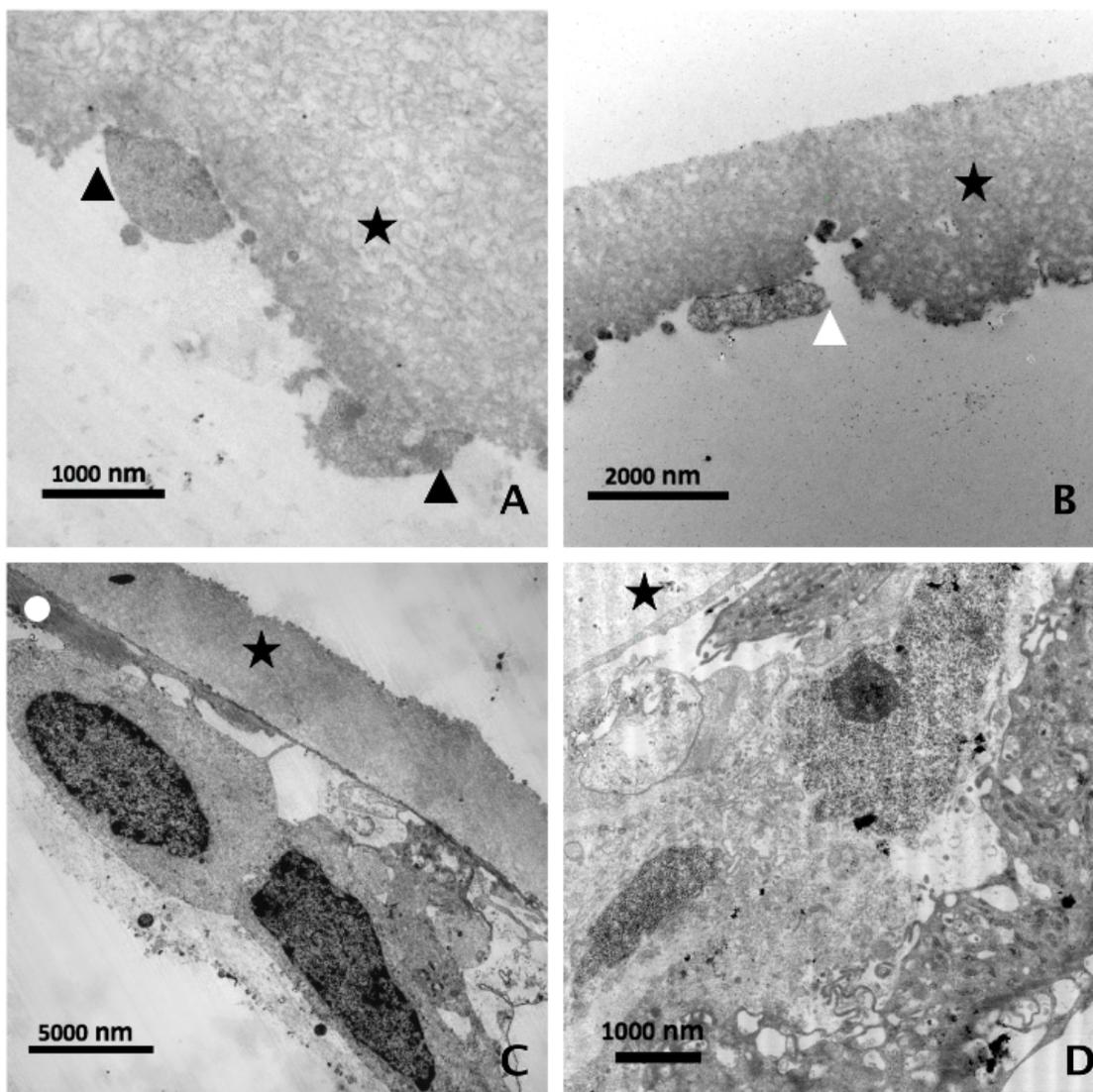
Die Zellpopulation der Fibroblasten wurde mit 37% am häufigsten aufgefunden (7/19 Augen) und ihr Vorhandensein mittelhäufig (+ in 6/7 und ++ in 1/7 positiven Präparaten).

Der zweithäufigste Zelltyp waren die Hyalozyten mit 32% (6/19 Augen). Die Inzidenz dieser Glaskörperzellen ist variabler: (+) in 1 von 6, + in 3 und ++ in 2 der positiven Präparate (entsprechend 17%, 50% und 33%).

Mit einer ähnlichen Häufung von 32% wurden Myofibroblasten (siehe **Abbildung 26**, Bild D) beobachtet (6/19 Augen), welche in großer Anzahl in einer und in mittlerer Anzahl bei 5 von 6, der positiven Proben vorkamen (entsprechend 17% ++ und 83% +).

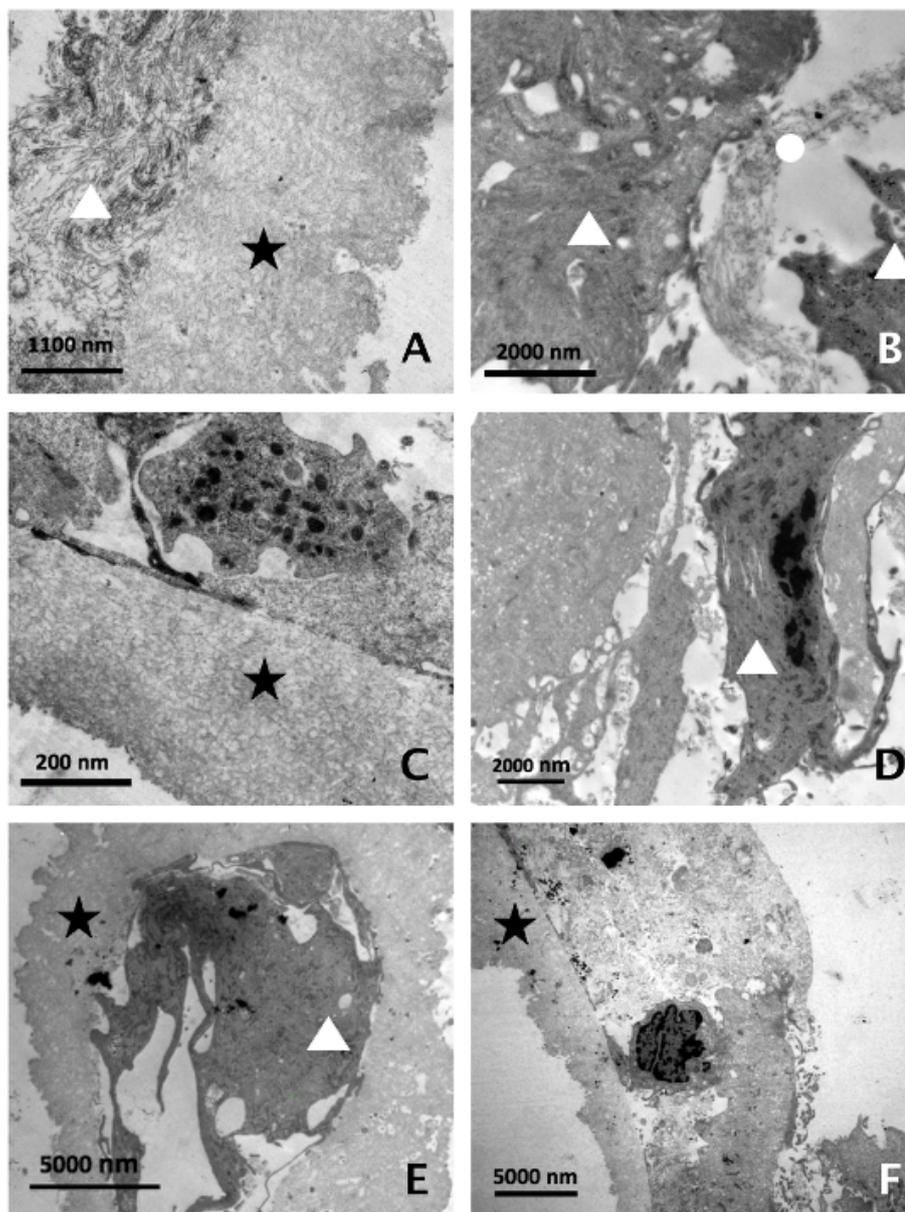
Die letzte, mittels TEM beschriebene Zellpopulation, sind die fibrinösen Astrozyten. Diese Zellen der Neuroglia (Beispiel: **Abbildung 26**, Bild E) wurden in 21% der Präparate gefunden (4/19 Augen) und waren überwiegend oft vorhanden (+, 3/4 und ++ 1/4 positiven Präparaten).

In den transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden nicht nur zelluläre Anteile, sondern auch azelluläre Komponenten nachgewiesen. Zu diesen gehören Kollagenstränge und natives Glaskörperkollagen (**Abbildung 26**, Bild A und B). Erstere wurden in 4 von 19 (21%) der Augen nachgewiesen, letztere kamen als mittelhäufig und häufig in 47% der Präparate (9/19) vor. NVC zeigte sich zum Teil zwischen der ILM und den Zellen auf der vitrealen Seite. Andere Kollagenformen, z.B. das neu gebildete Kollagen, wurden nicht gefunden.



**Abbildung 25: Debris auf der retinalen Seite der inneren Grenzmembran und mehrschichtige Zellansammlung auf der vitrealen Seite.**

Transmissionselektronenmikroskopie. Patient 7, linkes Auge, x20.000 Vergrößerung (A) und Patient 1, rechtes Auge, x12.000 Vergrößerung (B): Debris (Dreiecke) auf der retinalen Seite der inneren Grenzmembran (ILM, Stern). Patient 7, linkes Auge, x4.400 Vergrößerung: Einschichtige Anordnung von Zellen mit Kollagen (Punkt) auf vitrealer Seite der ILM (Stern) (C). Patient 8, linkes Auge, x7.000 Vergrößerung: Mehrschichtige Anordnung von Zellen auf vitrealer Seite der ILM (D).

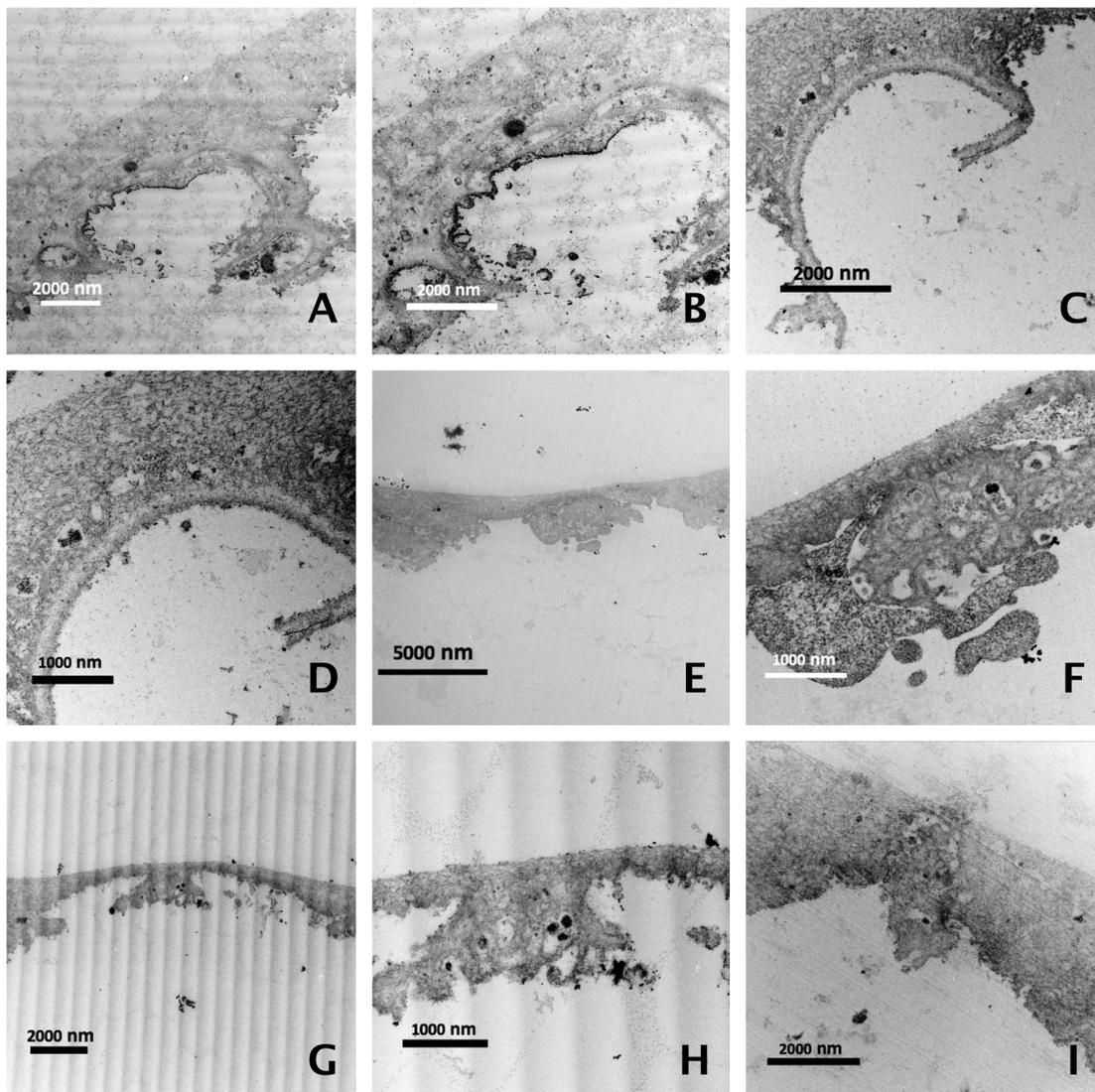


**Abbildung 26: Zellpopulationen und Kollagene.**

Transmissionselektronenmikroskopie. Patient 24, linkes Auge, 20.000x Vergrößerung: Glaskörperkollagen (Dreieck) auf vitrealer Seite der inneren Grenzmembran (ILM, Stern) (A). Patient 3, rechtes Auge, 12.000x Vergrößerung: Glaskörperkollagenstrang (Kreis) zwischen Zellen (Dreieck) (B). Patient 7, linkes Auge, 12.000x Vergrößerung: ILM (Stern) mit Zellen in mehrschichtiger Anordnung (C). Patient 3, rechtes Auge, 7.000x Vergrößerung: Myofibroblast (Dreieck) und weitere Zellen mit Kollagen (D). Patient 1, rechts Auge, 4.400x Vergrößerung: Fibrinöser Astrozyt (Dreieck) und ILM (Stern) (E). Patient 8, linkes Auge, 3.000x Vergrößerung: (F) Zellen und Zelldebris in mehrschichtiger Anordnung auf der vitrealen Seite der ILM (Stern).

### 3.5.3 Besondere Merkmale

In 3 der TEM-Präparate (16%) wurden wellenförmige Strukturen an der retinalen Seite der ILM festgestellt. Hiervon zeigten zwei eine Schichtung, welche an eine Gefäßwand erinnert (siehe **Abbildung 27**, Bilder A-D). Patient 4 wies eine trapezförmige Struktur in der Mitte dieser ILM Ausdünnung auf (siehe **Abbildung 27**, Bilder E-H), welche in der Zusammensetzung ähnlich dem Muster der ILM ist. Diese ist deutlich kleiner als die ILM-Ausdünnung und tritt einzeln auf (siehe **Abbildung 27**, Bild G und H), oder von Debris (siehe **Abbildung 27**, Bild E und F) umgeben. Im Präparat des Patienten 12 konnte eine ovale zelluläre Struktur dargestellt werden, die von Kollagen der ILM umgeben war (**Abbildung 27**, Bild I).



**Abbildung 27: EM-Präparate mit weiteren Zufallsbefunden.**

Transmissionselektronenmikroskopie. Patient 4, linkes Auge, (A) x7.000 und (B) x12.000 Vergrößerung: Wellenförmige Struktur der retinalen inneren Grenzschnittmembran (ILM). Patient 19, rechtes Auge, (C) x12.000 und (D) x20.000 Vergrößerung: Wellenförmige Struktur der retinalen ILM. Patient 4, linkes Auge, (E) x4.400x und (F) x20.000 Vergrößerung: Trapezförmige Struktur in der Mitte einer ILM Ausdünnung mit Zelldebris. Patient 4, linkes Auge, (G) x7.000 und (H) x20.000 Vergrößerung: Trapezförmige Struktur in der Mitte ILM-Ausdünnung ohne Zelldebris. Patient 12, linkes Auge, (I) x12.000 Vergrößerung: Mögliche durchwandernde Zelle oder Zelldebris innerhalb der ILM.

## 4. Diskussion

In dieser Studie wurde mittels Immunzytochemie eine positive Immunreaktivität der neurotrophen Faktoren Anti-GDNF und Anti-CNTF in Anwesenheit von prämakulären Zellen in chirurgisch exzidierten ILM-Präparaten von großen idiopathischen FTMH nachgewiesen. Angesichts der hier präsentierten Kollokalisierungen dieser neurotrophen Faktoren mit den Gliazellmarkern Anti-GFAP und Anti-Vimentin wird die Hypothese aufgestellt, dass aktivierte prämakuläre Makrogliazellen neurotrophe Faktoren produzieren.

Mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie zeigt unsere Studie eine große Vielfalt in der Zusammensetzung von prämakulären Zellkomponenten, die als Makrogliazellen und Hyalozyten auf der vitrealen Seite der ILM identifiziert wurden. Entgegen früherer Annahmen demonstrieren unsere Ergebnisse eindeutig, dass neurotrophe Faktoren innerhalb der prämakulären Zellkompositionen lokalisiert werden können und nicht innerhalb des Kollagens der ILM.

## 4.1 Zusammensetzung prämakulärer Membranen

### 4.1.1 Vorkommen und Lokalisation der neurotrophen Faktoren

Die neuroprotektive Rolle der neurotrophen Wachstumsfaktoren GDNF und CNTF in verschiedenen Modellen von retinaler Neurodegeneration oder Schädigung ist bereits bekannt[73].

Der CNTF wird von in Gliazellen, insbesondere Müllerzellen, exprimiert und fördert nachweislich das Überleben retinaler Ganglien- und Photorezeptorzellen[69]. Weitere neuroprotektive Effekte dieses Wachstumsfaktors sind die Förderung der Regeneration von Axonen und Verknüpfung von Synapsen [69], [70]. CNTF führt zur Hochregulierung der GFAP-Expression in Müllerzellen und es wird angenommen, dass CNTF über die Aktivierung von Müllerzellen die Photorezeptoren schützt[73].

GDNF fördert nachweislich das Überleben von Photorezeptoren und retinalen Ganglienzellen in verschiedenen retinalen Modellen, wie z.B. Ischämie, Opticusdurchtrennung, Retinitis pigmentosa oder Glaukom[69], [74], [75]. Dieser Wachstumsfaktor wird in GFAP-positiven Müllerzellen exprimiert[74]. Es liegen Hinweise vor, dass die neuroprotektive Wirkung von GDNF direkt und indirekt über die Aktivierung von Müllerzellen stattfindet[74], [76].

Unsere Daten bestätigen die Befunde der neurotrophen Faktoren GDNF und CNTF in den prämakulären Membranen. Im Gegensatz zu Shoide et al. fanden wir diese Faktoren jedoch nicht in der ILM selbst[51]. Da Müllerzellen als Hauptzellbestandteile der prämakulären Membranen identifiziert wurden, wird vermutet, dass neurotrophe Faktoren von aktivierten Müllerzellen exprimiert werden, die an den Heilungsprozessen des Netzhautgewebes als Reaktion auf pathologische Veränderungen beteiligt sind.

### **4.1.2 Neuriten in prämakulären Membranen**

Zusätzlich weisen unsere Ergebnisse mit der Expression der spezifischen Proteine Anti-Neurofilament, Anti-Calretinin und Anti-Melanopsin, die als Marker für retinale Ganglienzellen bekannt sind[61], auf das Vorhandensein von Neuritenfortsätzen in den ILM Präparaten von Patienten mit großen Makulaforamina hin. In der Retina führen verschiedene Netzhauterkrankungen nicht nur zu Gliazellproliferation und -migration, sondern auch zu neuronalen Veränderungen einschließlich des Einsprossens von Neuritenfortsätzen[61], [77]. Obwohl das Neuritenwachstum nicht vollständig geklärt ist[54], [77], wird aktuell davon ausgegangen, dass die Expression neurotropher Faktoren in Müllerzellen mit dem Wachstum von Neuritenfortsätzen verbunden sein könnte[61]. Unsere Ergebnisse unterstreichen das Potenzial für neuronales Remodeling der menschlichen Retina.

### 4.1.3 Zelluläre Komponenten prämakulärer Membranen

Zellen auf der vitrealen Seite der ILM wurden auf allen Präparaten gefunden. Diese waren aber mit heterogenen Merkmalen aufgetreten und unterschieden sich insbesondere in Zellanzahl sowie Zelldichte. Diese Schwankungen wurde bereits in anderen Studien beschrieben, in denen auch eine unterschiedliche Komposition der Zellen ausgewiesen wurde[18], [58]. In den hier untersuchten ILM-Präparaten waren die Zellen in Zellclustern organisiert oder homogen verteilt. Auch die vorbeschriebene Zellverteilung auf der ILM wurde in obengenannten Studien beobachtet[18], [58]. Die Verteilung der prämakulären Zellen ist meist inhomogen, so dass auch die quantitative Zusammensetzung der Zellen auf der ILM stark variieren kann[58].

Bisher ist die klinische Bedeutung der Zelldichte für die funktionelle Rehabilitation unbekannt. Die Anzahl der Zellen und die Zellverteilung können nur in vitro mittels DAPI-Färbung und Phasenkontrast- bzw. Interferenzmikroskopie vermessen werden, während eine exakte in vivo Messung aktuell weder klinisch noch mittels bildgebender Verfahren möglich ist. Mit Hilfe des Stereomikroskops konnten große Zellcluster unter Durchlichtbeleuchtung als weißliche Pigmentierungsareale, der ansonsten durchsichtigen ILM, erkannt werden.

#### 4.1.4 Müllerzellen und Neuriten in prämakulären Proliferationen

Mittels IF wurden typische Marker für Glia-, Ganglien und Müllerzellen gefunden. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese der Anwesenheit der o.g. Zellpopulationen auf der ILM. CRALBP ist ein typischer Marker für Müllerzellen[18]. VIM und GFAP deuten auf Gliazellen hin, während Calretinin, Melanopsin und NF auf verschiedenen Ganglienzellen-Subpopulationen hinweisen [58], [61]. Die in dieser Studie untersuchten Epitope wurden zum Teil schon bei IMF beschrieben und zum Teil bei anderen Pathologien des VI. Ebenso wurden in der Literatur bereits positive Zellen für Anti-GFAP, Anti-CRALBP, Anti-VIM und Anti-NF-Antikörper auf der ILM von idiopathischen MF nachgewiesen[18], [58]. Lesnik Oberstein et al. wiesen erstmalig Calretinin und Melanopsin in idiopathischen ERM nach [61].

Mit dieser Studie wurde anhand von IF das Vorkommen von Melanopsin und Calretinin exprimierenden Zellpopulationen auch auf der ILM von großen primären Makulaforamina nachgewiesen.

Es ist noch nicht vollständig geklärt, wie Zellen auf die ILM migrieren[54]. Zurzeit bestehen drei Hypothesen[54]:

- Migration von Gliazellen durch kleine Defekte der ILM, welche von der hinteren Glaskörperabhebung verursacht werden.
- Die Transdifferenzierung und Proliferation von Hyalozyten auf der ILM nach pathologischer hinterer Glaskörperabhebung.
- Transdifferenzierung und Migration von retinalen Pigmentepithelzellen durch Retina und ILM.

Die Migration von neuronalen Zellfortsätzen durch die ILM mit nachfolgender Bildung prämakulärer Membranen wird vor dem Hintergrund antero-posteriorer und/oder tangentialer Zugwirkung infolge einer retinalen Schädigung angenommen[54], [76]. Die antero-posteriore Traktion und die tangentialen Kräfte, welche zum IMF führen, demonstrieren eine Verletzung der Netzhautschichten und könnten zur Migration von Gliazellen führen. Nach dieser Hypothese könnten Glia- und Müllerzellen als Gerüst für die Durchwanderung von weiteren neuronalen Zellen dienen. Darüber hinaus fördern die aktivierten Müllerzellen das Wachstum von Gliazellen[61], [78]. Das Vorkommen von Zellen, die positiv für Epitope von Glia-, Ganglien- und neuronalen Zellen getestet wurden, bestärkt die Hypothese, dass verschiedene Zellpopulationen an der Entstehung von prämakulären Membranen bei Makulaforamina beteiligt sind[54].

Die Koexpression der Marker von Glia-, Ganglien- und weiteren neuronalen Zellen unterstützt verschiedene Hypothesen: 1) die Reprogrammierung von Zellen mit konsekutiver Transdifferenzierung [20], [54], [76] und/oder 2) die Phagozytose von Zellen bzw. Zellresten [18].

Die Koexpression von GFAP und VIM ist ein Anhaltspunkt für die Anwesenheit aktivierter Müllerzellen [18], [59], [73]. In der Vergangenheit wurde GFAP für einen spezifischen Gliazell-Marker gehalten [18]. Neueste Erkenntnisse identifizierten GFAP-positive Zellen auch mit anderen Zellen, wie z.B. Hyalozyten. Diese Epitope sind typisch, aber nicht spezifisch für eine bestimmte Zellpopulation [18]. Schumann et al. [18] stellten zwei Hypothesen für die Ursache einer Koexpression von GFAP und Hyalozyten-Marker wie CD49 und CD68 auf: (1) die Transdifferenzierung von Zellen und (2) die Phagozytose von Fragmenten GFAP-exprimierender Müllerzellen durch Hyalozyten. Daher ist es unklar, ob die in dieser Studie gefundenen Zellen native Müllerzellen oder andere Zellen sind [18], [54], [76].

GDNF war sowohl mit den Ganglienzellmarkern Calretinin und Melanopsin als auch mit dem Gliazellmarker GFAP positiv auf mehreren Präparaten zu finden. Dagegen kam CNTF nur mit Vimentin kolokalisiert vor. Diese Ergebnisse sprechen für eine Interaktion zwischen diesen Zellen und Wachstumsfaktoren [76]. Eine zusätzliche eigenständige Produktion von Wachstumsfaktoren durch verschiedene Zellpopulationen auf der ILM ist denkbar.

#### 4.1.5 Retinaler Debris an der inneren Grenzmembran

Mittels Rasterelektronenmikroskopie ist eine eindeutige topografische Zuordnung zellulärer und nicht-zellulärer Komponenten im ILM-Präparat möglich. Zellen wurden nur auf der vitrealen Seite der ILM gefunden. Dieses Ergebnis stimmt mit der Literatur überein[18], [57]. In jedem Präparat der in dieser Studie untersuchten Proben befand sich Zelldebris an der retinalen Seite der ILM, d.h., feine Zellreste kleiner Größe anliegend an die Undulationen der ILM.

Auf Basis der Daten der elektronenmikroskopischen Untersuchungen ist der Debris auf der retinalen Seite der ILM das einzige von der Retina abgetragene Material. Wegen ihrer unspezifischen Morphologie bleibt ihre Herkunft, trotz ultrastruktureller Untersuchungen, umstritten: Es könnte sich um retinale Strukturen wie Axone der retinalen Ganglienzellen oder um die Zellfortsätze der Müllerzellen handeln[79], [80].

Eine mögliche klinische Korrelation zum retinalen Debris kann indirekt von der *Dissociated Optic Nerve Fiber Layer (DONFL)-Appearance* (Erscheinung der Dissoziierten Fasern der retinalen Nervenfaserschicht) abgeleitet werden. Die DONFL-Erscheinung beschreibt die streifenförmige Erscheinung der Retinaoberfläche – besonders im rotfreien Licht – nach einer Makulaforamenooperation. Die DONFL-Erscheinung wird auf die mechanische Abtragung oberflächlicher retinaler Strukturen zurückgeführt, da insbesondere die Müllerzellen der Aufrechthaltung der retinalen Architektur dienen, aber auch die Verteilung von Axonen der inneren retinalen Nervenfaserschicht regulieren[79], [81].

#### **4.1.6 Nicht-zelluläre Komponenten prämakulärer Membranen**

Die Resultate der Elektronenmikroskopie entsprechen den Ergebnissen früherer Studien[55], [57]. Die gefundenen Zellen und Kollagene auf beiden Seiten der ILM unterschieden sich nicht von den bereits beschriebenen zellulären und nichtzellulären Komponenten. Auf der vitrealen Seite der ILM befanden sich verschiedene Kollagentypen, NFC und NVC, welche isoliert oder mit bzw. ohne Bezug zu prämakulären Zellen gefunden wurden. Die Anwesenheit dieser Kollagenfibrillen und ihr Vorkommen zwischen Zellen und innerer Grenzmembran wurde schon in früheren Studien bei Makulaforamina beschrieben[18], [55], [57]. Wir konnten diese Charakteristik auch in idiopathischen durchgreifenden Makulaforamina von mehr als 400 Mikrometer finden.

Das Fehlen von neu gebildetem Kollagen spricht für eine mögliche Unfähigkeit der ILM-Zellen, Kollagen selbst zu sezernieren. Dies deutet auf eine Verschiebung von Kollagen vitrealen Ursprungs durch Kollagenstränge hin. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass die nachgewiesenen Kollagenfibrillen auf der ILM Reste von epiretinalen Membranen sein könnten, welche trotz ERM-Entfernung auf der ILM verblieben sind[78].

Wie in der Studie von Shiode et al. demonstriert, regen manche Komponenten der ILM, wie Laminin, Fibronectin und Kollagen Typ IV, die Proliferation und Migration von Müllerzellen an, welche wiederum Wachstumsfaktoren produzieren[51]. Die Anwesenheit von Kollagen unterschiedlicher Herkunft wird daher als klinisch bedeutend angenommen, da sie in einem Zusammenhang mit der Pathogenese und mit den qualitativen Charakteristika des ILM-Präparates steht[51].

## 4.2 Bedeutung der Ergebnisse für das operative Vorgehen

### 4.2.1 Chirurgische Alternativen bei großen Makulaforamina

Die chirurgische Behandlung von großen FTMH mit einem Durchmesser von mehr als 400  $\mu\text{m}$  ist nach wie vor unbefriedigend, da die Verschlussraten nicht so hoch sind wie bei kleinen oder mittleren FTMH. Daher wurden andere Behandlungsoptionen untersucht, darunter die *inverted ILM Flap* Technik oder eine autologe ILM-Transplantation.

Bei diesen Techniken wird davon ausgegangen, dass die ILM ein Gerüst und möglicherweise einen biologischen Stimulus für das Zellwachstum und die neuronale Regeneration bietet, indem die Müllerzellaktivierung gefördert wird[38], [51]. Angesichts der Befunde zahlreicher GFAP-positiver Gliazellen in Bezug auf das ILM-Gewebe mehren sich die Hinweise darauf, dass die ILM-Flap-Technik die Müllerzellaktivierung und Transdifferenzierung unterstützen könnte und dadurch wichtige Mechanismen für eine hocheffiziente Proliferation und Netzhautregeneration induzieren könnte[76], [82].

Kürzlich schlugen Zhang und Kollegen vor, dass die ILM-Insertion in Kombination mit der Injektion von Nervenwachstumsfaktor (*Neuronal Growth Factor*, NGF), einem neuroprotektiven Faktor, der von Müllerzellen produziert wird, beim Schließen großer FTMH helfen könnte[83]. Sie fanden heraus, dass NGF, der von der National Medical Products Administration in China zur Behandlung von Sehnervenverletzungen zugelassen ist, die Proliferation von Müllerzellen anregt und ein neuroprotektives Mittel bei der Behandlung des Makulaforamens darstellen könnte[84].

#### 4.2.2 Anatomische und funktionelle Rehabilitation bei Makulaforamina

Bekannt ist bereits, dass der Durchmesser des MF[52], präoperative bestkorrigierte Sehschärfe[85] und Alter[86] mit dem postoperativen bestkorrigierten Visus korrelieren. Dagegen scheint das funktionelle Ergebnis nicht von der verwendeten Technik (*inverted ILM flap technique* vs. *temporal inverted ILM flap technique*) oder von der Anwesenheit von hyperreflektiven ILM-Resten auf der Fovea abzuhängen[52]. Nicht einmal die Größe des Flaps scheint einen Einfluss auf den postoperativen Visus zu haben[44]. Hayashi H. und Kuryama S. untersuchten in einer prospektiven Beobachtungsstudie die Entwicklung der Wiederherstellung der Foveaarchitektur mittels OCT[87]. Es wurde gezeigt, dass sowohl die ELM, als auch das äußere und innere Segment der Fotorezeptoren nicht bei allen Patienten wiederhergestellt wurden[87]. Es gab einen signifikanten Visusanstieg trotz unterschiedlicher Morphologie und der verschiedenen Verschlussarchitekturen des Makulaforamens in der OCT-Untersuchung[39], [52], beispielsweise bei U-Typ, V-Typ und irregulärem-Typ. Allerdings zeigten sich die besten funktionellen Ergebnisse beim postoperativen Auftreten einer Fovea mit U-Typ Konfiguration[87]. Eine Abhängigkeit des anatomischen Verschluss-Typs von der operativen Technik ist aber noch nicht abschließend geklärt.

Unsere Daten führen zur Fragestellung, ob neurotrophe Faktoren eine Rolle bei der Entwicklung der Sehfunktion bei Patienten mit großen FTMH spielen. In diesem Zusammenhang könnten die Menge und die Art der prämakulären Zellansammlung auf der ILM für die anatomische und funktionelle Rehabilitation des Netzhautgewebes nach Makulaforamenoperationen von Bedeutung sein. Dies würde ebenfalls erklären, warum nicht alle Patienten von dieser Technik gleich profitieren, denn Menge und Art des Zellbesatzes und damit auch der neurotrophen Faktoren scheinen stark zu variieren. Darüber hinaus konnten unsere Ergebnisse belegen, dass sich gefundene Zellen ausschließlich auf der vitrealen Seite zeigten mit einer heterogenen Verteilung und Dichte. Dies legt nahe, dass die Positionierung eines ILM-Flaps im Makuladefekt während der Operation ebenfalls einen Einfluss haben könnte.

### 4.2.3 Die Rolle der Müllerzellen bei der Rehabilitation

Die Anwesenheit von Müllerzellen wurde mittels immunzytochemischer Färbemethoden nachgewiesen. Müllerzellen spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechthaltung der retinalen Homostase und Struktur[76]. Ihre Somata befinden sich in der inneren Körnerzellschicht und Ihre Fortsätze erreichen jede retinale Schicht[76]. Ihre Aufgaben sind unter anderem die Freisetzung von Wachstumsfaktoren zur Unterstützung der retinalen Zellen, Wiederverwertung von Neurotransmittern und Regulation der Ionenbilanz der extrazellulären Matrix[76]. Außerdem können Müllerzellen Lichtstrahlen zu den Photorezeptoren richten[76].

Morphologie und Funktion dieser Zellen verändern sich nach verschiedenen verletzenden Stimuli, wie z.B. mechanische oder Licht-Beschädigung, und führen zur Proliferation[76]. Beschädigte Immun- und Mikrogliazellen können auch die Aktivierung von Müllerzellen stimulieren. Dieser Prozess wird als reaktive Gliose bezeichnet[76]. Im Zebrafischmodell führt eine Reprogrammierung nach retinaler Schädigung dieser Zellen zur Entwicklung von Vorläuferzellen, welche eine Rolle in der Netzhautregeneration spielen[76]. Tatsächlich können diese reprogrammierten Müllerzellen verschiedene retinale Zellen regenerieren[76]. Die Programmierung des Genoms zur Umwandlung in pluripotente Vorläuferzellen wird auch von verschiedenen Signalmolekülen, wie zum Beispiel CNTF, gefördert[76]. Mapk/Erk, Gsk3 $\beta$ / $\beta$ -Catenin und Jak/Stat sind mögliche Signalwege, welche zur Reprogrammierung des Genoms führen[76]. Die Schädigung-induzierte Proliferation von Müllerzellen findet über die erhöhte Expression des *ascl1a*-Gens statt[76]. Die Aktivierung von Müllerzellen kann zur Migration durch die ILM und zur Myofibroblasten-Transdifferenzierung führen[54].

Anhand der o.g. Rolle in der Regeneration bzw. Protektion retinaler Strukturen kann über einen möglichen Einfluss der Anwesenheit von Müllerzellen auf den Flap in der architektonischen sowie funktionellen Rehabilitation der Makula nach ILMFT spekuliert werden.

#### 4.2.4 Potential für die ILM Flap Technik

Aktuell ist noch unklar, ob die neue operative Methode der ILM-Flap-Technik dem ILM-Peeling bei MF überlegen ist. In den letzten Jahren beschäftigten sich verschiedene Gruppen mit dieser Frage. Außer der Erstbeschreibung[38] existieren verschiedene Studien, die eine signifikant bessere Wirksamkeit der ILMFT bei MF größer 400 µm zeigen, sowohl in der Erfolgsrate des Makulaverschlusses als auch im postoperativen Visus[85],[88]. Dagegen zeigten andere prospektive[89] und retrospektive Studien[86],[90] einen nicht signifikanten Vorteil der ILMFT gegenüber PPV mit ILM-Peeling in anatomischen und funktionellen Ergebnissen. Aufgrund der heterogenen Studienlage ohne große kontrollierte randomisierte Studien ist es daher immer noch ungewiss, ob die *inverted ILM Flap* Technik bei idiopathischen Makulaforamina die bessere Behandlungsmethode im Vergleich zum ILM-Peeling ist.

Zwei vor Kurzem publizierte Metaanalysen zeigten die Überlegenheit der ILMFT über das konventionelles ILM-Peeling bei MF. Beide Studien schlossen nur klinisch randomisierte Studien ein und beschrieben eine höhere Verschlussrate des Foramens nach ILMFT. Bei G. Chen et al. zeigten sich postoperative Sehschärfe sowie Anstieg des Visus besser nach PPV mit ILM-Flap[88], während bei JG. Yu et al. sich die Sehschärfe in sechsten postoperativen Monat nicht mehr als signifikant unterschiedlich erwies[91]. Auffällig ist der Einschluss von Studien, welche Visus und anatomischen Erfolg nur für eine Beobachtungszeit von 3 Monaten betrachten. Daher lassen sich, auch wenn beide Metaanalysen auf eine Überlegenheit der ILMFT gegenüber dem ILM-Peeling hinweisen, keine endgültigen Aussagen über die langfristig beste operative Behandlungsmöglichkeit treffen.

Bis heute sind die Mechanismen hinter dem Verschluss des MF und dem Visusanstieg nach Verwendung der ILMFT nicht vollständig geklärt. Man nimmt an, dass der Wirkmechanismus der ILMFT nur von dem begleitenden Peeling abhängt, allerdings finden sich Argumente gegen diese These in zwei Beobachtungen: 1) Die *Flap-closure* Erscheinung: Gelegentlich bleiben die Ränder vom MF nach ILMFT anatomisch nicht verschlossen und das Foramen wird nur von der ILM bedeckt (siehe **Abbildung 7**). OCT-Untersuchungen zeigten, dass bei all diesen Patienten ein kompletter anatomischer Verschluss des Defektes nach dem dritten Monat erreicht wurde[52]. 2) Sowohl die klassische ILMFT (mit kompletter Entfernung der ILM) als auch die *Temporal ILM*

*Flap Technique* (mit nur partiellem Peeling der ILM um den MF herum) zeigten ähnliche funktionelle und anatomische Ergebnisse[44].

Daher gibt es folgende Hypothesen der Wirksamkeit der ILMFT:

- Mit dem Peeling sollen Müllerzellfragmente von der innersten Netzhautschicht mit dem ILM-Flap ins Makulaloch gebracht werden. Diese sind die Akteure des anatomischen Lochverschlusses, sowie der Zunahme des Visus, nachdem sie mit diesem ins Foramen übertragen wurden. Dadurch wird eine Gliazellen-Proliferation induziert, die eine Umgebung für die Photorezeptoren schafft, um sich neu in der Nähe der Fovea positionieren zu können[38].
- Auch eine mögliche Gerüstrolle der ILM für die Gliazell-Migration und Proliferation im MF wird angenommen[38], [92].
- Der ILM-Flap dient als mechanische Barriere und verhindert den Eintritt von vitrealer Flüssigkeit in die Makula[44]. Dies verhindert die Hydratation mit konsequenter Eversion der MF-Ränder, die durch den Kontakt zur Glaskörperflüssigkeit stattfindet[17].
- Die Manipulation und Entfernung der ILM fördert eine Migration von makrophagenähnlichen Zellen (*Makrophag-like cells*) in die Retina. Diese aktivieren die Müllerzellen, die wiederum eine Gliazellproliferation für den Verschluss des MF auslösen[38], [85], [92].

Eine kürzlich publizierte *in vitro* Studie zeigt Hinweise darauf, dass die ILM eine stimulierende Rolle spielt bei der Migration von Müllerzellen mit nachweisbarem GFAP[51]. Dabei wurden iatrogene Makulaforamina in Affen Augen induziert und anschließend mit der ILMFT behandelt. Es wurde gezeigt, dass die ILM nicht nur die Einwanderung, sondern auch die Proliferation von Zellen im MF fördert, in der drei ihrer Hauptbestandteile wichtige Effekte auf kultivierten Müllerzellen zeigten: Kollagen Typ IV, Fibronectin und Laminin führten zu einer erhöhten Proliferation der Zellen, während Kollagen Typ IV und Fibronectin ihre Migration stimulierten. In derselben Studie wurde auch die Anwesenheit von neurotrophen Wachstumsfaktoren (GDNF, CNTF und Gehirn abgeleiteter neurotropher Faktor [BDNF]), und des basischen Fibroblasten-Wachstumsfaktors (bFGF) auf der ILM demonstriert. Diese Faktoren wurden auch von den migrierenden Müllerzellen exprimiert[51]. Eine schematische Darstellung dieser Hypothese ist in der **Abbildung 6** dargestellt.

Postoperativ ist das Wiedererkennen des ILM-Materials in der Fovea mittels OCT in den meisten Fällen möglich[38]. Im Zeitverlauf wird die Makulaarchitektur schrittweise wiederhergestellt. Die

---

Rehabilitation der fovealen Schichten beginnt auf Höhe der externen limitierenden Membran und setzt sich in der ellipsoiden Schicht fort[52].

#### 4.2.5 ILM-Flap-Komponenten und das Remodelling der Makula

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen in erster Linie die Abhängigkeit des Vorkommens neurotropher Faktoren von Vorkommen, Lokalisation und Herkunft prämakulärer Zellen. Wenn keine Zellen auf der retinalen Fläche der ILM beobachtet wurden, war retinaler Debris die einzige retinale Komponente, die bei einer ILM-Flap Methode potenziell in den Makuladefekt platziert wurde. Im Gegensatz dazu werden prämakuläre Zellen retinalen und extraretinalen Ursprungs zusammen mit der ILM in den Makuladefekt platziert. Dabei werden zum Beispiel Glia- und Ganglienzellmarker-positive Zellen, welche transdifferenzierte oder reprogrammierte Zellen sein können, mit dem ILMF ins MF gebracht. Somit können potenziell diese Bestandteile des Flaps eine neuroprotektive bzw. regenerationsfördernde Rolle bei retinaler Schädigung spielen[76].

Die in dieser Studie erhobenen Daten sprechen für eine Anwesenheit von Müllerzellen, da sich unter diesen auch VIM-, GFAP- und CRALBP-exprimierende Zellen befanden. Die Expression dieser Epitope ist ein Merkmal dieser Zellpopulation, und die Kollokationen von Vimentin und GFAP ein Hinweis auf aktivierte Müllerzellen[18]. Die Induktion einer Gliazellproliferation mit Vorkommen neuroprotektiver Faktoren wird ebenfalls von den Daten dieser Studie unterstützt, da zellulär exprimiertes GDNF und CNTF, in Kombination mit Müllerzellen, eine Protektion bzw. Reorganisation des verletzten fovealen Gewebe fördern kann[51], [69], [76]

Des Weiteren wirkt die ILM als Gerüst für die Migration von Gliazellen[38], [92]. Unsere ultrastrukturelle Aufnahme mittels EM zeigen die Anwesenheit einer integren ILM, welche - rein anatomisch betrachtet - als Schiene für Zellmigration sowie als Barriere zur Glaskörperflüssigkeit wirken könnte[17], [44].

Die Daten dieser Untersuchung stimmen mit den Ergebnissen der Arbeit von Shinode et. al zum Teil überein[51]. Die japanische Arbeitsgruppe wies die Anwesenheit von GFAP-positiven Zellen entlang der ins MF übertragenen ILM in einem Primatenmodell nach. Diese Zellen wurden als Müllerzellen identifiziert, und aufgrund ihrer zusätzlichen Immunreaktivität für Ki67 konnte eine Proliferation dieser Zellpopulation im Foramen nachgewiesen werden. In einem Versuch mit einer immortalisierten Müllerzelllinie wurden die Effekte von drei Hauptkomponenten der ILM, Kollagen IV, Laminin und Fibronectin – also von der ILM selbst - nachgewiesen. Dies passierte zum einen durch Förderung der Zellmigration und zum anderen durch ihre Proliferation. Außerdem produzierten die dadurch stimulierten Zellen verschiedene Wachstumsfaktoren: CNTF, GDNF, BDNF

und bFGF kamen auf den ILM Flaps in extrazellulärer Form vor. Zum Teil unterstützt diese Studie die Resultate von Shinode et al.[51] im menschlichen Modell, da GFAP-positive Zellen auf der ILM gefunden wurden und eine Produktion von neuronalen Wachstumsfaktoren durch diese Zellen bewiesen wurde. Allerdings wurde die Anwesenheit von extrazellulär vorkommenden Wachstumsfaktoren in dieser Studie nicht bestätigt.

Auch wenn das Primatenmodell der japanischen Arbeitsgruppe gute Erkenntnisse über den Wirkmechanismus dieses Eingriffs liefert[51], wäre die Durchführung des gleichen Experiments am Menschen hilfreich, aber Aufgrund der ethischen Unvertretbarkeit dieses Experiments bei Menschen, welches zur Enukleation des gerade therapierten Bulbus führen würde, nicht vertretbar.

Die obengenannten neuronalen Wachstumsfaktoren sind nicht die einzigen mit Bedeutung in der Neuroprotektion retinaler Zellen. Ein weiterer GF mit ähnlicher Wirkung ist der Nervenwachstumsfaktor. NGF hat eine antiapoptotische und Gliose-limitierende Wirkung und fördert die GF-Produktion seitens der Müllerzellen[83]. Die Proliferation von Müllerzellen nach Gabe von NGF wurde bereits von Zhang et al. in vitro nachgewiesen[84]. Dieselbe chinesische Arbeitsgruppe untersuchte auch die Wirksamkeit der ILM-Einführung mit NGF-Gabe ins IMF und zeigte eine anatomische sowie funktionelle Verbesserung der Ergebnisse[83]. Das Vorhandensein von NGF wurde in dieser Studie nicht geprüft, aber seine Expression in Myofibroblasten von idiopathischen ERM ist bekannt, und das Vorkommen von NGF auf der ILM bei MF ist demnach denkbar[93].

Bis dato wurden keine klinischen Studien mit Erprobung weiterer neuronaler Wachstumsfaktoren für die Therapie von durchgreifenden Makulaforamina bei Menschen publiziert. Trotzdem zeigte sich die therapeutische intravitreale Gabe von CNTF in der Behandlung der makulären Teleangiectasie Typ 2 erfolgreich[94]. In dieser Studie wurde ein Implantat mit genetisch modifizierten humanen CNTF-produzierenden retinalen Pigmentepithelzellen in der Pars plana von Patienten mit dieser neurodegenerativen Erkrankung eingesetzt. Diese Therapie bewirkte eine Verlangsamung der Pathologie.

### 4.2.6 Poren der ILM

Als Zufallsbefund wurden in dieser Studie homogene und lokal umschriebene Ausdünnungen der ILM festgestellt, welche als Poren bezeichnet werden. Diese Ausdünnungen der inneren Grenzschichtmembran machen sich in der Immunfluoreszenz mittels flat-mount Technik bemerkbar. Die Poren korrelieren mit Vertiefungen in der Phasenkontrast- sowie Interferenzmikroskopie. Ein weiteres morphologisches Korrelat zu dieser Erscheinung sind die Ausdünnungen der retinalen Seite in der Elektronenmikroskopie sowie in der Lichtmikroskopie. Die Funktion bzw. Ursache dieser anatomischen Veränderungen der ILM ist nicht bekannt.

Gandorfer et al. haben Poren der ILM erstmals beschrieben[19]. Die von ihnen gezeigten Poren erschienen als durchgreifende und rundliche Läsionen der ILM. Als weiteres Merkmal beschrieben Gandorfer et al.[19] die Ansammlung von Zellen um einzelne Poren herum. Dabei wurde die Hypothese formuliert, dass Poren eine Zelldurchwanderung von der Retina auf die vitreale Seite der ILM ermöglichen. In der Studie von Gandorfer et al.[19] wurde eine höhere Anzahl von ILM-Präparaten mittels flat-mount Technik untersucht, wobei Poren nur in 3 von 112 Proben gefunden wurden. Dass diese Ausdünnungen in der hier vorliegenden Studie deutlich häufiger nachgewiesen wurden, könnte auf die Wahl der Antikörperfärbung zurückzuführen sein oder auf den Verschluss von Poren durch Zellmigration.

Die Ausdünnungen der ILM, die in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen dieser vorliegenden Studie dargestellt werden konnten, sind nicht uneindeutig mit den Poren der Immunfluoreszenzfärbung zu assoziieren. Diese von retinal kommenden Ausdünnungen im Ultradünnschnitt könnten auch mit der Lokalisation von retinalen Blutgefäßen an der Netzhautoberfläche korrelieren. Über Blutgefäßen ist die ILM dünner[3]. In diesem Fall würden die lokalisierten ILM-Ausdünnungen die Areale repräsentieren, an denen retinale Gefäße Kontakt zur ILM haben[3].

Das morphologische Korrelat dazu stellen die wellenförmigen Strukturen auf der retinalen Seite der ILM dar, die als Einzel- und Zusatzbefund elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurden. Ihre schichtförmige Organisation erinnert an ein Blutgefäß oder eine Zellwand, deren Inhalt geöffnet wurde. Die Anwesenheit von retinalen Gefäßen im Bereich von ausgedünnten ILM-Arealen wurde bereits früher beschrieben[3]. Diese Beobachtung spricht für eine Schädigung der innersten Netzhautschicht beim ILM-Peeling und für die Abtragung von weiteren retinalen Komponenten jenseits von Müllerzellfragmenten. Gefäßreste an der retinalen Seite der ILM sind selten in

---

ILM-Präparaten zu finden. Durch sie können auch die kleinen Blutungen bei der ILM-Entfernung erklärt werden[79].

### 4.3 Limitationen

Diese Studie weist einige Einschränkungen auf, die hauptsächlich auf der kleinen Fallzahl des Patientenkollektivs beruhen. Außerdem gab es in unserer Studie keine statistische Signifikanz zwischen Zelldichte und Makulaforamen-Durchmesser. Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Zelldichte mit der Größe des Makulaforamens korreliert[20]. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass wir nur große FTMH mit einem Durchmesser von mehr als 400  $\mu\text{m}$  einbezogen haben. In dieser Untergruppe von FTMH mit einem Durchmesser von über 400  $\mu\text{m}$  korreliert die Zelldichte möglicherweise nicht kontinuierlich mit dem Durchmesser des Makulaforamens.

Andere Gründe für die großen Unterschiede in der Zelldichte zwischen den Proben könnten auch der Gewebeverlust bei der Entnahme aus dem Auginneren während der Operation oder bei der Aufbereitung im Labor, die Analyse der nicht vollständig entfernten ILM, das Alter der Patienten oder die Dauer des Bestehens des FTMH sein.

Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist an die semiquantitative Auswertung geknüpft. Die vorliegenden Untersuchungen haben deskriptiven Charakter. Eine Quantifizierung der Ergebnisse der Intensität der Immunfluoreszenz wäre jedoch aufgrund der variablen Zellendichte und aufgrund des mehrschichtigen Aufbaus der Zellkompositionen nicht verlässlich und vergleichbar. Der Einsatz eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops würde diese Problematik bei der Miniatur der untersuchten ILM-Präparate verbessern[95]. Generell ermöglicht die konfokale Mikroskopie eine präzisere Darstellung von Zellen in verschiedenen Betrachtungsebenen[95]. Dadurch ist eine exaktere Analyse der Zellen, welche in verschiedenen Schichten organisiert sind, wie z.B. bei Zellclustern oder gefalteten Arealen der ILM, möglich.

Die Abwesenheit von Positivkontrollen für die IF hingegen ist nicht als Mangel zu sehen. Aus mehreren Studien ist das Vorkommen dieser Epitope in prämakulären Zellproliferationen der ILM bei IMF oder idiopathischer epiretinale Gliose bekannt[18], [51], [61]. Diese vorherigen Arbeiten hatten ein ähnliches bzw. gleiches Protokoll für die Durchführung der IF. Aus diesem Grund konnte auf die Positivkontrollen in dieser Arbeit verzichtet werden.

Eine weitere methodische Limitation dieser Arbeit bezieht sich auf die intraoperativen Angaben zur Reihenfolge des ILM-Peelings sowie auf die topographische Lage der gewonnenen ILM-Fragmente im Bezug zur Fovea. Ein solches Mapping ist jedoch schwierig durchführbar und wurde

daher nicht praktiziert. Da die Ergebnisse eine ungleichmäßige Verteilung der Zellen auf der ILM aufweisen, kann somit eine weitere Zelldichte auf der nicht untersuchten perifovealen ILM nicht ausgeschlossen werden.

Zuletzt ist zu nennen, dass der strukturelle Erhalt der Präparate für die Qualität der EM-untersuchungen aufgrund vorangegangener Präparation für die Immunzytochemie eingeschränkt ist. Die Vorbereitung der Immunfluoreszenz und die daran anschließende Elektronenmikroskopie schöpfen die optimalen Präparationsschritte für ultrastrukturelle Untersuchungen nicht aus.

## 4.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ILM-Proben von großen idiopathischen FTMH aus einer variablen Zusammensetzung von prämakulären Zellen und Glaskörperrindenkollagen auf der vitrealen Seite der ILM bestehen. Die prämakulären Zellen erwiesen sich als positiv für neurotrophe Faktoren und makrogliale Zellmarker. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neurotrophe Faktoren, die von aktivierten Müllerzellen innerhalb der prämakulären Zellzusammensetzung produziert werden, potenziell zur Heilung eines Makulaforamens beitragen können.

## 4.5 Publikation der Dissertation

Die Daten dieser Arbeit sind Teil der Publikation *Premacular Cells as Source of Neurotrophic Factors in Idiopathic Macular Holes* (siehe Publikationsliste).

## Literaturverzeichnis

- [1] J. Sebag, "Anomalous posterior vitreous detachment: A unifying concept in vitreo-retinal disease," *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 242, no. 8, pp. 690–698, 2004, doi: 10.1007/s00417-004-0980-1.
- [2] S. C. Bu, R. Kuijer, R. J. van der Worp, X. R. Li, J. M. M. Hooymans, and L. I. Los, "The Ultrastructural Localization of Type II, IV, and VI Collagens at the Vitreoretinal Interface.," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0134325, Jul. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0134325.
- [3] J. Sebag, "Anatomy and pathology of the vitreo-retinal interface.," *Eye (Lond)*, vol. 6 ( Pt 6), pp. 541–52, 1992, doi: 10.1038/eye.1992.119.
- [4] G. Uechi, Z. Sun, E. M. Schreiber, W. Halfter, and M. Balasubramani, "Proteomic View of Basement Membranes from Human Retinal Blood Vessels, Inner Limiting Membranes, and Lens Capsules.," *J. Proteome Res.*, vol. 13, no. 8, pp. 3693–3705, Aug. 2014, doi: 10.1021/pr5002065.
- [5] J. Candiello, G. J. Cole, and W. Halfter, "Age-dependent changes in the structure, composition and biophysical properties of a human basement membrane.," *Matrix Biol.*, vol. 29, no. 5, pp. 402–10, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.matbio.2010.03.004.
- [6] P. B. Henrich *et al.*, "Nanoscale topographic and biomechanical studies of the human internal limiting membrane.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 53, no. 6, pp. 2561–70, Jun. 2012, doi: 10.1167/iovs.11-8502.
- [7] S. R. Russell, "What we know (and do not know) about vitreoretinal adhesion.," *Retina*, vol. 32 Suppl 2, pp. S181-6, Sep. 2012, doi: 10.1097/IAE.0b013e31825bf014.
- [8] P. Bishop, "The biochemical structure of mammalian vitreous.," *Eye (Lond)*, vol. 10 ( Pt 6), pp. 664–70, 1996, doi: 10.1038/eye.1996.159.
- [9] P. N. Bishop, "Structural macromolecules and supramolecular organisation of the vitreous gel.," *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 19, no. 3, pp. 323–44, May 2000, doi: 10.1016/s1350-9462(99)00016-6.
- [10] M. D. de Smet, A. M. Gad Elkareem, and A. H. Zwinderman, "The vitreous, the retinal interface in ocular health and disease.," *Ophthalmologica*, vol. 230, no. 4, pp. 165–78, 2013, doi: 10.1159/000353447.
- [11] L. I. Los, R. J. Van der Worp, M. J. A. Van Luyn, and J. M. M. Hooymans, "Age-related liquefaction of the human vitreous body: LM and TEM evaluation of the role of proteoglycans and collagen," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 44, no. 7, pp. 2828–2833, 2003, doi: 10.1167/iovs.02-0588.
- [12] P. N. Bishop, D. F. Holmes, K. E. Kadler, D. McLeod, and K. J. Bos, "Age-related changes on the surface of vitreous collagen fibrils.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 45, no. 4, pp. 1041–6, Apr. 2004, doi: 10.1167/iovs.03-1017.
- [13] M. W. Johnson, "Posterior vitreous detachment: evolution and complications of its early stages.," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 149, no. 3, pp. 371–82.e1, Mar. 2010, doi: 10.1016/j.ajo.2009.11.022.
- [14] J. S. Duker *et al.*, "The international vitreomacular traction study group classification of vitreomacular adhesion, traction, and macular hole," *Ophthalmology*, vol. 120, no. 12, pp. 2611–2619, 2013, doi: 10.1016/j.ophtha.2013.07.042.
- [15] J. D. M. Gass, "Reappraisal of biomicroscopic classification of stages of development of a macular hole," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 119, no. 6, pp. 752–759, 1995, doi: 10.1016/S0002-9394(14)72781-3.
- [16] K. M. Sebag J, Niemeyer M, "Chapter III.B: Anomalous Posterior Vitreous Detachment and Vitreoschisis," in *Vitreous: in Health and Disease*, J. Sebag, Ed. New York: Springer Science+Business Media, 2014, pp. 241–264.
- [17] H. Chung and S. H. Byeon, "New insights into the pathoanatomy of macular holes based on features of optical coherence tomography.," *Surv. Ophthalmol.*, vol. 62, no. 4, pp. 506–521, 2017, doi: 10.1016/j.survophthal.2017.03.003.
- [18] R. G. Schumann *et al.*, "Immunocytochemical and ultrastructural evidence of glial cells and hyalocytes in internal limiting membrane specimens of idiopathic macular holes.," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 52, no. 11, pp. 7822–34, Oct. 2011, doi: 10.1167/iovs.11-7514.
- [19] A. Gandorfer, R. Schumann, R. Scheler, C. Haritoglou, and A. Kampik, "Pores of the inner limiting membrane in flat-mounted surgical specimens.," *Retina*, vol. 31, no. 5, pp. 977–81, May 2011, doi: 10.1097/IAE.0b013e3181f44282.
- [20] R. G. Schumann *et al.*, "Cells at the vitreoretinal interface in small full-thickness macular holes.," *Retina*, vol. 35, no. 6, pp. 1158–65, Jun. 2015, doi: 10.1097/IAE.0000000000000441.
- [21] P. E. Tornambe, "Macular hole genesis: the hydration theory.," *Retina*, vol. 23, no. 3, pp. 421–4, Jun. 2003, doi: 10.1097/00006982-200306000-00028.
- [22] S. Wang, L. Xu, and J. B. Jonas, "Prevalence of full-thickness macular holes in urban and rural adult Chinese: the Beijing Eye Study.," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 141, no. 3, pp. 589–91, Mar. 2006, doi: 10.1016/j.ajo.2005.10.021.
- [23] V. Nangia, J. B. Jonas, A. Khare, and S. Lambat, "Prevalence of macular holes in rural central India. The Central India Eye and Medical Study.," *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 250, no. 7, pp. 1105–7, Jul. 2012, doi:

- 10.1007/s00417-012-1933-8.
- [24] V. A. Forsaa, B. Lindtjørn, J. T. Kvaløy, T. Frøystein, and J. Krohn, "Epidemiology and morphology of full-thickness macular holes.," *Acta Ophthalmol.*, vol. 96, no. 4, pp. 397–404, Jun. 2018, doi: 10.1111/aos.13618.
- [25] C. A. McCannel, J. L. Ensminger, N. N. Diehl, and D. N. Hodge, "Population-based incidence of macular holes.," *Ophthalmology*, vol. 116, no. 7, pp. 1366–9, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.ophtha.2009.01.052.
- [26] "Risk factors for idiopathic macular holes. The Eye Disease Case-Control Study Group.," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 118, no. 6, pp. 754–61, Dec. 1994, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7977602>.
- [27] E. Ezra *et al.*, "Incidence of idiopathic full-thickness macular holes in fellow eyes - A 5-year prospective natural history study," *Ophthalmology*, vol. 105, no. 2, pp. 353–359, 1998, doi: 10.1016/S0161-6420(98)93562-X.
- [28] E. Philippakis, P. Astroz, R. Tadayoni, and A. Gaudric, "Incidence of Macular Holes in the Fellow Eye without Vitreomacular Detachment at Baseline.," *Ophthalmologica.*, vol. 240, no. 3, pp. 135–142, 2018, doi: 10.1159/000488956.
- [29] C. N. Kay, P. R. Pavan, L. B. Small, T. Zhang, G. K. D. Zamba, and S. M. Cohen, "Familial trends in a population with macular holes.," *Retina*, vol. 32, no. 4, pp. 754–9, Apr. 2012, doi: 10.1097/IAE.0b013e3182252a92.
- [30] F. S. Ali, J. D. Stein, T. S. Blachley, S. Ackley, and J. M. Stewart, "Incidence of and Risk Factors for Developing Idiopathic Macular Hole Among a Diverse Group of Patients Throughout the United States.," *JAMA Ophthalmol.*, vol. 135, no. 4, pp. 299–305, 2017, doi: 10.1001/jamaophthalmol.2016.5870.
- [31] E. Ezra, "Idiopathic full thickness macular hole: Natural history and pathogenesis," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 85, no. 1, pp. 102–108, 2001, doi: 10.1136/bjo.85.1.102.
- [32] E. Arimura, C. Matsumoto, S. Okuyama, S. Takada, S. Hashimoto, and Y. Shimomura, "Quantification of metamorphopsia in a macular hole patient using M-CHARTS™," *Acta Ophthalmol. Scand.*, vol. 85, no. 1, pp. 55–59, 2007, doi: 10.1111/j.1600-0420.2006.00729.x.
- [33] C. Azzolini, F. Patelli, and R. Brancato, "Correlation between optical coherence tomography data and biomicroscopic interpretation of idiopathic macular hole," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 132, no. 3, pp. 348–355, 2001, doi: 10.1016/S0002-9394(01)01005-4.
- [34] N. E. Kelly and R. T. Wendel, "Vitreous surgery for idiopathic macular holes. Results of a pilot study.," *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)*, vol. 109, no. 5, pp. 654–9, May 1991, doi: 10.1001/archophth.1991.01080050068031.
- [35] C. Eckardt, U. Eckardt, S. Groos, L. Luciano, and E. Reale, "[Removal of the internal limiting membrane in macular holes. Clinical and morphological findings].," *Ophthalmologe*, vol. 94, no. 8, pp. 545–51, 1997, [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9376691>.
- [36] K. Spiteri Cornish *et al.*, "Vitrectomy with internal limiting membrane (ILM) peeling versus vitrectomy with no peeling for idiopathic full-thickness macular hole (FTMH).," *Cochrane database Syst. Rev.*, no. 6, p. CD009306, Jun. 2013, doi: 10.1002/14651858.CD009306.pub2.
- [37] E. Rahimy and C. A. McCannel, "IMPACT OF INTERNAL LIMITING MEMBRANE PEELING ON MACULAR HOLE REOPENING: A Systematic Review and Meta-Analysis.," *Retina*, vol. 36, no. 4, pp. 679–87, Apr. 2016, doi: 10.1097/IAE.0000000000000782.
- [38] Z. Michalewska, J. Michalewski, R. A. Adelman, and J. Nawrocki, "Inverted internal limiting membrane flap technique for large macular holes.," *Ophthalmology*, vol. 117, no. 10, pp. 2018–25, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.ophtha.2010.02.011.
- [39] Z. Michalewska, J. Michalewski, K. Dulczewska-Cichecka, and J. Nawrocki, "Inverted internal limiting membrane flap technique for surgical repair of myopic macular holes.," *Retina*, vol. 34, no. 4, pp. 664–9, Apr. 2014, doi: 10.1097/IAE.0000000000000042.
- [40] M. Mete *et al.*, "INVERTED INTERNAL LIMITING MEMBRANE FLAP TECHNIQUE VERSUS COMPLETE INTERNAL LIMITING MEMBRANE REMOVAL IN MYOPIC MACULAR HOLE SURGERY: A Comparative Study.," *Retina*, vol. 37, no. 10, pp. 1923–1930, Oct. 2017, doi: 10.1097/IAE.0000000000001446.
- [41] H. Sasaki *et al.*, "Inverted internal limiting membrane flap technique as a useful procedure for macular hole-associated retinal detachment in highly myopic eyes.," *Eye (Lond)*, vol. 31, no. 4, pp. 545–550, Apr. 2017, doi: 10.1038/eye.2016.263.
- [42] H. Takahashi, M. Inoue, T. Koto, Y. Itoh, K. Hirota, and A. Hidakata, "INVERTED INTERNAL LIMITING MEMBRANE FLAP TECHNIQUE FOR TREATMENT OF MACULAR HOLE RETINAL DETACHMENT IN HIGHLY MYOPIC EYES.," *Retina*, vol. 38, no. 12, pp. 2317–2326, Dec. 2018, doi: 10.1097/IAE.0000000000001898.
- [43] R. Baba *et al.*, "EFFICACY OF THE INVERTED INTERNAL LIMITING MEMBRANE FLAP TECHNIQUE WITH VITRECTOMY FOR RETINAL DETACHMENT ASSOCIATED WITH MYOPIC MACULAR HOLES.," *Retina*, vol. 37, no. 3, pp. 466–471, Mar. 2017, doi: 10.1097/IAE.0000000000001211.
- [44] Z. Michalewska, J. Michalewski, K. Dulczewska-Cichecka, R. A. Adelman, and J. Nawrocki, "TEMPORAL INVERTED INTERNAL LIMITING MEMBRANE FLAP TECHNIQUE VERSUS CLASSIC INVERTED INTERNAL LIMITING MEMBRANE FLAP TECHNIQUE: A Comparative Study.," *Retina*, vol. 35, no. 9, pp. 1844–50, Sep. 2015, doi: 10.1097/IAE.0000000000000555.
- [45] Y. Morizane *et al.*, "Autologous transplantation of the internal limiting membrane for refractory macular holes.," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 157, no. 4, pp. 861–869.e1, Apr. 2014, doi: 10.1016/j.ajo.2013.12.028.

- [46] J. Pires, J. Nadal, and N. L. Gomes, "Internal limiting membrane translocation for refractory macular holes.," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 101, no. 3, pp. 377–382, 2017, doi: 10.1136/bjophthalmol-2015-308299.
- [47] F. J. De Novelli, R. C. Preti, M. L. Ribeiro Monteiro, D. E. Pelayes, M. Junqueira Nóbrega, and W. Y. Takahashi, "Autologous Internal Limiting Membrane Fragment Transplantation for Large, Chronic, and Refractory Macular Holes.," *Ophthalmic Res.*, vol. 55, no. 1, pp. 45–52, 2015, doi: 10.1159/000440767.
- [48] D. S. Grewal and T. H. Mahmoud, "Autologous Neurosensory Retinal Free Flap for Closure of Refractory Myopic Macular Holes.," *JAMA Ophthalmol.*, vol. 134, no. 2, pp. 229–30, Feb. 2016, doi: 10.1001/jamaophthalmol.2015.5237.
- [49] T. Caporossi, B. Pacini, L. De Angelis, F. Barca, E. Peiretti, and S. Rizzo, "HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE TO CLOSE RECURRENT, HIGH MYOPIC MACULAR HOLES IN PATHOLOGIC MYOPIA WITH AXIAL LENGTH OF  $\geq 30$  mm.," *Retina*, Dec. 2019, doi: 10.1097/IAE.0000000000002699.
- [50] S.-N. Chen and C.-M. Yang, "LENS CAPSULAR FLAP TRANSPLANTATION IN THE MANAGEMENT OF REFRACTORY MACULAR HOLE FROM MULTIPLE ETIOLOGIES.," *Retina*, vol. 36, no. 1, pp. 163–70, Jan. 2016, doi: 10.1097/IAE.0000000000000674.
- [51] Y. Shiode *et al.*, "The role of inverted internal limiting membrane flap in macular hole closure," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 58, no. 11, pp. 4847–4855, 2017, doi: 10.1167/iov.17-21756.
- [52] K. Bonińska, J. Nawrocki, and Z. Michalewska, "MECHANISM OF 'FLAP CLOSURE' AFTER THE INVERTED INTERNAL LIMITING MEMBRANE FLAP TECHNIQUE.," *Retina*, vol. 38, no. 11, pp. 2184–2189, Nov. 2018, doi: 10.1097/IAE.0000000000001861.
- [53] D. O. G. (DOG). & R. G. e. V. (RG) erufsverband der Augenärzte Deutschlands e. V. (BVA)., "Stellungnahme von BVA, DOG und RG zur Entwicklung, Diagnostik und Behandlung der epiretinalen Gliose," *Der Ophthalmol.*, vol. 118, no. 2, pp. 121–138, Feb. 2021, doi: 10.1007/s00347-020-01291-3.
- [54] A. T. Fung, J. Galvin, and T. Tran, "Epiretinal membrane: A review," *Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 49, no. 3, pp. 289–308, 2021, doi: 10.1111/ceo.13914.
- [55] C. Haritoglou *et al.*, "Evaluation of the internal limiting membrane after conventional peeling during macular hole surgery," *Retina*, vol. 26, no. 1, pp. 21–24, 2006, doi: 10.1097/00006982-200601000-00004.
- [56] R. G. Schumann, M. Rohleder, M. M. Schaumberger, C. Haritoglou, A. Kampik, and A. Gandorfer, "Ultrastructural Aspects of Surgical Failure," pp. 340–349, 2006.
- [57] R. G. Schumann, M. M. Schaumberger, M. Rohleder, C. Haritoglou, A. Kampik, and A. Gandorfer, "Ultrastructure of the vitreomacular interface in full-thickness idiopathic macular holes: a consecutive analysis of 100 cases.," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 141, no. 6, pp. 1112–1119, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.ajo.2006.01.074.
- [58] A. Gandorfer, R. Scheler, C. Haritoglou, R. Schumann, M. Nentwich, and A. Kampik, "Pathology of the macular hole rim in flat-mounted internal limiting membrane specimens.," *Retina*, vol. 29, no. 8, pp. 1097–105, Sep. 2009, doi: 10.1097/IAE.0b013e3181aa8fb1.
- [59] G. Luna, G. P. Lewis, C. D. Banna, O. Skalli, and S. K. Fisher, "Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Müller cells following retinal injury: A comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin," *Mol. Vis.*, vol. 16, no. November, pp. 2511–2523, 2010.
- [60] R. De Hoz *et al.*, "Retinal Macroglial Responses in Health and Disease," *Biomed Res. Int.*, vol. 2016, 2016, doi: 10.1155/2016/2954721.
- [61] S. Y. Lesnik Oberstein, G. P. Lewis, T. Dutra, and S. K. Fisher, "Evidence that neurites in human epiretinal membranes express melanopsin, calretinin, rod opsin and neurofilament protein," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 95, no. 2, pp. 266–272, 2011, doi: 10.1136/bjo.2010.180679.
- [62] A. Kampik, K. R. Kenyon, R. G. Michels, W. R. Green, and Z. C. de la Cruz, "Epiretinal and vitreous membranes. Comparative study of 56 cases.," *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)*, vol. 99, no. 8, pp. 1445–54, Aug. 1981, doi: 10.1001/archophth.1981.03930020319025.
- [63] R. G. Schumann *et al.*, "Hyalocytes in idiopathic epiretinal membranes: a correlative light and electron microscopic study.," *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 252, no. 12, pp. 1887–94, Dec. 2014, doi: 10.1007/s00417-014-2841-x.
- [64] A. Gandorfer, M. Rohleder, S. Grossefinger, C. Haritoglou, M. Ulbig, and A. Kampik, "Epiretinal pathology of diffuse diabetic macular edema associated with vitreomacular traction.," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 139, no. 4, pp. 638–652, 2005, doi: 10.1016/j.ajo.2004.11.035.
- [65] T. Hisatomi *et al.*, "A new method for comprehensive bird's-eye analysis of the surgically excised internal limiting membrane.," *Am. J. Ophthalmol.*, vol. 139, no. 6, pp. 1121–2, Jun. 2005, doi: 10.1016/j.ajo.2004.11.051.
- [66] T. Hisatomi *et al.*, "Cellular migration associated with macular hole: a new method for comprehensive bird's-eye analysis of the internal limiting membrane.," *Arch. Ophthalmol. (Chicago, Ill. 1960)*, vol. 124, no. 7, pp. 1005–11, Jul. 2006, doi: 10.1001/archophth.124.7.1005.
- [67] Y. Xue *et al.*, "CRALBP supports the mammalian retinal visual cycle and cone vision," *J. Clin. Invest.*, vol. 125, no. 2, pp. 727–738, 2015, doi: 10.1172/JCI79651.
- [68] G. Parrilla-Reverter *et al.*, "Time-course of the retinal nerve fibre layer degeneration after complete intra-orbital optic nerve transection or crush: A comparative study," *Vision Res.*, vol. 49, no. 23, pp. 2808–2825, 2009, doi: 10.1016/j.visres.2009.08.020.
- [69] A. Kimura, K. Namekata, X. Guo, C. Harada, and T. Harada, "Neuroprotection, growth factors and BDNF-TRKB

- signalling in retinal degeneration," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 17, no. 9. 2016, doi: 10.3390/ijms17091584.
- [70] A. Müller, T. G. Hauk, and D. Fischer, "Astrocyte-derived CNTF switches mature RGCs to a regenerative state following inflammatory stimulation.," *Brain*, vol. 130, no. Pt 12, pp. 3308–20, Dec. 2007, doi: 10.1093/brain/awm257.
- [71] M. F. Paige, J. K. Rainey, and M. C. Goh, "A study of fibrous long spacing collagen ultrastructure and assembly by atomic force microscopy.," *Micron*, vol. 32, no. 3, pp. 341–53, Apr. 2001, doi: 10.1016/s0968-4328(00)00037-8.
- [72] A. Gandorfer, R. Scheler, R. Schumann, C. Haritoglou, and A. Kampik, "Interference microscopy delineates cellular proliferations on flat mounted internal limiting membrane specimens," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 93, no. 1, pp. 120–122, 2009, doi: 10.1136/bjo.2008.146514.
- [73] A. Bringmann *et al.*, "Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects," *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 28, no. 6, pp. 423–451, 2009, doi: 10.1016/j.preteyeres.2009.07.001.
- [74] C. Harada *et al.*, "Potential role of glial cell line-derived neurotrophic factor receptors in Müller glial cells during light-induced retinal degeneration," *Neuroscience*, vol. 122, no. 1, pp. 229–235, 2003, doi: 10.1016/S0306-4522(03)00599-2.
- [75] M. Frasson *et al.*, "Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse," *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 40, no. 11, pp. 2724–2734, 1999.
- [76] D. Goldman, "Müller glial cell reprogramming and retina regeneration.," *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 15, no. 7, pp. 431–42, Jul. 2014, doi: 10.1038/nrn3723.
- [77] G. P. Lewis *et al.*, "Identification of ganglion cell neurites in human subretinal and epiretinal membranes," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 91, no. 9, pp. 1234–1238, 2007, doi: 10.1136/bjo.2006.104612.
- [78] S. Y. Lesnik Oberstein, G. P. Lewis, E. A. Chapin, and S. K. Fisher, "Ganglion cell neurites in human idiopathic epiretinal membranes," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 92, no. 7, pp. 981–985, 2008, doi: 10.1136/bjo.2007.132332.
- [79] D. H. W. Steel, C. Dinah, K. White, and P. J. Avery, "The relationship between a dissociated optic nerve fibre layer appearance after macular hole surgery and Muller cell debris on peeled internal limiting membrane," *Acta Ophthalmol.*, vol. 95, no. 2, pp. 153–157, 2017, doi: 10.1111/aos.13195.
- [80] S. E. MacKenzie *et al.*, "Ultrastructure and retinal imaging of internal limiting membrane: A clinicopathologic correlation of trypan blue stain in macular hole surgery," *Retina*, vol. 30, no. 4, pp. 655–661, 2010, doi: 10.1097/IAE.0b013e3181bced50.
- [81] Y. Ito, H. Terasaki, A. Takahashi, T. Yamakoshi, M. Kondo, and M. Nakamura, "Dissociated optic nerve fiber layer appearance after internal limiting membrane peeling for idiopathic macular holes," *Ophthalmology*, vol. 112, no. 8, pp. 1415–1420, 2005, doi: 10.1016/j.ophtha.2005.02.023.
- [82] S. G. Giannelli, G. C. Demontis, G. Pertile, P. Rama, and V. Broccoli, "Adult human Müller glia cells are a highly efficient source of rod photoreceptors," *Stem Cells*, vol. 29, no. 2, pp. 344–356, 2011, doi: 10.1002/stem.579.
- [83] L. Zhang, X. Li, X. Yang, Y. Shen, and M. Wu, "Internal limiting membrane insertion technique combined with nerve growth factor injection for large macular hole," *BMC Ophthalmol.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1186/s12886-019-1258-z.
- [84] L. Zhang, X. Li, X. Lin, and M. Wu, "Nerve growth factor promotes the proliferation of Müller cells co-cultured with internal limiting membrane by regulating cell cycle via Trk-A/PI3K/Akt pathway," *BMC Ophthalmol.*, vol. 19, no. 1, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1186/s12886-019-1142-x.
- [85] S. Rizzo, R. Tartaro, F. Barca, T. Caporossi, D. Bacherini, and F. Giansanti, "INTERNAL LIMITING MEMBRANE PEELING VERSUS INVERTED FLAP TECHNIQUE FOR TREATMENT OF FULL-THICKNESS MACULAR HOLES: A COMPARATIVE STUDY IN A LARGE SERIES OF PATIENTS.," *Retina*, vol. 38 Suppl 1, no. 11m, pp. S73–S78, Sep. 2018, doi: 10.1097/IAE.0000000000001985.
- [86] T. Yamashita *et al.*, "Best surgical technique and outcomes for large macular holes: retrospective multicentre study in Japan.," *Acta Ophthalmol.*, vol. 96, no. 8, pp. e904–e910, Dec. 2018, doi: 10.1111/aos.13795.
- [87] H. Hayashi and S. Kuriyama, "Foveal microstructure in macular holes surgically closed by inverted internal limiting membrane flap technique.," *Retina*, vol. 34, no. 12, pp. 2444–50, Dec. 2014, doi: 10.1097/IAE.0000000000000252.
- [88] G. Chen, R. Tzekov, F. Jiang, S. Mao, Y. Tong, and W. Li, "Inverted ILM flap technique versus conventional ILM peeling for idiopathic large macular holes: A meta-analysis of randomized controlled trials.," *PLoS One*, vol. 15, no. 7, p. e0236431, 2020, doi: 10.1371/journal.pone.0236431.
- [89] N. B. Kannan, P. Kohli, H. Parida, O. O. Adenuga, and K. Ramasamy, "Comparative study of inverted internal limiting membrane (ILM) flap and ILM peeling technique in large macular holes: a randomized-control trial.," *BMC Ophthalmol.*, vol. 18, no. 1, p. 177, Jul. 2018, doi: 10.1186/s12886-018-0826-y.
- [90] R. Narayanan *et al.*, "SURGICAL OUTCOMES AFTER INVERTED INTERNAL LIMITING MEMBRANE FLAP VERSUS CONVENTIONAL PEELING FOR VERY LARGE MACULAR HOLES.," *Retina*, vol. 39, no. 8, pp. 1465–1469, Aug. 2019, doi: 10.1097/IAE.0000000000002186.
- [91] J.-G. Yu, J. Wang, and Y. Xiang, "Inverted Internal Limiting Membrane Flap Technique versus Internal Limiting Membrane Peeling for Large Macular Holes: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.," *Ophthalmic Res.*, vol. 64, no. 5, pp. 713–722, 2021, doi: 10.1159/000515283.

- [92] J. H. Park, S. M. Lee, S. W. Park, J. E. Lee, and I. S. Byon, "Comparative analysis of large macular hole surgery using an internal limiting membrane insertion versus inverted flap technique.," *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 103, no. 2, pp. 245–250, 2019, doi: 10.1136/bjophthalmol-2017-311770.
- [93] S. Minchiotti *et al.*, "Human idiopathic epiretinal membranes express NGF and NGF receptors," *Retina*, vol. 28, no. 4, pp. 628–637, 2008, doi: 10.1097/IAE.0b013e31815ec275.
- [94] E. Y. Chew *et al.*, "Effect of Ciliary Neurotrophic Factor on Retinal Neurodegeneration in Patients with Macular Telangiectasia Type 2: A Randomized Clinical Trial.," *Ophthalmology*, vol. 126, no. 4, pp. 540–549, 2019, doi: 10.1016/j.ophtha.2018.09.041.
- [95] A. D. Elliott, "Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices," *Curr. Protoc. Cytom.*, vol. 92, no. 1, Mar. 2020, doi: 10.1002/cpcy.68.

## Anhang A: Laborausstattung, Reagenzien und Rezepturen

- **Destilliertes Wasser** (6724092.00.00, Aqua ad iniectabilia, Braun, Deutschland).
- **Alcon BSS Plus® (Alcon, Freiburg im Breisgau, Deutschland)**. Zum Transport vom Operationsaal ins Labor wurden die gerade entfernten Präparate in einer mit Alcon BSS Plus® gefüllten Tube hineingelegt. Alcon BSS Plus® ist eine Spülflüssigkeit, die der Zusammensetzung von Kammerwasser und Glaskörperflüssigkeit ähnelt. Sie besteht aus: 160,9 mM Natrium, 5,8 mM Kalium, 1,05 mM Calcium, 130 mM Chlorid, 0,98 mM Magnesium, 5 mM Glukose, 0,3 mM Glutathion, 3 mM Phosphat und 25 mM Bikarbonat.
- **4% Paraformaldehyd-Lösung mit 0,1% Glutaraldehyd (PFA)**. PFA war das verwendete Fixierungsmittel für die Proben zur IF-Untersuchung. Es wurde wie folgt im hauseigenen Labor hergestellt: 2g Paraformaldehyd Pulver (104005, MERCK, Darmstadt, Deutschland) in 20 ml 0,1 M *Phosphate Buffered Saline* (PBS, pH 7,4) wurden gemischt und unter Rühren auf 75°C erhitzt. Die Lösung wurde so lange gerührt, bis keine Paraformaldehyd-Aggregate mehr sichtbar waren. Nach diesem Schritt wurde die Flüssigkeit mit 0,1 M PBS auf 50 ml aufgefüllt und unter dem Abzug durch einen doppelten Faltenfilter (595 ½ S&S Folded Filters, ø150mm, 311645, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) filtriert. Anschließend wurde der Lösung 200 µl einer 25%-igen Glutaraldehyd-Lösung (49626, Fluka, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Germany) zugegeben. Die nun fertige PFA-Lösung wurde bei 4°C gelagert und war 14 Tage lang haltbar.
- **0,1 mol/L PBS-Puffer** (P27, Apotheke der Universität München, München, Deutschland, pH 7,4).
- **5% Glutaraldehyd-Lösung (4% GA)**. GA wurde zur Fixierung der EM-Proben verwendet. Die Lösung wurde vom hausinternen Labor hergestellt und bestand aus 25% Glutaraldehyd (49630, Fluka) und 0,1 M PBS-Puffer (P27, Hausinterne Apotheke).
- **DAPI (AKS-38448, Dianova, Hamburg)**. Zur Darstellung der Zellkerne durch einen 460 nm Wellenlänge-Filter.
- **10% Pepsin** (P 7000, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

- **Phosphate-buffered saline (PBT) – Puffer.** Der PBT-Puffer wurde als Inkubationspuffer in der Immunfluoreszenz benutzt. Seine Herstellung erfolgte im hauseigenen Labor. Er besteht aus: 0,1 M PBS-Puffer (P27, Apotheke der Universität München, München, Deutschland, pH 7,4), 6% BSA (A-9647, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 0,1% Triton-X-100 (X100, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und 0,1% Natriumazid (S-8032, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).
- **Isotypkontrollen** (1 : 50 Verdünnung in PBS):
  - IgG, Kaninchen, GTX35005, GeneTex, Eching, Deutschland.
  - IgG1, Maus, X 0931, DAKO, Hamburg, Deutschland.
- **Osmium-Fixans.** Zur Nachfixierung und Kontrastierung. Herstellung im hauseigenen Labor: 1 g kristallisierter Osmiumtetroxyd (R 1017, Wetzlar, Deutschland) und 50 ml 0,1 M PBS-Puffer (P27, Apotheke der Universität München, München, Deutschland, pH 7,4).
- **Bleicitrat** nach Reynolds. Zur Kontrastierung der Schnitte. Laborherstellung: 1,33 g Bleinitrat (15334, Fluka), 76 g Natriumcitrat (S-4641, Sigma-Aldrich) werden zusammen mit 30 ml Aqua dest. im Schliffkolben kräftig geschüttelt (ca. 30 min). Danach werden 8 ml 1 M NaOH langsam bis zum Aufklären der Lösung hinzugeben. Schließlich wird die Lösung auf 50 ml mit Aqua destillata aufgefüllt (pH-Wert sollte bei ca. 12 liegen).
- **Uranylacetat** wurde zur Kontrastierung verwendet und immer frisch angesetzt. 1-2 Spatelspitzen Uranylacetat (8473, Merck) werden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gelegt und in 1 ml 70%-igem Ethanol oder Methanol kräftig geschüttelt, bis das Uranyl sich löst.
- **EPON-Mischung.** Zur Einbettung der EM-Proben. Es besteht aus:
  - 9 ml Lösung A (62 ml Epon 812 [21045, SERVA, Heidelberg Germany] und 100 ml DDSA [20755, SERVA]).
  - 21 ml Lösung B (100 ml Epon 812 [21045, SERVA] und 89 ml MNA [29452, SERVA])
  - 0,6 ml DMP 30 (2%, 36975, SERVA).
- **Histoknife Wet 8mm** (160-128-0001, Drukker).
- **Ultracut R** (705902, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland).
- **Elektronenmikroskop:** Zeiss EM 900 (Zeiss, Jena, Deutschland).
- **Elektronenmikroskop-Kamera:** Slow-scan CCD-Camera for TEM (7889 inside, TRS, Moorenweis, Deutschland).
- **Camera controller Type:** TRS Dual speed (461/14, TRS).
- **EM-Bilder-Software:** ImageSysProg (Version 1.2.3.46, TRS).

- **Werkbank:** Filtair 824 (FI824143105, Erlab, Köln, Deutschland).
- **Wärmeofen:** Memmert B30 (882080, Memmert, Schwabach, Deutschland).
- **Grid,** Objektträger für EM-Präparate: Hexagonal 200 mesh., Dünnsteg, Kupfer (G2710C, Pano, Wetzlar, Deutschland).
- **Leica Fluoreszenzmikroskop** (DM 2500, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) ausgestattet mit einer Mikroskopkamera von ProgRes® CF (Jenoptik Optical Systems, Jena, Deutschland).
- **Stereomikroskop:** Leica MS5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland).
- **Software zur Bearbeitung und Analyse der Bilder:**
  - ProgRes® CapturePro v2.8.8 (Jenoptik Optical Systems, Jena, Deutschland).
  - Adobe Photoshop® CS 6 (Adobe Systems GmbH, München, Deutschland).
  - ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).
- **Zentrifuge:** MiniSpin® (Eppendorf, Hamburg, Deutschland).
- **Rüttler:** IKA-Vibrax-VXR (IKA-Werke, Staufen, Deutschland).
- **Kühl-/Gefrierschrank,** Bosch, (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland).
- **Verbrauchsmaterial:**
  - SuperFrost™ Objektträger (J1800AMNZ, Menzel, Braunschweig, Deutschland).
  - Deckgläser 15x15 mm (BBAD01500150, Menzel, Braunschweig, Deutschland).
  - Pipetten Research® (0.5 – 10 µL, 10 – 100 µL und 100 – 1000 µL, Eppendorf).
  - Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard/Bulck 0,1 - 20 µl (0030000.838, Eppendorf).
  - Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard/Bulck 2 - 200 µl (0030000.870, Eppendorf).
  - Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard/Bulck 50 - 1000 µl (0030000.919, Eppendorf).
  - Safe-Lock Tubes 0,5 ml, mix (0030121.708, Eppendorf).
  - Safe-Lock Tubes 2,0 ml, mix (0030121.686, Eppendorf).
  - Messpipette bis 1 ml, nicht steril (REF. 201C, LOT 1144, Copan, Diagnostic Inc., Murrieta, USA).
  - Einmal-Micropipette Ringcaps 20 µl (4095040, Liebl&Ritzinger, München, Deutschland).
  - Rollrandgläser 40 x 19 mm, 5 ml (9400215, Wagner&Munz, München, Deutschland).
- **Kunststofftablett** mit halbkugelförmigen Kerben (keine Angaben zur Firma).
- **Feuchtkammer:** Durchsichtige, wie ein Buch aufklappbare Plastikschatel (keine Angaben

zur Firma). In der Schachtel selbst wurde der Boden mit gefalteten Papiertüchern durchnässt, mit destilliertem Wasser ausgelegt, und das Kunststoffablett auf die Tücher gelegt.

## Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. R.G. Schumann für die Chance bedanken, meine Promotion in Ihrem Labor mit langer Tradition durchzuführen. Diese Arbeit hat mir viele Möglichkeiten – selbst vor dem Einreichen der Dissertation – eröffnet. Zudem bedanke ich mich bei Frau Dr. med. D. Vogt für die Betreuung und Frau Schäler für die Hilfe sowie Aufsicht im Labor. Ohne diese Unterstützung wäre die Durchführung dieses Projektes nicht möglich gewesen.

Ein spezielles Dankeschön gilt Frau Dr. rer. nat. L. Brase für die aufmerksame und geduldige Unterstützung in der Korrektur der Form dieses Schreibens. Für die stetige emotionale Unterstützung möchte ich mich zudem bedanken. Frau Dr. Brase ist ein großes Vorbild bzgl. des wissenschaftlichen Arbeitens.

Ich möchte mich bei meiner Freundin Constanze bedanken für die Vermittlung der notwendigen Motivation und Resilienz, um an diesem Dissertationsschreiben durchgehend zu arbeiten.

Zuletzt darf die wichtige Danksagung für Herrn Prof. Dr. M.S. Spitzer, PD Dr. C. Skevas und (demnächst PD) Dr. med. D. Dulz für ihre Unterstützung während des Marathons der Dissertationsschrift nicht vergessen werden.

## Affidavit



### Eidesstattliche Versicherung

Mautone Luca

Name, Vorname

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

***Prämakuläre Zellen als Quelle neuronaler Wachstumsfaktoren bei großen idiopathischen Makulaforamina***

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

Hamburg, 14.02.2023

Luca Mautone

Ort, Datum  
Doktorand

Unterschrift Doktorandin bzw.

## **Lebenslauf**

## Publikationsliste

Lachmann ES, Mautone L, Dulz S. Isolated juvenile macular dystrophy without posterior column ataxia associated with FLVCR1 mutation. *Ophthalmic Genet.* 2021 Aug 25;1-3. doi: 10.1080/13816810.2021.1970196.

Schindler P<sup>t</sup>, Mautone L<sup>t</sup>, Bigdon E, Druchkiv V, Spitzer MS, Skevas C. Lens densitometry for assessment and prediction of cataract progression after pars plana vitrectomy with C3F8-gas for retinal detachment. *PLoS One.* 2021 Jul 12;16(7):e0254370. doi: 10.1371/journal.pone.0254370

Mautone L, Skevas C, Spitzer MS. Therapie der postoperativen Endophthalmitis: Operieren oder nur injizieren? [Treatment of postoperative endophthalmitis: Operate or only inject?]. *Ophthalmologie.* 2021;118(3):219-229. doi:10.1007/s00347-021-01320-9

Vogt D, Haritoglou C, Mautone L, et al. Premacular Cells as Source of Neurotrophic Factors in Idiopathic Macular Holes. *Curr Eye Res.* 2020;45(11):1395-1402. doi:10.1080/02713683.2020.1752389