

Aus der Klinik für Augenheilkunde der Medizinischen Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. S. Grisanti

**Geographische Atrophie bei altersbedingter Makuladegeneration:  
Morphometrie und Autofluoreszenzanalyse  
des retinalen Pigmentepithels in der Histologie**

**INAUGURALDISSERTATION**

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der

Universität zu Lübeck

- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von

Anna Wagner

Nursultan/Kasachstan

Lübeck 2019

**1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. M. Rudolf**

**2. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Iakov Shimanovich**

**Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2020**

**Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 03.03.2020**

**-Promotionskommission der Sektion Medizin-**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Die Makula	6
1.1.1 Retinale Schichten	7
1.1.2 Das retinale Pigmentepithel	8
1.1.3 Die Bruch-Membran	10
1.2 Die altersbedingte Makuladegeneration	11
1.2.1 Die geographische Atrophie	12
1.2.1.1 Epidemiologie	13
1.2.1.2 Pathophysiologie	14
1.2.1.3 Risikofaktoren	15
1.2.1.4 Therapeutische Optionen	15
1.2.2 Klinische Diagnostik	16
1.2.2.1 Ophthalmoskopie und Fundusphotographie	16
1.2.2.2 Fundusautofluoreszenz	17
1.2.2.3 Optische Kohärenztomographie	20
<b>2. Fragestellung</b>	<b>23</b>
2. A Morphometrie des RPE in der GA-Randzone	23
2. B Autofluoreszenz einzelner RPE-Zellen in der GA-Randzone	23

<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	24
3.1	Spendermaterial	24
3.2	Histologische Aufarbeitung	25
3.3	Fluoreszenzmikroskopie	29
3.4	Bildbearbeitung und –auswertung	29
3.4.1	RPE-Morphometrie	29
3.4.2	RPE-Autofluoreszenz	31
3.5	Statistik	32
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	33
4.1	Morphometrie des RPE	33
4.1.1	Messungen pro RPE-Degenerationsgrad	33
4.1.2	Analyse der Untergruppen des RPE-Degenerationsgrades 2	37
4.1.3	Morphometrische Analyse unter Berücksichtigung der klinischen Detektierbarkeit	39
4.2	Autofluoreszenz einzelner RPE-Zellen	40
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	46
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	52
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	53
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	61
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	62

## **Abkürzungsverzeichnis**

**AF** - Autofluoreszenz

**AMD** - altersbedingte Makuladegeneration

**BlamD** - basal laminar deposits; Teil basaler Ablagerungen

**BlinD** - basal linear deposits; Teil basaler Ablagerungen

**BrM** - Bruch-Membran

**CNV** - choroidale Neovaskularisation

**Fd-AF** - Fundus-Autofluoreszenz

**FLA** - Fluoreszenzangiografie

**GA** - Geographische Atrophie

**HAF** - histologisch gemessene Autofluoreszenz

**KL** - Konfidenzintervall

**NIA** - Nahinfrarot-Autofluoreszenz

**OCT** - optische Kohärenztomographie

**ONL** - outer nuclear layer, äußere Körnerschicht der Netzhaut

**RPE** - retinales Pigmentepithel

**PR** - Photorezeptoren

**SD-OCT** - spectral domain optische Kohärenztomographie

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Makula

Die Makula (Macula lutea) ist die Stelle des schärfsten Sehens. Sie liegt im Zentrum des hinteren Pols der Netzhaut, innerhalb der beiden temporalen Gefäßbögen (Abb. 1). Es ist ein Bereich mit einem Durchmesser von etwa 5 mm. Die dunklere, gelbliche Färbung dieses Bereichs ist durch die Einlagerung von Lichtschutzpigmenten (Lutein, Zeaxanthin) in die Netzhaut bedingt. Die Makula besitzt eine zentrale Grube, die Fovea centralis, die durch die höchste Dichte von Sinneszellen (Photorezeptoren) gekennzeichnet ist und entspricht damit dem Netzhautort mit der höchsten Sehschärfe.



**Abb. 1:** Zentraler Fundus eines gesunden linken Auges einer 44-jährigen Patientin; hinterer Pol mit Makula (großer Kreis) zwischen den temporalen Gefäßbögen und temporal des Nervus opticus, mit dem die Gefäße ins Auge treten; Kreis 3 umfasst die Fovea 1,5 mm mit zentraler Grube, Kreis 1 Foveola

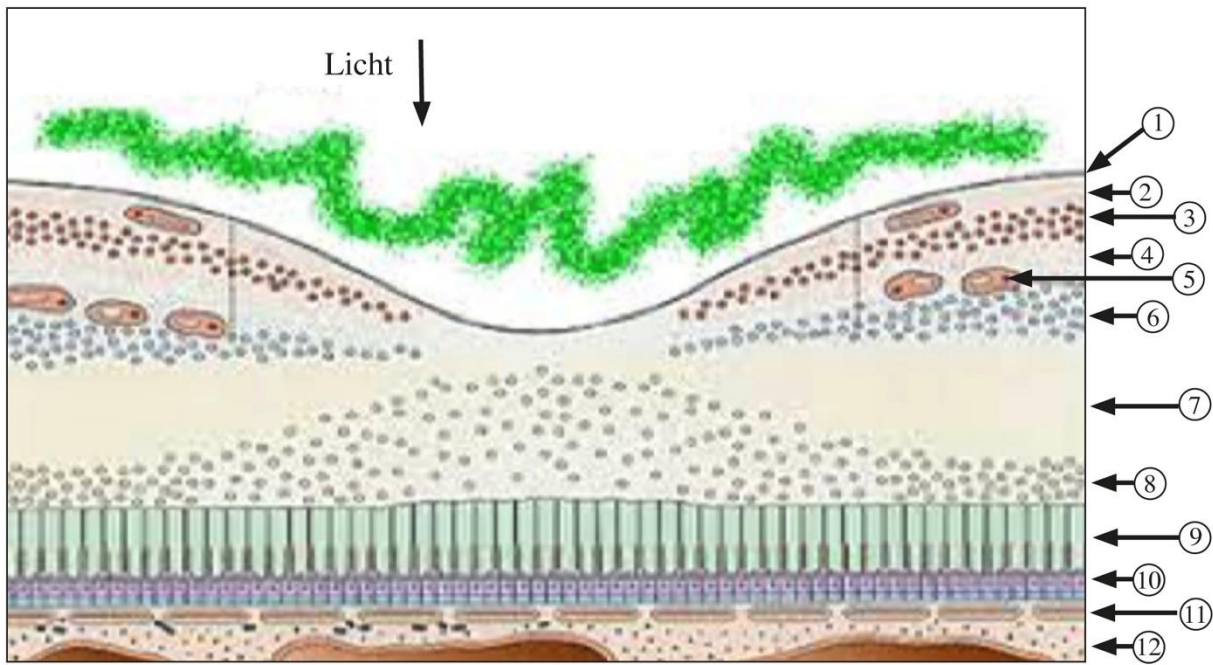
Durch die Hornhaut und die Linse wird das Licht auf die Makula, insbesondere in deren Zentrum, der Fovea, gebündelt. Sie ist eine hoch-komplexe neuronale Einheit mit der

höchsten Konzentration an hochdifferierten Photorezeptoren (Zäpfchen), welche für unser Farbsehen und die hohe visuelle Auflösung verantwortlich sind. Nur durch eine gut funktionierende Fovea ist für uns im Alltag das Lesen und das Erkennen von Gesichtern möglich. <sup>28</sup> Da es sich um ein sehr kleines Areal handelt, können bereits kleinste Veränderungen in diesem Bereich zu einem schwerwiegenden Sehverlust führen. Zur äußeren Makula hin nimmt die Dichte von Zäpfchen schnell ab und wird, wie in der Netzhautperipherie auch, von einer anderen Photorezeptorart (Stäbchen) dominiert.

### 1.1.1 Retinale Schichten

Um die hohe Auflösung der Makula zu gewährleisten, ist in der Fovea jedes Zäpfchen mit jeweils einer Ganglienzelle verschaltet (1:1 Verschaltung), was die hohe räumliche Auflösung garantiert. Die hohe Konzentration von Ganglienzellen im Foveabereich führt zur Ausbildung der Sehgrube, die durch die hohe Dichte an Ganglienzellen kaum Müller-Stützzellen und keine Blutgefäße enthält. Sie ist ein wichtiger Orientierungspunkt in der klinischen Bildgebung, da diese foveale Senke gut wiederzuerkennen ist. In der äußeren Makula und der peripheren Netzhaut sind die Stäbchen zu rezeptiven Feldern verschaltet, was die Dichte der Ganglienzellen und damit das Auflösungsvermögen deutlich reduziert. Zudem enthält die Netzhaut mehr Stützgewebe und retinale Gefäße.

Die Versorgung der inneren 2/3 der Netzhaut wird durch retinale Gefäße gewährleistet. Das äußere 1/3 der Netzhaut wird über das retinale Pigmentepithel und die Choriocapillaris versorgt.



**Abb. 2:** Querschnitt durch die Fovea

1. Membrana limitans interna, 2. Nervenfaserschicht; 3. Ganglienzellschicht; 4. innere plexiforme Schicht; 5. Netzhautkapillaren; 6. innere Körnerschicht; 7. äußere plexiforme (Henle) Schicht; 8. äußere Körnerschicht; 9. Photorezeptoren (Zäpfchen); 10. RPE; 11. Bruch-Membran; 12. Choriokapillaris <sup>28</sup>

In Höhe des Übergangs zwischen Außen- und Innensegmenten der Photorezeptoren liegt die Membrana limitans externa (Abb. 2). Hierbei handelt es sich nicht um eine herkömmliche Membran, sondern um eine Lage verbindender Komplexe (zonulae adherentes), meist zwischen den inneren Segmenten der Photorezeptoren und dem Müller-Zellenstützkomplex. Klinisch kann eine Kompromittierung der Membrana limitans externa als Hinweis auf eine Funktionseinschränkung der Photorezeptoren in diesem Bereich hindeuten.

### 1.1.2 Das retinale Pigmentepithel

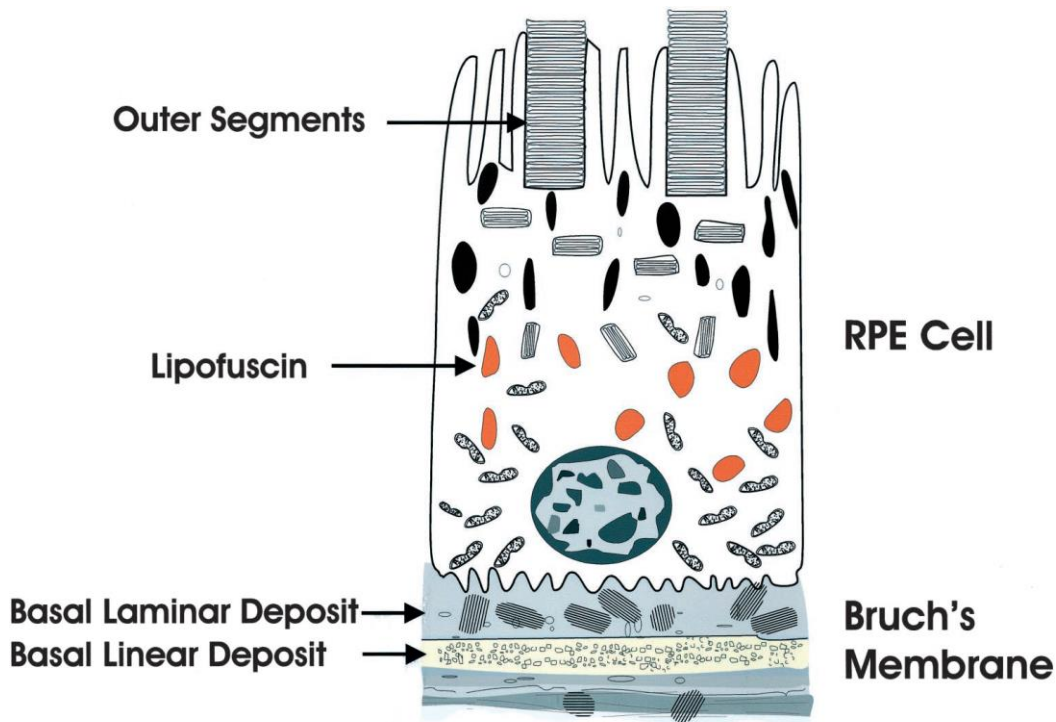
Das RPE ist eine einreihige Schicht hexagonaler Zellen, welche auf vielfältige Weise für die Funktion der Photorezeptoren essentiell ist. Die RPE-Zellen bilden durch zonulae occludentes (tight junctions) die äußere Blut-Retina-Schranke und pumpen aktiv Ionen und Wasser aus dem subretinalen Raum (Raum zwischen dem RPE und



sensorischer Retina). Das RPE phagozytiert zudem regelmäßig abgestoßene Photorezeptoraußensegmente und sorgt im Normalfall für einen gut-regulierten Abtransport von Metaboliten zur Choriocapillaris, einem spezialisierten Gefäßplexus der Aderhaut (Choroidea).

Zudem reguliert das RPE das Angebot von ausreichend Nährstoffen aus der Choriocapillaris oder durch aktives Recycling von Vitamin-A-Derivaten aus den phagozytierten Photorezeptorsegmenten. Die mit Sehfärbstoff besetzten Membranscheibchen der Photorezeptoren unterliegen einem ständigen Erneuerungsprozess. Pro Tag werden ca. 100 Membranscheibchen eines Photorezeptors abgestoßen und von den darunterliegenden RPE-Zellen phagozytiert. Innerhalb eines Zeitraums von zwei Wochen werden die Außensegmente der Photorezeptoren vollständig erneuert. Die aufgenommenen Membranscheibchen werden zu Phagosomen inkapsuliert, die dann mit enzymangereicherten Lysosomen verschmelzen und verdaut werden. Die essentiellen Fettsäuren sowie das Vitamin A werden zur erneuten Membransynthese zur Verfügung gestellt. Die Stoffwechselendprodukte werden an die Choriocapillaris abgegeben. Es können jedoch nicht alle anfallenden Abfallprodukte restlos aus der Pigmentepithelzelle abgeführt werden, so dass über Jahre hinweg eine zunehmende Anreicherung von Lipofuszin (finale Abbauprodukte) zu beobachten ist.<sup>85</sup>

Dies kann gegebenenfalls zu einer Überfrachtung der RPE-Zellen mit Lipofuszingranula führen und die Stoffwechselprozesse der RPE-Zellen einschränken. Zudem kommt es mit zunehmendem Alter zu basalen Ablagerungen, die den Stofftransport des RPE über die Bruch-Membran zur Choriocapillaris deutlich einschränken kann. Hierzu zählen kollagenreiche Ablagerungen zwischen basalem RPE-Plasma und der RPE-Basallamina, den sogenannten basal lamina deposits (BlamD), und lipidreiche Ablagerungen außerhalb der RPE-Basallamina, den basal linear deposits (BlinD)<sup>31</sup> (Abb. 3).



**Abb. 3:** Schema gealterte RPE-Zelle (RPE cell). RPE-Zellen stehen in Kontakt mit den Photorezeptoraußensegmenten (outer segments). Als natürlicher Alterungsprozess lagert sich zunehmend Lipofuszin in der RPE-Zelle ab. Zusätzlich kommt es zu kollagen- und lipidreichen basalen Ablagerungen (basal laminar/linear deposits).<sup>30</sup>

### 1.1.3 Die Bruch-Membran

Die Bruch-Membran ist für die Pathogenese vieler Makulaerkrankungen relevant. Die Bruch-Membran grenzt zum Augeninernen an das RPE und nach außen an die Choriocapillaris. Die Membran hat eine fünfschichtige Struktur und besteht aus der Basallamina der RPE-Zellen, einer inneren Kollagenschicht, einer zentralen Schicht elastischer Fasern, der äußeren Kollagenschicht und der Basallamina der Gefäßendothelzellen der Choriocapillaris.<sup>21</sup> Obwohl die Bruch-Membran das umgebende Gewebe strukturell unterstützt, besitzt sie auch eine hohe Ionen-Leitfähigkeit und lässt Sauerstoff neben Makromolekülen (in einer Größe von 65-75 kDa) von der Choriocapillaris in das RPE passieren.

Anders als das RPE durchläuft die Bruch-Membran einen stetigen Wandel während des Lebens mit altersabhängigen Veränderungen, die vor allem in ihrem kollagenen Anteil auftreten. So nimmt zum Beispiel die Löslichkeit des Kollagens der Bruch-

Membran wahrscheinlich durch Quervernetzung der Kollagenkomponenten zwischen Geburt und 90. Lebensjahr um 50% ab. <sup>14,17,19,32,39</sup>

Während die RPE-Zellen nur einen aktiven Membrantransport zulassen, sind die Gefäßendothelien der Choriokapillaris fenestriert und lassen einen freien Transport per Diffusion zu. Substanzen können frei durch die junge Bruch-Membran diffundieren, wodurch die Versorgung von RPE-Zellen und Photorezeptoren im Überfluss gewährleistet wird. Da die RPE-Zellen im Laufe des Lebens Metabolite über die Bruch-Membran in die Choriokapillare abgeben und diese nicht immer komplett abtransportiert werden, kann es zu einer Dickenzunahme der Bruch-Membran mit Umstrukturierung des kollagenen und elastischen Fasergerüsts kommen. Zusätzlich vermindert die Akkumulation lipophiler Substanzen die Diffusionsfähigkeit. <sup>21</sup> Histologisch kann eine Akkumulation von Material an der Basis der RPE-Zellen zur Bildung von BlamD und BlinD führen. <sup>32,37</sup> Die Formierung von Drusen ist ein weiterer Schritt dieses degenerativen Prozesses. <sup>14</sup> Dabei werden diese sub-RPE-Ablagerungen fokal massiv angehäuft und stören den Metabolitenaustausch zusätzlich.

## **1.2 Die altersbedingte Makuladegeneration**

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist in den Industrienationen der häufigste Grund für eine schwerwiegende Visusminderung und Erblindung im Sinne des Gesetzes bei Patienten über 60 Jahren. <sup>44,71,74,76</sup> Häufig ist nur isoliert die Makula betroffen, und das erhöhte Lebensalter stellt den Hauptrisikofaktor dar.

Man unterscheidet verschiedene Verlaufsformen. Grundsätzlich werden Frühformen und fortgeschrittene Stadien unterschieden. <sup>27</sup>

Zu den Frühformen zählen Pigmentverschiebungen des RPE und der Nachweis von vereinzelt Drusen, klinisch häufig sichtbare lipidreiche fokale Ansammlungen im Extrazellularraum zwischen dem RPE und der Bruchmembran. Man unterscheidet im Allgemeinen kleine, scharf begrenzte harte Drusen mit einem geringen AMD-Progressionsrisiko und größere, teils konfluierende weiche Drusen. Letztere gelten als wichtiger prognostischer Marker. Lassen sich größere und zahlreiche weiche Drusen

nachweisen, spricht man bereits von einem Intermediärstadium der AMD. Der Visus ist bei all diesen Veränderungen meistens noch gut bzw. nur mäßig eingeschränkt. Eine sinnvolle Therapieoption oder Prophylaxe besteht bei diesen Veränderungen nicht.

Fortgeschrittene AMD-Stadien können zu einer schwerwiegenden und irreversiblen Visusminderung führen. Man unterscheidet die feuchte und die trockene fortgeschrittene AMD.

Die feuchte altersbedingte Makuladegeneration ist durch das Einwachsen von choroidalen Neovaskularisationen (CNV) in den subretinalen Raum gekennzeichnet. Diese pathologischen Gefäße zeigen eine deutliche Leckage und Blutungsneigung mit konsekutiver Fibrosierung und können so in kurzer Zeit das Sehen dauerhaft reduzieren.<sup>98</sup> In den letzten Jahren hat sich aber eine wirkungsvolle Therapie durch die intravitreale Gabe von VEGF-Inhibitoren etablieren können. Die intravitreale Blockade des VEGF führt zur spezifischen Hemmung des CNV-Wachstums, wirkt antiödematös bzw. permeabilitätsmindernd, reduziert Makulaödeme und es kommt häufig zu einem Anstieg der Sehschärfe. Relevant für eine Behandlung sind heute drei Medikamente, die zwei zugelassenen Präparate Lucentis® (Ranibizumab) und Eylea® (Aflibercept) sowie als off-label-Variante Avastin® (Bevacizumab).

Bei der trockenen fortgeschrittenen AMD kommt es zur fokalen Atrophie des RPE mit konsekutiver Degeneration der Photorezeptoren. Da in der vorliegenden Studie der Fokus auf dieser AMD-Form liegt, die nach dem klinischen Erscheinungsbild auch geographische Atrophie genannt wird, wird im nächsten Abschnitt detaillierter auf diese AMD-Form eingegangen.

### 1.2.1 Die geographische Atrophie

Die GA gehört zu einer nicht exsudativen, trockenen Spätmanifestationsform der AMD. Dabei geht es um eine sehr langsam progrediente Erkrankung, welche zur scharf abgegrenzten Atrophie des RPE mit der korrespondierenden Choriokapillaris und der neurosensorischen Netzhaut führt (Abb. 4). Es kommt zu einer sehr langsamen aber irreversiblen Visusminderung und im Endstadium zu einem absoluten zentralen Skotom mit schwerem Visusverlust.<sup>44,46,47</sup>



**Abb. 4:** Fundus-Bild eines 68-jährigen Patienten mit geographischer Atrophie (Einblick durch Katarakt eingeschränkt). Die schwarzen Blockfeile zeigen den scharf begrenzten, aber unregelmäßigen Rand der RPE-Atrophie-Zone, die heller als das umgebene Gewebe durch den Verlust der pigmentierten Zellen wirkt.

#### 1.2.1.1 Epidemiologie

Die geographische Atrophie als eines der beiden Endstadien der AMD ist weitaus häufiger als die exsudative AMD. Die 10-Jahres-Inzidenz beträgt bei > 60-jährigen etwa 1,7%, Männer und Frauen sind etwa gleich häufig betroffen.<sup>33</sup>

Das Risiko, innerhalb von 10 Jahren eine GA zu bekommen beträgt – betrachtet man die drei wichtigsten Populations-Studien auf diesem Gebiet (Beaver Dam, Blue Mountains, Rotterdam) – bei den 55-bis 64-jährigen 0,04% und steigt altersabhängig auf 4,2% bei der Gruppe der mindestens 85 Jahre alten Menschen.<sup>34,57,99</sup>

Die Prävalenz steigt ähnlich der Frühform der Erkrankung und bei Drusen ebenso mit zunehmenden Alter stark an. Für die GA wurde in einer europaweiten Studie<sup>34,35,36</sup>

eine Prävalenz von 1,2% bei den > 65 Jahre alten Menschen mit einer deutlich größeren Zahl an betroffenen Frauen (1,45% zu 0,89%) ermittelt.

#### 1.2.1.2 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie der GA ist geprägt durch die Ansammlung von lipidreichen Stoffwechselprodukten auf dem Niveau der Bruch-Membran.<sup>39</sup> Dies führt zu Diffusionsstörungen zwischen dem RPE und der Choriocapillaris mit ausgeprägtem konsekutivem oxidativen Stress des RPE und der Photorezeptoren. Es kommt zu einer schrittweisen Degeneration dieser Strukturen, an deren Ende die Apoptose dieser Zellen steht. Dies ist mit einer dauerhaften Funktionseinschränkung der Netzhaut vergesellschaftet.<sup>100</sup> Die apoptotischen Untergänge von Photorezeptoren und RPE-Zellen im Rahmen der AMD sind multifaktorielle degenerative Prozesse.

Die GA besteht nicht nur aus Arealen mit vollständigem Verlust der Photorezeptoren und RPE-Zellen, sondern es kommt auch zur Atrophie der korrespondierenden Choriokapillarisschichten mit chorioidaler Gefäßengstellung.<sup>38</sup> Anfangs können sich mehrere isolierte kleine Atrophie-Areale entwickeln, die im Verlauf eine langsame Größenzunahme zeigen und dann konfluieren können. Drusen und deutliche Pigmentunregelmäßigkeiten des RPE sind häufig in Augen mit GA als Vorstufe zu finden.

Histologisch ist diese Randzone dadurch gekennzeichnet, dass hier degenerative hypertrophierte RPE-Zellen neben kleinen atrophen Zellen zu finden sind.<sup>23</sup> Der einschichtige Aufbau ist verlorengegangen und die RPE-Zellen lösen sich aus dem Zellverband und beginnen zu migrieren. Es kommt zu einem unregelmäßigen, mehrschichtigen RPE.

Von klinischer Seite sind gerade die Randbereiche der RPE-Atrophie interessant, da hier schon degenerativ veränderte Zellen vorliegen, diese aber noch weitgehend vital sind. Diese zu detektieren kann ggf. erlauben, die Prognose der Erkrankung für den Patienten besser abzuschätzen und langfristig eine Therapie zu entwickeln, die auf Erhaltung dieser RPE-Zellen abzielt.<sup>41</sup>

### 1.2.1.3 Risikofaktoren

Eine Kombination verschiedener Risikofaktoren spielt bei der geographischen Atrophie wahrscheinlich eine Rolle. Umweltfaktoren und Genetik zusammengefasst mit zunehmendem Alter und Rauchen sind die Hauptrisikofaktoren.<sup>47</sup>

Vor allem sind noch nicht alle genetischen Einflussfaktoren bekannt.<sup>42</sup> Eine molekulargenetische Untersuchung spielte bis jetzt jedoch noch keine Rolle, da sie auf den Verlauf und die Behandlung keinen Einfluss hat.

Es bestehen Hinweise auf Störungen im Lipidstoffwechsel im Zusammenhang mit Apolipoprotein E (ApoE), die auch eine Verbindung mit anderen neurodegenerativen Krankheiten, z.B. Morbus Alzheimer, vermuten lassen. Es besteht ein signifikanter Zusammenhang der Polymorphismen für den Complement-Faktor H (CFH-Y402H) (ein Regulator lokaler Entzündungen) und ARMS2-A69S mit der Progression von der AMD-Frühform zur GA.<sup>43, 44, 45, 50</sup>

Das Rauchen ist ein wesentlicher, vermeidbarer Risikofaktor für die Entwicklung der Spätstadien einer AMD und auch des Body-Maß-Index. Das Risiko der Progression der früheren AMD sinkt durch die Einnahme von Docosahexaensäure (z.B. in Fisch), einer Ernährung mit grünblättrigem Gemüse und einer Diät mit niedrigem glykämischen Index.<sup>76,98</sup>

### 1.2.1.4 Therapeutische Optionen

Derzeit gibt es keine gesicherte kausale oder allgemein anerkannte therapeutische Option für die GA. Aktuell kann man Patienten mit GA nur Nahrungsergänzungsmittel, eine regelmäßige ophthalmologische Verlaufskontrolle zum Ausschluss von feuchten Veränderungen und teilweise Lebensstilveränderungen zur Reduktion von Risikofaktoren empfehlen. Bei fortgeschrittener Visusminderung ist die Anpassung vergrößernder Sehhilfen sinnvoll.

Nach der ARED-Studie ist eine prophylaktische Einnahme von Antioxidantien, Zink und Kupfer bei geographischer Atrophie sinnvoll, dabei sollte bei aktiven oder ehemaligen Rauchern B-Karotin durch Lutein und Zeaxanthin ersetzt werden, um ein erhöhtes

Malignomrisiko zu vermeiden.<sup>2</sup> Es zeigte sich in der ARED-Studie I und II ein positiver Populationseffekt, der individuelle Nutzen ist jedoch schwer nachweisbar.<sup>51</sup>

Da die fortgeschrittene geographische Atrophie einen schwerwiegenden Sehverlust bedeutet, wird mit Hochdruck an neuen Therapien geforscht. In den letzten Jahren wurden ca. 30 Phase-I-Studien durchgeführt.<sup>52</sup>

Vielversprechende Therapeutika (z.B. Lampalizumab) konnten letztendlich bisher in Phase III-Studien keinen ausreichenden Benefit für GA-Patienten belegen.<sup>1</sup> Einen ersten positiven Effekt der vorläufigen Auswertung der aktuellen Studien zeigte die orale Gabe von Fenretinid zur Reduktion der A2E-Akkumulation im RPE, die intravitreale Applikation von einer Einheit mit encapselled cell technology für die Freisetzung von CNTF (Ciliary neurotrophic Factor) sowie die lokale Applikation der antioxidativen Substanz OT-551, insbesondere in frühen Stadien der geographischen Atrophie.<sup>52</sup> Sollten sich hieraus in Zukunft allgemein anerkannte Behandlungsoptionen ergeben, ist es umso wichtiger, die Veränderungen der GA mittels moderner hochauflösender Bildgebung zu dokumentieren, evaluieren und zu verstehen.<sup>2,3</sup>

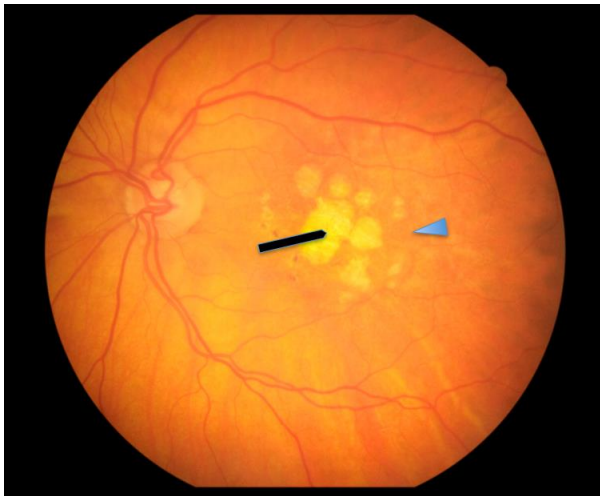
## 1.2.2 Klinische Diagnostik

### 1.2.2.1 Ophthalmoskopie und Fundusphotographie

Die Diagnose selbst kann man relativ leicht ophthalmoskopisch feststellen. Die Ränder der geographischen Atrophie können meistens durch Pigmentierung verstärkt auffallen und die Atrophieareale fallen häufig im Kontrast zum umgebenen Gewebe als helle, scharf begrenzte Areale auf (Abb. 5).

Da die Veränderungen nur sehr langsam ablaufen, ist eine gute Befunddokumentation notwendig, um auch kleine Veränderungen erkennen zu können. Hier eignen sich, wie im Weiteren aufgeführt, die Fundusphotographie, die Fundusautofluoreszenzaufnahmen sowie die optische Kohärenztomographie (OCT).<sup>4</sup>





**Abb. 5:** Zentraler Fundus eines linken Auges mit geographischer Atrophie. (Schwarzer Pfeil zeigt zentral konfluierende Areale der Atrophiezone, blauer Blockpfeil zeigt unregelmäßige Randzone der GA mit beginnendem Verlust der RPE peripher der gesamten Atrophiezone).

Die Fundusphotographie und rotfreie Fotografie eignen sich bedingt zur Verlaufsdokumentation von lokalen Veränderungen. Besonders bei hellhäutigen Patienten mit heller Funduspigmentierung kann die Größe der geographischen Atrophieareale leicht unterschätzt werden und minimale Veränderungen übersehen werden.<sup>4,46</sup> Hier zeigt sich die Fundusautofluoreszenz, wie im nächsten Kapitel dargestellt, der einfachen Fundusphotographie überlegen.<sup>45,47</sup>

#### 1.2.2.2 Fundusautofluoreszenz

Die Fundusautofluoreszenz (Fd-AF) ist die Methode der Wahl zur Früherkennung kleiner Areale von geographischer Atrophie und zur Verlaufskontrolle der Fundusphotographie oder der Fluoreszenzangiographie (Abb. 6). Dies wurde in der FAM-Studie geprüft, der größten Studie zum natürlichen Verlauf der GA und Fd-AF.<sup>46</sup>

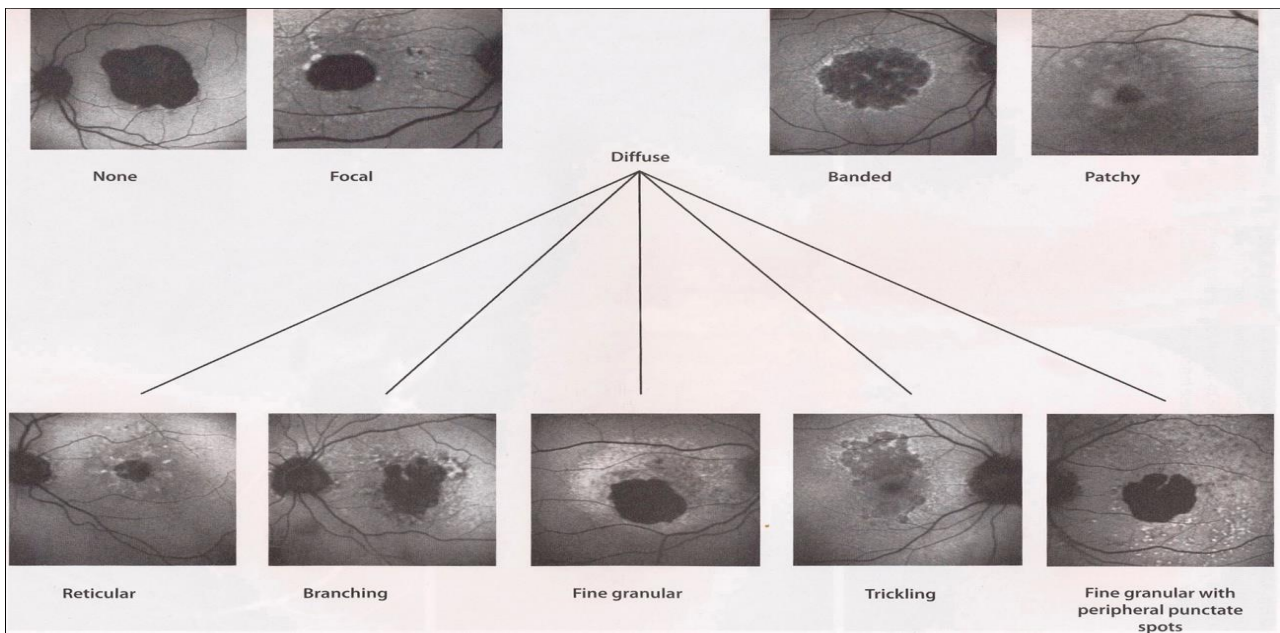
Von besonderer Bedeutung ist die Beurteilung der Randzone der geographischen Atrophie, weil sich in der Randzone der geographischen Atrophie verschiedene Fluoreszenzmuster beobachten lassen (Abb. 7). Diese weisen auf ein unterschiedliches Progressionsrisiko hin.<sup>2</sup>



**Abb. 6:** Fundusautofluoreszenz (Fd-AF) linkes Auge- (HRA), schwarze Blockpfeile zeigen auf scharf begrenzte fleckförmige hypofluoreszente Atrophiezone (GA); blauer Pfeil - auf höhere Autofluoreszenz (AF) im Randbereich der GA. Patient, 76 Jahre alt.

In der Randzone kann die Fd-AF normal oder erhöht sein. Die Fd-AF-Veränderungen wurden initial von Holz et al. 1999/2001 klassifiziert und im Verlauf von Bindewald et al. 2005 und anschließend von Holz et al. 2007 modifiziert. <sup>18,44,46,48</sup>

Laut Geographic Atrophy Progressions-Studie war die mittlere Änderung der Läsionsgröße von Baseline zum Monat 12 signifikant größer in Augen mit multifokalen atrophischen Arealen im Vergleich zu Augen mit nur unifokalen Läsionen. <sup>44,46</sup> Zudem zeigten extrafoveale Läsionen eine schnellere Progression als foveale Läsionen. Interessanterweise zeigte sich keine Korrelation zwischen der Sehschärfe und der Lokalisation der geographischen Atrophie, der Läsionsgröße und der Läsionsprogressionsrate. Die Analyse unterschiedlicher Fundusautofluoreszenz-Phänotypen zeigte eine schnellere Progression in Augen mit "diffusem" oder "bandförmigem" Fundusautofluoreszenz-Muster im Vergleich zu Augen mit keinem bzw. fokalem "Fundusautofluoreszenzmuster (Abb. 7). <sup>26</sup>



**Abb. 7:** Klassifikation der Fundusautofluoreszenz bei geographischer Atrophie nach Dithmar et al. und Holz et al. <sup>16</sup>

Nach der AREDS-Studie 26, sowie den Studien von Sunness et al. spielt die Beurteilung der Progression der GA eine wesentliche klinische Bedeutung, da die Progressionsrate pro Jahr zwischen den Patienten stark variiert (ca. von 0,4 bis 3,0mm<sup>2</sup>/Jahr). <sup>15,17-25,27</sup>

Die langsame Progression zeigte sich bei none (ohne erhöhte Fd-AF in der Randzone und am hinteren Pol) ca. 0,02 mm<sup>2</sup>/Jahr bis 0,38 mm<sup>2</sup>/Jahr, und bei focally increased pattern (einzelne oder mehrere isolierte Flecken erhöhter Fd-AF in der Randzone) ca. 0,81 mm<sup>2</sup>/J. Entsprechend einer raschen Progression - bei banded (weitgehend kontinuierlich erhöhte Fd-AF in der Randzone (rasche Progression) ca. 1,81 mm<sup>2</sup>/Jahr und bei patchy pattern (diffus erhöhte Fd-AF in der Randzone und darüber hinaus) ca. 1,77 mm<sup>2</sup>/Jahr. Eine schnelle Progression zeigten reticular pattern (erhöhte Fd-AF mit vorwiegend radiärer Orientierung) ca. 1,67 mm<sup>2</sup>/Jahr und besonders "tropfenweise" nach peripher fortschreitend trickling bis ca. 3,02 mm<sup>2</sup>/Jahr. <sup>15,17-25</sup>

Die Fd-AF ist ein nicht invasives Verfahren zur Untersuchung der Integrität der RPE-Zellschicht für die frühzeitige Darstellung von Krankheitsprozessen im Photorezeptor-RPE-Komplex.

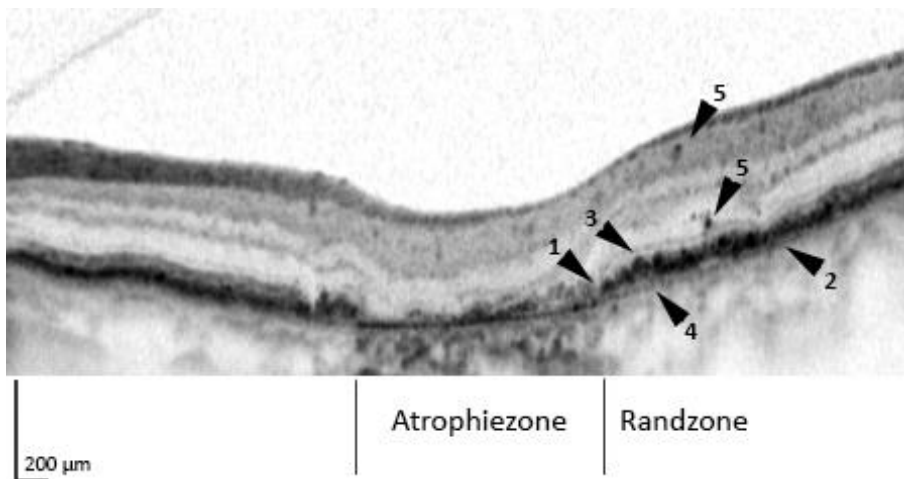
Am Augenhintergrund gibt es zahlreiche Substanzen (Fluorophore) mit unterschiedlich ausgeprägten autofluoreszenten Eigenschaften. Die beiden wesentlichen sind Lipofuszin, dargestellt mit der Fd-AF, und Melanin, dargestellt mit der Nahinfrarot-Autofluoreszenz. Lipofuszin zeigt die Autofluoreszenz bei Anregung mit blauem Licht bei einer Wellenlänge von 480-510 nm (Emissionsmaximum bei 600-640 nm).<sup>47,48</sup> Die Darstellung der Fd-AF in vivo erfolgt am besten mit einem konfokalen Scanning-Laser-Ophthalmoskop (z.B. Spectralis-HRA, Heidelberg Engineering, Heidelberg). Die Exzitation erfolgt mit einem blauen Laser (Wellenlänge 488 nm), die Messung des emittierten Lichts mit einem Sperrfilter (Wellenlänge  $\leq$  500 nm).<sup>47</sup>

Lipofuszin entsteht aus verschiedenen finalen Abbauprodukten der Phagozytose der Photorezeptoraußensegmente in den Lysosomen der RPE-Zellen und wird in Lipofuszingranula bereits ab 6 Monate und dann lebenslang an der Basis der RPE-Zellen eingelagert. Fluoreszenztechnisch ist A2E (N-Retinyl-N-Retinyliden-Ethanolamin) der wichtigste Bestandteil, der verschiedene schädigende Eigenschaften (u.a. Störung der Integrität von zellulären Membranen, Hemmung lysosomaler Prozesse, phototoxische Induktion von Apoptose, DANN-Schädigung) hat.<sup>55,57</sup>

### 1.2.2.3 Optische Kohärenztomographie (OCT)

Die optische Kohärenztomographie (OCT) stellt ein Abbildungsverfahren dar, das anhand von Reflektionen von Lichtwellen In-vivo-Schnittbilder von Gewebe liefert. Das heute am häufigsten verwandte Verfahren ist die Spectral-Domain OCT (SD-OCT). Sie ist nichtinvasiv, hochauflösend und erlaubt der Beurteilung der Netzhaut, insbesondere ist sie von Bedeutung für die Beurteilung der Makulaerkrankungen.

Die SD-OCT generiert Darstellungen des Gewebes basierend auf der Intensität des reflektierten Lichtes. Unterschiedliche Graustufen korrespondieren mit einem unterschiedlichen Grad der Reflektivität des Gewebes. So können die einzelnen Netzhautschichten besser unterschieden werden.<sup>47</sup>



**Abb. 8:** Beispiel einer SD-OCT einer geographischen Atrophie bei AMD. Klinisches Beispiel einer GA in der SD-OCT (Spectralis, Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg) eines 85-jährigen Patienten. Zentral ist die RPE-Atrophiezone dargestellt, die mit der Atrophie der äußeren Netzhautschichten einhergeht. Die RPE-Randzone zeigt insbesondere auf der linken Seite deutliche Auffälligkeiten. Vom *Pfeil 1*, dem direkten Übergang des RPE in die Atrophie, bis zu *Pfeil 2* zeigt sich das RPE deutlich hyperreflektiv, verdickt und unregelmäßig (*Pfeil 3*). Nahe der Atrophiezone zeigt sich zusätzlich weniger reflektives Material unter dem RPE, wodurch in diesem Bereich die Bruch-Membran (*Pfeil 4*) zu erkennen ist. In der Netzhaut zeigen sich 2 hyperreflektive Foci (*Pfeil 5*). Im Kontrast dazu zeigt das RPE auf der linken Seite der Atrophiezone nur Unregelmäßigkeiten unmittelbar am Atrophierand und sonst ein relativ gleichmäßiges und damit regelrechtes RPE-Signal. <sup>97</sup>

Bei der geographischen Atrophie zeigt sich im betroffenen Areal eine Verdünnung der neurosensorischen Netzhaut und aufgrund der Atrophie des RPE ein deutlicher Reflektivitätsverlust des RPE mit bester Darstellung der Aderhaut, mit scharfer Begrenzung zwischen der normalen Netzhaut/Aderhaut und dem Areal der geographischen Atrophie und unterschiedlichen Randzonen der fortgeschrittenen RPE-Degeneration als Unregelmäßigkeit im RPE-Choriokapillaris-Komplex (Abb. 8). <sup>48</sup> Bereits früh zeigen sich auch in der SD-OCT spezifische Veränderungen im Randbereich der Atrophiezone, die auf eine Umstrukturierung und Unregelmäßigkeiten auf RPE-Höhe hinweisen. <sup>4</sup> Häufig zeigen sich eine Verbreiterung des RPE-Signals sowie eine Erhöhung der Reflektivität. <sup>5,6</sup> Zudem sind nahe des Atrophierandes mitunter hyperreflektive Foci isoliert vom RPE-Hauptsignal in der Retina darzustellen, die am häufigsten in der Photorezeptorschicht zu finden sind, aber auch in anderen Netzhautschichten. <sup>7,8</sup> Diesbezüglich liegen auch histologische Studien vor, die charakteristische Veränderungen auf RPE-Niveau im Randbereich der RPE-

Atrophiezone beschreiben, welche die genannten SD-OCT-Veränderungen teilweise erklären können. <sup>5-7</sup>

## **2. Fragestellung**

In histologischen chorioretinalen Schnitten von 7 menschlichen Hornhautspenderaugen mit nachgewiesener geographischer Atrophie (GA) bei AMD sollten RPE-Veränderungen im GA-Randbereich dokumentiert, klassifiziert und ausgemessen werden, sowie deren Autofluoreszenz ausgewertet werden.

Die Bildaufnahmen und die Parameter bei den Ausmessungen sollten sich an aktuellen Standards der klinischen Bildgebung orientieren, damit die generierten Daten zur Interpretation von SD-OCT und Fd-AF herangezogen werden können.

### **A. Morphometrie des RPE in der GA-Randzone**

Nach Klassifikation der degenerativen RPE-Veränderungen sollte das RPE in jedem Degenerationsgrad senkrecht zur Bruch-Membran ausgemessen werden. Die zentralen Messgrößen waren: 1) die Höhe der gesamten RPE-Schicht, die bei fortgeschrittener Degeneration auch aus mehreren RPE-Zellen bestehen konnte, 2) die Höhe einzelner RPE-Zellen sowie 3) die Höhe der basalen Ablagerungen. Mit diesen Daten sollte die Frage beantwortet werden, ab welchem Degenerationsgrad RPE-Veränderungen in der klinischen SD-OCT wahrscheinlich auffallen.

### **B. Autofluoreszenz einzelner RPE-Zellen in der GA-Randzone**

Nach Klassifikation der degenerativen Veränderungen sollte die Autofluoreszenz einzelner repräsentativer RPE-Zellen in jedem Degenerationsgrad ausgemessen werden. Die Bestimmung der Summen-Autofluoreszenz und durchschnittlichen Autofluoreszenz pro gemessener RPE-Zelle könnte klären, ob sich hierdurch Rückschlüsse auf die Fluoreszenzintensitäten in der klinischen Fd-AF ableiten lassen. Mit diesen Daten sollte die Frage beantwortet werden, ab welchem Degenerationsgrad RPE-Veränderungen einzelner Zellen oder kleiner Zellverbände in der klinischen Fd-AF auffallen könnten.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Spendermaterial**

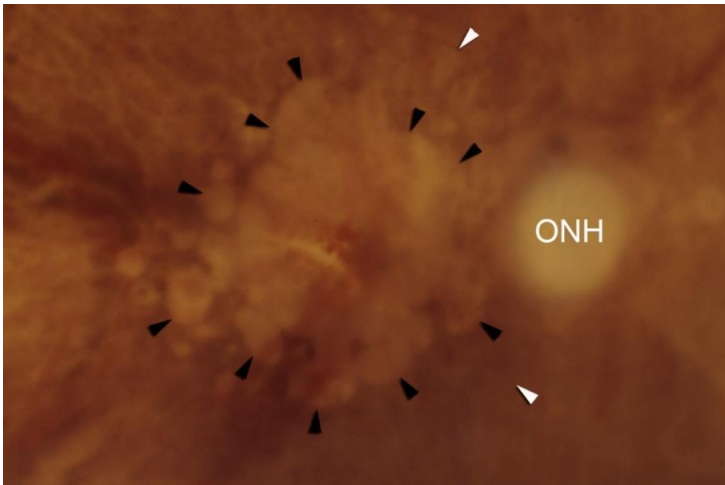
Die vorliegende Studie ist Teil eines internationalen Forschungsprojektes unter Leitung von Prof. Dr. Christine A. Curcio und Prof. Dr. Russell W. Read von der University of Alabama at Birmingham, USA in Kooperation mit Prof. Dr. M. Rudolf, translationale AMD-Forschungsgruppe Lübeck, Universität zu Lübeck.<sup>5-7</sup>

Die Studie wurde entsprechend der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Die Entnahme von humanem Spendermaterial zur wissenschaftlichen histologischen Untersuchung wurde der Ethik-Kommission der University of Alabama at Birmingham, AL, USA unter Protokoll-Nr. X04061500, vorgelegt und genehmigt. Für diese Studie wurden 10 Hornhautspenderaugen älterer Spender mit nachgewiesener geographischer Atrophie durch die Alabama Eye Bank zur Verfügung gestellt (Abb. 9). Alle Spender waren hellhäutig (kaukasischer Hauttyp). Es handelte sich um ein sehr besonderes Untersuchungsgut, da innerhalb von 6 Stunden die Entfernung der Hornhaut für Transplantationszwecke erfolgte und das restliche Gewebe umgehend in 4 % Paraformaldehyd fixiert wurde. Diese kurzfristige Fixierung garantierte eine Reduktion von post mortem-Artefakten.

Für die Morphometrie des RPE wurden nur Augen untersucht, deren GA nicht die großen Gefäßbögen überschritt (7 von 10 Augen). Das Spenderalter lag zwischen 73-93 Jahre. Diese Augen zeigten eine durchschnittliche Atrophiegröße von  $7,9 \pm 2,8$  mm<sup>2</sup>. Der Atrophie-Bereich aller untersuchten Augen variierte zwischen 2,0 bis 32,0 mm<sup>2</sup> mit äquivalentem Radius 0,81-2,65 mm (mittlerer Wert  $1,69 \pm 0,55$  mm).

Drei zusätzliche Spenderaugen ohne GA (Alter  $84,0 \pm 7,2$  Jahre) dienten als Kontrollgruppe für die Autofluoreszenzanalyse.





**Abb. 9: Fundus eines Hornhautspenders mit fortgeschrittener geographischer Atrophie**

ONH= N. Optikus, die Netzhaut ist aufgrund der postmortalen Veränderungen leicht transparent, die retinalen Gefäße sind ausgedünnt und schwach durchblutet (weiße Pfeile). Die Mehrheit der großen Aderhautgefäße ist auch atrophiert, das zeigt sich im leichten Kontrast zu der umliegenden pigmentierten Choroidea. In der Mitte der zentralen landkartenartigen Atrophiezone (schwarze Pfeile) zeigt sich eine restliche Blutinsel aus Aderhautgefäßen.

**3.2 Histologische Aufarbeitung**

Die Bulbi wurden nach Entfernung der Hornhaut für Transplantationszwecke innerhalb von 6 h post mortem in 4% Paraformaldehyd über Nacht fixiert und dann in 1% Paraformaldehyd bei 4°C gelagert. <sup>53</sup>

Es erfolgte die Präparation eines Netzhaut / Sklerablocks in einer Größe von ca. 8x8 mm, der den Sehnerv und die gesamte Makula mit RPE-Atrophiezone enthielt. Für die schonende Kryofixierung der Gewebe durchliefen die Bulbi zunächst eine aufsteigende Reihe aus Saccharose-Konzentrationen. Begonnen wurde mit einer 10% Lösung für eine Stunde, gefolgt von einer 20% und 30%-Lösung für jeweils 1,5 Stunden. Im Verlauf wurden die Augen stufenweise in eine Lösung aus 30% Saccharose und Einbettmedium (Tissue Tek Cryomold, Sakura Finetek, Torrance, USA) im Verhältnis 4:1 über Nacht gegeben. Nach Platzierung der Gewebelöcke in Cryomolds folgte für jeweils 2 Stunden die Exposition in einer Saccharose/Tissue Tek Lösung von 2:1 und

1:1. In der letzten Lösung erfolgt die Kryofixierung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Bei dieser Temperatur konnten die Proben bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

Bei  $-30^{\circ}\text{C}$  wurden mit einem Mikrotom (Ultracut UCT, Leica Mikrosysteme AG, Wien, Österreich)  $10\text{-}\mu\text{m}$  dicken und ca. 8 mm lange Kryoschnitte geschnitten und jeweils 3 Schnitte auf einen Objektträger (Superfrost Plus, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) übertragen. Die fertigen Schnitte wurden für ca. 1 Stunde bei  $50^{\circ}\text{C}$  auf einer Wärmeplatte getrocknet, anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

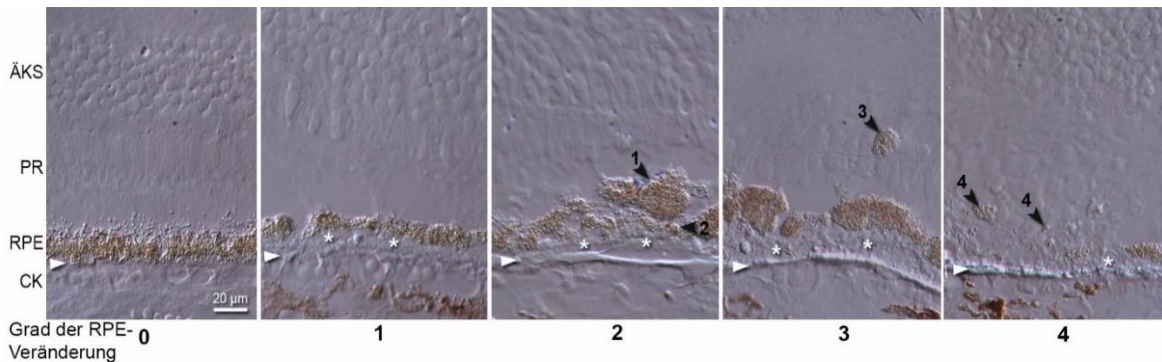
Für unsere Studie standen uns drei Makulaschnitte pro Auge zur Verfügung. Die Auswahl der Schnitte erfolgte durch einen Ophthalmopathologen (Prof. Dr. Russel Read), der die Schnitte für das jeweilige Auge als repräsentativ einstufte. Mit jedem Objektträger sollten alle wichtigen RPE-Veränderungen um die RPE-Atrophiezone erfasst werden. Der mittlere Schnitt sollte den Sehnerven enthalten.

Um durch weitere Färbeprozesse nicht die natürliche Autofluoreszenz zu beeinflussen, wurden die Makulaschnitte ungefärbt für diese Arbeit mit Eindeckmittel (Permount Mounting Medium, ProSciTech Pty Ltd, Kirwan, Australien) behandelt. Eine Qualitätskontrolle wurde an 3 Kontrollaugen ohne Pathologien durchgeführt. Die Augen wurden jeweils halbiert und eine Hälfte wurde wie die Studienaugen fixiert und eingebettet. Die zweite Hälfte wurde nicht fixiert, sondern direkt in 100% Tissue Tek gegeben und auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gefroren. Nach einem Monat wurden die beiden Hälften aufgeschnitten und deren Autofluoreszenz analysiert und verglichen. In der nichtfixierten Hälfte zeigten sich mehr Gewebe-Artefakte, als in der fixierten. Es zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied in der Messung der RPE-Autofluoreszenz in topographisch entsprechenden Bereichen zwischen beiden 2 Methoden ( $p=0,775$ ). Damit konnte eine signifikante Beeinflussung der RPE-Autofluoreszenz durch die Gewebefixierung ausgeschlossen werden.

Die Makulaschnitte wurden mittels Lichtmikroskopie (Eclipse 80i; Nikon Instruments, Melville, NY, USA) und Differenzialinterferenzkontrast (DIC) untersucht, das RPE fotodokumentiert (Retiga 4000R Fast, QImaging, Burnaby BC, Kanada) und dessen Degeneration nach unten genannten Regeln klassifiziert. Hieraus ergaben sich zusammenhängende Zonen eines Degenerationsgrades, da sich im allgemeinen eine

stetige Zunahme der RPE-Degeneration von peripherer Netzhaut hin zur Makula mit Atrophiezone zeigte.

Bevor wir das RPE oder deren basale Ablagerungen ausmessen konnten, teilten wir unsere DIC-Bilder nach einem etablierten Klassifikationssystem für RPE-Veränderungen im Rahmen einer GA in unterschiedliche Zonen ein, die bis zu 8 Degenerationsgrade beinhalten können.<sup>5-7</sup>



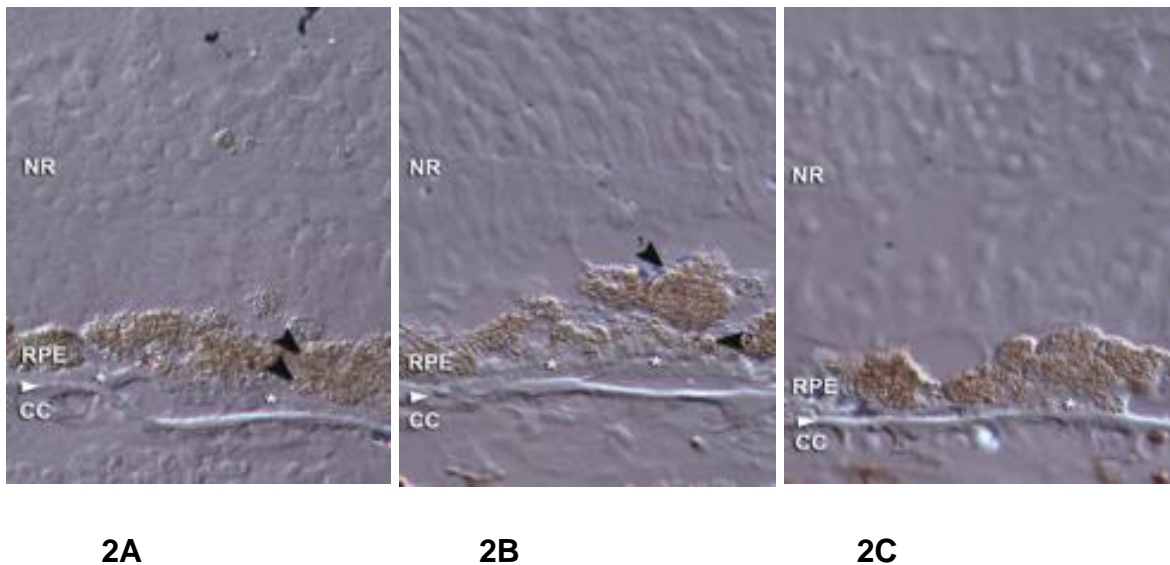
**Abb. 10: RPE-Degenerationsgrade bei Geographischer Atrophie**

0 = regelrechtes RPE, 1 = unregelmäßiges RPE, aber intakte Zellschicht, 2 = vergrößerte RPE-Zellen (Pfeil 1) neben kleinen atropnen RPE-Zellen (Pfeil 2), 3 = in Retina migrierende RPE-Zellen (Pfeil 3), 4 = eigentliche RPE-Atrophiezone, nur Zelldebris (Pfeil4), CK: Choriokapillaris, Stern\*: basale Ablagerungen, weißer Pfeil: Bruchmembran, PR: Photorezeptoren, ÄKS: äußere Körnerschicht)

Da sich eine stetige Progression der RPE-Degeneration von peripherer zur zentralen Makula hin zeigte, konnten unsere histologischen Schnitte in Zonen aufgeteilt werden, die jeweils einem der definierten Degenerationsgrade entsprach.<sup>100</sup> Dies schloss folgende morphologische RPE-Degenerationsgrade ein (Abb. 10): 0 = normale RPE-Zellen in intakter Zellschicht, 1 = unregelmäßige RPE-Zellen, aber noch intakte Zellschicht, 2 = abgerundete, hypertrophierte und/oder aufgehäuften RPE-Zellen und teilweise atrophierende Zellen, 3 = einzelne in die Neuroretina migrierende RPE-Zellen, die sich aus dem RPE-Zellverband gelöst haben 4 = Atrophiezone ohne intakte RPE-

Zellen. Auf eine weitere Unterteilung in einer reinen RPE-Atrophie mit (Grad 4) oder ohne basale Ablagerungen (Grad 5) wurde der Einfachheit wegen verzichtet.

Grad 2 wurde weiterhin nach morphologischen Gesichtspunkten in die folgenden 3 Untergruppen unterteilt (Abb. 10a): 2a = abgerundete und sich aus dem Zellverband lösende RPE-Zellen mit apikaler Verlagerung in den subretinalen Raum, 2b = pigmentierte Zellen innerhalb der basalen Ablagerungen, 2l = das RPE lag als Doppelschicht (leaflet) vor. Die Untergruppen 2a, 2b und 2l sind nur morphologisch deskriptiv und nicht als Progressionsgrade innerhalb des Degenerationsgrades 2 zu verstehen.



**Abb. 10 a: RPE-Degenerationsgrade bei Geographischer Atrophie-Untergruppen**

2A= (Apical) -2 schwarze Pfeile zeigen auf abgerundete und sich aus der Zellwand lösende RPE-Zellen mit anteriorer Verlagerung im subretinalen Raum; 2B= (Basal) pigmentierte Zellfragmente innerhalb der basal laminar deposits (basale Ablagerungen); = abgerundete, vergrößerte (Pfeil 1) RPE-Zellen neben kleinen atrophischen RPE-Zellen (Pfeil 2), teilweise aufgehäuft; 2L= (Leaflet) verdoppelte Kontur der RPE-Schicht. CC: Choriokapillaris, Stern\*: basale Ablagerungen, weißer Pfeil: Bruchmembran, NR: Neuroretina)

### **3.3 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Autofluoreszenz des RPE im Randbereich der geographischen Atrophie wurde mittels konfokaler Mikroskopie (DM IRBM, Leica Microsystems Heidelberg GmbH, Mannheim, Deutschland, Leica Software, Vers 2.6.1) unter 40-facher Vergrößerung mit Öl-Immersions-Objektiv detektiert und aufgenommen.

Die Aufnahmeeinstellungen wurden nach einer kleinen Voruntersuchungsreihe festgelegt und danach nicht mehr verändert, um die Ergebnisse der Autofluoreszenzmessungen vergleichen zu können. Die Einstellungsparameter orientieren sich zudem sehr an dem eines klinisch kohärenten Laserscanning-Ophthalmoskops (cSLO, z.B. Spectralis, Heidelberg Engineering), mit dem in der klinischen Diagnostik die Fundusautofluoreszenz gemessen wird.<sup>47</sup>

Die Exzitation lag dementsprechend bei 488 nm, die Emission bei 500-700 nm (long band). Die Laserenergie lag bei ca. ~1mW (80% Energie des Mikroskoplasers). Das Mikroskop war mit einer automatisierten x-y-z- Motorplattform ausgerüstet.

Bilderstapel (stacks) mit ca. 10-15 Einzelbildern wurden in 0,5-µm Schritten bei einer Auflösung 1024 x 1024 aufgezeichnet. Die Aufnahmeeinstellungen wurden mittels der Histogramm-Option der Mikroskop-Software durchgehend kontrolliert.

### **3.4 Bildbearbeitung und -auswertung**

#### **3.4.1 RPE-Morphometrie**

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden untersucht und die RPE-Veränderungen nach dem unter 3.4 aufgeführten Klassifikationssystem eingeteilt. Hierdurch ergaben sich zusammenhängende Zonen eines RPE-Degenerationsgrades. Folgende Parameter waren von Interesse:

- 1) die Höhe der gesamten RPE-Schicht, die bei fortgeschrittener Degeneration auch aus mehreren RPE-Zellen bestehen konnte;
- 2) die Höhe individueller RPE-Zellen;
- 3) die Höhe der basalen Ablagerungen, wenn nachweisbar.

Die detaillierte Methodik wurde auch in Wagner et al. 2018 publiziert.<sup>97</sup> Vor den Ausmessungen wurden durch zwei voneinander unabhängigen Untersuchern (A. Wagner, M. Rudolf) in jedem Bild und für jeden RPE-Degenerationsgrad alle klar abgrenzbaren und artefaktfreien RPE-Zellen und für die basalen Ablagerungen repräsentative Messzonen ausgesucht. Wenn die Markierungen beider Untersucher übereinstimmten, wurden hier die entsprechenden Messungen durchgeführt. Unterschieden sich die Markierungen, wurde erneut und unabhängig voneinander markiert. Gab es weiterhin Abweichungen, wurde erneut mikroskopiert und die Zellgrenzen wurden endgültig festgelegt. Durch das Fokussieren auf das Präparat waren häufig Zellgrenzen besser abgrenzbar und konnten einfacher markiert werden.

Als Orientierung bei der Zellgrenze wurden die Pigmentgranula genutzt sowie angrenzende, aber klar abgrenzbare Strukturen. Gerade basale Ablagerungen zeigten eine ausgeprägte Doppelbrechung in der Mikroskopie mit DIC und aktiver Fokussierung, sodass die Abgrenzung zu den RPE-Zellen gut gelang.

Wie viele Zellen auf einmal gemessen wurden, war vom histologischen Befund und vom zu untersuchenden Parameter abhängig. Für Parameter 1) Höhe der gesamten RPE-Schicht wurden für Degenerationsgrad 0-1 jeweils nur Einzelzellen gemessen, da hier das RPE nur einschichtig war (Abb. 10). Mit Degenerationsgrad 2 wurde die Einschichtigkeit des RPE deutlich kompromittiert und es kam zur Aufschichtung von degenerativen RPE-Zellen. In diesen Fällen wurden zum Teil mehrere sich überlagernde RPE-Zellen gemessen, um die Gesamthöhe des RPE zu ermitteln. Bei Degenerationsgrad 3 (Migration losgelöster RPE-Zellen in die Neuroretina) handelt es sich um ein Phänomen einzelner Zellen, sodass hier eine Gesamt-RPE-Zellschichthöhe nicht sinnvoll gemessen werden konnte.

Für Parameter 2) die Höhen der individuellen RPE-Zellen, wurden jeweils auch nur einzelne Zellen ausgemessen.

Die Ausmessungen von markierten Bereichen erfolgten stets im rechten Winkel zur Bruch-Membran mittels des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ (Version 1.43g, National Institutes of Health, USA). Optimal wären Höhenmessungen senkrecht zur Sklera gewesen, um auch kleine Verkipnungen der Messachse auszuschließen. Um jedoch Sklera und RPE in einem Bild abzubilden, hätten wir eine kleinere Vergrößerung

in der Mikroskopie wählen müssen, die wiederum das Erkennen der Zellgrenzen zusätzlich erschwert hätte. Durch die oben beschriebene Herangehensweise realisierten wir pro Auge  $\geq 25$  Messungen zur Höhe der gesamten RPE – Schicht,  $\geq 35$  Messungen zur Höhe individueller RPE-Zellen und  $\geq 16$  Messungen zur Höhe der basalen Ablagerungen.

Da mit einfacher Lichtmikroskopie und DIC keine klare Unterscheidung zwischen Basal Linear Deposits (BlinD) und Basal Lamina Deposits (BlamD) vorgenommen werden konnte, wurden die Sub-RPE-Deposits allgemein als basale Ablagerungen zusammengefasst. Messungen wurden nur durchgeführt, wenn Zellgrenzen auch ohne Kontrastfärbung klar zu erkennen und nicht durch Präparationsartefakte kompromittiert waren.

#### 3.4.2 RPE-Autofluoreszenz

Vor der oben genannten lichtmikroskopischen Untersuchung erfolgte die Autofluoreszenzaufnahme des RPE mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop.

Aus den 10-15 Einzelbildern pro Stacks wurde zunächst ein Maximum-Projektions-Image generiert. (IP Lab, Version 2.9.3r4; Biovision, Exton, PA). Danach wurden pro Bild von 2 unabhängigen Untersuchern (A. Wagner und M. Rudolf) ca. 10 repräsentative Zellen variabler Morphologie von intakt bis anormal in jeder histologisch definierten Zone der gematchten DIC-Bildern ausgewählt und markiert.

Bei der Beurteilung der Aufnahmen wurde die lichtmikroskopisch festgelegte Klassifikation der RPE-Degeneration auf die Autofluoreszenzaufnahmen 1:1 übertragen.

Die Autofluoreszenz der einzelnen markierten RPE-Zellen wurde mit der Software Leica Advanced Fluorescence (version 1.9.0., Leica Microsystems) gemessen und die Daten zur Analyse in ein Datenverarbeitungsprogramm (Microsoft Excel, Microsoft, Redmond, WA) exportiert.

Gemessen wurde die durchschnittliche Autofluoreszenz pro gemessener RPE-Zelle im Verhältnis zur Fläche des histologischen Querschnitts der Zelle, aufgeschlüsselt

nach jeweiligem RPE-Degenerationsgrad. Diese Information gibt Auskünfte über ein potenzielles Erscheinungsbild in der klinischen Autofluoreszenz. Zudem wurde die Summen-Autofluoreszenz pro gemessener RPE-Zelle ermittelt, indem alle Fluoreszenzsignale pro Zellenquerschnitt aufsummiert wurden. Dieser Messwert gibt unabhängig von Zellgröße an, ob sich autofluoreszentes Material vermehrt mit erhöhter Degeneration ansammelt.

Um die Autofluoreszenzdaten zwischen den verschiedenen Augen vergleichen und statistisch auswerten zu können, wurden sie normalisiert. Hierzu wurde die Autofluoreszenz eines Standard-Referenz-Punktes herangezogen, der jeweils 7 mm temporal des Nervus Optikus lag und immer morphologisch unverändertes RPE des Degenerationsgrades 0 aufwies.

### **3.5 Statistik**

Die Daten für jeden morphologischen Parameter (Fragestellung A) wurden für alle Augen pro RPE-Degenerationsgrad zusammengefasst und statistisch ausgewertet. Zur statistischen Auswertung führten wir T-Tests und ANOVA (Varianzanalyse) mittels Biostat 2009 Professional (Version 5.8.4.3., AnalystSoft Inc., Alexandria, VA, USA) durch. P-Werte von  $<0,05$  wurden als signifikant gewertet.

Die Statistik zur Fragestellung B wurde durch Prof. McGwin vom Department of Epidemiology der University of Alabama at Birmingham durchgeführt und wir haben normalisierte Daten von 119 ausgewählten Bereichen von 7 Augen mit dem F-Test und ANOVA (Varianzanalyse) analysiert. (SAS Vers.9.1, SAS Institute Inc., CARY, NC).

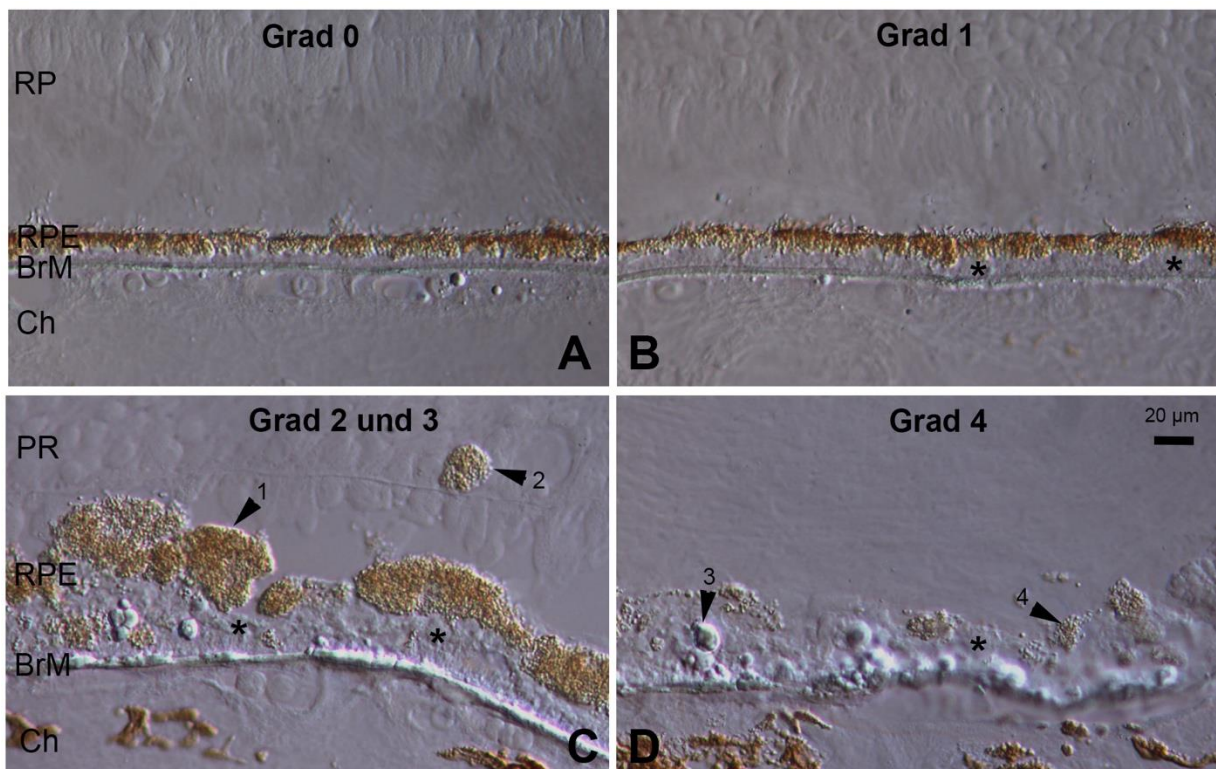


## 4. Ergebnisse

### 4.1 Morphometrie

#### 4.1.1 Messungen pro RPE-Degenerationsgrad

Von der äußeren Makula in Richtung der zentral gelegenen RPE-Atrophie zeigte das RPE eine fast kontinuierliche Zunahme des Degenerationsgrades. So waren in der äußeren Makula regelmäßig morphologisch regelrechtes RPE (Grad 0) oder eine intakte Zellschicht mit leicht unregelmäßigen RPE-Zellen (Grad 1) zu erkennen. In Abb. 10 und 11 sind Beispiele aus unserer Studie dargestellt, die auch unser Klassifikationssystem der RPE-Degeneration widerspiegeln.



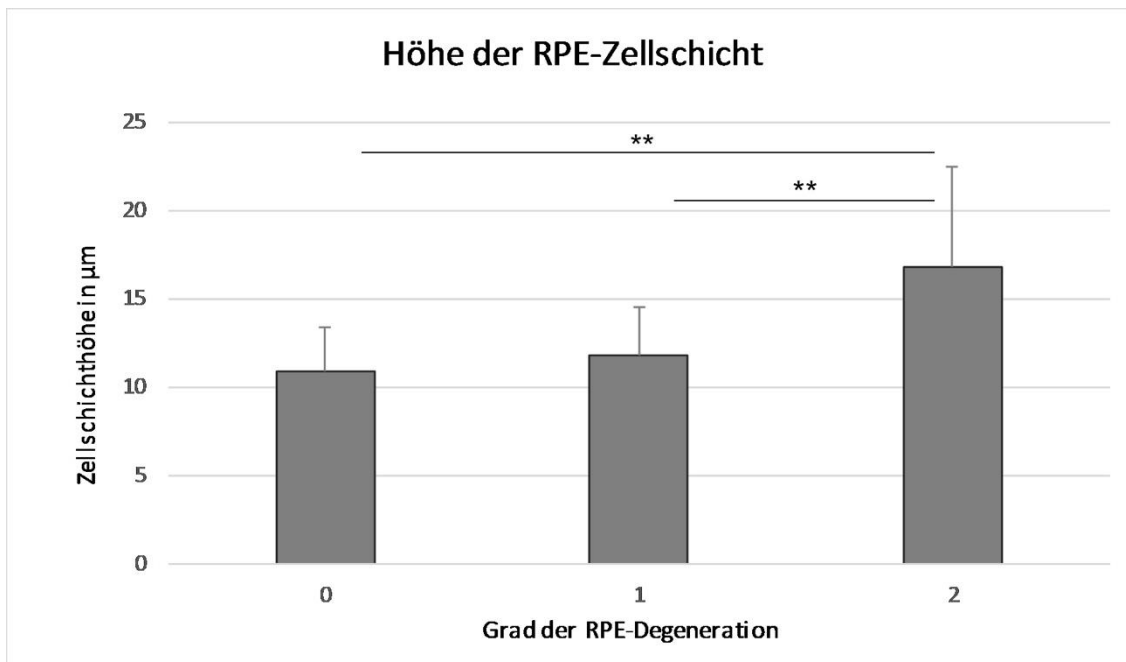
**Abb. 11: Lichtmikroskopische Bilder des RPE**

Aufgenommen mit Differenzialinterferenzkontrast, die Maßstabsskala bezieht sich auf alle Bilder. **A:** keine sichtbare RPE-Degeneration (Grad 0), ohne basale Ablagerungen und mit normal dicker Bruchmembran (BrM); **B:** leichte Unregelmäßigkeit des RPE und wenig basale Ablagerungen (Sternchen), zusammenhängender Zellverband; **C:** deutlicher Verlust der einreihigen Zellstruktur bei Degenerationsgrad 2, es liegen deutlich hypertrophe Zellen (Pfeil 1) vor; Zellen, die sich ganz vom Zellverband lösen, entsprechen Grad 3 (Grad 3). Die Bruchmembran ist verdickt und ist durch massive basale Ablagerungen von den RPE-Zellen getrennt. **D:** Atrophiezone ohne RPE-Zellen, nur Zelldebris (Pfeil 4) und Kalkablagerungen (Pfeil 3); PR: Photorezeptoren, Ch: Choroidea;

Unsere morphometrischen Daten sind bereits komplett veröffentlicht.<sup>66,96</sup> In den Veröffentlichungen wurden die Daten als Boxplots dargestellt, die den Vorteil bieten, auf einen Blick die Datenverteilung gut zu beurteilen. In dieser Zusammenschrift entschieden wir uns alternativ für Balkendiagramme.

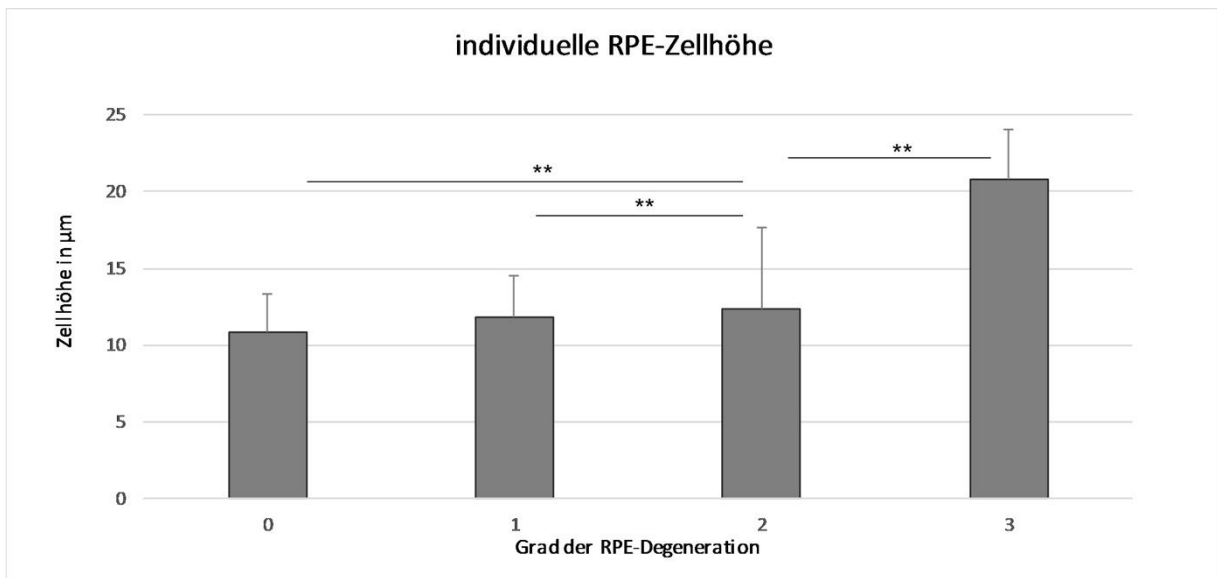
Die individuelle Zellhöhe entsprach in diesen Bereichen immer der Höhe der gesamten Zellschicht, da hier nur eine einzellige Zellschicht vorlag (Abb. 11; Grafik 1 und 2). Die Zellhöhe variierte insgesamt nur gering und unterschied sich nicht zwischen Grad 0 ( $10,9 \pm 2,6 \mu\text{m}$ ) und Grad 1 ( $11,8 \pm 2,8 \mu\text{m}$ ;  $p=0,31$ ).

RPE von Degenerationsgrad 2 zeigte einen deutlichen Verlust der einschichtigen Organisationsstruktur mit Migration von degenerativen RPE-Zellen mit konsekutiver Verlagerung und stellenweiser Aufschichtung zu Zellhaufen. Damit war die RPE-Schicht in diesem Abschnitt deutlich höher ( $16,5 \pm 5,1 \mu\text{m}$ ; Grafik 1) als die RPE-Schicht bei Grad 0 und 1 ( $p<0,001$ ). RPE-Veränderungen von Grad 2 dominierten den Randbereich der RPE-Atrophiezone (Grad 4) und zeigten eine deutlich erhöhte Variabilität von Zellgröße und Schichtaufbau (Abbildung 10). So fanden wir in diesem Bereich kleine atrophe Zellen neben vielen runden hypertrophen Zellen (Zellhöhe Minimum  $5,1 \mu\text{m}$ ; Maximum  $27,5 \mu\text{m}$ ). Der Mittelwert der individuellen RPE-Zellhöhe lag in diesem Bereich mit  $12,4 \pm 5,2 \mu\text{m}$  höher ( $p<0,001$ ) als bei Grad 0/1.



**Grafik 1: Höhe der RPE-Zellschicht**

Retinales Pigmentepithel (RPE) vom Degenerationsgrad 0 und 1 zeigte per definitionem eine einreihige Zellschicht, die in der Höhenausmessung vergleichbare Werte zeigte. RPE-Zellen vom Degenerationsgrad 2 zeigten häufig Migrationstendenzen. Durch Zellüberlagerungen nahm die Schichthöhe signifikant zu. Zudem zeigten sich viele einzelne Zellen vom RPE-Degenerationsgrad 2 selbst deutlich vergrößert (Grafik 2). Bei Grad 3 handelt es sich um ein Phänomen einzelner RPE-Zellen, die den Kontakt zum eigentlichen RPE-Zellverband verloren haben und in die Netzhaut migrieren, sodass eine Gesamtschichthöhe hier nicht sinnvoll gemessen werden konnte. Im RPE-Degenerationsgrad 4 waren per definitionem keine RPE-Zellen vorhanden, sondern nur noch Zelldebris. Somit war keine sinnvolle Messung einer Zellschicht möglich (\*\* $p < 0,0001$ ).

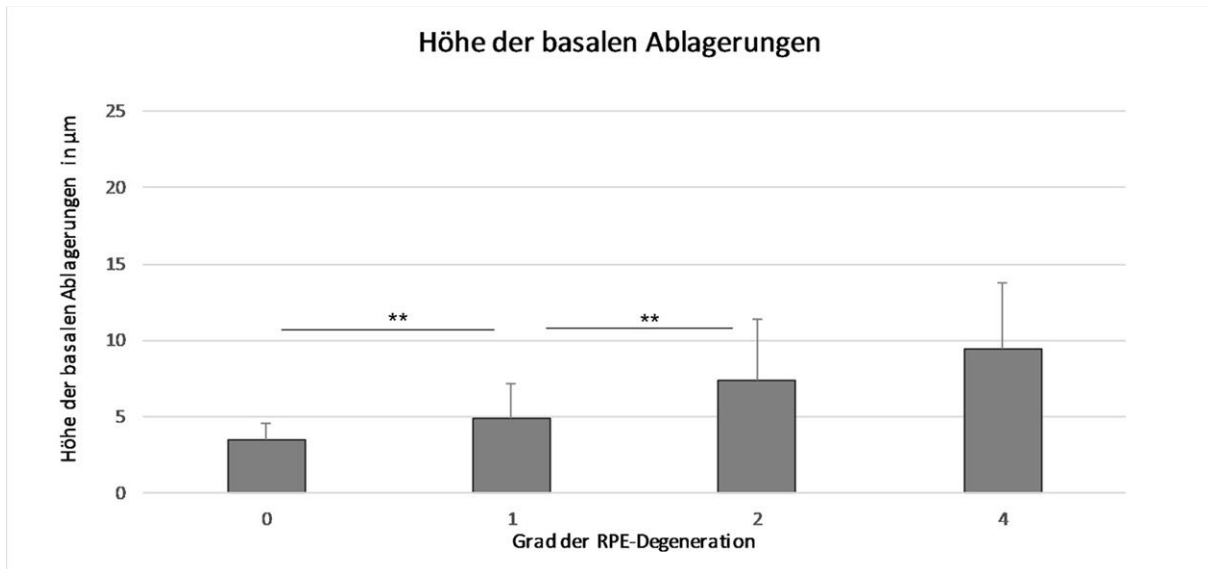


**Grafik 2:** Höhe individueller RPE-Zellen je nach Degenerationsgrad. Für jeden RPE-Degenerationsgrad wurden repräsentative Zellen ausgewählt und deren individuelle Zellhöhe senkrecht zur Bruchmembran ausgemessen. Für Zellen mit RPE-Degenerationsgrad 0 und 1 entsprachen die Werte der Gesamtschichthöhe (Grafik 1). In Zonen mit Degenerationsgrad 2 zeigten die RPE-Zellen eine deutlich erhöhte Variabilität. Alle detektierten Zellen, die sich vom RPE-Zellverband lösten und in die Netzhaut migrierten (Degenerationsgrad 3), waren deutlich hypertroph. Grad 4 konnte nicht sinnvoll gemessen werden, da es der Atrophiezone ohne das Vorhandensein von RPE-Zellen entsprach. (\*\* $p < 0,0001$ ).

Vereinzelte, in alle neuroretinalen Schichten migrierende Zellen wurden als RPE-Veränderungen Grad 3 klassifiziert. Diese Zellen waren mit einer Zellhöhe von  $20,8 \pm 3,3 \mu\text{m}$  sehr groß und fanden sich in der Regel dicht am Atrophierand über deutlich verändertem RPE vom Grad 2. Da sich diese Zellen komplett aus dem RPE-Zellverband gelöst hatten, konnten hier keine sinnvollen Messungen für die Parameter der Höhe der gesamten Zellschicht und basalen Ablagerungen erhoben werden.

Die Ausprägung und Höhe von basalen Ablagerungen waren in allen untersuchten Augen direkt mit dem Grad der RPE-Veränderungen assoziiert (Grafik 3). In Zonen mit RPE Grad 0 zeigten sich nur sporadisch und dünn ( $3,5 \pm 1,1 \mu\text{m}$ ) basale Ablagerungen. Mit zunehmender RPE-Degeneration zeigten sich auch zunehmend durchgehende und höhere basale Ablagerungen, die progressiv von Grad 0, über Grad 1 ( $5,0 \pm 2,3 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,001$ ) auf Grad 2 ( $7,4 \pm 4,0 \mu\text{m}$ ;  $p < 0,001$ ) zunahm. Grad 4 wurde mit  $9,5 \pm 4,3 \mu\text{m}$  nahe der Atrophierandzone am höchsten gemessen, statistisch lag jedoch kein Unterschied zu Grad 2 vor ( $p = 0,31$ ). Erstaunlich war die Betrachtung der Maximalwerte

in Zone 2 mit 21,0 µm und Zone 4 mit 18,3 µm, die fast dem doppelten einer normalen RPE-Höhe entsprachen, ohne dass hier Anzeichen für eine Drusenformierung vorlagen.



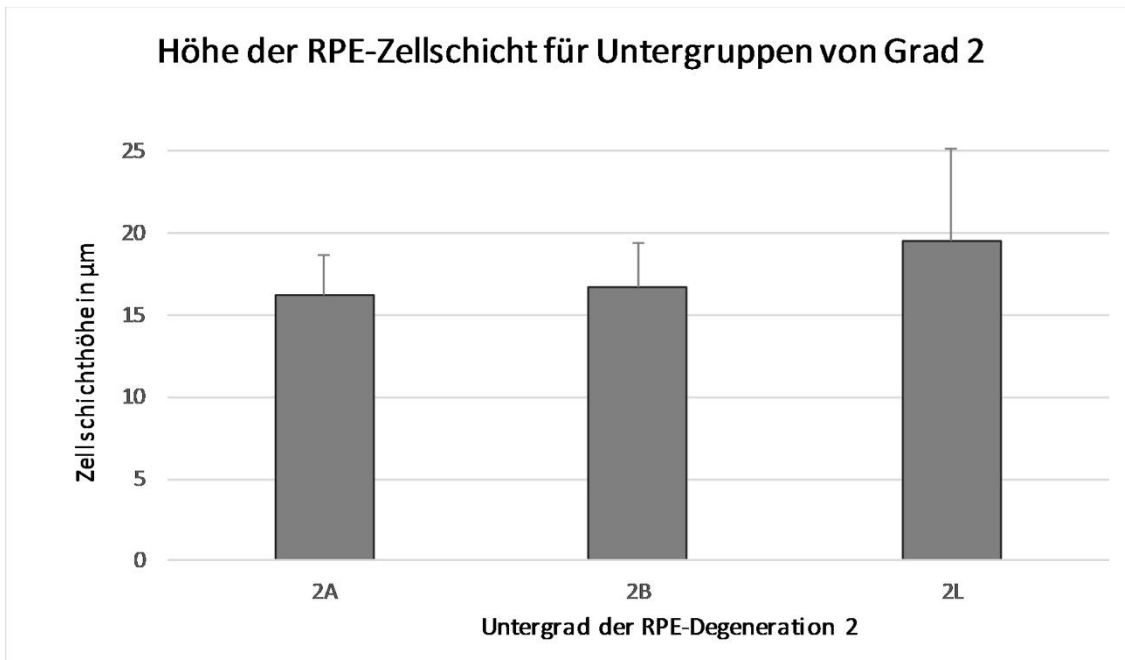
**Grafik 3:** Höhe der basalen Ablagerungen. RPE vom Degenerationsgrad 0 zeigte nur sporadisch wenig basale Ablagerungen, die zur Atrophiezone (Grad 4) hin kontinuierlicher auftraten und an Höhe deutlich zunahm (\*\*p<0,0001).

#### 4.1.2 Analyse der Untergruppen des RPE-Degenerationsgrades 2

Die deutlichsten morphologischen Veränderungen zeigten sich nahe der eigentlichen RPE-Atrophiezone (Grad 4) und waren durch RPE-Degenerationen vom Grad 2 gekennzeichnet. In diesem Degenerationsgrad gibt es eine weitere Differenzierungsmöglichkeit nach morphologischen Gesichtspunkten in die Untergruppen A, B, und L (Kapitel 3.2). Interessant ist, ob diese Untergruppen sich auch morphometrisch unterscheiden, weshalb wir eine Subgruppenanalyse für die RPE-Parameter Höhe der Zellschicht, individuelle Zellhöhe und basale Ablagerungen durchgeführt haben.

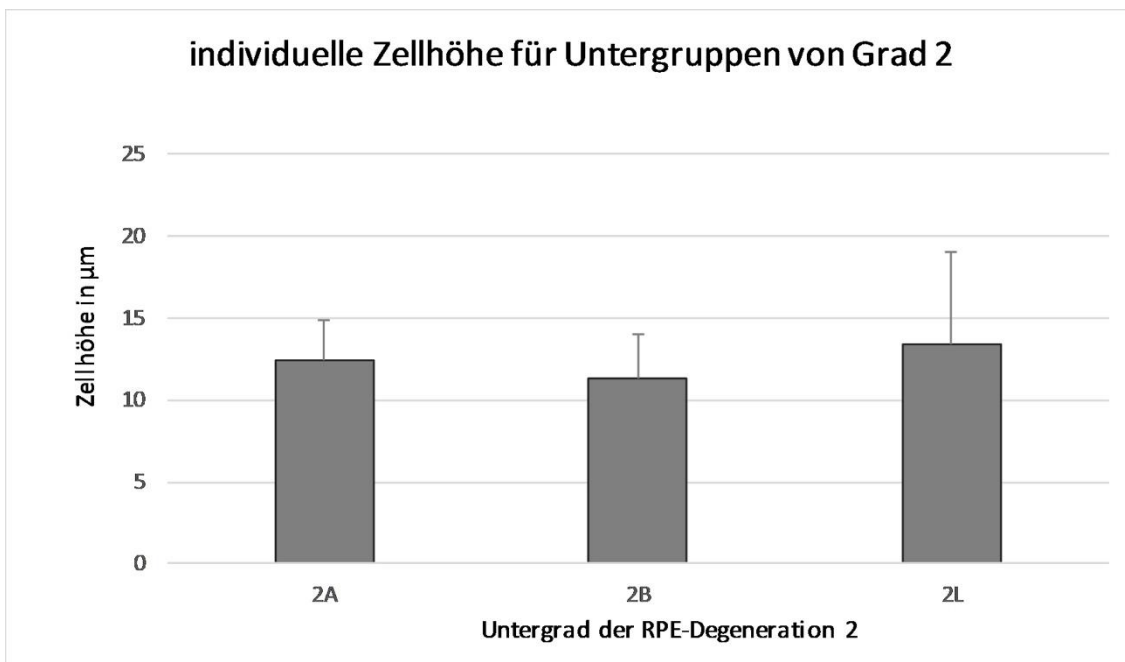
Die Analyse der Untergruppen zeigte jeweils keinen Unterschied in der Höhe der gesamten Zellschicht (2A: 15,5 ± 5,3 µm; 2B: 16,7 ± 4,3 µm; 2L: 19,5 ± 3,7 µm; Grafik 4). Auch in Bezug auf die individuelle Zellhöhe (2A: 12,0 ± 4,2 µm; 2B: 11,3 ± 2,8 µm;

2L:  $12,1 \pm 4,7 \mu\text{m}$ ; Grafik 5) oder die basalen Ablagerungen (2A:  $7,3 \pm 4,2 \mu\text{m}$ ; 2B:  $7,5 \pm 4,5 \mu\text{m}$ ; 2L:  $7,3 \pm 2,1 \mu\text{m}$ ; Grafik 6) zeigte sich keinerlei signifikanter Unterschied.



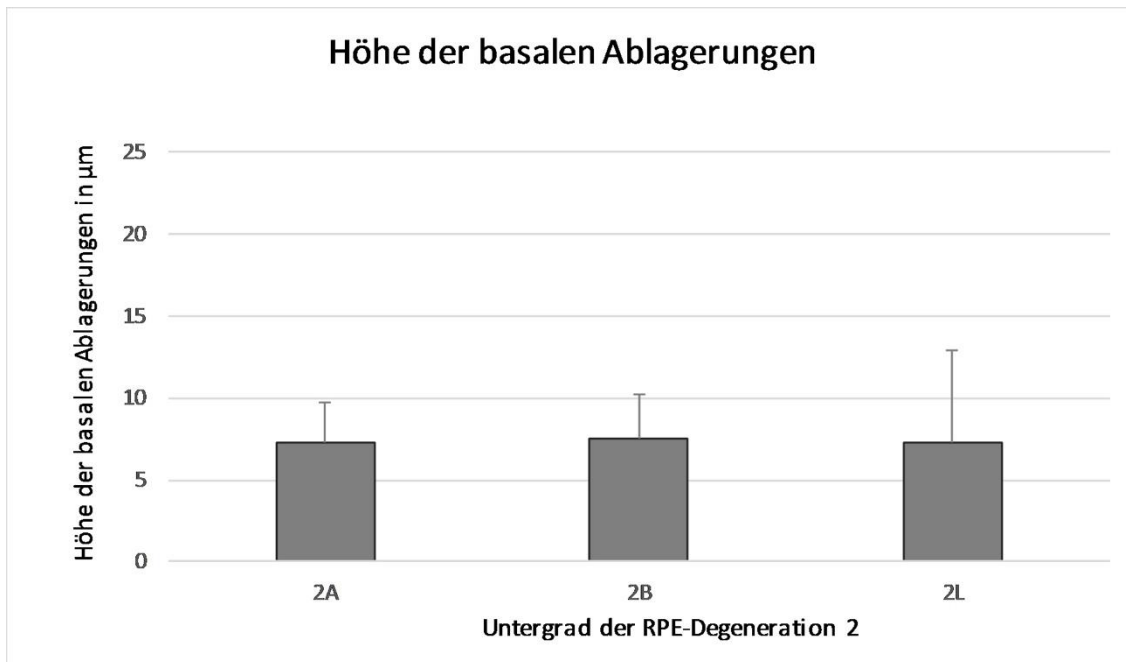
**Grafik 4: Höhe der RPE-Zellschicht für Untergruppen von Grad 2**

In den Grad-2-Untergruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe der gesamten Zellschicht ( $p=0,14$ ).



**Grafik 5: Höhe individueller RPE-Zellen für Untergruppen von Grad 2**

In den Grad-2-Untergruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der individuellen Zellhöhe ( $p=0,47$ ).



**Grafik 6: Höhe der basalen Ablagerungen für Untergruppen von Grad 2**

In den Grad-2-Untergruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Ausprägung basaler Ablagerungen ( $p=0,98$ )

#### 4.1.3 Morphometrische Analyse unter Berücksichtigung der klinischen Detektierbarkeit

Da für uns die potenzielle Sichtbarkeit der RPE-Veränderungen im SD-OCT im Vergleich zu normalem RPE von besonderem Interesse war, haben wir analysiert, wie viele der ausgemessenen RPE-Zellen von Degenerationsgrad 2 größer als normale RPE-Zellen (Grad 0) waren. Eine reguläre RPE-Zelle (Grad 0) war in unserer Ausmessung ca.  $11\mu\text{m}$  hoch (Grafiken 1/2). Da die axiale Auflösung heutiger SD-OCTs zwischen  $3$  und  $5\mu\text{m}/\text{Pixel}$  liegt, wäre es theoretisch möglich, RPE-Zellen zwischen  $14$ - $16\mu\text{m}$  bereits als vergrößert zu detektieren. Dies träfe in unserer Studie bereits auf  $26,8\%$  ( $\geq 14\mu\text{m}$ ) respektive  $13,4\%$  ( $\geq 16\mu\text{m}$ ) aller ausgemessenen individuellen RPE-Zellen von Degenerationsgrad 2 zu. Da wir in unserer Studie nur große RPE-Zellen vom Degenerationsgrad 3 gemessen haben (Grafik 2), wären quasi alle Grad 3-RPE-Zellen mittels moderner Bildgebungstechnik detektierbar.

Viel interessanter als einzelne veränderte RPE-Zellen ist jedoch die potenzielle Detektierbarkeit von Veränderungen in der Höhe der gesamten RPE-Schicht. Diese lag für RPE-Degenerationsgrad 2 in 64,1% unserer Messungen  $\geq 14 \mu\text{m}$ , beziehungsweise bei 53,4%  $\geq 16 \mu\text{m}$ .

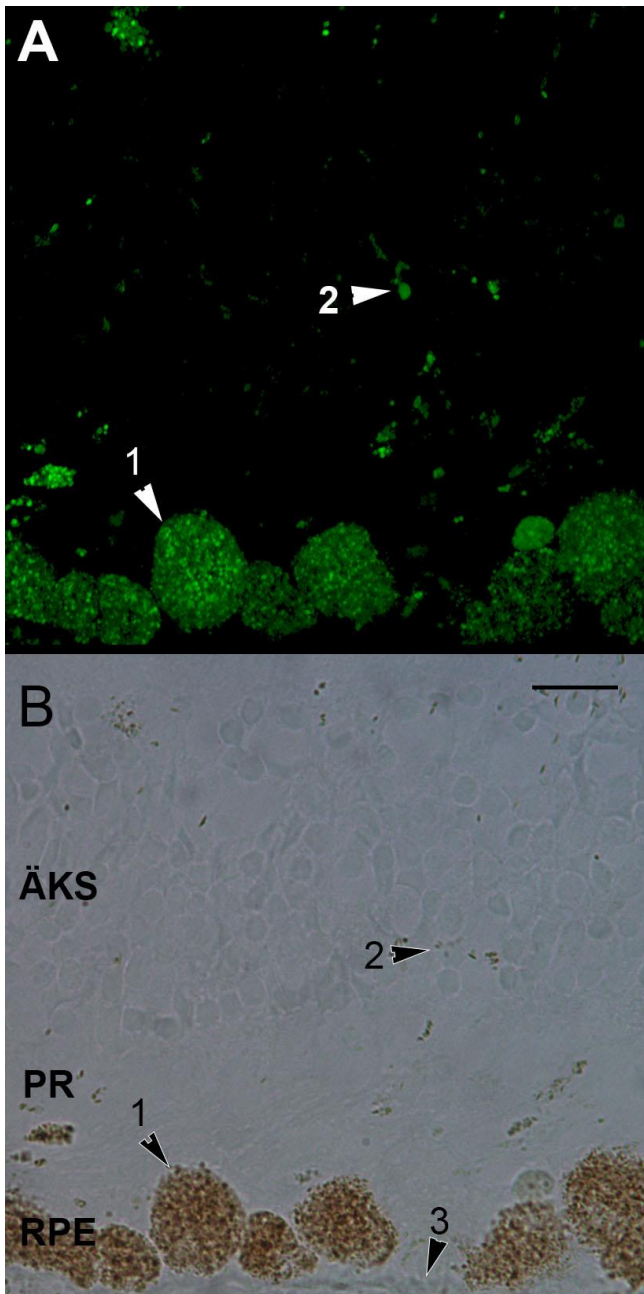
## **4.2. Autofluoreszenz einzelner RPE-Zellen**

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden einzelne RPE-Zellen in Autofluoreszenz-Aufnahmen gemessen. Da für eine valide Ausmessung eine klare Abgrenzung der individuellen RPE-Zellen in den Autofluoreszenzaufnahmen Voraussetzung war, wurden die zu messenden Zellen primär auch hier selektiert. Später erfolgte ein Abgleich mit den lichtmikroskopischen Aufnahmen und die Zuordnung der RPE-Zellen zu dem entsprechenden Degenerationsgrad. Dieses Vorgehen erklärt, warum die im Teil B gemessenen RPE-Zellen nicht zwangsläufig mit denen von Teil B 1:1 übereinstimmten, obwohl es viele Überschneidungen gab.

Das RPE zeigte mit den statisch angewandten Fluoreszenzeinstellungen in allen Proben erwartungsgemäß eine deutliche Autofluoreszenz (Abb. 12). Andere Strukturen wie die Bruchmembran, vereinzelt Drusen oder die äußeren Photorezeptorschichten zeigten ein nur sehr geringes Signal. Diese Strukturen waren aber für die Orientierung und bei der Korrelation mit den lichtmikroskopischen Aufnahmen sehr hilfreich.

Da sich die Autofluoreszenz des RPE pro untersuchtem Auge sehr unterscheiden kann, wurden die Autofluoreszenzdaten wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, normalisiert, um sie besser miteinander vergleichen zu können. Als Referenzwert wurde die absolute Autofluoreszenz ca. 7 mm temporal vom Sehnervenkopf ausgehend vermessen. In diesem Bereich lag jeweils immer morphologisch normales RPE (Degenerationsgrad 0) vor.

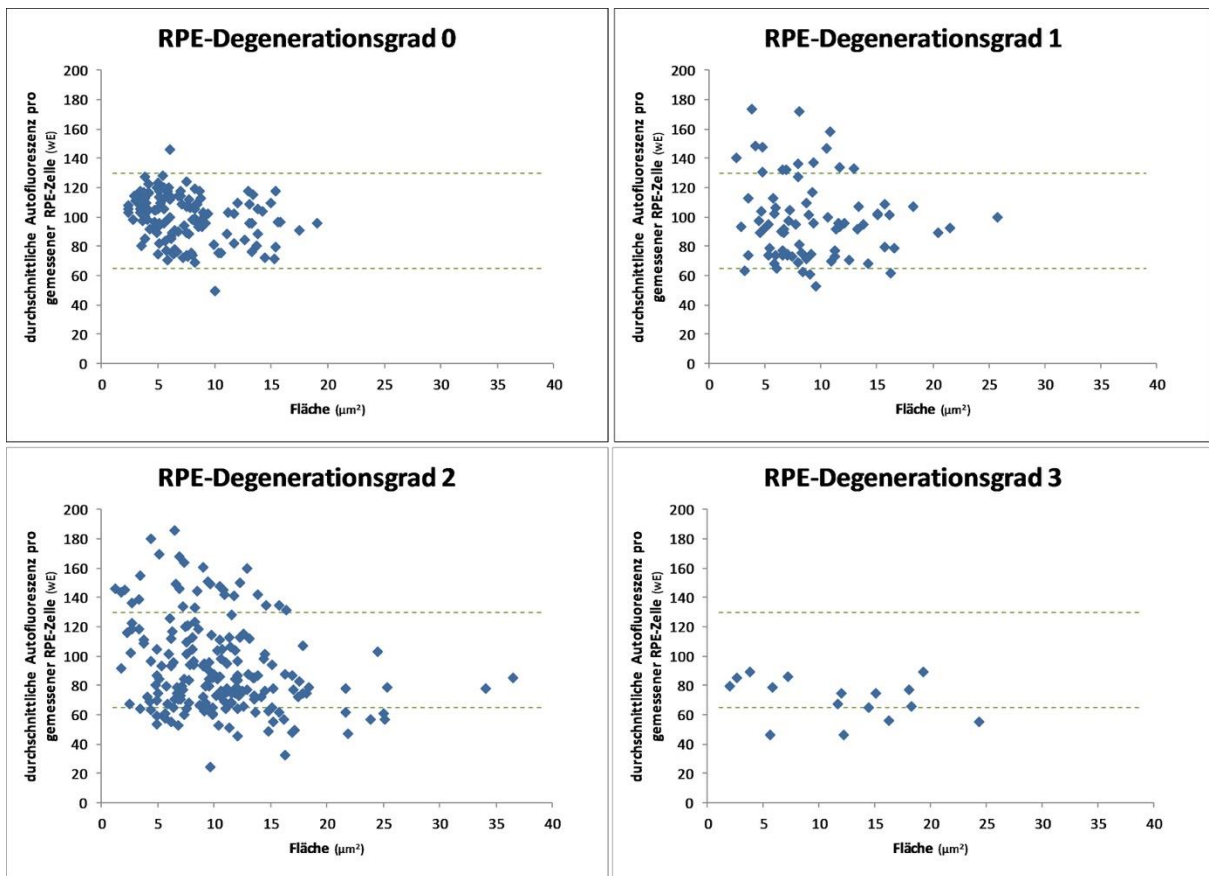




**Abbildung 12: Beispiel RPE-Autofluoreszenz in der Histologie**

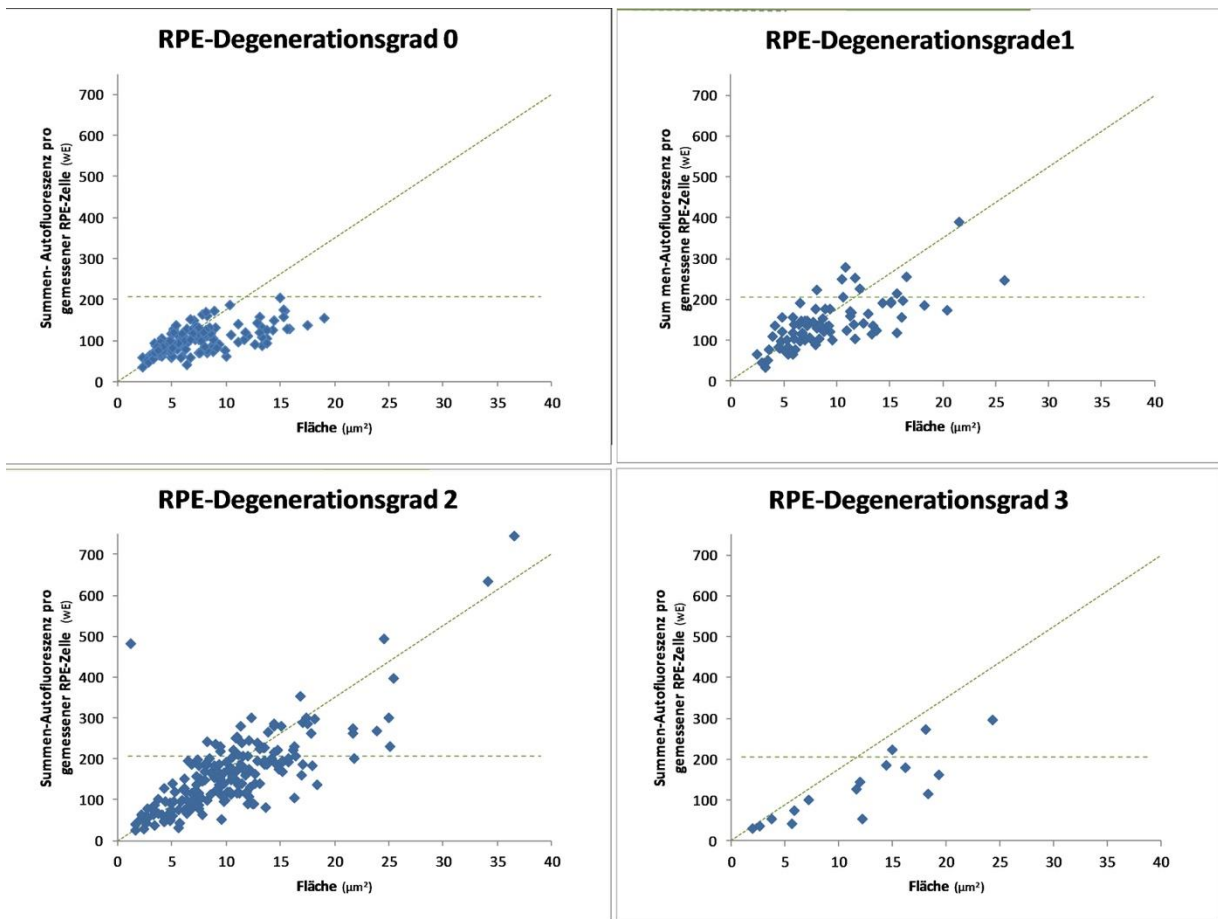
Bild A zeigt ein Beispiel für RPE des Degenerationsgrades 2 mit mehreren hypertrophen und gerundeten Zellen (Pfeil 1). B zeigt das korrespondierende lichtmikroskopische Bild. Messskala=20 µm) Über dem RPE befindet sich die teils degenerierte Netzhaut mit den Photorezeptoren (PR) und der äußeren Körnerschicht (ÄKS). Hyperfluoreszente und pigmentierte Partikel (Pfeil 2) bereits lysierter RPE-Zellen finden sich in allen Netzhautschichten. Pfeil 3= Bruchmembran

Mit beginnender RPE-Degeneration (Grad 1) zeigte sich eine erhöhte Streuung der durchschnittlichen Autofluoreszenz pro gemessener RPE-Zelle (Grafik 7). Einige normalgroße RPE-Zellen zeigten eine Zunahme der Autofluoreszenz. Im Gegensatz dazu zeigten größere Zellen tendenziell eher niedrigere Werte. Dieses Bild war beim RPE-Degenerationsgrad 2 noch ausgeprägter. Bei RPE-Degenerationsgrad 3 zeigte sich unabhängig von der Zellgröße eine herabgesetzte durchschnittliche Autofluoreszenz. Um zu eruieren, ob die alleinige Zellgröße durch einen quasi Verdünnungseffekt der Fluophore zu einer herabgesetzten durchschnittlichen Autofluoreszenz führt, haben wir uns die Summen-Autofluoreszenz der einzelnen RPE-Zellen angesehen (Grafik 8). Hier wurden alle Autofluoreszenz-Einzelsignale der Zellen über deren Querschnittsfläche im histologischen Schnitt aufsummiert.



### Grafik 7: Durchschnittliche Autofluoreszenz pro RPE-Zelle und Degenerationsgrad

Gemessen wurde die durchschnittliche Autofluoreszenz pro gemessener RPE-Zelle im histologischen Querschnitt, aufgeschlüsselt nach jeweiligem RPE-Degenerationsgrad und gemessener Zellgröße, hier als Fläche in  $\mu\text{m}^2$  angegeben. wE: willkürliche Einheit, die grün gestrichelten Linien markieren das 95%-Konfidenzintervall (KI) der durchschnittlichen Autofluoreszenz der morphologisch unveränderten RPE-Zellen (Degenerationsgrad 0) an. In den RPE-Degenerationsgraden 1 und 2 zeigen einige kleine Zellen eine Zunahme der durchschnittlichen Autofluoreszenz, während größere Zellen tendenziell eine herabgesetzte durchschnittliche Autofluoreszenz aufweisen. Ab Degenerationsgrad 3 ist in allen Zellen eine reduzierte durchschnittliche Autofluoreszenz nachzuweisen.



**Grafik 8: Summen-Autofluoreszenz pro RPE-Zelle und Degenerationsgrad**

Gemessen wurde die Summen-Autofluoreszenz pro gemessener RPE-Zelle im histologischen Querschnitt, aufgeschlüsselt nach jeweiligem RPE-Degenerationsgrad und gemessener Zellgröße, hier als Fläche in  $\mu\text{m}^2$  angegeben. wE: willkürliche Einheit, die x-Achse und die grün gestrichelte Linie markieren das 95%-Konfidenzintervall (KI) der Summen-Autofluoreszenz der morphologisch unveränderten RPE-Zellen (Degenerationsgrad 0) an. In den RPE-Degenerationsgraden 1 und 2 zeigt sich die Tendenz zur Erhöhung der Summen-Autofluoreszenz. Mit Degenerationsgrad 3 ist im Allgemeinen wieder eine reduzierte Summen-Autofluoreszenz nachzuweisen. Alle Messwerte liegen unterhalb der Winkelhalbierenden.

Die Ergebnisse der visuellen Aufarbeitung der Summen-Autofluoreszenz einzelner RPE-Zellen legen nahe, dass in den RPE-Degenerationsgraden 1 und 2 eine direkte Korrelation zwischen Zellgröße und Autofluoreszenz besteht. Das würde bedeuten, dass je größer die Zelle ist, desto mehr Lipofuszin als Hauptverursacher der RPE-Autofluoreszenz enthalten ist. Die durchschnittliche Autofluoreszenz ist jedoch etwas bei größeren Zellen herabgesetzt, sodass man wirklich von einem Verdünnungseffekt ausgehen kann. In der klinischen Bildgebung ist jedoch eher die durchschnittliche

Autofluoreszenz von Bedeutung, sodass diese Zellen nicht alleine zu einer erhöhten Fundus-Autofluoreszenz beitragen. Insgesamt liegt nur ein Bruchteil aller gemessener Zellen über dem 95%-Konfidenzintervall (KI) normaler RPE-Zellen. Für RPE vom Degenerationsgrad 1 träfe dies nur auf 16,5% der Zellen zu, für den Degenerationsgrad 2 auf lediglich 14,0%. Diese Werte reduzieren sich weiter, wenn man eine Unterscheidungsschwelle für die klinische Bildgebung einfügt. Läge diese z.B. 10% über dem 95%-KI normaler RPE-Zellen, reduziert sich die Anzahl hyperfluoreszenter Zellen weiter auf 7,6% respektive 9,4%.

Anders scheint es sich bei RPE-Zellen vom Degenerationsgrad 3 zu verhalten. Diese haben grundsätzlich keine deutlich erhöhte Summen-Autofluoreszenz und eine niedrige durchschnittliche Autofluoreszenz. Dies weist bereits auf eine erhöhte Zelldegeneration hin, in der das Lipofuszein nicht zellschonend abgelagert wird und als Hauptverursacher der Autofluoreszenz reduziert nachweisbar ist.

## 5. Diskussion

Viele Studien konnten bereits zeigen, dass sich die histologischen Veränderungen einer GA bei AMD in erster Linie auf dem Niveau des RPE, der Choriokapillaris und der äußeren Netzhaut zeigen.<sup>8,32,38,101</sup> Das klinische Monitoring einer GA wird deutlich an Bedeutung zunehmen, sollten neue Behandlungsoptionen entwickelt werden und zur Therapie zur Verfügung stehen. Neben der bereits gut etablierten Fundus-Autofluoreszenz bietet sich gerade auch die Kombination mit der weitverbreiteten SD-OCT an.<sup>3,8,100</sup> Das multimodale Imaging erlaubt eine validere Situationsbeurteilung als es mit einer einzelnen Methode möglich wäre.<sup>100</sup> Um aber diese klinischen Bildgebungsmodalitäten optimal zu interpretieren, ist es wichtig, die zugrundeliegenden histologischen Pathologien zu kennen und der klinischen Bildgebung zuzuordnen.

Ziel der hier vorliegenden Studie war es, RPE-Veränderungen in Hornhautspenderaugen mit bekannter AMD zu beschreiben und auszumessen, die auch in der heutigen alltäglichen SD-OCT mit hoher Wahrscheinlichkeit darzustellen und wiederzuerkennen sind. Hierfür wurden die RPE-Veränderungen nach einem etablierten System für RPE-Degenerationen klassifiziert und morphometrisch analysiert.<sup>5-7</sup> Zudem wurden RPE-Zellen je nach Degenerationsgrad bezüglich ihrer Autofluoreszenz untersucht, die hauptsächlich durch intrazelluläre Lipofuszin-Ablagerungen verursacht wird.<sup>26,27,86</sup> Die Parameter zur Anregung der Autofluoreszenz in den Histologien orientierten sich an klinischen Parametern von klinischen konfokalen Laserscanning-Ophthalmoskopen.<sup>46,47</sup>

In den untersuchten Histologien zeigte sich durchgehend eine stetige Progression des RPE-Degenerationsgrades von der äußeren Makula hin zur zentralen Makula. Dadurch konnten wir Zonen definieren, die jeweils einem Degenerationsgrad entsprachen. In der äußeren Makula zeigte sich jeweils morphologisch regelrechtes RPE (Grad 0) oder leicht unregelmäßiges RPE (Grad 1). Auch die Autofluoreszenz dieser RPE-Zellen wurde als normal beurteilt. Andere histologische Studien weisen aber darauf hin, dass sich bereits auf molekularer Ebene beginnende degenerative Veränderungen abzeichnen können.<sup>6,93</sup>

Das RPE war in diesen Zonen durchgehend einschichtig und zeigte nur sporadisch basale Ablagerungen. Die Zellhöhe in diesen Arealen entsprach insgesamt der Norm und variierte nicht signifikant, sodass sich diese Areale in einer SD-OCT-Darstellung durchgehend unauffällig zeigen sollten.

Insgesamt zeigten sich in Abschnitten, die direkt an die eigentliche RPE-Atrophiezone (Grad 4) grenzten, die offensichtlichsten RPE-Veränderungen, die als Grad 2 klassifiziert wurden. Zanzottera et al. fanden in RPE-Bruch-Membran-Wholemouts von GA-Augen ebenfalls deutliche degenerative RPE-Veränderungen in einem 500µm-Areal um den RPE-Atrophierand <sup>100,101</sup>. Neben massiven basalen Ablagerungen fanden wir Anzeichen einer fortgeschrittenen RPE-Degeneration mit Verlust der regulären einschichtigen Struktur. Degenerative Zellen begannen zu migrieren und schichteten sich zu mehrlagigem RPE oder regelrechten Zellhaufen auf. Die involvierten RPE-Zellen waren entweder atroph und klein oder deutlich hypertroph. Diese Beobachtungen passen zu Beschreibungen von Curcio et al., dass fortgeschrittenes degeneratives RPE entweder atrophiert oder zu migrieren beginnt <sup>8,98</sup>. Durch die Koexistenz kleiner und großer RPE-Zellen war die Variabilität für die gemessene Höhe individueller Zellen für diesen Degenerationsgrad am größten.

Es wurde eine Analyse der klinischen Detektierbarkeit durchgeführt, um die Frage zu beantworten, ob morphologische RPE-Veränderungen potenziell mit heute verwendeten SD-OCTs dargestellt werden können. Wir gingen von einer axialen Auflösung von 3-5 µm aus. Es wurde von der Annahme ausgegangen, dass Veränderungen, die 3-5 µm größer waren als das normale RPE (11µm), wahrscheinlich in SD-OCT-Bildgebung gegenüber normalem RPE detektiert werden könnte. Dies trafe in der hier vorliegenden Studie auf 26,8% ( $\geq 14\mu\text{m}$ ) respektive 13,4% ( $\geq 16\mu\text{m}$ ) aller ausgemessenen individuellen RPE-Zellen vom Degenerationsgrad 2 zu. Viel mehr als einzelne Zellen interessiert jedoch noch die potenzielle Darstellbarkeit von Veränderung der gesamten RPE-Schicht. Die gemessene Höhe der gesamten RPE-Schicht lag für RPE-Degenerationsgrad 2 in 64,1%  $\geq 14\mu\text{m}$  unserer Messungen, respektive 53,4%  $\geq 16\mu\text{m}$  vor. Der Prozentsatz der zu detektierenden RPE-Veränderungen vom Degenerationsgrad 2 ist im SD-OCT vermutlich noch höher, zieht man die ebenfalls charakteristischen Höhenschwankungen der gesamten RPE-Schicht für diesen Degenerationsgrad in Betracht.

Die in dieser Studie untersuchten Untergruppen vom RPE-Degenerationsgrad 2 zeigten keine signifikanten Größenunterschiede und lassen sich demnach nicht im SD-OCT unterscheiden. Andere Studien fand mit einer abgewandelten Klassifikation und sehr detaillierter RPE-Phänotypisierung für die entsprechenden Untergruppen variablere Werte zwischen  $13,0 \pm 3,0 \mu\text{m}$  und  $19,5 \pm 2,4\mu\text{m}$ .<sup>8</sup> Mit solchen Unterschieden in den Messergebnissen wäre doch eine Unterscheidung der Untergruppen in der SD-OCT denkbar.

Nahe am Rand der RPE-Atrophie fanden wir RPE-Zellen, die sich vom RPE-Zellverband gelöst hatten und in die Retina migrierten (Grad 3). Histologische Studien konnten in der Mehrzahl derartiger Zellen spindelförmige Melanosomen nachweisen, die charakteristisch für das RPE sind.<sup>9,101</sup> Differenzialdiagnostisch kommen nämlich auch Melanin-beladene Makrophagen in Betracht, die deutlich seltener nachzuweisen waren.<sup>9</sup>

Die Messergebnisse zeigten, dass RPE-Zellen von Degenerationsgrad 3 groß genug waren ( $20,8 \pm 3,3 \mu\text{m}$ ), um mit heutigen Auflösungsstandards in der SD-OCT sicher als individuelle Zellen dargestellt werden zu können. Unsere RPE-Zellen vom Degenerationsgrad 3 waren in den morphometrischen lichtmikroskopischen Ausmessungen tendenziell etwas größer als intraretinale pigmentierte Zellen anderer Arbeitsgruppen ( $10,3 \pm 7,2\mu\text{m}$ ).<sup>8</sup> Ein Grund hierfür besteht sicher darin, dass keine Gegenfärbung verwendet wurde und nur Zellen ausgemessen wurden, die offensichtlich als RPE-Degenerationsgrad 3 einordnet werden konnte. Hier liegt sicher auch ein Bias, sodass kleinere Zellen ggf. übersehen und nicht in unsere morphometrischen Messungen eingeschlossen wurden. Dies wurde zum Teil auch in unseren Autofluoreszenzuntersuchungen bestätigt. Hier fielen kleinere RPE-Zellen durch ihre Autofluoreszenz deutlicher auf, die in der Lichtmikroskopie nur einen geringen Melaningehalt besaßen und nur sehr schwer als einzelne Zellen abzugrenzen waren.

In AMD-Augen wurden mittels SD-OCT korrespondierende Veränderungen zu RPE-Zellen vom Degenerationsgrad 3 gefunden, die als hyperreflektive Foci beschrieben wurden.<sup>95,97,98</sup> Die hyperreflektiven Foci traten alleine oder in Gruppen auf und konnten in allen Netzhautschichten nachgewiesen werden.<sup>97</sup> Interessanterweise ging dem



Auftreten der intraretinalen hyperreflektiven Foci eine Verbreitung des RPE-Signals voraus, das durch degeneratives RPE bedingt war.<sup>98</sup> Der Nachweis dieses intraretinalen hyperreflektiven Materials war in SD-OCT-Studien mit einem deutlich erhöhten Risiko für eine Progression in eine GA verbunden.<sup>95,98</sup>

Der Vollständigkeit halber muss erwähnt werden, dass intraretinales, hyperreflektives Material auch bei neovaskulärer AMD oder anderen Makulaerkrankungen, wie z.B. bei diabetischer Makulopathie, gefunden werden kann.<sup>4,10,11</sup> Diese Veränderungen müssen jedoch nicht zwangsläufig RPE-Zellen repräsentieren, sondern werden in diesen Fällen auch durch beladene Makrophagen oder harte Exsudate hervorgerufen.

In unserer Studie korrelierten die Höhe und die Kontinuität der basalen Ablagerungen direkt mit dem Degenerationsgrad des RPE und waren damit direkt am RPE-Atrophierand am ausgeprägtesten. Gerade im direkten Übergang von fortgeschrittenem degenerativem RPE (Grad 2) zur Atrophie (Grad 4) zeigten sich massive Ablagerungen von durchschnittlich 9,5 µm, was fast der Höhe einer regulären RPE-Zellschicht entsprach. Andere Arbeitsgruppen interpretierten die basalen Ablagerungen nach entsprechender Gegenfärbung überwiegend als BlamD, welches, wenn reichlich vorhanden und Membrandebris aufwies, als histologisches Zeichen einer fortgeschrittenen AMD gewertet werden kann.<sup>14,39</sup> Zumindest entsprechen unsere Werte zur Höhe der basalen Ablagerungen denen der BlamDs in anderen Studien.<sup>8</sup> Es scheint plausibel, dass solch massive basale Ablagerungen die normale Versorgung des RPE aus der Choriokapillaris über die Bruch-Membran kompromittieren mit langfristig negativen Folgen auf die Zellhomöostase, Struktur und Funktion der Photorezeptoren. Bei sehr ausgeprägten basalen Ablagerungen, die wir bis zu einer maximalen Höhe von 21µm nahe der RPE-Atrophie gemessen haben, halten wir es für durchaus möglich, dass in den betroffenen Regionen das Bruch-Membran-Signal getrennt von RPE-Signal im SD-OCT dargestellt werden könnte.<sup>98,101</sup>

Neben der morphometrischen Analyse der RPE-Zellen wurde auch in den unterschiedlichen Degenerationsgraden die Autofluoreszenz einzelner RPE-Zellen untersucht. Das mit dem Alter im RPE zunehmend abgelagerte Lipofuszin, inklusive des zytotoxischen Hauptbestandteils A2E, wird als Hauptquelle der Fd-AF angesehen.<sup>87,88</sup> Verschiedene Muster einer erhöhten Fd-AF spielen eine große klinische

Bedeutung zur Beurteilung des Progressionsrisikos einer GA.<sup>2,47</sup> Von vielen wird die vermehrte Ablagerung von Lipofuscin als pathogenetisch wichtiger Faktor in der AMD-Entwicklung gesehen.<sup>85,86</sup> In unserer Studie scheint anhand der Summen-Autofluoreszenz individueller RPE-Zellen diese Annahme bis zum RPE-Degenerationsgrad 2 plausibel. Bei RPE-Zellen höheren Degenerationsgrades nimmt die Summen-Autofluoreszenz wieder ab, was darauf hindeuten könnte, dass diese Zellen entweder das Potenzial verlieren, Abbauprodukte zellschonend in Lipofuscin-Granula abzulagern oder dass diese Granula zerfallen und vermehrt zytotoxische Substanzen freisetzen.<sup>82</sup> Für die Detektierbarkeit einer vermehrten RPE-Degeneration in der Fd-AF ist jedoch die durchschnittliche Autofluoreszenz einzelner RPE-Zellen wichtig. Sie ist eine Funktion aus den insgesamt vorliegenden Lipofuscingranula (darstellbar als Summen-Autofluoreszenz) und der Zellgröße. Gerade größere RPE-Zellen zeigten hier eine Art Verdünnungseffekt mit reduzierter durchschnittlicher Autofluoreszenz. Mit den RPE-Degenerationsgraden 1 und 2 lagen die 14,0-16,5% der gemessenen Zellen mit ihrer durchschnittlichen Autofluoreszenz über dem 95%-KI der normalen RPE-Zellen. Rechnet man noch eine theoretische 10%-Schwelle über dem 95%-KI zur besseren Unterscheidung ein, reduziert sich die Detektierbarkeit einzelner Zellen auf 7,6-9,4%. RPE-Zellen vom Degenerationsgrad 3 lagen nie oberhalb des 95%-KI normaler RPE-Zellen. Dies wäre deutlich zu wenig für die auffällig erhöhten Fd-AF-Muster in der klinischen Bildgebung.<sup>47</sup> Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass eine Überlagerung verschiedener degenerativer RPE-Zellen, wie sie vor allem in Zonen vom RPE-Degenerationsgrad 2 zu finden waren, mehr zur einer erhöhten Fd-AF beitragen als eine Erhöhung der durchschnittlichen Autofluoreszenz pro RPE-Zelle.<sup>67,77</sup>

Wie jede Studie weist auch die hier vorliegende Studie klare Limitationen auf. Wir haben keine histologischen Färbungen der Präparate durchgeführt. Hierauf wurde ganz bewusst verzichtet, da die Histologien zuvor in einer anderen Studie genutzt wurden, in der die natürliche Autofluoreszenz des RPEs untersucht werden sollte.<sup>67</sup> Zellgrenzen waren durch DIC trotzdem gut abzugrenzen, jedoch kann es sein, dass kleine Zellen schlechter darzustellen oder von degenerativen Zellresten abzugrenzen waren und somit nicht bei den lichtmikroskopischen Ausmessungen berücksichtigt wurden. Außerdem lassen sich keine Zusatzaussagen treffen über die genaue Genese

einiger Veränderungen (z.B. Grad 3 RPE) im Detail, da keine Spezialfärbungen (z.B. Makrophagenmarker) angewandt wurden. Wir haben deshalb ein einfaches Klassifikationssystem für degenerative RPE-Veränderungen genutzt, das jedoch alle wichtigen RPE-Veränderungen im Rahmen einer GA abbildet. Natürlich müssen immer Post-mortem-Artefakte wie Zellschwellungen durch beginnende Autolyse und Präparationsartefakte berücksichtigt werden, welche nie ganz ausgeschlossen werden können und potenziell die Messungen verfälschen. Ein Vorteil unserer Studie war jedoch die relativ kurze post-mortem-Zeit bis zur Fixierung, um derartige Artefakte zu minimieren. Zudem haben wir offensichtliche Schnittartefakte von vornherein von Messungen ausgeschlossen. Trotz der genannten systematischen Einschränkungen waren unsere Messergebnisse plausibel und dicht an denen von anderen histologischen Studien, die Gegenfärbungen und ein aufwendigeres Klassifikationssystem mit umfassender RPE-Phänotypisierung genutzt haben. <sup>8,97</sup>

## 6. Zusammenfassung

**Ziel der Arbeit:** In der experimentell-histologischen Arbeit wurden degenerative Veränderungen des retinalen Pigmentepithels (RPE), inkl. Autofluoreszenz (AF), im Randbereich einer geographischen Atrophiezone vermessen, um zu beurteilen, ob diese Veränderungen bereits mit heute allgemein zur Verfügung stehenden klinischen Techniken (z.B. SD-OCT) detektierbar sind.

**Hintergrund:** Die fortgeschrittene trockene Form der altersbedingten Makuladegeneration (AMD) ist durch eine langsam progrediente Degeneration des RPE bis hin zu dessen Atrophie im Makulabereich gekennzeichnet. Klinisch interessant für eine Prognosebestimmung ist die richtige Interpretation von RPE-Veränderungen im unmittelbaren Randbereich einer Atrophiezone mittels hochauflösender Bildgebung.

**Material und Methoden:** Es wurden 7 Hornhautspenderaugen mit GA bei AMD verwendet. Jeweils 3 histologische Schnitte pro Auge wurden licht- und fluoreszenzmikroskopisch standardisiert untersucht und mittels eines etablierten Klassifikationssystems in Zonen unterschiedlicher RPE-Degenerationsgrade unterteilt. Analysiert wurden jeweils morphologische Parameter der gesamten RPE-Schicht sowie individueller RPE-Zellen. AF-Daten wurden nur für individuelle RPE-Zellen ausgewertet.

**Ergebnisse:** Von der äußeren Makula zur zentralen RPE-Atrophie hin zeigte das RPE eine stetige Zunahme des Grades der zellpathologischen Veränderungen. Zone 2 zeigte die deutlichste Variabilität der Zellschichthöhe mit hypertrophen, überlagerten Zellen neben atrophem RPE. Diese Zone könnte je nach Auflösung zu 53,4 - 64,1% klinisch detektiert werden. Sogar 13,4 - 16,8% der RPE-Zellen sind in dieser Zone groß genug, um als einzelne Zellen erkannt zu werden. In niedrigen RPE-Degenerationsgraden zeigte sich zunächst eine Zunahme der Autofluoreszenz, die jedoch bei höheren Graden wieder abnahm.

**Diskussion:** Unsere Daten liefern wichtige Informationen über histologische Phänomene und deren Größeneinordnung im Randbereich der RPE-Atrophie, die für die Interpretation klinischer Bildgebung wichtig sind. Eine vermehrte Lipofusceinsammlung kann aufgrund unserer Daten nicht alleine Grund für eine erhöhte Fundus-AF im Randbereich der RPE-Atrophie sein.

## 7. Literatur

1. Ach T, Best G, Ruppenstein M, Amberger R, Cremer C, Ditmar S. Hochauflösende Fluoreszenzmikroskopie des retinalen Pigmentepithels mittels strukturierter Beleuchtung, *Ophthalmologie* 2010;107:1037-1042.
2. Age-related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C und E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss; AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1417-1436.
3. Akagi-Kurashige Y, Tsujikawa A, Oishi A, et al. Relationship between retinal morphological findings and visual function in age-related macular degeneration. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2012;250:1129-36.
4. Arima M, Miyazaki M, Kohno RI, et al. An early “reopening” case of idiopathic macular hole; supportive usefulness of fundus autofluorescence. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2009;247:711-704.
5. Augood CA, Vingerling JR, de Jong PT, Chakravarthy U, Seland J, Soubrane G, et al. Prevalence of age-related maculopathy in older Europeans: the European Eye study (EUREYE). *Arch Ophthalmol* 2006;124:529-535.
6. Bahadorani S, Singer M. Recent advances in the management and understanding of macular degeneration. *F1000Res* 2017;6:519.
7. Balaratnasingam C, Messinger JD, Sloan KR, Yannuzzi LA, Freund KB, Curcio CA. Histologic and optical coherence tomographic correlates in drusenoid pigment epithelium detachment in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2017;124:644-656.
8. Bearely S, Chau FY, Koreishi A, et al. Spectral domain optical coherence tomography imaging of geographic atrophy margins. *Ophthalmology* 2009;116:1762-69.
9. Bearely S, Khanifar AA, Leserer DE, et al. Use of fundus autofluorescence images to predict geographic atrophy progression. *Retina* 2011;31:81-6.
10. Beutel J, Rudolf M, Grisanti S. Current and future therapies for age-related macular degeneration. *Expert Opin Drugs* 2009;14(2):341-62.
11. Bindewald A, Roth F, Schmitz-Valkenberg S, Scholl HPN, Holz FG. Fundus autofluorescence imaging. In: Holz FG, Spaide RF (eds.) *Medical retina*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2005:20-34.
12. Bindewald A, Schmitz-Valckenberg S, Jorzik JJ, et al. Classification of abnormal fundus autofluorescence patterns in the junctional zone of geographic atrophy in patients with age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 2005;89:874-87.

13. Bolz M, Schmidt-Erfurth U, Deak G, et al. Optical coherence tomographic hyper-reflective foci: a morphologic sign of lipid extravasation in diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2009;116:914-20.
14. Brancato R, Lumbroso B. Guide: to optical coherence tomography interpretation. INC Innovation News Commun. Rom, 2004.
15. Brandl C, Stark K.J, Wintergerst M, Heinemann M, Heid IM, Finger RP. Epidemiologie der altersbedingten Makuladegeneration. *Ophthalmologie* 2016;113:735-744.
16. Brinkmann CK, Adrion C, Mansmann U, Schmilz-Valckenberg S, Holz FG. Klinische Merkmale, Progression und Risikofaktoren bei geographischer Atrophie. *Ophthalmologie* 2010;107:999-1006.
17. Capon MR, Marshall J, Kraft JI, et al. Sorsby's fundus dystrophy. A light and electron microscope study. *Ophthalmology* 1989;96:1769-77.
18. Chiu CJ, Milton RC, Klein R, et al. Dietary compound score and risk of age-related macular degeneration in the age-related eye disease study. *Ophthalmology* 2009;116:939-946.
19. Cideciyan AV, Swider M, Aleman TS, et al. Reduced-illuminance autofluorescence imaging in ABCA4-associated retinal degenerations. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis* 2007;24:1457-1467.
20. Cong R, Zhou B, Sun Q, et al. Smoking and the risk of age-related macular degeneration: a meta-analysis. *Ann Epidemiol* 2008;18:647-656.
21. Curcio CA, Zanzottera EC, Ach T, Balaratnasingam C, Freund KB. Activated retinal pigment epithelium, an optical coherence tomography biomarker for progression in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58: BIO226.
22. Curcio CA, Johnson M, Rudolf M, Huang JD. The oil spill in ageing Bruch membrane. *Br J Ophthalmol* 2011;95:1638-45.
23. Curcio CA, Millican CL. Basal linear deposit and large drusen are specific for early age-related maculopathy. *Arch Ophthalmol* 1999;117:329-39.
24. Curcio CA, Medeiros NE, Millican CL. The Alabama Age-Related Macular Degeneration Grading System for donor eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1085-96.
25. Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE. Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol* 1990;22;292(4):497-523.
26. Delori FC, Dorey CK, Staurenghi G, et al. In vivo fluorescence of the ocular exhibits retinal pigment epithelium lipofuscin characteristics. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36:718-729.

27. Delori F, Greenberg JP, Woods RL, et al. Quantitative measurements of autofluorescence with the scanning laser ophthalmoscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:9379-90.
28. Dithmar S, Holz FG. *Fluoreszenzangiographie in der Augenheilkunde*. Springer, Heidelberg, 2007
29. Feeney-Burns L, Hilderbrand ES, Eldridge S. Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1984;25:195-200.
30. Ferrara D, Silver RE, Louzada RN, Novais EA, Collins GK, Seddon JM. Optical coherence tomography features preceding the onset of advanced age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58:3519-3529.
31. Fleckenstein M, Schmitz-Valckenberg S, Martens C, et al. Fundus Autofluorescence and Spectral Domain Optical Coherence Tomography Characteristics in a Rapidly Progressing Form of Geographic Atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:3761-66.
32. Fleckenstein M, Schmitz-Valckenberg S, et al. Progression of Age-Related Geographic Atrophy: Role of the Fellow Eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:6552-57.
33. Fleckenstein M, Wolf-Schnurrbusch U, Wolf S, et al. Bildgebende Diagnostik bei geographischer Atrophie. *Ophthalmologe* 2010;107:1007-1015.
34. Fleckenstein M, Charbel Issa P, Helb HM, et al. High-resolution spectral domain-OCT imaging in geographic atrophy associated with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:4137-4144.
35. Folgar FA, Yuan EL, Farsiu S, Toth CA. Lateral and axial measurement differences between spectral-domain optical coherence tomography systems. *J Biomed Opt* 2014;19:16014.
36. Framme C, Wolf S, Wolf-Schnurrbusch U. Small dense particles in the retina observable by spectral-domain optical coherence tomography in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:5965-9.
37. Francis PJ, Hamon SC, Ott J, et al. Polymorphisms in C2, CFB and C3 are associated with progression to advanced age related macular degeneration associated with visual loss. *J Med Genet* 2009;46:300-307.
38. Gallagher-Colombo S, Maminishkis A, Tague S, et al. Expression of MCT3 expression during wound healing of the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:5343-50.
39. Greenstein VC, Santos RA, Tsang SH, et al. Preferred retinal locus in macular disease: characteristics and clinical Implications. *Retina* 2008;28:2124-2140.

40. Grisanti S, Guidry C, Heimann K. Extracellular matrix contraction by transdifferentiated retinal pigment epithelial cells; promoters and inhibitors. *Ophthalmologie* 2011;93:709-713.
41. Guidry C, Medeiros NE, Curcio CA. Phenotypic variation of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:267-73.
42. Hahn P, Qian Y, Dentchev T, et al. Disruption of ceruloplasmin and hephaesin in mice causes retinal iron overload and retinal degeneration with features of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:13851-5.
43. Hilton CF. Subretinal pigment migration. Effects of cryosurgical retinal reattachment. *Arch Ophthalmol* 1974;91:445-50.
44. Holz FG. Atrophie-Progression bei altersabhängiger Makuladegeneration. *Ophthalmologie* 2017;114:974-975.
45. Holz FG, Steinberg JS, Gobel A, Fleckenstein M, Schmitz-Valckenberg S. Fundus autofluorescence imaging in dry AMD: 2014 Jules Gonin lecture of the Retina Research Foundation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2015;253:7-16.
46. Holz FG, Strauss EC, Schmitz-Valckenberg S, van Lookeren Campagne M. Geographic atrophy: clinical features and potential therapeutic approaches. *Ophthalmology* 2014;121:1079-91.
47. Holz FG, Bindewald-Wittich A, Fleckenstein M, et al. Progression of geographic atrophy and impact of fundus autofluorescence patterns in age related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 2007;143:463-472.
48. Holz FG, Bellmann C, et al. Fundus Autofluorescence and Development of Geographic Atrophy in Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:1051-1056.
49. Holz FG, Bellmann C, et al. Patterns of increased in vivo fundus autofluorescence in the junctional zone of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium associated with age-related macular degeneration. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237:145-152.
50. Hüttmann G, Lankenau E, Schulz-Wackerbarth C, Müller M, Steven P, Birngruber R. Optical coherence tomography: from retina imaging to intraoperative use - a review. *Klin Monbl Augenheilkd* 2009;226:988-964.
51. Hwang JC, Chan JW, Chang S, Smith RT. Predictive value of fundus autofluorescence for development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:2655 - 61.
52. Jackson GR, Curcio CA, Stoan KR, Owsley C. Photoreceptor degeneration in aging und age-related maculopathy. In: Penfold PL, Provis JM (eds.) *Macular Degeneration*. Springer, Berlin, 2005:45-62.



53. Kaneko H, Dridi S, Travallo V, et al. DICER1 deficit induces Alu RNA toxicity in age-related macular degeneration. *Nature* 2011;471:325-30.
54. Kanski JJ. *Klinische Ophthalmologie*. 7. Auflage, Urban & Fischer Verlag, 2012.
55. Kellner S, Kellner U, Weber BHF, et al. Lipofuscin-and melanin-related fundus autofluorescence in patients with ABCA4-associated retinal dystrophies. *Am J Ophthalmol* 2009;147:895-902.
56. Kellner U, Kellner S, Weinitz S. Fundus autofluorescence (488nm) and near-infrared autofluorescence (787 nm) visualize different retinal pigment epithelium alterations in patients with age-related macular degeneration. *Retina* 2010;30:6-15.
57. Klein R, Klein BE, Tomany SC, Meuer SM, Huang GH. Ten year incidence and progression of age-related maculopathy: The Beaver Dam Eye Study. *Ophthalmology* 2002;109:1767-1779.
58. Kubota R, Boman NL, David R, et al. Safety and effect on rod function of ACU-4429, a novel small-molecule visual cycle modulator. *Retina* 2012;32:183-8.
59. Kuntz CA, Jacobson SG, Cideciyan AV, et al. Sub-retinal pigment epithelial deposits in a dominant late-onset retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:1772-82.
60. Maller J, George S, Purcell S, et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2006;38:1055-1059.
61. McLeod DS, Grebe R, Bruno J, et al. Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:4982-4991.
62. Noshfegi AA, Mavrofrides EC, Puliafito C. Optical coherence tomography and retinal thickness assessment for diagnosis and management. In: Ryan S (ed.) *Retina*, 4th edn. Mosby, St Louis, 1583-1556, 2006.
63. Oishi M, Oishi A, Linder M, et al. Structural changes in optical coherence tomography underlying spots of increased autofluorescence in the perilesional zone of geographic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58:3303-3310.
64. Ota M, Nishijima K, Sakamoto A, et al. Optical coherence tomographic evaluation of foveal hard exudates in patients with diabetic maculopathy accompanying macular detachment. *Ophthalmology* 2010;117:1996-2002.
65. Robson AG, Michaelides M, Saihan Z, et al. Functional characteristics of patients with retinal dystrophy that manifest abnormal parafoveal annuli of high density fundus autofluorescence ; a review and update. *Doc Ophthalmol* 2008;116:79-89.
66. Rudolf M, Wagner A, Curcio CA<sup>2</sup>, Read R. Autofluorescence of Individual Cells in Histological Sections of Eyes with Geographic Atrophy (GA). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:1763.

67. Rudolf M, Wagner A, Vogt SD, Curcio CA, et al. Histologic basis of variations in retinal pigment epithelium autofluorescence in eyes with geographic atrophy. *Ophthalmology* 2013;120:821-8.
68. Sarks SH. Ageing and degeneration in the macular region: a clinico-pathological study. *Br J Ophthalmol* 1976;60:324-41.
69. Sarks JP, Sarks SH, Killingsworth MC. Evolution of geographic atrophy of the retinal pigment epithelium. *Eye (Lond)* 1988;2:552-77.
70. Sayegh RG, Simader C, Scheschy U, et al. A systematic comparison of spectral-domain optical coherence tomography und fundus autofluorescence in patients with geographic atrophy. *Ophthalmology* 2011;118:1844-1851.
71. Schmitz-Valckenberg S, Fleckenstein M, Scholl HP, et al. Fundus autofluorescence and progression of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2009;54:96-117.
72. Schmitz-Valckenberg S, Bindewald-Wittich A, Dolar-Szezasny J, et al. Fundus Autofluorescence in Age-Related Macular Degeneration Study Group. Correlation between the area of increased autofluorescence surrounding geographic atrophy and disease progression in patients with AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:2648-54.
73. Schmitz-Valckenberg S, Fleckenstein M, Helb HM, et al. In-vivo imaging of foveal sparing in geographic atrophy secondary to age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3915-3921.
74. Schmitz-Valckenberg S, Holz FG. Geographische Atrophie bei AMD. *Ophthalmologie* 2010;107:997-998.
75. Schmitz-Valckenberg S, Fleckenstein M, Göbel AP et al. Evaluation of autofluorescence imaging with the scanning laser ophthalmoscope and the fundus camera in age-related geographic atrophy. *Am J Ophthalmol* 2008;146:183-92.
76. Schmitz-Valckenberg S, Mößner A, Fleckenstein M, Wiedemann P, Holz FG. Therapieansätze bei geographischer Atrophie. *Ophthalmologie* 2010;107:1016-1019.
77. Schmitz-Valckenberg S, Bultmann S, Dreyhaupt J, Bindewald A, Holz FG, Rohrschneider K. Fundus autofluorescence and fundus perimetry in the junctional zone of geographic atrophy in patients with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;45:4470-6.
78. Schmitz-Valckenberg S, Holz FG, Bird AC, et al. Fundus autofluorescence imaging: review and perspectives. *Retina* 2008;28:385-409.
79. Schuman JS, Puliafito C, Fujimoto J (eds) *Optical coherence tomography of ocular diseases*, Slack, Thorofare, New Jersey, 2004.
80. Smith RT, Gomes NL, Barile GR, et al. Lipofuscin and autofluorescence metrics in progressive STGD. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:3907-14.

81. Smith W, Assink J, Klein R, Mitchell P, et al. Risk factors of age-related macular degeneration: Pooled findings from three continents. *Ophthalmology* 2001;108:697-704.
82. Spaide R. Autofluorescence from the outer retina and subretinal space: hypothesis and review. *Retina* 2008;28:5-35.
83. Spaide RF, Armstrong D, Browne R. Continuing medical education review: choroidal neovascularization in age-related macular degeneration – what is the course? *Retina* 2003;23:595-614.
84. Spaide RF. Chorioretinal inflammatory disorders. In: Holz FG, Schmitz-Valkenberg S, Spaide RF, Bird AC (eds.) *Atlas of Fundus Autofluorescence Imaging*. Springer, Berlin, 2007:207-39.
85. Sparrow JR, Yoon KD, Wu Y, Yamamoto K. Interpretations of fundus autofluorescence from studies of the bisretinoids of the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:4351-7.
86. Sparrow JR, Gregory-Roberts E, Yamamoto K, et al. The bisretinoids of retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res* 2012;31:121-35.
87. Staurengi G, Sadda S, Chakravarthy U, Spaide RF. International nomenclature for optical coherence tomography P. Proposed lexicon for anatomic landmarks in normal posterior segment spectral-domain optical coherence tomography: the IN\*OCT cobsensus. *Ophthalmology* 2014;121:1572-1578.
88. Sunness JS. The natural history of geographic atrophy, the Advanced atrophic form of age-related macular degeneration. *Mol Vis* 1999;5:25-29.
89. Sunnes JS, Margalit E, Srikumaran D, et al. The long-term natural history of geographic atrophy from age-related macular degeneration: enlargement of atrophy and implications for interventional clinical trials. *Ophthalmology* 2007;114:271-7.
90. Thompson CL, Jun G, Klein BE, Klein R, Capriotti J, Lee KE, et al. Genetics of pigment changes and geographic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:3005-3013.
91. Torrent-Depouy J, Wagner A, Grisanti S, Vogt SD<sup>2</sup>, Read RW<sup>2</sup>, Curcio C<sup>2</sup>, Rudolf M, et al. Morphometry of Cell Phenomena in Histological Sections of Geographic Atrophy (GA) due to Age related Macular. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:4943.
92. van der Schaft TL, Mooy CM, de Bruijn WC, et al. Histologic features of the early stages of age-related macular degeneration: a statistical analysis. *Ophthalmology* 1992;99:278-86.
93. Vogt SD, Curcio CA, Wang L, et al. Retinal pigment epithelial expression of complement regulator CD46 is altered early in the course of geographic atrophy. *Exp Eye Res* 2011;93:413-23.

94. Vogt SD, Barnum SR, Curcio CA, Lesen RW. Distribution of complement anphylatoxin receptors and membrane-bound regulators in normal human retina. *Exp Eye Res* 2006; 83:834-40.
95. von Rückmann A, Fitzke FW, Bird AC. Distribution of fundus autofluorescence with a scanning laser ophthalmoscope. *Br J Ophthalmol* 1995;79:407-12.
96. Wagner A, Mohi A, Ranjbar M, Grisanti S, Rudolf M. RPE morphometry in geographic atrophy due to AMD. *Ophthalmologie* 2018;Jan 8. doi: 10.1007.
97. Wang J, Rochtchina E, Lee AJ, Chia EM, Smith W, Cumming RG, et al. Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: The Blue Mountains Eye Study. *Ophthalmology* 2007;114:92-98.
98. Wiesinger K, Reinelt P, Ennemoser A, Edelmayr M, Schönherr U. What can anti-VEGF therapy achieve in clinical routine? Effectiveness of anti-VEGF therapy in patients with macular diseases in clinical routine on 1492 eyes in Austria. *Ophthalmologie* 2017;114:639-645.
99. Yates JR, Sepp T, Matharu BK, et al. Complement C3 variant and the risk of age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2007;357:553-561.
100. Zanzottera EC, Ach T, Huisingh C, Messinger JD, Freund KB, Curcio CA. Visualizing retinal pigment epithelium phenotypes in the transition to atrophy in neovascular age-related macular degeneration. *Retina* 2016;36 (Suppl 1):S26-S39.
101. Zanzottera EC, Messinger JD, Ach T, Smith RT, Freund KB, Curcio CA. The Project MACULA Retinal Pigment Epithelium Grading System for Histology and Optical Coherence Tomography in Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:3253-68.

## 8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Martin Rudolf für die Überlassung des interessanten Themas und seine uneingeschränkte Unterstützung bei der Fertigstellung meiner Arbeit.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Salvatore Grisanti für die Möglichkeit, die Doktorarbeit in seiner Abteilung zu erstellen.

Ich bedanke mich weiterhin bei Frau Petra Hammermeister für die kompetente Unterstützung bei der Organisation während der gesamten Phase meiner Arbeit.

Wir danken der Alabama Eye Bank für den Abruf von Spender-Augen und der Labormitarbeiterin Frau Christine Örün für die professionelle Vorbereitung der Kryoschnitte und die Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit.

Diese Arbeit wurde von der Internationalen Retinal Research Foundation, Deutsche Forschungsgemeinschaft (13942), Themenbezogene Forschungsförderung 2008 der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft, und die AMD-Förderpreis 2009 der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft unterstützt.

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Mann, meine Kinder und meine Eltern. Ohne ihre geduldige und liebevolle Unterstützung hätte ich diese Arbeit nicht fertigstellen können.

## 9. LEBENS LAUF

Anna Wagner

Albert-Lezius-Straße 16

23562 Lübeck

Tel.: 0451-2804241, Mobil: 0172 7858323

wagner.anna@t-online.de



## PERSÖNLICHE DATEN

---

<b>Geburtsdatum</b>	23.01.1977
<b>Geburtsort</b>	Nursultan / Kasachstan
<b>Familienstand</b>	verheiratet seit 08.08.1998
<b>Ehemann</b>	Andrey Wagner (Leitender Oberarzt / Segeberger Kliniken; Facharzt für Allgemein & Viszeral Chirurgie)
<b>Kinder</b>	Daniel Wagner, geb.12.2001 Diana Sophie Wagner, geb.10.2012
<b>06.2001</b>	Einreise nach Deutschland als Spätaussiedlerin
<b>Staatsangehörigkeit</b>	deutsch

## AUSBILDUNG

---

<b>09/83 - 05/93</b>	Chemisch-biologisches Lyzeum / Nursultan Allgemeine Hochschulreife mit Auszeichnung
<b>09/93 - 05/99</b>	Studium: Medizinische Akademie / Nursultan Fachrichtung: Humanmedizin Abschluss: Diplom mit Auszeichnung

## WEITERBILDUNG

---

<b>09/99 - 05/2000</b>	Internatur (entspr. AiP) für Augenheilkunde in Nursultan Abschluss: Zertifikat-Fachärztin für Augenheilkunde
<b>06/2000 - 06/2001</b>	Augenklinik für Kinder in Nursultan als Fachärztin
<b>09/2003 - 04/2004</b>	Uniklinikum für Ophthalmologie Kiel / Assistenzärztin
<b>01/2005</b>	deutsche Approbation
<b>01/2005 - 05/2008</b>	Augenpraxisklinik Lübeck als Assistenzärztin
<b>05/2008</b>	<b>Anerkennung als Fachärztin für Augenheilkunde</b>

## BERUFSERFAHRUNG

---

<b>05/2008 - 31.03.2016</b>	Augenpraxisklinik Lübeck / Fachärztin  Schwerpunkt: Makulaerkrankungen, endokrine Orbitopathie, Ultraschalldiagnostik, inkl. UBM
<b>01.04.2016 – 30.06.2017</b>	Augenarztpraxis Kücknitz / Leitende Fachärztin
<b>01.07.2017 - 31.12.18</b>	Augenklinik UKSH / Fachärztin / Oberärztin
<b>01.01.2019</b>	Eröffnung einer eigenen Augenarztpraxis in Lübeck

## PUBLIKATIONEN, VORTRÄGE, STUDIEN

---

<b>18.06.2011</b>	Fortbildung Augenpraxisklinik Lübeck  Vortrag: Ultraschalldiagnostik, Fälle aus der Praxis. Spätlese
<b>06.06.2012</b>	Fortbildung Augenpraxisklinik Lübeck  Vortrag: Fallvorstellung Ozurdex - 18 Monate Erfahrung

- 08.06.2012** Jahreshkongress Norddeutscher Augenärzte Hamburg
- Vortrag: Diagnose des Non-Hogkin-Lymphoms (NHL) bei einseitigem Mikulicz-Syndrom durch Ultraschall
- 08.2011 - 08.2012** Teilnahme an Beobachtungsstudie zur Behandlung von Patienten mit feuchter AMD
- 12.2011 - 02.2012** Teilnahme an "AURA" Studie (Behandlung und Versorgung von Patienten mit feuchter AMD)
- ab 07.2017** Teilnahme an folgenden Studien:
1. PACIFIC (CRFB002ADE28) – Nicht-interventionelle Studie mit Lucentis® - Beobachtung von Therapieansätzen mit Lucentis® (Ranibizumab) im Behandlungsgalltag in allen zugelassenen Indikationen
  2. Study Comparing Combination of LGX818 Plus MEK162 versus Vemurafenib and LGX818 Monotherapy in BRAF Mutant Melanoma (COLUMBUS)
  3. Study Comparing the Efficacy of MEK162 versus Dacarbazine in Unresectable or Metastatic NRAS Mutation-positive Melanoma (NEMO)
  4. Phase III-Studie: zur Beurteilung der Vakzinierung mit Tumor-RNA beladenen, autologen dendritischen Zellen vs Pat. mit resezierten Uveamelanom mit nachgewiesener Monosomie 3

## BESONDERE KENNTNISSE

---

- russisch** Muttersprachkenntnisse
- 09/94 - 05/97** Musikschule Nursultan; Klasse: Klavier

Lübeck, den 02.09.2019