

**Detektion der diabetischen *small fibre* Neuropathie
durch Untersuchung der
kornealen und intraepidermalen Nervenfasern
von Thy1-YFP Mäusen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
an der Universität Rostock

eingereicht am 07.09.2020
von **Janine Leckelt** aus Rostock
geb. 24.01.1986 in Berlin

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003103

Medizinische Fakultät I Institut für medizinische Biochemie und Molekularbiologie I
Schillingallee 70, 18057 Rostock I Institutsdirektor Prof. Markus Tiedge

Dekan: Prof. Dr. Emil Reisinger

1. Gutachter:

Prof. Dr. Simone Erika Baltrusch,
Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Oliver Stachs
Universitätsmedizin Rostock

3. Gutachter:

Prof. Dr. Ingo Rustenbeck
Technische Universität Braunschweig

Datum der Disputation: 07.06.2021

***„Jedes Naturgesetz, das sich dem Beobachter offenbart, lässt auf ein
höheres, noch unerkanntes schließen.“***

Alexander von Humboldt

Tagungsbeiträge

Janine Leckelt, Annett Kott, Oliver Stachs, Simone Baltrusch: Hyperglykämie führt zu Veränderungen im Zentrum der Cornea; *50. Jahrestagung der DDG, Berlin*

Janine Leckelt, Annett Kott, Oliver Stachs, Simone Baltrusch: Corneal nerve fibre damage and repair starts from the centre of the cornea in diabetic STZ-and Insulin-treated Thy1-YFP mice; *EASD Stockholm 2015*

Janine Leckelt, Florian Thomas, Annett Kott, Rica Waterstradt, Oliver Stachs, Anselm Jünemann, Markus Tiedge, Simone Baltrusch: Eine hohe RAGE-Expression könnte für das frühzeitige Auftreten von Diabetes mellitus assoziierten neuropathischen Schädigungen der Kornea verantwortlich sein; *52. Jahrestagung der DDG, Berlin*

Janine Leckelt, Florian Thomas, Annett Kott, Rica Waterstradt, Oliver Stachs, Anselm Jünemann, Markus Tiedge, Simone Baltrusch: High RAGE expression might be responsible for early corneal nerve fibre damage in diabetic individuals; *EASD Berlin 2018*

Publikationen

Ehmke T, Leckelt J, Reichard M, Weiss H, Hovakimyan M, Heisterkamp A, Stachs O, Baltrusch S. In vivo nonlinear imaging of corneal structures with special focus on BALB/c and streptozotocin-diabetic Thy1-YFP mice. *Experimental Eye Res.* **2016 May**

Leckelt J, Guimarães P, Kott A, Ruggeri A, Stachs O, Baltrusch S. Early detection of diabetic neuropathy by investigating CNFL and IENFD in thy1-YFP mice. *Journal Endocrinology* **2016 Nov.**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Tabellenverzeichnis	X
1 EINLEITUNG	1
1.1 Diabetes mellitus	1
1.1.1 Diabetes mellitus – Definition und Klassifikation.....	1
1.1.2 Epidemiologie des Diabetes mellitus	3
1.1.3 Komplikationen des Diabetes mellitus	4
1.2.1 Diabetische Neuropathie – Klassifikation	6
1.2.2 Die diabetische sensomotorische Polyneuropathie.....	7
1.2.2.1 Definition und klinische Manifestation.....	7
1.2.2.2 Epidemiologie und Risikofaktoren.....	8
1.2.2.3 Diagnostik der diabetischen sensomotorischen Polyneuropathie.....	9
1.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie der Kornea.....	11
1.3.1 Hintergrund und Entwicklung	11
1.3.2 Technik der in vivo CLSM.....	12
1.3.3 Aufbau und Funktion der Kornea	14
1.3.4 Visualisierung der kornealen Strukturen per in vivo CLSM	16
1.3.5 Topografie des sub-epithelialen Nervenplexus der Kornea.....	18
1.3.6 Quantifizierung morphologischer Parameter des sub-epithelialen Nervenplexus	20
1.3.7 Tierexperimente zur in vivo CLSM.....	22
2 MATERIALIEN UND METHODEN	28
2.1 Materialien.....	28
2.1.1 Chemikalien.....	28
2.1.2 Medikamente/Medizinprodukte.....	28
2.1.3 Kits	28
2.1.4 Antikörper	29
2.1.5 Geräte und Software	29
2.2 Tiermodelle und Tierhaltung.....	30
2.3 Tierversuchsvorhaben	30
2.4 Bestimmung der Blutglukosekonzentration	31
2.5 Bestimmung des Körpergewichts.....	31
2.6 Bestimmung der Hämoglobin A1c-Werte.....	31
2.7 Blut-Serum Assays	32
2.7.1 Gewinnung des Blutserums	32
2.7.2 ELISA zur Ermittlung des C-Peptid-Gehalts	32
2.7.3 ELISA zur Ermittlung der AGEs-Konzentration.....	33

2.8 Induktion eines Diabetes mellitus	34
2.9 Implantationen von Insulin-Pellets.....	34
2.10 In vivo konfokale Laserscanning-Mikroskopie.....	34
2.10.1 Narkotisierung der Versuchstiere	34
2.10.2 Bildaufnahmen des sub-epithelialen Nervenplexus der Kornea	35
2.10.3 Quantifizierung der sub-epithelialen Nervenfasern der Kornea	36
2.11 Ex Vivo Fluoreszenzmikroskopie der Kornea.....	37
2.11.1 Extraktion und Asservierung der Kornea	37
2.11.2 Unterteilung der Kornea	37
2.11.3 Ex Vivo Bildaufnahmen der Kornea	38
2.11.4 Quantifizierung des sub-epithelialen Nervenplexus.....	39
2.12 Ex Vivo Fluoreszenzmikroskopie der Hautbiopsie	39
2.12.1 Extraktion der Hautbiopsie.....	39
2.12.2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung (IIF).....	39
2.12.3 Ex Vivo Bildaufnahmen der Hautbiopsie des Fußes	40
2.12.4 Quantifizierung der intraepidermalen Nervenfasern der Hautbiopsie	41
2.13 Statistische Auswertung	42
3 ERGEBNISSE	43
3.1 Parameter des Stoffwechsels	43
3.1.1 Blutglukoseverlauf	43
3.1.2 Körpergewichtsverlauf	44
3.1.3 C-Peptid-Konzentrationen	45
3.1.4 HbA1c-Werte	45
3.2.1 Longitudinaler Verlauf der kornealen Nervenfasernlänge	46
3.2.2 Vergleich manuelle und automatische Quantifizierung.....	48
3.2.3 Korrelation der CNFL zu den HbA1c- und Serum-AGEs-Konzentrationen	50
3.3 Ex vivo Fluoreszenzmikroskopie der Kornea	51
3.3.1 Manuelle und automatische Aufnahmen – der peripheren und zentralen Zonen.....	51
aller Quadranten der Kornea	51
3.3.2 Manuelle und Automatische Quantifizierung der peripheren Nervenfasern	53
3.3.3 Manuelle und Automatische Quantifizierung der zentralen Nervenfasern.....	54
3.3.4 Vergleich der ex vivo manuell und automatisch ermittelten CNFL	56
3.4 Ex vivo Fluoreszenzmikroskopie der Hautbiopsie.....	57
3.4.1 Intraepidermale Nervenfaserdichte.....	57
3.4.2 Korrelation der intraepidermalen Nervenfaserdichte zur CNFL	58

4	DISKUSSION	59
4.1	Vergleichende quantitative Analyse der kornealen und intraepidermalen Nervenfasern von Thy1-YFP Mäusen im Kontext einer diabetisch assoziierten <i>small fibre</i> Neuropathie.....	58
4.2	Streptozotocin als diabetogene Substanz.....	62
4.3	Einsatz der in vivo konfokalen Laserscanning-Mikroskopie	64
4.3.1	Vergleich mit anderen Tierversuchen.....	64
4.3.2	Vergleich zwischen in vivo und ex vivo erfassten Nervenfasern mittels manuellem und automatisiertem Analyseverfahren.....	65
4.4	Ex vivo Analyse der intraepidermalen Nervenfasern.....	66
4.5	Der transgene Mausstamm THY1-YFP.....	
5	AUSBLICK.....	69
6	ZUSAMMENFASSUNG	70
7	THESEN.....	72
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	73
	DANKSAGUNG	
	LEBENS LAUF	
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	

Abkürzungsverzeichnis

ADA	American Diabetes Association
CCM	<i>Corneal Confocal Microscopy</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene related peptide</i>
CLSM	<i>Corneal Laserscanning Microscopy</i>
CMNBD	<i>corneal main nerve fiber branch density</i>
CNBD	<i>Conreal nerve branch density</i>
CNFD	<i>Corneal nerve fiber density</i>
CNFL	<i>Corneal nerve fiber length</i>
CNFT	<i>Corneal nerve fiber tortuosity</i>
DM	Diabetes mellitus
DMP	<i>Disease Management Program</i>
DN	Diabetische Neuropathie
DPN	Diabetische Polyneuropathie
EFNS	<i>European Federation of Neurological Societies</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
HbA1c	HämoglobinA1c
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HOMA	Homeostasis Model Assessment
HRT	Heidelberg Retinotomograph
IDF	<i>Internatonal Diabetes Federation</i>
IENFD	Intraepidermale Nervenfaserdichte
IVCCM	<i>in vivo corneal confocal microscopy</i>
µm	Mikrometer
NDS	Neuropathie Defizit Score
nm	Nanometer
NSS	Neuropathie Symptom Score
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
RCM	Rostock Cornea Modul
QST	Quantitative Sensorische Tests
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SEP	Sub-epithelialer Nervenplexus
STZ	Streptozotocin
TRVP	<i>Transient receptor vanilloid potential</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: International Diabetes Federation (IDF). Atlas weltweite Diabetes Prävalenz.....	3
Abbildung 2: Konfokales Laser-Scanning Mikroskop und live in vivo Aufnahmen des sub-epithelialen Nervenplexus des menschlichen Auges per CCM.....	11
Abbildung 3: Aufbau und Strahlengang des HRT/RCM Systems	13
Abbildung 4: Aufbau des Auges, der Kornea und der angrenzenden Limbusregion.....	14
Abbildung 5: Konfokale Aufnahme (x,y,z) der Basalzellen der Kornea und schematische Abbildung zur prinzipiellen Bildentstehung.....	16
Abbildung 6: Orthograder Schnitt eines Z-stack Bildes der Kornea.....	17
Abbildung 7: Sub-epithelialer Nervenplexus der Kornea schematisch (A) und per IVCCM (B).....	18
Abbildung 8: Sub-epithelialer Nervenplexus linear im Zentrum verlaufend.....	19
Abbildung 9: Zusammengesetzte Mosaik-Aufnahme des sub-epithelialen Nervenplexus.....	20
Abbildung 10: IVCCM Aufnahmen des Sub-Epithelialen Nervenplexus der Kornea eines gesunden Probanden und eines Diabetikers	21
Abbildung 11: Zentrale Dickenmessung in μm der Kornea für Hund, Katze, Hase, Ratte und Maus	22
Abbildung 12: Die Superfizialzellen des Epithels von Hund und Kaninchen dargestellt, gefolgt von den Intermediärzellen beim Hund und Kaninchen.....	23
Abbildung 13: Anteriore Stroma eines Schafes, eines Hundes, einer Katze, eines Kaninchens, einer Ratte und einer Maus.....	24
Abbildung 14: Endothelzellen von Schaf, Hund, Katze, Kaninchen , Ratte, Maus.....	25
Abbildung 15: Zeitachse des Versuchsablaufs.	30
Abbildung 16: Schematisches Prinzip eines Sandwich-ELISA	32
Abbildung 17: Schematische Darstellung eines Sandwich ELISA.....	33
Abbildung 18: Fixierung und Positionierung der zu untersuchenden Maus im Mousefix-Animalholder	35
Abbildung 19: In vivo CCM Aufnahme des SEP der Kornea einer gesunden YFP-Maus	37
Abbildung 20: Unterteilung der Kornea eines linken Auges (A).....	38
Abbildung 21: FM Aufnahme des sub-epithelialen Nervenplexus (A).....	39
Abbildung 22: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung.....	40
Abbildung 23: Schematische Darstellung für die Erfassung intraepidermaler Nervenfasern gemäß der Empfehlung der EFNS..	41
Abbildung 24: 12-wöchiger Verlauf der Blutglukosekonzentration von diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen.....	43
Abbildung 25: Körpergewicht zwischen nicht-diabetischen und diabetischen Tieren	44
Abbildung 26: HbA1c-Werte von nicht-diabetischen und diabetischen Tieren	45
Abbildung 27: Serum-AGEs-Gehalt von nicht-diabetischen und diabetischen Tieren.....	46

Abbildung 28: 12-wöchiger Verlauf der kornealen Nervenfaserlänge (CNFL) von diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen	47
Abbildung 29: Exemplarische Abbildungen der in vivo CLSM Aufnahmen des sub-epithelialen Nervenplexus der Kornea von nicht-diabetischen und diabetischen Mäusen	48
Abbildung 30: Manuelle (A) und automatische Quantifizierung (B) der in vivo CCM-Aufnahmen..	49
Abbildung 31: Lineare Regressionsanalyse der CNFL in Abhängigkeit vom HbA1c-Wert und von der Serum-AGEs-Konzentration.	50
Abbildung 32: Exemplarische Abbildungen der ex vivo Aufnahmen des SEP (peripher und zentral)	51
Abbildung 33: Ex vivo Aufnahmen der inferioren Wirbelstruktur des SEP der Kornea einer nicht-diabetischen (A) und diabetischen Maus (B).....	52
Abbildung 34: Manuelle Quantifizierung/NeuronJ der peripheren Nervenfasern des SEP der Kornea in den Quadranten inferonasal (A), inferotemporal (B), superonasal (C) und superotemporal (D).....	53
Abbildung 35: Automatische Quantifizierung/MATLAB der peripheren Nervenfasern des SEP in den Quadranten inferonasal (A), inferotemporal (B), superonasal (C) und superotemporal (D).	54
Abbildung 36: Manuelle Quantifizierung/NeuronJ der zentralen Nervenfasern des SEP in den Quadranten inferonasal (A), inferotemporal (B), superonasal (C) und superotemporal (D).....	55
Abbildung 37: Automatische Quantifizierung/MATLAB der zentralen Nervenfasern des SEP in den Quadranten inferonasal (A), inferotemporal (B), superonasal (C) und superotemporal (D).....	56
Abbildung 38: Ex vivo immunhistochemische Aufnahmen der Haut-Kryostatschnitte.....	57
Abbildung 39: Analyse der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD).....	58
Abbildung 40: Lineare Regressionsanalyse der CNFL	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nosologische Klassifikation des Diabetes mellitus.....	1
Tabelle 2: Modifizierte Klassifikation der DN nach Thomason und Tomlinson.....	6
Tabelle 3: Modifizierte Klassifikation der Nervenfasertypen.....	7
Tabelle 4: Verwendete Antikörper.....	28
Tabelle 5: C-Peptid-Konzentrationen.....	44

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Diabetes mellitus – Definition und Klassifikation

Der Diabetes mellitus (DM) ist eine heterogene chronische Stoffwechselerkrankung, die charakterisiert ist durch eine insuffiziente Synthese oder eine eingeschränkte Wirksamkeit von Insulin. Leitbefund der Erkrankung ist die Hyperglykämie [1].

Ein manifester Diabetes mellitus liegt laut der Deutschen Diabetes Gesellschaft vor, wenn bei einem Patienten laborchemisch ein Gelegenheits-Plasmaglukosewert von ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l), eine Nüchtern-Plasmaglukosekonzentration von ≥ 126 mg/dl ($\geq 7,0$ mmol/l), ein OGTT-2-h-Wert im venösen Plasma ≥ 200 mg/dl ($\geq 11,1$ mmol/l) oder ein HbA1c $\geq 6,5\%$ (≥ 48 mmol/mol Hb) nachweisbar ist [2]. Der Diabetes mellitus wird ätiologisch entsprechend der Klassifikation der Amerikanischen Diabetes Gesellschaft (ADA) derzeit in vier Gruppen eingeteilt [3].

Tabelle 1: Nosologische Klassifikation des Diabetes mellitus [3].

Typ 1 Diabetes	A) immunologisch	B) idiopathisch
Typ 2 Diabetes	Insulinresistenz und/oder Insulinsekretionsstörung	
Typ 3 Diabetes	Andere Ursachen: genetische Defekte der Beta-Zellfunktion, der Insulinsekretion; Erkrankungen des exokrinen Pankreas; Infektionen; Endokrinopathien, Medikamente usw.	
Gestationsdiabetes		

Zu den beiden Hauptformen gehören der Typ 1 und Typ 2 Diabetes mellitus. 5-10% aller Diabetiker leiden an einem sog. Typ 1 Diabetes [4]. Dieser beruht auf einer autoimmunologisch vermittelten Destruktion der Insulin produzierenden Beta-Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas. Hierbei kommt es zur Ausbildung eines absoluten Insulinmangelsyndroms, welches durch Polyurie, Polydipsie, Gewichtsverlust und Fatigue bis hin zur Entwicklung einer ketoazidotischen Stoffwechselentgleisung mit Bewusstseinsverlust gekennzeichnet sein kann [5]. Ätiologisch konnten für den Typ 1 Diabetes, eine Autoimmunerkrankung, bestimmte suszeptible Genloci des humanen Genoms identifiziert werden. Dabei erhöhen vor allem spezifische Genvarianten des humanen Leukozytenantigen-(HLA)-Systems das Risiko auf bis zu 50 % einen Typ 1 Diabetes zu entwickeln [6, 7].

Zusätzlich werden Umweltfaktoren wie Nahrungsantigene (Gluten und Kuhmilchbestandteile) und Virusinfektionen (Enteroviren und Coxsackie-Viren) als potentielle Auslöser der Autoimmunität in Betracht gezogen [8, 9].

Mit einem Anteil von 90 - 95 % stellt der Typ 2 Diabetes die häufigste Form dar [10]. Kennzeichnend sind die Ausbildung einer Insulinresistenz, d.h. die Unfähigkeit der peripheren insulinsensitiven Gewebe wie Muskulatur und Fett insulinabhängig Glukose aufzunehmen, als auch eine gestörte Insulinsekretion der Beta-Zellen, was zu einem relativen Insulinmangel führt [11, 12]. Als Vorstufe eines Typ 2 Diabetes gilt der sog. Prädiabetes, d.h. die Entwicklung einer gestörten Glukosetoleranz basierend auf erhöhten Blutglukosekonzentrationen, die noch nicht charakteristisch für einen manifesten Diabetes mellitus sind [13]. Diejenigen Patienten, deren endokrines Pankreas die Insulinresistenz nicht durch ausreichende Steigerung der Insulinsekretion kompensieren kann, entwickeln einen manifesten Diabetes mellitus [14, 15]. Der Typ 2 Diabetes birgt im Vergleich zum Typ 1 Diabetes ein höheres Risiko genetisch vererbt zu werden [16]. Das Risiko für Kinder, mit einem an Typ 1 Diabetes erkrankten Elternteil, liegt zwischen 1 bis 4 % bis zum 18. Lebensjahr ebenfalls einen Typ 1-Diabetes auszubilden. Kinder eines Typ 2 Diabetikers haben ein um 25 bis 50 % erhöhtes Risiko im Laufe ihres Lebens an einem Typ 2 Diabetes zu erkranken [17]. Einzelne Polymorphismen in Typ 2 Diabetes assoziierten Risiko-Gensequenzen, welche die Insulinsekretion oder die Insulinresistenz beeinflussen, konnten bereits identifiziert werden [18, 19],[20]. Die Mehrheit der genetischen Faktoren und zugehörigen Interaktionen ist bis jetzt jedoch noch unbekannt [21]. Des Weiteren führen bei entsprechend genetischer Prädisposition bestimmte Faktoren wie Adipositas (80 bis 90 % der Typ 2 Diabetiker), ein erhöhtes Lebensalter, Bewegungsmangel und falsche Ernährung zum Ausbruch der Erkrankung [22]. Der Typ 2 Diabetes beruht also auf einem komplexen Zusammenspiel von Gen-Gen-und Gen-Umwelt-Interaktionen [20]. Aufgrund der enormen Heterogenität beim Typ 2 Diabetes bezüglich genetischer Prädisposition, der Ausschöpfung der Beta-Zell Aktivität, Schweregrad des Verlaufs, dem Ausmaß der Insulinsubstitution und den auftretenden Folgekomplikationen arbeiten derzeit schwedische Forscher an einer neuen Einteilung des Typ 2 Diabetes [23]. Als Parameter dienen dabei Alter beim Erkrankungsbeginn, Body-Mass-Index, Glutamatdecarboxylase-Antikörper, HbA_{1c}, HOMA 2B (Beurteilung der Betazellfunktion basierend auf der C-Peptid-Konzentration) und HOMA2 IR (Beurteilung der Insulinsensitivität). Künftig sollen dann 5 Gruppen des Typ 2 Diabetes mellitus unterschieden werden, davon 2 mit mildem und 3 mit schwerwiegendem Verlauf [24].

1.1.2 Epidemiologie des Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus zählt global zu den häufigsten Stoffwechselerkrankungen. In der folgenden Grafik der aktuellen Ausgabe des Diabetes Atlas der Internationalen Diabetes Föderation (IDF 2017) sind die Prognosen der Diabetes Prävalenz weltweit für das Jahr 2017 und 2045 dargestellt (Abb.1).

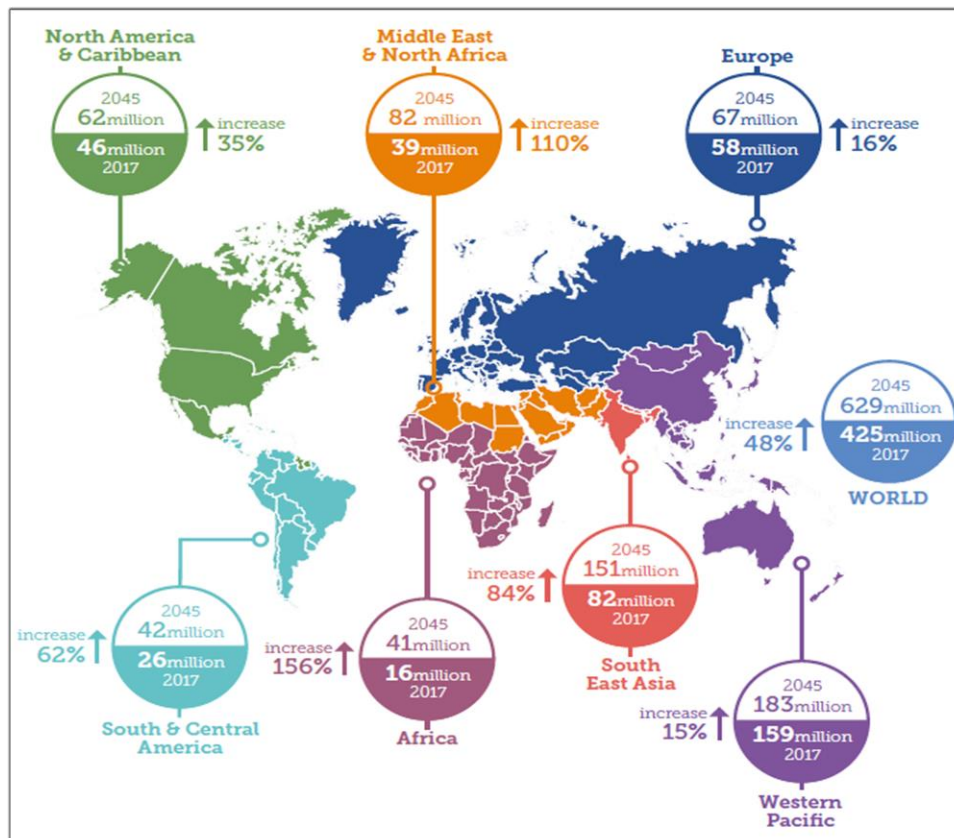


Abbildung 1: International Diabetes Federation. Atlas zur weltweiten Prävalenz des DM 2017 und 2045 [25].

Derzeit leiden weltweit ca. 425 Mio. Menschen an einem Diabetes mellitus. Die Prävalenz an der Gesamtbevölkerung (7,5 Billionen Menschen) beträgt dabei 8,8 % [25]. Auch wenn der Diabetes mellitus über viele Jahre als Wohlstandserkrankung der Industrienationen angesehen wurde, leben ca. 80 % der an Diabetes erkrankten Menschen in Entwicklungsländern [26, 27]. Laut den Prognosen der IDF für das Jahr 2045 steigt die Anzahl der Diabetiker weltweit auf ca. 628 Millionen Menschen an [25]. Dabei verzeichnen besonders Länder im afrikanischen, süd-ost asiatischen und west-pazifischen Raum dramatische Anstiege um bis zu 156 %.

Ursachen hierfür sind u.a. die Verbreitung westlicher Lebensmittelkonzerne, deren Angebot von zuckerhaltigen, kalorienreichen Nahrungsprodukten die Entwicklung einer Fehlernährung

bis hin zu Adipositas, dem größten Risikofaktor für Typ 2 Diabetes, fördert. Es werden verschiedene genetische Prädispositionen zwischen einzelnen Ethnien diskutiert, diese scheinen in Anbetracht der raschen Progredienz des Diabetes weltweit eine untergeordnete Rolle zu spielen [28, 29]. Zeitgleich sind Menschen in Entwicklungsländern einem schlechten und mangelhaften Gesundheitsversorgungssystem ausgesetzt. Westliche Nationen profitieren von einem sozioökonomischen Gesundheitssystem, welches Risikopatienten frühzeitig identifiziert und eine adäquate Patientenversorgung mit einem umfassenden Therapieangebot zwecks Patientenschulungen, Ernährungsberatung und medikamentöser Versorgung gewährleistet [30].

Im europäischen Vergleich weist Deutschland derzeit die zweitgrößte Anzahl an Diabetes erkrankter Menschen hinter Russland auf. Nach Schätzungen der IDF 2017 leiden in Deutschland ca. 7,47 Mio. Menschen im Alter von 20 bis 79 Jahren an einem Diabetes mellitus (Prävalenz 8,3 %) [25]. Der Anstieg der Diabetesprävalenz im Vergleich zum Jahr 2000 (Diabetes-Prävalenz 4,2 % [31]) entfällt hauptsächlich auf Menschen älter als 65 Jahre, Personen mit niedrigem Bildungsstatus, hohem Body-Mass-Index und geringer körperlicher Bewegung [32]. Schätzungen aus bevölkerungsbezogenen Surveys gehen davon aus, dass derzeit bei 7 bis 8 % der erwachsenen Bevölkerung ein Typ 2 Diabetes vorliegt [33]. Die Dunkelziffer von nicht-diagnostizierten Diabetikern wird bundesweit auf ca. 2 Mio. Menschen geschätzt [34].

Während der autoimmunbedingte Typ 1 Diabetes vorrangig eine Erkrankung des Kindes- und Jugendalters ist (Inzidenzrate: 2200 Neuerkrankungen/Jahr, Höhepunkt der Inzidenz im Alter von 12 bis 15 Jahren [35]) und der Typ 2 Diabetes lange Zeit als Altersdiabetes betrachtet wurde, sind bereits auch Vorstufen eines Typ 2 Diabetes zunehmend bei Kindern und Jugendlichen nachweisbar [36]. Die Diagnosestellung eines Typ 2 Diabetes ist bei einer Prävalenz von 0,03 bis 0,04 % der Mädchen und Jungen bis zum 19. Lebensjahr in Deutschland bislang noch selten [37].

1.1.3 Komplikationen des Diabetes mellitus

Unerkannt oder unzureichend behandelt kann der Diabetes mellitus (DM) auch heute noch zu akuten lebensbedrohlichen Stoffwechselentgleisungen führen. Aufgrund der Entdeckung und Herstellung des Insulins im Jahr 1923 [38] sind akut-letal verlaufende Notfälle von Diabetikern jedoch selten geworden [39].

Dennoch weisen heutzutage Diabetiker im Vergleich zu Nicht-Diabetikern ein erhöhtes Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko auf [40]. Aktuell ist davon auszugehen, dass ein 50-jähriger

männlicher Diabetespatient im Vergleich zu einem altersgleichen Mann ohne Diabetes eine um 5,8 Jahre reduzierte Lebenserwartung hat. Bei Frauen gehen die Schätzungen von einer Reduktion um 6,5 Jahre aus [41]. Die Ursachen liegen vor allem in den chronischen Folgeschäden des Diabetes mellitus. Die dauerhaften Hyperglykämien, die erhöhte Glukosevariabilität, der veränderte Glukosemetabolismus und die Bildung reaktiver Metabolite führen langfristig zu Schädigungen von Blutgefäßen, Nerven sowie zu Veränderungen und Umbauvorgängen in den betroffenen Organen [42].

Die Folgeschäden beim Diabetes mellitus werden in makro- und mikroangiopathische Schäden unterteilt. Schäden an den großen Blutgefäßen werden als Makroangiopathien bezeichnet [43]. Eine diabetische Stoffwechsellage begünstigt das Auftreten atherosklerotischer Veränderungen, die vorwiegend an den Herzkranzgefäßen, den hirnversorgenden und den peripheren großen Arterien auftreten [44]. Etwa drei Viertel der Patienten mit DM sterben an einer Gefäßkomplikation, wobei der Myokardinfarkt für 50 % der Todesfälle verantwortlich ist [45].

Unter Mikroangiopathien werden Schäden an den kleinen Blutgefäßen, den Blutkapillaren, zusammengefasst. Diese Blutkapillaren versorgen unter anderem die Netzhaut des Auges (Retina), die Nieren und die Nervenzellen (Neuronen) mit Nährstoffen. Schädigungen dieser Kapillaren können zu Retinopathien mit Erblindung (Prävalenz 11 %), chronischer Niereninsuffizienz mit Dialysepflichtigkeit (Prävalenz 14 %) und Neuropathien mit Entwicklung des diabetischen Fußsyndroms bis hin zur Amputation der betroffenen Extremität führen (Prävalenz 12 %) [43, 46, 47].

Die Pathophysiologie, welche zu den Folgekomplikationen eines Diabetes mellitus führt, beruht auf der unzureichenden und anderweitigen Verstoffwechslung von Glukose. Bedingt durch den Insulinmangel bzw. der Insulinresistenz wird eine Kaskade von Stoffwechselvorgängen initiiert, um der Hyperglykämie entgegenzuwirken. Zum einen kann Glukose über die Herstellung von Sorbitol in Fruktose umgewandelt werden. Das Sorbitol akkumuliert in der Zelle und führt zu osmotischem Stress. Über den Hexosamine Stoffwechselweg wird Glukose zu Glukosamin-6-Phosphat metabolisiert, dieses kann die Funktion von Proteinen und Rezeptoren beeinträchtigen. Eine besondere Bedeutung bei der Entwicklung diabetischer Folgeerkrankungen ist der Stoffwechselweg über die AGE-RAGE-Achse. Bei zu hohen Glukosekonzentrationen im Serum hat Glukose die Fähigkeit, über eine sog. Maillard Reaktion verschiedene Proteine/Rezeptoren nicht enzymatisch zu glykieren. Diese nicht-enzymatisch glykierten Produkte werden als sog. *advanced glykation endproducts* (AGEs) bezeichnet und binden spezifisch an einem *receptor for advanced glycation*

endproducts (RAGE). Über eine intrazelluläre Signalkaskade werden verschiedenste inflammatorische Prozesse in die Wege geleitet, die zu erhöhtem oxidativen zellulären Stress führen und letztlich zur Zellschädigung und eingeschränkten Zellfunktion beitragen [48].

1.2 Diabetische Neuropathie

1.2.1 Diabetische Neuropathie – Klassifikation

Unter dem Begriff der diabetischen Neuropathie (DN) sind subklinische oder manifeste Erkrankungen der Nervenfasern zusammengefasst, die in Folge eines Diabetes mellitus ohne andere erkennbare Ursache auftreten [49]. Dabei können verschiedene Regionen des peripheren und autonomen Nervensystems betroffen sein. Im klinischen Alltag hat sich die Einteilung nach Thomas und Tomlinson bewährt (Tab. 2) [50, 51].

Tabelle 2: Modifizierte Klassifikation der DN nach Thomas und Tomlinson [52].

Symmetrische Neuropathien	Sensomotorische Polyneuropathie (peripher)
	Autonome Neuropathie
	Symmetrische Proximale Neuropathie (peripher)
Fokale Neuropathien	Kraniale Neuropathie
	Mononeuropathie des Stammes
	Asymmetrische proximale Neuropathie der Extremität
Mischformen	

Die symmetrisch verlaufenden Neuropathien sind häufiger und zeigen einen chronisch progressiven Verlauf. Dagegen treten fokale Neuropathien seltener auf, setzen zudem akut ein und sind oft selbstlimitierend [53].

Das periphere Nervensystem umfasst verschiedene Nervenfasertypen, welche nach Grad der Myelinisierung, dem Durchmesser und der sich daraus resultierenden Nervenleitgeschwindigkeit klassifiziert (Tab. 3) werden.

Es wird eine grobe Unterscheidung in myelinisierte Nervenfasern mit großem Durchmesser und dünne unmyelinisierte Nervenfasern vorgenommen.

Tabelle 3: Modifizierte Klassifikation der Nervenfasertypen [54].

Faserklasse Lloyd/ Hunt	Faserklasse Erlanger/ Gasser	Myelin- scheide	Durch- messer- in μm	Leitungsge- schwindig- keit in m/s	Funktion
I	A α	+	15	<120	Motorik
II	A β	+	8	<60	Sensorik: Vibration, Berührung
	A γ	+	5	<30	Sensorik: Propriozeption
III	A δ	-	3	<30	Sensorik: Wärme, stechender Schmerz
	B	-	< 3	<15	Sensorik: Schweißdrüsen
IV	C	-	< 1	<1,5	Sensorik: Kälte, dumpfer Schmerz

Je nachdem, welche Nervenfasern geschädigt sind, wird von einer *Large* (Faserklasse I) oder *Small fibre* Neuropathie (Faserklasse II bis IV) gesprochen. Die Verwendung der englischen Termini ist auch in der Deutschen Fachsprache üblich [55].

1.2.2 Die diabetische sensomotorische Polyneuropathie

1.2.2.1 Definition und klinische Manifestation

Die diabetische sensomotorische Polyneuropathie (DSP), welche synonym in der Literatur auch als diabetische periphere Polyneuropathie (PNP) bezeichnet wird, ist mit 75 % die häufigste und klinisch bedeutsamste Form der diabetischen Neuropathie [56, 57]. Charakteristisch sind sensorische und motorische Defizite der Nervenfasern, wobei die sensorische Dysfunktion dominiert [58]. Betroffen sind vor allem die distalen Extremitäten wie Hände und Füße. Die diabetische sensomotorische Neuropathie kann unterschiedliche Verlaufsformen annehmen. In bis zu 50 % der Fälle verläuft die Erkrankung zunächst asymptomatisch, d.h. die Patienten geben keine klinischen Beschwerden oder Einschränkungen an. Neurologische Untersuchungen wie quantitative sensorische Tests und die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit sind jedoch pathologisch [59, 60]. Zudem kann die DSP einen schmerzlosen oder einen schmerzhaften Charakter annehmen [59]. Die schmerzlose Form betrifft etwa zwei Drittel der Patienten und ist durch Taubheitsgefühle und/oder Parästhesien in den Händen und Füßen gekennzeichnet. Weiterhin zeigen klinische Untersuchung eine reduzierte Sensibilität, fehlende Muskeleigenreflexe (insbesondere Achillessehnenreflex), Gangunsicherheit sowie unbemerkte Verletzungen bzw. Ulzera an den Füßen [51]. Von der schmerzhaften Verlaufsform ist etwa ein Drittel der Patienten betroffen.

Sie klagen häufig im Ruhezustand, nachts zunehmend, über Brennen, einschießende oder stechende Schmerzen, Kribbel-Parästhesien, Dysästhesien in den Händen und Füßen sowie über Schlafstörungen. Klinisch sind Sensibilitätseinschränkungen unterschiedlicher Qualität, beidseits reduzierte Muskeleigenreflexe im Bereich der distalen Extremitäten der Hände und Füße, messbar [49].

1.2.2.2 Epidemiologie und Risikofaktoren

Aufgrund einer hohen Anzahl von klinischen Studien zur Diagnosesicherung einer diabetischen sensomotorischen Polyneuropathie, verschiedener angewendeter klinischer Assessments [61] und unterschiedlich ausgewählter Kohorten (u.a. hinsichtlich Alter der Patienten, Diabetesdauer, Therapie, ambulant/stationär) variieren die Prävalenz- und Inzidenzangaben enorm. Laut der Amerikanischen Diabetes Gesellschaft (ADA) entwickeln ca. 20 % der Typ 1 Diabetiker innerhalb von 20 Jahren eine diabetische sensomotorische Polyneuropathie. Bei neu diagnostizierten Typ 2 Diabetiker beträgt die Prävalenz 10 bis 15 % und steigt auf bis zu 50 % innerhalb der nächsten 10 Jahre an [57]. Die Lebensqualität ist im Vergleich zu Patienten ohne sensomotorische diabetische Polyneuropathie erniedrigt. Das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko ist hingegen erhöht [62-64]. Bis zu 25 % aller Diabetiker leiden während ihres Lebens an einem diabetischen Fußulkus und über 50 % der Patienten, die in Deutschland an einem diabetischen Fußsyndrom erkranken, müssen mit einer Amputation innerhalb von 4 Jahren nach Diagnosestellung rechnen [65, 66]. Epidemiologische Daten zeigen, dass eine Neuropathie in 50 % der Fälle für ein diabetisches Fußsyndrom verantwortlich ist. Nur in bis zu 15 % liegt ausschließlich eine periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) vor, in 35 % ist eine Kombination von Neuro- und Angiopathie als auslösendes Moment der diabetischen Plantarulzeration nachweisbar [66, 67].

Folgende Risikofaktoren sind für die Entstehung einer diabetischen sensomotorischen Polyneuropathie identifiziert worden. Zu den primären Faktoren, welche modifizierbar und von klinischer Bedeutung für die Interventionsmöglichkeiten sind, zählen die Diabetesdauer, die Hyperglykämie, Adipositas, Dyslipidämie und arterielle Hypertonie. Rauchen, Vitamin D-Mangel, genetische Faktoren spielen eine untergeordnete Rolle für die beeinflussbaren Behandlungsoptionen [57]. Während bei Typ 1 Diabetikern frühe Interventionen durch verbesserte glykämische Kontrolle und Lifestyle-Veränderungen zu einer Reduktion der diabetischen Neuropathie bis zu 78 % führen können [68-70], zeigen Typ 2 Diabetiker mit einer Polyneuropathie auch unter strikter glykämischer Kontrolle nur eine geringe Reduktion von bis zu 9 % [71]. Die große Diskrepanz zwischen beiden Diabetes Typen lässt auf eine

unterschiedliche Pathogenese, die zur Entstehung einer diabetischen Polyneuropathie führt, schließen. Bislang gibt es keine einheitliche Therapieempfehlung für die diabetische sensomotorische Neuropathie [72].

1.2.2.3 Diagnostik der diabetischen sensomotorischen Polyneuropathie

Der Diabetes mellitus mit seinen assoziierten Komplikationen stellt eine chronische Erkrankung dar, dessen Diagnostik und Therapie Teil der bundesweiten strukturierten Behandlungsprogramme - des sog. *Disease Management Programme* (DMP) – ist [73]. Bestandteil dessen ist u.a. das Screening auf eine sensomotorische Polyneuropathie, welches bei Typ 2 Diabetikern zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und bei Patienten mit Typ 1 Diabetes spätestens 5 Jahre nach Diagnosestellung empfohlen wird [74]. Das Screening sollte eine ausführliche Anamnese, eine Inspektion der Füße, die Abklärung einer pAVK und einfache neurologische Tests wie die Prüfung des Achillessehnenreflexes sowie des Vibrations-, Druck- und Berührungsempfindens der Füße beidseits umfassen. Sind die Ergebnisse negativ, sollte einmal jährlich ein Neuropathie-Screening erfolgen [75].

Bei einem positiven Ergebnis muss im Anschluss eine sog. Basisdiagnostik vom Diabetologen, Allgemeinmediziner oder Neurologen veranlasst werden [74]. Hierbei werden zunächst die Symptome des Patienten nach Art, Zeitpunkt und Lokalisation durch Verwendung standardisierter Fragebögen erfasst. Anhand eines vorgegebenen Bewertungsschemas - wie dem Neuropathie-Symptom-Score (NSS) und dem Neuropathie Defizit-Score (NDS) - wird ein Ergebniswert ermittelt, mit dem der Schweregrad (leicht, mäßig und schwer) der DN bestimmt werden kann [76].

Zudem werden verschiedene Nervenfunktionstests durchgeführt, bei denen Nervenfasern durch spezifische Stimuli wie beispielsweise Kälte oder Vibration gereizt werden. Durch Abfragen der wahrgenommenen Empfindung des Patienten und der Beurteilung des Untersuchers können die Ergebnisse qualitativ und semi-quantitativ verifiziert werden.

Zu den Instrumentarien in der Diagnostik der diabetischen peripheren Neuropathie zählen u.a. quantitative sensorische Tests (QST). Hierbei werden Sinnesmodalitäten wie Berührung mit einem 10g-Monofilament, Kälte- und Wärmeempfinden mit einem Tip Therm® sowie Schmerz mit Hilfe einer Einmalnadel überprüft. Vibrationsmessungen erfolgen durch Verwendung einer 128-Hz-Stimmgabel konzipiert nach Rydel-Seiffer, welche das Vibrationsempfinden des Patienten anhand von skalierten Gewichten messbar macht. Ergänzend kann die sensorische und/oder motorische Nervenleitgeschwindigkeit von myelinisierten Nervenfasern beispielsweise des N. suralis, des N. peroneus oder des N.

ischiiadicus bestimmt werden. Verschiedene Parameter wie die Latenz, die Geschwindigkeit oder die Amplitude sind bei geschädigten Nervenfasern verändert. Auch wenn dieses Verfahren bislang als das objektivste mit hoher Reliabilität und Validität gilt, so machen die myelinisierten Nervenfasern nur einen Anteil der peripheren Nervenfasern von 10% aus [77]. Der höchste Anteil fällt auf die dünn- bzw. nicht-myelinisierten Nervenfasern (A-delta und C-Fasern), deren Funktion zwar durch quantitativ sensorische Tests erfasst werden kann, jedoch stark abhängig vom subjektiven Empfinden eines jeden Patienten ist und eher mit einer geringen Reproduzierbarkeit und Sensitivität einhergeht [78].

Die Visualisierung von Nervenfasern und deren Beurteilung von morphologischen Veränderungen war bislang nur mittels der Entnahme einer Hautbiopsie (Hautstanze von 3 bis 5 mm Durchmesser) möglich. Im Jahr 2005 hat die *European Federation of Neurological Societies* (EFNS) Leitlinien für die Verwendung und Evaluation von Hautbiopsien zur Detektion der diabetischen Neuropathie veröffentlicht [79]. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass mittels Hautbiopsien am Fußrücken frühzeitig diabetische Nervenfaserschäden detektiert werden konnten, obwohl elektrophysiologische und quantitative sensorische Nervenfunktionstests normwertig waren [80, 81]. Aufgrund der Invasivität des Eingriffes (wenn auch minimal invasiv), der bei Diabetikern verbundenen beeinträchtigten Wundheilung und erhöhten Infektanfälligkeit wird dieses Verfahren bislang nur in klinisch durchgeführten Studien angewandt und ist nicht für Longitudinalstudien geeignet [82].

Als Alternative zur Hautbiopsie steht nun die Entwicklung der *in vivo cornealen confokalen Laserscanning-Mikroskopie* (CLSM) gegenüber. Die Kornea ist aufgrund ihrer Transparenz das einzige Gewebe des menschlichen Körpers, in welchem Nervenfasern mittels hochauflösender Bildgebungsverfahren wie bei der *in vivo cornealen confokalen Laserscanning-Mikroskopie* (IVCCM) unmittelbar und nicht-invasiv untersucht werden können [83]. Die Möglichkeit der IVCCM korneale Nervenfasern qualitativ und quantitativ zu beurteilen, birgt ein immenses Potenzial für die Diagnostik und den therapeutischen Verlauf unterschiedlicher neuropathischer Erkrankung wie beispielsweise der diabetischen Polyneuropathie. Bislang wird dieses Verfahren nur in der klinischen Forschung eingesetzt [84]. Weltweit arbeiten verschiedene Forschungsgruppen daran, dieses einzigartige Verfahren der IVCCM voranzutreiben, mit dem Ziel, ein standardisiertes Vorgehen zu entwickeln und es in die klinische Praxis zu etablieren [55].

1.3 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie der Kornea

1.3.1 Hintergrund und Entwicklung

Die *in vivo corneale confokale Laserscanning-Mikroskopie* (IVCCM) ist ein neues nicht-invasives diagnostisches Verfahren, welches entwickelt wurde, um speziell Strukturen der Kornea darzustellen und zu untersuchen [83].

Als Basis für dessen Entwicklung diente der Heidelberg Retinotomograph (HRT), ein hochauflösendes konfokales Laserscanning-Mikroskop (CLSM), welches Bestandteil der individuellen Gesundheitsleistungen ist [85] und ergänzend für Untersuchungen des hinteren Augenabschnitts – speziell zur Glaukomdiagnostik, Detektion von Veränderungen der Retina und Pathologien des Sehnervens N. opticus – verwendet werden kann [86, 87]. Stave et al. entwickelten 2002 am Universitätsklinikum Rostock ein neues adaptives Linsensystem, das sog. *Rostock Cornea Modul* (RCM) und koppelten dieses erstmals an den Heidelberg Retinotomograph. Mit dem kombinierten HRT/RCM Modul konnte nun die Untersuchungsebene des hinteren Augenabschnitts auf den vorderen Abschnitt verlagert und so dessen Strukturen sichtbar gemacht werden [83].

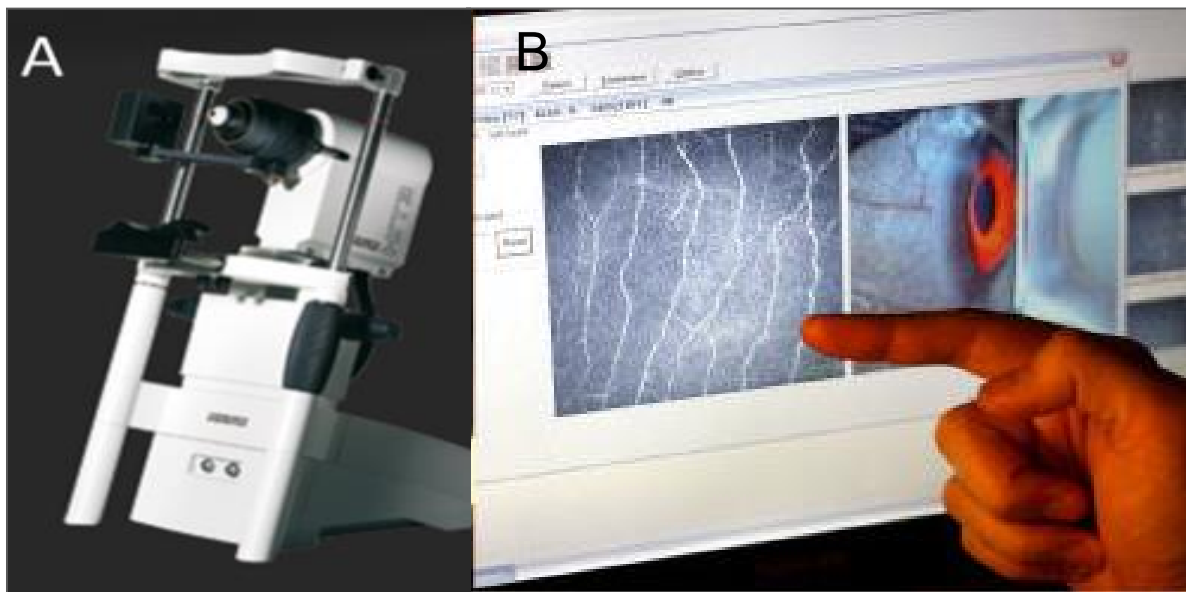


Abbildung 2: Konfokales Laser-Scanning Mikroskop (A) und live in vivo Aufnahmen des sub-epithelialen Nervenplexus des menschlichen Auges per CCM (B). (<https://www.intechopen.com/books/confocal-laser-microscopy-principles-and-applications-in-medicine-biology-and-the-food-sciences/laser-scanning-in-vivo-confocal-microscopy-of-the-cornea-imaging-and-analysis-methods-for-preclinica>).

Das Grundkonzept der konfokalen Mikroskopie stammt ursprünglich von Marvin Minsky, der seinen Prototyp um 1955 entwickelte und sich seine Idee 1957 patentieren ließ [88]. Die revolutionäre Idee Minskys war das Einbringen von Punktloch-Blenden in den Strahlengang

seines Mikroskops. Dadurch kann nur reflektiertes Licht aus der fokussierten Ebene, deren Brennpunkt auf Höhe der Lochblende liegt, detektiert werden. Ein Großteil der unerwünschten Lichtstreuung aus angrenzenden Gebieten oder Ebenen außerhalb dieses Brennpunktes kann so gefiltert werden [89]. Bei einem klassischen Lichtmikroskop überlagert sich immer reflektiertes Licht aus der eigentlichen Untersuchungsebene mit gestreutem Licht aus darüber- oder darunterliegenden Ebenen, wodurch die effektive Auflösung feiner Details enorm beeinträchtigt wird [90]. Auf ein Übersichtsbild, wie es sich bei der klassischen Lichtmikroskopie abbildet, wird zugunsten einzelner, präziser Punktaufnahmen bei einem konfokalen Mikroskop verzichtet. Um dennoch ein Übersichtsbild zu erhalten, muss der Untersuchungsstrahl in horizontaler x-y-Ebene und vertikaler z-Richtung über das gesamte Objekt geführt werden, um anschließend technisch aus den einzelnen Punktaufnahmen ein Gesamtbild zu rekonstruieren [86]. Eine entsprechende Software kann die erhaltenen Daten, dann entweder in eine zweidimensionale oder eine dreidimensionale Darstellung bringen [86].

Von Bedeutung ist, dass bei dem Verfahren der in vivo *cornealen confokalen* Laserscanning-Mikroskopie im Gegensatz zu allen anderen tomographischen Verfahren, die am vorderen Augenabschnitt eingesetzt werden, die Schnittebene frontal zur Hornhaut und nicht wie sonst sagittal oder transversal verläuft [55]. Die Hornhaut kann so Schicht für Schicht vom Epithel bis zum Endothel abgebildet werden, sodass eine echte in vivo Histologie möglich wird. Die Anpassung der Helligkeit und die Fokussierung geschehen automatisch [91].

1.3.2 Technik der in vivo CLSM

Optische Kernstücke des HRT II/RCM Systems sind ein Klasse 1 Diodenlaser der Wellenlänge 670 nm mit maximal 200 μ W Leistung und ein Wasserimmersionsobjektiv der Firma Zeiss (63x W, NA 0,95, Arbeits-Abstand 2,2 mm) [86]. Die Frontlinse hat über eine Polymethylacrylat-Kappe (TomoCap®) und einer Schicht aus Vidisic®-Gel Kontakt zur Hornhaut (Abb. 3). Mithilfe des Objektivs und einer weiteren Feldlinse wird eine 800-fache Gesamtvergrößerung eines 400x400 μ m großen Scanfensters bei einer optischen Auflösung von rund 1 bis 2 μ m erreicht [83].

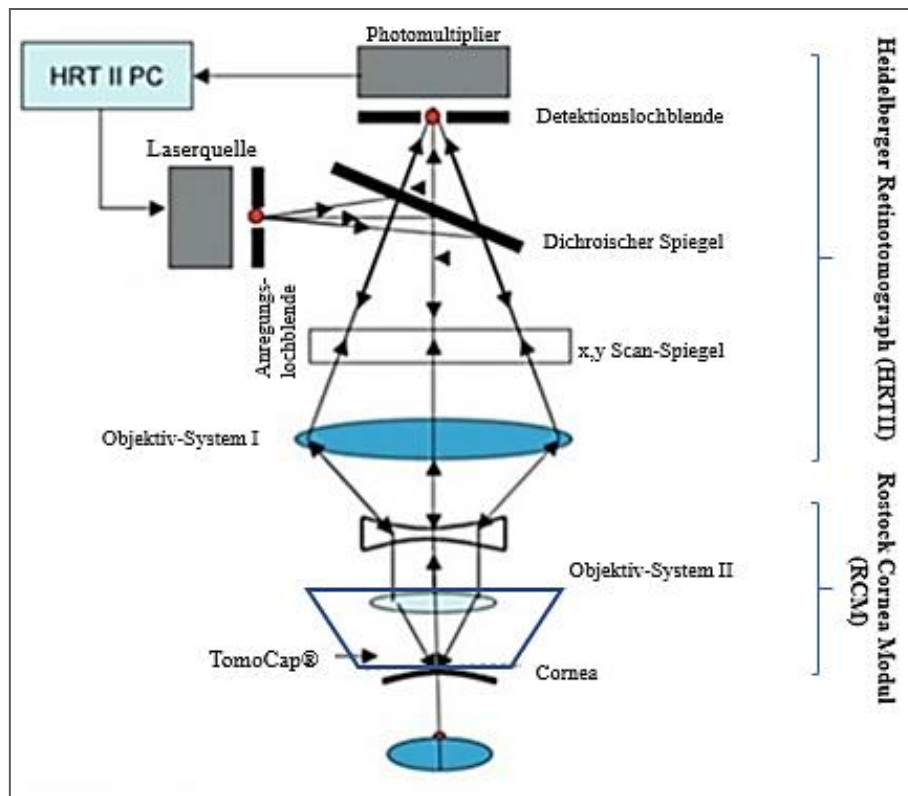


Abbildung 3: Aufbau und Strahlengang des HRT/RCM Systems [92].

Der monochromatische Laser wird als Anregungslichtquelle über die Anregungslochblende fokussiert. Ein Farbteiler (Dichroischer Spiegel) reflektiert einen großen Teil der Intensität dieses Strahls. Dieser trifft dann auf zwei bewegliche Scan-Spiegel und wird anschließend über zwei Objektiv-Systeme auf das Objekt gebracht [91, 93]. Die Scan-Spiegel werden benötigt, um den fokussierten Laserstrahl in der x-y-Ebene über die Probe zu führen, damit nacheinander die Informationen einer ganzen Ebene der Probe detektiert werden. Computergesteuert kann der Objektstisch zusätzlich in z-Richtung bewegt werden. Dabei wird der Fokus in die tiefere Ebene des zu untersuchenden Objekts gerichtet [86]. Das vom Objekt emittierte Reflexionslicht wird wieder durch die Objektiv-Systeme gesammelt und über den Scan-Spiegel zunächst zurück auf den Farbteiler und über eine Detektionslochblende auf einem Lichtdetektor abgebildet. Dieser Lichtdetektor wird durch einen Photomultiplier realisiert. In dieser Anordnung wird das Bild punktwise abgebildet. Aus der dabei entstehenden sequenziellen Folge von Signalen am Detektor kann dann das Bild des Objekts digital rekonstruiert werden [86]. Ausgehend von der Frontalebene kann der Untersucher mit einem motorisierten Joystick von der oberflächlichsten Zellebene dem Epithel, Schicht für Schicht durch das Stroma bis zum Endothel eintauchen. Die maximale Scantiefe des Geräts liegt bei etwa 1500 μm an der Kornea [86].

1.3.3 Aufbau und Funktion der Kornea

Die Kornea ist das einzige Gewebe des menschlichen Körpers, welches transparent ist und ermöglicht damit den Eintritt von Licht ins Augenninnere und die Bildentstehung auf der Netzhaut. Die Hornhaut leistet mit ca. 43 dpt den Hauptbeitrag zur Gesamtbrechkraft des Auges (insgesamt ca. 58 dpt) [94]. Neben den optischen Fähigkeiten bildet die Hornhaut eine für das Auge wichtige Barriere und schützt dieses vor Umwelteinflüssen. Eine weitere Besonderheit der Kornea ist ihre Avaskularität. Durch das Fehlen von Gefäßen hängt die Vitalität der Kornea hauptsächlich von drei Medien, dem Tränenfilm, dem Kammerwasser und dem Gefäßplexus des Limbus, ab.

Die Kornea ist wie ein Uhrglas in die Lederhaut (Sklera) eingelassen. Sie besitzt einen Durchmesser von etwa 11 mm, aufgrund ihrer Wölbung einen Radius von 7,8 mm. Die zentrale Dicke der Kornea beträgt ca. 535 μm und verteilt sich auf 5 verschiedene Schichten: das Epithel, die Bowmann'sche Membran, das Stroma, die Descemet-Membran und das Endothel (Abb. 4).

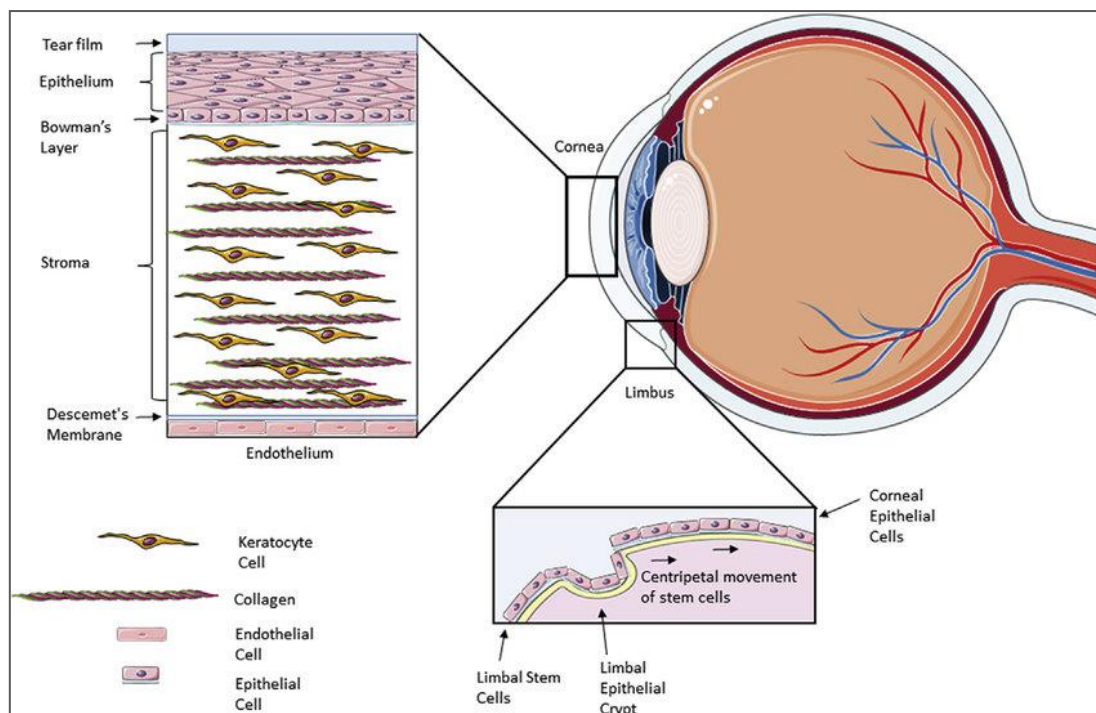


Abbildung 4: Aufbau des Auges, der Kornea und der angrenzenden Limbusregion [95].

Das Epithel als äußerste Schicht ist vom Tränenfilm bedeckt, dieser sorgt für den Schutz vor Infektionen, die Ernährung der vorderen Hornhautschicht, die Ausbildung eines Gleitfilms für die Augenlider und für eine glatte Hornhautoberfläche. Das Epithel selbst zählt zum

unverhornten mehrschichtigen Plattenepithel, besitzt eine Dicke von 50 bis 60µm und ist für die Absorption von Sauerstoff und anderen Nährstoffen verantwortlich. Es besteht aus mehreren Zellschichten. Dazu zählen die sog. Superfizialzellen (Stratum superfiziale), welche lang, sehr flach und eng beieinanderstehen, die sog. Flügelzellen mit einer charakteristischen polygonalen Form im Stratum intermedium und die Basalzellen als einschichtige säulenförmige Zellreihe im Stratum basale [96]. Die sich anschließende Bowmann'sche Membran (ca. 8 – 12 µm dick) ist für die mechanische Festigkeit und den Schutz des Stroma zuständig [96]. Das Stroma ist ein kollagenreiches Bindegewebe und trägt mit ca. 90% zum Gesamtvolumen der Kornea bei. Es setzt sich dabei aus extrazellulärer Matrix und vereinzelt Keratinozyten zusammen. Bei den Keratinozyten handelt es sich um modifizierte Fibroblasten, welche sich meist sternförmig mit 4 – 5 abflachenden Fortsätzen darstellen. Über diese stehen die Keratinozyten im gegenseitigen Kontakt und bilden ein funktionales Netzwerk. Sie sind für den Umsatz der extrazellulären Matrix verantwortlich und dienen der Integrität des Stroma. Die extrazelluläre Matrix zeichnet sich durch ihre Anordnung dichtgepackter und parallel gerichteter Kollagenfibrillen (Kollagene vom Typ I, III, V, VI und XII) aus [96]. Durch die spezielle Anordnung der Kollagenfibrillen, der damit verbundenen geringen Lichtstreuung und der Zusammensetzung des Stromas wird die Transparenz der Hornhaut gewährleistet. Eine hintere Grenzmembran, die sog. Descemet-Membran, trennt das hintere Stroma vom Endothel. Diese stellt ebenfalls eine Basalmembran dar, welche von den Endothelzellen gebildet wird. Das Hornhautendothel ist ein einschichtiges unverhorntes Plattenepithel, dessen Zellen sich als isoprismatisch darstellen [97]. Es wird derzeit noch eine 6. Schicht in der Literatur diskutiert, die sog. Dua-Schicht (prä-Descemet-Membran). Diese Schicht wurde im Jahr 2013 von dem englischen Ophthalmologen Harminder Dua beschrieben [98]. Sie soll eine feine, sehr belastbare (bis zu 2 bar) und etwa 15µm dicke Membran darstellen, lokalisiert zwischen Stroma und Descemet-Membran.

1.3.4 Visualisierung der kornealen Strukturen per in vivo CLSM

Aufgrund der verwendeten minimalen Laserenergie des konfokalen Laserscanning-Mikroskops besteht keine Gefahr der Schädigung des Augengewebes. Das physikalische Prinzip der Visualisierung der kornealen Strukturen mittels der in vivo CLSM beruht auf Reflektion des Lichts an Grenzflächen von zellulären Strukturen [99]. Der monochromatische Laserstrahl wird auf eine Ebene der Kornea fokussiert, woraufhin das einfallende Licht an den auftretenden Grenzflächen gebrochen und reflektiert wird. Das entstehende Bild wird dann an den Detektor weitergeleitet [86, 99]. Abbildung 5 erläutert die Bildentstehung der in vivo CLSM.

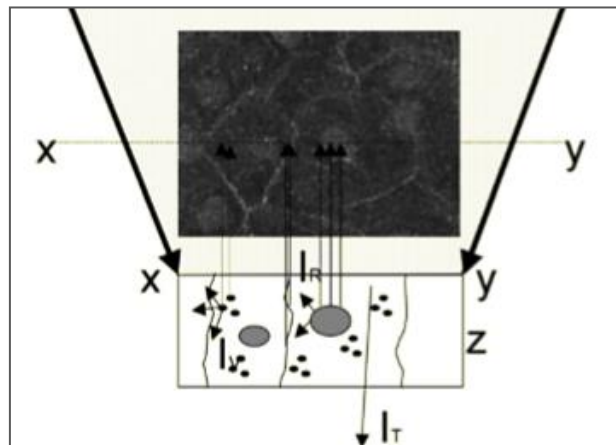


Abbildung 5: Konfokale Aufnahme (x, y, z) der Basalzellen der Kornea und schematische Abbildung zur prinzipiellen Bildentstehung basierend auf der Summe des reflektierten Lichts (I_r) an Grenzflächen. Der Zellkern mit einem höheren Brechungsindex als das Zytoplasma erscheint heller als das dunklere abgebildete Zytoplasma. (I_v Lichtstreuung, I_t Lichttransmission) [100].

Anhand des Reflexionsmusters bzgl. Form und Helligkeit kann auf die jeweilige Struktur bzw. den Zelltyp geschlossen werden [88]. Welche zellulären Bestandteile über welchen Mechanismus zu einer höheren Lichtreflektion beitragen, ist bislang noch nicht vollständig geklärt.

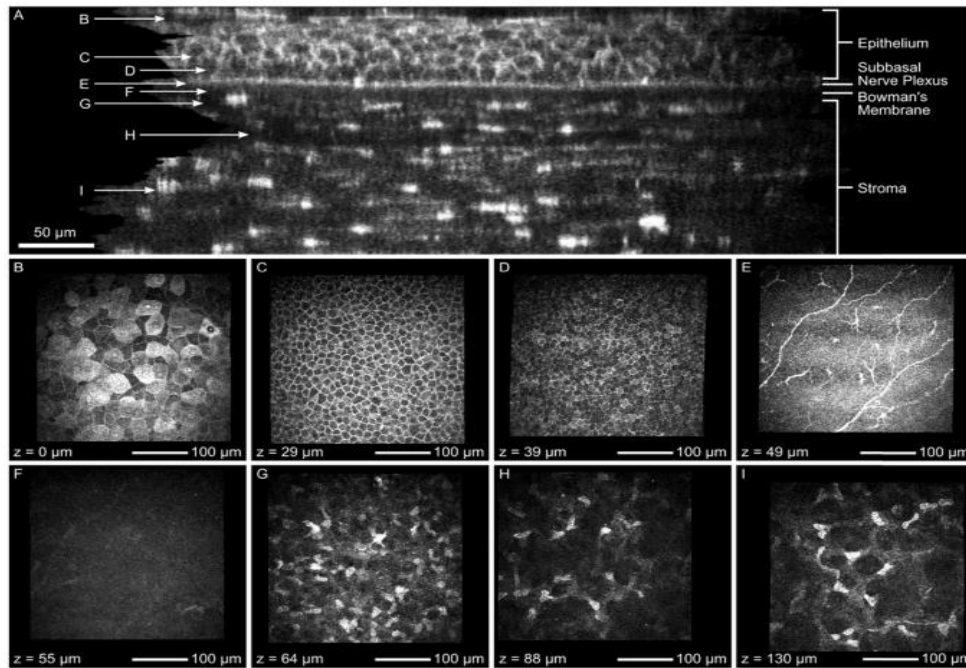


Abbildung 6: Orthograder Schnitt (A) eines Z-stack Bildes der Kornea nach KIT-alignment ohne Bildüberlagerung verschiedener Schnitte und exemplarische Aufnahmen verschiedener Zellschichten: Superfizialschichten (B), Flügelszellen (C), Basalzellen (D), sub-epitheliale Nervenplexus (E), Bowman Membran (F) und Stroma (G, H, I). Die Aufnahmen wurden rekonstruiert unter Benutzung einer konkaven TomoCap [101].

Mittels der IVCCM können die im Epithel vorhandenen drei bekannten Zelltypen anhand des Reflexionsmusters differenziert werden. Die oberflächlich gelegenen Superfizialzellen (Abb. 6B) sind anhand ihrer polygonalen Zellmorphologie, hellem Zytoplasma und hellem Zellkern, welcher von einem dunkel erscheinenden Areal umgeben ist, erkennbar. Im Stratum intermedium weisen die kleineren „Wing Cells“ (Abb. 6C) eine helle Zellgrenze und ein dunkles Zytoplasma auf [91]. Die Basalzellen (Abb. 6D) sind durch eine helle Zellgrenze und ein unregelmäßig reflektierendes Zytoplasma abgrenzbar [86].

Die darunterliegenden Nervenfasern in Abb. 6 E, welche den sub-epithelialen Nervenplexus bilden, präsentieren sich als hoch reflektive, linear verlaufende, sich verzweigende Strukturen. Die Bowmann'sche Membran (Abb. 6 F) stellt sich in der IVCCM als eine amorphe und azelluläre Schicht dar [86].

Das angrenzende Stroma weist klar abgrenzbare hyperreflektive Keratinozyten auf. Im Stroma verlaufen des Weiteren stromale Nervenfasern, welche breiter und gröber erscheinen und irregulär verlaufen als die regelmäßig zur Basalmembran parallel angeordneten sub-epithelialen Nervenfasern [102]. Unterschieden wird das Stroma weiterhin in einen anterioren, intermedium und posterioren Abschnitt (Abb. 6 G, H, I). Dabei nimmt die Anzahl

der Keratinozyten sowie der Gehalt von stromalen Nervenfasern von außen nach innen ab. Die kollagenreichen Fasern des Stroma lassen sich mittels der IVCCM nicht abbilden [86].

Die sich anschließende Descemet-Membran ist in der IVCCM durch ein unklares und zellfreies Erscheinungsbild gekennzeichnet.

Das abschließende Endothel weist die typischen hexagonal geformten Zellen auf. Diese zeigen dunkel erscheinende Zellgrenzen, ein helles Zytoplasma sowie einen dunklen Zellkern, dessen Differenzierung erschwert ist [100].

1.3.5 Topografie des sub-epithelialen Nervenplexus der Kornea

Von besonderem klinisch-experimentellen Interesse ist die nicht-invasive Untersuchung der kornealen Nervenfasern als potenzieller Marker zur Detektion und Evaluation der diabetischen Neuropathie.

Die Kornea gehört zu den am dicht-innerviertesten Geweben des menschlichen Körpers und ist bis zu 300-bis 600-fach dichter mit Nervenfasern versorgt als die Haut [103].

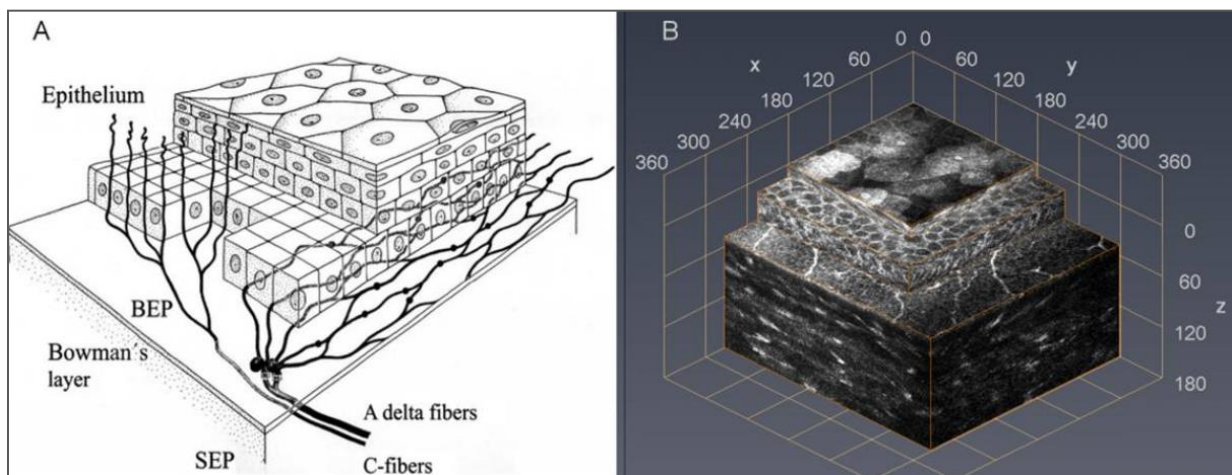


Abbildung 7: Sub-epithelialer Nervenplexus der Kornea schematisch (A) und per IVCCM (B) [104].

Die hauptsächliche Innervation ist sensorischen Charakters und erfolgt über die erste Abzweigung des Nervus trigeminus, dem Nervus ophthalmicus. Die peripheren A δ und C Fasern münden als freie Nervenenden in das korneale Epithel hinein. Physiologisch treten die Nervenfasern in Form von Nervenfaserbündeln von der Peripherie ausgehend in die Kornea ein und verlieren dabei, auf Höhe des Limbus, das Perineurium sowie ihre Myelinscheide. Die Umhüllung erfolgt nur noch durch die vorhandenen Schwann-Zellen [105]. Ausgehend davon penetrieren einzelne terminale Nervenfasern die Bowman-Membran, um den parallel angeordneten sub-epithelialen Nervenplexus (SEP) zu formen, ein Nervenfasergeflecht,

welches durch zahlreichen Verbindungen und Verzweigungen zwischen den einzelnen Nervenfasern gekennzeichnet ist [55]. Dabei konnten Guthoff et al. (2005) demonstrieren, dass sich die Lokalisation der A δ Fasern, die sich morphologisch als eine „Perlenkette“ darstellen, strikt und unveränderlich unter der Basalzellschicht des Epithels befindet [86]. Von den Durchtrittspunkten durch die Bowman'sche Membran verlaufen die Nervenfasern in einem charakteristischen radialen Muster in Richtung des kornealen Apex, wo sie eine wirbelartige Struktur formen [55, 106]. Bei den C-Fasern kommt es zu einer teilweisen Untergliederung in weitere Nervenfasern, welche nach der Ausbildung des SEP in höhere Epithelschichten entsendet werden und dort blind enden.

Im Gegensatz zu den stromalen Nerven, deren in vivo Darstellung aufgrund der komplexen 3D-Architektur schwierig ist, kann das Nervenfasernetzwerk des sub-epithelialen Nervenplexus parallel zur Bowman-Membran relativ einfach erfasst und online zweidimensional großflächig rekonstruiert werden [83].

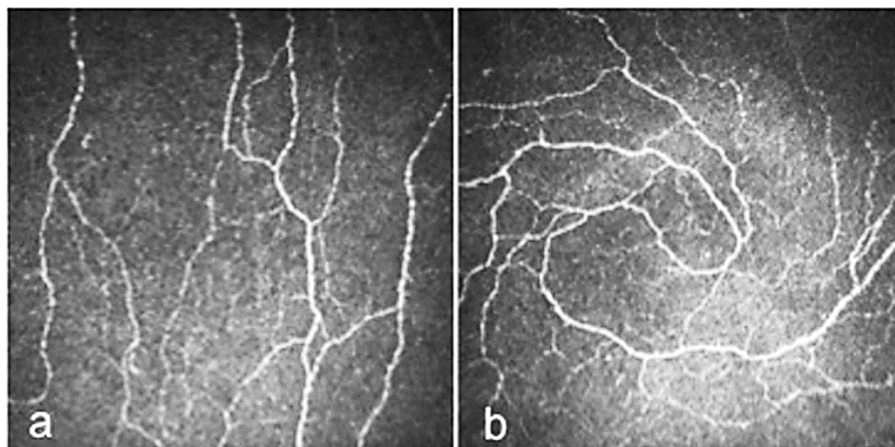


Abbildung 8: Sub-epithelialer Nervenplexus linear im Zentrum verlaufend (a) und inferozentral eine wirbelartige Struktur ausbildend (b), Bildgröße 400x400 μm [106].

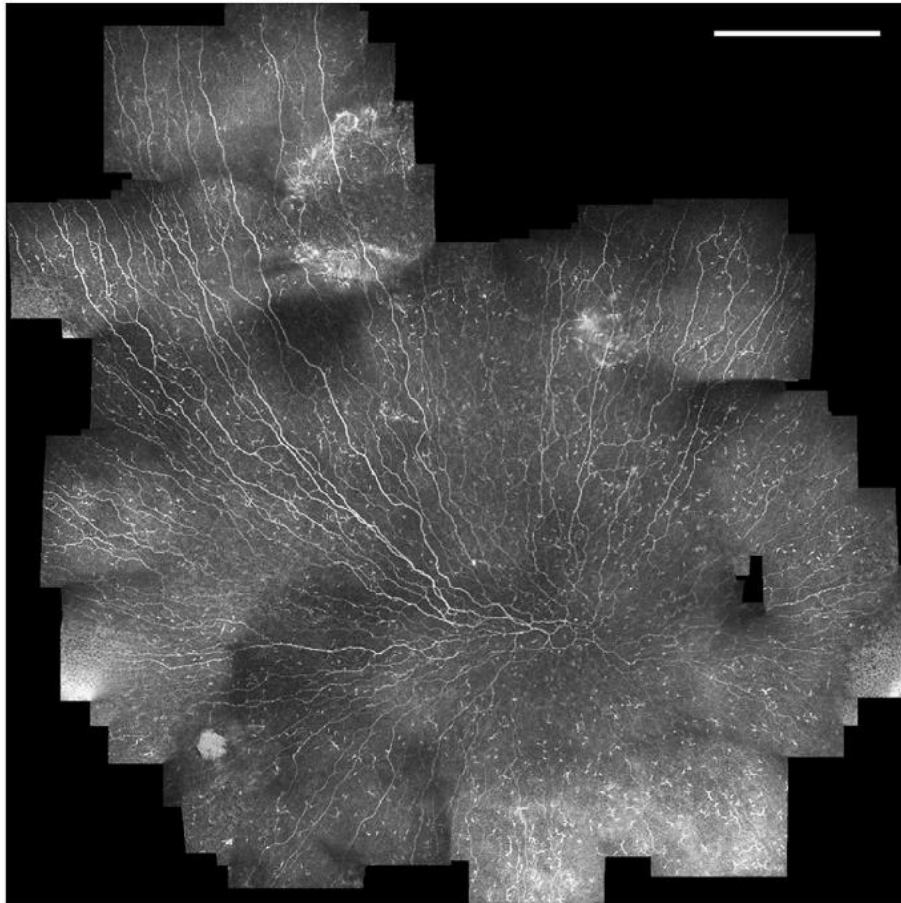


Abbildung 9: Zusammengesetzte Mosaik-Aufnahme des sub-epithelialen Nervenplexus, Scale Bar 400 μm [107].

1.3.6 Quantifizierung morphologischer Parameter des sub-epithelialen Nervenplexus

Nachdem mit der IVCCM erstmals eine nicht-invasive Methode zur Untersuchung der kornealen Nervenfasern verfügbar war, entwickelten im Jahr 2000 Rosenberg et al. die Idee, korneale Nervenfasern in Zusammenhang mit einer diabetischen Polyneuropathie zu untersuchen und zu quantifizieren [108]. Seitdem wurden von verschiedenen Forschungsgruppen geeignete morphologische Parameter zur Quantifizierung des sub-epithelialen Nervenplexus der Kornea bestimmt und hinsichtlich ihrer Validität in zahlreichen Studien überprüft [55].

Derzeit werden in klinischen Studien hauptsächlich die vier folgenden Parameter bestimmt und quantifiziert [109, 110]:

1. **Nervenfaserlänge CNFL** (*corneal nerve fibre length*) ist definiert als die Gesamtheit aller Nervenfaser bezogen auf die untersuchte Fläche Einheit mm/mm².
2. **Nervenfaserdichte CNFD** (*corneal nerve fibre dense*) misst die Anzahl der zentripetal verlaufenden Nervenfaser ohne deren Verzweigungen (no./mm²).
3. **Nervenfaserverzweigungsdichte CNBD** (*corneal nerve branch density*) misst die von einer Nervenfaser ausgehenden Verzweigungen (no./mm²).
4. **Nervenfaser-tortuosität CNFT** (*corneal nerve fibre tortuosity*) ist ein Maß, wie stark eine Nervenfaser gewunden ist.

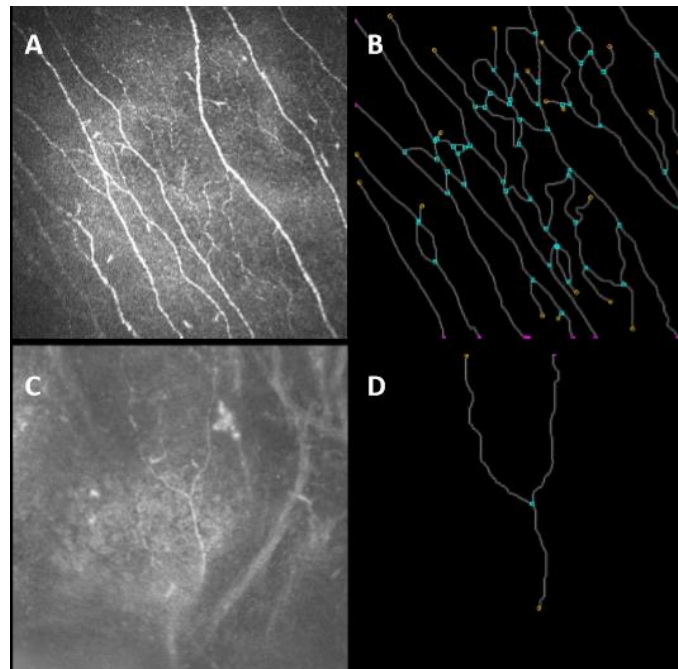


Abbildung 10: IVCCM Aufnahmen des Sub-Epithelialen Nervenplexus der Kornea eines gesunden Probanden (A) und eines Diabetikers (C). Mittels NeuronJ markierte Nervenfaser und kennzeichnende Markierung für unterschiedliche Parameter (B, D) [111].

In der Abbildung 10 ist die Quantifizierung der sub-epithelialen Nervenfaser von einem gesunden und einem diabetischen Probanden veranschaulicht.

Die in der Abbildung 10 (B, D) mit einem violetten Punkt versehenen Nervenfaser markieren die Hauptnervenfaser als Parameter für die CNFD. Das dient zur Unterscheidung der Nervenfaserbündel von verbindenden, deutlich dünneren Nervenfaserstrukturen. Jedoch kann die Differenzierung insbesondere bei sich stark verzweigenden Nervenfaser uneindeutig und erschwert sein [112].

Die Nervenfaserverzweigungsdichte CNBD wird in Abbildung 10 durch die blau-markierten Punkte dargestellt. Einige Studiengruppen geben aufgrund der hohen Anzahl an Verzweigungen noch zusätzlich einen Parameter mit an, der wiederum nur die Hauptverzweigungsäste misst. Diese „*corneal main nerve fiber branch density*“ (CMNBD) ist durch braun markierte Punkte dargestellt (Abb. 10) [84].

Werden alle aufgenommenen Nervenfasern nachgezeichnet, kann der Parameter der CNFL bestimmt werden.

Die Werte der Parameter (CNFL, CNBD, CNFD) für einen gesunden Probanden sind deutlich höher als die Werte für einen gleichaltrigen Diabetiker mit schwerer Polyneuropathie [109].

Für den Parameter der Nervenfasertortuosität gilt dies nicht. Bei einem gesunden Probanden ist der Verlauf eher geradlinig mit niedrigem Ausgangswert, während bei einer diabetischen Polyneuropathie der Verlauf irregulärer und stärker gewunden ist und folglich mit einem höheren Messwert einhergeht [113].

1.3.7 Tierexperimente zur in vivo CLSM

In der Grundlagenforschung sind auch heute noch trotz aller Kritik Tierexperimente unverzichtbar, um systemische Wirkungen von Krankheiten und Therapien im Gesamtorganismus erforschen zu können.

Im Jahr 2010 untersuchten Reichard et al. die Methode der CLSM an 6 verschiedenen Tierarten: einem Hund, einer Katze, einem Schaf, einem Kaninchen, einer Ratte und einer Maus. Für die Untersuchung der IVCCM mussten die Tiere kurzzeitig narkotisiert werden [114].

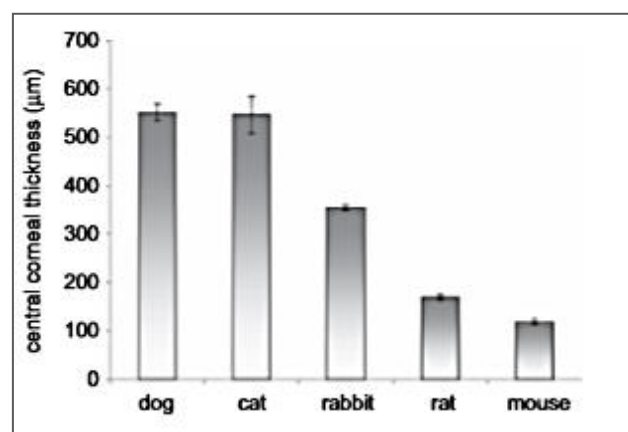


Abbildung 11: Zentrale Dickenmessung in µm der Kornea für Hund, Katze, Hase, Ratte und Maus [114].

Zunächst wurde eine Pachymetrie der Kornea aller verwendeten Tierarten durchgeführt. Die Dickenmessung der Kornea ergab für Hund und Katze vergleichbare Werte wie beim Menschen. Mit Abnahme der Tiergröße nahm ebenfalls die zentrale Dicke der Kornea ab, am geringsten war diese bei der Maus mit einer zentralen Dickenmessung von 100µm [114].

Das corneale Epithel wies bei allen Spezies mit minimalen morphologischen Variationen die drei vorkommenden Zelltypen auf. Die Größe der Zellen nahm von der Oberfläche bis zur Basalmembran stetig ab. Die Superfizialzellen erschienen polygonal mit hyperreflektivem Zytoplasma und prominenten Nuklei [114]. Die Zellgrenzen waren klar definiert. Die Intermediärzellen stellten sich kleiner mit einem hyporeflektivem und dunklem Zytoplasma dar. Zellkerne dieses Zelltyps konnten in keiner Spezies mittels IVCCM beobachtet werden. Die Basalzellen wiesen die gleiche Form auf wie die Flügelzellen bei geringerer Größe. In allen Tierarten wurde eine amorphe Zellschicht der Bowmann'schen Membran von 2 bis 4µm visualisiert [114]. Eine ausgeprägte Bowmann'sche Membran mit einer Größe von 10 µm konnte mittels IVCCM nur in Schafen nachgewiesen werden.

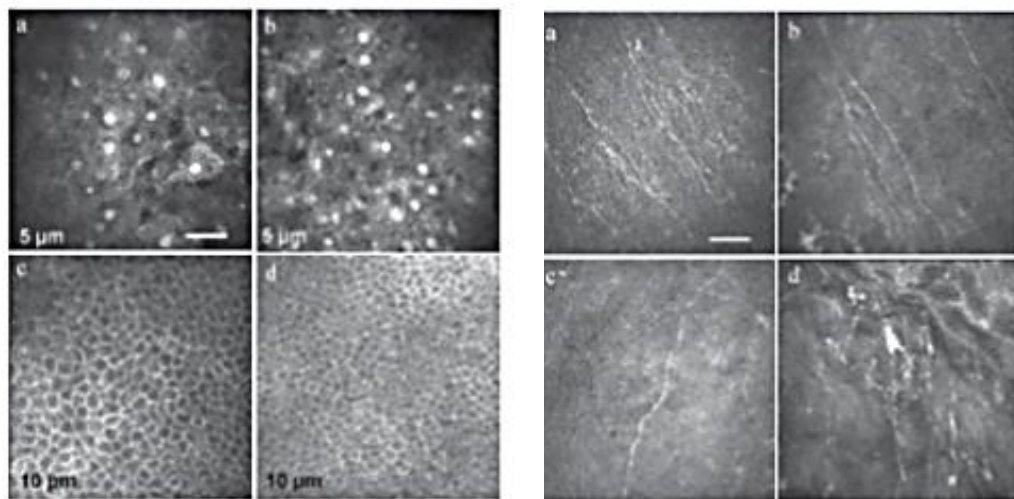


Abbildung 12: In der ersten Abbildung (links) sind die Superfizialzellen des Epithels von Hund (a) und Kaninchen (b) dargestellt, gefolgt von den Intermediärzellen beim Hund (c) und Kaninchen (d). In der zweiten Abbildung (rechts) ist der sub-epitheliale Nervenplexus von Maus (a), Hund (b), Kaninchen (c) und Schaf (d) illustriert. Scale bar 50 µm [114].

Unterhalb der Basalmembran ließen sich in allen Tierspezies dünne, parallel verlaufende Nervenfasern darstellen, welche den sub-epithelialen Nervenplexus formten. Die Nervenfasern unterschieden sich zwar nicht hinsichtlich ihrer Morphologie, variierten jedoch

stark in der Menge. Am dichtesten erschien der sub-epitheliale Nervenplexus in Mäusen und Schafen (Abb.12 a und b) in der IVCCM [114].

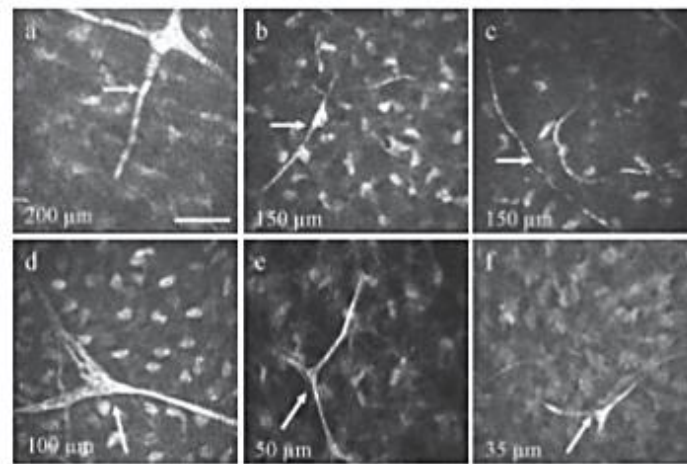


Abbildung 13: Anteriore Stroma eines Schafes (a), eines Hundes (b), einer Katze (c), eines Kaninchens (d), einer Ratte (e) und einer Maus (f). Der weiße Pfeil ist auf die linear verlaufenden, dicken stromalen Nervenfasern gerichtet. In den Keratozyten der Mäuse sind kleine Zellkerne abgrenzbar. Scale bar 50 µm [114].

Die Stroma Region wies in Schafen, Hunden, Katzen, Kaninchen und in Ratten (Abb. 13 a-e) hyperreflektive Zellkerne der Keratinozyten auf. Nur in Mäusen (Abb. 13 f) waren die Zellkerne der Keratinozyten mittels IVCCM nicht sichtbar. Zudem präsentierten sich die Keratinozyten als ein Netzwerk gräulich reflektierender Strukturen, welche durch Fortsätze miteinander verbunden schienen [115]. Den höchsten Anteil an Keratinozyten wurde in Katzen und Kaninchen gefunden [114]. Die Form der Keratinozyten schien sich innerhalb des Stromas von anterior nach posterior speziell in Schafen von oval bis hin zu triangulär zu verändern. Zellkerne der Keratinozyten von Hunden und Katzen zeigten keine morphologischen Unterschiede innerhalb des Stroma [116]. In der Kornea der Ratten waren die Zellkerne der Keratinozyten im anterioren als auch im posterioren Stroma hyperreflektiv [116].

Stromale Nervenfasern wurden in allen Spezies beobachtet [114]. Deren Visualisierung variierte von multiplen feinen hyperreflektiven Fasern, die sich verzweigten oder einzeln verliefen bis hin zu Fasern mit einem Durchmesser von über 50µm [114]. Gemein hatten alle Spezies den höchsten Gehalt an stromalen Nervenfasern im anterioren und mittleren Stroma-Bereich [114, 116].

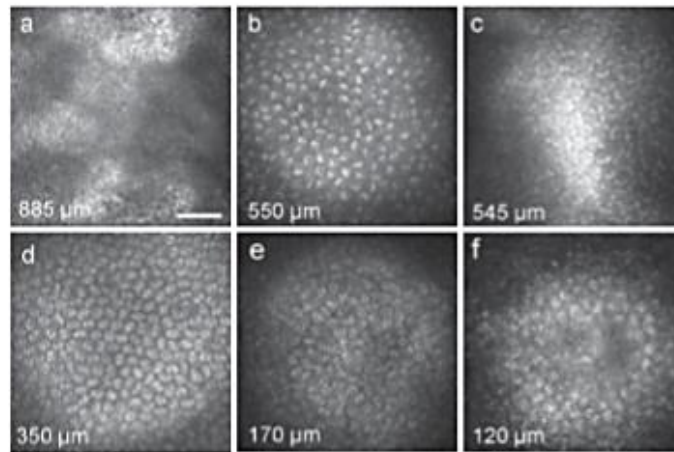


Abbildung 14: Endothelzellen von Schaf (a), Hund (b), Katze (c), Kaninchen (d), Ratte (e), Maus (f). Scale bar 50 µm. [113].

Die Descemet-Membran erschien bei Schafen, Hunden und Katzen als eine amorphe azelluläre Schicht oberhalb des Endotheliums. Im Schaf war die Descemet Membran sehr prominent und stark hyperreflektiv ausgebildet. Diese überlappte teilweise mit den endothelialen Zellen (Abb. 11 a), sodass eine Differenzierung zwischen den beiden Schichten erschwert war [114]. Im Gegensatz dazu konnte in Mäusen und Ratten die Descemet-Membran mittels IVCCM nicht dargestellt werden [117]. Das Endothel (Abb. 14 b-f) wies wie beim Menschen auch hexagonal geformte, hyperreflektive Zellen auf [114].

In der von Reichard et al. (2010) durchgeführten Querschnittsstudie konnte somit gezeigt werden, dass die in vivo CLSM-Methodik auch in verschiedenen Spezies anwendbar ist [114].

1.4 Zielstellung der Arbeit

Mit der Entwicklung der nicht-invasiven IVCCM steht nun eine neue, vielversprechende und einzigartige Methode im Bereich der Diagnostik und Evaluation der Therapie neuropathischer Erkrankungen zur Verfügung. Es können mittels dieser Methode Nervenfasern nicht-invasiv und in Echtzeit untersucht werden.

Inwieweit korneale Nervenfasern als potenzielle Biomarker im Rahmen einer diabetischen Neuropathie eingesetzt werden können und ob die Anwendung der IVCCM und deren Nutzen im klinischen Alltag anwendbar und effizient ist, muss erst in weiterführenden Longitudinalstudien untersucht werden.

Um diese Thematik näher zu beleuchten, lag das Hauptaugenmerk dieser Dissertation in der Untersuchung der kornealen Nervenfasern in vivo per CLSM und ex vivo per Fluoreszenzmikroskopie. Im Rahmen dieser Studie wurde der transgene Thy1-YFP Mausstamm verwendet, dessen Neurone das Fluoreszenzprotein YFP exprimieren. Zudem sollte untersucht werden, ob korneale Nervenfasern mögliche Veränderungen der intraepidermalen Nervenfasern im Anfangsstadium eines Diabetes mellitus (Diabetesdauer ca. 4 Wochen) widerspiegeln. Dazu wurde in Thy1-YFP Mäusen ein Diabetes mellitus mittels STZ chemisch induziert. Nach Manifestation der Erkrankung, erfolgte eine Insulintherapie über einen Zeitraum von 8 Wochen. Anschließend wurden verschiedene Stoffwechselfparameter und die kornealen sowie intraepidermalen Nervenfasern der diabetischen Tiere untersucht.

Fragestellungen dieser Arbeiten waren:

1. Bestehen Korrelationen zwischen den Stoffwechselfparametern und den morphologischen Veränderungen des SEP der Kornea von diabetischen und nicht-diabetischen Thy1-YFP Mäusen nach 4-wöchiger Diabetesdauer?
2. Ist die Ermittlung der CNFL als Parameter durch ein semi-automatisches (NeuronJ) und ein automatisches Verfahren (MATLab) vergleichbar?
3. Zeigen sich morphologische Veränderungen der sub-epithelialen Nervenfasern zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Thy1-YFP Mäusen in den ex vivo Präparaten der Kornea nach 4-wöchiger Diabetesdauer und korrelieren diese zwischen

den peripheren und zentral gemessen Abschnitten? Dazu wurde die Kornea ex vivo zusätzlich in 4 Quadranten inferonasal, inferotemporal und superonasal und superotemporal unterteilt.

4. Bestehen Korrelationen zwischen den kornealen und intraepidermalen Nervenfasern in diabetischen und nicht-diabetischen Tieren?
5. Welchen Einfluss hat eine 8-wöchige Insulintherapie auf Stoffwechselfparameter und die kornealen und intraepidermalen Nervenfasern der diabetischen Mäuse im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrollen?
6. Eignet sich der hier verwendete transgene Mausstamm Thy1-YFP und ein chemisch induzierter Diabetes mellitus zum weiteren Erkenntnisgewinn zur diabetischen Neuropathie?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Aceton	J.T.Baker, Gliwice, Polen
Bovine serum albumin (BSA)	PAA, Cölbe, Deutschland
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Karlsruhe, Deutschland
Diethylether	Deventer, Niederlande
Kohlendioxid medicAL	Düsseldorf, Deutschland
O.C.T. Tissue Tek	Deventer, Niederlande
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Torgelow, Deutschland
Phosphat-Buffer-Solution (PBS)	PAA, Cölbe, Deutschland

2.1.2 Medikamente/Medizinprodukte

Aqua ad iniektabilia	Braun, Melsungen, Deutschland
Atipamezolhydrochlorid ® Antisedan	Antisedan, Espoo, Finnland
Carbomer Gel ®Vidisc	Vidisc, Berlin, Deutschland
Enthaarungscreme ®Pilca	Pilca, Milano, Italien
Glucose 10%	Braun, Melsungen, Deutschland
Hautdesinfektionsmittel ®Braunol	Braun, Melsungen, Deutschland
Insulin-Pellets ®LinBit	LinBit, Scarborough, Kanada
Ketamin ®Ketamin Inresa	Roth, Neuss, Deutschland
Medetomidinhydrochlorazid ®Dorbene	Dorbene, León, Spanien
Streptozotocin	St. Louis, MO, USA
Sucrose	Roth, Heidelberg, Deutschland

2.1.3 Kits

HämoglobinA1c Reagenzkit	Abbott, Tarrytown, USA
C-Peptid ELISA	ALPCO, Salem, NH, USA
AGE ELISA	ALPCO, Salem, NH, USA

2.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

	Antikörper (AK)	Spezies	Hersteller
Primär-AK	Anti-PGP 9.5 (polyklonal)	Kaninchen	Santa-Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA
Sekundär-AK	Anti-Kaninchen-IgG (polyklonal), mit TRITC konjugiert	Ziege	Santa-Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA

2.1.5 Geräte und Software

Blutzuckermessgerät	Abbott, Alameda, Kanada
Blutzucker Teststreifen	Abbott, Alameda, Kanada
DCA HbA1c Analyzer	Tarrytown, USA
FluoView FV10i	Olympus, Hamburg, Deutschland
Heidelberger Retinotomograph II	Heidelberg, Deutschland
Laborwaage Labaoratory LC 620 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Lichtmikroskop Olympus CW2	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
MousefixAnimalholder	Orchtrup, Deutschland
NeuronJ (ImageJ)	NIH, USA
Prism analysis program	San Diego, CA, USA
Rostocker Cornea Modul	Heidelberg, Deutschland
TomoCap	Heidelberg, Deutschland

2.2 Tiermodelle und Tierhaltung

Für den Tierversuch wurden 25 männliche homozygote Mäuse des Stammes B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J, kurz Thy1-YFP, im Alter von 8 bis 12 Wochen verwendet. Der congenetische Mausstamm enthält einen transgenetischen neuronalen Fluoreszenz Marker, welcher das *yellow fluorescence protein (YFP)* in Nervenfasern exprimiert. Die Tiere stammten ursprünglich aus den Jackson Laboratories Charles River und wurden in der Zentralen Versuchstierhaltung der Universität Rostock zu je 2 bis 4 Tieren pro Käfig unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur 23 ± 1 °C, Luftfeuchtigkeit 53 ± 2 %, künstlicher Tag-/Nachtrhythmus, Hellphase von 7.00 bis 19:00 Uhr) gehalten. Eine individuelle Markierung der Tiere erfolgte mittels Ohrlochcodierung. Trockenfutter (pelletiertes Alleinfuttermittel) und Trinkwasser (Leitungswasser) standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Für die Versuche lag ein genehmigtes Versuchstiovorhaben des Landesamtes für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern vor.

2.3 Tierversuchsvorhaben

Es wurde eine longitudinale Studie über einen Gesamtzeitraum von 12 Wochen durchgeführt. Der zeitliche Versuchsablauf ist in der nachfolgenden Abbildung schematisch dargestellt.



Abbildung 15: Zeitachse des Versuchsablaufs. Dauer für STZ bzw. Kontrollpuffer-Applikation (roter gestrichelter Balken) und Insulintherapie (grün gestrichelter Balken)

Zu Beginn wurde die Baseline der Versuchstiere bezüglich verschiedener Stoffwechselfparameter (Blutglukosekonzentration, HbA1c-Wert, AGE-Level), einschließlich des Körpergewichts, bestimmt. Des Weiteren erfolgte anfangs eine Untersuchung der Kornea beider Augen mittels IVCCM, um eventuelle Vorschädigungen ausschließen zu können und die Ausgangswerte der CNFL des sub-epithelialen Nervenplexus eines jeden Tieres zu bestimmen. Die 25 Versuchstiere wurden anschließend randomisiert in 2 Kohorten eingeteilt,

eine mit Streptozotocin behandelte diabetische (n=15) und eine nicht-diabetische Gruppe (n=10), welche nur mit dem Lösungspuffer des STZ behandelt wurde und als Kontrollgruppe diente.

Die kornealen Nervenfasern des SEP wurden 2-wöchentlich nach STZ-Verabreichung untersucht. Nach vierwöchiger Dauer des induzierten Diabetes wurde die Hälfte der Tiere beider Kohorten getötet. Die Gewebeentnahmen von Kornea und Haut wurden dann mittels ex vivo Fluoreszenzmikroskopie untersucht und deren Werte der Nervenfasernlänge/-dichte unter Korrelation zu den Stoffwechselfparametern miteinander verglichen. Die verbliebenen diabetischen Tiere wurden nun mit Insulin-Pellets behandelt, um den Blutglukosespiegel zu normalisieren und den möglichen Einfluss auf die CNFL des sub-epithelialen Nervenplexus nach weiteren 2 und 8 Wochen (Gesamtzeitraum 12 Wochen) zu untersuchen. Zum Ende des Experiments wurden alle verbliebenen Tiere getötet, die Gewebe der Kornea und der Haut wurden mikroskopisch untersucht und die Parameter miteinander als auch mit den Ausgangs- und Zwischenwerten unter Korrelation zu den Stoffwechselfparametern verglichen.

2.4 Bestimmung der Blutglukosekonzentration

Die Konzentration der Blutglukose wurde engmaschig alle 2 Tage morgens zwischen 7.00 und 11.00 Uhr, unter nachfolgender Insulintherapie auch am späten Nachmittag zwischen 16.00 und 18.00 Uhr, bestimmt. Durch Anritzen der Schwanzspitze wurde der gewonnene Blutstropfen an den Teststreifen des Blutzuckermessgerätes gehalten. Die anschließende Messung erfolgte auf Grundlage der Glukoseoxidase-Methode. Der Messbereich des Gerätes liegt im Bereich zwischen 1,1 und 27,8 mmol/l. Werte oberhalb 27,8 mmol/l werden mit „Hi“ und Werte unterhalb 1,1 mit „Lo“ bezeichnet.

2.5 Bestimmung des Körpergewichts

Das Körpergewicht der Tiere wurde im Anschluss an die Messung der Blutglukosekonzentration mit einer Laborwaage bestimmt.

2.6 Bestimmung der Hämoglobin A1c-Werte

Der HbA1c-Wert wird als Langzeitparameter in der Diabetologie für die Höhe der Blutglukosespiegel der letzten 8 bis 12 Wochen genutzt. Dieser ergibt sich als prozentualer Anteil aus dem Verhältnis zwischen spezifischer HämoglobinA1c-Konzentration und dem Gesamthämoglobingehalt. Neuere Richtlinien empfehlen die Angabe des HbA1c-Wertes in mmol/mol. In diesem Experiment wurde ein DCA Analysegerät verwendet. Die notwendigen Reagenzien befanden sich in einer DCA HbA1c-Reagenz-kassette. Chemische Grundlage für

die Bestimmung der spezifischen HbA1c-Konzentration bildet ein Immuno-Latex-Agglutinationsassay. Für die Bestimmung des HbA1c-Wertes wurde 1 µl Blut durch Anritzen der Schwanzspitze entnommen. Die Messung des HbA1c dauerte ca. 6,5 Minuten. Es wurden Werte zwischen 3,83 bis 129,51 mmol/mol angezeigt.

2.7 Blut-Serum Assays

2.7.1 Gewinnung des Blutserums

Unter kurzzeitiger Diethylether-Narkose wurde der retroorbitale venöse Plexus der Tiere mittels eines nicht heparinisierten 4 µl Einmalkapillarröhrchens punktiert und max. 300 µl Blut in ein Eppendorfröhrchen überführt. Die Proben wurden für max. 6 h bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Für die endgültige Serumgewinnung erfolgte die Zentrifugierung bei 3500 rpm bei 4°C für 10 Minuten. Der Überstand, das Serum, wurde in ein neues Gefäß pipettiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.7.2 ELISA zur Ermittlung des C-Peptid-Gehalts

Die Bestimmung der C-Peptid-Konzentration erfolgte mittels eines enzymatischen Immunoassays exakt nach Herstellerangaben. Grundlage des Verfahrens bildet ein Sandwich-ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) mit nachfolgender Farbreaktionsmessung, deren Ausmaß sich proportional zur C-Peptid-Konzentration verhält.

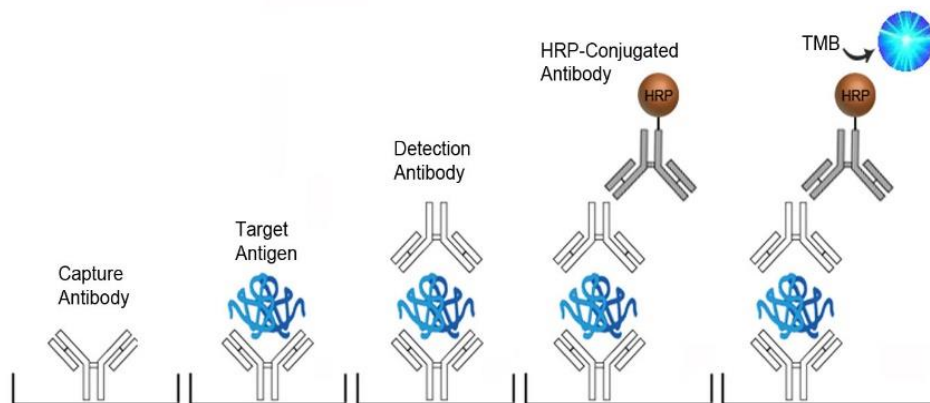


Abbildung 16: Schematisches Prinzip eines Sandwich-ELISA (modifiziert nach https://www.lsbio.com/image2/mouse-igg-elisa-kit-sandwich-elisa-ls-fl0451/255806_1927627.jpg)

Die Mikrotiterplatte enthält einen monoklonalen C-Peptid-Antikörper (*coated*-Antikörper), an den das C-Peptid als Antigen aus der Serumprobe binden kann. Zum Inkubationsansatz wird ein enzymmarkiertes Konjugat, welches an den unterschiedlichen Epitopen des C-Peptids binden kann, hinzugegeben. Es kommt zur Ausbildung eines Antikörper-Antigen-Antikörper Komplexes - sog. Sandwich-Komplex. Nach 2 stündiger Inkubationszeit auf einem

Mikroplattenschüttler bei 800 rpm erfolgt eine 3malige Waschung mit Waschpuffer. Anschließend wird das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben und für 10 Minuten erneut auf einem Mikroplattenschüttler bei 800 rpm inkubiert. Durch Hinzugabe einer Stopplösung wird die Reaktion des TMB zu einer gelblich-farbigem Verbindung durch die antikörpergebundene Peroxidase unterbunden. Die Absorption des gelben Farbumschlags wird mit einem Mikroplatten Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Der C-Peptid-Gehalt der einzelnen Serumproben wird durch Aufstellen einer Standardkurve errechnet. Diese ergibt sich aus der zu den Serumproben parallel gemessenen C-Peptid-Standard-Reihen: 0 pM, 60 pM, 250 pM, 750 pM, 1500 pM, 3000 pM. Die Einheit der Ergebnisse wird in ng/ml angegeben. Dabei entsprechen 320,3 pM = 1 ng/ml. Alle Messungen der Proben wurden als Doppelbestimmung durchgeführt.

2.7.3 ELISA zur Ermittlung der AGEs-Konzentration

Die Bestimmung der AGEs-Konzentration erfolgte nach ähnlichem Prinzip wie die Messung des C-Peptid-Gehalts. Grundlage dieses Verfahrens bildet ebenfalls ein Sandwich ELISA, dessen Signaldetektion auf der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC) beruht. Avidin, welches aus Hühnereiern gewonnen wird, besitzt eine hohe Affinität für das Glykoprotein Biotin. Das generelle Prinzip beruht darauf, dass Avidin einen biotynilierten sekundären Antikörper bindet, der eine Meerrettichperoxidasereaktion (HRP) katalysiert. Die nachfolgende Farbreaktionsmessung verhält sich proportional zur AGEs-Konzentration.

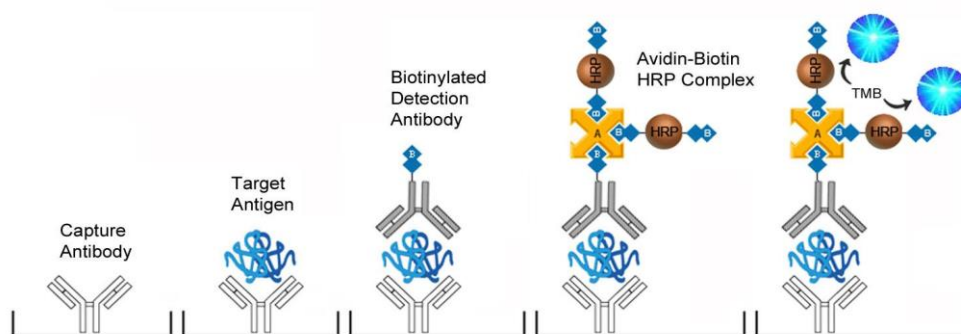


Abbildung 17: Schematische Darstellung eines Sandwich ELISA (modifiziert nach https://www.lsbio.com/image2/mouse-igg-elisa-kit-sandwich-elisa-ls-fl0451/255806_1927627.jpg)

Die Messung der AGE-Konzentration erfolgte exakt nach Herstellerangaben. Deren Gehalt, der gemessenen Serumproben, ergab sich zu den parallel gemessenen Standardreihen: S1 - 0,156 µg/ml, S2 - 0,312 µg/ml, S3 - 0,625 µg/ml, S4 - 1,25 µg/ml, S5 - 2,5 µg/ml, S6 - 5 µg/ml, S7 - 10 µg/ml.

2.8 Induktion eines Diabetes mellitus

Das Streptozotocin wurde den Versuchstieren in Form einer *multiple low-dose* Injektion (65 mg/kg) intraperitoneal an fünf aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht. Vor der Applikation mussten die Tiere für 4 Stunden (von 10.00 bis 14.00 Uhr) nüchtern belassen werden, dabei stand ihnen Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Das Gewicht der Tiere wurde zu jedem Verabreichungszeitpunkt neu bestimmt. In der Anwendung des Streptozotocins wurden dessen hohe Lichtempfindlichkeit als auch dessen Instabilität in Lösungen berücksichtigt. Hierzu wurde das Streptozotocin in einer Konzentration von 6 mg/ml in 50 mM Natrium-Citrat-Puffer (pH-Wert 4,5) gelöst. Die Injektion erfolgte rasch innerhalb von 10 Minuten in der anfangs genannten Dosierung. Die Tiere wurden hierfür kurzzeitig in Diethylether narkotisiert. Die selektive Zerstörung der Beta-Zellen durch das Streptozotocin birgt das potenzielle Risiko einer hypoglykämischen Entgleisung für die Tiere innerhalb der ersten 48 h. Um dieser entgegenzuwirken wurde das Trinkwasser nach jeder Applikationsrunde mit 10%iger Glukose Lösung aufgefüllt.

2.9 Implantationen von Insulin-Pellets

Die Insulinpellets wurden den Mäusen unter Diethylethernarkose subkutan zwischen den Schulterblättern implantiert. Das betreffende Hautareal wurde mit einem Hautdesinfektionsmittel desinfiziert. Die Insulin-Pellets, welche zuvor in Braunollösung getränkt waren, wurden über einen Trokar (12 G) verabreicht. Eine Naht der Einstichstelle nach Applikation erfolgte nicht. Die Anzahl der verabreichten Insulinpellets richtete sich nach den Empfehlungen des Herstellers und variierte zwischen 0,5 bis 2 Pellets.

2.10 In vivo konfokale Laserscanning-Mikroskopie

2.10.1 Narkotisierung der Versuchstiere

Um die in vivo CLSM durchführen zu können, mussten die Tiere zu Beginn immobilisiert werden. Hierfür wurden die Tiere mit einer subkutanen Injektion von Medetomidine (0,5 mg/kg) und Ketamin (5 mg/kg) narkotisiert. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde durch eine Schmerzreizung am Schwanz überprüft. Um einer Austrocknung der Kornea vorzubeugen, wurde auf beide Augen ein Tropfen Carbomer Gel aufgetragen. Im Anschluss wurde die narkotisierte Maus für die Zeit der Untersuchung in einem *Mousefix-Animalholder* fixiert. Ein integriertes Wärmegerät sorgte für die kontinuierliche Aufrechterhaltung einer Körpertemperatur von 37 °C. Nach Abschluss der 20 bis 30-minütigen Untersuchung erhielten die Mäuse s.c. Atipamezole (1,5 mg/kg) als Antidot für Medetomidine. Unter Rotlichtbestrahlung konnten die Tiere langsam wiedererwachen.

2.10.2 Bildaufnahmen des sub-epithelialen Nervenplexus der Kornea

Für die Untersuchung der Kornea wurde der Heidelberg Retinotomograph II als in vivo konfokales Laserscanning-Mikroskop in Kombination mit dem Rostock Cornea Modul (RCM) verwendet. Das Mikroskop ist mit einem Wasserimmersionsobjektiv (x63/0,95 NA, Carl Zeiss) und einer Nikon 0,09 mm² Feldlinse ausgestattet. Das zu untersuchende Auge wurde so positioniert, dass der zentrale Teil der Kornea senkrecht zum Objektiv ausgerichtet war. Sowohl auf die Frontlinse als auch auf das Auge wurde ein Tropfen Carbomer Gel aufgetragen. Die dazwischen gekoppelte Polymethylmetacrylat-Kappe (TomoCap) am Objektiv sorgte für einen kohärenten Strahlengang des Lasers zwischen Frontlinse und Kornea. Alle Aufnahmen wurden als real-time Display über eine integrierte, digitale Kamera des Mikroskops auf einem Computer angezeigt.

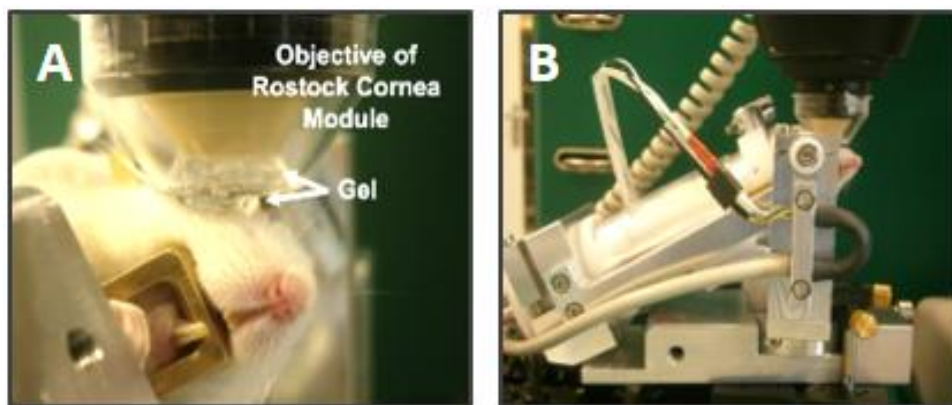


Abbildung 18: Fixierung und Positionierung der zu untersuchenden Maus im Mousefix-Animalholder (A, B)

Zunächst wurde die Kornea durch manuelle vertikale und horizontale Ausrichtung des Objektivs aufgesucht. Als oberflächliche Schicht konnte das Epithel durch dessen charakteristische Form der Flügelzellen dargestellt werden. Mittels eines motorisierten Joysticks war es möglich, die axiale Tiefe einzustellen, um sich so in den einzelnen Schichten der Kornea dreidimensional zu bewegen. Der sub-epitheliale Nervenplexus konnte aufgrund seiner charakteristischen Lage zwischen Stroma und Basalzellen des Epithels identifiziert werden. Die Nervenfasern des sub-epithelialen Plexus wiesen die charakteristische feine, linear verlaufende Form auf. Sobald die korrekte Ebene aufgefunden wurde, erfolgten mittels des Sequenz-Modus konsekutiv Einzelaufnahmen mit einer Rate von 4 Bildern pro Sekunde über eine größtmögliche Fläche des sub-epithelialen Nervenplexus. Bedingt durch die konvexe Form der Kornea wurden zentral gelegene, planare Bilder aufgenommen. Wenn

während der Aufnahmen abgerundete Randbereiche erreicht worden waren, wurden diese als außerhalb des Zentrums gewertet und nicht weiter aufgenommen. Ein automatisch gesichertes 2D Einzelbild hatte eine Größe von 300x300 μm (z-Achse 5 μm) bei einem Auflösungsvermögen von 384x384 Pixeln. Es wurden von jedem Auge insgesamt ca. 800 bis 1000 Einzelbilder eines z-Stapels aufgenommen.

2.10.3 Quantifizierung der sub-epithelialen Nervenfasern der Kornea

Für die Quantifizierung des sub-epithelialen Nervenplexus wurden zunächst Bildaufnahmen ausgewählt, die den folgenden Kriterien entsprachen.

1. Aufnahmen mit höchster Kontrastierung und klarer Definition der feinen sub-epithelialen Nervenfasern
2. Aufnahmen mit der optisch-höchsten Nervenfaserdichte
3. Keine sich überlappenden Bilder
4. Absenz von Druck -und Bewegungsartefakten

Es wurden von jedem Auge ca. 5 bis 7 Einzelbildaufnahmen ausgewählt und mittels zwei verschiedener Quantifizierungsverfahren vergleichend ausgewertet.

Bei der ersten Methode handelte es sich um ein manuelles Verfahren eines Plug-in-Programms von ImageJ. Dabei wurden mit Hilfe eines Pencil-Tools die sub-epithelialen Nervenfasern nachgezeichnet. Sichtbare stromale Nervenfasern als auch dendritische Zellen wurden von der Quantifizierung ausgeschlossen. Die Gesamtlänge aller Nervenfasern wurde als korneale Nervenfaserlänge (CNFL) in mm/mm^2 pro Bild angegeben. Für die Berechnung wurde entsprechend der Größe und des Auflösungsvermögens eines Bildes ein Kalibrierungsfaktor von 1,28 $\text{pixel}/\mu\text{m}$ genutzt. Die Nervenfaserlänge für jede Kornea wurde als CNFL-Mittelwert angegeben.

Bei der zweiten Methode wurde ein automatisiertes Programm Matlab® (The MathWorks, Natick, MA) zur Erfassung der Nervenfasern genutzt. Die Aufnahmen wurden von Pedro Guimarães ausgewertet und verglichen.

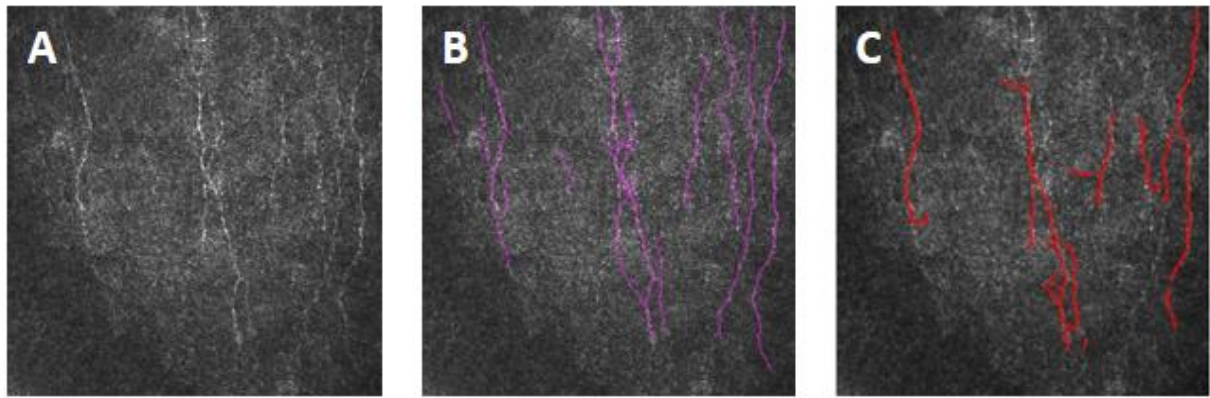


Abbildung 19: In vivo CCM Aufnahme des SEP der Kornea einer gesunden YFP-Maus (A). Manuelle Markierung der Nervenfasern (lila) mittels des semi-automativen Programms Imag/J (B). Automatisierte Markierung der Nervenfasern (rot) unter Verwendung des Programms MATLAB (C)

2.11 Ex Vivo Fluoreszenzmikroskopie der Kornea

2.11.1 Extraktion und Asservierung der Kornea

Die Tiere wurden mittels Kohlenstoffdioxidbegasung getötet. Für die Enukleation des Auges mussten zuerst die Augenlider mit einer Kolibripinzette (0,12 mm) gespreizt werden, umso den Augapfel vollends sichtbar zu machen. Als Nächstes wurde der obere Pol der Kornea durch einen angenähten Fadenknoten markiert. Mit einer Schere erfolgte nun die eigentliche Enukleation des Augapfels aus der Orbita, indem der Sehnerv durchtrennt und umliegende Binde- und Muskelgewebe entfernt wurden. Anschließend wurde das entnommene Auge in 1M PBS gewaschen und für 30 Minuten in PFA 4 % fixiert. Für die Extraktion der Kornea erfolgte zunächst die Halbierung des Auges in ein vorderes und hinteres Segment. Hierzu wurde der Bulbus oculi an der Nervenaustrittsstelle mit einer Micro-Pinzette fixiert und die Lederhaut mit einer Phakolanz (1,5 mm; 45°) eingestochen. Entlang der Einstichstelle konnte mittels einer Federschere (gebogen; Blattlänge 6,5 mm) das Auge halbiert werden. Aus dem vorderen Segment wurden vorsichtig Linse und Iris entfernt, sodass die Kornea extrahiert werden konnte. Für die bessere Handhabung der Kornea wurde ca. 1 mm Limbus belassen. Nach erneuter 30-minütiger Fixierung des Präparats in 4 % PFA wurde die Kornea in 0,1M PBS 30%iger Sucrose-Lösung im Kühlschrank bei 4°C asserviert.

2.11.2 Unterteilung der Kornea

Vor der mikroskopischen Untersuchung der Kornea wurde diese nach Entnahme aus der Sucrose-Lösung in 1M PBS gewaschen und unter einem Lichtmikroskop in 4 gleichgroße Quadranten superonasal (SN) und- temporal (ST) sowie inferonasal (IN) und –temporal (IT) unterteilt (siehe Abbildung). Der angenähte Faden diente zur Orientierung des oberen Pols.

Mit Hilfe einer Micro-Pinzette und einer Federschere wurden die gegenüberliegenden Randbereiche der Kornea vorsichtig übereinander geklappt und unter Zuhilfenahme einer Millimeterskalierung in vier annähernd gleich große Viertel-Hälften geteilt zu werden.

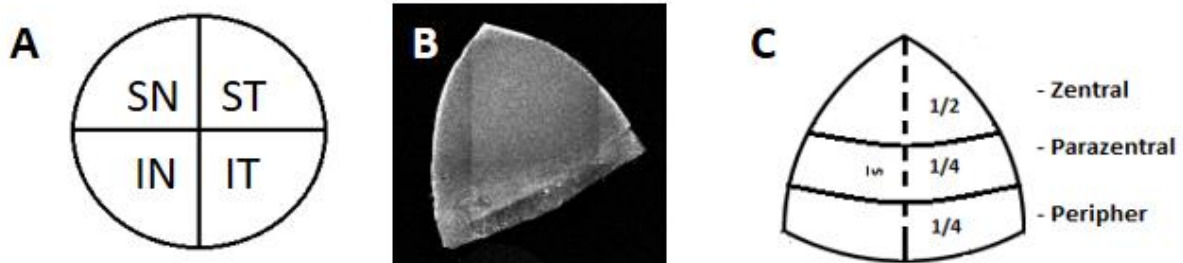


Abbildung 20: Unterteilung der Kornea eines linken Auges (A), mit FM aufgenommener Quadrant (B) 3 Zonen eines Quadranten unter Vermessung der Strecke s (C),

Ein Quadrant der Kornea wurde auf einem Objektträger mit Dapi Mountifluor-Medium eingedeckelt. Nach einer kurzen Einwirkzeit von 30 Minuten wurde das Präparat unter einem FV10i Fluoreszenzmikroskop untersucht. Anhand eines Übersichtsfensters auf dem Computerbildschirm war es möglich jeden einzelnen Quadranten in 3 ähnlich großflächige Zonen einzuteilen (peripher, parazentral und zentral).

2.11.3 Ex Vivo Bildaufnahmen der Kornea

Die Bildaufnahmen erfolgten mit dem konfokalen Fluoreszenz-Mikroskop, Fluoview 10i und einem UPLASAPO 60x Ölobjektiv (NA 1.35). Die Nervenfasern wurden über das YFP mittels eines Laserdiode von 473 nm (15 mW) sichtbar gemacht. Die Anregung der mit DAPI-gefärbten Zellkerne erfolgte mit einer Laserdiode von 405 nm (22 mW).

Um sich in dem Präparat zu orientieren, wurden zunächst die mit DAPI-angefärbten Basalzellen des Epithels aufgesucht, welche durch ihre eng angeordnete Struktur und hexagonale Form leicht identifizierbar waren. Die sub-epithelialen Nervenfasern verliefen als feine Einzelstränge unterhalb der Basalzellen des Epithels. Stromale Nervenfasern setzten sich aus mehreren Nervenfaserbündeln zusammen und konnten sicher zu den singulären sub-epithelialen Nervenfasern abgegrenzt werden. Jeweils von der Peripherie und des Zentrums eines jeden Quadranten entsprechend der Abbildung 20 B/C wurden ca. 7 bis 10 Einzelbilder aufgenommen. Ein Bild hatte eine Größe von 212x212 μm (Auflösungsvermögen 1024x1024 Pixel, z-Achse 1,37 μm) und wurde anschließend mittels FluoView-Software schwarz-weiß kontrastiert.

2.11.4 Quantifizierung des sub-epithelialen Nervenplexus

Die qualitativ hochwertigsten Aufnahmen für jeden Quadranten wurden, wie unter Punkt 2.10.3 beschrieben, ausgewählt. Für jede Zone, Peripherie und Zentrum, eines Quadranten wurden jeweils 5 Aufnahmen mittels NeuronJ quantifiziert. Ein Kalibrierungsfaktor von 4,83 pixel/ μm wurde hierbei genutzt, um die Nervenfasernlänge in mm/mm² angeben zu können.

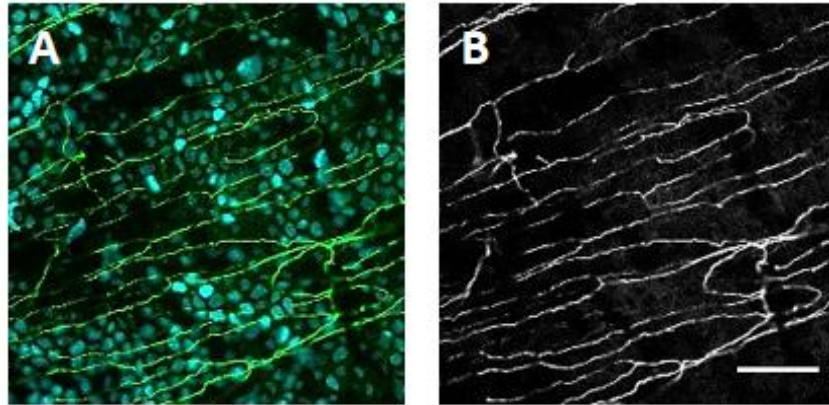


Abbildung 21: FM Aufnahme des sub-epithelialen Nervenplexus (A). Mit Dapi-gefärbte Zellkerne der Basalzellen (Blau) und YFP-Nervenfasern (grün). Schwarz-Weiß-Kontrastierung der Bildaufnahme (B). Skala 50 μm .

2.12 Ex Vivo Fluoreszenzmikroskopie der Hautbiopsie

2.12.1 Extraktion der Hautbiopsie

Einen Tag vor der Tötung durch Kohlendioxidbegasung wurden die Füße beidseits mit Enthaarungscreme eingerieben. Mittels eines Skalpells und einer anatomischen Pinzette war es möglich, die Haut der Plantarseite des Fußes zu entfernen. Ein Hautschnitt umfasste eine Größe von ca. 5x1 mm und wurde zügig longitudinal mit dem lateralen Anteil zur Schnittseite in einem Cryomold-Einbetttschälchen, gefüllt mit Cryomatrix, in flüssigem Stickstoff bei -80°C schockgefroren und bei gleicher Temperatur bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Von Frau Giers wurden die Kryostatschnitte der Gewebeproben angefertigt. Ein Schnitt hatte dabei eine Dicke von 5 μm und wurde bis zur Mikroskopie bei -20°C Grad aufbewahrt.

2.12.2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung (IIF)

Zusätzlich zum endogenen YFP wurden die Nervenfasern unter Verwendung eines Antikörpers gegen den Pan-neuronalen Marker, Anti-PGP.9.5, mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung (Prinzip siehe Abbildung) visualisiert.

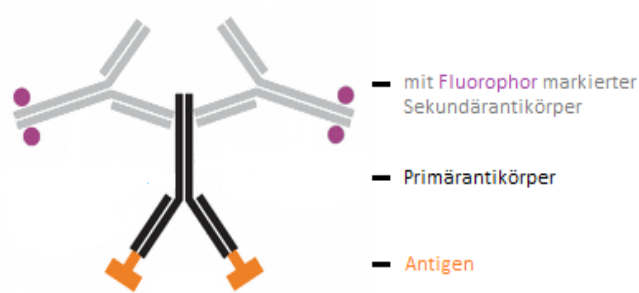


Abbildung 22: Prinzip der indirekten Immunfluoreszenzfärbung Nachgewiesene Antigene (Proteine) werden über zwei nachfolgend verwendete Antikörper detektiert. Durch Lichtemission des an den Sekundärkörper gekoppelten Fluorophors kann das Antigen sichtbar gemacht werden

Beim PGP9.5 handelt es sich um ein Ubiquitin-C-terminal-Hydrolase 1 (UCHL-1) Protein, welches als Thio-Protease Peptidbindungen am C-Terminalen Ende des Ubiquitin hydrolysiert. Das PGP9.5 ist im Zytoplasma lokalisiert und wird in Neuronen und im diffusen neuroendokrinen System exprimiert. Damit der unmarkierte Primärantikörper, Anti-PGP9.5, Zugang zum Antigen findet, wird als erster Schritt die Zellmembran permeabilisiert. Hierfür erfolgte eine 10-minütige Inkubation von 8-10 Kryostatschnitten in einer mit eiskaltem Acton (-20°C) gefüllten Färbeküvette bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden im Anschluss 3x in 1M PBS gewaschen. Pro Schnitt wurden 50 µl Primärantikörper-Lösung (Verdünnung 1:500) aufgetragen, mit Parafilm abgedeckt und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C im Kühlschrank für 15 h inkubiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Parafilms wurden die Präparate drei Mal in 1M PBS gewaschen. Ein mit TRITC konjugierter Sekundärantikörper (Verdünnung 1:500) wurde auf die Schnitte pipettiert, mit Parafilm abgedeckt und bei Raumtemperatur in einer dunklen feuchten Kammer für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde erneut in 1M PBS gewaschen. Die Schnitte wurden mit DAPI-Mountifluor-Medium eingedeckelt und bis zur Mikroskopie im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

2.12.3 Ex Vivo Bildaufnahmen der Hautbiopsie des Fußes

Die Bildaufnahmen der Hautbiopsie erfolgten mit einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop, FluoView 10i. Ein Schnitt wurde bei 60facher Vergrößerung in Ölimmersion untersucht. Die Anregung für YFP und DAPI erfolgte wie unter 12.11.3 beschrieben. Zusätzlich wurde für die Anregung von TRITC die Laserdiode von 635 nm (12 mW) gewählt. Die Epidermis konnte aufgrund der eng angeordneten Basalzellen des Stratum basale der Epidermis identifiziert werden. Zudem war eine stärkere Hintergrundfärbung von YFP und TRITC im Bereich der Epidermis im Vergleich zur schwächer gefärbten Dermis erkennbar. Von den 8 bis 10 Kryostatschnitten wurden 3 mit der optisch-höchsten intraepidermalen Nervenfaserdichte ausgewählt und eine MAP-Aufnahme entlang des Präparates rekonstruiert (Z-Stack 5 µm,

step 0.2 μm , bestehend aus ca. 20-25 Einzelaufnahmen bei einem Auflösungsvermögen von 1024x1024 Pixel).

2.12.4 Quantifizierung der intraepidermalen Nervenfasern der Hautbiopsie

Die Intraepidermalen Nervenfasern wurden entsprechend der Leitlinien der *European Federation of Neurological Societies* quantifiziert. In dem unten dargestellten empfohlenen Schema werden lediglich die Nervenfasern gezählt, welche die epidermale-dermale Grenze sichtbar durchqueren. Aufgrund der stärkeren Hintergrundfärbung der Epidermis kann ohne eine spezifische immunfluoreszierende Färbung der Basalmembran eine optische Unterscheidung zwischen Epidermis und Dermis vorgenommen werden. Mittels des Programms ImageJ konnte die Länge der epidermalen-dermalen Grenze ausgemessen werden. Die intraepidermale Nervenfaserdichte (IENFD) wurde in Anzahl der Nervenfasern/mm angegeben.

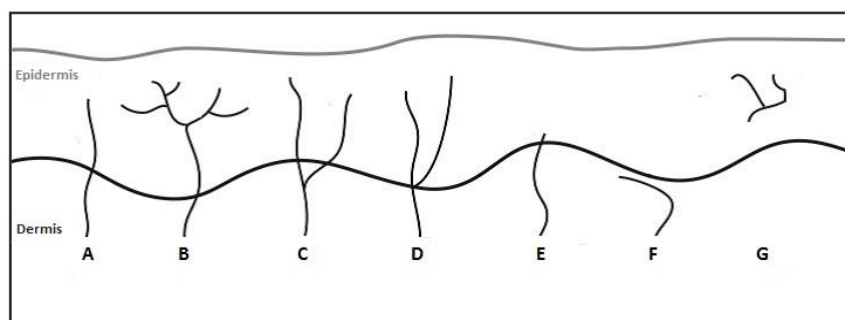


Abbildung 23: Schematische Darstellung für die Erfassung intraepidermaler Nervenfasern gemäß der Empfehlung der EFNS. Schwarz durchgezogene Linie = epidermale-dermale Grenze. Senkrecht dazu verlaufende schwarze Fasern = Nerven. (A) Nervenfasern, welche die epidermale-dermale Grenze passieren, werden gezählt. Nerven, die sich nach deren Durchquerung verzweigen, werden nur einmal gezählt (B). Nervenfasern, die sich vor Passieren der Grenze teilen werden zwei Mal gezählt (C). Nerven, die sich innerhalb der Grenze teilen, werden zwei Mal gezählt (D). Nervenfragmente mit Durchquerung der Grenze werden einmal gezählt (E). Nervenfasern, die nicht sichtbar die Grenze durchqueren (F) oder nur als Fragment in der Epidermis zu sehen sind (G), werden nicht gezählt.

2.13 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen der durchgeführten Versuche erfolgten mit dem Programm GraphPad Prism. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM; „*standard error of the mean*“) angegeben. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % (P-Wert $< 0,05$) wurde als statistisch signifikant angesehen. Die Analyse von zwei unterschiedlichen Merkmalsgruppen erfolgte mit dem Student's t-Test. Lagen mehr als zwei verschiedene Merkmalsgruppen vor, wurde der ein- oder zweifaktorielle ANOVA Test für unabhängige Variablen mit Bonferroni Korrektur verwendet. Um den Zusammenhang zwischen abhängigen und unabhängigen Variablen zu überprüfen, wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Parameter des Stoffwechsels

3.1.1 Blutglukoseverlauf

Die folgende Abbildung 24 veranschaulicht den 4-wöchigen Verlauf der Blutglukosekonzentration nach einem durch Streptozotocin induzierten Diabetes mellitus und der nachfolgenden 8-wöchigen Insulin Behandlung in Form von implantierten *Insulin-releasing-pellets*.

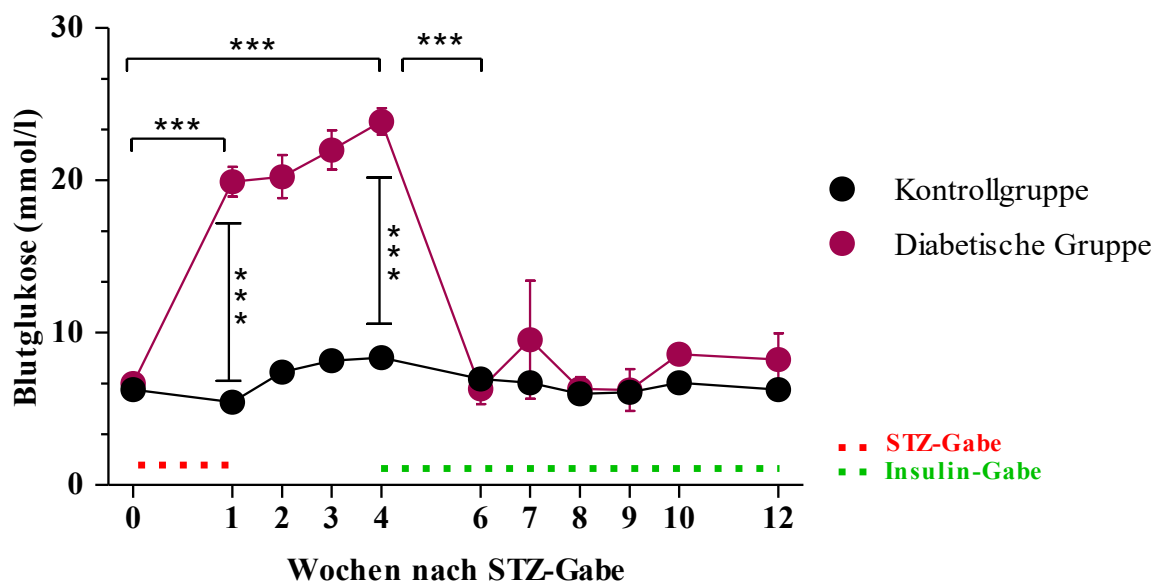


Abbildung 24: 12-wöchiger Verlauf der Blutglukosekonzentration von diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen. Two-Way ANOVA/ Bonferroni Korrektur. Die Daten sind abgebildet als Mittelwert \pm SEM. *** $P < 0,001$. ($n = 5 - 15$). Die rot gestrichelte Linie markiert den Zeitraum für die STZ-Gabe. Die grün gestrichelte Linie markiert die Dauer der Insulingabe.

Zu Beginn zeigten beide Versuchsgruppen ähnliche Ausgangswerte der Blutglukosekonzentration von $6,26 \pm 0,54$ vs. $6,66 \pm 0,50$ mmol/l. Nach einwöchiger Injektion von Streptozotocin stieg die Blutglukosekonzentration der als diabetisch eingestuften Versuchsgruppe signifikant bis auf Werte von $23,8 \pm 0,87$ mmol/l zum Zeitpunkt der 4. Woche an. Die Blutzuckerwerte der nicht-diabetischen Gruppe, welche nur mit dem Injektionspuffer Natrium-Citrat behandelt wurden, blieben mit Werten von $8,36 \pm 0,44$ mmol/l unverändert. Die ermittelten Zeit- und Interaktionseffekte zwischen den beiden Kohorten waren bis Woche 4 signifikant ($P < 0,001$ Two-Way-ANOVA). Eine kontinuierliche Insulin-Therapie über 8 Wochen bewirkte eine Normalisierung des Blutzuckerspiegels in

diabetischen Mäusen ($23,8 \pm 0,87$ vs. $8,24 \pm 1,72$ mmol/l; $P < 0,001$). Zum Ende des Versuches ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der mit Insulin behandelten diabetischen Gruppe und der zeitgleich untersuchten Kontrollgruppe ($8,24 \pm 1,72$ vs. $6,26 \pm 0,29$ mmol/l). Von der 4. bis zur 12. Woche (8-wöchige Insulintherapie) waren die ermittelten Zeit- und Interaktionseffekte ebenfalls signifikant unterschiedlich ($P < 0,001$; Two-Way-ANOVA).

3.1.2 Körpergewichtsverlauf

Zu Beginn wiesen beide Gruppen ähnliche Ausgangskörpergewichte auf ($24,76 \pm 0,50$ vs. $25,79 \pm 0,66$ in g). Als Folge des induzierten Diabetes mellitus nahmen die mit STZ behandelten Tiere im Vergleich zu den gruppeninternen Ausgangswerten und der zeitgleich gemessenen Kontrollgruppe signifikant bis zur 4. Woche an Gewicht ($25,79 \pm 0,66$; $27,13 \pm 0,47$ vs. $21,75 \pm 0,36$ g; $P < 0,001$) ab. Unter anschließender Insulin-Therapie konnte eine Normalisierung des Körpergewichts der diabetischen Gruppe ($25,80 \pm 0,34$ vs. $29,20 \pm 0,56$ in g) erzielt werden (Abb. 25).

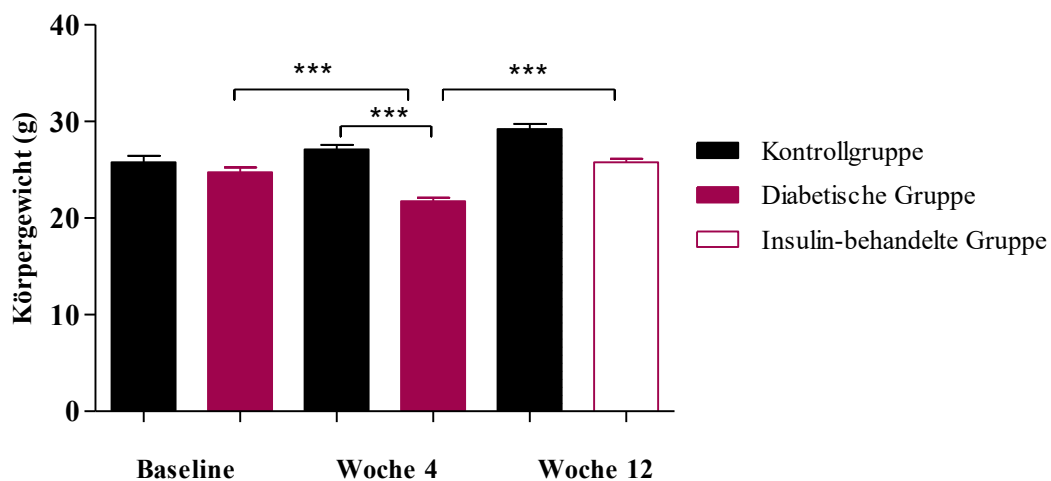


Abbildung 25: Körpergewicht zwischen nicht-diabetischen und diabetischen Tieren zum Zeitpunkt Baseline, nach 4 und 12 Wochen (nach 8-wöchiger Insulinbehandlung). Analyse mittels One-Way ANOVA/Bonferroni Korrektur. Daten sind abgebildet als Mittelwert \pm SEM. *** $P < 0,001$. (n=5-15 pro Gruppe)

3.1.3 C-Peptid-Konzentrationen

Als Folge der Beta-zell-spezifischen Zerstörung durch STZ sezernierten die diabetischen Mäuse signifikant weniger C-Peptid verglichen mit der nicht-diabetischen Gruppe.

Tabelle 5: C-Peptid-Konzentrationen der nicht-diabetischen und diabetischen Gruppe zum Zeitpunkt Woche 4 nach STZ-Gabe; unpaired student's T-Test; dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, *P = 0,02 (n=4).

	C-Peptid ng/ml
Nicht-Diabetische Gruppe	1,83 \pm 0,25
Diabetische Gruppe	0,81 \pm 0,22 *

3.1.4 HbA1c-Werte

Infolge der vierwöchigen bestehenden Hyperglykämie kommt es sowohl zu einem signifikanten Anstieg des HbA1c-Wertes im Vergleich zu den gruppeninternen Ausgangswerten ($22,87 \pm 0,94$ vs. $47,96 \pm 1,12$ mmol/mol; $P < 0,001$) als auch zu denen der zeitgleich untersuchten Kontrollgruppe ($22,09 \pm 1,46$ vs. $47,96 \pm 1,12$ mmol/mol; $P < 0,001$). Die HbA1c-Werte der diabetischen Tiere unter Insulintherapie veränderten sich zu den vorrangegangenen Messwerten der diabetischen Tiere ohne Insulin erst nach 8-wöchiger Insulintherapie signifikant (Abb. 26). Zum Ende der Studie bestanden keine signifikanten Unterschiede der HbA1c-Werte zwischen den diabetischen Tieren unter Insulintherapie und der zeitgleich gemessenen Kontrollgruppe ($20,00 \pm 1,17$ vs. $26,78 \pm 2,16$ mmol/mol).

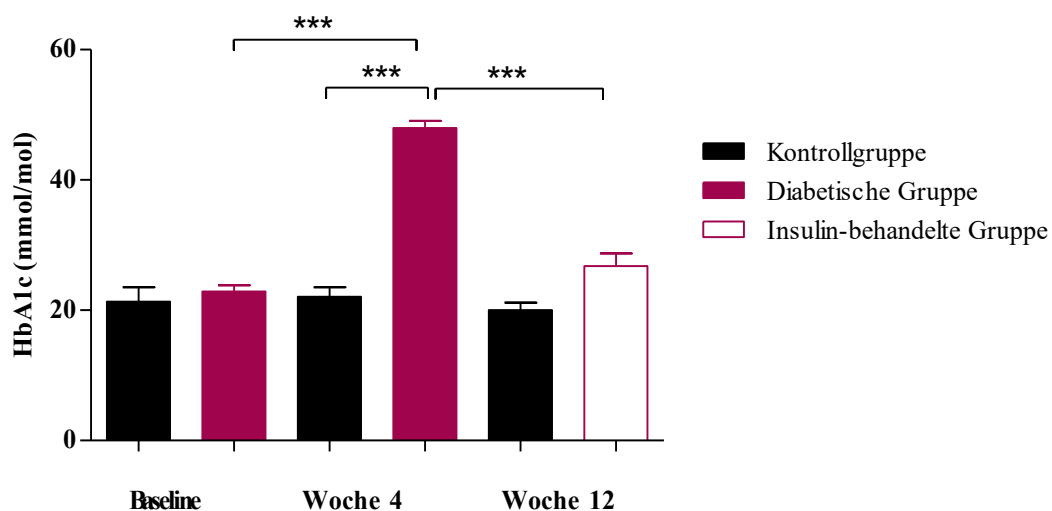


Abbildung 26: HbA1c-Werte von nicht-diabetischen und diabetischen Tieren zum Zeitpunkt Baseline, nach 4 und 12 Wochen (nach 8wöchiger Insulinbehandlung). Analyse mittels One-Way ANOVA/Bonferroni Korrektur. Daten sind abgebildet als Mittelwert \pm SEM. *** P < 0,001. (n=5-15 pro Gruppe).

3.1.5 Serum-AGEs-Konzentrationen

Die Serum-AGEs-Werte lagen zu Beginn bei $9,08 \pm 0,75$ vs. $9,03 \pm 1,69$ ng/ml ohne signifikante Unterschiede. Zum Zeitpunkt der 4. Woche zeigte sich ein signifikanter Anstieg der AGEs-Spiegel der diabetischen Mäuse im Vergleich zu deren gruppeninternen Ausgangswerten ($19,98 \pm 1,70$ vs. $9,08 \pm 0,75$ ng/ml; $P < 0,01$). Nach 8-wöchiger Insulin-Behandlung war die AGEs-Konzentration der diabetischen Mäuse verglichen mit deren gruppeninternen Ausgangswerten weiterhin signifikant hoch ($22,45 \pm 1,84$ vs. $9,08 \pm 0,75$ ng/ml; $P < 0,01$). Es fanden sich zum Ende des Untersuchungszeitpunktes jedoch keine signifikanten Unterschiede zur zeitgleich gemessenen Kontrollgruppe.

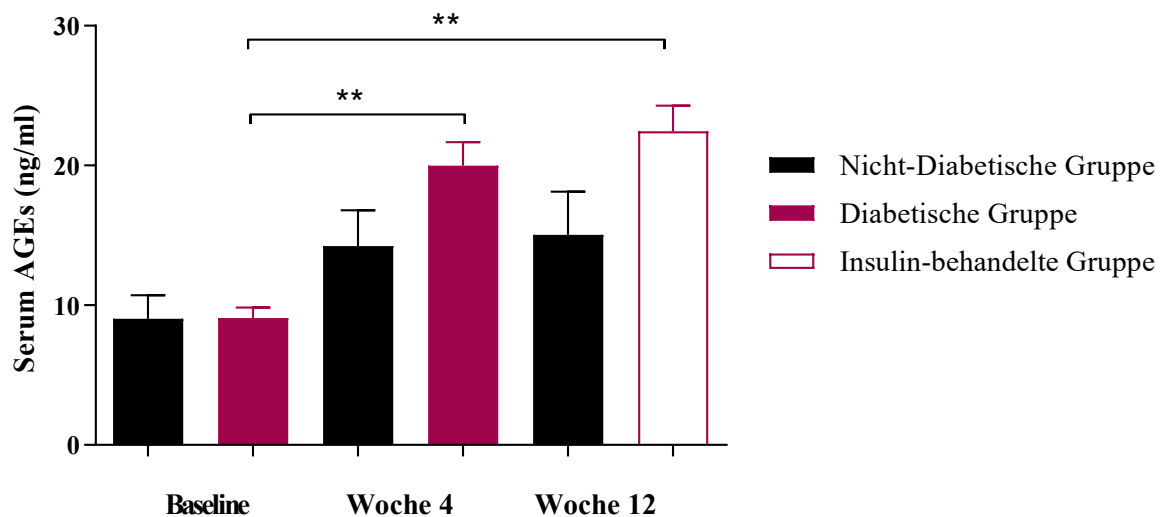


Abbildung 27: Serum-AGEs-Gehalt von nicht-diabetischen und diabetischen Tieren zum Zeitpunkt Baseline, nach 4 und 12 Wochen (nach 8-wöchiger Insulinbehandlung). Analyse mittels One-Way ANOVA/Bonferroni Korrektur. Daten sind abgebildet als Mittelwert \pm SEM. ** $P < 0,01$. (n=5-15 pro Gruppe).

3.2 In vivo konfokale Laserscanning-Mikroskopie der Kornea

3.2.1 Longitudinaler Verlauf der kornealen Nervenfasernlänge

Zunächst wurden die Ausgangswerte beider Gruppen mittels des Kolmogorov-Smirnow-Tests (Dallal-Wilkinson-Lilliefors P-Wert) hinsichtlich des Vorliegens auf einer Normalverteilung untersucht. Der für beide Gruppen ermittelte P-Wert war größer als 0,05, sodass mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Normalverteilung des Parameters korneale Nervenfasernlänge (CNFL) für beide Untersuchungsgruppen ausgegangen werden kann. Zu Beginn der Analyse wiesen beide Gruppen ähnliche Ausgangswerte ohne signifikante Unterschiede auf. Nachdem den Mäusen mittels Streptozotocin-Injektion ein Diabetes mellitus induziert wurde, nahm die

CNFL der diabetischen Mäuse nach vier Wochen signifikant ab ($P < 0,001$). Dabei bestanden signifikante Unterschiede bzgl. Zeit ($P < 0,001$) und Interaktion ($P < 0,001$) (Two-Way-ANOVA). Unter der anschließenden 8-wöchigen Insulin-Therapie blieben die kornealen Nervenfasern nach zwei Wochen zunächst unverändert. Im Vergleich zur diabetischen Gruppe zum Zeitpunkt der 4. Woche konnte aufgezeigt werden, dass die kornealen Nervenfasern sich langsam signifikant nach der 8-wöchigen Insulintherapie ($P < 0,01$) regeneriert hatten und zum Versuchsende hin keine signifikanten Unterschiede zu den zeitgleich gemessenen Kontrolltieren mehr bestanden. Für die Regenerationszeit der Nervenfasern unter Insulintherapie waren sowohl die Zeit- als auch der Interaktionseffekt signifikant ($P < 0,001$).

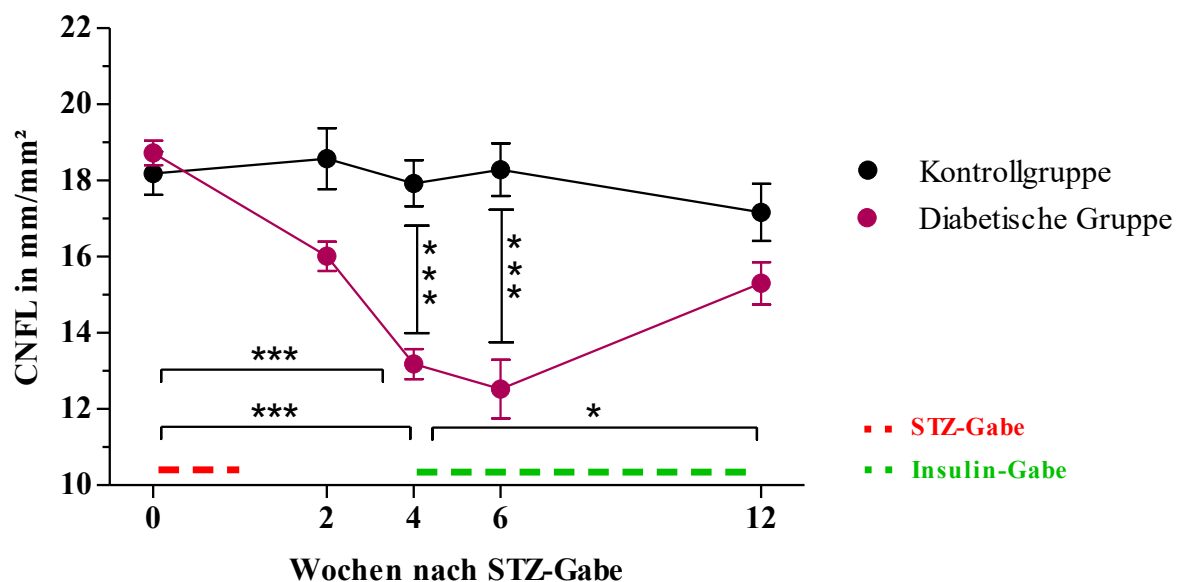


Abbildung 28: 12-wöchiger Verlauf der kornealen Nervenfasernlänge (CNFL) von diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen. Analyse Two-Way ANOVA mit Bonferroni Korrektur. Die Daten sind abgebildet als Mittelwert \pm SEM. *** $P < 0,001$. * $P < 0,05$. ($n=5-15$). Die rot gestrichelte Linie markiert den Zeitraum für die STZ-Gabe. Die grün gestrichelte Linie markiert die Dauer der Insulingabe.

3.2.2 Vergleich manuelle und automatische Quantifizierung

Zur Validierung der Ergebnisse der manuell erfassten kornealen Nervenfasern wurden alle Aufnahmen ergänzend mit einem automatischen Analyseverfahren ausgewertet und miteinander verglichen. In der Abbildung 29 sind exemplarisch die sub-epithelialen Nervenfasermarkierungen mittels der beiden Verfahren zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten dargestellt.

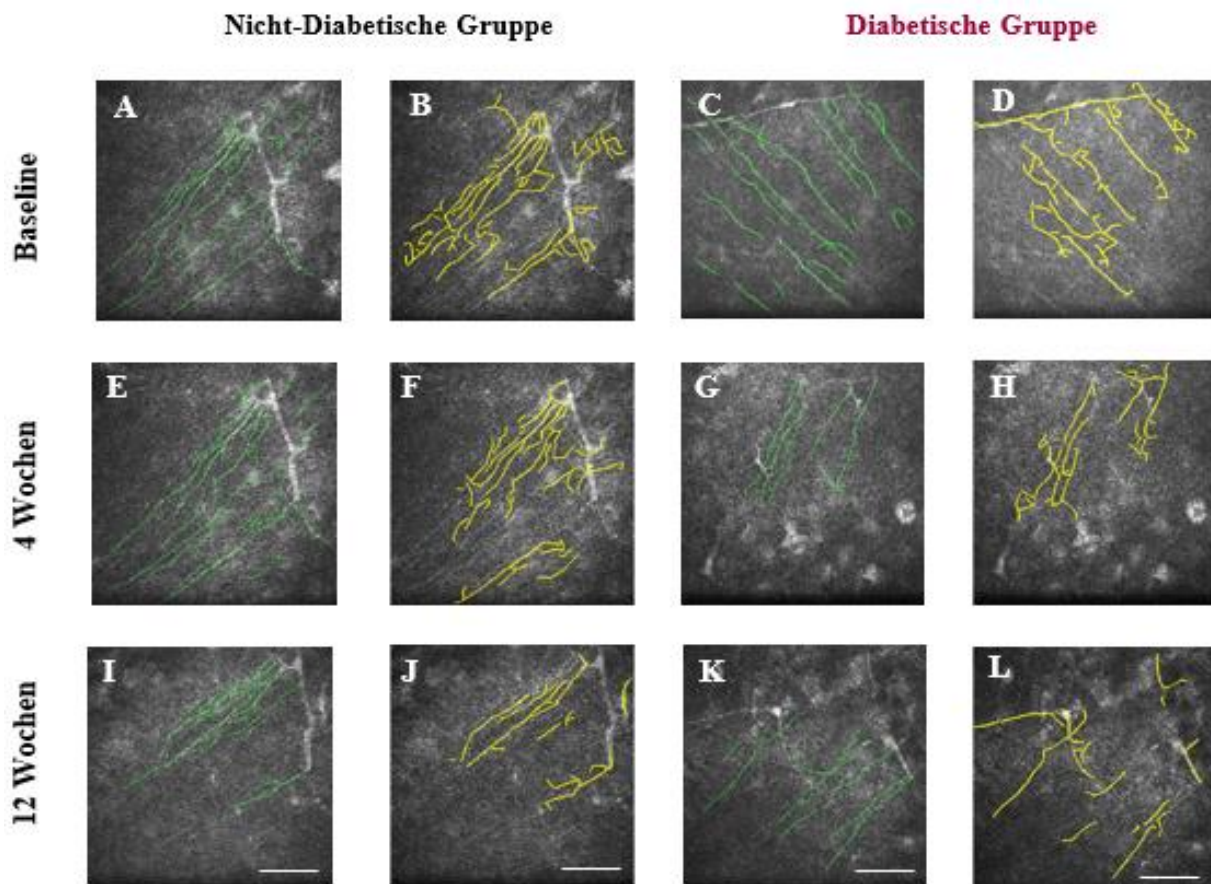


Abbildung 29: Exemplarische Abbildungen der in vivo CLSM Aufnahmen des sub-epithelialen Nervenplexus der Kornea von nicht-diabetischen und diabetischen Mäusen zu den Zeitpunkten Baseline, nach 4 und 12 Wochen (Abb. A – L). Die in grün abgebildeten Nervenfasern wurden mit dem manuellen Verfahren NeuronJ markiert. Die mit gelb nachgezeichneten Nervenfasern repräsentieren die Markierungen des automatisierten Programmes, MatLab. Skala 50 µm.

Mittels des manuellen Verfahrens wurden die Ausgangswerte der CNFL der diabetischen und nicht-diabetischen Gruppe zwischen 18,19 und 18,73 mm/mm² ermittelt. Das automatische Programm detektierte geringere CNFL-Werte von 12,63 und 13,10 mm/mm² für beide Gruppen. Nach der Verabreichung des STZ ergaben beide Methoden eine signifikante Abnahme der CNFL zum Zeitpunkt der vierten Woche. Mittels des manuellen Verfahrens betrug die Nervenfaserdifferenz der diabetischen Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren

27 % (von 17,93 auf 13,18 mm/mm²). Die automatische Auswertung detektierte einen Nervenfaserverlust von 36 % (11,83 auf 7,56 mm/mm²). Zum Ende des Versuches (nach 8-wöchiger Insulintherapie) bestand zwischen den Kontrolltieren und den mit Insulin behandelten Tieren bezüglich der CNFL kein signifikanter Unterschied. Mit Hilfe des manuellen Verfahrens wurden weiterhin höhere CNFL-Werte (17,17 und 15,30 mm/mm²) als durch das automatische Programm (12,42 und 9,83 mm/mm²) ermittelt.

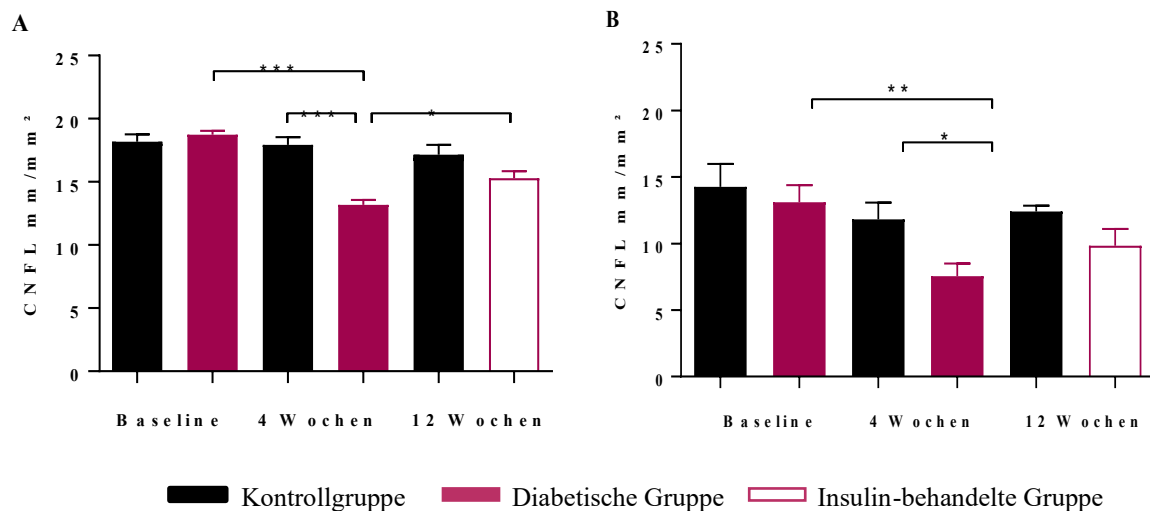


Abbildung 30: Vergleichende Darstellung der manuellen (A) und automatischen Quantifizierung (B) der in vivo CCM-Aufnahmen von nicht-diabetischen und diabetischen Mäusen zu den Zeitpunkten Baseline, 4 Wochen nach Induktion eines DM und 12 Wochen nach Insulintherapie. Analyse One-Way ANOVA/Bonferroni Korrektur. Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. * $P < 0,01$; ** $P < 0,001$; *** $P < 0,0001$ ($n = 4 - 15$ pro Gruppe).

3.2.3 Korrelation der CNFL zu den HbA1c- und Serum-AGEs-Konzentrationen

Die Regressionsanalyse ermittelte einen moderaten Zusammenhang zwischen der Abnahme der kornealen Nervenfasernlänge und dem Anstieg des HbA1c-Wertes ($R^2 = 0,66$; $P < 0,001$). Die vergleichende Analyse zwischen der Abnahme der kornealen Nervenfasernlänge und der Konzentration an AGEs im Serum ergab ebenfalls eine negative Korrelation ($R^2 = 0,33$; $P < 0,01$), die allerdings schwächer ausgeprägt war.

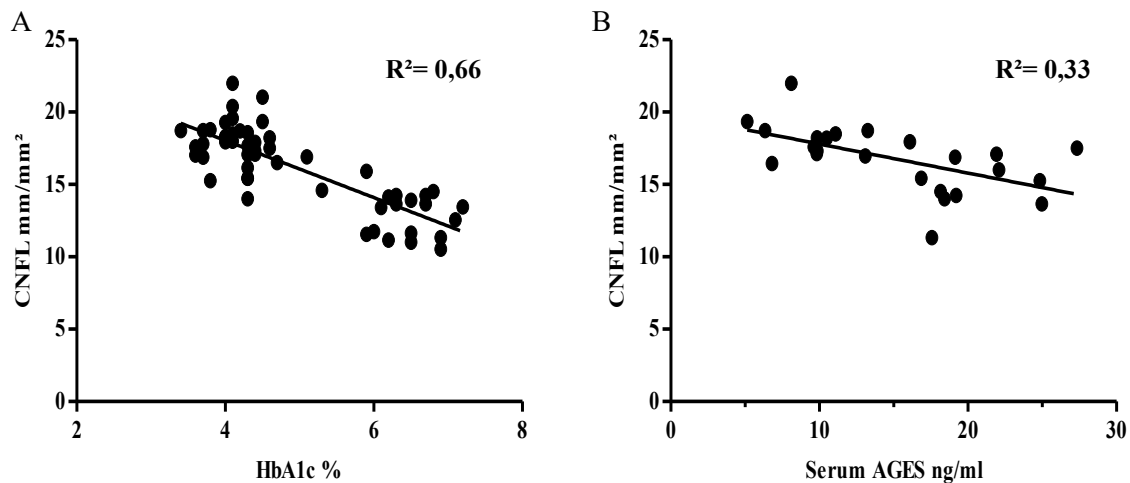


Abbildung 31: Lineare Regressionsanalyse der CNFL in Abhängigkeit vom HbA1c-Wert (A) und von der Serum-AGEs-Konzentration (B). R^2 = Bestimmtheitsmaß.

3.3 Ex vivo Fluoreszenzmikroskopie der Kornea

3.3.1 Manuelle und automatische Aufnahmen – der peripheren und zentralen Zonen aller Quadranten der Kornea

In der Abbildung 32 sind exemplarisch die ex vivo Aufnahmen des sub-epithelialen Nervenfasernetzes der peripheren und zentralen Kornea zu den Zeitpunkten Baseline, nach 4 und 12 Wochen von der nicht-diabetischen und diabetischen Gruppe vor und nach Insulinbehandlung dargestellt.

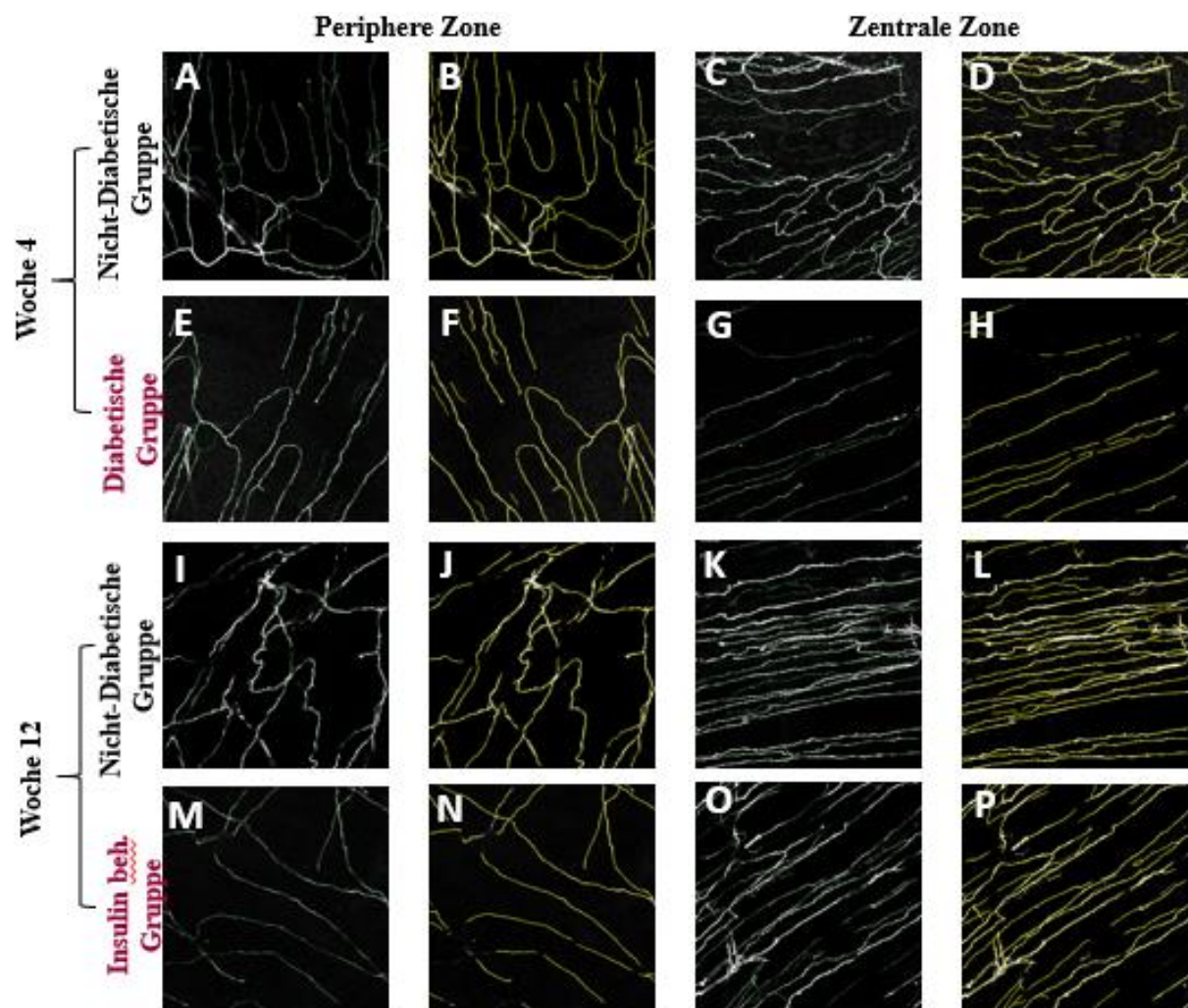


Abbildung 32: Exemplarische Abbildungen der ex vivo Aufnahmen des SEP (peripher und zentral) der Kornea von nicht-diabetischen und diabetischen Mäusen zu den Zeitpunkten Baseline, nach 4 und 12 Wochen. Grün abgebildete Nervenfasern/ manuelles Verfahren NeuronJ (A, E, I, M, G, K, O). Gelb nachgezeichnete Nervenfasern/ automatisiertes Programm, MatLab (B; F, J, N, D, H, L, P). Bildgröße 212x212 μm .

Auf den Abbildungen erscheinen die peripheren Nervenfasern ungeordnet vom Verlauf und von der Menge her geringer als die Nervenfasern in den zentralen Anteilen der Kornea, mit

einem höheren Anteil und einer eher linear-angeordneten Struktur. Zur weiteren Quantifizierung wurden die Aufnahmen wiederum mittels des manuellen und automatischen Verfahrens markiert und ausgewertet.

Exemplarisch ist in der Abbildung 33 die Wirbelstruktur im inferonasalen Quadranten einer nicht-diabetischen und diabetischen Thy1-YFP Maus zum Zeitpunkt der 4. Woche dargestellt. Es ist erkennbar, dass die diabetische Maus weniger Nervenfasern in der Kornea besitzt als das gleichaltrige Kontrolltier.

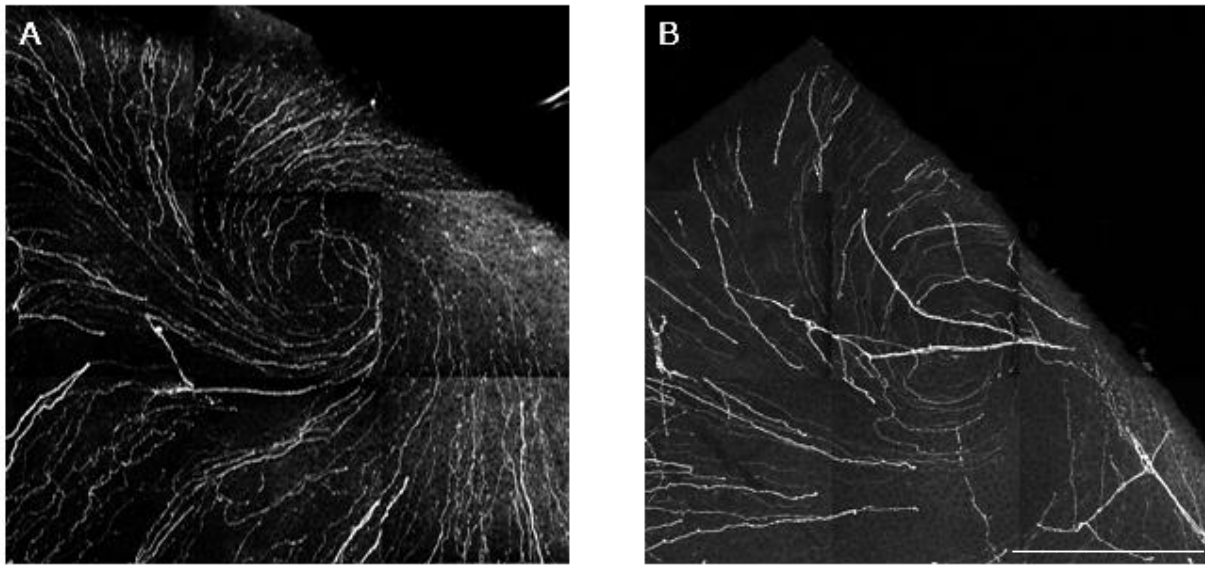


Abbildung 33: Ex vivo Aufnahmen der inferioren Wirbelstruktur des SEP der Kornea einer nicht-diabetischen (A) und diabetischen Thy1-YFP Maus. MAP- Aufnahme schwarz-weiß kontrastiert. Skala 212 μm .

3.3.2 Manuelle und Automatische Quantifizierung der peripheren Nervenfasern

Die manuellen Auswertungen des superonasalen, superotemporalen, inferotemporalen und inferonasalen Quadranten zeigten ähnliche Ergebnisse ohne signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu den Zeitpunkten Woche 4 und 12.

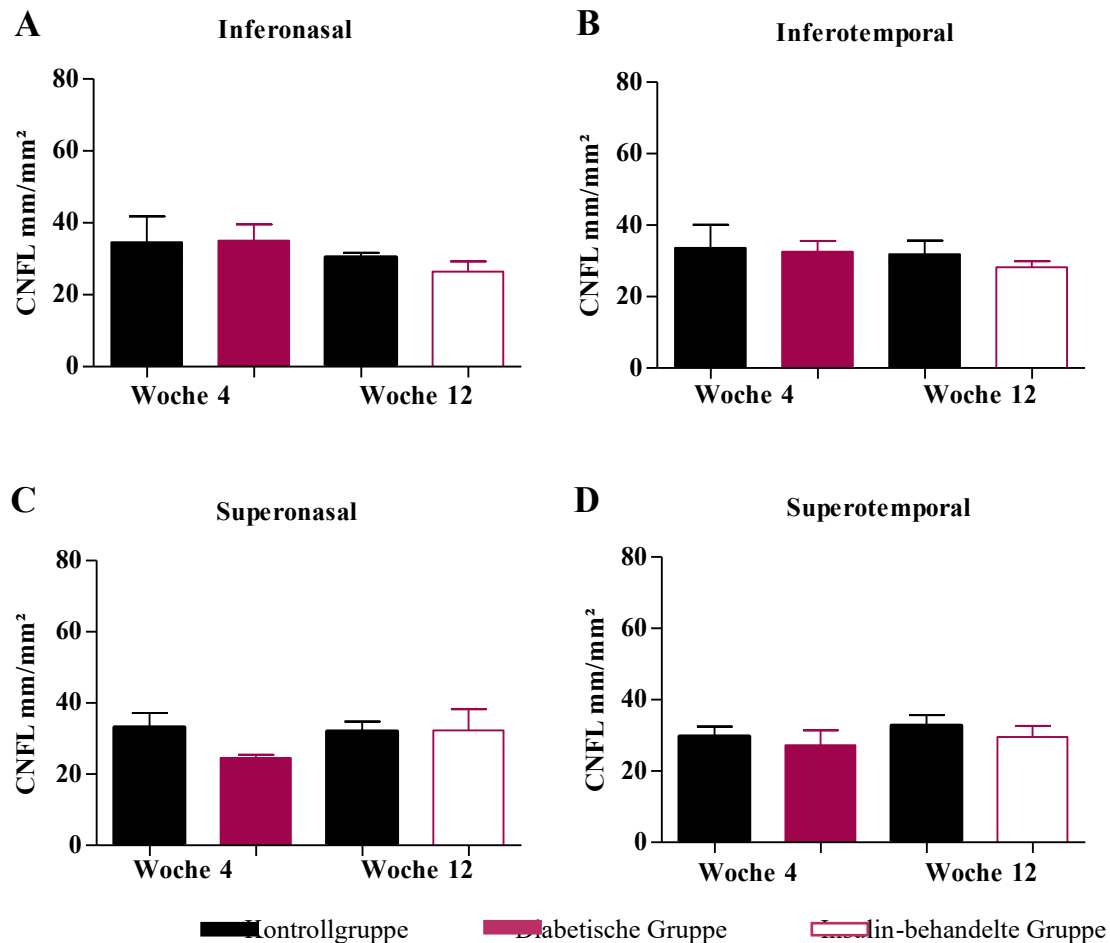


Abbildung 34: Manuelle Quantifizierung/NeuronJ der peripheren Nervenfasern des SEP der Kornea in den Quadranten inferonasal (A), inferotemporal (B), superonasal (C) und superotemporal (D). Vergleich der CNFL der nicht-diabetischen und diabetischen Gruppe zum Zeitpunkt Woche 4 und nach Insulintherapie zum Zeitpunkt Woche 12. Analyse One-way ANOVA/Bonferroni Korrektur. (n=4-8 pro Gruppe).

Die automatische Analyse der peripheren Nervenfasern ergab wie das manuelle Verfahren für die gleichen Zeitpunkte und Untersuchungsgruppen ähnlich hohe CNFL-Werte für den superonasalen, superotemporalen, inferotemporalen und inferonasalen Quadranten. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede der CNFL zwischen den einzelnen Gruppen und Zeitpunkten.

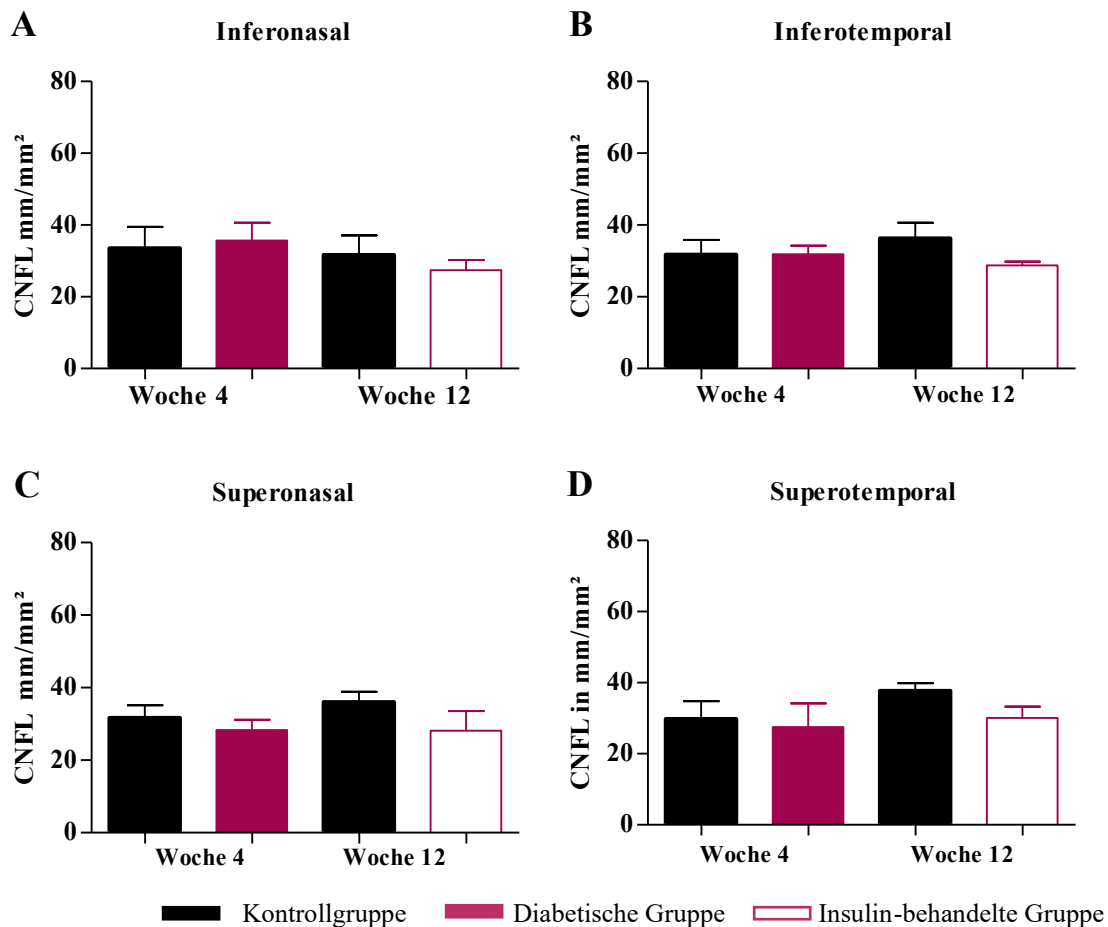


Abbildung 35: Automatische Quantifizierung/MATLAB der peripheren Nervenfasern des SEP der Kornea in den Quadranten inferonasal (A), inferotemporal (B), superonasal (C) und superotemporal (D). Vergleich der CNFL der nicht-diabetischen und diabetischen Gruppe zum Zeitpunkt Woche 4 und nach Insulintherapie zum Zeitpunkt Woche 12. Analyse One-way ANOVA/Bonferroni Korrektur. (n=4-8 pro Gruppe)

3.3.3 Manuelle und Automatische Quantifizierung der zentralen Nervenfasern

Die manuelle Analyse der zentralen Nervenfasern ergab eine signifikante Abnahme der CNFL-Werte der diabetischen Gruppe in allen vier Quadranten der Kornea vergleichend mit der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt Woche 4 (superonasal: 62,83 vs. 41,97 mm/mm², ** P < 0,001; superotemporal: 58,23 vs. 40,49 mm/mm², ** P < 0,001; inferotemporal: 57,31 vs. 34,48 mm², *** P < 0,0001; inferonasal: 66,94 vs. 34,53, *** P < 0,0001). Für den inferonasalen Bereich, in welchem sich der *inferior whorl* befindet, wurden für die Kontrollgruppe die höchsten CNFL-Werte ermittelt. Innerhalb der zeitgleichen Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede der CNFL der vier Quadranten, wenn auch dessen Abnahme in den inferioren Bereichen dominiert. Zum Ende des Versuches nach Beendigung der Insulinbehandlung zum Zeitpunkt Woche 12 fanden sich keine signifikanten Unterschiede der CNFL zwischen der Kontrollgruppe und der mit Insulin behandelten diabetischen Gruppe.

In den beiden inferioren Bereichen zeigte sich eine signifikante Zunahme der CNFL zwischen der diabetischen und anschließend mit Insulin behandelten Gruppe (inferotemporal: 34,68 mm/mm² vs. 46,70 mm/mm², ** P < 0,001 und inferonasal: 34,53 mm/mm² vs. 48,71 mm/mm², * P < 0,01).

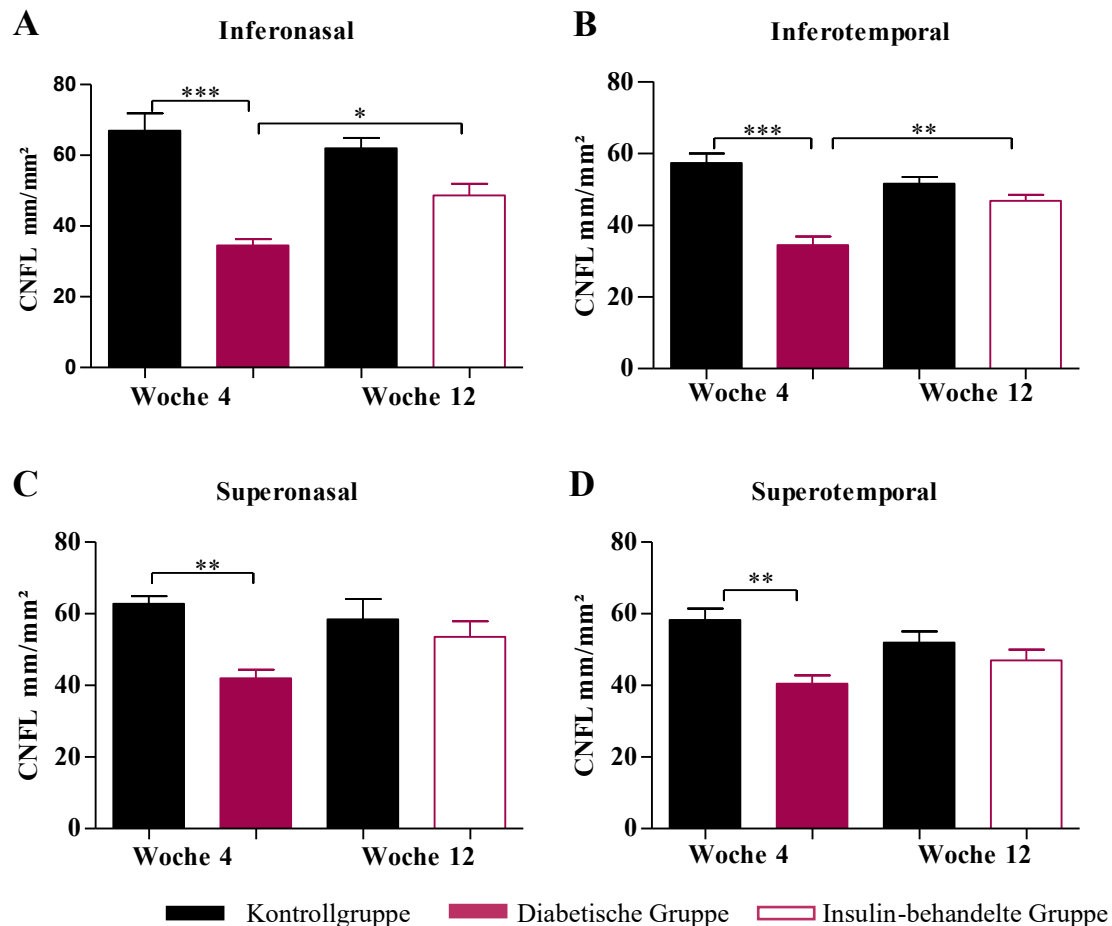


Abbildung 36: Manuelle Quantifizierung/NeuronJ der zentralen Nervenfasern des SEP der Kornea in den Quadranten inferonasal (A), inferotemporal (B), superonasal (C) und superotemporal (D). Vergleich der CNFL der nicht-diabetischen und diabetischen Gruppe zum Zeitpunkt Woche 4 und nach Insulintherapie zum Zeitpunkt Woche 12. Analyse One-way ANOVA/Bonferroni Korrektur. *** P < 0,0001. ** P < 0,001. * P < 0,01 (n=4-8 pro Gruppe)

Die automatische Analyse ergab wie das manuelle Verfahren zum Zeitpunkt Woche 4 eine signifikante Abnahme der CNFL der diabetischen Gruppe in allen vier Quadranten (superonasal: 64,87 mm/mm² vs. 29,10 mm/mm², ** P < 0,001; superotemporal: 58,23 mm/mm² vs. 40,50 mm/mm², * P < 0,01; inferotemporal: 59,89 mm/mm² vs. 27,47 mm/mm², ** P < 0,001; inferonasal: 63,31 mm/mm² vs. 29,10 mm/mm², ** P < 0,001). Zum Zeitpunkt der 12. Woche bestanden keine signifikanten Unterschiede der CNFL zwischen der nicht-diabetischen und der mit Insulin behandelten diabetischen Gruppe.

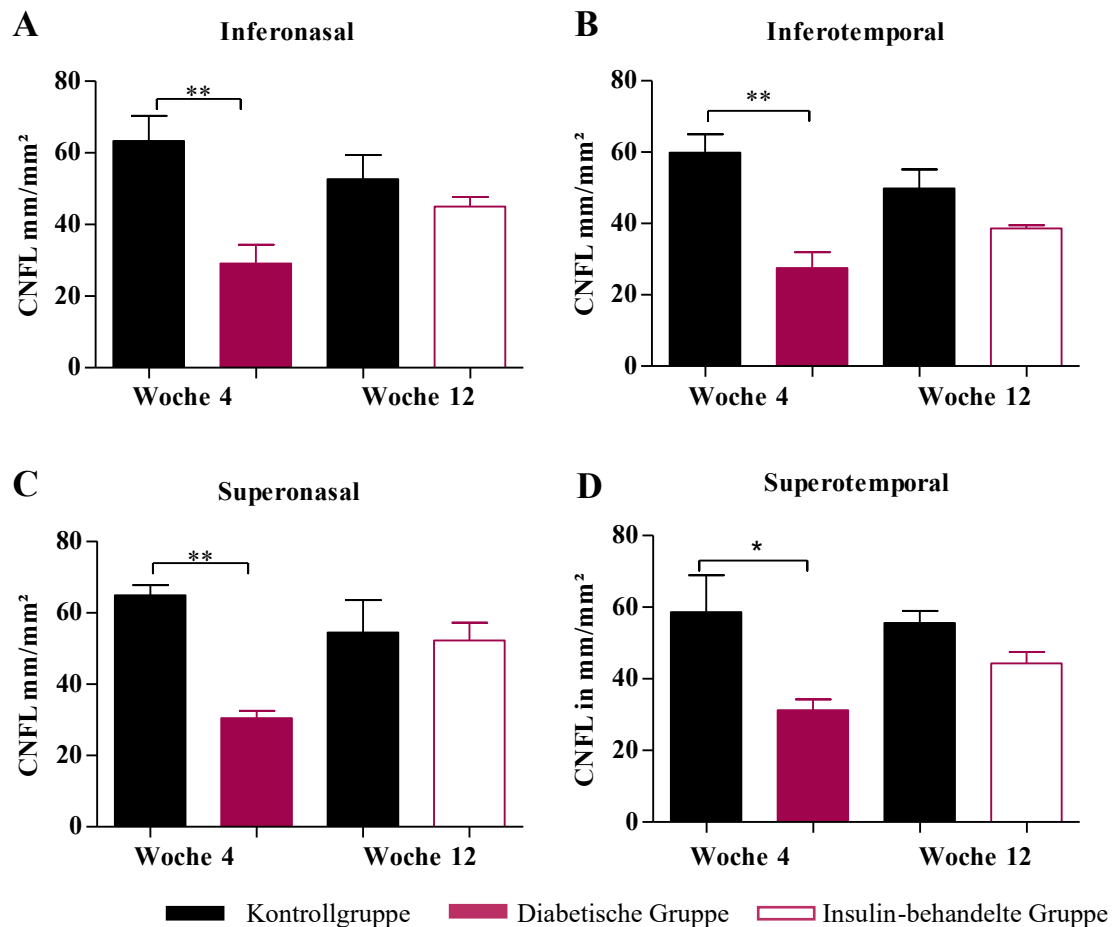


Abbildung 37: Automatische Quantifizierung/MATLAB der zentralen Nervenfasern des SEP der Kornea in den Quadranten inferonasal (A), inferotemporal (B), superonasal (C) und superotemporal (D). Vergleich der CNFL der nicht-diabetischen und diabetischen Gruppe zum Zeitpunkt Woche 4 und nach Insulintherapie zum Zeitpunkt Woche 12. Analyse One-way ANOVA/Bonferroni Korrektur. ** $P < 0,001$. * $P < 0,01$. (n=4-8 pro Gruppe)

3.3.4 Vergleich der ex vivo manuell und automatisch ermittelten CNFL

Der Vergleich der beiden Methoden zur Analyse der ex vivo Aufnahmen der kornealen Nervenfasern ergab eine hohe Übereinstimmung. Die Sensitivität betrug $88 \pm 3 \%$. Für die *False Discovery Rate* wurde ein Wert von $13 \pm 2 \%$ bestimmt.

3.4 Ex vivo Fluoreszenzmikroskopie der Hautbiopsie

3.4.1 Intraepidermale Nervenfaserdichte

Die intraepidermale Nervenfaserdichte wurde nach 4 Wochen zwischen der nicht-diabetischen und diabetischen Gruppe bestimmt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der IENFD beider Gruppen. Nach 12 Wochen und erfolgter Insulinbehandlung blieben die intraepidermalen Nervenfasern unverändert.

Die zusätzliche exemplarische Immunfluoreszenzmarkierung mit dem Pan-neuronalen Marker PGP9.5 ergab, dass alle YFP positiven Nervenfasern auch positiv für PGP9.5 waren. Umgekehrt zeigten nicht alle mit PGP9.5 gefärbten Nervenfasern eine positive Immunfluoreszenz für das YFP.

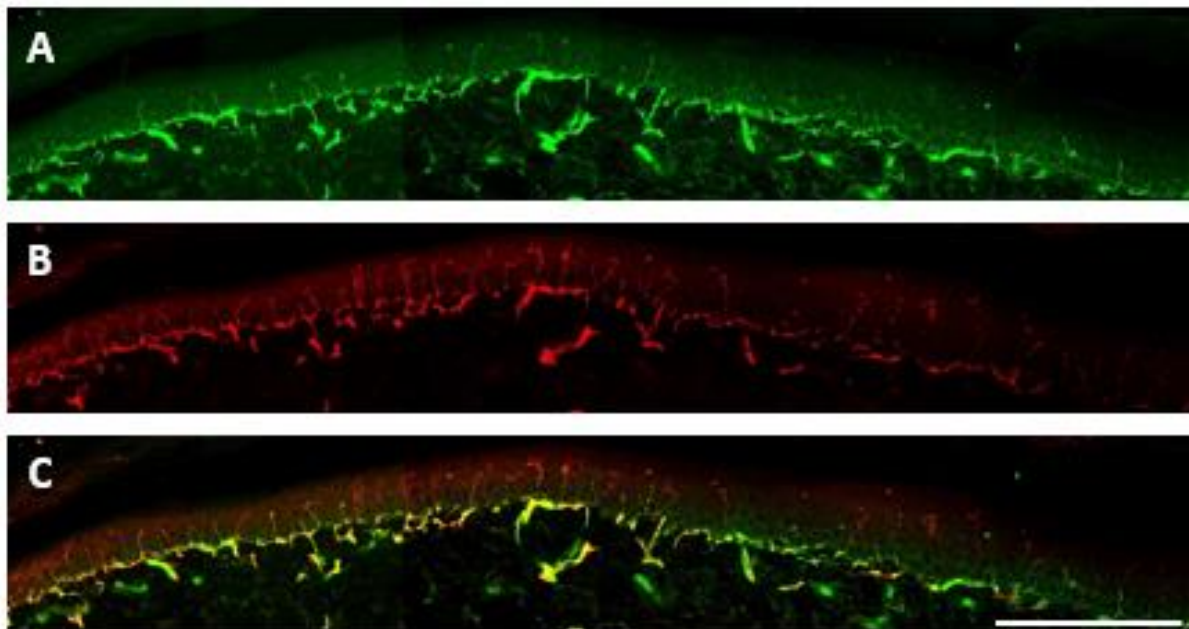


Abbildung 38: Ex vivo immunhistochemische Aufnahmen der Haut-Kryostatschnitte (Dicke 10µm). Bild (A) YFP fluoreszierende intraepidermale Nervenfasern (grün). Bild (B) PGP9.5 gefärbte Nervenfasern (rot). Bild (C) Gesamtdarstellung von YFP und PGP9.5. Skala, 200 µm.

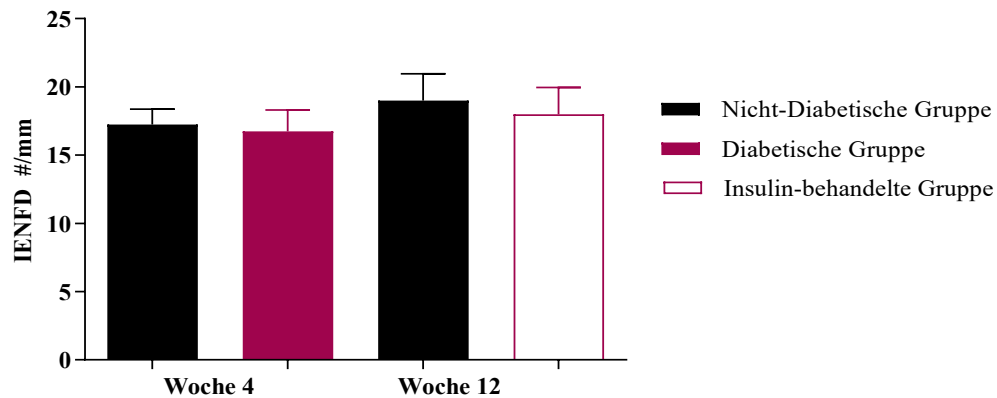


Abbildung 39: Analyse der intraepidermalen Nervenfaserdichte (IENFD). Vergleich von nicht-diabetischen und diabetischen Mäusen zum Zeitpunkt Woche 4 und nach abgeschlossener Insulinbehandlung nach Woche 12. One-Way ANOVA/Bonferroni Korrektur. (n=4 pro Gruppe).

3.4.2 Korrelation der intraepidermalen Nervenfaserdichte zur CNFL

Die lineare Regressionsanalyse ermittelte, dass statistischer kein Zusammenhang zwischen den intraepidermalen und kornealen Nervenfaserdichte besteht ($R^2 = 0,09$; $P < 0,24$).

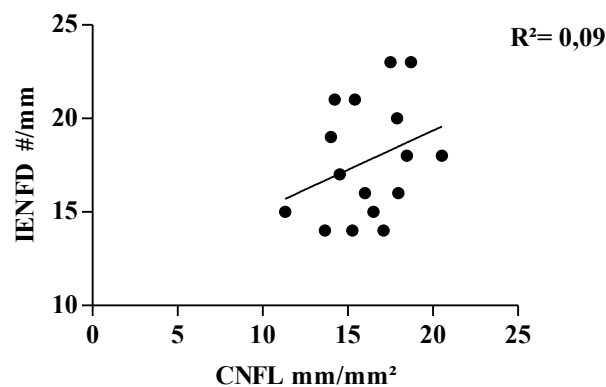


Abbildung 40: Lineare Regressionsanalyse der IEND in Abhängigkeit von der CNFL. R^2 = Bestimmtheitsmaß

4 Diskussion

4.1 Vergleichende quantitative Analyse der kornealen und intraepidermalen Nervenfasern von Thy1-YFP Mäusen im Kontext einer diabetisch assoziierten *Small Fibre* Neuropathie

Schätzungsweise 50% aller an Diabetes mellitus erkrankten Menschen werden im Krankheitsverlauf an einer diabetischen Polyneuropathie leiden. Laut Fachgesellschaften für DM fehlen bislang objektive Biomarker zur Diagnostik und Evaluation einer *Small fibre* Neuropathie [118].

Mit der Entwicklung der CCM steht ein einzigartiges Verfahren zur Verfügung, Nervenfasern der Kornea objektiv, nicht invasiv und in vivo zu untersuchen und zu quantifizieren. Das Verfahren ist aufgrund seiner hohen Sensitivität und Spezifität herkömmlichen Untersuchungsmethoden zur Detektion einer diabetischen Polyneuropathie überlegen [119]. Unklar ist, inwieweit die Nervenfasern des sub-epithelialen Nervenplexus als Biomarker für eine diabetische Polyneuropathie valide sind.

Die Nervenfasertypen C und A δ des sub-epithelialen Nervenplexus der Kornea sind vergleichbar mit den intraepidermalen Nervenfasertypen der Haut. Zu untersuchen, inwieweit der Progress einer diabetischen Neuropathie in beiden Gewebetypen vergleichbar ist, war ein Ziel dieser tierexperimentellen Studie an Thy1-YFP Mäusen.

Die Versuchstiere wurden randomisiert in eine Gruppe zur STZ-Behandlung (diabetisch) und eine Kontrollgruppe (nicht-diabetisch) eingeteilt. Alle mit STZ behandelten Mäuse konnten anhand signifikant erhöhter Blutglukosekonzentrationen bereits nach einer Woche als diabetisch klassifiziert werden. Über einen 4-wöchigen Untersuchungszeitraum war der HbA1c-Wert als Langzeitparameter des Blutglukoseverlaufes signifikant erhöht, das Körpergewicht hingegen im Sinne der katabolen Stoffwechsellaage infolge des Insulinmangels erniedrigt. Der Insulinmangel wurde durch signifikant verminderte C-Peptid-Konzentrationen, als Maß für die endogene Insulinproduktion, bestätigt.

Im Rahmen des longitudinalen Studiendesigns konnten Anzahl und Verlauf der kornealen Nervenfasern der Tiere intra- und interindividuell vom Ausgangszeitpunkt bis zu den Endpunkten untersucht und quantifiziert werden. Als Parameter wurde die korneale Nervenfaserlänge (CNFL) bestimmt. Es zeigte sich bis zur 4. Untersuchungswoche, dass die CNFL der diabetischen Mäuse progredient und signifikant abnahm. Die Messwerte der Kontrolltiere blieben stets konstant. Die signifikante Abnahme der CNFL von diabetischen

Mäusen ermittelt durch ein manuelles Messverfahren wurde zusätzlich durch ein automatisiertes Programm zur Bestimmung der CNFL bestätigt und verifiziert. In den ex vivo untersuchten kornealen Nervenfasern zeigte sich der progrediente signifikante Nervenfaserverlust in den zentralen Anteilen der Kornea, mit einer höheren Tendenz im inferonasalen Bereich. Das gleiche Phänomen wurde beim Menschen mit Typ 1 Diabetes mellitus nachgewiesen [106]. Peripher lokalisierte Nervenfasern blieben unbeeinträchtigt. Auch wenn die Dauer des Diabetes mellitus von vier Wochen kurz erscheint, so entspricht dieser Lebenszeitraum der Maus etwa 5 Jahre im Leben eines Menschen. Zeitgleich untersuchte Hautproben der Hinterpfote zeigten keine Veränderungen der intraepidermalen Nervenfasern von diabetischen und nicht-diabetischen Thy1-YFP Mäusen am Ende der 4. Untersuchungswoche. Auch wenn zu diesem Zeitpunkt keinerlei Korrelation zwischen den kornealen und intraepidermalen Nervenfasern besteht, so zeigen weiterführende Experimente am gleichen Tiermodell einen Verlust von intraepidermalen Nervenfasern nach ca. 12 Wochen Diabetes-Erkrankung [120].

Aufgrund der frühzeitigen Veränderungen der kornealen Nervenfasern ist davon auszugehen, dass diese eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer diabetischen Stoffwechsellage besitzen als intraepidermale Nervenfasern. Dieses Ergebnis konnte ebenfalls in einer Longitudinalstudie mit Patienten mit frühzeitig diagnostiziertem Typ 1 Diabetes ohne Zeichen einer diabetischen Polyneuropathie (DPN) bestätigt werden. Obwohl sensorische Funktionstests der Nervenfasern der Haut normwertig waren, zeigten die kornealen Nervenfasern bereits nach vier Jahren eine signifikante Abnahme der CNFL. Daraus resultierend, postulierten Edwards et al. (2017), dass die CNFL einen konsistenten und frühzeitig nutzbaren Marker für eine DPN darstellt [121].

Weiterführend wurden in der hier durchgeführten experimentellen Studie den nach 4 Wochen verbleibenden diabetischen Mäusen Insulinpellets verabreicht. Über einen Untersuchungszeitraum von 8 Wochen normalisierten sich die Blutglukosekonzentrationen, die HbA1c-Werte und das Körpergewicht der zuvor als diabetisch klassifizierten Tiere.

Während dieses Untersuchungszeitraum nahm die CNFL der diabetischen Mäuse unter der Insulinbehandlung wieder zu. Zum Versuchsende waren keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrolltieren gleichen Alters feststellbar. Intraepidermale Nervenfasern blieben weiterhin unbeeinträchtigt.

Korneale Nervenfasern der Thy1-YFP Mäuse scheinen nicht nur frühzeitig infolge eines Diabetes mellitus zu degenerieren, sondern zeigen auch regeneratives Potenzial unter der

Insulintherapie. Dieser Effekt wurde auch in klinischen Studien bei Typ 1 Diabetikern nachgewiesen. Azmi et al. konnten 2019 in einer longitudinal durchgeführten Studie von Typ 1 Diabetikern nach Pankreas- und Nierentransplantation eine signifikante Zunahme der CNFL messen, während intraepidermale Nervenfasern als auch sensorische Tests weiterhin pathologisch beeinträchtigt waren [122]. In einer Querschnittsstudie von kürzlich diagnostizierten Typ 2 Diabetikern zeigten Patienten mit abnormaler CNFD normale IENFD und vice versa [123].

In der durchgeführten tierexperimentellen Studie konnte demonstriert werden, dass sich korneale und intraepidermale Nervenfasern nach einem chemisch induzierten Diabetes mellitus über einen relativ kurzen Untersuchungszeitraum und anschließender Insulinbehandlung unterschiedlich und unabhängig voneinander verhalten. Die Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse der Nervenfasern in beiden Gewebetypen, der Kornea und der Haut, sind bislang noch unklar. Anatomisch-physiologisch zeigen beide Gewebetypen einen unterschiedlichen Aufbau und eine andere Versorgungsstruktur. Die Haut ist vorrangig von außen vom Säureschutzmantel umgeben und die Versorgung mit Nährstoffen erfolgt hauptsächlich über das Blut. Die Kornea zählt zu den sogenannten immun-privilegierten Geweben, welche keine Immunzellen aufweisen und deren Vitalität vorrangig vom Kammerwasser und der Tränenflüssigkeit abhängt. Ähnlich wie bei der Linse des Auges, die mit zunehmenden Alter AGEs akkumuliert und zur Kataraktbildung tendiert, ist anzunehmen, dass die Kornea susceptibler für die Ablagerung von AGEs ist als die Haut. Zu den AGEs zählen neben dem relativ kurzlebigen HbA1c weitere nicht enzymatisch glykierte Proteine mit teilweise auch langen Halbwertszeiten von Jahren, die am Rezeptor für AGEs binden können und über eine Kaskade inflammatorische Prozesse auslösen. Folgend führt dies zu Neuronen Dysfunktion und progressiv zur Neuronen Degeneration. In dieser Studie zeigten die Veränderungen der CNFL eine gute Korrelation mit dem HbA1c Wert, dieser spiegelt jedoch nicht die Glukosevariabilität wider. Zudem ermöglicht er, entsprechend der Lebensdauer der Erythrozyten, nur eine Aussage über den Blutglukosespiegel der letzten 2 – 3 Monate. Die Korrelation zwischen der CNFL und der Serum AGEs-Konzentration war eher moderat und zeigte auch einen Anstieg der AGEs-Konzentration in den diabetischen Tieren, welche mit Insulin behandelt wurden. Der Anstieg war jedoch deutlich geringer als in der akuten diabetischen Stoffwechsellaage vor Beginn der Insulintherapie und kann auch als metabolisch verstärkte altersbedingte Veränderung betrachtet werden.

4.2 Streptozotocin als diabetogene Substanz

In tierexperimentellen Studien gibt es die Möglichkeiten Krankheiten wie den Diabetes mellitus durch genetisch modifizierte Tierstämme beispielsweise dem NOD oder dem Akita Mausstamm für den Typ 1 Diabetes oder aber durch Verwendung von chemischen Substanzen (Streptozotocin oder Alloxan) zu imitieren [124]. In dem hier durchgeführten tierexperimentellen Versuch wurde den Mäusen Streptozotocin als diabetogene Substanz verabreicht.

Streptozotocin (STZ) wurde zunächst als antibiotisch wirksame Substanz, welche vom Bakterium *Streptomyces acromogenes* produziert wird, identifiziert. Nach seiner Entdeckung 1956 wird es als alkylierendes Zytostatikum in der Behandlung von metastasierenden, fortgeschritten neuroendokrinen Tumoren des Pankreas von Erwachsenen verwendet [125]. Die Arbeitsgruppe von Rakiets konnte 1963 eine diabetogene Wirkung von Streptozotocin nachweisen. Seitdem wird die Substanz in experimentellen Tierversuchen verwendet, um chemisch einen Diabetes mellitus zu induzieren [126].

Das Streptozotocin (2-desoxy-2-(((methylnitrosoamino)carbonyl)amino)-D-glucopyranose) zählt chemisch betrachtet zu der Substanzgruppe der Glucosamine und Nitrosoharnstoffe. Die toxische Wirkung des STZ auf die insulinproduzierenden Betazellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas basiert u.a. auf den Einbau von Methylgruppen in die DNA, der gesteigerten NO-Produktion und Bildung freier Sauerstoffradikale (ROS) [127]. Die selektive Wirkung auf murine Betazellen beruht darauf, dass Streptozotocin aufgrund der Strukturähnlichkeit zu Glukose durch den Glukosetransporter 2 (GLUT2), der in hoher Dichte in der Membran von Betazellen vorkommt, in das Zellinnere transportiert wird. Auch Hepatozyten und Epithelzellen des Nierentubulus besitzen GLUT2 in ihrer Zellmembran. Deshalb kann das Streptozotocin schweres Leberversagen verursachen und führt zu Tubulusnekrosen in den Nieren, weshalb es sich nicht zur Erforschung einer diabetischen Nephropathie eignet, dessen Pathophysiologie auf der Ausbildung einer Glomerulosklerose beruht. Durch Streptozotocin verursachte Nervenschädigungen werden in der Literatur bislang nicht beschrieben.

Alle mit Streptozotocin behandelten Versuchstiere entwickelten bereits nach ein-wöchiger Verabreichung signifikant erhöhte Blutzuckerwerte, signifikant erhöhte HbA1c-Werte und wurden somit als diabetisch eingestuft. Das C-Peptid als Marker für die endogene Insulinproduktion war bei den diabetisch eingestuften Tieren als Folge der toxischen Wirkung des STZ auf die Betazellen signifikant vermindert. Durch das Fehlen von Insulin überwiegt

dessen hormoneller Gegenspieler Glukagon und damit die Entwicklung einer katabolen Stoffwechsellaage, was sich in einer signifikanten Abnahme des Körpergewichts bei den mit STZ behandelten Tieren zeigt. Klinisch wiesen die Tiere charakteristische Symptome für einen Diabetes mellitus Typ 1 wie Polydipsie und Polyurie auf, die aber nicht quantifiziert wurden.

In dieser Studie wurden ausschließlich Männchen des genetisch veränderten Thy1-YFP Mausstamm verwendet. Dieser Mausstamm gilt als sog. *high responder* und besitzt eine hohen Suszeptibilität auf die schädigende Wirkung des STZ [128]. Des Weiteren tendieren männliche Mäuse zu einer stärkeren Entwicklung einer Hyperglykämie, während Weibchen, die mit der gleichen Dosis von Streptozotocin behandelt wurden, eher einen milden Blutzuckeranstieg zeigten [129]. Die Eigenschaft beruht vermutlich auf dem höheren Östradiol Spiegel der Weibchen verbunden mit einem Schutz der Betazellen gegen eine durch oxidativen Stress induzierte Apoptose [130].

In der Anwendung des Streptozotocins gibt es verschiedene Protokolle. Grob unterschieden werden *single large dose*, *single moderate dose* und *multiple low dose* über mehrere Tage [124]. Die in diesem Tierexperiment angewandte *multiple low dose* Form birgt den Vorteil, dass die toxische Wirkung des Streptozotocin eher eine Apoptose statt einer Nekrose der Betazellen gleicht, wodurch die Mortalitätsrate vermindert ist [131]. Aufgrund der induzierten Insulitis dient der STZ induzierte Diabetes mellitus im B6-Mausstamm als Grundlage für die Erforschung eines Typ 1 Diabetes mellitus [132, 133]. Allerdings stellt die Pathophysiologie des Typ 1 Diabetes mellitus eine Autoimmunerkrankung dar. Gemäß der WHO-Definition zählt eine chemische Induktion des Diabetes mellitus daher zum Typ 3 DM. Mit STZ behandelte Tiere entwickeln bereits nach einer Woche einen manifesten Diabetes mellitus. Dieser Lebenszeitraum der Maus entspricht etwa einem Jahr im Leben eines Menschen.

Vier Wochen nach der STZ-Applikation ist die Behandlung des Diabetes mellitus mit Insulin auch aus tierethischer Sicht unumgänglich. Die diabetischen Tiere wurden im Verlauf der Studie mit Insulin-Pellets behandelt. Diese Dosis entsprach nicht der einer intensivierten Insulintherapie beim Menschen, deckte jedoch mindestens den basalen Insulinbedarf und war ausreichend, um den Blutzuckerspiegel als auch den HbA1c-Wert wieder zu normalisieren. Hypoglykämien waren bei den punktuellen Blutzuckermessungen nicht zu verzeichnen.

4.3 Einsatz der in vivo konfokalen Laserscanning-Mikroskopie

4.3.1 Vergleich mit anderen Tierversuchen

Die CLSM findet nicht nur in klinischen Studien Anwendung, sondern wird derzeit auch in verschiedenen tierexperimentellen Studien etabliert.

Dabei gilt vor allem in den tierexperimentellen Studien die Bestimmung der CNFL als zentraler Parameter. Weitere Parameterbestimmungen wie die CNBD oder CNFD beim Menschen sind bei Nagetieren zu subjektiv und schlecht reproduzierbar. Das menschliche Auge ist ca. 20-mal größer als das der Maus. Ebenso ist die murine Schicht, in welcher der sub-epitheliale Nervenplexus lokalisiert ist, ca. 5-mal dünner als beim Menschen. Es muss bei Nagern somit ein kleineres Untersuchungsfeld und eine komprimierte, erniedrigte Auflösung in Kauf genommen werden.

In allen Studien an diabetischen Mäusen und Ratten konnte unabhängig vom verwendeten Modell gezeigt werden, dass die kornealen Nervenfasern infolge der Erkrankung degenerieren. Unterschiedlich waren jedoch die gemessenen CNFL-Werte zur Baseline sowie die Diabetes Dauer, nach der eine Schädigung der kornealen Nervenfasern detektiert wurde.

In der hier vorliegenden tierexperimentellen Studie lagen die durchschnittlichen Ausgangswerte der CNFL bei 18,46 mm/mm². Die kornealen Nervenfasern veränderten sich frühzeitig nach vierwöchiger Diabetes-Dauer. Yorek et al. (2015) untersuchten den gleichen Mausstamm und die Auswirkungen eines durch STZ induzierten DM auf die kornealen Nervenfasern [134]. Hier war die CNFL der diabetischen Tiere erst nach 20 Wochen signifikant erniedrigt. Auffällig zwischen den beiden Studien waren die erheblichen Unterschiede der CNFL-Messwerte. Der durchschnittliche Baseline-Wert in unserer Studie lag bei 18,46 mm/mm². Yorek et al. gaben die Messwerte nur als Diagramm an, überschritten aber Werte von schätzungsweise 2,7 mm/mm² nicht. Weiterhin nahm in unserem Versuch die CNFL der diabetischen Tiere auf Werte von 13,18 mm/mm² ab, während die CNFL Werte in der Yorek et al. Studie auf ca. 1,5-2,2 mm/mm² reduziert waren. Auch wenn der prozentuale Nervenfaserverlust (ca. 25 – 35 %) der diabetischen Mäuse in beiden Experimenten ähnlich war, so unterscheiden sich die Absolutwerte doch extrem. Die Gründe für die hohe Diskrepanz der CNFL-Messwerte in beiden Studien beruhen eher auf qualitativen Unterschieden der Bildaufnahmen als auf verschiedenen Auswahl- und Auswertungskriterien. Es lässt sich also feststellen, dass eine sehr gute Bildqualität und eine hohe Auflösung der Aufnahmen von besonderer Bedeutung für die Analyse sind. Zudem wurde in der Studie von Yorek et al. (2015) das HRT I und in diesem Tierversuch bereits der Nachfolger das HRT II

genutzt, was die Diskrepanz der erzielten Ergebnisse erklären könnte [134]. Eine andere Studie an diabetischen Swiss Webster Mäusen bestätigte die Daten unserer Studie und zeigte eine signifikante Abnahme der kornealen Nervenfasern nach nur vierwöchiger Diabetes-Dauer [135].

Neben methodischen Unterschieden der CNFL-Bestimmung führen vor allem genetische Dispositionen in den Mausstämmen zu einer erhöhten Variabilität der Ausgangswerte. So zeigte beispielsweise eine Studie an BALB/c Mäusen 2- bis 3-mal höhere CNFL-Werte als in C75BL/6/J -Mäuse [115].

4.3.2 Vergleich zwischen in vivo und ex vivo erfassten Nervenfasern mittels manuellem und automatisiertem Analyseverfahren

Zunächst erfolgte die Analyse der kornealen Nervenfasern in vivo per CLSM. Es wurden die sub-epithelialen Nervenfasern im Zentrum der Kornea untersucht, welche in diesem Bereich plan ist und damit die Darstellung der Nervenfasern in einer gleichbleibenden Ebene vereinfacht. Der sub-epitheliale Nervenfaserverplexus war anhand seiner anatomisch-definiert verlaufenden Struktur leicht auffindbar. Die Einzelaufnahmen des SEP wurden mittels entsprechender Kriterien ausgewählt. Mit Hilfe des manuellen Verfahrens wurden anhand von mind. 4 bis 5 Einzelaufnahmen die sub-epithelialen Nervenfasern nachgezeichnet und deren Gesamtwert als CNFL in mm/mm² berechnet. Der SEM dieses Gesamtwertes war hierbei in allen Gruppen gering. Allerdings ist das manuelle Verfahren sehr zeitaufwändig und trotz festgelegter Kriterien zur Quantifizierung mit einer Subjektivität des Auswerter behaftet. Um die Effizienz als auch die Objektivität des Messverfahrens zu optimieren, werden sowohl in klinischen als auch in tierexperimentellen Studien software-basierte Algorithmen zur Ermittlung der CNFL genutzt. In dieser Studie wurde ein an der Universität Padua entwickeltes Programm in MATLAB angewendet. Vergleichend mit den manuell ausgewerteten Bildern des SEP fielen die CNFL-Werte des software-basierten Analyseverfahrens niedriger aus. Allerdings konnte auch software-basiert eine signifikante Abnahme der CNFL der diabetischen Mäuse detektiert werden. Auch nach Ende der Insulintherapie war das Ergebnis, dass zwischen behandelten diabetischen Tieren und der altersgleichen Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede bestanden, mittels beider Verfahren zur Quantifizierung gleich. Ein erhöhtes Signal-Rausch-Verhältnis der vivo CLSM bei der Maus erschwert eine klare Identifikation der sub-epithelialen Nervenfasern im automatisierten Verfahren. Teilweise waren stromale und sub-epitheliale Nervenfasern nicht voneinander abgrenzbar und sehr feine sub-epitheliale Nervenfasern nicht detektierbar. Somit

scheint das menschliche Auge der automatisierten Bildanalyse in MATLAB noch überlegen zu sein und eine manuelle Auswertung von Vorteil.

Bei den ex vivo erfassten Nervenfasern war das Signal-Rausch-Verhältnis bei Anregung des neuronalen Marker YFP zur Visualisierung der Nervenfasern deutlich besser. Bei einer zusätzlich höheren Auflösung lagen die CNFL-Werte deutlich über denen per IVCCM gemessenen Werten. Zusätzlich konnte die Kornea in vier Bereiche (inferonasal, inferotemporal, superonasal und superotemporal) mit jeweils einer peripheren und zentralen Zone unterteilt werden. In allen zentralen Anteilen wurde eine signifikante Abnahme der CNFL detektiert, mit einer höheren Tendenz im inferonasalen und -temporalen Anteil. Mittels IVCCM war dieser nicht darstellbar. Die feinen Nervenfasern, welche eine wirbelartige Struktur formen, waren nur in den ex vivo Aufnahmen zu sehen.

Des Weiteren wurden ex vivo die kornealen Nervenfasern in den peripheren und zentralen Anteilen der vier Quadranten untersucht. Die sub-epithelialen Nervenfasern in den peripheren Anteilen blieben während des gesamten Versuches in den diabetischen und nicht-diabetischen Tieren konstant und unverändert. Es kann also postuliert werden, dass die Nervenschädigungen mit einem Verlust des Axons in den zentralen Anteil einhergehen. Dabei wurden mittels manueller Analyse ähnliche Ergebnisse wie beim automatisierten Verfahren ermittelt. Die Sensitivität als auch die *false discovery rate* zur Überprüfung der Übereinstimmung beider Methoden erzielte hohe zuverlässige Werte und kann daher als Verfahren zur Auswertung der CNFL empfohlen werden.

4.4 Ex vivo Analyse der intraepidermalen Nervenfasern

Die Quantifizierung der intraepidermalen Nervenfasern erfolgte entsprechend der Leitlinien Empfehlung für EFNS.

Für die Aufnahmen der Präparate der Haut wurden ca. 4 bis 5 konsekutive Einzelaufnahmen als z-stack rekonstruiert. Das Festlegen der epidermalen-dermalen Grenzzone war aufgrund der stärkeren Hintergrundfärbung der Epidermis im Vergleich zur dunkler erscheinenden Dermis möglich, eine spezielle immunhistochemische Färbung der Basalmembran war somit nicht notwendig. Anhand der festgelegten Zählkriterien der Leitlinie war die Quantifizierung der intraepidermalen Nervenfasern eindeutig. Die ermittelten Werte der IENFD waren vergleichbar mit denen aus anderen Studien von Thy1-YFP Mäusen [119].

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass die diabetische Stoffwechsellage der mit STZ behandelten Mäuse keinen Einfluss auf die intraepidermalen Nervenfasern über den vier-

wöchigen Untersuchungszeitraum hatte. Auch nach der Therapie mit Insulin blieben die IENFD-Werte der diabetischen Tiere ohne signifikante Unterschiede zu den Kontrolltieren. Es ist anzunehmen, dass bei längerer Diabetes-Dauer die IENFD signifikant abnehmen würde. Zudem wurden in dieser Studie ausschließlich morphologische Veränderungen untersucht. Nicht untersucht wurde, inwieweit sich die sensorischen Funktionen der Nervenfasern verändert hatten.

Chen et al. (2005) beobachteten Thy1-YFP Mäuse nach Verabreichung von Streptozotocin über einen Zeitraum von 6 Monaten. Hier nahm die intraepidermale Nervenfaserdichte der diabetischen STZ Mäuse erst nach 3 Monaten signifikant ab [120]. Gleichzeitig wurde der Phänotyp der diabetischen Neuropathie, der mit STZ behandelten Tiere, untersucht. Es stellte sich heraus, dass die sensorische Veränderung einer thermalen Hypalgesie bereits nach einem Monat signifikant messbar war und laut dieser Studie kein linearer Zusammenhang zwischen Veränderungen der Sensitivität und der Dichte der intraepidermalen Nervenfasern bestand [120]. Andere Studien wiesen am gleichen STZ-Thy1-YFP Mausmodell die Entwicklung einer schmerzhaften Form der diabetischen Polyneuropathie nach [136]. Es bestand eine Hyperalgesie gegenüber thermalen, mechanischen und chemischen Stimuli. Die Verabreichung von Insulin führte zu einer Normalisierung der Sensitivität der Nervenfasern [137].

4.5 Der transgene Thy1-YFP Mausstamm

Das Besondere an dem in dieser Studie verwendeten transgenen B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J-Mausstamm ist die Fähigkeit das Fluoreszenzprotein, *yellow fluorescent protein* (YFP), in Nervenfasern zu exprimieren. Dadurch liefert diese Maus-Linie einen starken und spezifischen Vitalmarker für Axone.

Herkömmlicherweise werden Nervenfasen in Gewebeschnittpräparaten mittels speziellen immunhistochemischen Färbungen visualisiert. Diese Verfahren sind zumeist sehr zeitaufwändig und kostenintensiv. Die Expression von YFP in den Nervenfasern ermöglicht jedoch ohne aufwändige Färbemethode deren Veranschaulichung im Fluoreszenzmikroskop.

Das Prinzip zur Herstellung von transgenen Mäusen basiert auf einer Entnahme von befruchteten Eizellen eines weiblichen Donors und anschließender Injektion des gewünschten Genlocus in Form von DNA-Fragmenten in die Vorkerne der Eizelle (Pronukleusinjektion). Diese genetisch manipulierten Eizellen werden dann in eine scheinschwangere Maus übertragen.

Der transgene Mausstamm B6.Cg-Tg(Thy1-YFP)16Jrs/J basiert auf einem Inzuchtstamm der C75BL/6J-Maus-Linie. Zur Vereinfachung erfolgt in dieser Arbeit die Bezeichnung Thy1-YFP. Um diesen Mausstamm zu entwickeln, wurde zunächst ein transgenes Konstrukt, das ein YFP-Gen unter der Kontrolle von regulatorischen Elementen enthielt, die vom Thymus-Zell Antigen 1 (Thy1)-Gen abgeleitet waren, in befruchtete Eizellen von B6CBAF1-Mäusen injiziert. Die erhaltenen Nachkommen wurden für mindestens fünf Generationen mit Wildtyp-C57BL/6J-Mäusen rückgekreuzt [138]. Es wurden insgesamt 9 Linien gezüchtet, deren Bezeichnung 12, 16, 21, A, C, D, F, G, und H sich nach der Stelle der Insertion richtet [138]. Wo genau das transgene Konstrukt im Genom der befruchteten Eizelle lokalisiert ist, bleibt unbekannt und ist dem Zufall überlassen [138].

Das Thy1-Gen ist Bestandteil von motorischen und sensorischen Nervenfasern, wird aber nicht in allen Nervenfasern exprimiert und lässt sich keinem Fasertypus eindeutig zu ordnen. Der Thy1-YFP Mausstamm hat sich in der Forschung von neuronalen Strukturen, ob zentrales oder peripheres Nervensystem, als neues in vivo Mausmodell fest etabliert. So konnten Untersuchungen an kornealen Nervenfasern von Thy1-YFP Mäusen nach chirurgischer Transsektion zeigen, dass sich YFP-positive Fasern nach traumatischen Verletzungen regenerierten [139]. Auch wenn nur die Hälfte aller YFP positiven Fasern positiv für einen Pan-neuronalen Marker, dem Anti-Tubulin III, waren und die Hälfte aller Anti-Tubulin III positiven Nervenfasern positiv für das YFP waren, so ist die Expression des YFP in Nervenfasern dennoch stabil und zeigt in allen Untersuchungen niedrige Abweichungen mit SEM < 3% [140].

In dieser dargelegten tierexperimentellen Studie wurden erstmals Thy1-YFP Mäuse im Zusammenhang mit einer diabetischen Polyneuropathie untersucht. Dazu wurden ausschließlich YFP-positive korneale und intraepidermale Nervenfasern analysiert. Ergänzend wurden die kornealen Nervenfasern mit einem Pan-neuronalen Markers, dem Anti-PGP9.5, visualisiert. Der Marker Anti-PGP9.5 wurde verwendet, da klinische Studien gezeigt haben, dass er dem Marker Anti-Tubulin III überlegen ist [141].

Um korneale Nervenfasern per Immunfluoreszenzfärbung sichtbar zu machen, ist ein 72-stündiges Verfahren notwendig. Während des Färbeprozesses stellte sich heraus, dass das YFP bereits nach Eindecken der Proben ausgebleichen war. Um dennoch zu zeigen es sich bei den YFP-positiven Fasern um Nervenfasern handelt, wurde die Immunfluoreszenzfärbung der intraepidermalen Nervenfasern angewandt. Diese Färbemethode ist weniger zweitaufwendig und demonstrierte ebenso, dass alle YFP-positiven Fasern auch positiv für das Anti-PGP9.5

waren. Es konnte jedoch nicht, wie in der Studie von Yu et al. (2007) beschrieben, aufgezeigt werden, dass alle Anti-PGP9.5-positive Fasern auch YFP positiv sind. Zusammenfassend lässt sich aber beurteilen, dass die Verwendung eines transgenen Mausmodells, welches das YFP in Nervenfasern exprimiert, valide ist [140].

Auch wenn das Anti-PGP9.5 als Pan-neuronaler Marker gilt, so zeigen weiterführende Studien von Bönhof et al. (2017) eine potenzielle Überlegenheit des Anti-GAP43 zur Evaluation von sich regenerierenden intraepidermalen Nervenfasern [141].

Zukünftig wäre ein transgenes Mausmodell mittels CRISPR/Cas9 System [142] zur Evaluation einer diabetischen *Small fibre* Neuropathie, in welchem die von C-Nervenfasern bestimmten Rezeptoren wie CGRP oder TRVP, die Funktionen bei der Weiterleitung von Schmerz- oder Wärmereizen ausüben, ein fluoreszierendes Protein exprimieren vielversprechend.

5 Ausblick

Die konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) bietet als ophthalmologische Technik nicht nur eine Möglichkeit Veränderungen der Kornea zu visualisieren, sondern offenbart zudem ein Spektrum zur Diagnostik und Evaluation von Therapien der Neuropathie über den Fachbereich der Augenheilkunde hinaus. Nach aktuellem Forschungsstand ist unbestritten, dass korneale Nervenfasern einen potenziellen Biomarker zur Diagnostik einer diabetischen Polyneuropathie darstellen. Die CLSM ist die bis heute einzige Technik, die es ermöglicht Nervenfasern und deren physiologischen als auch pathophysiologischen Veränderungen in vivo und nicht-invasiv sichtbar zu machen. Diese Methode könnte das diagnostische Assessment einer diabetischen Polyneuropathie neben sensorischen Funktionstests und klinischen Untersuchungen komplettieren.

Es gibt inzwischen zahlreiche klinische und tierexperimentelle Studien zur Untersuchung des sub-epithelialen Nervenplexus. Die technischen Herausforderungen bestehen darin, möglichst effizient 2 bis 3-dimensionale Übersichtsaufnahmen des sub-epithelialen Nervenplexus im Bereich der Wirbelstruktur ohne Artefakte zu rekonstruieren. Zudem sollte ein geeignetes Analyseverfahren zur Auswertung der sub-epithelialen Nervenfasern entwickelt werden, um die Objektivität der Ergebnisse weiter zu verbessern.

Das hier vorgestellte Thy1-YFP Mausmodell eines chemisch induzierten Diabetes mellitus bietet aufgrund der Expression des Fluoreszenzmarkers YFP in den Nervenfasern viele

technische Möglichkeiten. Jedoch eignet sich die CLSM des HRT II nur bedingt zur weiteren Untersuchung der kornealen Nervenfasern. Die Auflösung am Mauseye ist zu gering, um auch nur annähernd ähnlich hohe absolute CNFL-Werte wie mittels der Fluoreszenzmikroskopie zu detektieren. Des Weiteren ist die Wirbelstruktur der Nervenfasern per CLSM nur schwer darstellbar. Dies gelingt mittels Multi-Photonen Mikroskopie, einer Technik, die in der AG um Frau Prof. Baltrusch an der Universitätsmedizin Rostock etabliert wurde [143], Ziel ist es, Thy1-YFP Mäuse in vivo unter Narkose mittels dieser Technik zu untersuchen. Neben den kornealen Nervenfasern können auch intraepidermale Nervenfasern visualisiert und mit hoher Auflösung longitudinal untersucht werden.

In unserem Versuch haben wir die Auswirkungen eines Diabetes mellitus auf die CNFL untersucht. Um Spätschäden detaillierter beurteilen zu können, müsste man weiterführend die Versuchsgruppen weiter unterteilen. Die Einordnung könnte in drei Kohorten erfolgen (1) eine unbehandelte diabetische Gruppe, (2) eine diabetische Gruppe, die schlecht glykämisch eingestellt ist und (3) eine streng-glykämisch eingestellte diabetische Gruppe. Ergänzend wären neben den morphologischen Parametern auch die sensorischen Funktionen der Nervenfasern zu testen. Zur weiteren Erforschung der Pathophysiologie der diabetischen Polyneuropathie dient in der AG um Frau Prof. Baltrusch an der Universitätsmedizin Rostock eine Kreuzung des transgenen Thy1-YFP- und einem RAGE knockout Mausstamms. Es soll weiterführend untersucht werden, welche Bedeutung der AGE-RAGE Achse hinsichtlich der Entwicklung von diabetischen Nervenschädigungen zukommt [144].

6 Zusammenfassung

Der Diabetes Mellitus (DM) gehört weltweit zu der häufigsten Stoffwechselerkrankung. Als chronische Erkrankung sind neben einer optimalen Blutglukoseeinstellung, die diabetischen Folgeerkrankungen eine besondere Herausforderung in der Behandlung der betroffenen Patienten. Schätzungsweise 50% aller an Diabetes mellitus erkrankten Menschen werden im Krankheitsverlauf an einer diabetischen Polyneuropathie leiden. Laut Fachgesellschaften für DM fehlen bislang objektive Biomarker zur Diagnostik und Evaluation einer *Small fibre* Neuropathie. Mit der Entwicklung der in vivo *corneal confocal* Laserscanning-Mikroskopie (IVCCM) offenbart sich eine bisher einzigartige Technik, Nervenfasern der Kornea nicht-invasiv zu visualisieren und zu quantifizieren. Unklar ist bislang, inwieweit Veränderungen der kornealen Nervenfasern mit den intraepidermalen Nervenfasern der Haut infolge einer diabetischen bedingten Schädigung vergleichbar sind.

Ziel dieser tierexperimentellen Studie an Thy1-YFP Mäusen war es, die morphologischen Veränderungen von kornealen und intraepidermalen Nervenfasern nach chemischer Induktion eines Diabetes mellitus zu untersuchen.

Dazu erwies sich die STZ basierte Induktion eines Diabetes mellitus als geeignet, um Folgeschäden einer diabetischen Polyneuropathie zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass die kornealen Nervenfasern der diabetischen Tiere frühzeitig degenerieren und damit eine erhöhte Suszeptibilität für eine diabetische Stoffwechsellage aufwiesen, während intraepidermale Nervenfasern morphologisch nach vierwöchiger Diabetes-Dauer unbeeinträchtigt blieben. Neben einer frühzeitigen Degeneration der Nervenfasern der Kornea zeigten diese ebenfalls ein rasch einsetzendes regeneratives Potenzial nach zweimonatiger Insulinbehandlung.

Die IVCCM war geeignet, um eine signifikante Abnahme der CNFL von diabetischen Mäusen zu detektieren. Jedoch ist das Auflösungsvermögen der Aufnahmen bei der Maus nicht ausreichend genug, damit die Nervenfasern zusätzlich mittels einer Software automatisch ausgewertet werden könnten. Auch wenn beide Analyseverfahren (manuell und automatisiert detektierte Nervenfasern) gleiche Effekte (signifikante Abnahme der CNFL der diabetischen Mäuse) aufzeigten, war die Übereinstimmungen hinsichtlich der einzelnen detektierten Nervenfasern zwischen beiden Methoden bezüglich Sensitivität und *false discovery rate* relativ gering. In der ex vivo Mikroskopie bestätigte sich, dass die kornealen Nervenfasern, welche sich zentral befinden und eine wirbelartige Struktur bilden, frühzeitig degenerieren, während peripher gelegene Nervenfasern unverändert blieben. Die Fluoreszenzmikroskopie zeigte im Vergleich zur CLSM eine qualitativ hochwertigere Bildauflösung sowie Vergrößerung der sub-epithelialen Nervenfasern und führte in der manuellen also auch automatisierten Analyse zu sehr guten Ergebnissen mit einer höheren Sensitivität und geringeren *false discovery rate*. Die Veränderungen der kornealen Nervenfasern korrelierten gut mit den HbA1c-Messwerten, während die Korrelation mit der Serum-AGEs-Konzentration eher als moderat anzusehen war.

7 Thesen dieser Arbeit:

- I. Eine Polyneuropathie gehört zu den häufigen Spätschäden eines Diabetes mellitus.
- II. Die in vivo *corneal confocal* Laserscanning-Mikroskopie (IVCCM) wird als objektiver Biomarker zur Diagnostik der *small fibre* Neuropathie bei Patienten mit Diabetes mellitus diskutiert.
- III. In dieser Studie wurden neuro-fluoreszente Thy1-YFP Mäuse mit Streptozotocin (STZ) behandelt, um die Entwicklung einer diabetischen Polyneuropathie mittels IVCCM im Vergleich zu weiteren Parametern zu untersuchen.
- IV. Alle mit STZ behandelten Mäuse konnten als diabetisch klassifiziert werden.
- V. Der Parameter *corneal nerve fibre length* (CNFL) zur Evaluation der kornealen Nervenfasern mittels IVCCM nahm bei den diabetischen Mäusen signifikant und progredient über einen Zeitraum von 4 Wochen ab.
- VI. Die kornealen Nervenfasern reagierten auf die diabetische Stoffwechsellage susceptibler als intraepidermale Nervenfasern, die sich über den gleichen Zeitraum morphologisch nicht veränderten.
- VII. Die manuelle Auswertung der IVCCM Aufnahmen zur Bestimmung der CNFL war der automatisierten Auswertung überlegen. Die geringe Größe der murinen Kornea erschwert die automatisierte Auswertung.
- VIII. Unter Insulintherapie und Senkung der Hyperglykämie nahm die CNFL in den diabetischen Mäusen wieder signifikant zu.
- IX. Am Mausmodell konnte somit gezeigt werden, dass die IVCCM-Analyse zur Beurteilung und Verlaufskontrolle der diabetischen Polyneuropathie geeignet ist.
- X. Die ex vivo Untersuchung der kornealen Nervenfasern mittels der YFP Fluoreszenz zeigte eine Abnahme der CNFL in den zentralen Anteilen der Kornea, periphere Abschnitte, die mittels IVCCM nicht untersucht werden können, blieben unverändert.
- XI. Aufgrund des besseren Signal-Rausch-Verhältnisses in der ex vivo Analyse war die Übereinstimmung zwischen manuell und automatisiert detektierten Nervenfasern hoch. Das automatisierte Verfahren ist hier gut anwendbar.
- XII. Die Abnahme der kornealen Nervenfasern korrelierte signifikant mit einem Anstieg des HbA1c-Wertes und der *advanced glykation endproducts* (AGEs).
- XIII. Die höhere Suszeptibilität der kornealen Nervenfasern für diabetische Folgeschäden könnte auf eine höhere Akkumulation von AGEs in der Kornea zurückzuführen sein.

8 Literaturverzeichnis

1. Kellerer, M.a.S.M., Definiton, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Diabetes, 2011. 6: p. 107-110.
2. Nauck, M.e.a., *Definition, Klassifikation und Diagnose des Diabetes mellitus*. Diabetologie, 2017. 12: p. 94-100.
3. Guillausseau, P.J., *[Classification and diagnostic criteria of diabetes: propositions of ADA and WHO]*. Diabetes Metab, 1997. 23(5): p. 454-5.
4. Reimann, M., et al., *An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus*. Pharmacol Ther, 2009. 121(3): p. 317-31.
5. Johnson, D.D., P.J. Palumbo, and C.P. Chu, *Diabetic ketoacidosis in a community-based population*. Mayo Clin Proc, 1980. 55(2): p. 83-8.
6. Nokoff, N. and M. Rewers, *Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals*. Ann N Y Acad Sci, 2013. 1281: p. 1-15.
7. Steck, A.K. and M.J. Rewers, *Genetics of type 1 diabetes*. Clin Chem, 2011. 57(2): p. 176-85.
8. Eringsmark Regnell, S. and A. Lernmark, *The environment and the origins of islet autoimmunity and Type 1 diabetes*. Diabet Med, 2013. 30(2): p. 155-60.
9. Couper, J.J., *Environmental triggers of type 1 diabetes*. J Paediatr Child Health, 2001. 37(3): p. 218-20.
10. Gerich, J.E., *Contributions of insulin-resistance and insulin-secretory defects to the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. Mayo Clin Proc, 2003. 78(4): p. 447-56.
11. Lillioja, S., et al., *Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians*. N Engl J Med, 1993. 329(27): p. 1988-92.
12. Martin, B.C., et al., *Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study*. Lancet, 1992. 340(8825): p. 925-9.
13. Goyal, R. and I. Jialal, *Glucose Intolerance*, in StatPearls. 2018: Treasure Island (FL).
14. Polonsky, K.S., J. Sturis, and G.I. Bell, *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Non-insulin-dependent diabetes mellitus - a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance*. N Engl J Med, 1996. 334(12): p. 777-83.
15. Vaishya, S., R.D. Sarwade, and V. Seshadri, *MicroRNA, Proteins, and Metabolites as Novel Biomarkers for Prediabetes, Diabetes, and Related Complications*. Front Endocrinol (Lausanne), 2018. 9: p. 180.
16. https://www.med.uni-goettingen.de/de/media/tag_der_medizin/tdm_2004_genetik_der_zuckerkrankheit.pdf.
17. Barnett, A.H., et al., *Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs*. Diabetologia, 1981. 20(2): p. 87-93.

18. Florez, J.C., et al., *TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program*. N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 241-50.
19. Hansen, L. and O. Pedersen, *Genetics of type 2 diabetes mellitus: status and perspectives*. Diabetes Obes Metab, 2005. **7**(2): p. 122-35.
20. Grant, S.F., et al., *Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes*. Nat Genet, 2006. **38**(3): p. 320-3.
21. Sladek, R., et al., *A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 881-5.
22. Drong, A.W., C.M. Lindgren, and M.I. McCarthy, *The genetic and epigenetic basis of type 2 diabetes and obesity*. Clin Pharmacol Ther, 2012. **92**(6): p. 707-15.
23. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/197654/Diabetes-mellitus-Typ-2-Neue-Einteilung-vorgestellt>.
24. Ahlqvist, E., et al., *Novel subgroups of adult-onset diabetes and their association with outcomes: a data-driven cluster analysis of six variables*. Lancet Diabetes Endocrinol, 2018. **6**(5): p. 361-369.
25. Ogurtsova, K., et al., *IDF Diabetes Atlas: Global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040*. Diabetes Res Clin Pract, 2017. **128**: p. 40-50.
26. <https://www.aerzteblatt.de/archiv/78663/Chronische-Erkrankungen-in-Entwicklungslaendern-Herzinfarkte-und-Diabetes-im-Slum>.
27. Collaboration, N.C.D.R.F., *Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants*. Lancet, 2016. **387**(10027): p. 1513-30.
28. Dagenais, G.R., et al., *Variations in Diabetes Prevalence in Low-, Middle-, and High-Income Countries: Results From the Prospective Urban and Rural Epidemiological Study*. Diabetes Care, 2016. **39**(5): p. 780-7.
29. Ramachandran, A., R.C. Ma, and C. Snehalatha, *Diabetes in Asia*. Lancet, 2010. **375**(9712): p. 408-18.
30. <https://www.dandc.eu/de/article/diabetes-breitet-sich-entwicklungslaendern-aus>.
31. <http://www.diabetesatlas.org/resources/previous-editions.html>.
32. Heidemann, C., et al., *Temporal changes in the prevalence of diagnosed diabetes, undiagnosed diabetes and prediabetes: findings from the German Health Interview and Examination Surveys in 1997-1999 and 2008-2011*. Diabet Med, 2016. **33**(10): p. 1406-14.
33. Maier, W., et al., *The impact of regional deprivation and individual socio-economic status on the prevalence of Type 2 diabetes in Germany. A pooled analysis of five population-based studies*. Diabet Med, 2013. **30**(3): p. e78-86.
34. Tamayo, T., et al., *Diabetes in Europe: an update*. Diabetes Res Clin Pract, 2014. **103**(2): p. 206-17.
35. Bendas, A., et al., *Trends in Incidence Rates during 1999-2008 and Prevalence in 2008 of Childhood Type 1 Diabetes Mellitus in Germany--Model-Based National Estimates*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132716.

36. Tamayo, T., et al., *The Prevalence and Incidence of Diabetes in Germany*. Dtsch Arztebl Int, 2016. **113**(11): p. 177-82.
37. Herder, C., et al., *Prevalence of impaired glucose regulation in German school-leaving students*. Int J Obes (Lond), 2007. **31**(7): p. 1086-8.
38. Banting, F.G., et al., *Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus*. Can Med Assoc J, 1922. **12**(3): p. 141-6.
39. Sandahl, K., et al., *Increased mortality in a Danish cohort of young people with Type 1 diabetes mellitus followed for 24 years*. Diabet Med, 2017. **34**(3): p. 380-386.
40. Tancredi, M., et al., *Excess Mortality among Persons with Type 2 Diabetes*. N Engl J Med, 2015. **373**(18): p. 1720-32.
41. Rao Kondapally Seshasai, S., et al., *Diabetes mellitus, fasting glucose, and risk of cause-specific death*. N Engl J Med, 2011. **364**(9): p. 829-841.
42. Chawla, A., R. Chawla, and S. Jaggi, *Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum?* Indian J Endocrinol Metab, 2016. **20**(4): p. 546-51.
43. Klein, R., *Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes*. Diabetes Care, 1995. **18**(2): p. 258-68.
44. Einarson, T.R., et al., *Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: a systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017*. Cardiovasc Diabetol, 2018. **17**(1): p. 83.
45. Haffner, S.M., et al., *Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction*. N Engl J Med, 1998. **339**(4): p. 229-34.
46. Deshpande, A.D., M. Harris-Hayes, and M. Schootman, *Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications*. Phys Ther, 2008. **88**(11): p. 1254-64.
47. Perreault, L., et al., *Exploring residual risk for diabetes and microvascular disease in the Diabetes Prevention Program Outcomes Study (DPPOS)*. Diabet Med, 2017. **34**(12): p. 1747-1755.
48. Skyler, J.S., et al., *Differentiation of Diabetes by Pathophysiology, Natural History, and Prognosis*. Diabetes, 2017. **66**(2): p. 241-255.
49. Boulton AJ, G.F., Jervell JA. Guidelines for the diagnosis and outpatient management of diabetic , et al.
50. Da Costa, E.M.Ä.Z.f.Q.i.d.M.Ä., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen , et al .
51. Haslbeck M, L.D., Neundörfer B, et al. Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle der Neuropathie bei , D.m.T.u.T.E.L.D.D. Diabetes, and -.G. 2004.
52. Said, G., *Diabetic neuropathy: an update*. J Neurol, 1996. **243**(6): p. 431-40.
53. Edwards, J.L., et al., *Diabetic neuropathy: mechanisms to management*. Pharmacol Ther, 2008. **120**(1): p. 1-34.
54. Patzelt, V., *[On myelin and classification of the nerve fibers]*. Acta Neuroveg (Wien), 1953. **6**(1-2): p. 170-80.

55. Allgeier, S., *Gewinnung von Bilddaten : Automatisierung in der Diagnostik am Beispiel der Kornea*. xii, 172 pages.
56. Papanas, N. and D. Ziegler, *Risk Factors and Comorbidities in Diabetic Neuropathy: An Update 2015*. Rev Diabet Stud, 2015. **12**(1-2): p. 48-62.
57. Pop-Busui, R., et al., *Diabetic Neuropathy: A Position Statement by the American Diabetes Association*. Diabetes Care, 2017. **40**(1): p. 136-154.
58. Rutkove, S.B., *A 52-year-old woman with disabling peripheral neuropathy: review of diabetic polyneuropathy*. JAMA, 2009. **302**(13): p. 1451-8.
59. Ziegler, D., et al., *Epidemiology of polyneuropathy in diabetes and prediabetes*. Handb Clin Neurol, 2014. **126**: p. 3-22.
60. Bongaerts, B.W., et al., *Older subjects with diabetes and prediabetes are frequently unaware of having distal sensorimotor polyneuropathy: the KORA F4 study*. Diabetes Care, 2013. **36**(5): p. 1141-6.
61. Bril, V., et al., *Reliability and validity of the modified Toronto Clinical Neuropathy Score in diabetic sensorimotor polyneuropathy*. Diabet Med, 2009. **26**(3): p. 240-6.
62. Benbow, S.J., M.E. Wallymahmed, and I.A. MacFarlane, *Diabetic peripheral neuropathy and quality of life*. QJM, 1998. **91**(11): p. 733-7.
63. Navarro, X., et al., *Neuropathy and mortality in diabetes: influence of pancreas transplantation*. Muscle Nerve, 1996. **19**(8): p. 1009-16.
64. McNeely, M.J., et al., *The independent contributions of diabetic neuropathy and vasculopathy in foot ulceration. How great are the risks?* Diabetes Care, 1995. **18**(2): p. 216-9.
65. Boulton, A.J., *The diabetic foot: grand overview, epidemiology and pathogenesis*. Diabetes Metab Res Rev, 2008. **24 Suppl 1**: p. S3-6.
66. Lobmann, R., *[Diabetic foot: how to avoid therapeutic mistakes]*. MMW Fortschr Med, 2013. **155**(18): p. 63-6.
67. Rathur, H.M. and A.J. Boulton, *The neuropathic diabetic foot*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007. **3**(1): p. 14-25.
68. Pop-Busui, R., et al., *Effects of prior intensive insulin therapy on cardiac autonomic nervous system function in type 1 diabetes mellitus: the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications study (DCCT/EDIC)*. Circulation, 2009. **119**(22): p. 2886-93.
69. *Effect of intensive diabetes treatment on nerve conduction in the Diabetes Control and Complications Trial*. Ann Neurol, 1995. **38**(6): p. 869-80.
70. Smith, A.G., et al., *Lifestyle intervention for pre-diabetic neuropathy*. Diabetes Care, 2006. **29**(6): p. 1294-9.
71. Ismail-Beigi, F., et al., *Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial*. Lancet, 2010. **376**(9739): p. 419-30.

72. Malik, R.A., *Wherefore Art Thou, O Treatment for Diabetic Neuropathy?* Int Rev Neurobiol, 2016. **127**: p. 287-317.
73. Hauner, H., et al., *[Disease management program (DMP) diabetes mellitus: simulation of therapeutic results of different guidelines. A new diabetes mellitus model (DMM)]*. Dtsch Med Wochenschr, 2003. **128**(21): p. 1167-72.
74. Bundesärztekammer (BÄK), K.B.K., Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Neuropathie bei Diabetes im Erwachsenenalter – Langfassung. 2011 Version 1.2.
<http://www.diabetes.versorgungsleitlinien.de> <http://www.awmf-leitlinien.de>
75. *Systematic guideline search and appraisal, as well as extraction of new and relevant recommendations, for the DMP "diabetes mellitus type 2" Executive summary of final report: V09-04, Version 1.0*, in Institute for Quality and Efficiency in Health Care: Executive Summaries. 2005: Cologne, Germany.
76. D. Ziegler, J.K., C. Maier, J. Pannek, *Diabetische Neuropathie*. Diabetologie und Stoffwechsel, 2013: p. 8(S 02): S108-S118.
77. Tavakoli, M., et al., *Corneal confocal microscopy detects early nerve regeneration in diabetic neuropathy after simultaneous pancreas and kidney transplantation*. Diabetes, 2013. **62**(1): p. 254-60.
78. Smith, C., et al., *The function of multiple ejaculations in bitterling*. J Evol Biol, 2014. **27**(9): p. 1819-29.
79. Lauria, G., et al., *EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy*. Eur J Neurol, 2005. **12**(10): p. 747-58.
80. Sumner, C.J., et al., *The spectrum of neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance*. Neurology, 2003. **60**(1): p. 108-11.
81. Alam, U., et al., *Diagnostic utility of corneal confocal microscopy and intra-epidermal nerve fibre density in diabetic neuropathy*. PLoS One, 2017. **12**(7): p. e0180175.
82. Quattrini, C., et al., *Surrogate markers of small fiber damage in human diabetic neuropathy*. Diabetes, 2007. **56**(8): p. 2148-54.
83. Stave, J., et al., *[Modified Heidelberg Retinal Tomograph HRT. Initial results of in vivo presentation of corneal structures]*. Ophthalmologe, 2002. **99**(4): p. 276-80.
84. Malik, R.A., *Which test for diagnosing early human diabetic neuropathy?* Diabetes, 2014. **63**(7): p. 2206-8.
85. Reinhard O. W. Burk, K.R., Friedrich E. Kruse, Hans E. Völcker, *Laser-Scanning-Tomographie der Papille*. Glaukom. Diagnostik und Therapie. Enke, Stuttgart 1990, ISBN 3-432-98691-2, S. 113–119., 1990.
86. Guthoff RF, B.C., Stave J, *Atlas of Confocal Laser Scanning In-vivo Microscopy in Ophthalmology*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2006, 2006.
87. Kruse, F.E., et al., *Reproducibility of topographic measurements of the optic nerve head with laser tomographic scanning*. Ophthalmology, 1989. **96**(9): p. 1320-4.

88. Sheppard, C.J.R.S., D.M. Introduction. In *Confocal Laser Scanning Microscopy*; Springer-Verlag New York Inc.: New York, 1997; 1–13.
89. Minsky, M., Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10: 128-138. doi:10.1002/sca.4950100403.
90. Paddock, S.W.M.B.h.d.o.M.
91. Zhivov, A., et al., *In vivo confocal microscopy of the ocular surface*. *Ocul Surf*, 2006. **4**(2): p. 81-93.
92. Guthoff, R.F. and O. Stachs, *[New laser-based technologies in ophthalmology]*. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2009. **226**(12): p. 957.
93. Stachs, O., et al., *In vivo three-dimensional confocal laser scanning microscopy of the epithelial nerve structure in the human cornea*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2007. **245**(4): p. 569-75.
94. Finis, D., et al., *[Special Diagnostics of the Cornea]*. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2015. **232**(11): p. 1319-32; quiz 1333-4.
95. Masterton, S. and M. Ahearne, *Mechanobiology of the corneal epithelium*. *Exp Eye Res*, 2018. **177**: p. 122-129.
96. Sridhar, M.S., *Anatomy of cornea and ocular surface*. *Indian J Ophthalmol*, 2018. **66**(2): p. 190-194.
97. DelMonte, D.W. and T. Kim, *Anatomy and physiology of the cornea*. *J Cataract Refract Surg*, 2011. **37**(3): p. 588-98.
98. Dua, H.S., et al., *Human corneal anatomy redefined: a novel pre-Descemet's layer (Dua's layer)*. *Ophthalmology*, 2013. **120**(9): p. 1778-85.
99. Levi, A., A. Ingber, and D.C. Enk, *[In vivo reflectance-mode confocal laser microscopy: basic principles and clinical and research employments in dermatology]*. *Harefuah*, 2012. **151**(10): p. 576-80, 605.
100. Guthoff, R., et al., *In vivo confocal microscopy of failing and functioning filtering blebs: Results and clinical correlations*. *J Glaucoma*, 2006. **15**(6): p. 552-8.
101. Bohn, S., et al., *Cellular in vivo 3D imaging of the cornea by confocal laser scanning microscopy*. *Biomed Opt Express*, 2018. **9**(6): p. 2511-2525.
102. Stachs, O., et al., *[Three-dimensional confocal laser scanning microscopy of the corneal nerve structure]*. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2006. **223**(7): p. 583-8.
103. Rozsa, A.J. and R.W. Beuerman, *Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit*. *Pain*, 1982. **14**(2): p. 105-20.
104. Guthoff, R.F., et al., *Epithelial innervation of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy*. *Cornea*, 2005. **24**(5): p. 608-13.
105. Muller, L.J., L. Pels, and G.F. Vrensen, *Ultrastructural organization of human corneal nerves*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1996. **37**(4): p. 476-88.

106. Kalteniece, A., et al., *Greater corneal nerve loss at the inferior whorl is related to the presence of diabetic neuropathy and painful diabetic neuropathy*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 3283.
107. Lagali, N.S., et al., *Wide-field corneal subbasal nerve plexus mosaics in age-controlled healthy and type 2 diabetes populations*. Sci Data, 2018. **5**: p. 180075.
108. Rosenberg, M.E., et al., *Corneal structure and sensitivity in type 1 diabetes mellitus*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(10): p. 2915-21.
109. Petropoulos, I.N., et al., *Rapid automated diagnosis of diabetic peripheral neuropathy with in vivo corneal confocal microscopy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2014. **55**(4): p. 2071-8.
110. Parissi, M., et al., *Standardized baseline human corneal subbasal nerve density for clinical investigations with laser-scanning in vivo confocal microscopy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013. **54**(10): p. 7091-102.
111. Zhivov, A., et al., *[Quantitative analysis of corneal subbasal nerve plexus with in vivo confocal laser scanning microscopy]*. Klin Monbl Augenheilkd, 2011. **228**(12): p. 1067-72.
112. Zhivov, A., et al., *Imaging and quantification of subbasal nerve plexus in healthy volunteers and diabetic patients with or without retinopathy*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e52157.
113. Pritchard, N., et al., *Corneal Markers of Diabetic Neuropathy*. The Ocular Surface, 2011. **9**(1): p. 17-28.
114. Reichard, M., et al., *Comparative in vivo confocal microscopical study of the cornea anatomy of different laboratory animals*. Curr Eye Res, 2010. **35**(12): p. 1072-80.
115. Reichard, M., et al., *In vivo visualisation of murine corneal nerve fibre regeneration in response to ciliary neurotrophic factor*. Exp Eye Res, 2014. **120**: p. 20-7.
116. Labbe, A., et al., *Comparative anatomy of laboratory animal corneas with a new-generation high-resolution in vivo confocal microscope*. Curr Eye Res, 2006. **31**(6): p. 501-9.
117. Dvorscak, L. and C.F. Marfurt, *Age-related changes in rat corneal epithelial nerve density*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(3): p. 910-6.
118. Bannerman, P.G. and A. Hahn, *Enhanced visualization of axonopathy in EAE using thyl-YFP transgenic mice*. J Neurol Sci, 2007. **260**(1-2): p. 23-32.
119. Tavakoli, M., et al., *Corneal confocal microscopy for the diagnosis of diabetic autonomic neuropathy*. Muscle Nerve, 2015. **52**(3): p. 363-70.
120. Chen, Y.S., S.S. Chung, and S.K. Chung, *Noninvasive monitoring of diabetes-induced cutaneous nerve fiber loss and hypoalgesia in thyl-YFP transgenic mice*. Diabetes, 2005. **54**(11): p. 3112-8.
121. Edwards, K., et al., *Corneal confocal microscopy best identifies the development and progression of neuropathy in patients with type 1 diabetes*. J Diabetes Complications, 2017. **31**(8): p. 1325-1327.
122. Azmi, S., et al., *Early nerve fibre regeneration in individuals with type 1 diabetes after simultaneous pancreas and kidney transplantation*. Diabetologia, 2019. **62**(8): p. 1478-1487.
123. Ziegler, D., et al., *Early detection of nerve fiber loss by corneal confocal microscopy and skin biopsy in recently diagnosed type 2 diabetes*. Diabetes, 2014. **63**(7): p. 2454-63.

124. Deeds, M.C., et al., *Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models*. Lab Anim, 2011. **45**(3): p. 131-40.
125. https://www.dgho.de/arbeitskreise/a-g/drg-gesundheitsoekonomie/nub-antraege-2019/19_85_streptozotocin_dgho_10102018.pdf.
126. Rakieten, N., M.L. Rakieten, and M.V. Nadkarni, *Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917)*. Cancer Chemother Rep, 1963. **29**: p. 91-8.
127. Eleazu, C.O., et al., *Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans*. J Diabetes Metab Disord, 2013. **12**(1): p. 60.
128. Leiter, E.H., *Multiple low-dose streptozotocin-induced hyperglycemia and insulinitis in C57BL mice: influence of inbred background, sex, and thymus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(2): p. 630-4.
129. Kolb, H., *Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice*. Diabetes Metab Rev, 1987. **3**(3): p. 751-78.
130. Le May, C., et al., *Estrogens protect pancreatic beta-cells from apoptosis and prevent insulin-deficient diabetes mellitus in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9232-7.
131. O'Brien, B.A., et al., *Beta-cell apoptosis is responsible for the development of IDDM in the multiple low-dose streptozotocin model*. J Pathol, 1996. **178**(2): p. 176-81.
132. Wu, K.K. and Y. Huan, *Diabetic atherosclerosis mouse models*. Atherosclerosis, 2007. **191**(2): p. 241-9.
133. Rossini, A.A., et al., *Studies of streptozotocin-induced insulinitis and diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(6): p. 2485-9.
134. Yorek, M.S., et al., *Effect of diet-induced obesity or type 1 or type 2 diabetes on corneal nerves and peripheral neuropathy in C57Bl/6J mice*. J Peripher Nerv Syst, 2015. **20**(1): p. 24-31.
135. Chen, D.K., et al., *Repeated monitoring of corneal nerves by confocal microscopy as an index of peripheral neuropathy in type-1 diabetic rodents and the effects of topical insulin*. J Peripher Nerv Syst, 2013. **18**(4): p. 306-15.
136. Courteix, C., A. Eschalier, and J. Lavarenne, *Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain*. Pain, 1993. **53**(1): p. 81-8.
137. Malcangio, M. and D.R. Tomlinson, *A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats*. Pain, 1998. **76**(1-2): p. 151-7.
138. Feng, G., et al., *Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP*. Neuron, 2000. **28**(1): p. 41-51.
139. Namavari, A., et al., *In vivo serial imaging of regenerating corneal nerves after surgical transection in transgenic Thy1-YFP mice*; 2011
140. Transgenic corneal neurofluorescence in mice Chaerles Q. Yu 2007
141. Bönhof, GJ, et al., *Patterns of cutaneous nerve fibre loss and regeneration in type 2 diabetes with painful and painless polyneuropathy*. Diabetologia. 2017;**60**(12):2495-2503.

142. Jiang F, et al., *CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms*. Annu Rev Biophys. 2017;**46**:505-529.
143. S. Baltrusch , *Ophthalmologisches Monitoring der diabetischen Neuropathie am Mausmodell* Klin Monbl Augenheilkd 2016; 233(12): 1313-1319
144. J. Leckelt, et al., *High RAGE expression might be responsible for early corneal nerve fibre damage in diabetic individuals*. Diabetologia (2018) 61 (Suppl 1):S1–S620

Danksagung

Mein größter Dank geht an Frau Professor Dr. rer. nat. S. Baltrusch für die Überlassung des spannenden Dissertationsthemas an dem Institut für Medizinische Biochemie und Molekularbiologie der Universitätsmedizin Rostock. Ich bedanke mich für Ihre sehr gute Betreuung, die ich mir nicht besser hätte wünschen können. Sie war stets bei Nachfragen für mich erreichbar, offen für Vorschläge und hat mich in allen Belangen rund um das Thema mit einbezogen. Über die Möglichkeit zur Teilnahme an nationalen sowie internationalen Kongressen habe ich mich sehr gefreut und bin mit großem Dank verbunden.

Die Ergebnisse wären ohne die unermüdliche Begleitung von Annett Kott nicht möglich gewesen. Ich bedanke mich sehr bei Ihr für Ihr Engagement und stete Hilfsbereitschaft innerhalb und außerhalb des Labors.

Für die weitere Unterstützung bei den Experimenten danke ich vor allem Claudia Fahle und Rica Waterstradt sowie Frau Giers.

An das gesamte Team geht mein Dank für ein kollegiales und hilfsbereites Arbeitsklima.

Bei Frau Dr. rer. nat. Mandy Wietzke bedanke ich mich sehr für Ihr Engagement bei der Korrektur dieser Arbeit und Ihre lieb gewonnene Freundschaft.

Ein besonderer Dank geht an meine liebe Familie, insbesondere meine Eltern, die mir immer viel Vertrauen und Liebe entgegengebracht haben sowie an meine besten Freunde, die mich immer unterstützen und für mich da sind.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name **Janine Leckelt**

Geburtsdaten **24. Januar 1986**

Staatsbürgerschaft **Deutsch**

Ausbildung

10/2011 – 12/2017 **Studium der Humanmedizin, Universität Rostock**

1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Herbst 2013
2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Herbst 2016
3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung Herbst 2017

10/2005 – 09/2008 **Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin,
DRK Klinikum Köpenick Berlin**

08/1998 – 07/2005 **Max-Reinhardt-Gymnasium, Allgemeine Hochschulreife**

Beruflicher Werdegang

11/2018 – bis heute **Facharztweiterbildung für Allgemeinmedizin**

05/2020 – bis heute **Gemeinschaftspraxis Seeger (Nephrologie, Dialyse und
hausärztliche Versorgung) in Berlin**

05/2019 – 04/2020 **Klinik für Innere Medizin, Sana Klinikum Lichtenberg**

11/2018 – 04/2019 **Unfallchirurgie/Orthopädie Sana Klinikum Lichtenberg**

01/2018 – 10/2018 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Medizinische
Biochemie und Molekularbiologie der UMR**

07/2009 – 09/2011 **Gesundheits- und Krankenpflegerin im Helios Klinikum
Berlin Buch**

10/2018 – 06/2009 **Gesundheits- und Krankenpflegerin onkologische
Hauskrankenpflege Rothe in Berlin**

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt durch meine Unterschrift, dass ich diese an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Promotion vorgelegte Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Diese Arbeit wurde bisher noch nicht veröffentlicht und keiner in- oder ausländischen Prüfungsbehörde als Dissertation vorgelegt.

Berlin, 01.08.2020

.....

Unterschrift