

Aus der Kinder- und Jugendklinik der Universitätsmedizin Rostock  
(Direktor: Prof. Dr. M. Radke)

und

der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universitätsmedizin  
Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. A. Jünemann)

Eine klinisch experimentelle Querschnittstudie zur  
Charakterisierung des subbasalen Nervenplexus der Kornea:  
Untersuchung von gesunden Kindern und Jugendlichen sowie  
von pädiatrischen Patienten mit einem Typ 1 Diabetes mellitus  
oder einer chronischen Niereninsuffizienz

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des Akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von  
Sophie Camilla Baronesse von Keyserlingk  
geboren am 31.03.1989 in Berlin

Rostock, den 24.08.2016

**Gutachter:**

1. Gutachter:  
PD Dr. rer. nat. Dagmar-C. Fischer  
Kinder und Jugendklinik der Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter:  
Prof. Dr. rer. nat. Oliver Stachs  
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter:  
PD Dr. Andreea Gamulescu  
Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde des Universitätsklinikums Regensburg

**Datum der Einreichung:** 24.08.2019

**Datum der Verteidigung:** 21.03.2017

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>II.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>4</b>
<b>III.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>IV.</b>	<b>Anmerkung</b>	<b>7</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1	Diabetes mellitus	8
1.2	Chronische Niereninsuffizienz	12
1.3	Polyneuropathie als Folgeerkrankung von T1DM und CKD	16
1.3.1	Diagnostik der Polyneuropathie	19
1.4	Der subbasale Nervenplexus der Kornea	22
1.5	Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie	23
1.5.1	Funktionsweise und Entwicklung der Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie	23
<b>2.</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>25</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>26</b>
3.1	Datenerhebung und -verarbeitung	27
3.2	Studienspezifische ophthalmologische Untersuchungen	28
3.2.1	Erhebung des ophthalmologischen Status	28
3.2.2	Messung der Kornealen Sensitivität	28
3.2.3	Abbildung des subbasalen Nervenplexus mit Konfokaler-Laser-Scanning-Mikroskopie	29
3.2.3.1	Bildaufnahme	29
3.2.3.2	Bildzusammensetzung und -optimierung	30
3.2.3.3	Berechnung der morphologischen Daten	32
3.3	Statistische Auswertung	32

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
4.1	Charakterisierung der Studienpopulation	33
4.2	Studienspezifische ophthalmologische Untersuchungen der Patienten und Kontrollen	35
4.2.1	Ophthalmologischer Status und Test der kornealen Sensitivität	35
4.2.2	Morphologie des subbasalen Nervenplexus	36
4.2.2.1	Morphologie der Nerven bei gesunden Kontrollen	37
4.2.2.2	Vergleich des subbasalen Nervenplexus zwischen T1DM-Patienten, CKD-Patienten und gesunden Kontrollen	38
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>43</b>
5.1	Aktuelle Forschungsergebnisse zur Untersuchung des SNP mit CLSM	43
5.2	Veränderungen des SNP bei T1DM- und CKD-Patienten	47
5.3	Grenzen der vorliegenden Arbeit	49
5.4	Ausblick	50
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>Thesen</b>	<b>52</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>53</b>
<b>9.</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>58</b>
<b>10.</b>	<b>Curriculum Vitae</b>	<b>59</b>
<b>11.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>60</b>

# I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Aktivierete Stoffwechselwege durch vermehrtes Angebot der Abbauprodukte der Glykolyse bei intrazellulärer Hyperglykämie	9
Abb. 2:	Aktivierungswege der MAPK bei Hyperglykämie	11
Abb. 3:	Ursachen der CKD	13
Abb. 4:	Übersicht über Mechanismen, die bei CKD-Patienten die kardiovaskuläre Letalität erhöhen	14
Abb. 5:	Klassifizierung der CKD nach GFR (G1-5) und Albuminurie (A1-3)	15
Abb. 6:	Übersicht über die Mechanismen neuronaler Schädigungen bei chronischer Hyperglykämie	17
Abb. 7:	NSS und NDS zur Diagnostik von DPN und UPN	20
Abb. 8:	Schematische Darstellung der ENG Messung von sensiblen Nervenfasern und der Reizantworten von gesunden oder geschädigten Nerven	21
Abb. 9:	Schematische Darstellung der Kornea (A) und des SNP (B)	22
Abb. 10:	Abbildung des in dieser Studie verwendeten HRT II / RCM und die damit aufgenommenen Bilder der kornealen Schichten	24
Abb. 11:	Schematische Darstellung der Datenerhebung und –verarbeitung	27
Abb. 12:	Abbildung des in dieser Studie verwendeten Cochet-Bonnet-Ästhesiometers (A), Messung der kornealen Sensitivität bei einer Probandin mit dem Cochet-Bonnet-Ästhesiometer (B), schematische Darstellung der kornealen Quadranten (C)	28
Abb. 13:	CLSM Untersuchung des SNP bei zwei Studienprobanden	30
Abb. 14:	Bildstapel einer Foukuserie von SNP-Aufnahmen mit CLSM	31
Abb. 15:	Mosaikbild des SNP eines Probanden (A), Ausschnitt des Mosaikbildes mit Markierung der daraus errechneten kornealen Parameter (B)	31
Abb. 16:	Übersicht über die Studienpopulation	33
Abb. 17:	Exemplarische SNP-Bilder der Studiengruppen	36
Abb. 18:	Darstellung der betrachteten kornealen Parameter in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht	37

Abb. 19: Vergleich der SNP-Befunde bei T1DM-Patienten, CKD-Patienten und Kontrollen	38
Abb. 21: Signifikante Unterschiede des SNP zwischen T1DM-Patienten und Kontrollen	39
Abb. 20: Signifikante Assoziation des Geschlechts mit CNCP (A) und CNFTo (B) bei T1DM-Patienten	39
Abb. 22: Signifikanter Unterschied der CNFTo zwischen CKD-Patienten und Kontrollen	40
Abb. 23: Signifikante Korrelationen der kornealen Parameter bei den Studiengruppen	41
Abb. 24: Signifikante Korrelationen kornealer Parameter bei T1DM-Patienten, die bei den Kontrollen nicht nachweisbar waren	42
Abb. 25: Signifikante Korrelation zwischen CNFTo und Insulin-Tagesdosis bei T1DM-Patienten	42

## II. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klassifizierung der Nervenfasern nach Erlanger und Gasser	16
Tab. 2: Ursachen der Niereninsuffizienz der CKD-Patienten	33
Tab. 3: Anthropometrische und klinische Daten der Studiengruppen	34
Tab. 4: Übersicht über die kornealen Parameter der Studiengruppen	36
Tab. 5: Übersicht über aktuelle Studienergebnisse zur Untersuchung des SNP bei Diabetikern mit CLSM	45

### III. Abkürzungsverzeichnis

AGEs	Advanced Glycation Endproducts
BMI	Body Mass Index
CKD	Chronic Kidney Disease (Chronische Nierenerkrankung/Chronische Niereninsuffizienz)
CLSM	Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie
CNCP	number of corneal nerve connection points per mm <sup>2</sup> (Anzahl der Berührungspunkte zwischen Nerven und Bildrand pro mm <sup>2</sup> )
CNFB	number of nerve fiber branches per mm <sup>2</sup> (Anzahl der Nervenverzweigungen pro mm <sup>2</sup> )
CNFD	corneal nerve fiber density per mm <sup>2</sup> (Anzahl der Nervenfasern pro mm <sup>2</sup> )
CNFL	corneal nerve fiber length per mm <sup>2</sup> (addierte Nervenfasernlänge in einem mm <sup>2</sup> )
CNFT <sub>h</sub>	corneal nerve fiber thickness in μm (Dicke der Nervenfasern in μm)
CNFT <sub>o</sub>	corneal nerve fiber tortuosity (Gewundenheit der Nervenfasern)
CON	Kontrollgruppe
CRP	C-reaktives Protein
DAG	Diacylglycerol
DPD	periphere Diabetische Polyneuropathie
EHEC	Enterohämorrhagisches Escherichia coli
ENG	Elektroneurographie
eNOS	endothelialen Stickstoffmonoxid Synthetase
HRT II	Heidelberg Retina Tomograph Modell II
HUS	Hämolytisch-urämisches Syndrom
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NDS	Neuropathie Defizit Score
NO	Stickstoffmonoxid
NSS	Neuropathie Symptom Score
OVS	Oscillating Volume Scan
PKC	Proteinkinase C
QST	Quantitative Sensitivitätstestung
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RAGEs	AGE-Rezeptoren
RCM	Rostock Cornea Module

RR	Blutdruck
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SNP	Subbasaler Nervenplexus der Kornea
T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
UDP-GlcNAc	Uridine-Diphosphat-N-Acetyl-Glukosamin
UPN	Urämische Polyneuropathie
VEGF	Vascular endothelial growth factor



## IV. Anmerkung

In der Sprachentwicklung ist die Gleichstellung der Geschlechter ein wichtiger Prozess. So auch in wissenschaftlichen Arbeiten. Teilweise wird jedoch durch die Modifizierung jedes geschlechtlichen Wortes der Lesefluss unterbrochen.

Ich verwende in meiner Dissertationsarbeit nach Möglichkeit Begriffe, die für beide Geschlechter gültig sind. Falls mir dies nicht möglich ist ohne „\_Innen“ oder häufige Wiederholungen zu verwenden, werde ich das geläufige, in der Regel maskuline Wort verwenden. Ich möchte darauf aufmerksam machen, dass ich auch in diesen Fällen immer beide Geschlechter anspreche.

# 1. Einleitung

Der Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) und die chronische Niereninsuffizienz (CKD) sind weitverbreitete und für die Pädiatrie relevante Erkrankungen, die trotz unterschiedlicher Ursachen durchaus zu ähnlichen, wenn nicht identischen Folgeerkrankungen führen können. In dieser Arbeit steht die Polyneuropathie als Folge vaskulärer und metabolischer Veränderungen bei T1DM und CKD im Mittelpunkt. Folgeerkrankungen werden klinisch meist erst viele Jahre nach Manifestation der Grunderkrankung bzw. im Falle der CKD bei massiver Einschränkung der Nierenfunktion relevant. Daher ist die Prävention derselben eine große Herausforderung und erfordert sensitive und reproduzierbare Verfahren zum Monitoring.

Der subbasale Nervenplexus der Kornea (SNP) wird von dünn- und unmyelinisierten sensiblen Nervenfasern gebildet. Genau diese Nervenfasern werden bei diabetischer und urämischer Polyneuropathie (DPN und UPN) früh geschädigt. Weiterhin ist der korneale Nervenplexus für das in Rostock entwickelte und optimierte nicht-invasive Verfahren der Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) gut zugänglich.

## 1.1 Diabetes mellitus

Eine der häufigsten und für die Pädiatrie relevanten Diabetesformen ist der Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM). Die Erkrankung erfordert eine lebenslange Insulintherapie. Daraus resultiert eine hohe glykämische Variabilität, die wiederum zu häufigen Hyperglykämien und daraus entstehenden Folgeerkrankungen führt.

Bei Gesunden wird Glukose insulinabhängig über den membranständigen GLUT 4 Transporter in Skelettmuskel-, Herzmuskel- und Fettzellen aufgenommen. Im Nüchternzustand werden über diesen Transporter 20% und bei erhöhtem Insulinspiegel 75-95% der Blutglukose in den Skelettmuskelzellen verstoffwechselt. Zu insulinunabhängiger Glukoseaufnahme kommt es in Neuronen, Endothelzellen, Hepatozyten, intestinaler Mukosa und epithelialen Nierenzellen (1).

Beim T1DM führt die Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas zu einem letztlich vollständigen Insulinmangel und durch die fehlende zelluläre Glukoseaufnahme in Fett-, Skelettmuskel- und Herzmuskelzellen zur Hyperglykämie. Typische Symptome bei Krankheitsmanifestation sind Polyurie und Polydipsie. Der intrazelluläre Glukosemangel in Fettzellen und die fehlende Hemmung der Lipolyse durch Insulin führen zu vermehrter Freisetzung von

Fettsäuren. Diese werden in der Leber über Acetyl-CoA in Ketonkörper umgebaut, dienen den Muskelzellen zwar als Energielieferant, führen aber gleichzeitig zur Übersäuerung des Körpers und im Extremfall zu einem ketoazidotischen Koma (2,3).

Der T1DM manifestiert sich in der Regel innerhalb von Tagen bis Wochen. Häufig besteht eine autoimmune oder genetische Genese. In der Regel sind Kinder und Jugendliche betroffen (4).

In Deutschland sind derzeit schätzungsweise 30.000 – 32.000 Kinder und Jugendliche an T1DM erkrankt, was ca. 0,2% der unter 20-jährigen ausmacht. Die Prävalenz steigt jährlich um 3,9% (5).

Die Gefahren einer T1DM-Erkrankung liegen neben den akuten Stoffwechselentgleisungen in den starken Schwankungen der Glukosekonzentration und chronischen Hyperglykämien mit den daraus resultierenden makro- und mikrovaskulären Komplikationen.

Die chronische extrazelluläre Hyperglykämie führt in insulinunabhängigen Zellen, wie Endothel- und Nervenzellen oder Makrophagen, zu einer intrazellulären Hyperglykämie (6). In den Zellen kommt es zur Glykolyse und durch die unterschiedlichen Abbauprodukte zur Aktivierung mehrerer Stoffwechselwege (7) (Abb. 1).

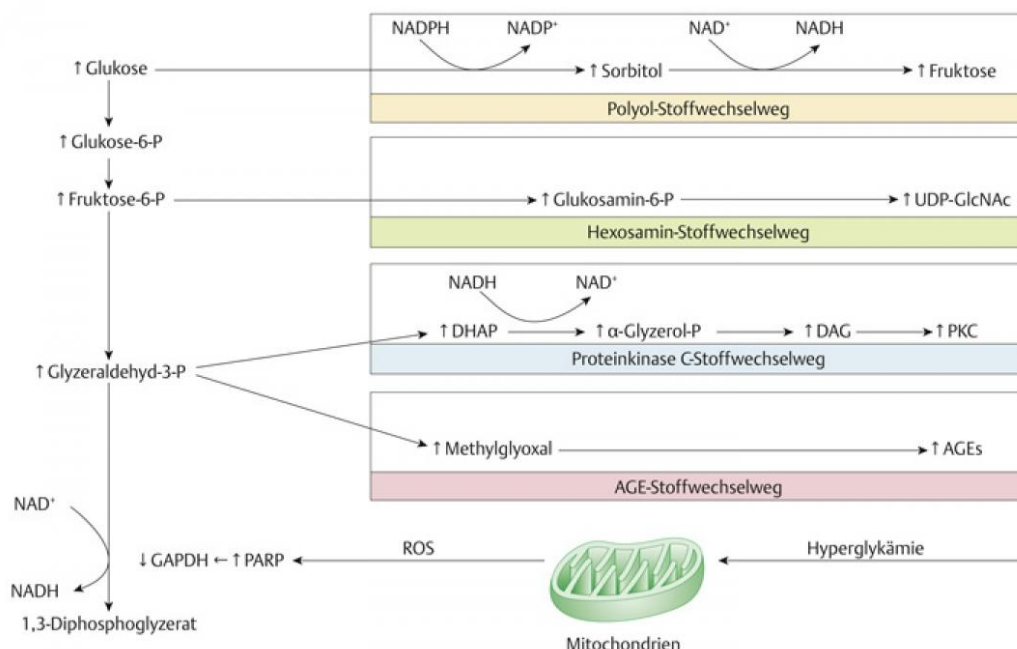


Abb. 1: Aktivierte Stoffwechselwege durch vermehrtes Angebot der Abbauprodukte der Glykolyse bei intrazellulärer Hyperglykämie (7)

### Aktivierung des Polyol-Stoffwechselweges

Im Polyol-Stoffwechselweg wird Glukose durch die Aldose-Reduktase unter Oxidation von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) zu Sorbitol und durch die Sorbitol-Dehydrogenase weiter zu Fruktose umgewandelt. Dadurch sinkt der Glukose-Spiegel in der Zelle. Gleichzeitig nimmt aber auch die Konzentration des NADPH ab. Da NADPH für die Regeneration des Radikalfängers Glutathion benötigt wird, wird die Zelle anfälliger für oxidativen Stress.

Intrazelluläre Fruktose und Glukose sind osmotische Substanzen und ein Konzentrationsanstieg bedeutet osmolaren Stress für die Zelle. Dieser führt zur Autophosphorylierung von Zelloberflächenproteinen, die eine Signalkaskade zur Aktivierung von mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) in Gang setzt (8,9).

### Aktivierung des Hexosamin-Stoffwechselweges

Vermeehrt anfallendes Fruktose-6-Phosphat wird durch eine Amidotransferase in Glukosamin-6-Phosphat und schließlich in Uridine-Diphosphat-N-Acetyl-Glukosamin (UDP-GlcNAc) umgewandelt. Dies führt über Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur vermehrten Bildung von endothelschädigenden Faktoren (7).

### Aktivierung der Proteinkinase C (PKC)

Die Aktivierung der PKC wird einerseits durch oxidativen Stress, andererseits durch steigende Konzentration von Diacylglycerol (DAG) bei Hyperglykämie ausgelöst. Die PKC bedingt unter anderem eine Aktivierung von MAPK, eine Ausschüttung von Vascular endothelial growth factor (VEGF) und durch Hemmung der endothelialen Stickstoffmonoxyd Synthetase (eNOS) eine reduzierte Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) (8,9).

### Vermehrte Bildung von advanced glycation endproducts (AGEs) und AGE-Rezeptoren (RAGEs)

AGEs und RAGEs entstehen sowohl intra- als auch extrazellulär durch eine nicht-enzymatische Glykierung von Proteinen. Diese Glykierung hat Auswirkungen auf die Struktur von Proteinen und beeinflusst Zellverknüpfungen und/oder die Zellkommunikation. Die nicht-enzymatische Glykierung von zirkulierenden Proteinen und deren Bindung an RAGEs kann zur Aktivierung von MAPK und zur Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen führen (6,8,9).

MAPK sind eine Gruppe von Serin/Threonin spezifischen Kinasen, die durch Aktivierung von Signalkaskaden die Zellproliferation, -differenzierung oder –apoptose direkt oder durch Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen und Wachstumsfaktoren indirekt beeinflussen (8,9). (Abb. 2).

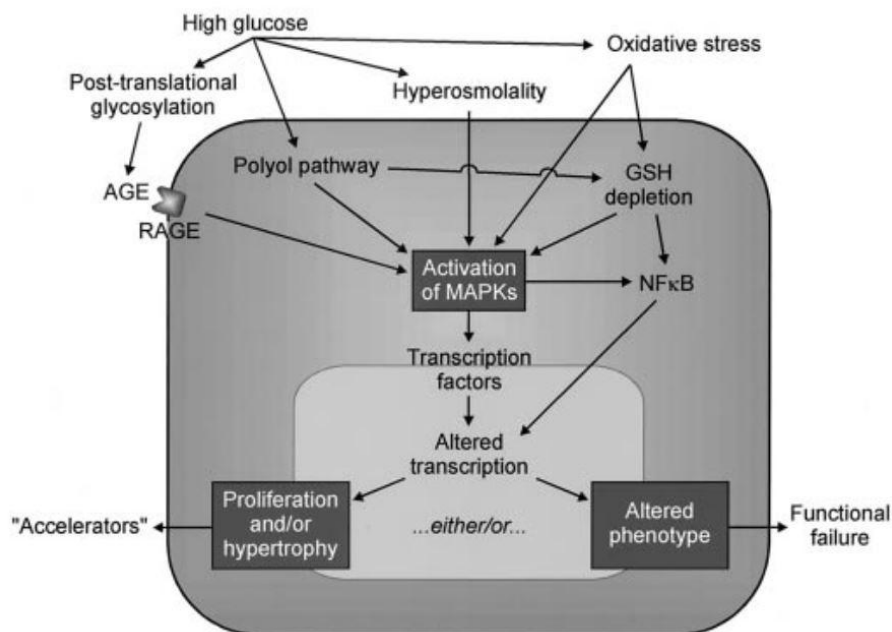


Abb. 2: Aktivierungswege der MAPK bei Hyperglykämie (modifiziert nach (8))

#### Makro- und Mikrovaskuläre Komplikationen:

Makrovaskuläre Komplikationen manifestieren sich in der Regel als kardiovaskuläre Ereignisse (2,10). Dem gegenüber sind Diabetische Retinopathie, Nephropathie und/oder Neuropathie (DPN) typische mikrovaskuläre Komplikationen (11,12).

Neben chronischer Hyperglykämie, Inflammation und endothelialer Dysfunktion tragen weitere Risikofaktoren wie Hypertonie, Nikotinabusus, Hypercholesterinämie, Dyslipidämie, und Übergewicht zur Entstehung von vaskulären Komplikationen bei (10).

Das Endothel reguliert den Gefäßtonus, die Gefäßpermeabilität, die Balance zwischen Koagulation und Fibrinolyse und das Ausmaß von Entzündungsreaktionen. Dazu interagieren die Endothelzellen mit glatten Muskelzellen der Gefäßwand, Thrombozyten, Leukozyten, Makrophagen, retinalen Zellen und mesangialen Zellen der Niere (10).

Wichtig für die Endothelfunktion ist unter anderem die Freisetzung von NO durch die eNOS. NO wirkt vasodilatatorisch, antiinflammatorisch, antiproliferativ, senkt die

Gefäßpermeabilität und die Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand und hemmt indirekt die Transkription von NF- $\kappa$ B (10).

Die vaskulären Komplikationen sind Folge der metabolischen Veränderungen mit sekundären Funktionseinschränkungen und strukturellen Veränderungen wie Membranverdickungen, Zellhypertrophie und –hyperplasie und daraus resultierender Lumenverkleinerung der Gefäße. Es resultieren Funktionsverluste und Ischämien (9–12).

Das Risiko für Folgeerkrankungen steigt mit der Erkrankungsdauer und der Höhe des HbA1c-Wertes (3,4,13).

Bei pädiatrischen T1DM-Patienten liegen zum Zeitpunkt der Diagnose in der Regel keine Begleiterkrankungen oder Folgeschäden vor (14). Wenn sich Folgeerkrankungen bereits im Jugend- oder jungen Erwachsenenalter manifestieren, sind diese primär auf die Grunderkrankung und weniger auf Assoziationen mit Lebensstil oder Alter zurückzuführen (4). Damit tragen Untersuchungen an einer pädiatrischen Patientengruppe dazu bei die pathophysiologischen Mechanismen und die Ätiologie der Folgeerkrankungen zu verstehen. Gleichzeitig ist die Früherkennung von Pathologien in den unterschiedlichen Altersgruppen relevant, um die Patienten bestmöglich zu betreuen.

## 1.2 Chronische Niereninsuffizienz

Eine chronische Niereninsuffizienz (CKD) liegt vor, wenn die Gesundheit betreffende Veränderungen der Nierenfunktion und/oder –struktur für mindestens drei Monate bestehen. Die Funktionseinschränkungen können sich durch eine verminderte Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)  $< 60\text{ml}/\text{min}/1,72\text{m}^2$ , Albuminurie, Veränderungen des Urinsediments oder der Elektrolytausscheidung manifestieren. Die Strukturveränderungen lassen sich durch Bildgebung oder histologische Untersuchungen nachweisen (15).

Die Ursachen für eine CKD sind sehr heterogen. Bei pädiatrischen Patienten stehen hereditäre Ursachen im Vordergrund, wohingegen die CKD bei Erwachsenen meist Folge von systemischen, teils Lebensstil-assoziierten Erkrankungen ist.

Abb. 3 gibt eine Übersicht über die Ursachen der CKD bei allen (A) und pädiatrischen (B) Dialysepatienten in Deutschland.

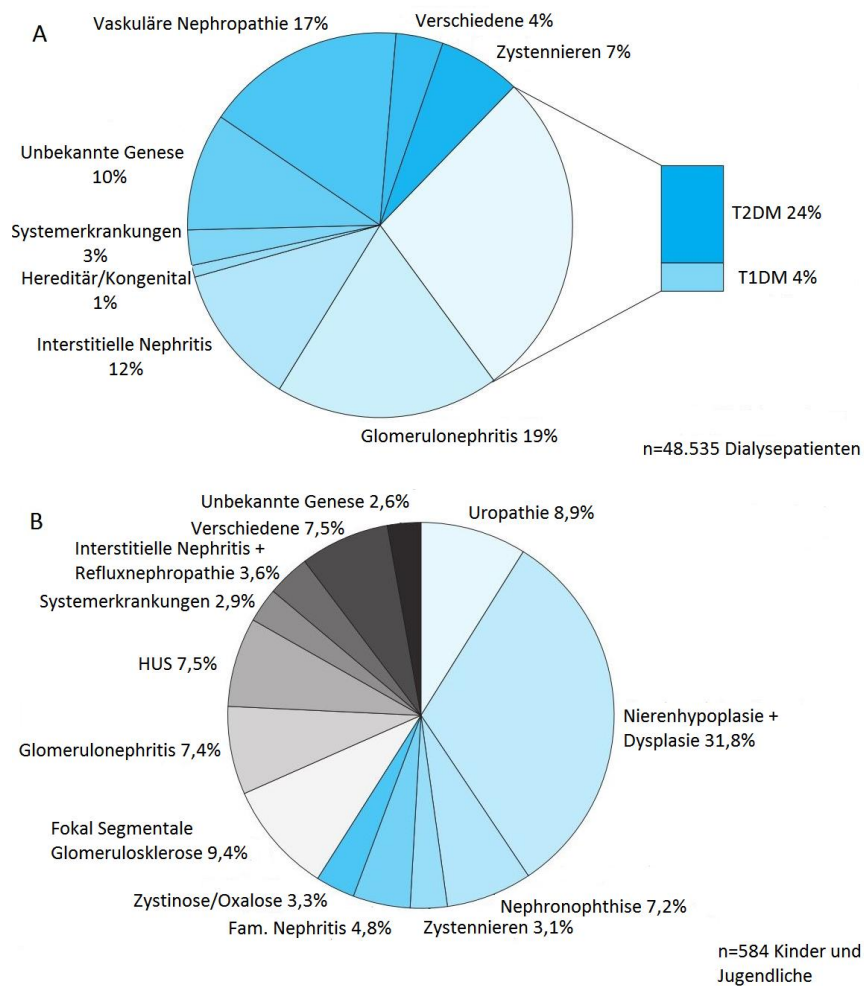


Abb. 3: Ursachen der CKD bei Dialysepatienten insgesamt (>99% erwachsene Patienten) (A) und pädiatrischen Dialysepatienten (B) (60)

Die CKD geht damit einher, dass

- der Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt,
- das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS),
- durch Erythropoetinmangel die Blutbildung und
- durch reduzierte renale Synthese des 1,25-Dihydroxycholecalciferol der Knochen- und Mineralstoffwechsel

gestört sind.

Durch Retention harnpflichtiger Substanzen und metabolische Veränderungen kommt es

- zu einem deutlich erhöhten Risiko für kardiovaskuläre-Ereignisse (Akutes Koronarsyndrom, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, Plötzlicher Herztod) und
- zu Schädigungen des Nervensystems mit Ausbildung von urämischer Enzephalopathie und urämischer Polyneuropathie (UPN) (2,16).

CKD-Patienten haben ein höheres Risiko an kardiovaskulären Ereignissen zu sterben als die terminale Niereninsuffizienz zu erreichen (17). Abb. 4 gibt eine Übersicht über die metabolischen Mechanismen, die bei CKD-Patienten zu einer gesteigerten kardiovaskulären Letalität führen (18).

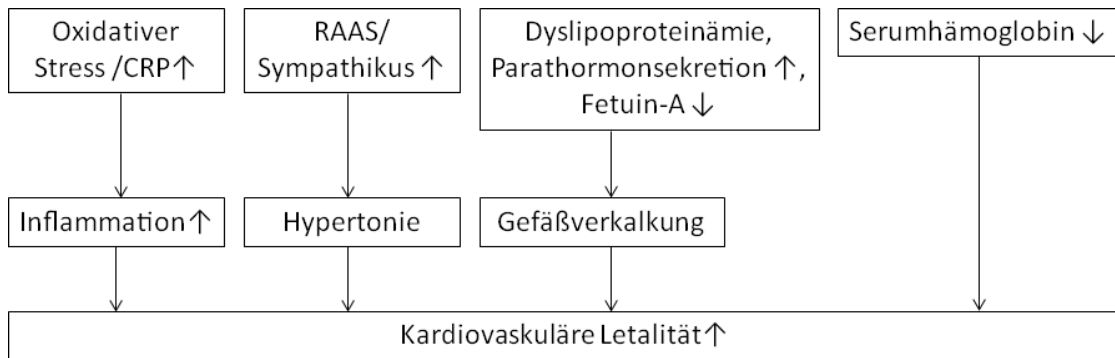


Abb. 4: Übersicht über Mechanismen, die bei CKD-Patienten die kardiovaskuläre Letalität erhöhen (CRP - C-reaktives Protein, RAAS – Renin-Angiotensin-Aldosteron-System)

Die CKD wird nach GFR und Albuminurie klassifiziert, wodurch das Risiko für ein Auftreten von Komplikationen und ein Krankheitsprogress abgeschätzt werden können (Abb. 5).

Im Verlauf der CKD kann eine Nierenersatztherapie notwendig werden. Die Indikation ist individuell abzuschätzen.

Als Richtlinien gelten (19):

- ein Absinken der GFR < 15 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>
- klinische Zeichen einer Urämie
- therapieresistente Hyperkaliämie, metabolische Azidose, Hypertonie
- Mangelernährung, Katabolismus
- Auftreten einer schweren Neuropathie
- Auftreten eines kardiorenenalen Syndroms mit therapieresistenter Überwässerung

Die Prävalenz der CKD liegt in Deutschland bei etwa 11%, was 6,7 Millionen Menschen entspricht.

Ca. 61.000 der CKD-Patienten sind dialysepflichtig und ca. 21.000 befinden sich in der Nachsorgebehandlung nach einer Nierentransplantation (18).



Klassifikation der CKD nach GFR und Albuminurie				Albuminurie Beschreibung und Range		
				Normal bis leicht erhöht	Moderat erhöht	Stark erhöht
				< 30mg/g <3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	>300 mg/g >30 mg/mmol
GFR Kategorien (ml/min/1,73m <sup>2</sup> ) Beschreibung und Range	G1	Normal oder erhöht	≥ 90	1	1	2
	G2	Mild herabgesetzt	60-89	1	1	2
	G3a	Mild bis moderat herabgesetzt	45-59	1	2	3
	G3b	Moderat bis stark herabgesetzt	30-44	2	3	3
	G4	Stark herabgesetzt	15-29	3	3	4+
	G5	Terminales Nierenversagen	<15	4+	4+	4+

*Abb. 5: Klassifizierung der CKD nach GFR (G1-5) und Albuminurie (A1-3) zur Risikoabschätzung einer Krankheitsverschlechterung/ dem Auftreten von Komplikationen und Angabe jährlich empfohlener Kontrollen: grün – geringes Risiko, jährliche Kontrollen; gelb – moderates Risiko, mindestens jährliche Kontrollen; orange – hohes Risiko, Kontrollen halbjährlich; hellrot – sehr hohes Risiko, Kontrollen 3x jährlich; dunkelrot – sehr hohes Risiko, Kontrollen mindestens 4x jährlich (61)*

Sowohl ein Diabetes mellitus als auch eine chronische Nierenerkrankung führen zu Schädigungen des Nervensystems mit Ausbildung von Polyneuropathien. Bei erwachsenen Patienten sind die Ursachen der Folgeerkrankungen nicht eindeutig zu identifizieren, da auch Alters- und/oder Lebensstil-assoziierte Faktoren eine Rolle bei der Krankheitsentwicklung spielen. Letzteres ist bei Kindern und Jugendlichen in der Regel nicht relevant. Untersuchungen dieser Patientengruppe können dazu beitragen Pathomechanismen von Folgeerkrankungen zu verstehen. Gleichzeitig ist gerade bei dieser jungen Patientengruppe eine Sekundärprävention besonders wichtig, um möglichst lange eine gute Lebensqualität zu erhalten.

### 1.3 Polyneuropathie als Folgeerkrankung von T1DM und CKD

Sowohl die periphere diabetische Polyneuropathie (DNP) als auch die urämische Polyneuropathie (UPN) sind symmetrische, distal betonte Polyneuropathien mit Schädigung von sensiblen und motorischen Nervenfasern. Nach Erlanger und Gasser werden die Nervenfasern nach ihrer Dicke klassifiziert (Tab. 1). Die dünn- und unmyelinisierten A $\delta$ - und c-Fasern werden bei DPN und UPN als erstes geschädigt. Im Verlauf treten auch Schäden an den dicken, myelinisierten A $\alpha$ - $\gamma$  Fasern auf (13,20). Bei beiden Polyneuropathien kommt es zu einem Axonverlust nach dem „dying back“ Muster (die Schädigung beginnt distal und setzt sich proximal fort) (13,21,22).

Tab. 1: Klassifizierung der Nervenfasern nach Erlanger und Gasser (23)

Einteilung	Nervenfaserdurchmesser [ $\mu\text{m}$ ]	Nervenleitgeschwindigkeit [m/s]	Vorkommen
A $\alpha$	10-20	60-120	Efferenzen zur Skelettmuskulatur Afferenzen aus Muskelspindeln
A $\beta$	6-12	30-70	Afferenzen aus der Haut für Berührung und Druck
A $\gamma$	4-8	15-30	Efferenzen zu Muskelspindeln
A $\delta$	3-5	12-30	Afferenzen aus der Haut für Temperatur und Schmerz
B	1-3	3-15	Präganglionäre sympathische Nervenfasern
C	0,3-1	0,5-2	Postganglionäre sympathische Nervenfasern Afferenzen aus der Haut für Schmerz

Der Pathomechanismus der Nervenschädigung ist multifaktoriell und nicht endgültig geklärt.

Die DPN wird durch ein Zusammenspiel von metabolischen Prozessen bei chronischer Hyperglykämie und Ischämie durch endotheliale Dysfunktion ausgelöst. Eine Übersicht über die neuronalen Schädigungsmechanismen bei Diabetes mellitus gibt Abb. 6.

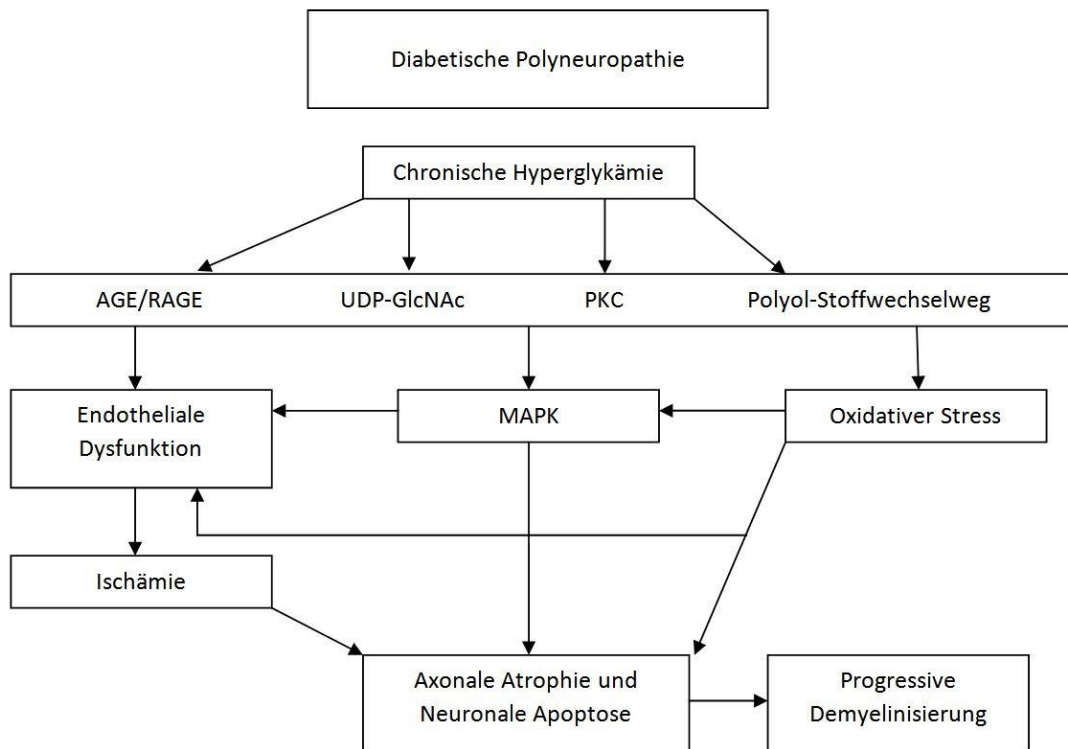


Abb. 6: Übersicht über die Mechanismen neuronaler Schädigungen bei chronischer Hyperglykämie, AGE/RAGE - advanced glycation endproducts und receptor of advanced glycation endproducts; UDP-GlcNAc - Uridine-Diphosphat-N-Acetyl-Glukosamin; PKC - Proteinkinase C; MAPK - mitogen aktivierte Proteinkinase

Bei der DPN treten Missempfindungen in Form von Taubheitsgefühl, sensiblen Reizerscheinungen, Krämpfen und/oder dauerhaften Schmerzen auf. Die Symptome beginnen in der Regel distal und breiten sich an den unteren Extremitäten strumpf- bzw. an der oberen Extremität handschuhförmig nach proximal aus.

Das Risiko für Fußulzerationen ist groß und dadurch bedingte Amputationen sind häufig. Das Auftreten einer DPN ist bei T1DM-Patienten stark mit der Erkrankungsdauer und dem HbA1c assoziiert (11,24).

Das Auftreten von Diabetischer Nephropathie, Diabetischer Retinopathie und vaskulären Folgeerscheinungen ist bei Diabetikern mit DPN signifikant erhöht (13,24,25).

Die Therapie der DPN besteht aus optimierter Diabeteseinstellung, Reduzierung der Risikofaktoren (essentielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Adipositas, Nikotin- und Alkoholabusus) und medikamentöser Schmerzlinderung (13).

Der Progress der DPN ist schwer aufzuhalten. Daher ist eine Früherkennung besonders wichtig.

Im Schnitt entwickeln 30% der Diabetiker eine DPN (13). Diese Werte schwanken je nach untersuchter Patientengruppe und untersuchendem Zentrum (8-54%) (13,24,25).

Im Gegensatz zur DPN sind die Mechanismen, die der UPN zugrunde liegen, weniger geklärt.

Als Ursachen werden ein Vitamin B1-Mangel, eine Hemmung von Natrium-Kalium-ATPasen und/oder eine dauerhafte Hyperkaliämie diskutiert.

Die mit CKD häufig einhergehende und schon in frühen Stadien auftretende Malnutrition kann zu einem Vitamin B1-Mangel führen. Da Vitamin B1 ein wichtiges Coenzym des Glukosestoffwechsels ist, sind im Besonderen Zellen und Organe mit hohem Glukoseumsatz, wie z.B. Nerven, das kardiovaskulären System und der Gastrointestinaltrakt, betroffen (1,21,26).

Des Weiteren führt die Akkumulation dialysepflichtiger Substanzen zur Hemmung von Natrium-Kalium-ATPasen in neuronalen Zellmembranen. Dadurch veränderte Ruhemembranpotentiale können Nervenschädigungen und durch eine reduzierte Fortleitung von Aktionspotentialen eine Abnahme der Nervenleitgeschwindigkeit verursachen. Als akkumulierende Substanz wird Parathormon diskutiert (21,26).

Eine dauerhafte Hyperkaliämie (vor allem zwischen den Dialysesitzungen) kann durch dauerhafte Depolarisation der Zellen kalziumgetriggerte Signalkaskaden in Gang setzen, welche zu Nervenschädigungen führen (21,26).

Sicherlich spielen wie bei der DPN, auch vaskuläre Veränderungen und oxidativer Stress durch metabolische Veränderungen eine Rolle in der Pathogenese.

Bei der UPN sind die meisten Patienten von milden bis moderaten Missempfindungen, einem Restlesslegs- oder Burning-Feet-Syndrom betroffen. Eine starke Schmerzhaftigkeit tritt eher selten auf. Muskelkrämpfe und -atrophien sind häufig.

Die Ursache dafür kann neben der UPN auch eine Urämie sein (21). Bei CKD-Patienten tritt eine UPN häufig im CKD-Stadium V auf (20,21).

Die Angaben über die Prävalenz gehen in der Literatur mit 10-100% stark auseinander (20,21). Dies kann an unterschiedlichen Diagnostikkriterien und Patientengruppen liegen. So liegt bei fast allen Patienten im CKD-Stadium V eine Abnahme der Nervenleitgeschwindigkeit vor, aber nur bei ca. 10% eine symptomatische UPN (21). Laaksonen et al. konnten dagegen bei über 80 % der Patienten im CKD-Stadium V eine symptomatische Polyneuropathie nachweisen (27).

Bei Verbesserung der Nierenfunktion oder nach Nierentransplantation können die Nerven regenerieren, sodass nach einiger Zeit (Monate bis Jahre) eine normwertige Nervenleitgeschwindigkeit messbar sein kann (21,27).

### 1.3.1 Diagnostik der Polyneuropathie

Die Diagnostik von DPN und UPN umfasst folgende Untersuchungen:

- Anamnese und Inspektion
- kurze Fragebögen wie den Neuropathie Symptom Score (NSS) und den Neuropathie Defizit Score (NDS) (Abb. 7)
- Quantitative Sensitivitätstestung (QST) mit Tests für Temperatur-, Vibrations-, Schmerz- und Berührungsempfinden
- Elektroneurographie (ENG), aktueller Goldstandard (Abb. 8)

Durch diese Untersuchungen kann eine DNP und UPN im symptomatischen Stadium gut diagnostiziert werden. Häufig liegen allerdings schon Nervenschäden vor dem Auftreten von Symptomen vor.

Toopchizadeh et al. konnten zeigen, dass bei Kindern und Jugendlichen mit einem T1DM bei einer Erkrankungsdauer von mindestens 5 Jahren bereits bei über 50% eine subklinische Polyneuropathie vorlag (28).

Bei Kindern und Jugendlichen mit einer terminalen Niereninsuffizienz ist fast immer eine Reduktion der Nervenleitgeschwindigkeit, aber selten eine symptomatische UPN nachweisbar (29,30). Der Verlust der Nervenleitgeschwindigkeit ist sowohl in den oberen als auch den unteren Extremitäten proximal und distal nachweisbar (21,27)

A

Symptomatik Fuß/ Unterschenkel*			
	ja	nein	
Brennen	2	0	
Taubheitsgefühl	2	0	
Parästhesien	2	0	Punkte: 0-2
Schwächegefühl	1	0	
Krämpfe	1	0	
Schmerzen	1	0	Punkte: 0-1
Lokalisation			
Füße	2		
Unterschenkel	1		
woanders	0		Punkte: 0-2
Exazerbation			
Nachts vorhanden	2		
Am Tag und nachts vorh.	1		
Nur am Tag vorh.	0		
Pat. wird durch Symptome geweckt	Score von 1 addieren		Punkte: 0-3
Besserung der Symptome beim			
Gehen	2		
Stehen	1		
Sitzen oder Hinlegen	0		Punkte: 0-2
<b>Gesamtscore</b>			<b>Punkte: 0-10</b>

**NSS-Auswertung:**

- 3-4 = leichte Symptome
- 5-6 = mäßige Symptome
- 7-10 = schwere neuropathische Symptome

(\*in jeder Punktespalte kann die maximale Punktzahl nur einmal vergeben werden.)

B

		rechts	links
Achillessehnenreflex			
Reflexe	normal	0	0
	vermindert	1	1
	fehlend	2	2
Vibrationsempfindung			
Messung dorsal am Großzehengrundgelenk	normal	0	0
	vermindert/fehlend	1	1
Schmerzempfindung			
Messung am Fußrücken	normal	0	0
	vermindert/fehlend	1	1
Temperaturempfindung			
Messung am Fußrücken	normal	0	0
	vermindert/fehlend	1	1
<b>Gesamtscore</b>			

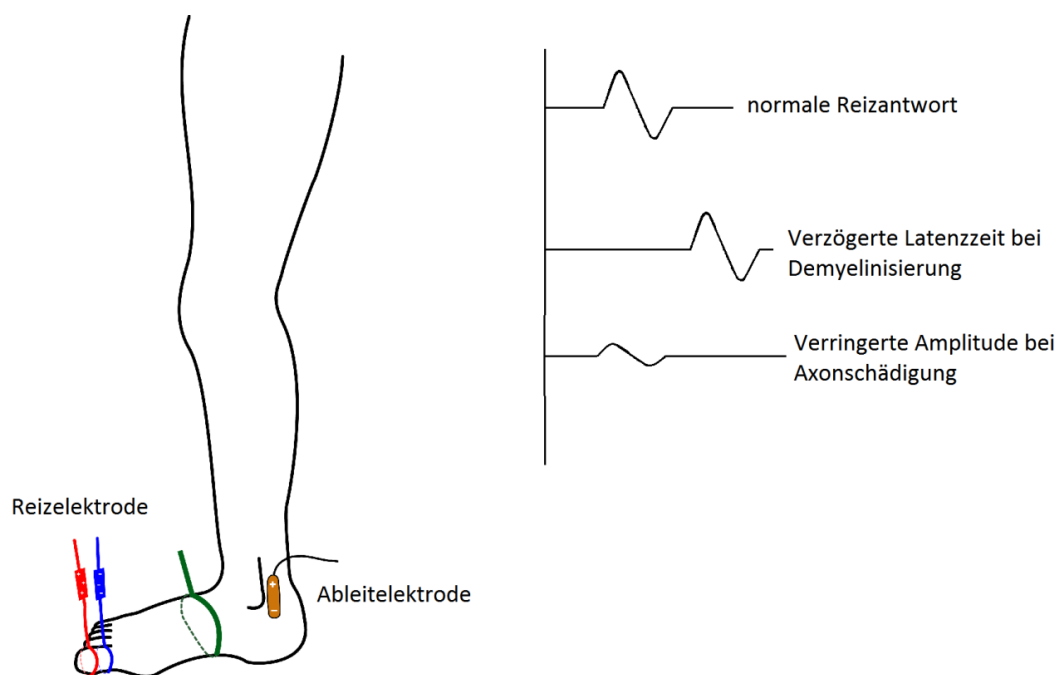
**NDS:**

- 3-5 = leichte neuropathische Defizite
- 6-8 = mäßige neuropathische Defizite
- 9-10 = schwere neuropathische Defizite

Abb. 7: NSS (A) und NDS (B) zur Diagnostik von DPN und UPN (modifiziert nach (13))

Die frühen Schäden an A $\delta$ - und c-Fasern können mit der QST festgestellt werden. Die QST ist aber, wie die Fragebögen, ein subjektives Messverfahren und somit stark von der Mitarbeit der Patienten abhängig.

Die ENG ist ein objektives Messverfahren und aktueller Goldstandard in der Polyneuropathie-Diagnostik. Mit der ENG werden myelinisierte motorische A $\alpha$ - und sensible A $\beta$ -Fasern untersucht (13). Über die Höhe der Amplitude kann ein Axonverlust und über die Latenzzeit eine Demyelinisierung diagnostiziert werden. Diese Grenzen können verschwimmen, da ein Ausfall dicker, myelinisierter Fasern auch zu einem deutlichen Verlust der Nervenleitgeschwindigkeit führen kann (22). Frühe Nervenschäden werden durch die ENG nicht erfasst (25).



*Abb. 8: Schematische Darstellung der ENG Messung von sensiblen Nervenfasern und der Reizantworten von gesunden oder geschädigten Nerven*

Mit einer Hautbiopsie kann histologisch eine Nervenschädigung im frühen Stadium diagnostiziert werden. Aufgrund der Invasivität und den dadurch entstehenden Risiken wird diese Diagnostikmethode nicht empfohlen (13).

Sowohl für DPN als auch für UPN gibt es der Zeit kein etabliertes nichtinvasives Messverfahren, mit dem frühe Schäden an dünn- und unmyelinisierten Nervenfasern erfasst werden können.

Die Darstellung des Subbasalen Nervenplexus der Kornea (SNP) mit Konfokaler-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) könnte dafür eine Lösung sein.

## 1.4 Der subbasale Nervenplexus der Kornea

Der SNP ist Teil des sensiblen peripheren Nervensystems. Seine Nervenfasern entspringen dem ersten Trigeminusast und bestehen aus myelinisierten A $\delta$ -Fasern (3-5  $\mu$ m Durchmesser) und unmyelinisierten C-Fasern (0,3-1 $\mu$ m Durchmesser), also den Nervenfasern, die bei der DPN und UPN als erstes geschädigt werden (13).

Die Nervenfasern, die die Kornea innervieren, verlaufen mit dem N. ophthalmicus, dann dem N. nasociliaris und treten über die Nn. ciliares longi über die Sklera in die Kornea ein (31). Dort ziehen sie durch das korneale Stroma, durchbrechen die Bowman-Membran und bilden parallel zu dieser und unter den basalen Epithelzellen den subbasalen Nervenplexus. Von dort zweigen sich die Nerven weiter auf und enden zwischen den Epithelzellen (Abb. 9) (32,33).

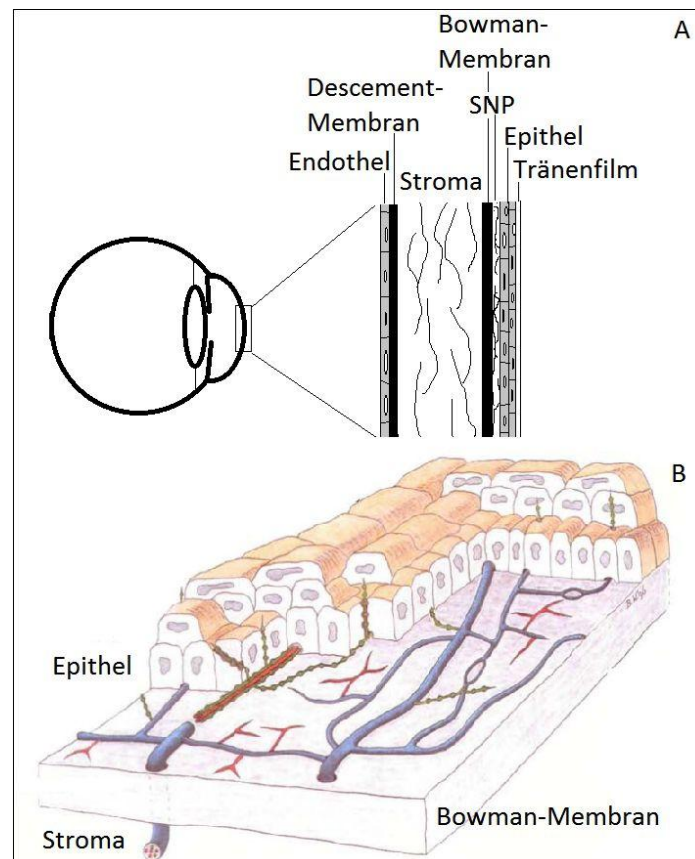


Abb. 9: Schematische Darstellung der Kornea (A) und des SNP (B) mit unmyelinisierten Nervenfaserbündeln, die aus dem Stroma kommend die Bowman-Membran durchbrechen (blau), daraus entspringen Fasern, die im SNP verbleiben (rot) und Fasern, die zwischen die Epithelzellen ziehen (grün) (modifiziert nach Müller et al. (33))



## 1.5 Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie

Die CLSM im Allgemeinen ist ein nicht-invasives laseroptisches Verfahren, bei dem ein fokussierter Laserstrahl ein Präparat sequentiell abrastert. In der Medizin und der Biotechnologie werden in der Regel fluoreszierende Farbstoffe zur Markierung der zu untersuchenden Gewebetypen oder zellulären Strukturen verwendet.

Auch zur Darstellung von morphologischen Strukturen der Kornea kann die konfokale Mikroskopie genutzt werden. Da die Untersuchung *in vivo* erfolgt und die Kornea durchsichtig ist, können Zellstrukturen jedoch nicht durch Farbstoffe markiert werden. Statt dessen wird die Autofluoreszenz oder Streulicht für die Darstellung genutzt.

### 1.5.1 Funktionsweise und Entwicklung der Konfokalen-Laser-Scanning-Mikroskopie

Durch das konfokale Prinzip können dezidierte Gewebeschichten ohne Überlagerungen durch darunter und darüber liegende Schichten abgebildet werden. Ein Laserstrahl wird durch ein Objektiv auf einen Objektpunkt in einer bestimmten Schärfenebene projiziert. Das reflektierte Licht fällt durch das Objektiv auf eine Zwischenbildebene. In dieser Zwischenbildebene ist eine Lochblende angeordnet, durch die nur die reflektierten Strahlen der konfokalen Schicht auf einen Detektor fallen. Reflektierte Strahlen mit anderen Fokusebenen werden in der Zwischenbildebene ausgeschlossen (34).

Das erste konfokale Mikroskop wurde 1955 von Marvin Minsky entwickelt, der damit Hirngewebe untersuchte (34). Dieses Mikroskop konnte Bildpunkte in einem Objekt mit einem Abstand von unter 1  $\mu\text{m}$  darstellen. Der gewünschte Bildausschnitt musste manuell durch Bewegung des Objektes Punkt für Punkt abgefahren werden und das Bild ließ sich nicht aufzeichnen.

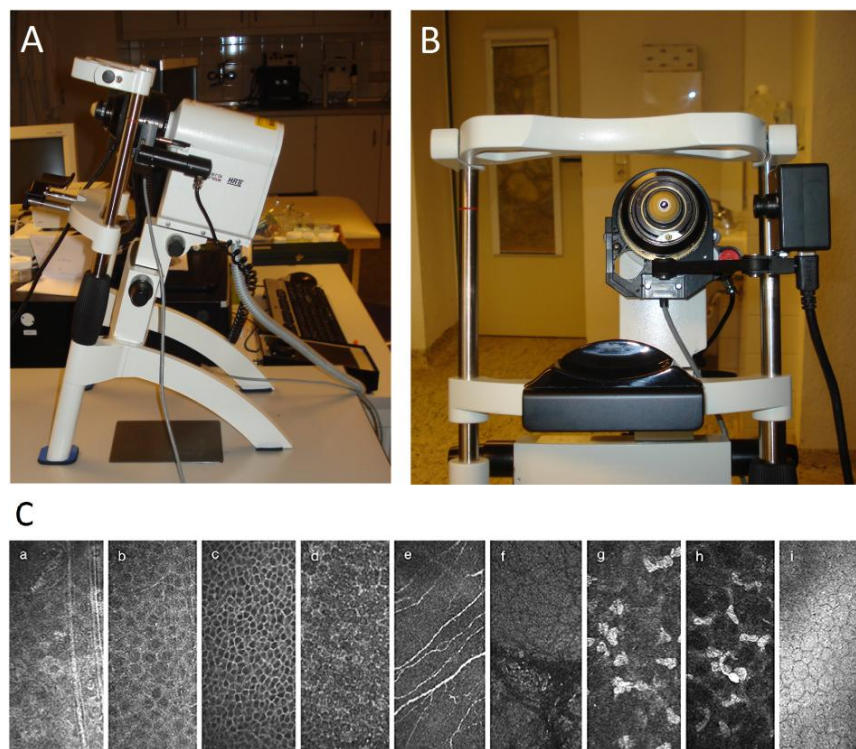
In den folgenden Jahren wurde dieses Prinzip immer wieder aufgegriffen. So entwickelte die Arbeitsgruppe um Petráň und Egger in den 1960er Jahren ein konfokales Mikroskop, das durch eine runde Scheibe (Nipkow-Scheibe) mit mehreren Strahlengängen gleichzeitig arbeitete und zur gleichen Zeit mehrere Punkte eines Bildausschnitts abbildete. Durch Rotation der Scheibe konnte der gesamte Bildausschnitt schneller abgebildet werden (35). In den späten 1960 Jahren wurde das erste Punkt-Scanner-Mikroskop mit einem Laser als Lichtquelle und einem Photomultiplier zur Bildaufzeichnung verwendet (36). In den frühen 1980er Jahren

koppelte die Arbeitsgruppe um Sheppard ein konfokales Mikroskop an einen Mikrocomputer und verbesserte damit die Bildaufnahme und Bildbearbeitung (37). 1986 entwickelten Amos und White eine Möglichkeit den Fokus in der Z-Ebene zu bewegen, indem sie in einem Konfokalen Mikroskop bewegliche Scan-Spiegel installierten (38).

Masters et al. gelang 1994 die erste in vivo Untersuchung der Kornea mit einem konfokalen Spalt-Scanning-Mikroskop (39).

2002 wurde an der Universität Rostock der Heidelberg-Retina-Tomograph (HRT), der zur Vermessung der Retina und des Sehnervenkopfes in der Glaukomdiagnostik entwickelt wurde (40), erstmals mit dem Rostock Kornea Module (RCM) gekoppelt. Dadurch konnten mit dem HRT auch Strukturen des vorderen Augenabschnittes sichtbar gemacht werden. Durch die Technik im RCM war eine schnelle Bewegung des Fokuspunktes sowohl in der X-Y-Ebene als auch in der Z-Ebene möglich. Die Untersuchungsdauer konnte durch eine dezidierte Computersteuerung des RCM wesentlich verkürzt werden (41).

Abb. 10 zeigt das in dieser Studie verwendete HRT II/RCM und Aufnahmen der unterschiedlichen kornealen Schichten.



*Abb. 10: Abbildung des in dieser Studie verwendeten HRT II / RCM in Seitenansicht (A) und Frontalansicht (B) und die damit aufgenommenen Bilder der kornealen Schichten (C) (a) Superfizialzellen, (b) Obere Flügelzellen, (c) untere Flügelzellen, (d) Basalzellen, (e) SNP, (f) Bowman-Membran, (g) anteriores Stroma, (h) posteriores Stroma, (i) Endothel, (modifiziert nach(62))*

## 2. Ziel der Arbeit

T1DM und CKD sind häufige Erkrankungen, die Auswirkungen auf den gesamten Organismus haben.

Bei beiden Erkrankungen ist die Polyneuropathie eine häufige und schwer therapierbare Folgeerkrankung.

Der SNP ist Teil des peripheren Nervensystems und wird aus A $\delta$ - und C-Fasern gebildet. Diese Fasern werden bei DPN und UPN als erstes geschädigt.

Mit dem in der Universitätsmedizin Rostock entwickelten Kornea Modul, gekoppelt mit einem Heidelberg-Retina-Tomograph, können die Nerven des SNP mit CLSM untersucht werden.

Bei erwachsenen Patienten liegen in der Regel viele Begleit- und Folgeerkrankungen vor, die zum Teil Alters- und Lebensstil-assoziiert sind. Dadurch ist eine direkte Zuordnung der Grunderkrankung als Ursache einer Polyneuropathie schwierig.

Bei Kindern und Jugendlichen liegen meist geringe bis keine Begleiterkrankungen vor, sodass Nervenschädigungen sehr viel wahrscheinlicher nur durch den T1DM/die CKD verursacht sind.

In einer klinisch experimentellen Querschnittstudie sollte geprüft werden, ob

- die Methode der CLSM gut bei Kindern und Jugendlichen anwendbar ist,
- es Abhängigkeiten der morphologischen Kenngrößen der Nerven von Alter, Geschlecht oder Körpergröße gibt,
- bei Kindern und Jugendlichen mit einem T1DM oder einer CKD im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe bereits Veränderungen des SNP nachweisbar sind, auch wenn keine polyneuropathischen Symptome vorhanden sind,
- diese Veränderungen mit krankheitsspezifischen Werten assoziiert sind und
- sich die CLSM als Methode zur Frühdiagnostik eignet.

### 3. Material und Methoden

Das Protokoll der klinisch experimentellen Querschnittstudie wurde der Ethikkommission der Universität Rostock vorgelegt und mit deren Zustimmung (Votumnummer A-2012-0103) nach den Kriterien der Deklaration von Helsinki in der Version von 2000 durchgeführt.

Folgende Ein- und Ausschlusskriterien wurden festgelegt:

Einschlusskriterien:

- Alter unter 18 Jahren
- Patienten (Diabetes mellitus Typ I oder Chronische Nierenerkrankung) und gesunde Kontrollen

Ausschlusskriterien für alle Teilnehmenden:

- Tumorerkrankungen in den letzten fünf Jahren
- Akute oder chronische Infektionen
- Epilepsien oder andere neurologische Erkrankungen
- ophthalmologische Erkrankungen und/oder ophthalmologische Operationen innerhalb der letzten fünf Jahre

Es wurden T1DM-Patienten der endokrinologischen Ambulanz der Kinder- und Jugendklinik und CKD-Patienten des KfH-Nierenzentrums der Universitätsmedizin Rostock (UMR) und Schüler der Jahrgänge 5 bis 12 des Christopherus Gymnasiums Rostock informiert und zur freiwilligen Teilnahme an der Studie eingeladen.

Von allen Teilnehmenden liegt eine schriftliche Einverständniserklärung vor.

Von allen Teilnehmenden wurden

- Alter,
- Körpergröße (mit einem Stadiometer), Gewicht und BMI und
- Blutdruck (nach Riva Rocci)

bestimmt. Ausgehend von den absoluten Werten wurden nach Kromeyer-Hauschild et al. (42) die Z-Scores für Körpergröße, Gewicht und BMI und nach der NHLBI Arbeitsgruppe (43) die Z-Scores für den Blutdruck ermittelt.

Von den Patienten wurde zusätzlich

- die Erkrankungsdauer,
- der zur Untersuchung aktuelle Kreatinin-Wert in  $\mu\text{mol/l}$ ,
- die zur Untersuchung aktuelle GFR nach Schwartz in  $[\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2]$ ,
- die Therapieform,
- das Vorliegen polyneuropathischer Symptome,
- bei T1DM-Patienten
  - der zur Untersuchung aktuelle HbA1c-Wert und
  - der durchschnittliche HbA1c-Wert der 12 Monate vor der Untersuchung

erfasst.

### 3.1 Datenerhebung und -verarbeitung

Die Datenerhebung und Datenverarbeitung erfolgte in enger Zusammenarbeit der Kinder- und Jugendklinik und der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der UMR, dem Institut für angewandte Informatik in Karlsruhe und dem Translationszentrum für Regenerative Medizin Leipzig (Abb. 11).

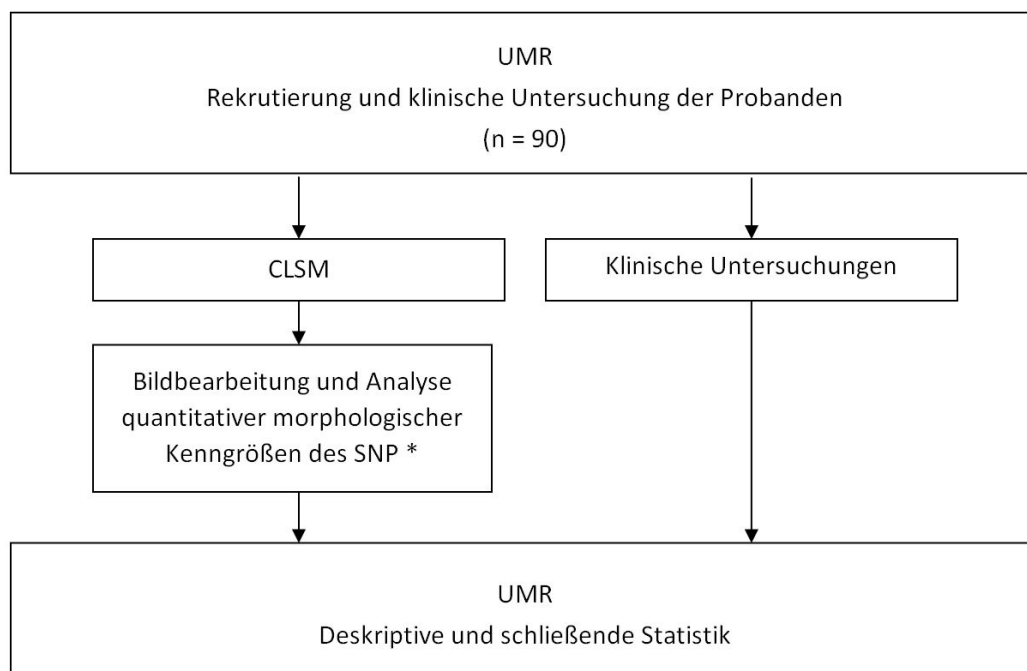


Abb. 11: Schematische Darstellung der Datenerhebung und -verarbeitung

\* Die Bildbearbeitung erfolgte durch Dr. B. Köhler, Institut für Angewandte Informatik, Karlsruhe und die Bildanalyse durch Dr. K. Winter, Translationszentrum für Regenerative Medizin, Leipzig

## 3.2 Studienspezifische ophthalmologische Untersuchungen

### 3.2.1 Erhebung des ophthalmologischen Status

Bei T1DM- und CKD-Patienten wurde ein ophthalmologischer Status erhoben. Dieser beinhaltete die ophthalmologische Anamnese, die Visusbestimmung mit Schrifttafeln, die Messung des Augeninnendrucks mit der Non-Contact-Tonometrie, die Spaltlampenuntersuchung des vorderen Augenabschnittes und nach medikamentöser Mydriasis des Fundus.

Bei der Kontrollgruppe erfolgte aus Zeitgründen neben den studienspezifischen Untersuchungen ausschließlich die ophthalmologische Anamnese.

### 3.2.2 Messung der Kornealen Sensitivität

Bei allen Teilnehmenden wurde die korneale Sensitivität mit dem Cochet-Bonnet-Ästhesiometer bestimmt. Dabei wird mit der Spitze eines 60mm langen Nylonfilaments mit einem Durchmesser von 0,12mm die Kornea in allen vier Quadranten (superior, temporal, inferior, nasal) getestet (Abb. 12). Erfolgt keine Reaktion auf die Berührung, wird das Filament um 5mm verkürzt und damit steifer. Diese Abfolge wird solange wiederholt, bis eine Reaktion zu verzeichnen ist. Die Länge, bei der eine Reaktion erfolgt, wird dokumentiert.

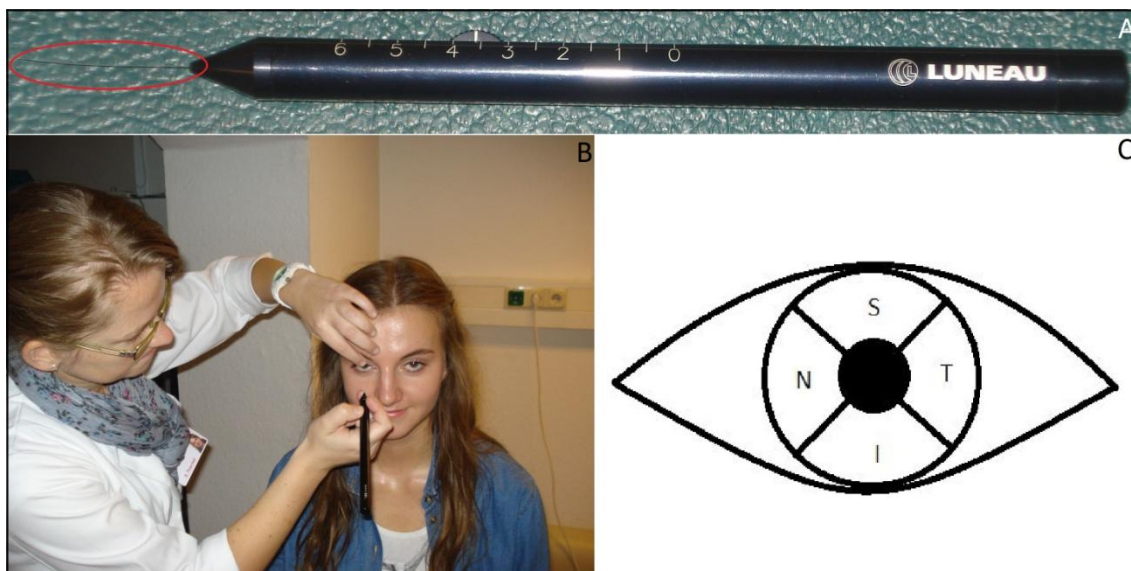


Abb. 12: Abbildung des in dieser Studie verwendeten Cochet-Bonnet-Ästhesiometers (A), Messung der kornealen Sensitivität bei einer Probandin mit dem Cochet-Bonnet-Ästhesiometer (B), schematische Darstellung der kornealen Quadranten (C)

### 3.2.3 Abbildung des subbasalen Nervenplexus mit Konfokaler-Laser-Scanning-Mikroskopie

#### 3.2.3.1 Bildaufnahme

In dieser Studie wurde ein Heidelberg-Retina-Tomograph II mit einem Rostock Cornea Module (HRT II/RCM) verwendet. Beides wurde von der Firma Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, hergestellt. Als Lichtquelle diente ein Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 670 nm und als Objektiv ein wasserbeständiges Kontaktobjektiv von Zeiss, (63x/0.95W, 670 nm; Zeiss, Jena/ Deutschland).

Die Aufnahmen mit CLSM erfolgten unilateral, vorzugsweise rechts. Vor der Untersuchung wurden beide Augen mit einem Lokalanästhetikum (Proparacain-POS® 0,5%; Ursapharm Arzneimittel GmbH, Saarbrücken) betäubt und ein Tränenersatzgel (Vidisc®; Bausch + Lomb, Berlin) in die Augen gegeben, um ein unwillkürliches Blinzeln zu vermeiden.

Auf das Objektiv des HRT II/RCM wurde vor jeder Untersuchung eine sterile und unmittelbar vor der Verwendung mit dem als Kontaktmittel zwischen Kornea und Objektiv dienenden sterilen Tränenersatzgel gefüllte Einwegkunststoffkappe gesetzt (TomoCap®; Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg).

Danach konnte die Untersuchung unter Kontakt des Mikroskops mit der Kornea durchgeführt werden. Um Augenbewegungen während der Untersuchung möglichst zu vermeiden, sollte der Proband während der Untersuchung mit dem linken Auge auf einen Lichtpunkt schauen bzw. einen Punkt im Raum fixieren.

Die Bildaufnahme erfolgte mit einem Oszillationsverfahren (OVS-Modus - oscillating volume scan), bei dem nacheinander mehrere Fokuserien aufgenommen wurden. Eine Fokuserie umfasste in der Regel 96 Einzelaufnahmen, die alternierend vom basalen Epithel durch den SNP und die Bowman-Membran bis in das anteriore korneale Stroma und wieder zurück aufgenommen wurden. Der Abstand der einzelnen Bilder betrug dabei ca. 0,5µm. Bei Bedarf wurden mit diesem System in einer Fokuserie bis zu 120 Einzelbilder aufgenommen und so die Gesamthöhe des abgebildeten Volumens von ca. 48µm auf ca. 60µm gesteigert. Ein Einzelbild umfasste 384 x 384 Pixel und hatte eine Gesamtgröße von 400 x 400 µm.

Es wurden in der Regel dreimal drei Fokuserien in direkt aneinander angrenzenden kornealen Arealen aufgenommen. Eine Untersuchung dauerte insgesamt ca. 15 Minuten.

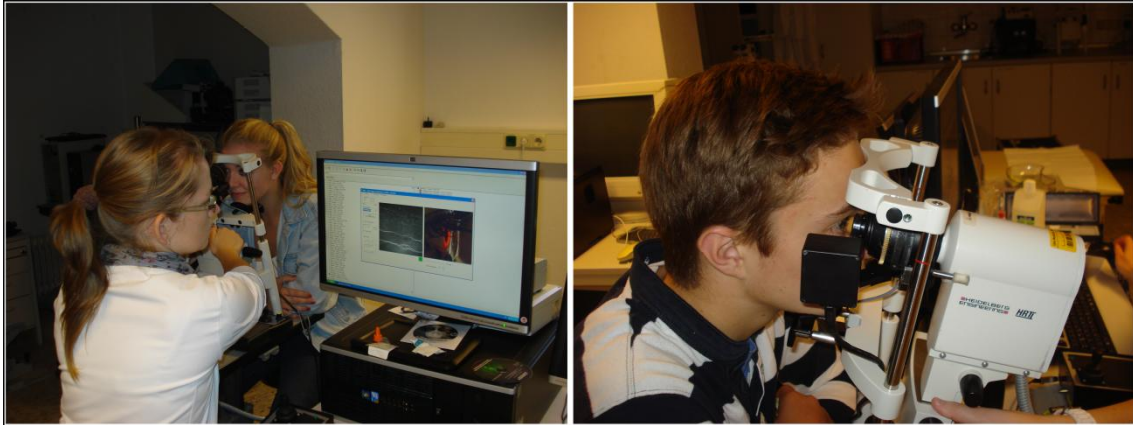


Abb. 13: CLSM Untersuchung des SNP bei zwei Studienprobanden

### 3.2.3.2 Bildzusammensetzung und -optimierung

Die Bildzusammensetzung und -optimierung wurde aufgrund ihrer Komplexität freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Dr. B. Köhler des Instituts für Angewandte Informatik, Karlsruher Institut für Technologie, übernommen.

Die Einzelbilder einer Fokuserie sind aufgrund von Augenbewegungen während der Untersuchung sowohl zueinander verschoben als auch ineinander verzerrt. Diese Augenbewegungen treten vermehrt bei schlechter Compliance, aber auch durch unwillkürliche Mikrosakkaden auf (Geschwindigkeit maximal  $120^\circ/s$ , maximale Auslenkung  $2^\circ$  (44)).

Ein Einzelbild wird aus vielen Bildpunkten zusammengesetzt. Das HRT II/RCM fährt den Bildausschnitt Bildzeile für Bildzeile ab und zeichnet so das Gesamtbild auf. Um einen Bildpunkt aufzuzeichnen, benötigt das HRT II/RCM  $<0,2 \mu s$ , für eine Bildzeile ca.  $65 \mu s$  und für ein Einzelbild ca.  $25 ms$  (45).

Während der Aufnahme eines Bildes kann durch unwillkürliche Augenbewegungen eine Verschiebung von ca.  $400 \mu m$  auftreten. Dabei kommt es bei nasal-temporalen Augenbewegungen zu einer horizontalen Scherung und bei inferior-superioren Augenbewegungen zu vertikalen Stauchungen bzw. Dehnungen.

Um die Bewegungsartefakte zu minimieren, wurden die Einzelaufnahmen einer Fokuserie in ein dreidimensionales Koordinatensystem transformiert. Auf definierter Höhe wurden die Einzelbilder in Teilbilder unterteilt und mit den korrespondierenden Teilbildern des vorherigen und nachfolgenden Einzelbildes abgeglichen. Durch die so detektierbaren Verzerrungen konnte der Bewegungsverlauf des Auges während der Bildaufnahme rekonstruiert und Korrekturvektoren für die einzelnen Bildzeilen direkt abgeleitet werden (45).



In dem rekonstruierten dreidimensionalen Bildstapel einer Fokuserie ist die Grenze zwischen dem kornealen Epithel und der Bowman-Membran, an der der SNP liegt, gut identifizierbar (Abb. 14).

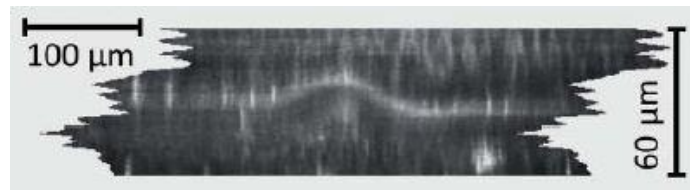


Abb. 14: Bildstapel einer Fokuserie von SNP-Aufnahmen mit CLSM, (entnommen aus (45))

Aus der 3D-Darstellung wurde eine 2D-Abbildung des SNP errechnet.

Da für jeden Probanden mehrere Fokuserien vorlagen, konnten die einzelnen 2D-Bilder durch überlappende Areale zu einem größeren Mosaikbild zusammengesetzt werden (Abb. 15). Dadurch wurde ein deutlich größerer Bereich des SNPs abgebildet, als der 400 μm x 400 μm messende Bildausschnitt des HRT II.

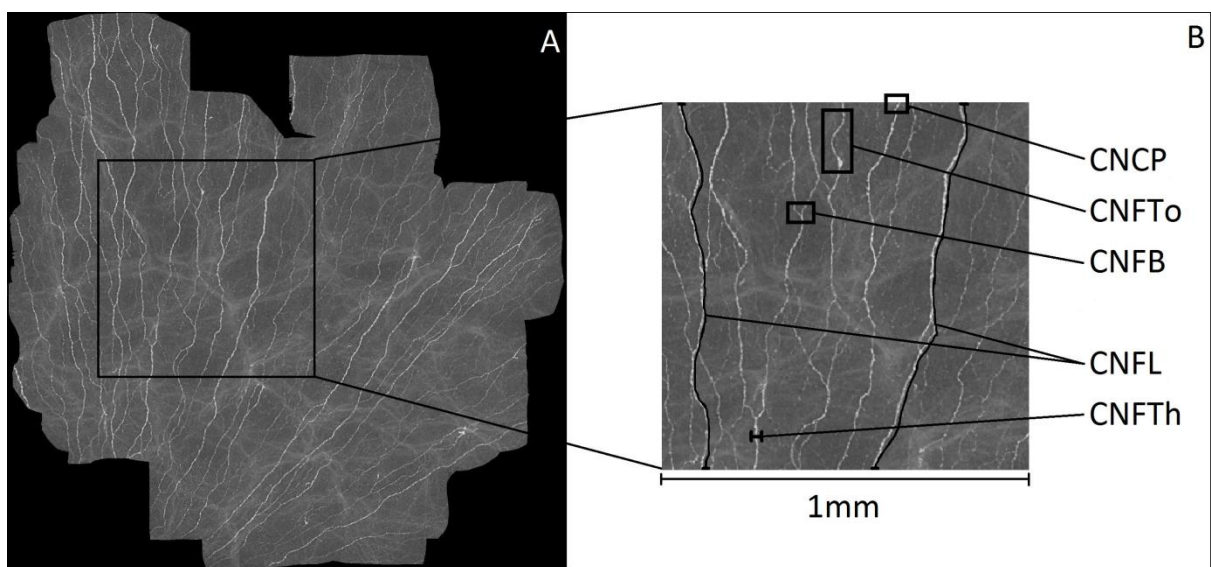


Abb. 15: Mosaikbild des SNP eines Probanden (A), Ausschnitt des Mosaikbildes mit Markierung der daraus errechneten kornealen Parameter (B) CNCP - nervale Berührungspunkte, CNFTo - nervale Tortuosität, CNFB - Nervenfaserverzweigungen, CNFL - Nervenfaserlänge, CNFTh - Nervenfaserdicke

### 3.2.3.3 Berechnung der morphologischen Daten

Aus den zusammengesetzten Mosaikbildern wurden die morphologischen Daten des SNP freundlicher Weise von Dr. K. Winter, Translationszentrum für Regenerative Medizin in Leipzig, berechnet (Abb. 15).

Zur weiteren Auswertung wurden folgende Parameter betrachtet:

- Nervenfasernlänge pro  $\text{mm}^2$  (CNFL)
  - addierte Nervenfasernlänge in  $\mu\text{m}$  pro  $\text{mm}^2$
- Nervenfasernichte pro  $\text{mm}^2$  (CNFD)
  - Anzahl der Nervenfasern pro  $\text{mm}^2$
- Nervenfaserverzweigungen pro  $\text{mm}^2$  (CNFB)
  - Anzahl der Verzweigungen der Nervenfasern pro  $\text{mm}^2$
- nervale Berührungspunkte pro  $\text{mm}^2$  (CNCP)
  - Anzahl der Punkte, an denen Nerven die Grenze eines  $\text{mm}^2$  kreuzen
- Nervenfaserndicke in  $\mu\text{m}$  (CNFTh)
  - Dicke der Nervenfasern in  $\mu\text{m}$
- Tortuosität (CNFTo)
  - Marker für die Gewundenheit der Nervenfasern

## 3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS, Version 21 (IBM SPSS Statistics, SPSS GmbH, Munich, Germany). Alle Daten wurden auf Normalverteilung getestet und sind mit Mittelwert  $\pm$  SD bzw. Median und Range angegeben. Für Gruppenvergleiche wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Bivariate Korrelationsanalysen erfolgten mit dem Spearman-Rho-Test. Werte  $p \leq 0,05$  wurden als signifikant definiert. Die graphischen Darstellungen wurden mit Sigmaplot, Version 10.0 (Systat Software GmbH) erstellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Studienpopulation

Die Teilnehmenden wurden entsprechend ihrer Grunderkrankung in drei Studiengruppen kategorisiert (Abb. 16).

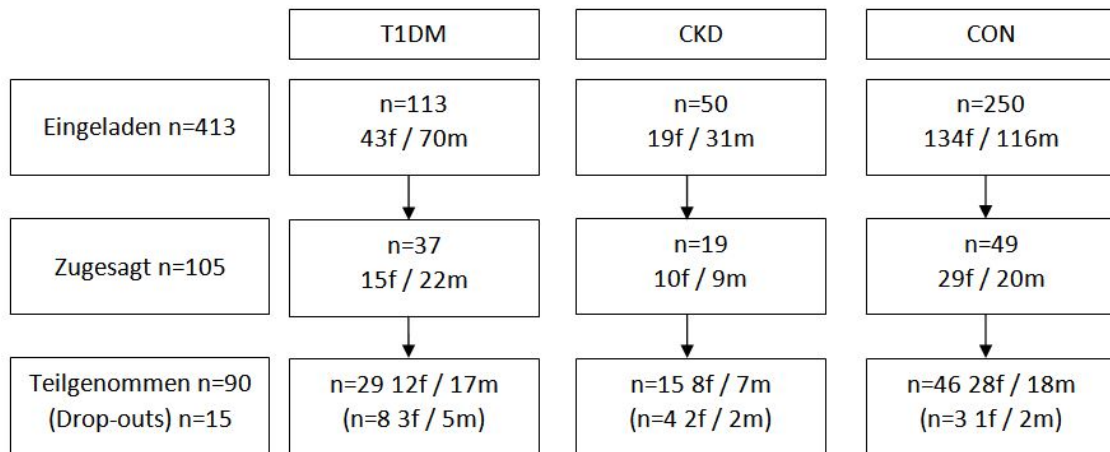


Abb. 16: Übersicht über die Studienpopulation, T1DM – T1DM-Patienten, CKD – CKD-Patienten, CON - Kontrollgruppe

Gründe für einen Abbruch der Studie trotz Zusage waren in 13 Fällen spontane Terminabsagen oder Verweigerung der Untersuchung und in zwei Fällen zu starke Augenbewegungen während der Untersuchung.

Die Grunderkrankungen der CKD-Patienten waren heterogen (Tab. 2).

Tab. 2: Ursachen der Niereninsuffizienz der CKD-Patienten

Grunderkrankung	Alter [Jahre]	Erkrankungsdauer [Monate]
Z.n. HUS bei EHEC-Infektion (n = 7)	14,5	80
Glomerulonephritis/IgA-Nephropathie (n = 5/1)	13,7	43
Nierendysplasie (n = 2)	14,2	130

Angabe des gemittelten Alters und der Erkrankungsdauer, HUS – Hämolytisch Urämisches Syndrom, EHEC – Enterohämorrhagische Escherichia coli

Die anthropometrischen und klinischen Daten der Studiengruppen sind in Tab. 3 zusammengefasst.

*Tab. 3: Anthropometrische und klinische Daten der Studiengruppen*

	<b>T1DM</b> n = 29	<b>CKD</b> n = 15	<b>CON</b> n = 46
Alter [Jahre]	14,3 ± 2,5	14,1 ± 2,3	14,8 ± 1,9
Größe [Z-Score]	-0,05 ± 0,79*	-0,17 ± 1,11 <sup>#</sup>	0,61 ± 1,18* <sup>#</sup>
Gewicht [Z-Score]	0,17 ± 0,93	0,33 ± 1,07	0,44 ± 1,01
BMI [Z-Score]	0,25 ± 0,91	0,44 ± 1,18	0,25 ± 0,86
RR syst. [Z-Score]	1,78 ± 1,24	1,35 ± 0,86	1,14 ± 1,12
RR diast. [Z-Score]	0,77 ± 0,71	0,86 ± 0,80	0,27 ± 0,85
Erkrankungsdauer [Monate]	64,2 ± 49,9	71,7 ± 53,5	
Mean-HbA1c-Wert [%] <sup>1</sup>	8,6 ± 1,5		
HbA1c-Wert [%]	8,7 ± 2,0		
GFR nach Schwartz [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	115,2 ± 32,6 <sup>§</sup>	91,5 ± 46,6 <sup>§</sup>	

*Angabe von Mittelwert ± SD der anthropometrischen und klinischen Daten*

<sup>1</sup> *Durchschnitt der HbA1c-Werte der letzten 12 Monate vor Studienteilnahme*

*\*,<sup>#</sup>,<sup>§</sup> p<0,05 bezogen auf den Vergleich zwischen Gruppen mit dem gleichen Symbol*

Nach Aktenlage wies keiner der Probanden zum Zeitpunkt der Studie polyneuropathische Symptome auf.

## 4.2 Studienspezifische ophthalmologische Untersuchungen der Patienten und Kontrollen

### 4.2.1 Ophthalmologischer Status und Test der kornealen Sensitivität

Alle Teilnehmenden hatten auf dem mit CLSM untersuchten Auge mit Korrektur einen Visus von mindestens 1,0. Der Augeninnendruck war bei allen Teilnehmenden normal und die Hornhaut regelrecht. Die Reaktion auf das Nylonfilament des Cochet-Bonnet-Ästhesiometers erfolgte bei allen in voller Länge.

Bei den Kontrollen lagen anamnestisch keine ophthalmologischen Auffälligkeiten vor.

Bei der Spaltlampenuntersuchung zeigten sich bei T1DM-Patienten weder im vorderen noch im hinteren Augenabschnitt diabetische Veränderungen.

Bei CKD-Patienten zeigte sich bei 10 Probanden ein altersentsprechender Befund ohne Hinweise auf Schäden. Bei zwei Probanden zeigte sich ein Fundus Hypertonikus Grad 1 bzw. eine Tortuositas der Gefäße an beiden Augen. Drei der CKD-Patienten lehnten die Untersuchung an der Spaltlampe ab.

## 4.2.2 Morphologie des subbasalen Nervenplexus

Der subbasale Nervenplexus konnte bei 90 Teilnehmenden mit der CLSM abgebildet werden. Typische Bilder für Vertreter der drei Gruppen sind in Abb. 17 dargestellt. Eine Übersicht über die morphologischen Parameter des SNP gibt Tab. 4.

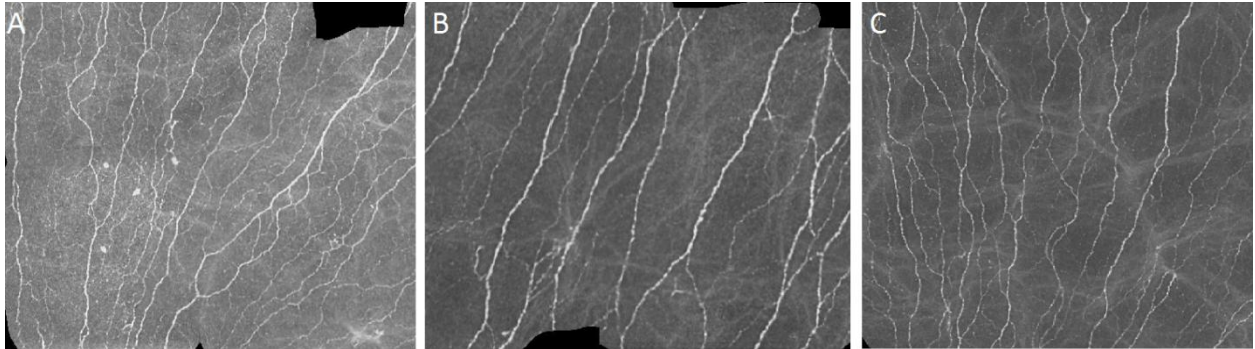


Abb. 17: Exemplarische SNP-Bilder der Studiengruppen: T1DM (A), CKD (B) und CON (C)

Tab. 4: Übersicht über die kornealen Parameter der Studiengruppen T1DM, CKD, CON

Korneale Parameter	T1DM	CKD	CON
CNFL [ $\mu\text{m}$ ]	18,70 (8,83 – 30,45)	21,78 (11,12 – 38,46)	22,34 (9,87 – 34,03)
CNFD pro $1\text{mm}^2$	250,09 (83,97 – 503,30)	285,85 (139,62 – 903,72)	252,08 (125,51 – 640,98)
CNFB pro $1\text{mm}^2$	134,87 (27,93 – 302,29)	160,21 (63,69 – 570,69)	123,44 (52,45 – 396,77)
CNCP pro $1\text{mm}^2$	73,50 (10,57 – 159,01)	63,14 (35,51 – 136,27)	77,31 (22,63 – 152,78)
CNFT <sub>h</sub> [ $\mu\text{m}$ ]	2,19 (2,14 – 2,30)	2,21 (2,16 – 2,44)	2,21 (2,15 – 2,33)
CNFT <sub>o</sub>	0,084 (0,076 – 0,094)	0,084 (0,075 – 0,091)	0,081 (0,071 – 0,090)

Werte in Median und Range angegeben

#### 4.2.2.1 Morphologie der Nerven bei gesunden Kontrollen

Bei gesunden Kontrollen waren die kornealen Parameter weder geschlechts- noch altersabhängig (Abb. 18).

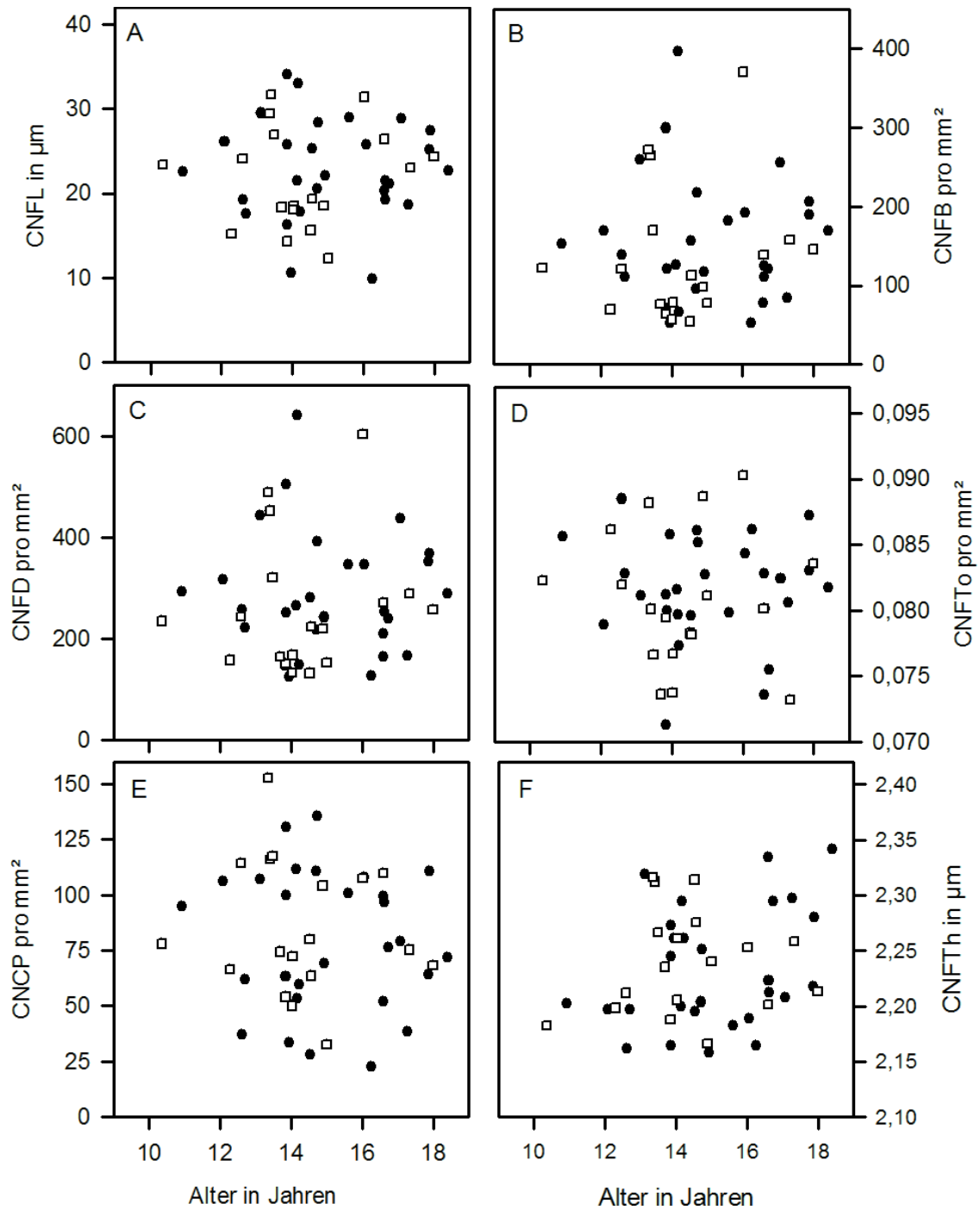


Abb. 18: Darstellung der betrachteten kornealen Parameter in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht (A-F), ● Mädchen; □ Jungen

#### 4.2.2.2 Vergleich des subbasalen Nervenplexus zwischen T1DM-Patienten, CKD-Patienten und gesunden Kontrollen

Die SNP-Befunde bei T1DM-, CKD-Patienten und Kontrollen sind in Abb. 19 dargestellt.

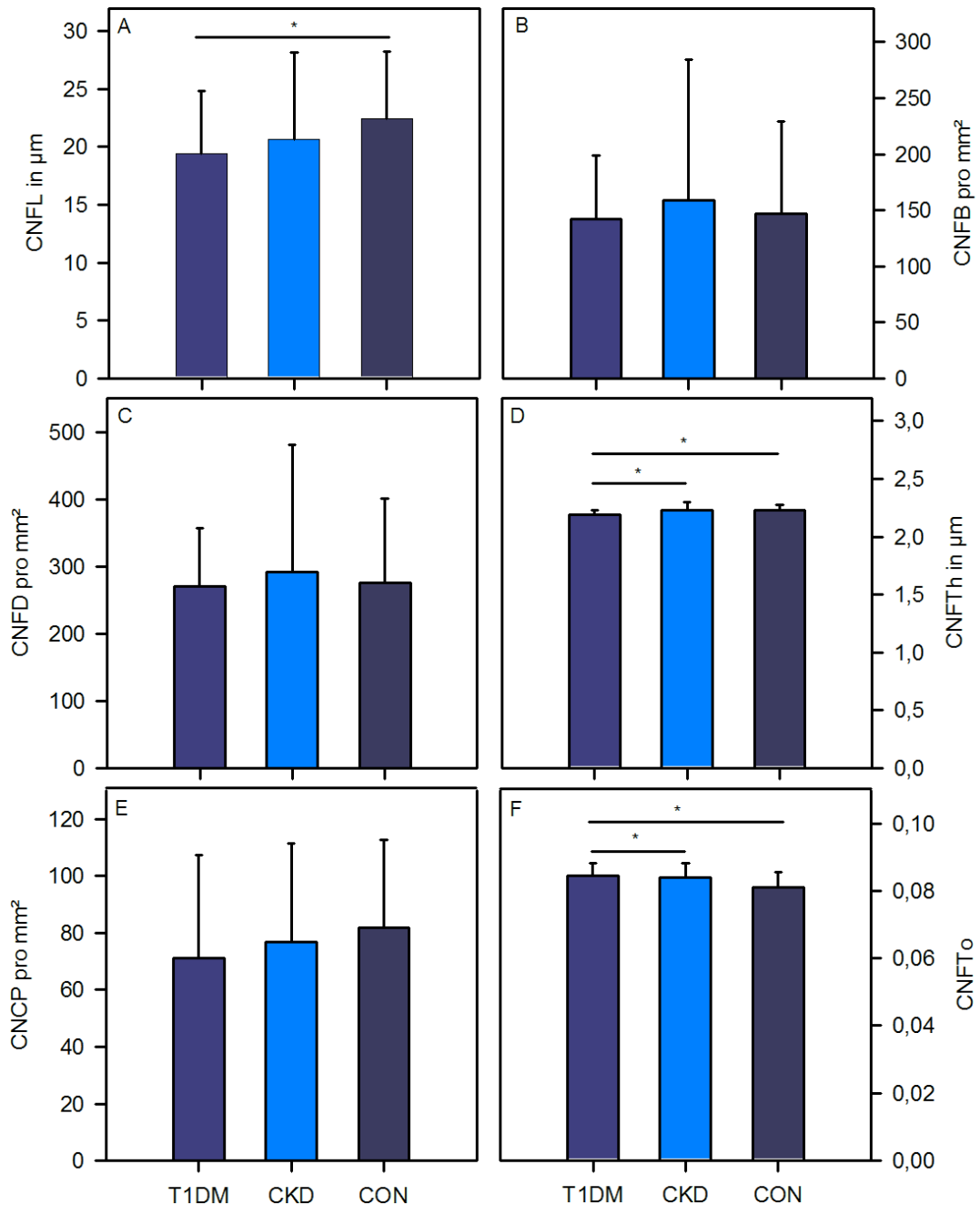


Abb. 19: Vergleich der SNP-Befunde bei T1DM-Patienten, CKD-Patienten und Kontrollen, signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zwischen den Gruppen sind durch \* markiert, die Werte sind mit Mittelwert und SD dargestellt



Anders als bei gesunden Kontrollen und CKD-Patienten unterschieden sich CNCP und CNFTo bei Mädchen und Jungen mit T1DM signifikant (Abb. 20). Da diese Unterschiede weder bei anderen kornealen Parametern noch in den beiden anderen Studiengruppen auftraten, wurde auf eine geschlechtsspezifische Unterscheidung verzichtet.

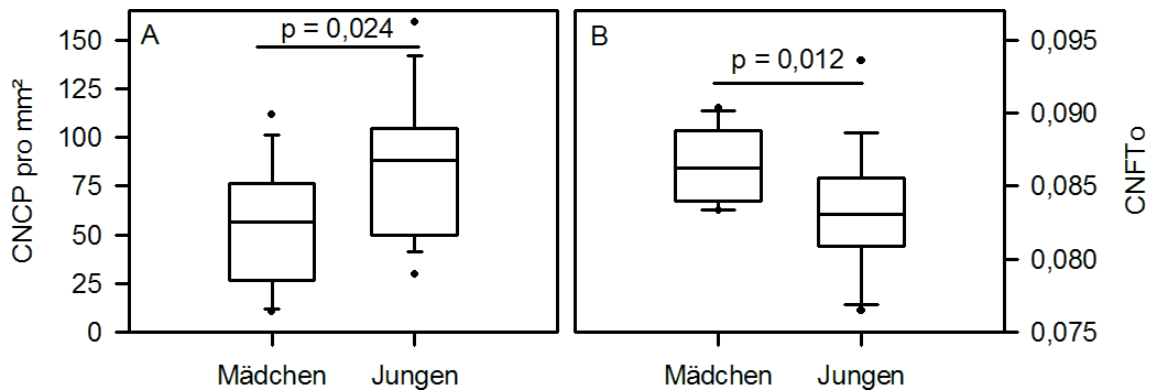


Abb. 20: Signifikante Assoziation des Geschlechts mit CNCP (A) und CNFTo (B) bei T1DM-Patienten

Bei T1DM-Patienten waren CNFL und CNFT<sub>h</sub> im Vergleich zu Kontrollen signifikant verringert und die CNFT<sub>o</sub> signifikant erhöht (Abb. 21).

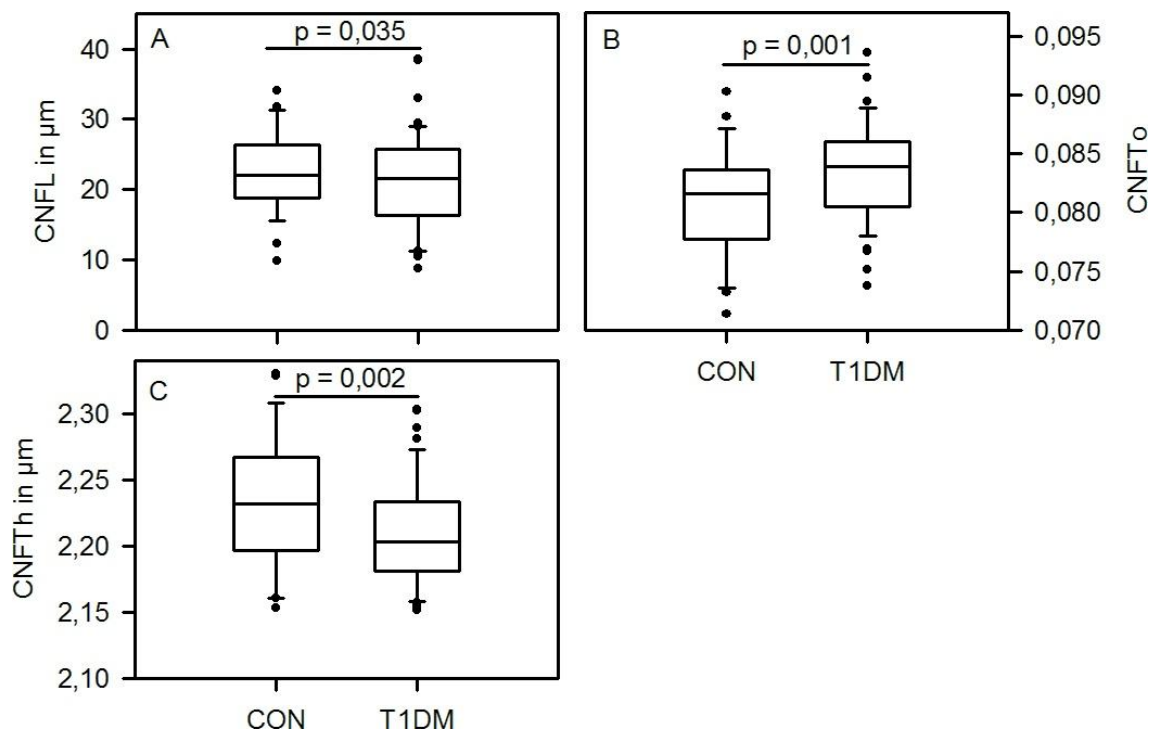


Abb. 21: Signifikante Unterschiede des SNP zwischen T1DM-Patienten und Kontrollen

Die Unterschiede zwischen T1DM-Patienten und gesunden Kontrollen waren unabhängig davon, ob der T1DM bereits über 5 Jahre bestand oder im Jahr vor der Untersuchung im Durchschnitt ein erhöhter HbA1c ( $\geq 7,5\%$ ) bzw. stark erhöhter HbA1c ( $\geq 10,0\%$ ) vorlag.

Die CNFL nahm von Kontrollen über CKD-Patienten hin zu den T1DM-Patienten ab. Auch CNFD, CNFB und CNCP waren bei den T1DM-Patienten tendenziell, wenn auch nicht signifikant niedriger als bei den CKD-Patienten.

Bei CKD-Patienten war die CNFTo im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht (Abb. 22A). Wenn nur CKD-Patienten mit einer Erkrankungsdauer von mindestens fünf Jahren in die Analyse eingeschlossen wurden, trat der Unterschied in der CNFTo deutlicher hervor (Abb. 22B). Eine Korrelation zwischen der Erkrankungsdauer und CNFTo konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

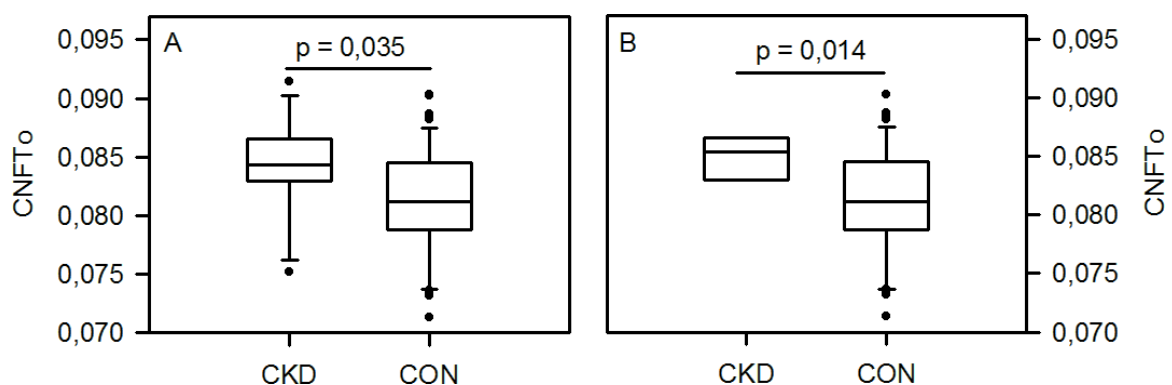


Abb. 22: Signifikanter Unterschied der CNFTo zwischen allen CKD-Patienten und Kontrollen (A) und zwischen CKD-Patienten mit einer Erkrankungsdauer >60 Monaten und Kontrollen (B)

Die Korrelationsanalyse der kornealen Parameter zeigte, dass bei T1DM-, CKD-Patienten und Kontrollen zwischen CNFL, CNFD, CNFB, CNCP und CNFTo signifikante Assoziationen bestehen (Abb. 23). Bei den T1DM-Patienten gab es zusätzlich signifikante Korrelationen zwischen CNFTo, CNFL und CNCP (Abb. 24).

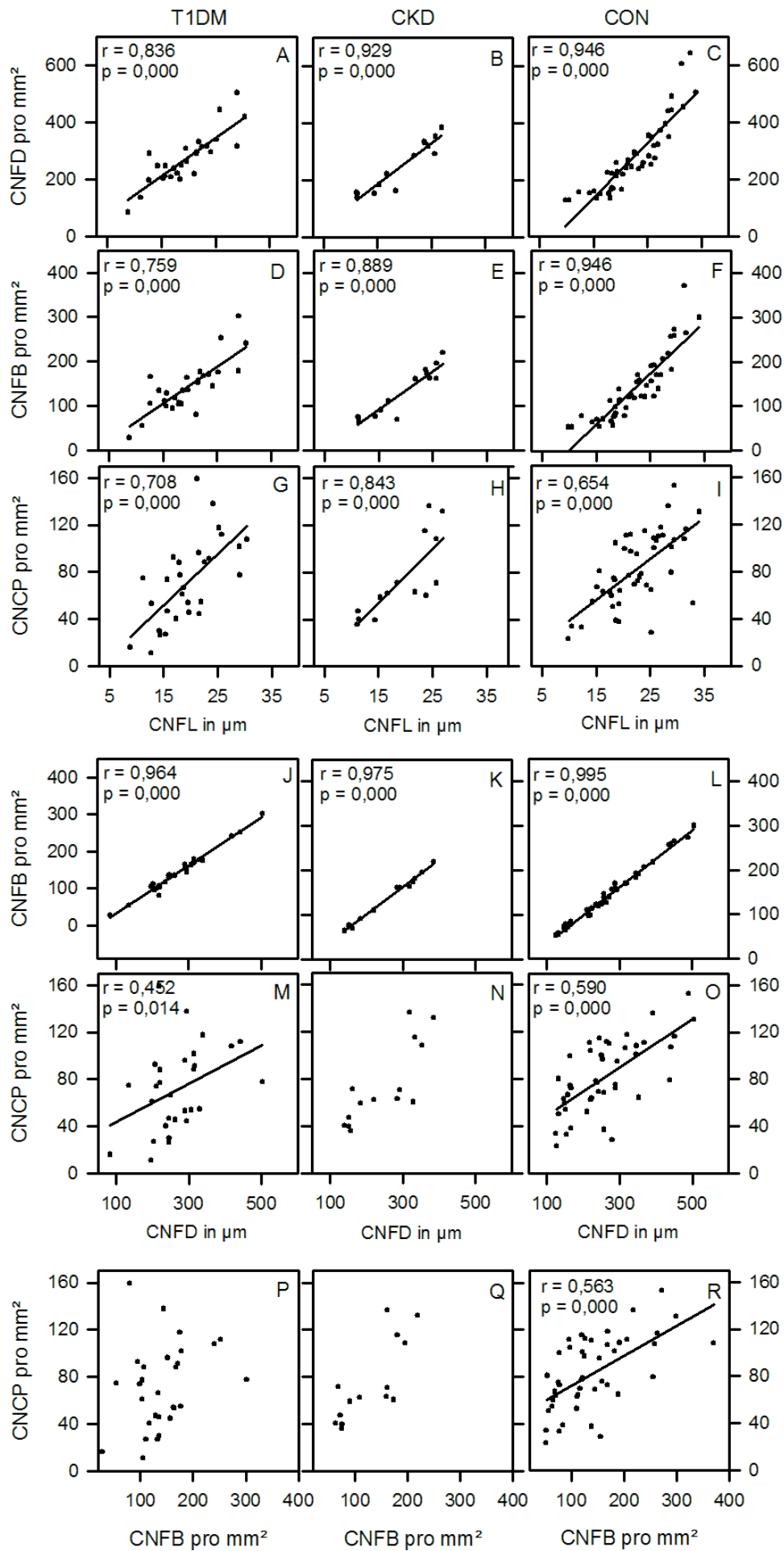


Abb. 23: Signifikante Korrelationen der kornealen Parameter bei den Studiengruppen

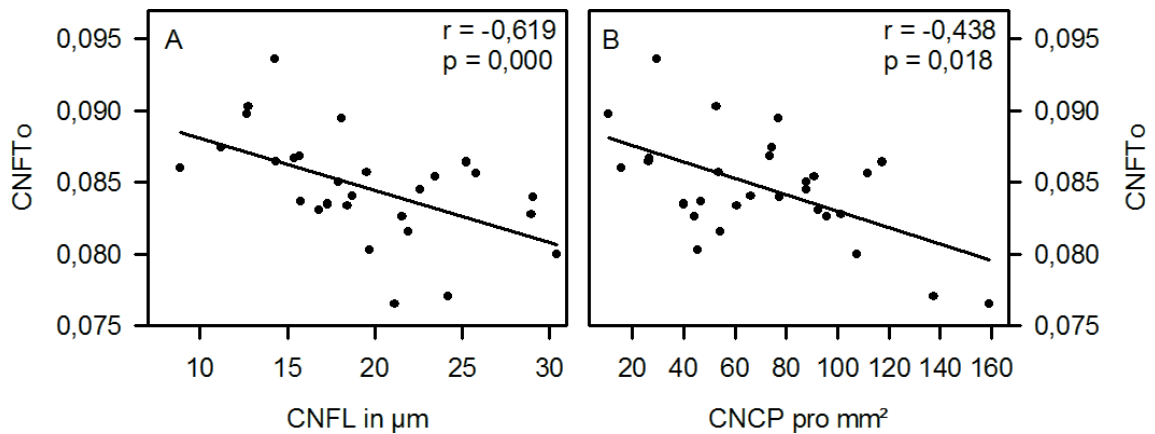


Abb. 24: Signifikante Korrelationen kornealer Parameter bei T1DM-Patienten, die bei den Kontrollen nicht nachweisbar waren

Zwischen den anthropometrischen und den kornealen Parametern gab es keine signifikanten Korrelationen.

Erkrankungsdauer, Therapieform, HbA1c-Wert (bei T1DM-Patienten) und CKD-Stadium und Retentionswerte (bei CKD-Patienten) hatten keinen signifikanten Einfluss auf korneale Parameter.

Zwischen CNFTo und der Insulin-Tagesdosis wurde eine signifikante positive Assoziation beobachtet (Abb. 25).

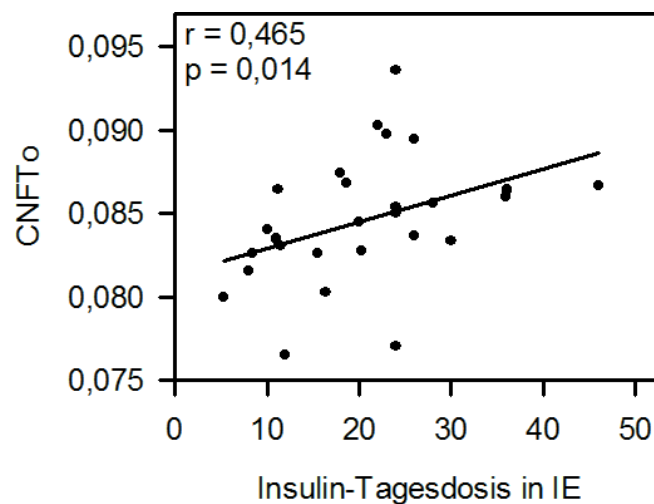


Abb. 25: Signifikante Korrelation zwischen CNFTo und Insulin-Tagesdosis bei T1DM-Patienten

## 5. Diskussion

In dieser Studie wurde der SNP von Kindern und Jugendlichen mit einem T1DM oder einer CKD mit CLSM untersucht und die Ergebnisse mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

Hintergrund der Studie war die Frage, ob bereits bei Kindern und Jugendlichen mit T1DM oder CKD früh im Krankheitsverlauf Veränderungen der Nerven messbar sind, und ob sich diese Veränderungen ähneln.

Da nicht bekannt war ob und ggf. wie sich der SNP mit Alter und zwischen dem Geschlecht verändert, wurde eine Kontrollgruppe in die Studie eingeschlossen.

Die morphologischen Parameter des SNP zeigten keine Abhängigkeiten von Alter oder Geschlecht.

Sowohl bei den T1DM- als auch bei den CKD-Patienten waren trotz relativ geringer Erkrankungsdauer und milder renaler Funktionseinschränkung (CKD-Patienten) und obwohl zum Zeitpunkt der Studie bei keinem der erkrankten Kinder und Jugendlichen ophthalmologische oder neuropathische Folgeschäden bekannt waren, deutliche Veränderungen des SNP mit CLSM nachweisbar. Diese betrafen vor allem CNFL und CNFTo.

Daraus lässt sich einerseits schließen, dass es bei T1DM und CKD bereits sehr früh im Krankheitsverlauf zu messbaren Schäden an dünn- und unmyelinisierten Nervenfasern kommt. Andererseits kann bestätigt werden, dass mit der CLSM sehr frühe Nervenschäden diagnostiziert werden können und sie damit eine geeignete Methode für eine Frühdiagnostik ist.

### 5.1 Aktuelle Forschungsergebnisse zur Untersuchung des SNP mit CLSM

Tab. 5 gibt eine Übersicht über aktuelle Studien zu Veränderungen des SNP bei Patienten mit Diabetes mellitus.

Es sind insgesamt elf Studien aufgeführt, von denen vier ausschließlich T1DM-Patienten und eine Studie ausschließlich T2DM-Patienten untersuchte, in die restlichen sechs Studien wurden sowohl T1DM- als auch T2DM-Patienten eingeschlossen. Über diese Studien liegen zwei Reviews von E. De Clerck und E. Wang von 2015 vor, die in der Tabelle nicht aufgeführt sind (46,47).

Sellers et al. untersuchten als einzige Kinder und Jugendliche. Sie konnten sowohl bei T1DM- als auch bei T2DM-Patienten die gute Anwendbarkeit der CLSM, jedoch keine Veränderungen kornealer Nerven nachweisen (48).

Bei erwachsenen Patienten konnten sowohl bei T1DM als auch bei T2DM Veränderungen der CNFL, CNFD, CNFB, CNCP und CNFTo nachgewiesen werden. Die Veränderungen nahmen bei Patienten mit DPN zu (46,47,49–52).

Korrelationen kornealer Parameter mit dem HbA1c-Wert oder der Erkrankungsdauer waren in vier Studien signifikant (53–56).

Tavakoli et al. konnten nachweisen, dass sich die Nerven des SNP durch bessere Diabeteseinstellung wieder erholen können.

So konnte bei T1DM-Diabetikern sechs Monate nach simultaner Nieren- und Pankreastransplantation mit der CLSM eine Zunahme von CNFB und 12 Monate nach Operation zusätzlich eine Verbesserung der CNFD und CNFL nachgewiesen werden, auch wenn mit ENG oder NSS keine Verbesserungen messbar waren (57).

Bei T1DM- und T2DM Diabetikern mit milder bis moderater Polyneuropathie führte eine verbesserte Einstellung von HbA1c, Blutdruck und Serumcholesterin über 24 Monate zu einer signifikanten Zunahme von CNFD und CNFB (55).

Von CKD-Patienten gibt es bislang noch keine Untersuchungsergebnisse des SNP. Da die DPN und UPN ähnliche Nervenveränderungen aufweisen, sind ähnliche SNP Veränderungen wahrscheinlich.

Tab. 5: Übersicht über aktuelle Studienergebnisse zur Untersuchung des SNP bei Diabetikern mit CLSM

Autor/Jahr	DM Typ	n	Alter [Jahre]	Charakteristika des SNP
C. Dehghani 2014 (53)	I	147	>18	CNFL↓, CNFD↓ und CNFB↓ neg. Korrelation zw. CNFD und HbA1c; CNFB und Erkrankungsdauer/Zigarettenkonsum
K. Edwards 2012 (54)	I+II	231	>18	Patienten ohne DPN: keine signifikanten Veränderungen Patienten mit milder DPN: gegenüber Kontrollen/Patienten ohne DPN CNFL↓ und CNFB ↓ neg. Korrelationen zw. CNFL und HbA1c / Erkrankungsdauer
F. Ishibashi 2012 (56)	I	38	>18	CNFL↓, CNFD↓ und CNFTo↑ Veränderung bei Patienten mit DPN am stärksten neg. Korrelation zw. CNFL / CNFD und HbA1c
P. Kallinikos 2004 (49)	I+II	18	>18	Patienten mit milder/moderater DPN: CNFTo ↑ nicht signifikant Patienten mit schwerer DPN: CNFTo ↑ signifikant
N. Pritchard 2014 (50)	I	242	>18	CNFL↓ und CNFB↓ Veränderung bei Patienten mit DPN am stärksten

Autor/Jahr	DM Typ	n	Alter [Jahre]	Charakteristika des SNP
M. Stem 2014 (51)	I+II	43	>18	CNFL↓ Veränderung bei Patienten mit DPN am stärksten
E. A. Sellers 2013 (48)	I+II	12	<18	CLSM gut toleriert, CNFL, CNFD, CNFB und CNFTo unverändert zur Kontrollgruppe
M. Tavakoli 2011 (55)	I+II	25	>18	Nach 24 Monaten mit verbesserter Einstellung von HbA1c, Blutdruck und Blutfetten: CNFD↑, CNFB↑, CNFTo↑ und CNFL unverändert Korrelation zwischen CNFD und HbA1c Multivariate Korrelationen der anderen kornealen Parameter mit klinischen Parametern
M. Tavakoli 2013 (57)	I	15	>18	Simultane Nieren-Pankreastransplantation 6 Monate später: CNFB↑ / 12 Monate später: CNFL↑ und CNFD↑
A. Zhivov 2013 (52)	I+II	18	>18	CNFL↓, CNFD↓, CNFB↓ und CNCP↓
D. Ziegler 2014 (58)	II	86	>18	CNFL↓, CNFD↓, CNBD↓, CNCP↓ und CNFTh↓ entspricht nicht zwangsläufig Befunden einer frühen Hautbiopsie



## 5.2 Veränderungen des SNP bei T1DM- und CKD-Patienten

Unsere Befunde sprechen dafür, dass bei T1DM-Patienten und CKD-Patienten bereits früh im Krankheitsverlauf und bei teilweise milder Krankheitsaktivität komplexe Veränderungen an den kornealen Nervenfasern existieren, auch wenn keine polyneuropathischen Symptome vorliegen.

Das widerspricht der Studie von Sellers et al., die bei Kindern und Jugendlichen mit T1DM oder T2DM zwar die gute Anwendbarkeit der CLSM, nicht aber Veränderungen des SNP nachweisen konnten (48).

Analog zu den Befunden bei erwachsenen T1/T2DM-Patienten konnten wir signifikante Veränderungen an CNFL, CNFTo, und CNFTh nachweisen. Dies ist um so beachtenswerter, da Begleiterkrankungen bei unserer Patientengruppe vernachlässigbar waren.

Bei T1DM-Patienten waren CNFL, CNFTh und CNFTo, bei CKD-Patienten CNFTo signifikant verändert. Eine Erklärung für das unterschiedliche Ausmaß der Veränderungen könnte die ausgeprägtere „Krankheitsaktivität“ bei T1DM-Patienten sein. Bei T1DM-Patienten war der HbA1C-Wert im Schnitt erhöht, während bei CKD-Patienten zum Untersuchungszeitpunkt meist nur eine milde renale Funktionseinschränkung vorlag. Viele der von uns untersuchten CKD-Patienten erlitten mehrere Monate vor Studieneinschluss eine akute Nierenschädigung mit starker Funktionseinschränkung, die sich im Laufe der Zeit wieder deutlich erholte. Trotzdem werden diese Patienten weiterhin in der nephrologischen Ambulanz betreut, um mögliche Spätschäden der akuten Erkrankung und der noch immer bestehenden Funktionseinschränkung so gut wie möglich zu vermeiden. Aus anderen Studien ist bekannt, dass sich die Nerven bei Verbesserung der Nierenleistung wieder regenerieren können (21,27).

Die Erkrankungsdauer war bei T1DM- und CKD-Patienten ähnlich.

In einigen Studien zeigten sich Korrelationen der CNFL und CNFD mit dem HbA1c und der CNFB mit der Erkrankungsdauer und dem Nikotinkonsum (53–56). Diese Korrelationen konnten in unserer Studie nicht reproduziert werden, u.a. da keiner der Probanden rauchte.

Die Zunahme der CNFTo bei CKD-Patienten mit einer Erkrankungsdauer von  $\geq 60$  Monaten im Vergleich zu gesunden Kontrollen, spricht für eine Abnahme der

Nervenqualität mit zunehmender Erkrankungsdauer und/oder fortschreitendem CKD-Stadium. Auch wenn in dieser Studie keine direkte Korrelation der kornealen Parameter mit der Erkrankungsdauer besteht. Dafür spricht, dass von CKD-Patienten mit einer Erkrankungsdauer  $\geq 60$  Monaten 4/7 Probanden im CKD-Stadium III-IV waren und von den CKD-Patienten mit einer Erkrankungsdauer  $< 60$  Monaten 8/8 Probanden im CKD-Stadium I-II.

Bei T1DM-Patienten zeigten sich in unserer Studie negative Korrelationen der CNFTo mit der CNFL und CNCP, die aus anderen Studien nicht vorbeschrieben sind. Sie können als Zeichen einer frühzeitigen Nervenschädigung interpretiert werden, da eine Veränderung dieser drei Parameter für die Abnahme der Nervenqualität typisch ist (52,56,59).

Des Weiteren war bei T1DM-Patienten zwischen Insulin-Tagesdosis und der Tortuosität eine signifikant positive Korrelation nachweisbar, die in dieser Form nicht vorbeschrieben ist. Aus der Höhe der Insulin-Tagesdosis lässt sich weder auf eine schlechte T1DM-Einstellung noch auf die Erkrankungsdauer schließen. Damit muss die Interpretation dieser Assoziation zunächst offen bleiben.

### 5.3 Grenzen der vorliegenden Arbeit

An dieser Studie haben 46 gesunde Probanden, 29 T1DM-Patienten und 15 CKD-Patienten teilgenommen.

Statt der erwarteten Anzahl von 105 Kindern und Jugendlichen haben "nur" 90 erfolgreich an der Studie teilgenommen. Nur in zwei Fällen war der Studienabbruch auf eine schlechte Compliance während der CLSM zurückzuführen. In den übrigen Fällen wurde die Zusage spontan und ohne Angabe von Gründen zurückgezogen bzw. die angebotenen Untersuchungstermine wurden als unpassend abgelehnt.

Die Gruppe der CKD-Patienten, als die kleinste Studiengruppe, war sehr heterogen. Dies betrifft sowohl die Ursachen als auch die Stadien der CKD. Zwischen den Ursachen der CKD und den Veränderungen am SNP bestehen wahrscheinlich nur geringe Zusammenhänge. Lediglich bei hereditären (syndromalen) Erkrankungen, die auch mit neuronalen Schäden assoziiert sind, wären vermutlich auch spezifische Aberrationen des SNP zu erwarten. In allen anderen Fällen dürfte die durch die chronische Niereninsuffizienz bedingte metabolische Adaptation und damit die Krankheitsdauer und das Krankheitsstadium für die Veränderungen am SNP von größerer Bedeutung sein. Daher wäre es durchaus sinnvoll, die CLSM in einer prospektiven und ggf. multizentrischen Studie mit longitudinaler Beobachtung der Patienten und paralleler Erfassung von Nierenfunktion und SNP zu integrieren. Dadurch können Zusammenhänge zwischen Aktivität der Grunderkrankung und Schäden des SNP erfasst werden.

Eine Assoziation der kornealen Parameter mit dem Geschlecht war zwar bei T1DM-Patienten, aber weder bei der Kontrollgruppe noch bei den CKD-Patienten nachweisbar. Diese Beobachtung wurde von uns nicht weiter verfolgt. Es ist denkbar, dass die Assoziation bei T1DM-Patienten an einen oder mehrere Parameter gekoppelt ist, die in dieser Studie nicht erfasst wurden.

## 5.4 Ausblick

Unsere Studie weist darauf hin, dass die CLSM auch in der Pädiatrie für die Untersuchung des SNP und damit für klinisches Monitoring und zur Frühdiagnostik von Nervenveränderungen im Rahmen einer DPN oder UPN geeignet ist.

Vorteile der Untersuchung des SNP mit CLSM sind:

- Die Methode ist nicht invasiv und wird auch von Kindern und Jugendlichen gut toleriert.
- Es ist ein objektives Messverfahren und dadurch nicht von dem subjektiven Empfinden der Untersuchten abhängig.
- Es werden A $\delta$ - und C-Fasern untersucht, die bei DPN und UPN als erstes geschädigt werden.
- Der individuelle Verlauf wird dokumentiert.
- Die Untersuchung kann vom Augenarzt durchgeführt werden und mit bereits bestehenden regelmäßigen Kontrollen verbunden werden.

Nachteile der Methode sind:

- Die Rekonstruktion und Auswertung der SNP-Bilder ist sehr aufwendig.
- Das medizinische Personal muss in der Methode neu ausgebildet werden.
- Es gibt keine Grenzwerte für gesunde/veränderte Nerven.

Der am stärksten limitierende Faktor eines Einsatzes der CLSM als Routineverfahren in der Polyneuropathie-Diagnostik ist der hohe rechentechnische Aufwand für die Rekonstruktion und Auswertung der Bilder. Parallel zur weiteren Erforschung von klinischen Zusammenhängen sollte daher auch die Entwicklung einer automatisierten Bildanalyse vorangetrieben werden. Erst dann ist das Verfahren für die klinische Routine wirklich einsatzfähig und longitudinale Untersuchungen sind im Rahmen der bereits bestehenden etablierten Untersuchungsabläufe möglich. Dann könnte man auch individuell überprüfen, ob sich unter der aktuellen Therapie Nervenschäden entwickeln und ob diese durch Therapieänderungen beeinflusst werden.

Weitere Untersuchungen an gesunden Probanden sind notwendig, um physiologische Grenzwerte der betrachteten Kenngrößen des SNP festzulegen. Die Erstellung solcher Referenzwerte wird dadurch erleichtert, dass es offenbar keine Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und körperlicher Entwicklung gibt. Mit solchen Daten könnte ab der ersten Untersuchung eine Aussage über die Nervenqualität getroffen werden.

## 6. Zusammenfassung

Ziel dieser klinisch experimentellen Querschnittstudie war es, den subbasalen Nervenplexus der Kornea bei gesunden Kindern und Jugendlichen und bei pädiatrischen Patienten mit T1DM oder CKD mit Konfokaler-Laser-Scanning-Mikroskopie zu untersuchen. Es sollte differenziert werden, ob die Methode bei pädiatrischen Patienten anwendbar ist, ob es bei gesunden Probanden in Abhängigkeit von Alter und oder Geschlecht zu Veränderungen des SNP kommt und ob es im Rahmen eines T1DM oder einer CKD schon früh im Krankheitsverlauf zu morphologischen Veränderungen des SNP als Indikator neuronaler Veränderungen kommt. Der SNP besteht aus sensiblen dünn- und unmyelinisierten A $\delta$ - und C-Fasern, die dem Nervus trigeminus entspringen. Es ist bekannt, dass diese Fasern bei DPN und UPN als erstes und erst im Verlauf A $\alpha$ - $\gamma$ -Fasern geschädigt werden.

Es wurden 46 gesunde Kontrollen (Alter  $14,8 \pm 1,9$  Jahre), 29 T1DM-Patienten (Alter  $14,3 \pm 2,5$  Jahre, Erkrankungsdauer  $64,2 \pm 49,9$  Monate) und 15 CKD-Patienten (Alter  $14,1 \pm 2,3$  Jahre, Erkrankungsdauer  $71,7 \pm 53,5$  Monate) in die Studie eingeschlossen. Keiner der Probanden hatte zum Zeitpunkt der Untersuchung Symptome einer Polyneuropathie oder eine herabgesetzte korneale Sensitivität. Aufgrund des jungen Alters der Probanden können Einflüsse von Alters- und Lebensstil-assoziierten Erkrankungen sowie Folgeerkrankungen vernachlässigt werden. Von allen Teilnehmenden wurde der SNP des rechten Auges mit CLSM in mehreren Fokuserien im Z-Scan untersucht und durch Rekonstruktion der Bilderserien Mosaikbilder des SNP erstellt. Ausgehend von diesen Mosaikbildern wurden CNFL, CNFD, CNFB, CNCP, CNFTh und CNFTo ermittelt und die Ergebnisse der unterschiedlichen Gruppen miteinander verglichen. Die kornealen Parameter zeigten keine Abhängigkeit vom Alter oder Geschlecht.

In dieser Studie konnten erstmals Veränderungen des SNP bei Kindern und Jugendlichen mit T1DM oder CKD festgestellt werden und das obwohl bei keinem der Probanden polyneuropathische Symptome vorlagen. Die Veränderungen waren bei T1DM-Patienten stärker ausgeprägt als bei CKD-Patienten. Bei T1DM-Patienten waren CNFL und CNFTh im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erniedrigt und die CNFTo signifikant erhöht. Bei CKD-Patienten war die CNFTo signifikant erhöht.

Die messbaren Veränderungen des SNP sprechen dafür, dass sowohl bei T1DM- als auch bei CKD-Patienten dünn- und unmyelinisierten A $\delta$ - und C-Fasern sehr früh im Krankheitsverlauf geschädigt werden und das DPN und UPN ähnlich verlaufen.

## 7. Thesen

Ziel dieser klinisch experimentellen Querschnittstudie war es, den subbasalen Nervenplexus der Kornea (SNP) bei Kindern und Jugendlichen mit Typ 1 Diabetes mellitus (T1DM) oder chronischer Niereninsuffizienz (CKD) mit Konfokaler-Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) zu untersuchen und zu differenzieren, ob im Rahmen des T1DM oder der CKD früh im Krankheitsverlauf morphologische Veränderungen der Nervenfasern auftreten, die auf Nervenschäden und eventuelle Gemeinsamkeiten beider Erkrankungen hinweisen.

Es wurden 46 gesunde Kontrollen (Alter  $14,8 \pm 1,9$  Jahre), 29 T1DM-Patienten (Alter  $14,3 \pm 2,5$  Jahre, Erkrankungsdauer  $64,2 \pm 49,9$  Monate) und 15 CKD-Patienten (Alter  $14,1 \pm 2,3$  Jahre, Erkrankungsdauer  $71,7 \pm 53,5$  Monate) in die Studie eingeschlossen. Keiner der Probanden hatte zum Zeitpunkt der Untersuchung Symptome einer Polyneuropathie oder eine herabgesetzte korneale Sensitivität.

1. Der SNP besteht aus sensiblen dünn- und unmyelinisierten A $\delta$ - und C-Fasern, die dem Nervus trigeminus entspringen.
2. Dünn- und unmyelinisierte Fasern werden bei DPN und UPN als erstes und im Verlauf A $\alpha$ - $\gamma$ -Fasern geschädigt.
3. Die CLSM ist ein nicht-invasives, gut toleriertes Messverfahren, mit dem objektiv Veränderungen an A $\delta$ - und C-Fasern des SNP festgestellt werden können.
4. Bei Kindern und Jugendlichen mit chronischen Erkrankungen können Alters- und Lebensstil-assoziierte Komorbiditäten und ihre Auswirkungen auf den SNP in der Regel vernachlässigt werden.
5. Die morphologischen Kenngrößen der Nervenfasern des SNP sind nicht mit Alter oder Geschlecht assoziiert.
6. Bei Kindern und Jugendlichen mit T1DM oder CKD treten Veränderungen des SNP auf, die für eine Schädigung der dünn- und unmyelinisierten A $\delta$ - und C-Fasern früh im Krankheitsverlauf sprechen.
7. Ähnlichkeiten der Schädigungen des SNP bei Patienten mit T1DM oder CKD sprechen für einen ähnlichen Verlauf der DPN und UPN.
8. Da die morphologischen Veränderungen sehr früh im Krankheitsverlauf und in Abwesenheit polyneuropathischer Symptome auftreten, können diese als Biomarker und die CLSM als geeignete Methode der Frühdiagnostik verwendet werden.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Löffler, G. Petrides P. Biochemie und Pathobiochemie. 8th ed. Springer Verlag; 2008.
2. Herold G. Innere Medizin. 2012. 620-628 p.
3. Arbeitsgemeinschaft, für Pädiatrische Diabetologie. Verlaufskontrolle des Diabetes mellitus im Kindes- und Jugendalter S3-Leitlinie der DDG und AGPD. 2015.
4. Böhm BO, Dreyer M, Fritsche A, Füchtenbusch M, Gözl S, Martin S. Therapie des Typ-1-Diabetes. Diabetologie. 2011;(57).
5. Heidemann, C. Du, Y. Scheidt-Nave C. Diabetes mellitus in Deutschland. GBE kompakt. 2010;18(1).
6. Callaghan, B Feldman E and MD. The Metabolic Syndrome and Neuropathy: Therapeutic Challenges and Opportunities. Natl Inst Heal. 2013;74(3):1–6.
7. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. Diabetes. 2005;54(6):1615.
8. Tomlinson DR. Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications. Diabetologia. 1999;42(11):1271–81.
9. Singh R, Kishore L, Kaur N. Diabetic peripheral neuropathy: Current perspective and future directions. Pharmacol Res. Elsevier Ltd; 2014;80:21–35.
10. Schalkwijk CG, Stehouwer CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. Clin Sci. 2005;109(2):143–59.
11. Juster-Switlyk K, Smith AG. Updates in diabetic peripheral neuropathy [ version 1 ; referees : 3 approved ]. F1000 Res. 2016;5(0):1–7.
12. Malik RA, Tesfaye S, Thompson SD, Veves A, Sharma AK, Boulton AJM, et al. Endoneurial localisation of microvascular damage in human diabetic neuropathy. Diabetologia. 1993;454–9.
13. Leitlinie Neuropathie bei Diabetes im Erwachsenenalter – Langfassung, 1. Auflage. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). 2011.
14. Nationale Versorgungsleitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes – Langfassung, 1. Auflage. Version 4. 2013,. Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). 2014.
15. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. Chapter 1: definition and classification of CKD. Kidney Int Suppl. 2013;3:19–62.

16. Riccabona M. Leitlinien Kinderurologie. Urol und Urogynäkologie. 2003;10(Sonderheft 4):7–14.
17. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. Chapter 4: Other complications of CKD: CVD, medication dosage, patient safety, infections, hospitalizations, and caveats for investigating complications of CKD. *Kidney Int Suppl.* 2013;3(1):91–111.
18. Hoberg E, Galle J-C, Bjarnason-Wehrens B, Cordes C, Karoff M, Klein G, et al. Umsetzungsempfehlungen von Diagnose- und Therapieleitlinien bei chronischen Nierenerkrankungen. *Herzmedizin.* 2007;24(3):136–46.
19. Deutsche Gesellschaft für Nephrologie. Dialysestandard. 2016;
20. Krishnan A V., Kiernan MC. Uremic neuropathy: Clinical features and new pathophysiological insights. *Muscle and Nerve.* 2007;35(3):273–90.
21. Said G. Uremic neuropathy. 1st ed. *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier B.V.; 2013. 607-612 p.
22. Heuß PDD. Diagnostik bei Polyneuropathien. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. 2012. p. 1–17.
23. Schiebler TH, Korf HW. Anatomie. Kapitel 15 - Zentralnervensystem. 2007. 724-726 p.
24. Salvotelli L, Stoico V, Perrone F, Cacciatori V, Negri C, Brangani C, et al. Prevalence of neuropathy in type 2 diabetic patients and its association with other diabetes complications: The Verona Diabetic Foot Screening Program. *J Diabetes Complications.* Elsevier Inc.; 2015;29(8):1066–70.
25. Tavakoli M, Petropoulos IN, Malik RA. Corneal confocal microscopy to assess diabetic neuropathy: an eye on the foot. *J Diabetes Sci Technol.* 2013;7(5):1179–89.
26. Mambelli E, Barrella M, Facchini MG, Mancini E, Sicuso C, Bainotti S, et al. The prevalence of peripheral neuropathy in hemodialysis patients. *Clin Nephrol.* 2012;77(June):468–75.
27. Laaksonen S, Metsrinne K, Voipio-Pulkki LM, Falck B. Neurophysiologic parameters and symptoms in chronic renal failure. *Muscle and Nerve.* 2002;25(6):884–90.
28. Toopchizadeh V, Shiva S, Khiabani N-Y, Ghergherechi R. Electrophysiologic pattern and prevalence of subclinical peripheral neuropathy in children and adolescents with type I diabetes mellitus in Iran. *Saudi Med J.* 2016;37(3):299–303.
29. Arbus GS, Barnor N, Hsu AC, Murphy EG. Effect of chronic renal failure , dialysis and transplantation on motor nerve conduction velocity in children. *C J.* 1975;113:517–20.



30. Menster M. Peripheral motor nerve conduction velocities in children undergoing chronic hemodialysis. *Nephron*. 1978;(22):337–41.
31. Michael Schünke, Erik Schulte US. Prometheus - Kopf, Hals und Neuroanatomie. 3rd ed. Thieme; 2012. 168-171 p.
32. Richter A, Slowik C, Somodi S, Rudolf HV. Hornhautinnervation des Menschen mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie. *Ophthalmologe*. 1997;141–6.
33. Müller LJ, Vrensen GFJM, Pels L, Cardozo BN, Willekens B. Architecture of Human Corneal Nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;38(5):985–94.
34. Minsky M. Confocal Scanning Microscope. *Scanning*. 1988;128–38.
35. Egger MD. New Reflected-Light Microscope for Viewing Unstained Brain and Ganglion Cells. *Science* (80- ). 1967;(4):305–7.
36. Davidovits P, Egger MD. Scanning laser microscope. *Nature*. 1969.
37. Cox IJ, Sheppard CJ. Scanning optical microscope incorporating a digital framestore and microcomputer. *Appl Opt*. 1983;22(10):1474.
38. Amos WB, White JG. How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biol Cell*. 2003;95(6):335–42.
39. Masters BR, Thaeer AA. Real-time scanning slit confocal microscopy of the in vivo human cornea. *Appl Opt*. 1994;33(4):695–701.
40. Borque E, Ferreras A, Polo V, Larrosa JM, Alias E, Honrubia FM. Evaluation of four new discriminant functions for HRT II in glaucoma diagnosis. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2008;83(6):349–56.
41. J. Stave, G. Zinser, G. Grümmer RG. Der modifizierte Heidelberg-Retina-Tomograph HRT. *Ophthalmologe*. 2002;276–80.
42. Kromeyer-Hauschild K, Wabitsch M, Kunze D, Geller F, Geiß HC, Hesse V, et al. Perzentile für den body-mass-index für das Kindes- und Jugendalter unter Heranziehung verschiedener deutscher Stichproben. *Monatsschr Kinderheilkd*. 2001;149(8):807–18.
43. NIH. The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Natl Institutes Heal*. 2005;05–5267:1–60.
44. Martinez-Conde S, Macknik SL, Hubel DH. The role of fixational eye movements in visual perception. *Nature*. 2004;5(3):229–32.
45. Köhler B, Allgeier S, Eberle F, Guthoff R, Maier S, Stachs O, et al. Bildrekonstruktion des subbasalen Nervenplexus der Kornea mit erweitertem Bildfeld aus Fokussereien eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2011;228(12):1060–6.

46. De Clerck EEB, Schouten JSAG, Berendschot TTJM, Kessels AGH, Nuijts RMMA, Beckers HJM, et al. New ophthalmologic imaging techniques for detection and monitoring of neurodegenerative changes in diabetes: A systematic review. *Lancet Diabetes Endocrinol*. Elsevier Ltd; 2015;3(8):653–63.
47. Wang EF, Misra SL, Patel D V. In Vivo Confocal Microscopy of the Human Cornea in the Assessment of Peripheral Neuropathy and Systemic Diseases. Hindawi Publ Corp. 2015;2015(Table 1).
48. Sellers EAC, Clark I, Tavakoli M, Dean HJ, McGavock J, Malik RA. The acceptability and feasibility of corneal confocal microscopy to detect early diabetic neuropathy in children: A pilot study. *Diabet Med*. 2013;30(5):630–1.
49. Kallinikos P, Berhanu M, O'Donnell C, Boulton AJM, Efron N, Malik RA. Corneal Nerve Tortuosity in Diabetic Patients with Neuropathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45(2):418–22.
50. Pritchard N, Edwards K, Dehghani C, Fadavi H, Jeziorska M, Marshall A, et al. Longitudinal assessment of neuropathy in type 1 diabetes using novel ophthalmic markers (LANDMark): Study design and baseline characteristics. *Diabetes Res Clin Pract*. Elsevier Ireland Ltd; 2014;104(2):248–56.
51. Stem MS, Hussain M, Lentz SI, Raval N, Gardner TW, Pop-Busui R, et al. Differential reduction in corneal nerve fiber length in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. *J Diabetes Complications*. Elsevier Inc.; 2014;28(5):658–61.
52. Zhivov A, Winter K, Hovakimyan M, Peschel S, Harder V, Schober HC, et al. Imaging and Quantification of Subbasal Nerve Plexus in Healthy Volunteers and Diabetic Patients with or without Retinopathy. *PLoS One*. 2013;8(1):1–8.
53. Dehghani C, Pritchard N, Edwards K, Vagenas D, Russell a. W, Malik R a., et al. Natural History of Corneal Nerve Morphology in Mild Neuropathy Associated With Type 1 Diabetes: Development of a Potential Measure of Diabetic Peripheral Neuropathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55(12):7982–90.
54. Edwards K, Pritchard N, Vagenas D, Russell A, Malik RA, Efron N. Utility of corneal confocal microscopy for assessing mild diabetic neuropathy: Baseline findings of the LANDMark study. *Clin Exp Optom*. 2012;95(3):348–54.
55. Tavakoli M. Corneal confocal microscopy detects improvement in corneal nerve morphology with an improvement in risk factors for diabetic neuropathy. *Natl Inst Heal*. 2011;4(164):1261–7.
56. Ishibashi F, Okino M, Ishibashi M, Kawasaki A, Endo N, Kosaka A, et al. Corneal nerve fiber pathology in Japanese type 1 diabetic patients and its correlation with antecedent glycemic control and blood pressure. *J Diabetes Investig*. 2012;3(2):191–8.
57. Tavakoli M, Mitu-Pretorian M, Petropoulos IN, Fadavi H, Asghar O, Alam U, et al. Corneal confocal microscopy detects early nerve regeneration in diabetic neuropathy after simultaneous pancreas and kidney transplantation. *Diabetes*. 2013;62(1):254–60.

58. Ziegler D, Papanas N, Zhivov A, Allgeier S, Winter K, Ziegler I, 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):2454–63.
59. Tavakoli M, Ferdousi M, Petropoulos IN, Morris J, Pritchard N, Zhivov A, et al. Normative values for corneal nerve morphology assessed using corneal confocal microscopy: a multinational normative data set. *Diabetes Care*. 2015;38(5):838–43.
60. Frei U, Schober-Halstenberg J. Nierenersatztherapie in Deutschland. *Quasi-Niere*. 2007;5(1).
61. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. Chapter 2: Definition, identification, and prediction of CKD progression. *Kidney Int Suppl*. 2013;3:63–72.

## 9. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich während meiner Arbeit unterstützt haben.

Ich danke meiner Doktormutter, Frau Priv-Doz. Dr. rer. nat. Dagmar-Christiane Fischer für die Vergabe des Dissertationsthemas und die hervorragende Unterstützung bei jedem Schritt meiner Arbeit und Prof. Dr. rer. nat. Oliver Stachs für die volle Unterstützung bei technischen Fragen zur Konfokalen Mikroskopie und zur Bildauswertung.

Sabine Peschel danke ich für die gemeinsame Arbeit. Sie hat mich der Augenheilkunde einen großen Schritt näher gebracht. Ohne sie wäre die Untersuchung der Probanden nicht möglich gewesen.

Dr. Bernd Köhler und dessen Arbeitsgruppe danke ich für die Rekonstruktion und Zusammensetzung der SNP-Bilder.

Dipl. Inf. Karsten Winter danke ich für die Errechnung der kornealen Parameter aus den SNP-Bildern.

Dr. med. Ulrike Jacoby, Dr. med. Corinna Schreiber, Dr. med. Hagen Staude, Schwester Susi und allen Schwestern der endokrinologischen Ambulanz und der KfH-Nierenambulanz der UMR danke ich für die Unterstützung bei der Arbeit.

Anja Rahn danke ich für die herzliche Unterstützung im Labor.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich immer unterstützt haben. Im Besonderen danke ich Luise von Keyserlingk und Kasimir von Finck, die sich immer die Zeit für Fragen, Korrekturen und Formatierungen genommen haben.

## 10. Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Name: Sophie Camilla Baronesse von Keyserlingk  
Adresse: Wichertstraße 67, 10439 Berlin  
Geburtsdatum: 31. März 1989  
Geburtsort: Berlin

### Studium/Schulbildung

2009 – 2015 Medizinstudium an der Universität Rostock  
2012 – 2016 Anfertigung der vorliegenden Promotion  
2001 – 2008 Humboldt-Gymnasium Berlin  
1995 – 2001 Victor-Gollancze-Grundschule Berlin

### Praktische Erfahrungen

#### Arbeitserfahrungen

seit 12/2016 Assistenzärztin in der Abteilung für Augenheilkunde der  
Schlosspark-Klinik Berlin  
01/2016 - 07/2016 Ärztliche Betreuung von Herzsportgruppen beim  
Gesundheitssport Lichtenberg e.V.

#### Praktisches Jahr

06/2015 - 10/2015 St. Gertrauden Krankenhaus Berlin, Augenheilkunde  
03/2015 - 06/2015 Chirurgik Kliniken Lycksele Lasarett, Schweden, Chirurgie  
11/2014 - 03/2015 Bethel Krankenhaus Berlin, Innere Medizin

### Wissenschaftliche Arbeiten

2012 – 2016 Anfertigung der vorliegenden Promotion zur Untersuchung des  
Subbasalen Nervenplexus bei Kindern und Jugendlichen mit  
einem Typ 1 Diabetes mellitus oder einer chronischen  
Niereninsuffizienz

## 11. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

\_\_\_\_\_

(Abgabedatum)

\_\_\_\_\_

(Vollständige Unterschrift)