

AUS DER KLINIK- UND POLIKLINIK FÜR AUGENHEILKUNDE DER UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

DIREKTOR: PROF. DR. MED. ANSELM JÜNEMANN

STELLENWERT DER KONFOKALEN IN-VIVO-MIKROSKOPIE
DES SUBBASALEN NERVENPLEXUS DER HORNHAUT IN
DER DIAGNOSTIK EINER DIABETISCHEN NEUROPATHIE

INAUGURALDISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN
DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN ROSTOCK

EINGEREICHT AM 12. JULI 2018,

VERTEIDIGT AM 27. FEBRUAR 2019

VON SABINE CHRISTINA PESCHEL | GEB. AM 24. SEPTEMBER 1981 IN COTTBUS

AUS SPREMBERG |

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00002460

ERSTGUTACHTER: PROF. DR. RER. NAT. OLIVER STACHS,
EINRICHTUNG: UNIVERSITÄT ROSTOCK,
UNIVERSITÄTSAUGENKLINIK,
DOBERANER STRAÙE 140, 18057 ROSTOCK

ZWEITGUTACHTER: PROF. DR. MED. ANDREAS WREE
EINRICHTUNG: UNIVERSITÄT ROSTOCK,
INSTITUT FÜR ANATOMIE,
GERTRUDENSTRASSE 9, 18057 ROSTOCK

DRITTGUTACHTER: PROF. DR. MED. MAREN KLEMM, ÄRZTLICHE DIREKTORIN (KOMM.)
EINRICHTUNG: UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF,
KLINIK UND POLIKLINIK FÜR AUGENHEILKUNDE,
MARTINISTR. 52, 20246 HAMBURG

INHALTSVERZEICHNIS

I.	Einleitung	1
II.	Grundlagen	1
2.1	Diabetes Mellitus.....	1
2.1.1	Definition	1
2.1.2	Klassifikation	2
2.1.3	Epidemiologie.....	3
2.1.4	Makro- / Mikroangiopathie.....	3
2.2	Diabetische Neuropathie	5
2.2.1	Definition	5
2.2.2	Epidemiologie.....	6
2.2.3	Ätiologie	6
2.2.4	Pathogenese.....	6
2.2.5	Prävention	7
2.2.6	Diagnosekriterien	7
2.3	Diabetische Retinopathie und Makulopathie	11
2.3.1	Definition	11
2.3.2	Epidemiologie.....	11
2.3.3	Ätiologie	12
2.3.4	Pathogenese.....	12
2.3.5	Prävention	13
2.4	Kornea.....	14
2.5	Problemstellung	16
III.	Material und Methoden	17
3.1	Probanden	17
3.1.1	Normalprobanden	17
3.1.2	Probanden mit Diabetes Mellitus	17
3.2	Methoden	18

3.2.1	AUGENÄRZTLICHE UNTERSUCHUNGEN UND SPALTLAMPENMIKROSKOPIE	18
3.2.2	KONFOKALE IN-VIVO-MIKROSKOPIE	18
3.2.3	NEUROPATHIE DEFIZIT SCORE UND NEUROPATHIE SYMPTOM SCORE.....	21
3.2.4	7-FELDER-FUNDUS.....	21
3.2.5	HORNHAUTSENSIBILITÄT	23
3.3	AUSWERTUNG	23
3.3.1	BILDANALYSE	23
3.3.2	STATISTISCHE AUSWERTUNG	24
IV.	ERGEBNISSE	25
4.1	UNTERSUCHUNGSGRUPPEN	25
4.2	SPALTLAMPENMIKROSKOPIE UND FUNDUSFOTOGRAFIE.....	29
4.2.1	NORMALPROBANDEN	29
4.2.2	PROBANDEN MIT DIABETES MELLITUS	29
4.3	NEUROPATHIE DEFIZIT SCORE UND NEUROPATHIE SYMPTOM SCORE.....	31
4.4	HORNHAUTSENSIBILITÄT	33
4.5	KONFOKALE IN-VIVO-LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE (CLSM).....	34
4.5.1	QUALITATIVE BEWERTUNG DES SUBBASALEN NERVENPLEXUS.....	34
4.5.2	QUANTITATIVE BEWERTUNG DES SUBBASALEN NERVENPLEXUS	34
V.	DISKUSSION	39
5.1	DIABETISCHE NEUROPATHIE	39
5.2	DIABETISCHE RETINOPATHIE	41
5.3	HORNHAUTSENSIBILITÄT BEI DIABETES MELLITUS	44
5.4	BILDVERARBEITUNG.....	45
5.5	CLSM ALS FRÜHE, NICHTINVASIVE DIAGNOSTIK EINER DIABETISCHEN NEUROPATHIE...	46
VI.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	50
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	52
VIII.	THESEN	63
IX.	LEBENS LAUF	64

X.	VERÖFFENTLICHUNGEN	65
XI.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	67
XII.	DANKSAGUNG.....	68

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: UNTERSUCHUNG DER VIBRATIONSEMPFINDUNG MITTELS 128-HZ-STIMMGABEL NACH RYDEL-SEIFFER [152]	8
ABBILDUNG 2: DÄMPFER STIMMGABEL LINKS C64/C128 RYDEL-SEIFFER [100].....	9
ABBILDUNG 3: FESTSTELLEN DER VIBRATIONSTÄRKE [150].....	9
ABBILDUNG 4: ALTERSBEZOGENE NORMWERTE DES VIBRATIONSEMPFINDENS IN ACHTELGRADEN AUF DER RYDEL-SEIFFER-STIMMGABEL [151]	9
ABBILDUNG 5: 10 G - MONOFILAMENT ZUR ÜBERPRÜFUNG DES DRUCK-/TASTEMPFINDENS, GLEICHZEITIG AUCH ALS TIP-THERM ZUR ÜBERPRÜFUNG DES TEMPERATUREMPFINDENS UND MITTELS INTEGRIERTEM NEUROTIP ZUR ÜBERPRÜFUNG DER SCHMERZEMPFINDUNG VERWENDBAR [152].....	10
ABBILDUNG 6: ANATOMIE DER KORNEA [71].....	15
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE ZEICHNUNG DER KORNEALEN INNERVATION [153].....	15
ABBILDUNG 8: KONFOKALE ANORDNUNG IM HRT II UND RCM [154].....	20
ABBILDUNG 9: UNTERSUCHUNGSVORRICHTUNG ROSTOCKER LASER-SCANNING-MIKROSKOP (RLSM) [155].....	20
ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER 7 ZU DOKUMENTIERENDEN BEREICHE AM FUNDUS [86].....	22
ABBILDUNG 11: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG (RECHTES AUGE) UND BEISPIELAUFNahme EINES 7-FELDER-FUNDUS-FOTOS (LINKES AUGE) DES GESUNDEN PROBANDEN NR. 1	22
ABBILDUNG 12: MESSUNG DER HORNHAUTSENSIBILITÄT MITTELS COCHET-BONNET-ÄSTHESIOMETER [EIGENE AUFNAHME].....	23
ABBILDUNG 13: STUFEN DER BILDANALYSE (BILDGRÖÖE 400x400 MM)	24
ABBILDUNG 14: VERGLEICH DER UNTERSUCHUNGSGRUPPEN IN BEZUG AUF DAS MITTLERE ALTER.....	27
ABBILDUNG 15: VERGLEICH DER DIABETESUNTERGRUPPEN (MIT UND OHNE DIABETISCHE RETINOPATHIE) IN BEZUG AUF DIABETESDAUER UND HBA1C	28
ABBILDUNG 16: EXEMPLARISCHE 7-FELDER-FUNDUS-FOTOS	30
ABBILDUNG 17: ANZAHL DER DIABETESPROBANDEN MIT DIABETISCHER RETINOPATHIE IN BEZUG AUF DIE DAUER IHRER DIABETESERKRANKUNG	31
ABBILDUNG 18: KORRELATIONEN ZWISCHEN DEN GRUPPEN BEZÜGLICH DES NDS (NEUROPATHIE DEFIZIT SCORE).....	32
ABBILDUNG 19: KORRELATIONEN ZWISCHEN DEN GRUPPEN BEZÜGLICH DES NSS (NEUROPATHIE SYMPTOM SCORE)	32

ABBILDUNG 20: KORRELATIONEN ZWISCHEN DEN GRUPPEN BEZÜGLICH DER HORNHAUTSENSIBILITÄT	33
ABBILDUNG 21: KONFOKALE LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE UND QUANTIFIZIERUNG DER MIKROMORPHOLOGISCHEN PARAMETER.....	36
ABBILDUNG 22: KORRELATIONEN ZWISCHEN NORMALPROBANDEN UND GESAMTDIABETIKERGRUPPE BEZÜGLICH NERVENFASERDICHTHE UND HOMOGENITÄT	37
ABBILDUNG 23: KORRELATION ZWISCHEN NORMALPROBANDEN UND GESAMTDIABETIKERGRUPPE BEZÜGLICH SKELETTPIXEL UND TOTALER NERVENFASERLÄNGE	38
ABBILDUNG 24: KORRELATION ZWISCHEN NORMALPROBANDEN UND GESAMTDIABETIKERGRUPPE BEZÜGLICH NERVENFASERANZAHL, DURCHSCHNITTLICHER NERVENFASERLÄNGE UND ANZAHL DER NERVENFASERÄSTE	38
ABBILDUNG 25: ERGEBNIS DER MULTIVARIANZANALYSE	50

TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: NOSOLOGISCHE KLASSIFIKATION DES DIABETES MELLITUS NACH ADA [2].....	4
TABELLE 2 : KLASSIFIKATION DER DIABETISCHEN NEUROPATHIE NACH THOMAS [29]	5
TABELLE 3: KLASSIFIKATION DER DIABETISCHEN NEUROPATHIE NACH SIMA ET AL. [30].....	5
TABELLE 4: EVALUATIONSBOGEN ZUR ERHEBUNG DES NEUROPATHIE SYMPTOM SCORE [32]	10
TABELLE 5: EVALUATIONSBOGEN ZUR ERHEBUNG DES NEUROPATHIE DEFIZIT SCORE [32].....	11
TABELLE 6: STADIUM UND KLINISCHE BILDER DER DIABETISCHEN RETINOPATHIE NACH DER „GLOBAL DIABETIC RETINOPATHY PROJECT GROUP“ [53]	13
TABELLE 7: UNTERTEILUNG DER WICHTIGSTEN HAUPTPARAMETER	25
TABELLE 8: KLINISCHE UND DEMOGRAPHISCHE DATEN DER PROBANDEN.....	26
TABELLE 9: KLINISCHE UND DEMOGRAPHISCHE DATEN DER PROBANDEN MIT DIABETES MELLITUS.....	26
TABELLE 10: QUANTIFIZIERUNG DES SUBBASALEN NERVENPLEXUS	37

I. EINLEITUNG

Diabetes mellitus (D.m.) und seine Folgeerscheinungen nehmen im Rahmen des demografischen Wandels immer mehr an Bedeutung zu. Im Zuge dessen wird es immer wichtiger, Präventionsmaßnahmen zu betreiben, die eine Exazerbation der Erkrankung verhindern. Dies wiederum verlangt Biomarker oder Surrogatparameter, welche eine bestimmte Prädisposition beschreiben. Diese Marker sollten, wenn möglich, schnell, bequem, nichtinvasiv ermittelbar und zuverlässig sein. Inhalt dieser Arbeit ist die Evaluierung der Möglichkeit einer nichtinvasiven diagnostischen Methode zur Beurteilung und Früherkennung der diabetischen Neuropathie beziehungsweise Retinopathie. Dazu werden zusätzlich zu den gängigen Parametern der diabetischen Neuropathie (Neuropathie Defizit Score, Neuropathie Symptom Score) und Retinopathie, Alterationen des subbasalen Nervenplexus der Hornhaut mittels konfokaler In-vivo-Mikroskopie qualitativ und quantitativ analysiert.

Im Rahmen der Studie wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Welche Rolle spielt eine Quantifizierung des subbasalen Nervenplexus zur Definition der Stadieneinteilung der diabetischen Neuropathie?
2. Welche Korrelationen bestehen zwischen Vorhandensein einer diabetischen Retinopathie, Neuropathie sowie Veränderungen des subbasalen Nervenplexus?
3. Ist eine Hornhautanalyse vergleichbar oder sogar verlässlicher als diabetologisch beziehungsweise neurologisch bestimmbare Parameter? Ist damit eventuell die Nervenfaserverreduktion ein möglicher Surrogatparameter für eine Neuropathie?

II. GRUNDLAGEN

2.1 DIABETES MELLITUS

2.1.1 DEFINITION

Laut der evidenzbasierten Leitlinie der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) [1] ist der Diabetes mellitus eine durch den Leitbefund chronische Hyperglykämie charakterisierte Regulationsstörung des Stoffwechsels, der entweder eine gestörte Insulinsekretion oder eine verminderte Insulinwirkung oder auch beides zugrunde liegt.

2.1.2 KLASSIFIKATION

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) gab bereits 1965 Empfehlungen zur Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. Diese Kriterien wurden 1997 durch die Amerikanische Diabetesgesellschaft (ADA) revidiert und durch neue Empfehlungen ergänzt, welche 2000 durch die WHO [2] und die Deutsche Diabetesgesellschaft (DDG) bestätigt und in die aktuelle evidenzbasierte Leitlinie übernommen wurden.

Der Typ 1 Diabetes ist durch eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden B-Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas charakterisiert. Es besteht ein Insulinmangel mit einem Insulinmangelsyndrom, welches durch die klinischen Zeichen Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose und Gewichtsverlust gekennzeichnet ist. Der Insulinmangel manifestiert sich in Form einer gestörten Glukosetoleranz über mäßig erhöhte Nüchternblutglukosewerte bis hin zur abrupt einsetzenden absoluten Insulinbedürftigkeit mit ketoazidotischer Stoffwechselentgleisung und möglichem Bewusstseinsverlust. Vorrangig tritt der Typ 1 Diabetes in jüngeren Lebensjahren auf, kann sich aber auch im späteren Lebensalter manifestieren. In der Regel beginnt er abrupt mit plötzlich einsetzenden Beschwerden und Symptomen. 15 bis 25 Prozent der schweren, bis zum Bewusstseinsverlust führenden ketoazidotischen Stoffwechselentgleisungen, stellen als „Manifestationskoma“ den Beginn der Krankheit dar [3]. Jedoch kann sich der Insulinmangel zunächst auch nur als gestörte Glukosetoleranz zeigen. In solchen Fällen führt eine akute Stoffwechselbelastung, zum Beispiel durch Infekte oder Operationen, zur Entgleisung in eine häufig schwere Ketoazidose. In anderen Fällen wiederum, vor allem bei Patienten, bei denen sich der Typ 1 Diabetes erst im Erwachsenenalter manifestiert (latent autoimmune diabetes in adults, LADA), bleibt über Jahre eine Restfunktion der B-Zellen erhalten, die eine ketoazidotische Stoffwechselentgleisung verhindert [4].

Der Typ 2 Diabetes ist eine Erkrankung, die selten zu schweren Stoffwechselentgleisungen, aber häufig zu schwerer Mikro- und Makroangiopathie sowie Neuropathie führen kann. Er stellt die häufigste Form des Diabetes mellitus in Deutschland dar. Es besteht eine phänotypische Variabilität mit unterschiedlich schwer ausgeprägten Störungen der Insulinwirkung und der Insulinsekretion bei den meist übergewichtigen Patienten. Für den Typ 2 Diabetes besteht eine genetische Determinierung. Die zugrundeliegenden genetischen Faktoren sind im Detail noch unbekannt. In Untersuchungen an eineiigen Zwillingen wurde beobachtet, dass zu circa 90 Prozent beide Geschwister

an einem Typ 2 Diabetes erkrankten [5, 6]. Die genetische Penetranz ist demzufolge sehr hoch. Der Pathomechanismus für die Entstehung des Typ 2 Diabetes beruht auf einer gestörten Insulinsekretion [7-11] und/oder einer Insulinresistenz [9, 12-15]. Beim Typ 2 Diabetes besteht keine autoimmune Zerstörung der B-Zellen. Neben der genetischen Disposition spielen Übergewicht, unausgewogene und einseitige Ernährung sowie mangelnde körperliche Aktivität und höheres Lebensalter eine ausschlaggebende Rolle. Die Stammfettsucht gilt als unabhängiger Risikofaktor für die Manifestation eines Typ 2 Diabetes [16-21]. Dieser kann in seltenen Fällen auch bei Jugendlichen auftreten [22-24]. Tabelle 1 stellt die nosologische Klassifikation des Diabetes mellitus mit weiteren Unterformen nach ADA dar.

2.1.3 EPIDEMIOLOGIE

Im Rahmen der 46. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft wurde, zusammengefasst aus verschiedenen Datenquellen, die Häufigkeit des diagnostizierten Typ 2 Diabetes in der erwachsenen Bevölkerung in Deutschland mit etwa acht Prozent (sechs Millionen) angegeben [25]. Der aktuelle Diabetes-Atlas der International Diabetes Federation (IDF) gibt sogar eine Häufigkeit von zwölf Prozent an [26]. Demzufolge wird die Zahl der Menschen mit Diabetes in Europa bis 2030 um 20 Prozent ansteigen. Anhand einer Studie des Deutschen Diabetes-Zentrums Düsseldorf (DDZ) ist ein möglicher Anstieg um mehr als 1,5 Millionen [24] in Deutschland bis 2030 in der Altersklasse der 55- bis 74-Jährigen möglich. Außerdem wurde darauf verwiesen, dass, wenn jede zweite Person mit erhöhtem Diabetesrisiko (Prädiabetes) an einem Präventionsprogramm teilnehmen würde, sich mindestens ein Viertel der zukünftigen Diabetesfälle vermeiden ließe.

2.1.4 MAKRO- / MIKROANGIOPATHIE

Die diabetischen Gefäßschäden werden in eine unspezifische Makroangiopathie und eine diabetesspezifische Mikroangiopathie mit Verdickung der kapillären Basalmembranen unterteilt [27]. Prädilektionsstellen der Makroangiopathie können die Koronargefäße (Folge: Koronare Herzkrankheit), die peripheren Arterien (Folge: Periphere arterielle Verschlusskrankheit) und auch die Hirnarterien (Folge: arterielle Verschlusskrankheit der Hirnarterien und ischämischer Hirninfarkt) sein. Veränderungen durch die Mikroangiopathie können sich vor allem an den Nieren (diabetische Nephropathie), dem Augenhintergrund (diabetische Retinopathie) sowie an den Nerven (diabetische

Neuropathie) zeigen. Im Rahmen dieser Arbeit werden im Folgenden die diabetische Neuropathie und Retinopathie näher betrachtet.

I. Typ 1 Diabetes	
B-Zell-Zerstörung, die üblicherweise zum absoluten Insulinmangel führt	
A. Immunologisch vermittelt	B. Idiopathisch
II. Typ 2 Diabetes	
Kann sich von einer vorliegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken	
III. Andere spezifische Diabetes-Typen	
A. Genetische Defekte der B-Zell-Funktion zum Beispiel	
<ul style="list-style-type: none"> • Chromosom 12, HNF-1α (frühere Bezeichnung MODY 3) • Chromosom 7, Glucokinase (GCK) (frühere Bezeichnung MODY 2) • Chromosom 20, HNF- 4α (frühere Bezeichnung MODY 1) • Mitochondriale DNA 	
B. Genetische Defekte der Insulinwirkung, zum Beispiel	
<ul style="list-style-type: none"> • Typ A Insulinresistenz • Leprechaunismus • Rabson-Mendenhall-Syndrom • Lipatrophischer Diabetes 	
C. Erkrankungen des exokrinen Pankreas, zum Beispiel	
<ul style="list-style-type: none"> • Pankreatitis • Trauma, Pankreatektomie • Neoplasie • Zystische Fibrose • Hämochromatose • Fibrosierend verkalkende Pankreopathie (Fibrocalculus pancreopathy – FCPD) 	
D. Endokrinopathien, zum Beispiel	
<ul style="list-style-type: none"> • Akromegalie • Cushing-Syndrom • Glukagonom • Phäochromozytom • Hyperthyreose • Somatostatinom • Aldosteronom 	
E. Medikamenten- oder chemikalieninduziert, zum Beispiel	
<ul style="list-style-type: none"> • Neuroleptika (insbes. Clozapin, Olanzapin) • Pentamidin • Nikotinsäure • Glukokortikoide • Schilddrüsenhormone • Diazoxid • β-adrenerge Agonisten • Thiazide • Phenytoin • Alpha- Interferon 	
F. Infektionen, zum Beispiel	
<ul style="list-style-type: none"> • Kongenitale Rötelninfektion • Zytomegalievirus 	
G. Seltene Formen des immunvermittelten Diabetes, zum Beispiel	
<ul style="list-style-type: none"> • „Stiff-Person“-Syndrom • Antiinsulinrezeptorantikörper 	
H. Andere gelegentlich mit Diabetes assoziierte genetische Syndrome, zum Beispiel	
<ul style="list-style-type: none"> • Down-Syndrom • Klinefelter-Syndrom • Turner-Syndrom • Wolfram-Syndrom • Laurence-Moon-Biedl-Syndrom • Chorea Huntington • Dystrophia myotonica • Porphyrie • Prader-Willi-Syndrom 	

TABELLE 1: NOSOLOGISCHE KLASSIFIKATION DES DIABETES MELLITUS NACH ADA [2]

2.2 DIABETISCHE NEUROPATHIE

2.2.1 DEFINITION

Die diabetische Neuropathie ist eine klinisch manifeste oder subklinische Erkrankung der peripheren Nerven, die infolge des Diabetes mellitus ohne andere Ursachen auftritt. Sie kann sowohl das somatische als auch das autonome Nervensystem betreffen [28]. Die Einteilung nach Thomas [29] ist die am weitesten verbreitete Einteilung der diabetischen Neuropathie und umfasst alle in Tabelle 2 aufgeführten Neuropathieformen, außer der autonomen diabetischen Neuropathie.

I. Symmetrische Polyneuropathien
<ul style="list-style-type: none"> • Sensible oder sensomotorische Polyneuropathie • Autonome Neuropathie • Symmetrische proximale Neuropathie der unteren Extremität
II. Fokale und multifokale Neuropathien
<ul style="list-style-type: none"> • Kraniale Neuropathie • Mononeuropathie des Stammes und der Extremitäten • Asymmetrische proximale Neuropathie der unteren Extremitäten
III. Mischformen

TABELLE 2 : KLASSIFIKATION DER DIABETISCHEN NEUROPATHIE NACH THOMAS [29]

Diese Einteilung wurde anschließend modifiziert. Dabei wird zwischen schnell reversiblen, persistierenden symmetrischen Polyneuropathien und fokalen oder multifokalen Polyneuropathien unterschieden, siehe Tabelle 3 [30].

I. Schnell reversible Polyneuropathien
<ul style="list-style-type: none"> • Hyperglykämische Neuropathie
II. Persistierende symmetrische Polyneuropathien
<ul style="list-style-type: none"> • Distale somatische sensorische/motorische Polyneuropathien überwiegend die langen Fasern betreffend • Autonome Neuropathien • „Small-Fiber“-Neuropathien
III. Fokale / Multifokale Neuropathien
<ul style="list-style-type: none"> • Kraniale Neuropathien • Thorakoabdominale Radikulopathien • Fokale limbale Neuropathien • Proximale Neuropathien • Kompressions- und Engpassneuropathien

TABELLE 3: KLASSIFIKATION DER DIABETISCHEN NEUROPATHIE NACH SIMA ET AL. [30]

2.2.2 EPIDEMIOLOGIE

Die distalen symmetrischen sensorischen oder sensomotorischen Polyneuropathien (DPN) stellen die wichtigste klinische Manifestation dar [31]. Die Prävalenz dieser Neuropathieformen liegt bei Patienten mit Typ 1 oder Typ 2 Diabetes im Mittel bei etwa 30 Prozent [31, 32].

Die Lebensqualität ist im Vergleich zu Patienten ohne sensomotorische diabetische Neuropathien erniedrigt [33]. Außerdem ist das Mortalitätsrisiko [34] und das Risiko für ein diabetisches Fußsyndrom erhöht [35]. Weiterhin bestehen Assoziationen mit Diabetesdauer, Blutzuckereinstellung, diabetischer Retinopathie und anderen Risikofaktoren [36].

2.2.3 ÄTIOLOGIE

Die wichtigsten ätiologischen Faktoren, welche mit der diabetischen Polyneuropathie in Verbindung gebracht werden, sind eine schlechte Blutzuckereinstellung, viszerale Adipositas, Diabetesdauer, Hypertonie, Alter, Rauchen, Hypoinsulinämie und eine Dyslipidämie [31].

2.2.4 PATHOGENESE

Aktuellere experimentelle Studien weisen auf eine multifaktorielle Pathogenese hin [37-39]. Die meisten Daten wurden durch Studien, basierend auf dem diabetischen Rattenmodell, generiert. Momentan werden sechs pathogenetische Mechanismen diskutiert [40, 41]. Diese wurden nicht separat betrachtet, sondern als ein komplexes Zusammenspiel mit multiplen Interaktionen zwischen metabolischen (Polyol-Pfad) und vaskulären Faktoren (Mikroangiopathie), welche im Folgenden näher beschrieben werden.

Ein erhöhter Umsatz im Polyolstoffwechsel mit Akkumulation von Sorbitol und Fruktose, einer Depletion von Myo-Inositol, Reduktion der Aktivität der Na²⁺-K⁺-ATPase und Veränderungen der Expression verschiedener Isoenzyme der Proteinkinase C (PKC) bilden einen Erklärungsansatz. Des Weiteren werden Störungen im Metabolismus der 6-n essenziellen Fettsäuren und Prostaglandine, die zur Änderung der Struktur der Nervenmembran sowie zu mikrovaskulären und hämorheologischen Veränderungen führen, verantwortlich gemacht. Auch vaskuläre Ursachen mit konsekutiver Ischämie beziehungsweise Hypoxie, die Bildung freier Sauerstoffradikale (oxidativer Stress) und eine so genannte „hyperglykämische Pseudohypoxie“ stellen

einen weiteren Pathogenesefaktor dar. Störungen des Neurotrophismus mit reduzierter Expression und ein Mangel an neurotrophen Faktoren (zum Beispiel nerve growth factor (NGF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Insulin-like growth factor (IGF)) sowie Störungen des axonalen Transports werden ebenfalls als Pathogenesefaktor in Betracht gezogen. Auch werden eine nicht-enzymatische Glykierung mit erhöhten glykierten Blutproteinen und Akkumulation von Glykierungsendprodukten (AGEs: advanced glycation endproducts) an Nerven- und/oder Gefäßwandproteinen sowie Immunprozesse mit Autoantikörpern gegen den Nervus vagus, sympathische Ganglien und das Nebennierenmark diskutiert. Weitere Erklärungsansätze beinhalten Zytokine (zum Beispiel Interleukine, TNF α und TNF β) mit ihren Effekten auf die Homöostase des peripheren und zentralen Nervensystems [42, 43].

2.2.5 PRÄVENTION

Eine sensomotorische diabetische Neuropathie ist ein wesentlicher unabhängiger Risikofaktor für die Manifestation eines diabetischen Fußsyndroms [44, 45]. Bei den präventiven Strategien steht die Frühdiagnose einer vorwiegend sensiblen, peripheren Neuropathie an erster Stelle [46]. Aufgrund prospektiver Studien besteht heute eine zunehmende Evidenz, dass einzelne Maße der Polyneuropathie wie Vibrationsschwel- lenerhöhung und Verlangsamung der Nervenleitgeschwindigkeit ein erhöhtes Mortali- tätsrisiko anzeigen [34, 37].

2.2.6 DIAGNOSEKRITERIEN

Zu den meist verwendeten und anerkannten Untersuchungsscores für die diabetische Polyneuropathie zählen der Neuropathie Defizit Score (NDS), der NIS-LL (Neuropathy Impairment Score In The Lower Limbs), das MNSI (Michigan Neuropathy Screening Instrument) und der CE-V (Clinical Examination Score of Valk) [47]. Der NSS (Neuro- pathie Symptom Score) [32], ergänzt durch den Neuropathie Defizit Score, ist nicht nur diagnostisches Instrument, sondern auch eine prognostische Quantifizierung, die es ermöglicht, die Prävention individuell an den Patienten anzupassen.

Der NSS (Tabelle 4) besteht aus Fragestellungen hinsichtlich der Symptomatik, Loka- lisation, Exazerbation und Besserung der Symptome. Hierbei wird ein Gesamtscore bestimmt. Ein Score von 3-4 bedeutet leichte, ein Score von 5-6 mäßige, ein Score von 7-10 schwere neuropathische Defizite.

Der NDS beinhaltet neurologische Untersuchungen, welche im Folgenden näher erläutert werden (Tabelle 5) [32]. Zur Erhebung des NDS gehört u.a. die Prüfung des Achillessehnenreflexes beziehungsweise des Patellarsehnenreflexes. Die Überprüfung der Vibrationsempfindung sollte mit einer 128-Hz-Stimmgabel (nach Rydel-Seiffer) am Großzehengrundgelenk durchgeführt werden (Abbildung 1-4). Falls dort kein Empfinden besteht, sollte die Untersuchung weiter proximal am Malleolus medialis wiederholt werden. Die untere Normgrenze für die Überprüfung proximal des Großzehengrundgelenkes beträgt 6/8 (für Patienten unter 30 Jahre) und 5/8 (für Patienten über 30 Jahre) [48]. Für eine Untersuchung am Malleolus medialis beträgt die untere Normgrenze 6/8 (für Patienten unter 40 Jahre) und 5/8 (für Patienten über 40 Jahre) [49]. Die Schmerzempfindung sollte am Fußrücken mit einem Zahnstocher, einer Einmalnadel oder dem Neurotip durchgeführt werden. Dabei sollte „Ist es schmerzhaft?“ und nicht „Können Sie die Nadel fühlen?“ gefragt werden. Die Testung des Temperaturempfindens am Fußrücken kann mit einer kalten Stimmgabel, einem eiswassergekühlten Reagenzglas oder dem Tip-Therm durchgeführt werden. Aus diesen Untersuchungsergebnissen wird ein Gesamtscore bestimmt. Ein Score von 3-5 bedeutet leichte, ein Score von 6-8 mäßige und ein Score von 9-10 schwere neuropathische Defizite. Die Bedeutung dieser Scores liegt darin, dass sie in den meisten klinischen Versuchen verwendet wurden und dadurch eine prognostische Einschätzung präsentieren können. So zeigt beispielsweise ein Score ≥ 6 eine Versechsfachung des relativen Risikos von Fußulzera [50].



ABBILDUNG 1: UNTERSUCHUNG DER VIBRATIONSEMPFINDUNG MITTELS 128-HZ-STIMMGABEL NACH RYDEL-SEIFFER [152]



ABBILDUNG 2: DÄMPFER
STIMMGABEL LINKS
C64/C128
RYDEL-SEIFFER [100]

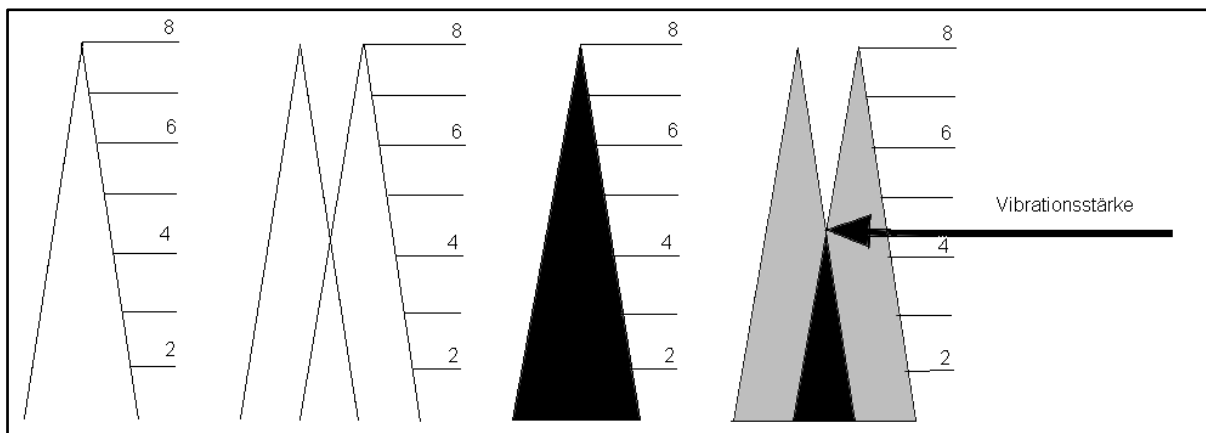


ABBILDUNG 3: FESTSTELLEN DER VIBRATIONSTÄRKE [150]

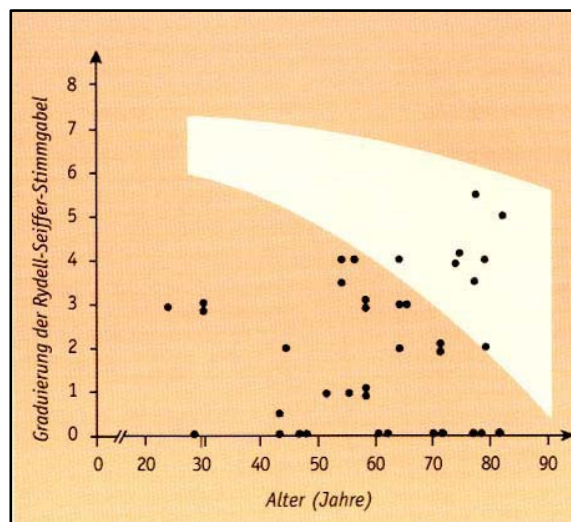


ABBILDUNG 4: ALTERSBEZOGENE NORMWERTE (HELL: 95%IGER-VERTRAUENSBEREICH) DES VIBRATIONSEMPFINDENS IN ACHTELGRADEN AUF DER RYDEL-SEIFFER-STIMMGABEL [151]



ABBILDUNG 5: 10 G - MONOFILAMENT ZUR ÜBERPRÜFUNG DES DRUCK-/TASTEMPFINDENS, GLEICHZEITIG AUCH ALS TIP-THERM ZUR ÜBERPRÜFUNG DES TEMPERATUREMPFINDENS UND MITTELS INTEGRIERTEM NEUROTIP ZUR ÜBERPRÜFUNG DER SCHMERZEMPFINDEUNG VERWENDBAR [152]

Symptomatik: Fuß/ Unterschenkel			
	Ja	Nein	
Brennen	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 0	Punkte:
Taubheitsgefühl	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 0	
Parästhesien	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 0	
Schwächegefühl (Ermüdung, Erschöpfung)	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0	Punkte:
Krämpfe	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0	
Schmerzen	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 0	
Lokalisation			
Füße	<input type="checkbox"/> 2		Punkte:
Unterschenkel	<input type="checkbox"/> 1		
Woanders	<input type="checkbox"/> 0		
Exazerbation			
Nachts vorhanden	<input type="checkbox"/> 2		Score von:
Tagsüber und nachts vorhanden	<input type="checkbox"/> 1		
Nur tagsüber vorhanden	<input type="checkbox"/> 0		
Patient wird durch Symptome aus dem Schlaf geweckt	<input type="checkbox"/> 1 addieren		Punkte:
Symptombesserung beim			
Gehen	<input type="checkbox"/> 2		Punkte:
Stehen	<input type="checkbox"/> 1		
Sitzen oder Hinlegen	<input type="checkbox"/> 0		
	Gesamtscore		

TABELLE 4: EVALUATIONSBOGEN ZUR ERHEBUNG DES NEUROPATHIE SYMPTOM SCORE [32]

Achillessehnenreflex		
Reflexe	rechts	links
Normal	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0
Vermindert	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 1
Fehlend	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 2
Vibrationsempfindung		
Messung dorsal am Großzehengrundgelenk	rechts	links
Normal	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0
vermindert/ fehlend	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 1
Schmerzempfindung		
Messung am Fußrücken	rechts	links
Normal	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0
vermindert/ fehlend	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 1
Temperaturempfinden		
Messung am Fußrücken	rechts	links
Normal	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 0
vermindert/ fehlend	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 1
		Gesamtscore:

TABELLE 5: EVALUATIONSBOGEN ZUR ERHEBUNG DES NEUROPATHIE DEFIZIT SCORE [32]

2.3 DIABETISCHE RETINOPATHIE UND MAKULOPATHIE

2.3.1 DEFINITION

Netzhautveränderungen als Folge einer Mikroangiopathie des Auges bei Diabetes mellitus werden als diabetische Retinopathie zusammengefasst [51]. Die diabetische Retinopathie wird in nicht proliferative und proliferative Stadien eingeteilt. Diese Einteilung erfolgt anhand von Standardfotos der Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group [52]. In Tabelle 6 sind Stadium und klinische Bilder der diabetischen Retinopathie nach der „Global Diabetic Retinopathy Project Group“ dargestellt [53].

2.3.2 EPIDEMIOLOGIE

Netzhautkomplikationen des Diabetes wie die Retinopathie und die Makulopathie stellen die häufigsten Manifestationsformen der diabetischen Mikroangiopathie dar [54].

Bei einem Typ 1 Diabetes entwickelt sich nach 5-jähriger Dauer in ca. 20 bis 25 %, nach 15 bis 20-jähriger Dauer in circa 95 % eine Retinopathie [55]. Über 50 % entwickeln nach 20-jähriger Diabetesdauer eine proliferative diabetische Retinopathie, bei 5 bis 7 % bereits nach 5 bis 8 Jahren [55]. Jedoch entwickeln ca. 20 % der Diabetes 1 Patienten nach 40-jähriger Diabetesdauer nur eine milde, nicht-proliferative Retinopathie [56]. Nach mehr als 15-jähriger Diabetesdauer findet sich bei ca. 15% eine Makulopathie [55]. In bis zu 36 % der Diabetes Typ 2 Fälle besteht bereits bei Diagnosestellung eine Retinopathie [57]. Nach 5-jähriger Dauer eines Typ 2 Diabetes ohne Insulinbehandlung besteht bei ca. 30 %, nach circa 15 bis 20-jähriger Dauer bei ca. 50 % eine Retinopathie. Ein Anteil von ca. 5 bis 10 % entwickeln eine proliferative diabetische Retinopathie [55]. Beim Typ 2 Diabetes mit Insulinbehandlung besteht nach 5-jähriger Diabetesdauer bei ca. 40-50 %, nach 15 bis 20-jähriger Diabetesdauer bei ca. 80 % eine Retinopathie. Eine proliferative diabetische Retinopathie entwickeln ca. 30 % [55]. Nach mehr als 15-jähriger Diabetesdauer vom Typ 2 mit Insulinbehandlung entwickelt sich bei bis zu 25 % ein klinisch signifikantes Makulaödem [55].

2.3.3 ÄTIOLOGIE

Die chronische Hyperglykämie ist ein gesicherter kausaler Faktor der diabetischen Mikroangiopathie [58]. Außerdem üben folgende Faktoren einen Einfluss auf die Entwicklung beziehungsweise Progression einer Retinopathie beziehungsweise Makulopathie aus: arterielle Hypertonie [57, 59, 60], ein hoher systolischer beziehungsweise hoher diastolischer Blutdruck [59], hormonelle Einflüsse (Pubertät, Schwangerschaft) [61-65] und Dyslipoproteinämie [66-70].

2.3.4 PATHOGENESE

Die Hyperglykämie beim Diabetes mellitus führt zur Bildung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs), zur Aktivierung des Polyolstoffwechsels und beeinflusst zelluläre Signaltransduktionswege. Daraus resultieren eine Hyperviskosität, ein prothrombotisches und proinflammatorisches Milieu mit entzündlichen Reaktionen, eine verminderte Verformbarkeit der Blutzellen, Leukozytenadhäsion und oxidativer Stress. Bekannte Pathomechanismen an der diabetischen Retinopathie sind: Aktivierung des Aldose-Reduktase-Weges, Aktivierung zellulärer Signalwege durch glykolytische Intermediate, nicht enzymatische Glykierung und deren Folgeprodukte und die Verschie-

bung des intrazellulären Redoxpotentials. In allen Stadien der Manifestation und Progression der diabetischen Retinopathie spielen Wachstumsfaktoren eine essenzielle Rolle. Die retinale Hypoxie prägt die späten Stadien der diabetischen Retinopathie. Angiogene Faktoren wie zum Beispiel Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) verursachen Neovaskularisationen und damit das Endstadium der diabetischen Retinopathie [52].

2.3.5 PRÄVENTION

Eine optimale Diabeteseinstellung, Behandlung von Risikofaktoren und die ophthalmologische Therapie der diabetischen Retinopathie können diese Erblindungsursache um bis zu 90 % reduzieren [52].

Stadium	Klinisches Bild
I. Nicht proliferativ	
A. Mild	Mikroaneurysmen
B. Mäßig	Mikroaneurysmen Einzelne intraretinale Blutungen Perlschnurartige Venen
C. Schwer	„4-2-1“-Regel: > 20 Mikroaneurysmen und intraretinale Blutungen in 4 Quadranten oder Perlschnurartige Venen in 2 Quadranten oder Intraretinale mikrovaskuläre Anomalien (IRMA) in 1 Quadranten
II. Proliferativ	Papillenproliferation Papillenferne Proliferation Präretinale Blutung Traktionsbedingte Netzhautablösung

TABELLE 6: STADIUM UND KLINISCHE BILDER DER DIABETISCHEN RETINOPATHIE NACH DER „GLOBAL DIABETIC RETINOPATHY PROJECT GROUP“ [53]

2.4 KORNEA

Die Kornea (Hornhaut), eine komplexe Struktur, ein avaskuläres und transparentes Gewebe, das nicht nur eine Schutzfunktion hat, sondern auch für circa zwei Drittel der optischen Brechkraft des Auges verantwortlich ist, ist das am dichtesten innervierte Gewebe des menschlichen Körpers [71] (Abbildung 6). Minimaler Kontakt provoziert den Lidreflex zum Schutz des Auges. Mechanische, thermische und chemische Reize rufen durch Stimulation der Hornhautnerven überwiegend ein Gefühl von Schmerzen hervor [128]. Neben ihrer wichtigen sensorischen Funktion helfen Hornhautnerven, die funktionelle Integrität der Augenoberfläche durch Freisetzung trophischer Substanzen aufrecht zu erhalten, die Homöostase des Hornhautepithels zu fördern und durch die Aktivierung von Hirnstammreflexen die Tränenproduktion und den Lidreflex zu stimulieren. Histochemische Studien haben das Vorhandensein von verschiedenen Neurotransmittern, einschließlich Substanz P, Calcitonin Gene-Related Peptide, Neuropeptid Y, Vasoaktivem Intestinalem Peptid, Galanin, Methionin, Enkephalin, Katecholaminen und Acetylcholin in der Hornhaut gezeigt [129]. Schäden an den Hornhautnerven, die durch chirurgische Interventionen, Traumata oder systemische Erkrankungen hervorgerufen wurden, führen zu einer Beeinträchtigung der Empfindlichkeit der Hornhaut und zu Veränderungen in der funktionellen Integrität der Augenoberfläche [128].

Die sensorischen Nerven, welche die Mehrheit der Hornhautnerven darstellen, werden vor allem vom ersten Ast des Nervus trigeminus, dem Nervus ophthalmicus [130] abgeleitet. Dieser verzweigt sich mehrmals und bildet ein loses Netzwerk von Axonen. Diese Nervenäste treten zirkumferentiell in der Peripherie der Hornhaut ein und verlaufen radiär parallel zur Hornhautoberfläche [131]. Sie verlieren ihr Perineum und ihre Myelinscheiden innerhalb des ersten Millimeters des Limbus und werden nur von Schwannschen Zellen umgeben. Sie unterteilen sich in kleinere Seitenäste, welche in semiradialer Richtung durch das mittlere Drittel des Hornhautstromas ziehen und einen dichten subepithelialen Plexus bilden. Auf ihrem weiteren Weg durchbrechen sie die Bowman-Membran und formieren nun den dichten subbasalen Nervenplexus, dessen Verzweigungen in allen Schichten des Hornhautepithels enden [72, 73]. Die corneoepithelialen Nervenenden sind differenziert und typenspezifisch im Epithel angeordnet. Diese sind strukturell und funktional ähnlich myelinisierten A δ - Fasern sowie marklosen C- Fasern. A δ - Fasern mit großem Durchmesser sind gerade Nerven, die in erster Linie auf mechanische Reize reagieren, während C-Fasern mit kleinem Durchmesser auf thermische und chemische Reize reagieren.

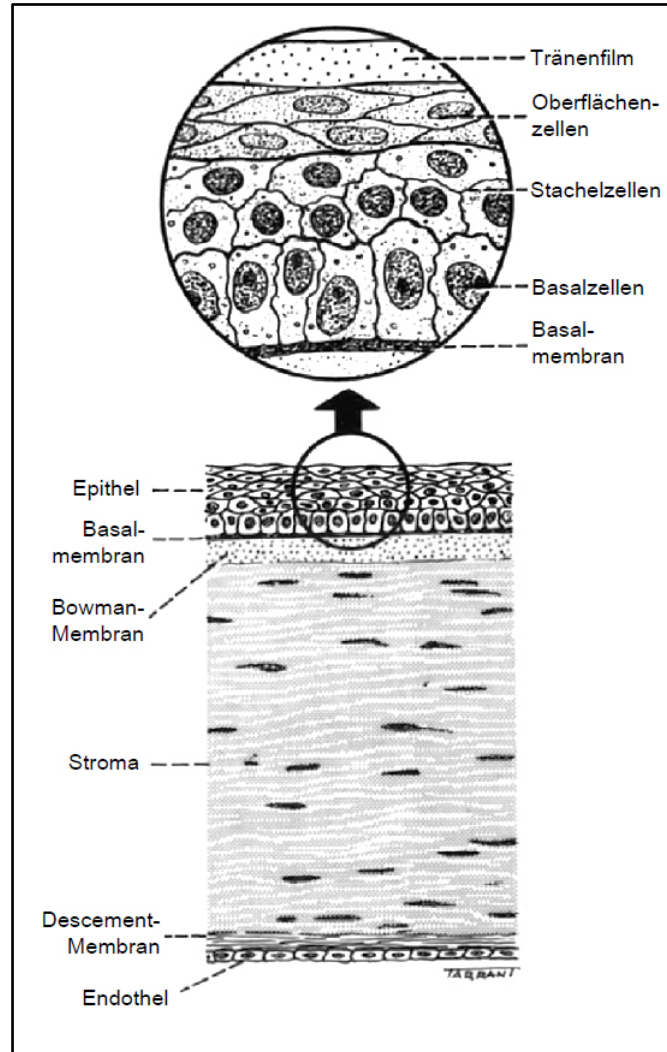


ABBILDUNG 6: ANATOMIE DER KORNEA [71]

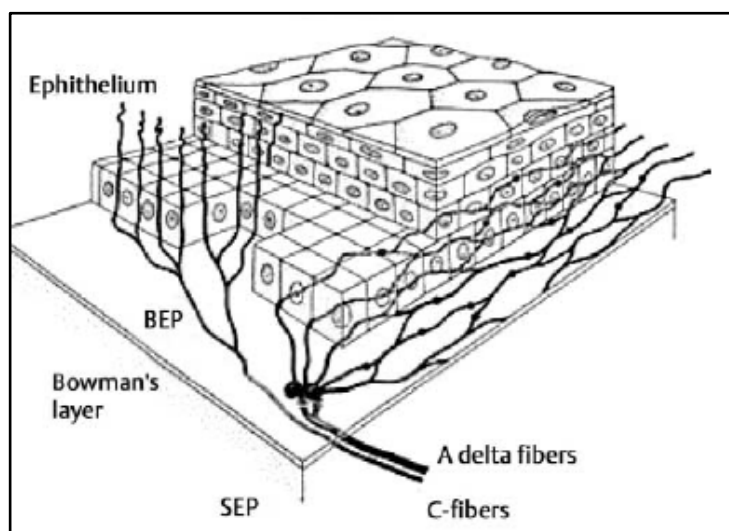


ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE ZEICHNUNG DER KORNEALEN INNERVATION [153]

2.5 PROBLEMSTELLUNG

Inhalt dieser Arbeit ist die Untersuchung der Möglichkeit einer nichtinvasiven diagnostischen Methode zur Beurteilung und Früherkennung der diabetischen Neuropathie und Retinopathie. Dazu werden zusätzlich zu den gängigen Parametern der diabetischen Neuropathie (Neuropathie Defizit Score, Neuropathie Symptom Score) die neuropathiebedingten Alterationen des subbasalen Nervenplexus der Hornhaut mittels konfokaler In-vivo-Mikroskopie qualitativ und quantitativ analysiert.

III. MATERIAL UND METHODEN

3.1 PROBANDEN

Die Studie wurde durch die Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock bewilligt (Nummer A 2008 81). Die Untersuchungen entsprechen den Grundsätzen der Deklaration von Helsinki. Insgesamt 38 Probanden nahmen an der Studie teil. Es wurde jeweils ein Auge eines Probanden untersucht. Die Untersuchungen erfolgten nach einer ausführlichen Aufklärung. Normalprobanden sowie Diabetespatienten haben ein Aufklärungs- und Einwilligungsformular unterschrieben.

3.1.1 NORMALPROBANDEN

Zur Erhebung eines konfokalmikroskopischen Normalbefundes wurden 20 Augen von 20 Normalprobanden untersucht. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte aus dem Patientengut der Universitätsaugenklinik Rostock auf freiwilliger Basis. Folgende Einschlusskriterien wurden festgelegt:

1. Innerhalb der letzten Jahre keinerlei Medikation, die Einfluss auf die Hornhaut und somit auf die Untersuchung nehmen konnte.
2. Keine Hornhauterkrankungen, beziehungsweise Operationen im Bereich des betreffenden Auges.
3. Insgesamt beinhaltete die Studie 20 im Vergleich zur Diabetesgruppe altersgematchte Probanden (12 weiblich, 8 männlich) im Alter von $66,3 \pm 13,3$ Jahren.

3.1.2 PROBANDEN MIT DIABETES MELLITUS

In dieser Gruppe wurden insgesamt 18 Augen von 18 Diabetes mellitus Patienten Typ 2 (9 weiblich, 9 männlich) im Alter von $68,8$ Jahren $\pm 8,8$ untersucht. Die Diabetesdauer betrug $15,1 \pm 9,9$ Jahre. Der HbA1c betrug $8,2 \pm 1,6\%$. Die Rekrutierung der Patienten erfolgte in Zusammenarbeit mit der Klinik für Innere Medizin I, Klinikum Südstadt, Rostock.

Folgende Einschlusskriterien waren Voraussetzung zur Teilnahme an der Studie:

1. Diabetes mellitus Typ 2 Patient.
2. Bis zu zwei Jahre vor der Untersuchung keine Einnahme von Medikamenten, die Hornhautveränderungen hervorrufen können.
3. Kein Vorliegen zusätzlicher Hornhauterkrankungen oder hornhautstrukturbeeinflussender Zustände (Zustand nach Operation etc.). Zusätzlich wurden die Diabetesprobanden anhand des Vorhandenseins beziehungsweise Fehlens einer diabetischen Neuropathie und Retinopathie eingeteilt.

3.2 METHODEN

3.2.1 AUGENÄRZTLICHE UNTERSUCHUNGEN UND SPALTLAMPENMIKROSKOPIE

Es erfolgten die gängigen ophthalmologischen Untersuchungen des vorderen Augenabschnittes sowie des Fundus mittels Spaltlampenbiomikroskopie. Zusätzlich zur augenärztlichen Untersuchung inklusive der Visusprüfung wurden eine Erhebung der Allgemeinanamnese sowie eine ophthalmologische Anamnese durchgeführt. Die spaltlampenbiomikroskopische Untersuchung der Normalprobanden diente der Absicherung des Augenbefundes zur Vermeidung von Fehleinschätzungen. Die Diabetesprobanden wurden hinsichtlich typischer Augenveränderungen bei Diabetes mellitus untersucht. Dazu zählen unter anderem die diabetische Retinopathie, die Cataracta diabetica und die Rubeosis iridis.

3.2.2 KONFOKALE IN-VIVO-MIKROSKOPIE

Die Hornhäute gesunder Probanden und die der Diabetespatienten wurden in vivo mit der Technik der CLSM untersucht. Diese Technik basiert auf Nutzung des Heidelberg-Retina-Tomographs II (HRT II, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland) in Kombination mit dem Rostock Cornea Modul (RCM, Heidelberg Engineering, Heidelberg, Deutschland).

Aufgrund seiner Unzufriedenheit mit den Ergebnissen der Spaltlampenfotografie, welche zu der damaligen Zeit immer nur ein Teilbild dargestellt hatte, entwickelte 1940 der damalige Direktor der Universitätsaugenklinik Bern, Prof. Dr. Goldmann, ein Gerät, welches einen „echten“ optischen Schnitt durch das Auge mit Darstellung aller Feinheiten ermöglicht hatte [74]. Er beschrieb ein konfokales Spaltlampensystem linearer Beleuchtung [75]. Marvin Minsky, der 1957 mit seinem eingereichten Patent als Erfinder der konfokalen Mikroskopie anerkannt ist, forschte an Hirngewebe, was jedoch zu dieser Zeit aufgrund mangels an entsprechenden Laserdioden und nicht genügender Leistung technisch limitiert war und wahrscheinlich dadurch keine Beachtung fand [76]. Eine Form des konfokalen Mikroskops, welches eine Reihe von Öffnungen auf einer sich drehenden Nipkow-Scheibe enthielt, wurde von Pêtrán 1966 patentiert. Pêtrán nannte es „Tandem-Scanning-Mikroskop“ [75]. Maurice beschrieb 1968 ein konfokales Scanning-Mikroskop, mit dem eine Darstellung des Endothels, des Stromas, der Descemet-Membran sowie des Epithels von Kaninchen mit bis zu 500-facher Auflösung möglich war [77, 78]. In den folgenden Jahren fanden durch verschiedene Studiengruppen weitere ex vivo Untersuchungen mit dem Tandem-Scanning-Mikroskop

statt. Als nächstes waren in vivo Untersuchungen das Ziel von Studiengruppen wie Cavanagh et al. [79] oder Masters et al. [80]. Des Weiteren wurde 1994 durch Masters und Kollegen von einem neuen „Real-time“-Scanning-Mikroskop berichtet, welches über ausreichend Lichtsammelleffizienz verfügte, sodass genaue in vivo Aufnahmen mit hohem Kontrast durchgeführt werden konnten [80]. Arbeitsgruppen, unter anderen um Guthoff und Stave, arbeiteten mit dieser Technik und modulierten sie. In diesem Fall wurde das konfokale Laser Scanning Ophthalmoskop CLSO (Zeiss) durch Kombination mit einem Objektivadapter, der den Laserstrahl auf die vorderen Abschnitte des Auges fokussiert, zu einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop moduliert [81]. 2002 berichteten Stave und Kollegen über die Entwicklung eines Objektivvorsatzes zur Fokussierung des Lasers auf die Kornea für den HRT (Heidelberg-Retina-Tomographen) [82]. Dieser wurde und wird auch immer noch zur Diagnostik und Dokumentation von Sehnervenkopfveränderungen bei Glaukompatienten genutzt [83, 84].

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit dem HRT II in Kombination mit dem von Stave und Kollegen entwickelten Rostock Cornea Module-RCM (Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany) durchgeführt. Zwischen einer Lichtquelle und einer Detektorfläche wird Laserlicht reflektiert. Nur ein Objekt innerhalb der fokalen Ebene kann wiedergegeben werden [85]. Das HRTII-RCM-System verwendet als Laserquelle eine Laserdiode mit einer Wellenlänge von 670 nm und ist mit einem Wasser-Immersionsobjektiv (63x/0.95W, 670 nm; Zeiss, Jena, Deutschland) ausgestattet. Die Frontlinse wird über eine sterile Einweg-Polymethylmethacrylat-Kappe (Tomo-Cap) unter Nutzung von Vidisic® Augengel (Bausch & Lomb, Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland) an die Hornhaut gekoppelt. Dieses Gel hat einen der Hornhaut ähnlichen Brechungsindex (Brechungsindex 1,35) und bildet so eine homogene Immersion zwischen den Strukturen. Um die korrekte Position des Immersionsobjektives während des Untersuchungsvorganges zu kontrollieren, ist neben dem Objektivadapter eine Kamera angebracht. Zuvor wurde das zu untersuchende Auge mit Proparackain 0,5 % (Augentropfen Ursapharm, Saarbrücken, Deutschland) anästhetisiert, da ein ungestörter Kontakt zwischen Patientenkornea und Modul notwendig ist. Die Bildaufnahme der zentralen Hornhaut wurde im z-Scan eines automatischen Volumen-Scan-Modus (30 Bilder, Volumentiefe 60 µm, konstanter Zwischenschichtabstand 2 µm) durchgeführt. Die aufgenommenen Bilder sind mit einer Fläche von 400x400 µm definiert. Die Aufnahmezeit für einen einzigen Stapel betrug 1,2 Sekunden.

Die konfokale Mikroskopie wurde in Regionen durchgeführt, die von besonderem Interesse sind, das heißt: auf der Ebene der Basalzellen, des subbasalen Nervenplexus, der Bowman-Membran und im vorderen Stroma in einer Tiefe von 30 bis 90 µm. Mindestens drei Messungen wurden durchgeführt. Die Gesamtdauer der Mikroskopie betrug etwa 15 Minuten.

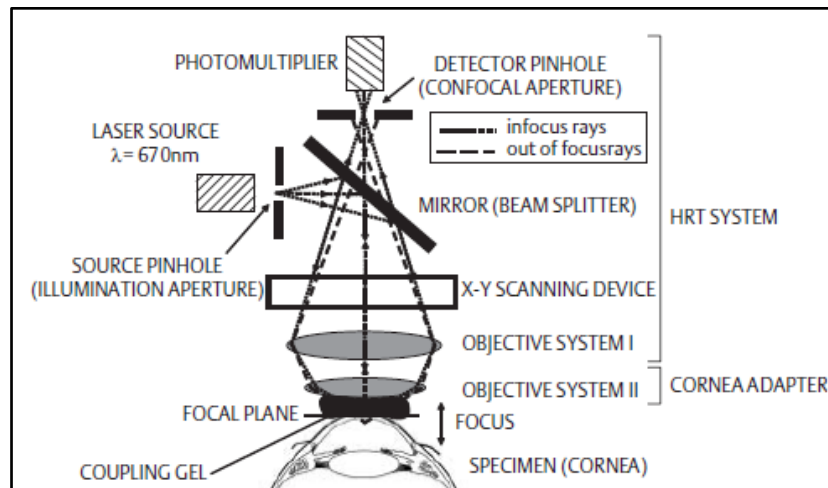


ABBILDUNG 8: KONFOKALE ANORDNUNG IM HRT II UND RCM [154]



ABBILDUNG 9:
UNTERSUCHUNGSVORRICHTUNG ROSTOCKER LASER-SCANNING-MIKROSKOP (RLSM) [155]

3.2.3 NEUROPATHIE DEFIZIT SCORE UND NEUROPATHIE SYMPTOM SCORE

Zur Einschätzung der diabetischen Neuropathie wurden der NSS (Neuropathie Symptom Score) und NDS (Neuropathie Defizit Score) verwendet, deren Durchführung bereits zuvor beschrieben wurde. Zur Erfassung wurden die in Tabelle 4 und 5 dargestellten Fragebögen verwendet.

3.2.4 7-FELDER-FUNDUS

In Bezug auf die diabetische Retinopathie wurde der Augenhintergrund näher betrachtet. Dazu wurde die Methode der 7-Felder-30°-Fundus-Fotografie mithilfe einer Nikon NF505 Camera (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) angewandt [86]. Die 7-Felder-30°-Fundus-Fotografie dokumentiert sieben Bereiche des Fundus (Abbildung 10 und 11):

Field 1M - Disc: Zentriert den temporalen Rand der Sehnervenscheibe an der Gefäß-/Nervenkreuzungsstelle.

Field 2 - Makula: Zentriert die Makula nahe der Gefäß-/Nervenkreuzungsstelle.

Field 3M - Temporal der Makula: Positioniert die Gefäß-/Nervenkreuzungsstelle.

Field 4 - Superior Temporal: Der untere Rand des Feldes ist tangential zu einer horizontalen Linie, welche durch den oberen Rand der Sehnervenscheibe geht. Der nasale Rand des Feldes ist tangential zu einer vertikalen Linie, welche das Zentrum der Sehnervenscheibe passiert.

Field 5 - Inferior Temporal: Der obere Rand des Feldes ist tangential zu einer horizontalen Linie, welche durch den unteren Rand der Sehnervenscheibe geht. Der nasale Rand ist tangential zu einer vertikalen Linie, welche das Zentrum der Sehnervenscheibe passiert.

Field 6 - Superior Nasal: Der untere Rand des Feldes ist tangential zu einer horizontalen Linie, welche durch den oberen Rand der Sehnervenscheibe geht. Der temporale Rand des Feldes ist tangential zu einer vertikalen Linie, welche das Zentrum der Sehnervenscheibe passiert.

Field 7 - Inferior Nasal: Der obere Rand des Feldes ist tangential zu einer horizontalen Linie, welche durch den unteren Rand der Sehnervenscheibe geht. Der temporale

Rand des Feldes ist tangential zu einer vertikalen Linie, welche das Zentrum der Sehnervenscheibe passiert.

Field 8 - Ein optionales Feld außerhalb der 7 Felder sollte genutzt werden, um neue Gefäße und/oder präretinale Blutungen oder Glaskörperblutungen zu dokumentieren, wenn diese nicht gut durch die 7 Felder dokumentiert werden konnten.

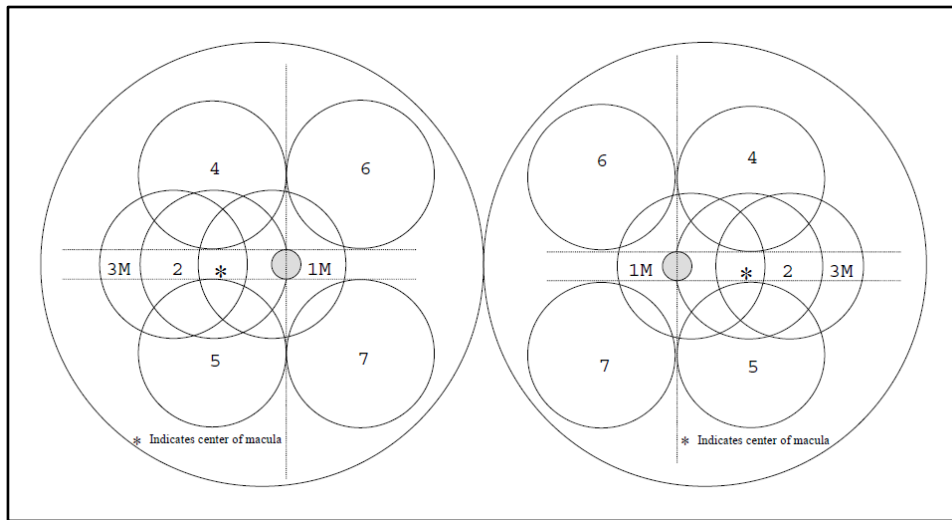


ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER 7 ZU DOKUMENTIERENDEN BEREICHE AM FUNDUS [86]

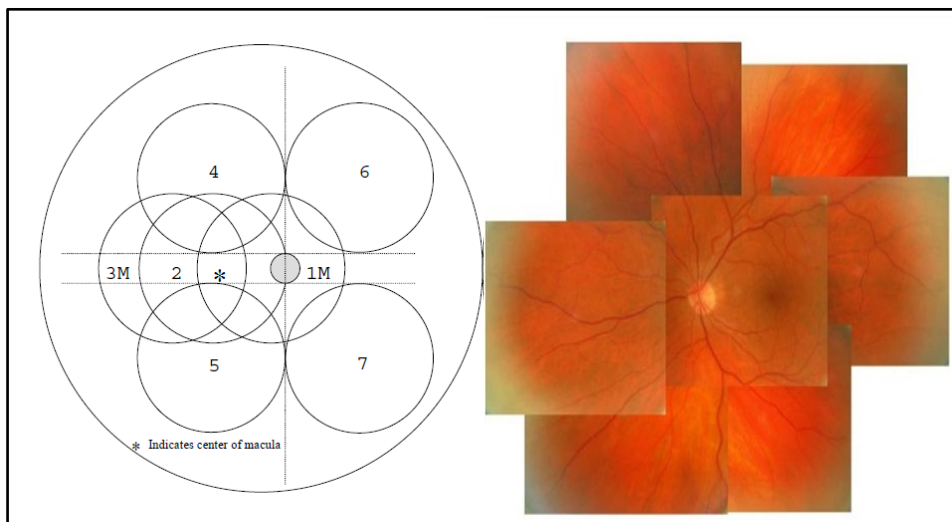


ABBILDUNG 11: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG (RECHTES AUGE) UND BEISPIELAUFNahme EINES 7-FELDER-FUNDUS-FOTOS (LINKES AUGE) DES GESUNDEN PROBANDEN NR. 1

3.2.5 HORNHAUTSENSIBILITÄT

Die Hornhautsensibilität wurde mittels Cochet-Bonnet-Ästhesiometer (Luneau Ophthalmologie, Chartres Cedex, France, Monofilamentdicke 0,12 mm) im Bereich der zentralen Hornhaut ermittelt (Abbildung 12). Das Monofilament wurde zunächst mit seiner vollen Länge von 60 mm angewandt. Falls die Antwort des Probanden negativ ausfiel, wurde die Filamentlänge konsekutiv in 5-mm-Schritten reduziert, bis eine positive Probandenantwort erfolgte.

Die physiologische Sensibilität liegt zwischen 50 und 60 mm.

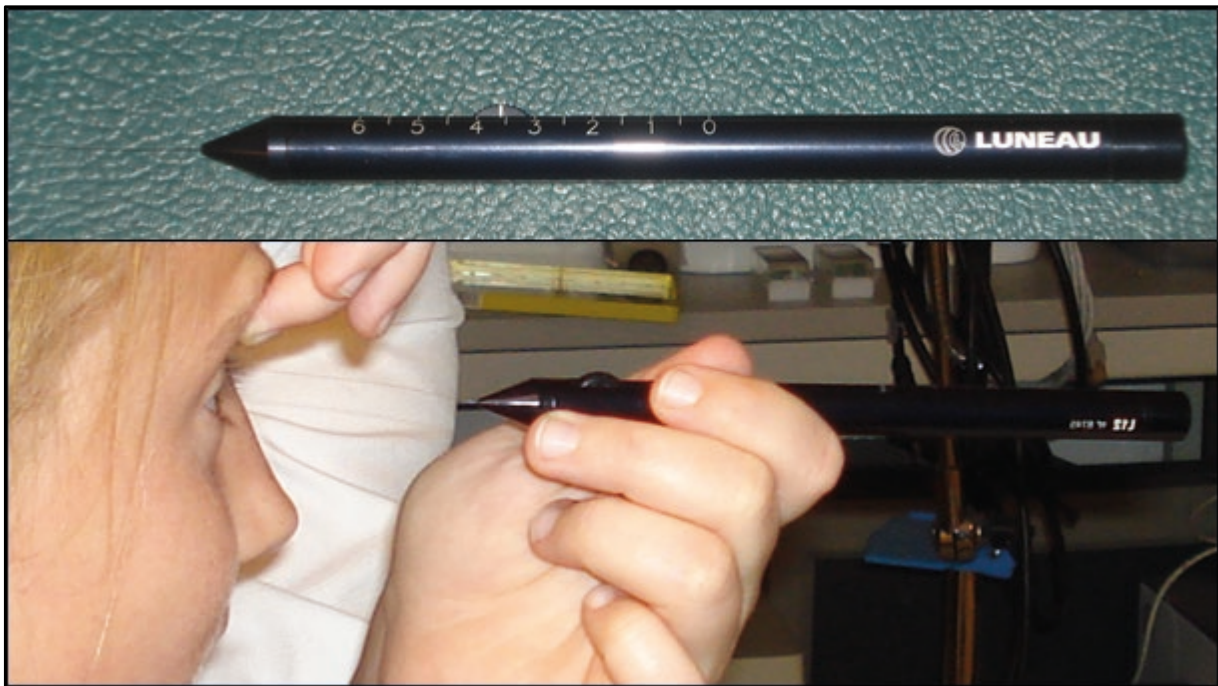


ABBILDUNG 12: MESSUNG DER HORNHAUTSENSIBILITÄT MITTELS COCHET-BONNET-ÄSTHESIOMETER [EIGENE AUFNAHME]

3.3 AUSWERTUNG

3.3.1 BILDANALYSE

Die Auswertung des subbasalen Nervenplexus auf Grundlage von artefaktfreien Einzelbildern, wurde automatisch an präsegmentierten Bildern mit einem in Kooperationsarbeit mit K. Winter vom Translationszentrum für Regenerative Medizin (TRM) Leipzig entwickelten Software-Tool durchgeführt und basiert auf morphologischen und topologischen Parametern [87]. Die Bildanalyse (Abbildung 13) erfolgte in zwei Stufen. Zunächst wurden die segmentierten Bilder morphologisch analysiert und danach die Fasern skelettiert. In einer zweiten Stufe fand die topologische Analyse statt. Die morphologischen Parameter können somit in zwei Hauptkategorien unterteilt werden:

1) vor der Skelettierung und 2) nach der Skelettierung. Diese sind in Tabelle 7 näher spezifiziert.

Einige der Parameter können auch in Bezug auf die Anzahl der verbindenden Komponenten (einzelne Nervenfasernetze innerhalb des Bildbereichs) berechnet werden. Alle Parameter der Messungen können isoliert, kombiniert oder gewichtet für eine Quantifizierung der subbasalen Nervenplexus - Netzwerke verwendet werden.

3.3.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Dokumentation und Auswertung der Daten erfolgte mithilfe von SPSS für Windows in der Version 17.0 (SPSS INC. Chicago, Illinois, USA).

Eine deskriptive Statistik wurde für kontinuierliche und kategoriale Variablen berechnet. Diese Statistik beinhaltet Mittelwerte und Standardabweichungen der kontinuierlichen Variablen sowie Häufigkeiten und relative Häufigkeiten der kategorialen Variablen.

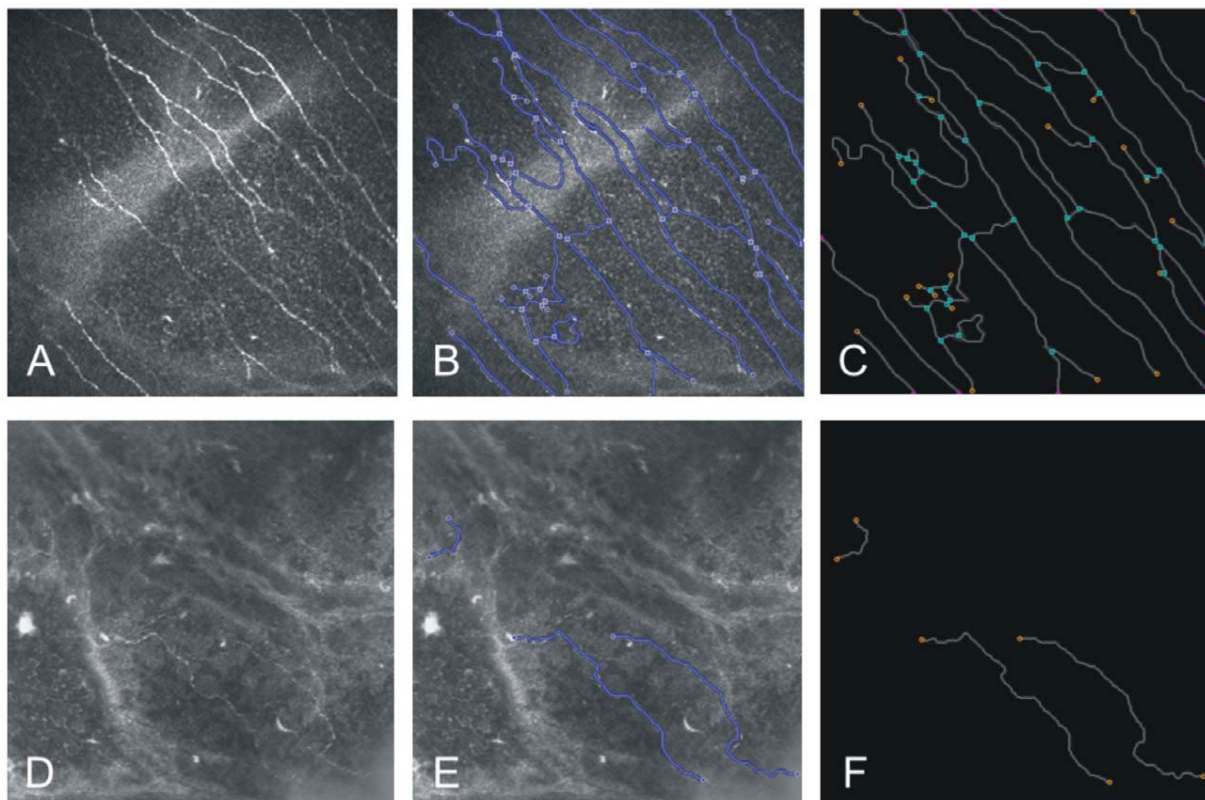


ABBILDUNG 13: STUFEN DER BILDANALYSE (BILDGRÖÖE: 400 x 400 MM).

A - C GESUNDER PROBAND NR. 1

D - F DIABETESPROBAND NR. 9

1) Vor Skelettierung	
component pixels (n)	Anzahl an Pixeln, die als Nervenfasern identifiziert wurden
component ratio (%)	prozentuale Bedeckung der Nervenfasern in Bezug auf den Bildbereich
homogeneity of component pixel	Maß für die Gleichmäßigkeit der Verteilung der Komponent-Pixel
2) Nach Skelettierung	
skeleton pixels (n)	Anzahl der Pixel, die die Mittelachsen der Nervenfasern präsentieren
single nerve fibers (n)	Anzahl aller Segmente zwischen Nervenästen und Nervenenden
total nerve fiber length / average single nerve fiber length (μm)	Länge aller Nervenfasern im Bildbereich / durchschnittliche Länge der einzelnen Nervenfasern
nerve fiber density ($\mu\text{m}/\text{mm}^2$)	Länge aller Fasern in Bezug auf den Bildbereich
number of branches (n)	Anzahl der Nervenäste
number of connectivity points (n)	Anzahl der Nervenfasern, welche die Bildfläche von/nach außen betreten/verlassen
number of endpoints (n)	Anzahl der Nervenenden

TABELLE 7: UNTERTEILUNG DER WICHTIGSTEN HAUPTPARAMETER

IV. ERGEBNISSE

4.1 UNTERSUCHUNGSGRUPPEN

Das mittlere Alter sowie das Geschlecht der Kontrollgruppe unterschieden sich nicht signifikant von denen der Diabetesgruppe (Abbildung 14). Des Weiteren wurden die Probanden mit Diabetes in 2 Untergruppen eingeteilt: mit diabetischer Retinopathie (DR) und ohne diabetische Retinopathie (NDR). Diese beiden Untergruppen unterschieden sich nicht im Alter ($p = 0,376$), jedoch aber in der Dauer des Diabetes ($p = 0,004$) und der Höhe des HbA1c ($p = 0,01$) (Abbildung 15).

Die einzelnen klinischen und demografischen Daten der Probanden sind in Tabelle 8 und 9 angegeben.

Parameter	Gesunde Probanden (n=20)	D.m. + Neuropathie (n=18)	D.m. + Neuropathie + DR (n=7)	D.m. + Neuropathie + NDR (n=11)
Alter (Jahre)	66,3 ± 13,3	68,8 ± 8,8	66,4 ± 8,7	70,4 ± 9,0
Geschlecht (männlich/weiblich)	10/10	9/9	3/4	4/7
Dauer des D.m. (Jahre)	-	15,1 ± 9,9	31,9 ± 9,8	9,4 ± 6,2
HbA1c (%)	-	8,2 ± 1,6	9,2 ± 1,1	7,6 ± 1,6
Hornhautsensibilität (mm)	59 ± 18	43 ± 11	41 ± 7	45 ± 13
Neuropathie Symptom Score, NSS (Punkte)	0,2 ± 0,6	7,1 ± 2,1	8,0 ± 2,0	6,5 ± 2,2
Neuropathie Defizit Score, NDS (Punkte)	0,2 ± 0,6	7,1 ± 2,6	7,7 ± 2,7	6,6 ± 2,6

TABELLE 8: KLINISCHE UND DEMOGRAPHISCHE DATEN DER PROBANDEN

Probanden	Diabetesdauer	DR/NDR	NSS	NDS	HbA1c in %
1	12	NDR	7	4	8.7
2	24	DR	10	10	8.7
3	6	NDR	4	4	11
4	24	DR	7	8	8.4
5	28	DR	5	6	9.9
6	22	DR	10	8	11.2
7	14	NDR	9	9	5.5
8	6	NDR	9	8	7.3
9	37	DR	7	8	8.7
10	18	DR	7	10	7.9
11	1	NDR	8	9	7.1
12	9	NDR	8	8	7.6
13	3	NDR	7	6	7.2
14	11	NDR	4	3	7.2
15	7	NDR	8	9	5.2
16	27	DR	10	8	9.7
17	10	NDR	3	4	8.8
18	14	NDR	5	10	7.6

TABELLE 9: KLINISCHE UND DEMOGRAPHISCHE DATEN DER PROBANDEN MIT DIABETES MELLITUS

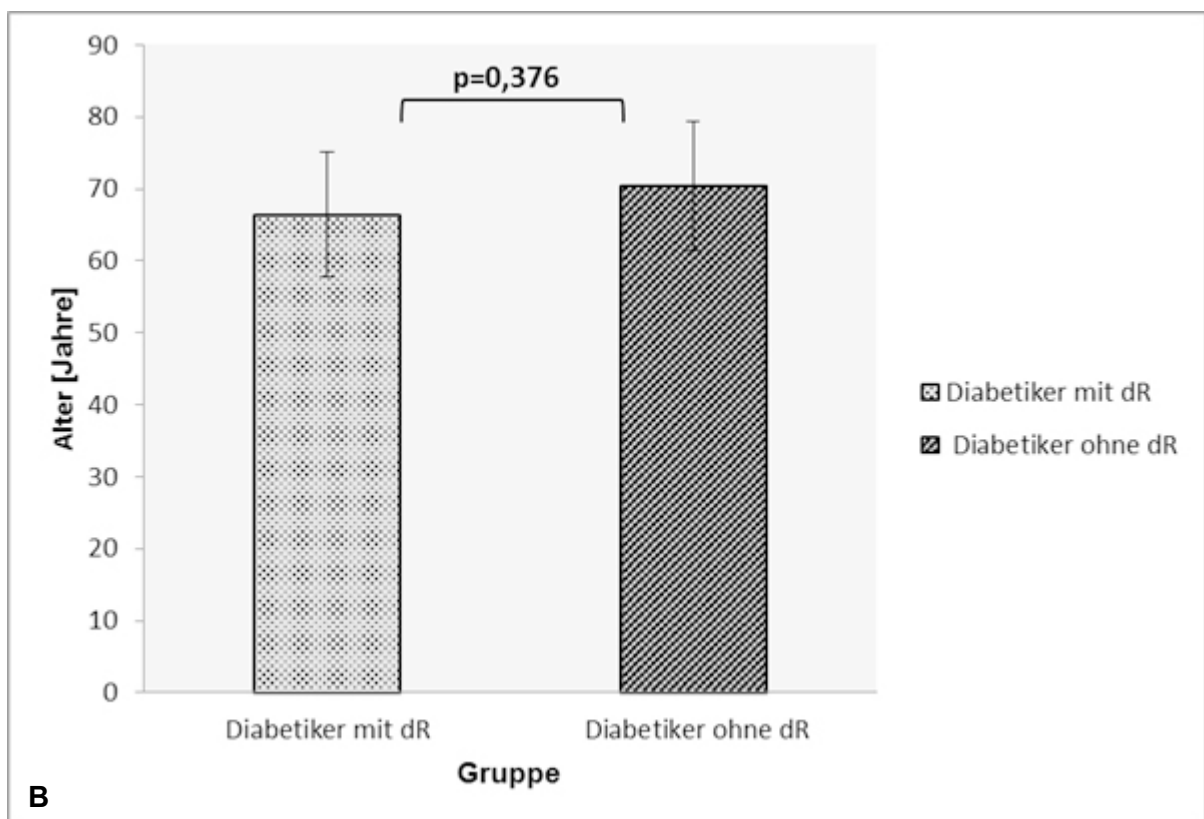
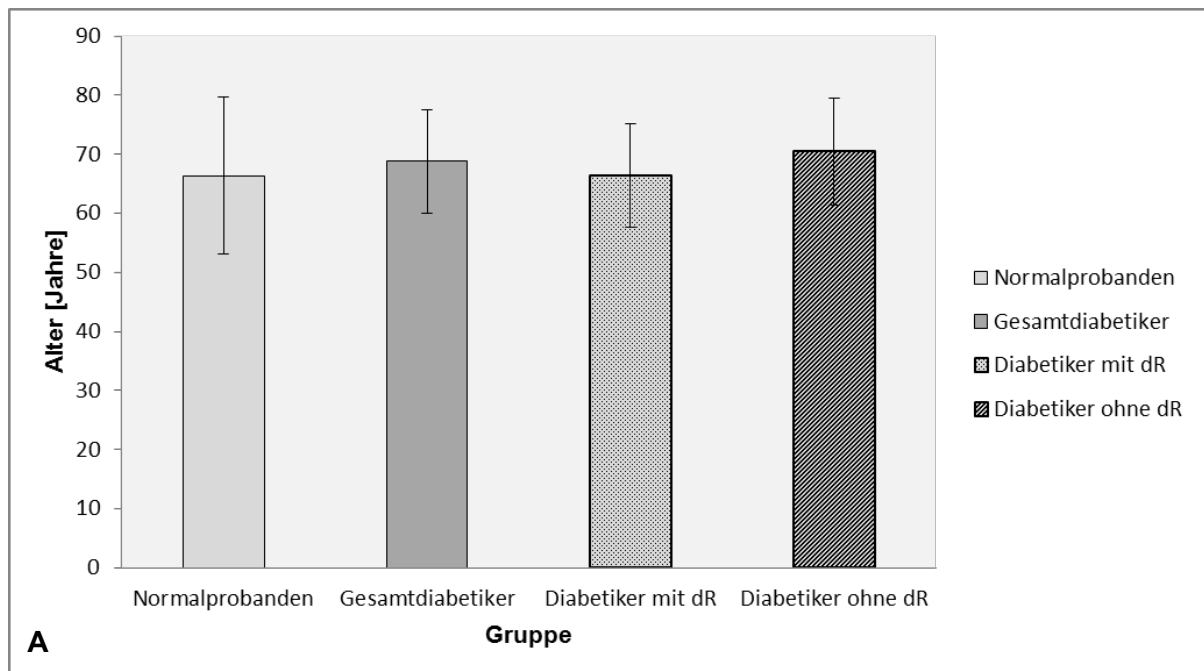


ABBILDUNG 14: VERGLEICH DER UNTERSUCHUNGSGRUPPEN IN BEZUG AUF DAS MITTLERE ALTER

A - VERGLEICH ZWISCHEN NORMALPROBANDEN UND DIABETESGRUPPEN

B - VERGLEICH ZWISCHEN DIABETESUNTERGRUPPEN (MIT UND OHNE DIABETISCHE RETINOPATHIE)

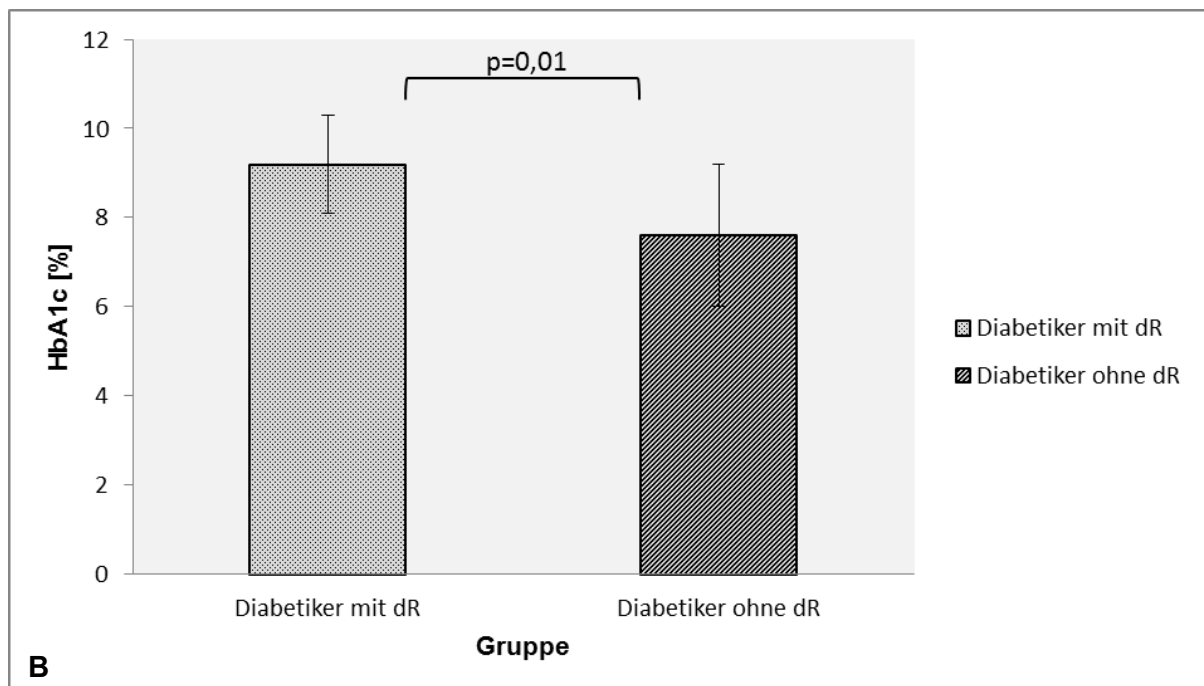
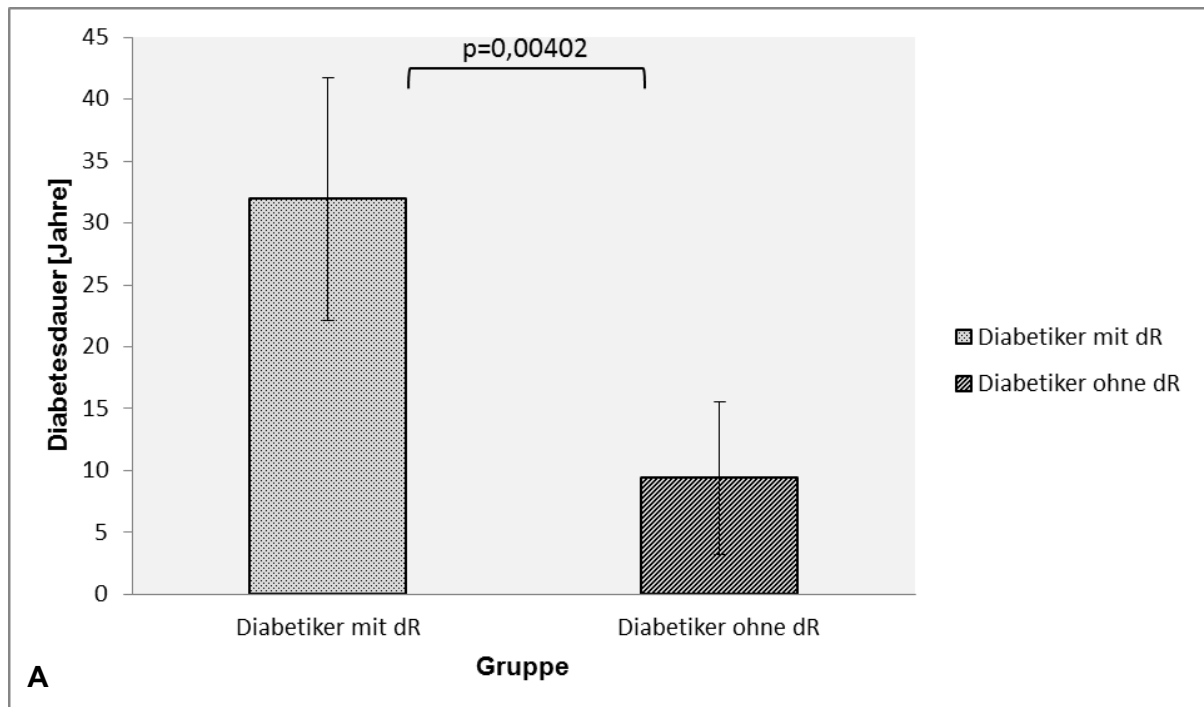


ABBILDUNG 15: VERGLEICH DER DIABETESUNTERGRUPPEN (MIT UND OHNE DIABETISCHE RETINOPATHIE) IN BEZUG AUF
A – DIABETESDAUER
B – HbA1c

4.2 SPALTLAMPENMIKROSKOPIE UND FUNDUSFOTOGRAFIE

4.2.1 NORMALPROBANDEN

Erwartungsgemäß stellten sich in der Spaltlampenmikroskopie bei allen Normalprobanden reizfreie und regelrechte vordere Augenabschnitte dar. Auch funduskopisch und dokumentiert mittels 7-Felder-Fundusfotographie zeigte sich bei allen Normalprobanden das Erscheinungsbild einer normalen Netzhaut ohne Hinweise auf Pathologien, wie zum Beispiel Zeichen einer Retinopathie oder eines Glaukoms. In Abbildung 11 ist exemplarisch ein 7-Felder-Fundus-Foto des Normalprobanden Nummer 1 dargestellt.

4.2.2 PROBANDEN MIT DIABETES MELLITUS

Von den insgesamt 18 Probanden zeigten sich spaltlampenmikroskopisch bei allen Diabetes mellitus-Patienten Typ 2 reizfreie und regelrechte vordere Augenabschnitte. Funduskopisch wiesen sieben von 18 Diabetesprobanden (=38,9 %) Veränderungen im Sinne einer diabetischen Retinopathie auf. Davon hatten fünf eine mäßige nicht-proliferative, ein Proband eine schwere nicht-proliferative und ein Proband eine proliferative diabetische Retinopathie mit ischämischer Makulopathie. In Abbildung 16 sind exemplarisch 7-Felder-Fundus-Fotos von einem Diabetesprobanden mit diabetischer Retinopathie (Abbildung 16B) und von einem Diabetesprobanden ohne diabetische Retinopathie (Abbildung 16C) aufgeführt. Es wird deutlich, dass die Inzidenz der diabetischen Retinopathie mit der Dauer der Erkrankung erhöht ist (Abbildung 17) und keine direkte Korrelation mit den HbA1c-Werten hat.

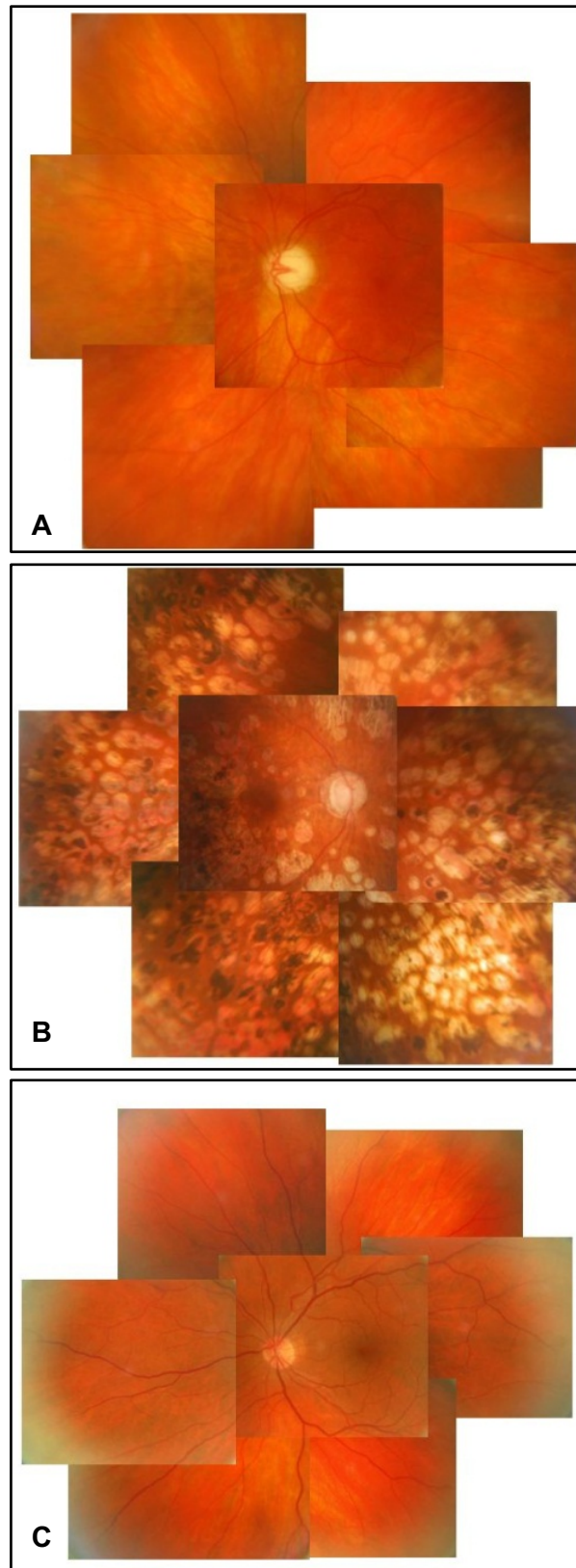


ABBILDUNG 16: EXEMPLARISCHE 7-FELDER-FUNDUS-FOTOS

- A – REGELRECHTER FUNDUS DES PROBANDEN NR. 19 OHNE DIABETES MELLITUS
B – FUNDUS DES PROBANDEN NR. 6 MIT DIABETES MELLITUS, MIT DIABETISCHER RETINOPATHIE, DICHT PANRETINAL GELASERT
C – FUNDUS DES PROBANDEN NR. 8 MIT DIABETES MELLITUS, OHNE DIABETISCHE RETINOPATHIE

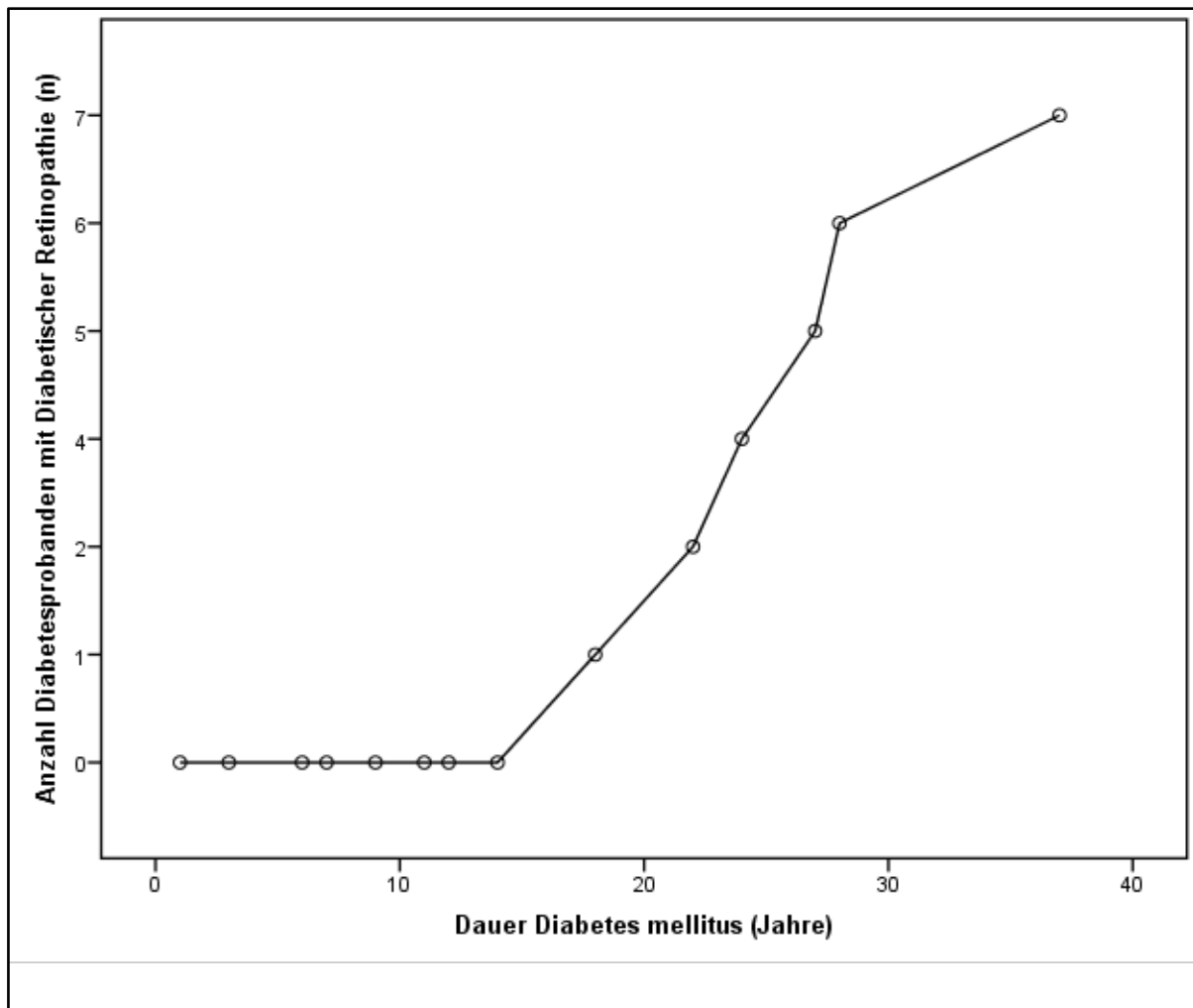


ABBILDUNG 17: ANZAHL DER DIABETESPROBANDEN MIT DIABETISCHER RETINOPATHIE IN BEZUG AUF DIE DAUER IHRER DIABETESERKRANKUNG

4.3 NEUROPATHIE DEFIZIT SCORE UND NEUROPATHIE SYMPTOM SCORE

Der NSS betrug bei den Normalprobanden $0,2 \pm 0,6$ Punkte, der NDS $0,2 \pm 0,6$ Punkte. Damit lagen in der Gruppe der Normalprobanden weder neuropathische Symptome noch neuropathische Defizite vor.

In der Gesamtdiabetikergruppe betrug der NSS $7,1 \pm 2,1$ Punkte, der NDS betrug $7,1 \pm 2,6$ Punkte. Somit lagen schwere neuropathische Symptome und mäßige neuropathische Defizite in dieser Gruppe vor. Es zeigten sich im Vergleich zum NSS beziehungsweise NDS der Normalprobanden signifikante Unterschiede (in beiden Fällen $p < 0,001$).

In der Gruppe der Diabetiker mit diabetischer Retinopathie betrug der NSS $8,0 \pm 2,0$ Punkte, der NDS $7,7 \pm 2,7$ Punkte. Das bedeutet, dass in dieser Gruppe ebenfalls schwere neuropathische Symptome und mäßige neuropathische Defizite vorlagen. In der Gruppe der Diabetiker ohne diabetische Retinopathie betrug der NSS $6,5 \pm 2,2$

Punkte, der NDS $6,7 \pm 2,6$ Punkte. Auch hier lagen somit schwere neuropathische Symptome und mäßige neuropathische Defizite vor. NSS und NDS unterschieden sich nicht signifikant in den Diabetesuntergruppen ($p = 0,17$ beziehungsweise $p = 0,45$). Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt.

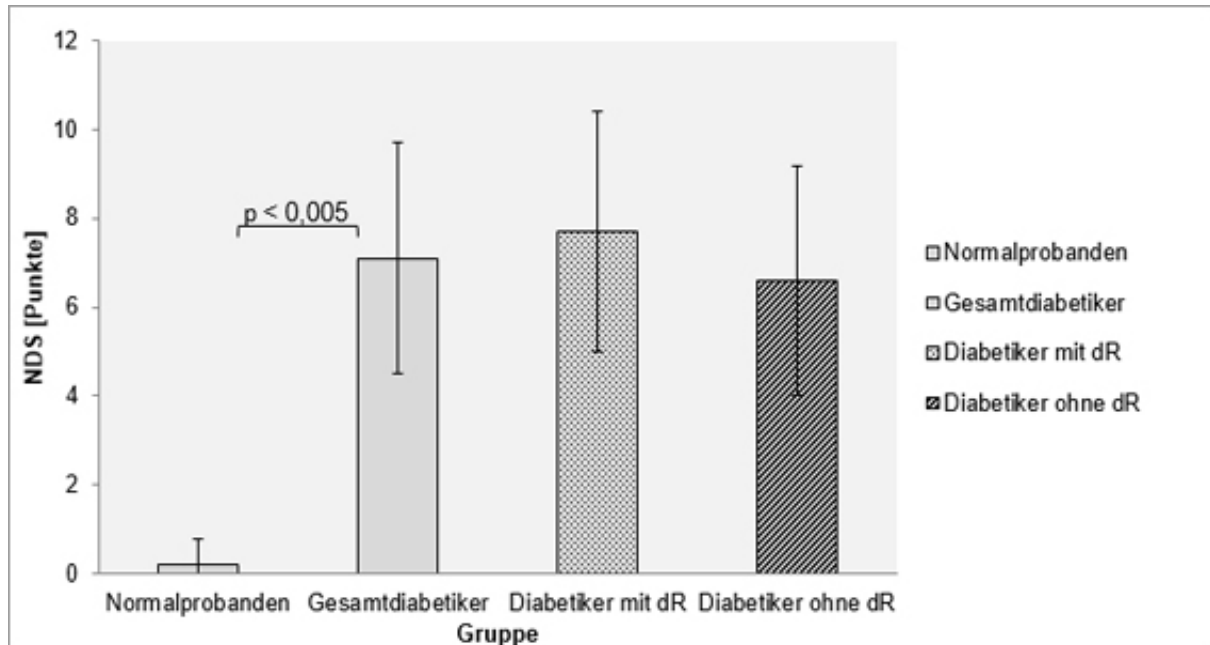


ABBILDUNG 18: KORRELATIONEN ZWISCHEN DEN GRUPPEN BEZÜGLICH DES NDS (NEUROPATHIE DEFIZIT SCORE)

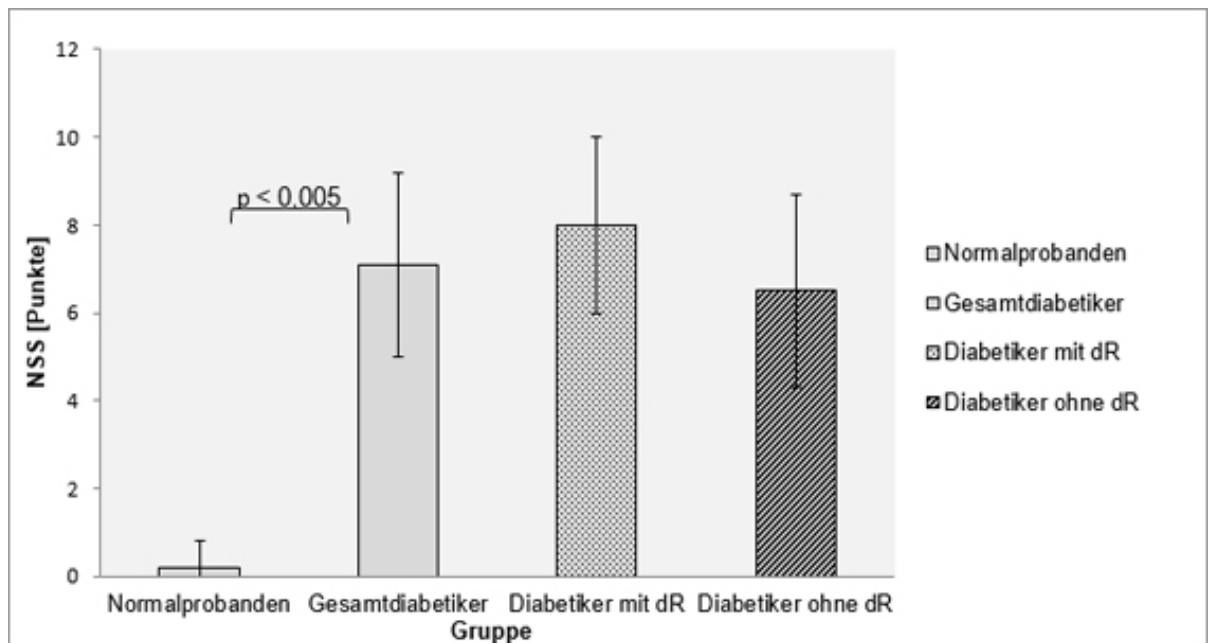


ABBILDUNG 19: KORRELATIONEN ZWISCHEN DEN GRUPPEN BEZÜGLICH DES NSS (NEUROPATHIE SYMPTOM SCORE)

4.4 HORNHAUTSENSIBILITÄT

Die Hornhautempfindlichkeit gemessen nach Cochet-Bonnet betrug 59 ± 18 mm bei den gesunden Probanden und 43 ± 11 mm in der Gesamtdiabetikergruppe. Zwischen diesen beiden Gruppen bestanden signifikante Unterschiede in der Hornhautsensibilität ($p < 0,001$). In der Gruppe der Diabetiker mit diabetischer Retinopathie betrug die Hornhautempfindlichkeit 41 ± 7 mm. Bei den Diabetes mellitus Patienten ohne diabetische Retinopathie betrug die Sensibilität 45 ± 13 mm. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Hornhautsensibilität der Diabetiker mit diabetischer Retinopathie und der Hornhautempfindlichkeit der Diabetiker ohne diabetische Retinopathie ($p = 0,43$). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

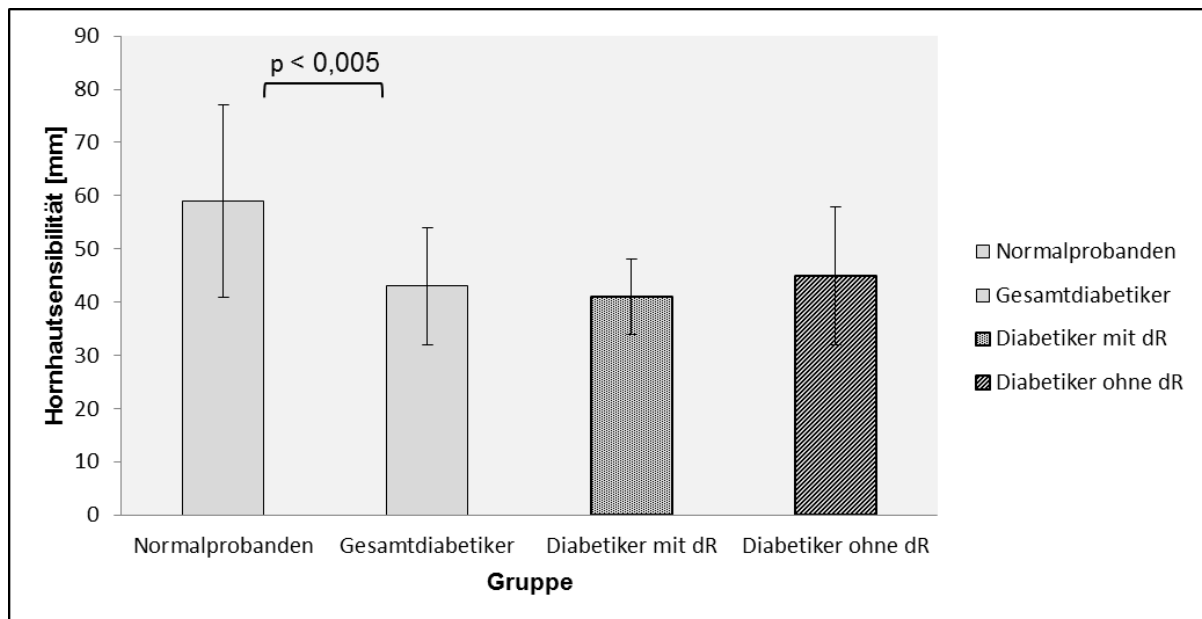


ABBILDUNG 20: KORRELATION ZWISCHEN DEN GRUPPEN BEZÜGLICH DER HORNHAUT-SENSIBILITÄT

4.5 KONFOKALE IN-VIVO-LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE (CLSM)

4.5.1 QUALITATIVE BEWERTUNG DES SUBBASALEN NERVENPLEXUS

Abbildung 21 zeigt beispielhaft Bilder des subbasalen Nervenplexus eines gesunden Probanden (A-C) und eines Probanden der Diabetikergruppe mit Diabetes mellitus Typ 2 (D-F).

Die Strukturen des subbasalen Nervenplexus der Normalprobanden zeigten ein typisches regelrechtes Muster: Hyperreflektive Nervenfasern, die in Richtung Zentrum laufen. Es stellten sich eine regelmäßige Tortuosität und regelmäßige Nervenverzweigungen dar. Im Vergleich dazu zeigte sich bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 mit Neuropathie ein deutlich rarefiziertes Muster des subbasalen Nervenplexus. Außerdem waren eine vermehrte Tortuositas, weniger Verzweigungen, dünnere Nervenfasern und ein erhöhtes Reflexionsvermögen zu erkennen. Auch im Vergleich der beiden Diabetes mellitus-Untergruppen visualisierte die konfokale In-vivo-Laser-Scanning-Mikroskopie einen leichten Rückgang der Nervenfaserdichte bei Diabetikern mit Retinopathie im Vergleich zu denen ohne diabetische Retinopathie. Um diese qualitativen Befunde zu untermauern, wurde eine detaillierte Bildanalyse durchgeführt.

4.5.2 QUANTITATIVE BEWERTUNG DES SUBBASALEN NERVENPLEXUS

Um die repräsentativsten Daten aufzuzeigen, wurde die Anzahl der untersuchten Parameter auf solche mit signifikanten Unterschieden zwischen diabetischen Probanden und Kontrollprobanden reduziert ($p < 0,05$, Mann-Whitney-Test). Die Anzahl der Komponent-Pixel, die Nervenfasern-Komponenten, die Skelettpixel, die einzelnen Nervenfasern pro Komponente, die gesamte Faserlänge, die durchschnittliche Faserlänge eines einzelnen Nervs, die Nervenfaserdichte, die Verbindungspunkte, die Anzahl von Verzweigungen und die Homogenität der Komponent-Pixel wurden bewertet.

Die Quantifizierung des subbasalen Nervenplexus (Tabelle 10) zeigte signifikant weniger Strukturen des subbasalen Nervenplexus in der Diabetes mellitus-Gruppe (mit und ohne diabetische Retinopathie vereint) im Vergleich zu den Kontrollen bei folgenden Parametern (Abbildung 22-24):

Komponent-Pixel ($p < 0,001$), Skelett-Pixel ($p < 0,001$), Komponenten-Verhältnis ($p < 0,001$), einzelne Nervenfasern ($p < 0,001$), einzelne Nervenfasern pro Komponent ($p < 0,001$), gesamte Faserlänge ($p < 0,001$), durchschnittliche Faserlänge ($p = 0,04$), Nervenfaserdichte ($p < 0,001$), Verbindungspunkte ($p < 0,001$), Anzahl der Verzweigungen (Filiae) ($p < 0,001$) und Homogenität der Komponentenpixel ($p = 0,001$). Eine

nicht signifikante Reduktion zeigte sich in der durchschnittlichen Einzelfaserlänge ($p = 0,08$) (Abbildung. 24).

Die Mikromorphologie des subbasalen Nervenplexus zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Diabetikeruntergruppe mit Retinopathie ($n = 7$) und der Diabetiker-Untergruppe ohne Retinopathie ($n = 11$) in folgenden Parametern (Abbildung. 22-24): Komponenten-Pixel ($p = 0,15$), Skelett- Pixel ($p = 0,15$), Komponenten- Verhältnis ($p = 0,15$), einzelne Nervenfasern ($p = 0,72$), einzelne Nervenfasern pro Komponente ($p = 0,54$), Gesamtfaserlänge ($p = 0,15$), durchschnittliche Faserlänge ($p = 0,38$), Nervenfaserdichte ($p = 0,15$), Verbindungspunkte ($p = 0,25$), Anzahl der Verzweigungen ($p = 0,48$) und Homogenität der Komponenten-Pixel ($p = 0,10$).

Der Vergleich der Ergebnisse der Quantifizierung beider Diabetes-Untergruppen (mit und ohne diabetische Retinopathie) mit den Kontrollen zeigte die gleichen signifikanten Unterschiede wie der Vergleich aller Diabetes-Patienten mit den Kontrollen (Abbildung 22-24). Eine einzige Ausnahme stellte sich bei der durchschnittlichen einzelnen Nervenfasernlänge ($p = 0,36$) heraus (Abbildung 24).

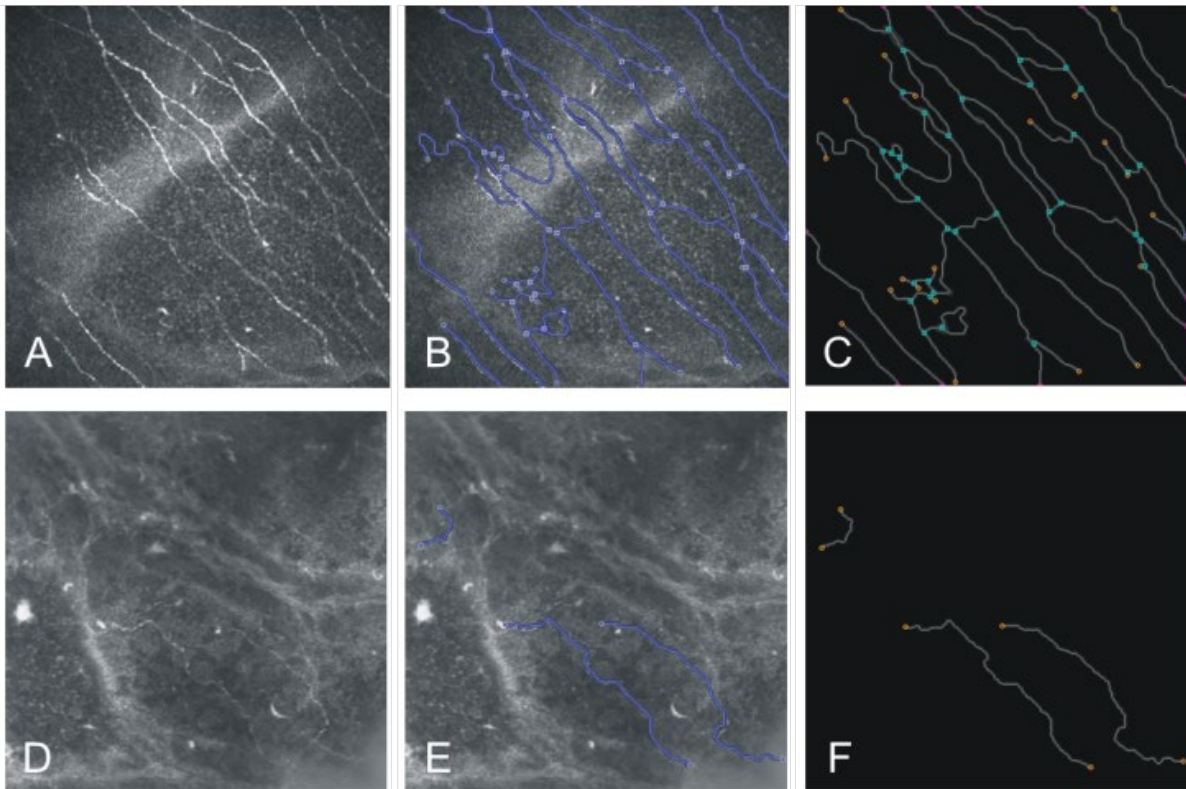


ABBILDUNG 21: KONFOKALE LASER-SCANNING-MIKROSKOPIE UND QUANTIFIZIERUNG DER MIKROMORPHOLOGISCHEN PARAMETER:

- A-** Ursprüngliches Bild des subbasalen Nervenplexus im Zentrum der Kornea aufgenommen bei dem Normalprobanden Nr. 1 mit einer Hornhautsensibilität von 60 mm (Bildgröße: 400 x 400 μm)
- B-** Ergebnis der Segmentierung des Bildes
- C-** Rekonstruktion des subbasalen Nervenplexus des Bildes A: totale Nervenfaserlänge 4706 μm ; Nervenfaserdichte 0,034 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$; Nervenfasernzahl 68
- D-** Ursprüngliches Bild des subbasalen Nervenplexus im Zentrum der Kornea aufgenommen bei einem Diabetespatienten (Nr. 9) mit einer Hornhautsensibilität von 40 mm und einem NDS=8 Punkte (Bildgröße: 400 x 400 μm)
- E-** Ergebnis der Segmentierung des Bildes D
- F-** Rekonstruktion des subbasalen Nervenplexus des Bildes D: totale Nervenfaserlänge 545,4 μm ; Nervenfaserdichte 0,004 $\mu\text{m}/\text{mm}^2$; Nervenfasernzahl 3

Parameter	Gesunde Probanden (n=20)	D.m. + Neuropathie (n=18)	D.m. + Neuropathie + DR (n=8)	D.m. + Neuropathie + NDR (n=12)
Komponentpixel [n]	52863,8±19766,0	21756,6±8363,2	18114,3±6091,1	24074,3±9024,8
Skelettpixel [n]	16469,7±5430,3	5223,6±2060,1	4325,9±1530,1	5794,9±2210,6
Komponenten- verhältnis (%)	5,7±2,1	2,4±0,9	2,0±0,7	2,6±1,0
Nervenfasernzahl [n]	302,2±148,9	78,1±53,2	68,8±40,3	84,1±61,1
Nervenfasernzahl per Komponent [n]	8,8±6,5	3,4±3,5	3,1±3,9	3,5±3,4
Totale Faserlänge [µm]	19961,3±6552,9	6223,1±2419,2	5171,2±1842,8	6892,4±2577,7
Durchschnittliche Nervenfasernlänge [µm]	74,8±26,0	95,8±42,0	91,3±53,3	98,7±35,6
Nervenfasernichte [µm/mm ²]	0,02±0,007	0,006±0,002	0,005±0,002	0,007±0,003
Verbindungspunkte [n]	21,8±9,9	5,8±5,8	3,6±2,4	7,3±6,9
Nervenäste [n]	141,9±85,7	25,3±28,6	20,5±25,2	28,4±31,3
Homogenität (Komponentpixel)	0,009±0,004	0,014±0,005	0,017±0,006	0,013±0,004

TABELLE 10: QUANTIFIZIERUNG DES SUBBASALEN NERVENPLEXUS

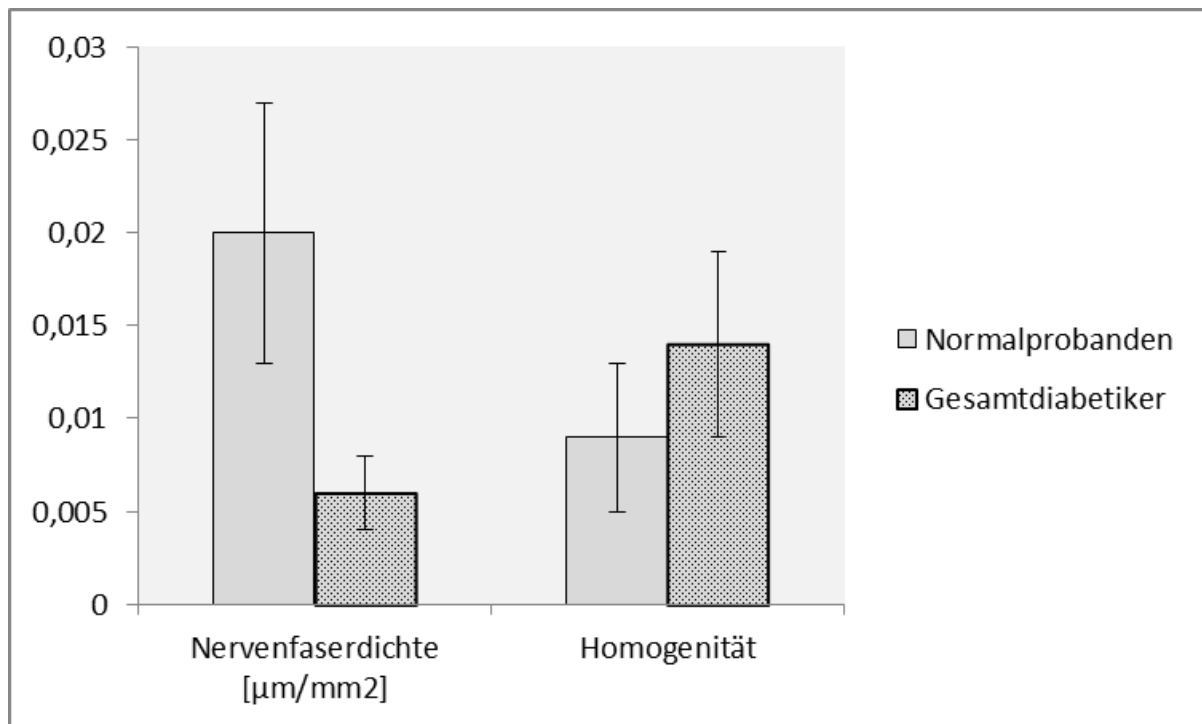


ABBILDUNG 22: KORRELATION ZWISCHEN NORMALPROBANDEN UND GESAMTDIABETIKERGRUPPE BEZÜGLICH NERVENFASERNICHTE UND HOMOGENITÄT

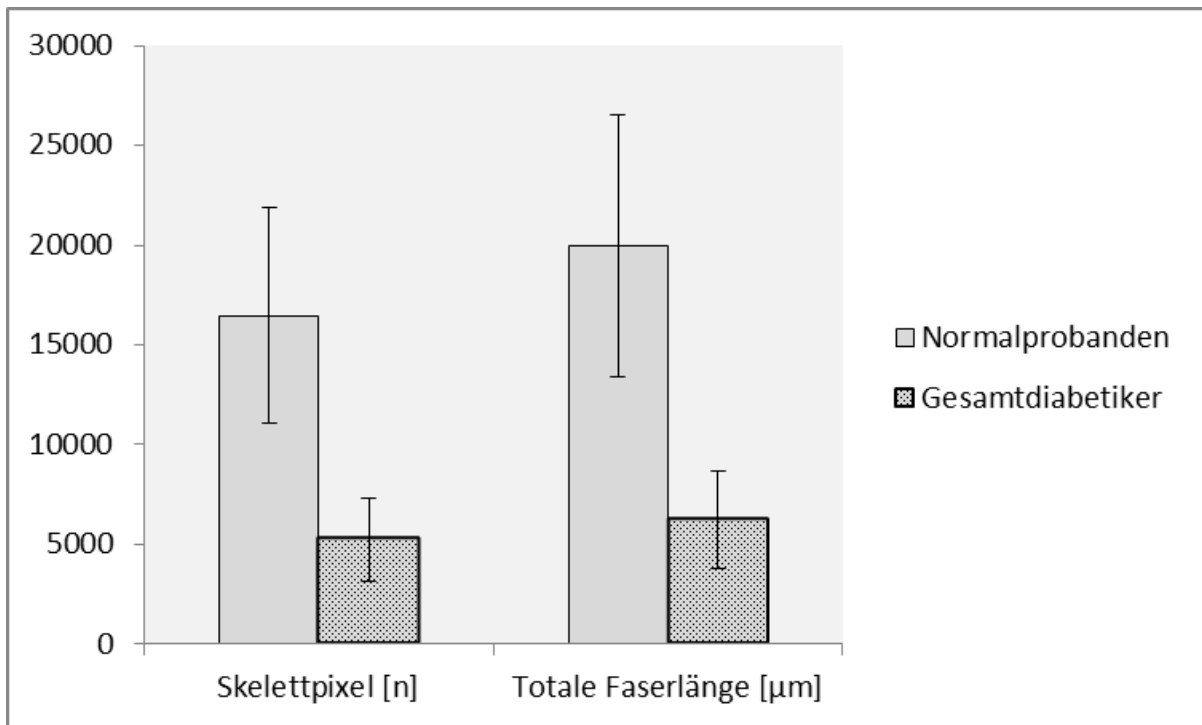


ABBILDUNG 23: KORRELATION ZWISCHEN NORMALPROBANDEN UND GESAMTDIABETIKERGUPPE BEZÜGLICH SKELETTPIXEL UND TOTALER NERVENFASERLÄNGE

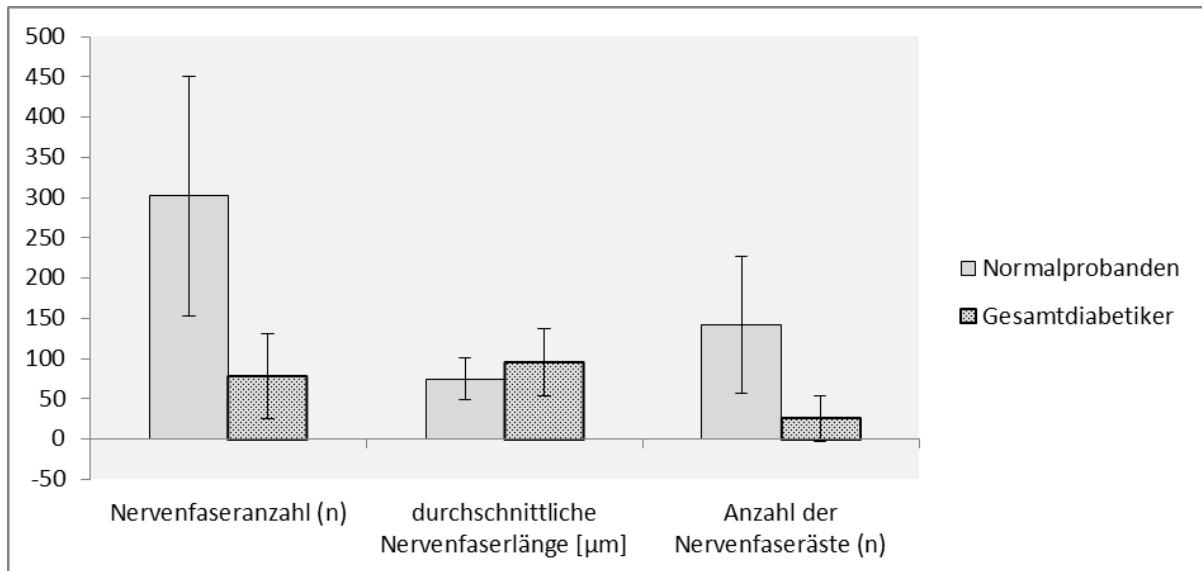


ABBILDUNG 24: KORRELATION ZWISCHEN NORMALPROBANDEN UND GESAMTDIABETIKERGUPPE BEZÜGLICH NERVENFASERNANZAHL, DURCHSCHNITTLICHER NERVENFASERNLÄNGE UND ANZAHL DER NERVENFASERNÄSTE

V. DISKUSSION

Die durchgeführten Messungen und deren Datenanalyse beschäftigen sich mit der Frage, inwieweit die CLSM die Möglichkeit einer nichtinvasiven diagnostischen Methode zur Beurteilung und Früherkennung der diabetischen Neuropathie und Retinopathie darstellt. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Quantifizierung der Morphologie des subbasalen Nervenplexus der Kornea, welche in Bezug zu konventionellen Parametern zur Beurteilung der diabetischen Neuropathie (Neuropathischer Defizit Score, Neuropathischer Symptom Score), zur diabetischen Retinopathie und zur Hornhautsensibilität gesetzt wurde.

5.1 DIABETISCHE NEUROPATHIE

Die diabetische Neuropathie hat die drittgrößte an das Alter und Geschlecht angepasste Inzidenzrate aller neurologischen Erkrankungen. Sie wird nur von zerebrovasculären Ereignissen und dem Herpes Zoster übertroffen [88].

Zur Epidemiologie der diabetischen Neuropathie liegen zahlreiche unterschiedliche Daten vor. Die geringe Übereinstimmung der Ergebnisse und die dadurch resultierenden weiten Angabenbereiche können durch unterschiedliche diagnostische Kriterien und Untersuchungsmethoden sowie Unterschiede der untersuchten Populationen erklärt werden.

Die meisten Studien sind klinik- oder zentrumsbasiert und die Population selektioniert. Vor diesem methodischen Hintergrund sind bei Typ 1 Diabetes Prävalenzen der diabetischen Neuropathie von 8-54 % und bei Typ 2 Diabetes von 13-46 % berichtet worden [1].

Assoziationen der sensomotorischen diabetischen Polyneuropathie bestehen in Diabetesdauer, unzureichender Diabeseinstellung, diabetischer Retinopathie und anderen Risikofaktoren [89]. Auch wurde in der Fachliteratur eine gestörte Glukosetoleranz (IGT= Impaired Glucose Tolerance) bei etwa 30 % der Fälle als Ursache einer „idiopathischen“ sensomotorischen Polyneuropathie erwähnt [90-92].

In einer Studie über Prädiabetes und Neuropathie wird angegeben, dass zwischen 25 % und 62 % der Patienten mit idiopathischer peripherer Neuropathie einen Prädiabetes haben und bei Personen mit Prädiabetes bereits 11-25 % an einer peripheren Neuropathie leiden. Des Weiteren wird darauf hingewiesen, dass populationsbasierte Studien auf einen Gradienten für die Prävalenz der Neuropathie hindeuten, wobei die-

ser am größten bei Patienten mit manifestem Diabetes mellitus ist, gefolgt von Personen mit gestörter Glukosetoleranz, dann mit beeinträchtigten Nüchtern glukosewerten bis zu jenen mit Normoglykämie. Auch wird darauf hingewiesen, dass Personen mit einem Prädiabetes weniger schwere Neuropathien haben als solche mit einem manifesten Diabetes mellitus. Die sensorischen Qualitäten seien auch häufiger als die motorischen Qualitäten betroffen. Diese Beeinträchtigung der kleinen Nervenfasern könnte das früheste nachweisbare Zeichen sein [93].

Hierdurch zeigt sich, dass eine frühzeitige Diagnostik mit dem Ziel der Beurteilung der kleinen Fasern notwendig ist, um gerade Patienten im Anfangsstadium zu identifizieren und auf die Therapiemöglichkeit von Folgeschäden hinzuweisen. Dadurch könnte mit der Sekundärprävention so früh wie möglich begonnen werden.

Die diabetische Neuropathie bringt viele Folgen mit sich. Die Lebensqualität ist im Vergleich zu Patienten ohne sensomotorische diabetische Polyneuropathie erniedrigt [33], das Mortalitätsrisiko [34, 94] und das Risiko für ein diabetisches Fußsyndrom sind erhöht [35]. Die sensomotorische diabetische Polyneuropathie ist der wichtigste Risikofaktor für nichttraumatische Amputationen an den unteren Extremitäten [95-99].

Mit über 60.000 Amputationen pro Jahr liegt Deutschland europaweit im oberen Drittel [101]. Ca. 70% dieser Amputationen werden bei Diabetikern durchgeführt und bei etwa 30000 Patienten ist die diabetische Stoffwechselstörung unabhängig vom Diabetestyp die Hauptursache der Amputation. Bundesweit haben Diabetiker ein deutlich gesteigertes Amputationsrisiko, welches bis zu 50-fach gegenüber Nichtdiabetikern erhöht ist. Dadurch entstehen lange stationäre Verweildauern und ein hoher Behandlungsaufwand, welche wiederum einen wesentlichen Teil der diabetesassoziierten Kosten im Gesundheitswesen verursachen [102]. So wurden 2008 der Versorgung der Diabeteserkrankten für Deutschland vom Statistischen Bundesamt direkte Kosten von 6,34 Milliarden Euro zugeschrieben [103]. In einer Studie von 2002 wurden für Patienten, bei denen eine Amputation durchgeführt wurde, jährliche Kosten in Höhe von 10 796 Euro angeführt [104].

Die diabetische Neuropathie birgt also nicht nur persönliche Probleme, sondern auch sozioökonomische Folgen im Sinne von Kosten, die im Gesundheitswesen mit einer geeigneten Diagnostikmethode und dadurch frühzeitiger Prävention und Therapie eingespart werden könnten.

In der vorliegenden Arbeit zeigte die Gruppe der Normalprobanden weder neuropathische Symptome noch neuropathische Defizite. Im Gegensatz dazu wies die Gesamtdiabetikergruppe schwere neuropathische Symptome und mäßige neuropathische Defizite auf. Es zeigten sich im Vergleich zum NSS beziehungsweise NDS der Normalprobanden signifikante Unterschiede (in beiden Fällen $p < 0,001$). Das bedeutet, dass diese Probanden der Diabetikergruppe bereits unter den Folgen des Diabetes, mindestens in Form einer mäßigen Neuropathie litten. Nun stellt sich die Frage, inwieweit solche Folgen vorhersagbar sind. Die Gruppe von Ziegler et al. untersuchte [105] 86 frisch diagnostizierte Typ-2-Diabetiker im Vergleich zu 48 Kontrollprobanden mittels CLSM zur Quantifizierung von Alterationen des subbasalen Nervenplexus sowie mittels Hautbiopsie zur Quantifizierung der intraepidermalen Nervenfaserdichte. Neurophysiologische Untersuchungen wurden ebenfalls durchgeführt. Im Vergleich zu den Normalprobanden zeigten Diabetiker zu Beginn ihrer Erkrankung eine signifikante Reduktion der Nervenfaserdichte, -länge sowie der intraepidermalen Nervenfaserdichte, jedoch nicht in denselben Probanden, was durch ein „Patchy Manifestation Pattern“ der „Small Fiber Neuropathie“ erklärt wird. Die für die Beurteilung der diabetischen Neuropathie durchgeführten Methoden bewerten einerseits nur die Funktion der langen Nervenfasern, wie dies zum Beispiel in der Elektrophysiologie (Nervenleitgeschwindigkeit, Elektromyographie) geschieht. Andere Verfahren, wie die Hautbiopsie und der Quantitative Sudomotor Axon Reflex Test (QSART), können zur Diagnostik der Small Fiber Neuropathie genutzt werden, sind aber wiederum invasiv, benötigen spezielle Labore oder werden durch Medikamente beeinflusst [126]. Die Hautbiopsie ist eine sensitive und effektive Methode zur Diagnose einer Small-Fiber-Neuropathie, sie ermöglicht die Beurteilung von kleinen Fasern durch Quantifizierung der intraepidermalen Nervenfaserdichte- und Nervenfaserlängenveränderungen [156]. Der Nachteil liegt aber eindeutig in der Invasivität. Es gibt also kaum beziehungsweise keine Möglichkeiten, eine pathologische Veränderung in kleinen Nervenfasern zu diagnostizieren. Diese sollte in weiteren prospektiven Studien weiter untersucht werden.

5.2 DIABETISCHE RETINOPATHIE

Netzhautkomplikationen des Diabetes, wie die Retinopathie und die Makulopathie, stellen die häufigsten Manifestationsformen der diabetischen Mikroangiopathie dar [54]. Es ist von großer klinischer Bedeutung, zu klären, inwieweit die Augen-Marker für

Diabetes miteinander und mit dem Neuropathiestatus korrelieren. Die diabetische Retinopathie ist eine der häufigsten Komplikationen bei Typ 1 und Typ 2 Diabetes und betrifft nahezu alle Personen mit 15 oder mehr Erkrankungsjahren [106]. Die chronische Hyperglykämie ist ein gesicherter kausaler Faktor der diabetischen Mikroangiopathie [57, 58]. Die Häufigkeit der diabetischen Retinopathie hängt vermutlich in beiden Fällen, Typ 1 und Typ 2, von der Dauer der Erkrankung und der glykämischen Kontrolle ab [107].

In der vorliegenden Studie konnte bestätigt werden, dass es eine direkte Korrelation zwischen der Diabetesdauer und der Häufigkeit der diabetischen Retinopathie gibt. Frühere Arbeiten zeigten, dass die Blutzuckerkontrolle eine große und anhaltende Wirkung bei der Verringerung der diabetischen Komplikationen hat. Es hat sich gezeigt, dass eine enge Blutzuckerkontrolle das Fortschreiten der Schwere der diabetischen Retinopathie verhindert [108]. Dennoch schreitet die diabetische Retinopathie bei einigen Patienten trotz guter Blutzuckerkontrolle fort. Eine gute Blutzuckereinstellung garantiert also nicht immer das Ausbleiben einer Progredienz der diabetischen Retinopathie [109]. Auch, wenn in dieser Querschnittsstudie die meisten Patienten mit diabetischer Retinopathie die höchsten HbA1c-Werte zeigten, gab es einige Ausnahmen. Zum Beispiel zeigte Proband Nr. 3 mit einem HbA1c von 11 % keine Hinweise auf eine diabetische Retinopathie (Diabetesdauer 6 Jahre), während Proband Nr. 6 mit dem gleichen HbA1c-Wert (Diabetesdauer 22 Jahre) eine diabetische Retinopathie aufwies. Proband Nr. 10 mit einem verhältnismäßig niedrigen HbA1c von 7,9 % zeigte eindeutige Zeichen für eine diabetische Retinopathie (NDS = 7, Diabetesdauer 18 Jahre). Eine mögliche Erklärung für diesen Befund könnte sein, dass diese Studie keine langfristige glykämische Kontrolle der diabetischen Patienten durchführte, sondern mit einem einzigen HbA1c-Wert die vorangegangenen drei Monate dokumentiert hat. Dies deutet darauf hin, dass in Nicht-Längsschnittstudien HbA1c-Werte nicht unbedingt mit der Inzidenz der diabetischen Retinopathie korrelieren müssen, und dass die Dauer des Diabetes wahrscheinlich der stärkste Prädiktor für die Entwicklung und Progression der diabetischen Retinopathie ist.

Auch gab es keine direkte Korrelation zwischen dem Neuropathiestatus und der Inzidenz der diabetischen Retinopathie. Des Weiteren fehlten bei Patienten mit einem NDS = 9 oder 10 und einer Diabetesdauer von 14 Jahren jegliche Anzeichen einer diabetischen Retinopathie, während andere mit einem NDS = 6 und einer Diabetes-

dauer von 28 Jahren eine diabetische Retinopathie aufwiesen. Diese Erkenntnisse unterstreichen einmal mehr die Rolle der Diabetesdauer bei der Entwicklung einer diabetischen Retinopathie.

Im Zusammenhang mit der diabetischen Retinopathie existieren Studien, die zusätzlich einen besonderen Fokus auf mikrovaskuläre Veränderungen legen. Die Betrachtung der diabetischen Retinopathie als reine mikrovaskuläre Erkrankung hat ergeben, dass sie nicht isoliert als Gefäßpathologie angesehen werden sollte [110]. Die Neurodegeneration der retinalen Gliazellen wurde als zugrunde liegende Ursache der retinalen Gefäßveränderungen angenommen [111]. Ein wichtiger Angriffspunkt der Neurodegeneration in der Netzhaut ist die Ganglienzellschicht, in der ein axonaler Verlust und eine Verdünnung der retinalen Nervenzellenfaserschicht (RNFL) als Folgen des apoptotischen Todes von Ganglienzellen auftreten. Müller-Zellen stellen einen weiteren möglichen Angriffspunkt für den programmierten Zelltod dar. Diese sind Zellen, die das vaskuläre Endothel unterstützen. Die Apoptose selbiger führt zu Funktionsstörungen kleiner Gefäße und damit zu einer Mikroangiopathie. Somit gehen wahrscheinlich zelluläre neurodegenerative Veränderungen in der Netzhaut mikrovaskulären Veränderungen voraus und dienen als Marker für eine frühe diabetische Retinopathie. Es gab einige Angaben aus der Fachliteratur zu dieser Hypothese, welche jedoch inkonsequent sind. In einigen Studien wurde die RNFL- Ausdünnung durch Auftreten der diabetischen Retinopathie erklärt [112, 113]. Andererseits sah man auch bei Patienten ohne diabetische Retinopathie eine Ausdünnung der Nervenzellenfaserschicht [114]. In einer späteren Studie konnten keine signifikanten Unterschiede in der Dicke der retinalen Nervenzellenfaserschicht bei Patienten ohne diabetische Retinopathie gezeigt werden, obwohl die gleiche Technik, die optische Kohärenztomographie (OCT), verwendet worden ist [115]. Die Autoren erklären diese Diskrepanz mit der kürzeren Dauer des Diabetes in der zweiten Studie ($4,8 \pm 4,4$ vs. $7,9 \pm 7,3$).

Die oben genannten Studien waren darin begrenzt beurteilbar, als dass in keiner von ihnen die diabetische Gruppe entsprechend des Neuropathiestatus eingeteilt wurde. In der Zwischenzeit wurde die Beziehung zwischen RNFL- Dicke und diabetischer Polyneuropathie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 durch die Messung der Dicke der retinalen Nervenzellenfaserschicht mittels OCT und der Beurteilung des diabetischen Neuropathie-Status mittels Neuropathie Defizit Score [107] untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergab sich bei den Diabetes-Patienten mit NDS > 5 eine signifikante Ausdünnung der Nervenzellenfaserschicht. Es sollte beachtet werden, dass die RNFL- Dicke

entsprechend des Alters, des Geschlechts und der ethnischen Zugehörigkeit variiert. Dementsprechend müssen zur Überprüfung der Hypothese, dass neuronale Anomalien Gefäßveränderungen vorgehen könnten und damit die Prüfung der RNFL-Dicke ein früherer Marker der diabetischen Retinopathie ist, bevölkerungsbezogene, dem Alter und Geschlecht angepasste Studien in Zukunft durchgeführt werden. Andere Studien beleuchten außerdem den Zusammenhang zwischen der diabetischen Retinopathie und der diabetischen Nephropathie. Dabei zeigt sich die proliferative Retinopathie als unabhängiger Marker der langfristigen Nephropathie bei Typ 1 Diabetes [116]. Eine andere Gruppe [117] untersuchte quantitativ die Tortuosität der retinalen Arteriolen und deren Zusammenhang mit einer Nephropathie. Auch die Tortuosität konnte unabhängig mit der leichten diabetischen Retinopathie und dem frühen Stadium der Nephropathie bei Typ 1 Diabetes assoziiert werden. Dies soll ebenfalls in zukünftigen Studien überprüft werden. Bei möglicher Bestätigung sollen so neue Einblicke in frühe mikrovaskuläre Veränderungen und damit nützliche klinische Informationen über die Gefahr der Retinopathie und Nephropathie geliefert werden.

5.3 HORNHAUTSENSIBILITÄT BEI DIABETES MELLITUS

Die korneale Sensibilität zeigte eine signifikante Abnahme sowohl in der Diabetikergruppe als auch in beiden Subgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das ist konform mit bisherigen Studien [138, 139]. In einer Publikation von Rosenberg und Kollegen zeigten Patienten mit Diabetes mellitus ohne oder mit nur leichter bis mäßiger Neuropathie interessanterweise eine ganz normale Hornhautsensibilität. Eine Reduktion der Hornhautsensibilität wurde nur unter schwerer Neuropathie festgestellt. In der vorliegenden Studie zeigten die Diabetes-Patienten ebenfalls beeinträchtigte Strukturen des subbasalen Nervenplexus in Zusammenhang mit einer verminderten Empfindlichkeit der Hornhaut, die in Konsens mit eben erwähneter und weiteren früheren Studien bei Diabetes Typ 1 und 2 [140-146] gehen.

Die Untersuchung der Hornhautsensibilität könnte somit einen zusätzlichen ophthalmologischen Marker zur Diagnostik der diabetischen Neuropathie bieten: Pritchard et al. [147] zeigten die unterschiedliche Kapazität der Nonkontaktkorneaästhesiometrie mit einem Schwellenwert von 66 mbar. Dabei betrug die Sensitivität 52 % und die Spezifität 85 % bei Diabetikern mit einem NDS ≥ 6 sowie 70 % und 75 % jeweils bei Patienten mit einem NDS ≥ 3 [148].

5.4 BILDVERARBEITUNG

Viele Studien über die Morphologie des subbasalen Nervenplexus unterscheiden sich in ihren Bildaufnahmestrategien, den Quantifizierungsalgorithmen und der Definition der einzelnen Parameter. Dies führt zu Schwierigkeiten beim Vergleich der Ergebnisse aus verschiedenen Studien. Ausgewertete Ergebnisse aus 13 konfokalen Studien, die zwischen 2001 und 2008 veröffentlicht wurden [118], zeigten eine enorme Diskrepanz hinsichtlich der Quantifizierungsparameter. Eine Erklärung für diese Schwankungen sind zum einen Unterschiede im Bildkontrast der verwendeten Mikroskope. Daher ist der Vergleich der quantitativen Parameter nur gültig, wenn das gleiche konfokale Mikroskop verwendet wurde. Das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) und Spaltlampen-Scanning-Mikroskop (SSCM) stehen aktuell vorrangig der Hornhaut-Forschung zur Verfügung. Die feinen Nervenäste des subbasalen Nervenplexus sind, gegenüber dem SSCM, mit dem CLSM wegen des hohen Kontrastes sichtbar. Dies ermöglicht es, etwa 80 % der bestehenden Nervenfasern des subbasalen Nervenplexus zu visualisieren. Dies ist mit dem SSCM und TSCM durch einen verringerten Kontrast an den seitlichen Kanten des Bildes nicht möglich. Entsprechend neuerer Literatur hat sich die In-vivo-CLSM (Heidelberg Retina Tomograph II oder III mit Rostock Kornea Modul ausgestattet) als das am weitesten verbreitete Instrument zur morphologischen Beurteilung des subbasalen Nervenplexus durchgesetzt.

Der Trend hin zu quantitativen Studien hat zur Entwicklung verschiedener Ansätze der Charakterisierung der Parameter des subbasalen Nervenplexus geführt, so zum Beispiel die Beurteilung der Nervenfaserdichte und -länge mit Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated, USA) [119] sowie mit Hilfe eines automatischen Calliper Tools [120] oder Neuron J als Plug-In für Image J, Analysis 3.1 (Soft Imaging System Münster, Deutschland) [118] oder Sion (Scion Image für Windows, Scion Corporation, USA) [121]. Auch die Analyse der Nerven-Tortuosität durch eine manuelle Sortierung [119] oder die Implementierung in MATLAB (MathWorks, USA) für die Evaluation des Tortuositätskoeffizienten [118, 122] haben stattgefunden. Darüber hinaus wurden Erfahrungen mit Cell D (Olympus, Deutschland) und Amira (TGS Inc., USA) gesammelt, aber die Ergebnisse waren aufgrund der hohen Anzahl an falsch positiv und negativ erkannten Phänomenen nicht zufriedenstellend.

Eine Reihe von vollautomatischen Systemen für die Beurteilung der Morphologie des subbasalen Nervenplexus wurden kürzlich entwickelt [123-125], welche eine starke

Korrelation zwischen manuellen und vollautomatischen Methoden darstellen. Allerdings sind diese Algorithmen auf einige Parameter wie Nervenfasernlänge, -dichte, Filaedichte, Faserbreite und Intensität begrenzt. In dieser Arbeit wurde ein angepasster Bildverarbeitungs-Algorithmus [87] zur Präprozessierung, Segmentierung und Auswertung der morphologischen Parameter des subbasalen Nervenplexus verwendet. Die Analyse dieser relativ kleinen Gruppe von Patienten ergab die Möglichkeit, die pathologischen Befunde, basierend auf nur zwei Parametern (Komponentenverhältnis und Nervendichte), mit der gleichen Wahrscheinlichkeit wie mit der Benutzung der gesamten Parameterliste dieser Studie zu erkennen. Derzeit gibt es also eine generelle Notwendigkeit, die Bildaufnahmen und die Bildverarbeitung zu vereinheitlichen und zu verbessern, um den subbasalen Nervenplexus als einen, durch ein nicht-invasives, standardisiertes Verfahren ermittelbaren, ophthalmologischen Marker für die frühe diabetische Polyneuropathie bei Patienten mit Diabetes und Prä-Diabetes einsetzen zu können.

5.5 CLSM ALS FRÜHE, NICHTINVASIVE DIAGNOSTIK EINER DIABETISCHEN NEUROPATHIE

Das Auge ist das einzige Organ des menschlichen Körpers, an dem Nerven nicht-invasiv beobachtet werden können [126]. Die Hornhaut und die Netzhaut sind reich an sensorischen Nervenzellen und ihren Axonen. Deswegen sind sie potenzielle Orte für eine nichtinvasive Beurteilung der durch die Neuropathie verursachten Schäden.

Basierend auf dem Nachweis einer Beeinträchtigung der Empfindlichkeit der Hornhaut bei Diabetes mellitus [135] weist eine zunehmende Menge an Daten darauf hin, dass eine Verringerung der Nervenfaserdichte und andere morphologische Veränderungen des subbasalen Nervenplexus in der Hornhaut nützlich für die Beurteilung der diabetischen Polyneuropathie sein können. Bei Diabetes mellitus wurden Mängel in allen Schichten der Hornhaut festgestellt, welche die Hornhautdicke, die Zellmorphologie und die Basalmembran betreffen [136, 137]. Diese Veränderungen haben wiederum Auswirkungen auf andere Parameter wie Tränensekretion, Zelldichte und epitheliale Instabilität.

Mithilfe histo- oder immunochemischer Methoden unter Nutzung von Licht- oder Elektronenmikroskopen bilden ex vivo Studien den Ursprung in der Geschichte der Erforschung der Mikromorphologie kornealer Nerven. Die erste ex vivo Bildgebung der subbasalen Nervenplexus Strukturen wurde 1982 durch Schimmelpfennig präsentiert [126]. Durch eine Gold-Chlorid-Imprägnierung konnten Nervenfasern innerhalb der

epithelialen Zellschicht, welche durch aufgereichte Fasern und gelegentlich kurze Verzweigungen überbrückt wurden, dargestellt werden [126]. Erste in vivo Studien, in denen ein konfokales Mikroskop genutzt wurde, resultierten in deskriptiven Aussagen über die Anzahl der Hauptnervenzweige in der gesunden und pathologischen Kornea [127, 128]. Die Technik der In-vivo-Mikroskopie hat in den letzten Jahren die Prüfung der menschlichen Hornhaut erleichtert und machte es zu dem einzigen Organ im Körper, in dem Nerven direkt und nichtinvasiv beobachtet werden können. Diese hoch auflösende Methode hat neue Einblicke in die Hornhautnervenmorphologie und -dichte, in normalen und pathologischen Bedingungen versehen mit besonderem Schwerpunkt auf den subbasalen Nervenplexus, geboten [119, 129-133]. Darüber hinaus ermöglicht dieses bildgebende Verfahren mehrere Untersuchungen desselben Hornhautareals im Verlauf [73, 134-137].

Die Umsetzung der konfokalen In-vivo-Mikroskopie der Hornhaut hat deutliche Veränderungen der Hornhautnerven bei Diabetikern gezeigt. Der erste Bericht zur konfokalen In-vivo-Mikroskopie an Diabetes-Patienten war von Rosenberg et al. [138]. Dabei wurden Diabetespatienten mit verschiedenen Neuropathiegraden untersucht. Die Studie beleuchtete die Morphologie des subbasalen Nervenplexus und die Hornhautsensibilität bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 näher. Unter Verwendung eines Tandem-konfokalen Mikroskops zeigten die Autoren eine signifikante Reduktion der Dichte des subbasalen Nervenplexus bei Diabetikern mit Polyneuropathie. Auch bei Diabetikern ohne Anzeichen einer Polyneuropathie gab es Veränderungen in der Morphologie des subbasalen Nervenplexus. Malik et al. [139] erhielten in ihren Untersuchungen eine statistisch signifikante Verringerung der Nervenfasernzahl des subbasalen Nervenplexus der Hornhaut bei Diabetes-Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen mit einer Tendenz für eine höhere Reduktion der Nervenfasernzahl bei zunehmender Schwere der peripheren diabetischen Neuropathie. In derselben Studie wurde auch über eine signifikante Reduktion der Nervenfaserverzweigungsdichte im subbasalen Nervenplexus bei Diabetes-Patienten berichtet. Daraus wurde eine Verringerung der Regenerationsfähigkeit des subbasalen Nervenplexus mit Fortschreiten der Neuropathie gefolgert.

Es folgten eine Reihe von Studien, die einen Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und morphologischen Defiziten der Hornhautnerven mit der nichtinvasiven konfokalen Mikroskopie belegt haben [118, 122, 140-144]. Im Vergleich zu Patienten ohne Diabetes mellitus haben die Menge und die Verzweigungen der Hornhautnerven eine

Reduktion gezeigt, während die Tortuositas eine Zunahme aufwies. Die Autoren vermuteten, dass die Zunahme der Tortuositas einen morphologischen Marker der Nervenregeneration [122] darstellen könnte. Diese Ergebnisse wurden von einer anderen Gruppe [140] bestätigt. Außerdem untersuchte diese Gruppe den subbasalen Nervenplexus bei Diabetikern Typ 2 in Bezug auf die diabetische Retinopathie. Die Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede bezüglich der Morphologie des subbasalen Nervenplexus (Nervenfasernlänge, totale Nervenfaserverzweigungen, Grad der Tortuositas) bei Patienten mit proliferativer diabetischer Retinopathie im Vergleich zur nicht-proliferativen Gruppe. In der vorliegenden Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede im NSS oder NDS zwischen den Untergruppen mit und ohne diabetische Retinopathie festgestellt werden (Abbildung 18-19). Dies verdeutlichen die vergleichbaren mikromorphologischen Parameter mit Ausnahme der Komponentapixel. Beide Gruppen zeigten eine signifikante Abnahme der subbasalen Nervenplexus-Strukturen im Vergleich zur Kontrollgruppe

Eine signifikante Abnahme der Nervenfaserdichte und -länge, sowie der Verzweigungsdichte wurde durch einige Gruppen publiziert [121, 141]. Dabei gab es jedoch Unterschiede in den verwendeten Mikroskopen und in der Bildverarbeitung. Tavakoli et al. [121] analysierten drei Hauptparameter in Spaltlampen-konfokal-mikroskopischen Bildern: Nervenfaserdichte, Nervenverzweigungsdichte (beide durch im Mikroskop vorhandene Software ermittelt) und Nervenfasernlänge (Scion Image). Messmer et al. [141] führten eine Laser-scanning konfokale Mikroskopie durch und untersuchten die Anzahl der Hauptnerven und Nervenverzweigungen (manuelle Zählung), Länge der Nervenfasern (Image J) und graduierten die Nerventortuositas basierend auf der Oliveira-Soto-Skalierung [119]. Im selben Jahr zeigten auch Tavakoli et al. die Quantifizierung der Nervenfasertortuositas bei idiopathischer Small-Fiber-Neuropathie mithilfe der MATLAB-Funktion [121]. Aufgrund der verschiedenen Bildtechniken und Analyseverfahren erhielten diese Gruppen folgende Ergebnisse in den Kontrollgruppen [121, 141]: Nervenfaserdichte 45.6 vs. 23.3 no/mm², Nervenfasernlänge 11.21 vs. 16.1 mm/mm² und Nervenverzweigungsdichte 25.38 vs. 30.6 no/mm². Dies zeigt einmal mehr, dass für eine Diagnostikmethode ein einheitliches Verfahren mit einheitlichen Maßzahlen, sowohl in der Bildtechnik als auch in der Analyse, vonnöten ist.

Weitere Studien wendeten die In-vivo-CLSM an einer Gruppe von Diabetes-Patienten mit strenger Diät, Bewegung und unter medikamentöser Behandlung an. Nach 25 Monaten gab es eine signifikante Verbesserung der Nervenfaserdichte der Hornhaut, die

positiv mit der Verbesserung der HbA1c-Werte korrelierte. In einer anderen Studie unterzogen sich Diabetes-Patienten einer gleichzeitigen Pankreas- und Nierentransplantation [145]. Diese wurden mittels In-vivo-CLSM prä- und postoperativ untersucht. Sechs Monate nach der Operation hatte sich die Nervenfasernlänge in Bezug auf die präoperativen Werte deutlich erholt. So zeigt sich, dass die In-vivo-CLSM nicht nur für eine frühzeitige Diagnostik sinnvoll ist, sondern auch eine Progression und Regression der diabetischen Polyneuropathie dokumentieren und damit überwachen kann.

Weitere Autoren beschrieben die Anatomie des subbasalen Nervenplexus inklusive der wirbelartigen Muster [129]. Patel und McGhee stellten dynamische Veränderungen in der Anatomie des subbasalen Nervenplexus fest [136] und führten 2- und 3-dimensionale Rekonstruktionen des subepithelialen Nervenplexus aus [131, 146, 147]. Es richten hierunter allerdings nur wenige Studien ihren Blick auf die Beziehung zwischen der Morphologie des subbasalen Nervenplexus und der diabetischen Retinopathie [141, 148]. In dieser Studie zeigten alle Patienten, mit oder ohne diabetischer Retinopathie, signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Als Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten Messmer et al. keine signifikanten Unterschiede in der Hornhautsensibilität zwischen NDR und Kontrollgruppe finden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die konfokale In-vivo-Laser-Scanning-Mikroskopie stellt eine objektive und sensitive Methode zur quantitativen Erfassung der Morphologie des Nervensystems der diabetischen Neuropathie dar. Die Basis hierfür bildet die nichtinvasive Erfassung und Quantifizierung von Aufnahmen des subbasalen Nervenplexus. Diese Tatsache wurde bereits mehrfach in tierexperimentellen und humanen Studien publiziert und wird im Rahmen dieser Arbeit an einem dezidierten Patientenkollektiv mit einer diabetischen Neuropathie bestätigt. Erstmals wurden manifestierte Alterationen bei Patienten mit diabetischer Neuropathie und diabetischer Retinopathie in Zusammenhang mit dem HbA1c und den neurodiabetischen Befunden untersucht. Zusammenfassend sind die in der Arbeit im Detail diskutierten Ergebnisse der Multivarianzanalyse in Abbildung 25 dargestellt. Dabei entspricht die Breite der Pfeile der Stärke der Korrelation. Die Nervenfaserdichte ist am stärksten vom HbA1c und der Neuropathie abhängig. Die Korrelationen zwischen der Nervenfaserdichte und der diabetischen Retinopathie sowie zwischen der diabetischen Neuropathie und der diabetischen Retinopathie waren nur gering ausgeprägt.

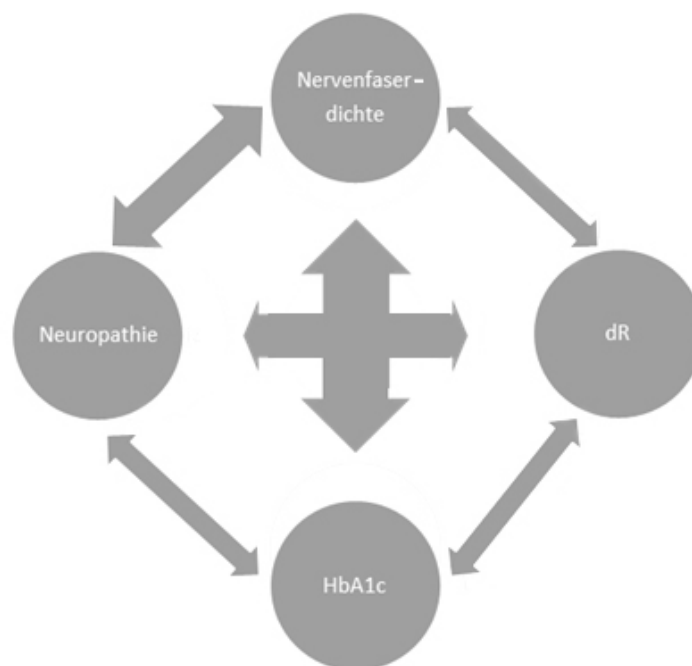


ABBILDUNG 25: ERGEBNIS DER MULTIVARIANZANALYSE

Die bei der Studienkonzeption gestellten Fragen hinsichtlich einer möglichen Rolle der Nutzung des subbasalen Nervenplexus zur Stadieneinteilung der diabetischen Neuropathie und nach dem Auffinden von Korrelationen zwischen diabetischer Retinopathie, Neuropathie sowie der Morphologie des subbasalen Nervenplexus können gegenwärtig nur eingeschränkt beantwortet werden. Dies hat vor allem methodische Gründe. Die Quantifizierung des subbasalen Nervenplexus zur Stadieneinteilung einer diabetischen Neuropathie könnte jedoch in Zukunft eine große Rolle spielen, vorausgesetzt, dass Aufnahme- und Auswertungsstrategien standardisiert werden und später in Form einer Leitlinie zur Verfügung stehen. Diese Problematik adressierend, werden gegenwärtig im Rahmen einer multizentrischen Studie Fragen zur Reproduzierbarkeit und Sensitivität der Methode für verschiedene Krankheitsbilder und Bildaufnahmestrategien untersucht.

Hinsichtlich einer Überführung der Methode in die klinische Routine besteht neben der statistisch soliden Verifizierung des Ansatzes für verschiedene Krankheitsbilder auch ein deutlicher Handlungsbedarf bezüglich der Standardisierung der Auswertungsmethodik. Nur so könnte sichergestellt werden, dass die ermittelten Daten des kornealen Nervenplexus als Surrogatparameter einer diabetischen Neuropathie und gegebenenfalls, auch einer diabetischen Retinopathie zu werten sind.

Trotz des angesprochenen Bedarfs an methodischen Weiterentwicklungen besitzt die In-vivo-Mikroskopie des subbasalen Nervenplexus der Hornhaut ein erhebliches Potential als Surrogatparameter einer diabetischen Neuropathie, objektiv und nichtinvasiv eine neuronale Beteiligung bei Diabetespatienten zu erfassen.

Aufgrund der inzwischen zahlreich vorhandenen Publikationen zu diesem Thema besteht die Hoffnung, dass der Surrogatparameter der kornealen Nervenfaserdichte genutzt werden kann, um neue Studien zur Prophylaxe und vielleicht sogar zur Therapie der diabetischen Neuropathie anzuregen.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Diabetesgesellschaft, D., *Evidenzbasierte Leitlinien*. 2004.
 2. Alberti K, Zimmet P. *Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation*. Diabet Med, 1998. **15**(7): p. 539-53.
 3. Johnson D, Palumbo P, Chu C. *Diabetic ketoacidosis in a community-based population*. Mayo Clin Proc, 1980. **55**(2): p. 83-8.
 4. Martin S. *Pathogenese und Immuntherapie des Diabetes mellitus Typ 1*. Diabetes und Stoffwechsel, 1998. **7**: p. 17-24.
 5. Barnett A, Eff C, Leslie R, Pyke D. *Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs*. Diabetologia, 1981. **20**(2): p. 87-93.
 6. Newman B, Selby J, King M, Slemenda C, Fabsitz R, Friedman G. *Concordance for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in male twins*. Diabetologia, 1987. **30**(10): p. 763-8.
 7. Cederholm J, Wibell L. *Evaluation of insulin release and relative peripheral resistance with use of the oral glucose tolerance test: a study in subjects with normoglycaemia, glucose intolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus*. Scand J Clin Lab Invest, 1985. **45**(8): p. 741-51.
 8. Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Widén E, Schalin C, Groop L. *Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus*. N Engl J Med, 1989. **321**(6): p. 337-43.
 9. Martin B, Warram J, Krolewski A, Bergman R, Soeldner J, Kahn C. *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.
 10. Lindström T, Arnqvist H, Ludvigsson J, von Schenck H. *C-peptide profiles in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus before and during insulin treatment*. Acta Endocrinol (Copenh), 1992. **126**(6): p. 477-83.
 11. Polonsky K, Sturis J, Bell G. *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.
 12. Lillioja S, Mott D, Spraul M, Ferraro R, Foley J, Ravussin E, Knowler W, Bennett P, Bogardus C. *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.
 13. Zhang Y, Wat N, Stratton I, Warren-Perry M, Orho M, Groop L, Turner R. *UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and beta 3-adrenergic-receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations. UK Prospective Diabetes Study*. Diabetologia, 1996. **39**(12): p. 1505-11.
-

14. Banerji M, Lebovitz H. *Insulin-sensitive and insulin-resistant variants in NIDDM*. Diabetes, 1989. **38**(6): p. 784-92.
 15. Rett K, Wicklmayr M, Standl E. *The metabolic syndrome. Pathophysiologic causes, diagnosis, therapy*. Wien Klin Wochenschr, 1994. **106**(24): p. 750-7.
 16. Carey V, Walters E, Colditz G, Solomon C, Willett W, Rosner B, Speizer F, Manson J. *Body fat distribution and risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in women. The Nurses' Health Study*. Am J Epidemiol, 1997. **145**(7): p. 614-9.
 17. DeFronzo R, Ferrannini E. *Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease*. Diabetes Care, 1991. **14**(3): p. 173-94.
 18. Kissebah A, Vydelingum N, Murray R, Evans D, Hartz A, Kalkhoff R, Adams P. *Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity*. J Clin Endocrinol Metab, 1982. **54**(2): p. 254-60.
 19. Morris R, Rimm D, Hartz A, Kalkhoff R, Rimm A. *Obesity and heredity in the etiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus in 32,662 adult white women*. Am J Epidemiol, 1989. **130**(1): p. 112-21.
 20. Reaven, G.M., *Role of insulin resistance in the pathophysiology of non-insulin dependent diabetes mellitus*. Diabetes Metab Rev, 1993. **9 Suppl 1**: p. 5S-12S.
 21. Standl E. *Hyperinsulinemia and atherosclerosis*. Clin Invest Med, 1995. **18**(4): p. 261-6.
 22. Kapellen T, Böttner A, Galler A, Raile K, Nietzsche U, Kiess W. *Treatment of adolescents with type 2 diabetes*. Klin Padiatr, 2004. **216**(2): p. 57-61.
 23. Awa W, Boehm B, Kapellen T, Rami B, Rupprath P, Marg W, Becker M, Holl R; DPV-Wiss Study Group and the German Competence Network Diabetes Mellitus. *HLA-DR genotypes influence age at disease onset in children and juveniles with type 1 diabetes mellitus*. Eur J Endocrinol, 2010. **163**(1): p. 97-104.
 24. Alberti G, Zimmet P, Shaw J, Bloomgarden Z, Kaufman F, Silink M; Consensus Workshop Group. *Type 2 diabetes in the young: the evolving epidemic: the international diabetes federation consensus workshop*. Diabetes Care, 2004. **27**(7): p. 1798-811.
 25. Rathmann W. *Pressekonferenz zur 46. Jahrestagung der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG)*, 2011.
 26. Whiting D, Guariguata L, Weil C, Shaw J. *IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030*. Diabetes Res Clin Pract, 2011. **94**(3): p. 311-21.
 27. Herold, G., *Innere Medizin*. Herold, Gerd, 2012, p.700-25.
 28. American Diabetes Association, American Academy of Neurology. *Report and recommendations of the San Antonio conference on diabetic neuropathy. Consensus statement*. Diabetes, 1988. **37**(7): p. 1000-4.
 29. Thomas P. *Metabolic neuropathy*. J R Coll Physicians Lond, 1973. **7**(2): p. 154-60.
-

30. Sima A, Thomas P, Ishii D, Vinik A. *Diabetic neuropathies*. Diabetologia, 1997. **40 Suppl 3**: p. B74-7.
31. Shaw J. *Epidemiology of diabetic neuropathy*, In: Gries F, Cameron N, Low P, Ziegler D, eds. Textbook of Diabetic Neuropathy. Thieme, 2003, p. 64-82.
32. Young M, Boulton A, MacLeod A, Williams D, Sonksen P. *A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population*. Diabetologia, 1993. **36**(2): p. 150-4.
33. Benbow S, Wallymahmed M, MacFarlane I. *Diabetic peripheral neuropathy and quality of life*. QJM, 1998. **91**(11): p. 733-7.
34. Forsblom C, Sane T, Groop P, Tötterman K, Kallio M, Saloranta C, Laasonen L, Summanen P, Lepäntalo M, Laatikainen L, Matikainen E, Teppo A, Koskimies S, Groop L. *Risk factors for mortality in Type II (non-insulin-dependent) diabetes: evidence of a role for neuropathy and a protective effect of HLA-DR4*. Diabetologia, 1998. **41**(11): p. 1253-62.
35. McNeely M, Boyko E, Ahroni J, Stensel V, Reiber G, Smith D, Pecoraro R. *The independent contributions of diabetic neuropathy and vasculopathy in foot ulceration. How great are the risks?* Diabetes Care, 1995. **18**(2): p. 216-9.
36. Pirart J, Lauvaux J, Rey W. *Blood sugar and diabetic complications*. N Engl J Med, 1978. **298**(20): p. 1149.
37. Tomlinson D, Gardiner N. *Glucose neurotoxicity*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(1): p. 36-45.
38. Figueroa-Romero C, Sadidi M, Feldman E. *Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy*. Rev Endocr Metab Disord, 2008. **9**(4): p. 301-14.
39. Cameron N, Cotter M. *Pro-inflammatory mechanisms in diabetic neuropathy: focus on the nuclear factor kappa B pathway*. Curr Drug Targets, 2008. **9**(1): p. 60-7.
40. Reichel G, Neundörfer B. *Pathogenese und Therapie der peripheren diabetischen Polyneuropathien*. Deutsches Ärzteblatt 93, 1996. **15**: p. A-963-A967.
41. Ziegler D. *Pathogenese der Diabetischen Neuropathie*. Diabetes und Stoffwechsel, 1998. **7**: p. 251-266.
42. Skundric D, Lisak R. *Role of neuropoietic cytokines in development and progression of diabetic polyneuropathy: from glucose metabolism to neurodegeneration*. Exp Diabetes Res, 2003. **4**(4): p. 303-12.
43. Neundörfer B, Ziegler D. *Derzeit diskutierte pathogenetische Mechanismen der diabetischen Neuropathie*. Evidenzbasierte Leitlinie DDG; Diagnostik, Therapie und Verlaufskontrolle der Neuropathie bei Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2, 2004.
44. Abbott C, Carrington A, Ashe H, Bath S, Every L, Griffiths J, Hann A, Hussein A, Jackson N, Johnson K, Ryder C, Torkington R, Van Ross E, Whalley A, Widdows P, Williamson S, Boulton A; North-West Diabetes Foot Care Study. *The North-West Diabetes Foot Care Study: incidence of, and risk factors for, new diabetic foot ulceration in a community-based patient cohort*. Diabet Med, 2002. **19**(5): p. 377-84.

45. Carrington A, Shaw J, Van Schie C, Abbott C, Vileikyte L, Boulton A. *Can motor nerve conduction velocity predict foot problems in diabetic subjects over a 6-year outcome period?* Diabetes Care, 2002. **25**(11): p. 2010-5.
 46. *Standards of medical care in diabetes.* Diabetes Care, 2004. **27 Suppl 1**: p. 15-35.
 47. Meijer J, van Sonderen E, Blaauwweikel E, Smit A, Groothoff J, Eisma W, Links T. *Diabetic neuropathy examination: a hierarchical scoring system to diagnose distal polyneuropathy in diabetes.* Diabetes Care, 2000. **23**(6): p. 750-3.
 48. Hiltz M, Axelrod F, Hermann K, Haertl U, Duetsch M, Neundörfer B. *Normative values of vibratory perception in 530 children, juveniles and adults aged 3-79 years.* J Neurol Sci, 1998. **159**(2): p. 219-25.
 49. Claus D, Carvalho V, Neundörfer B, Blaise J. *Perception of vibration. Normal findings and methodologic aspects.* Nervenarzt, 1988. **59**(3): p. 138-42.
 50. Gin H, Perlemoine C, Rigalleau V. *How to better systematize the diagnosis of neuropathy?* Diabetes Metab, 2006. **32**(4): p. 367-72.
 51. Sachsenweger, M., ed. *Diabetische Retinopathie.* Vol. 2. 2002, Thieme: Duale Reihe Augenheilkunde. 259.
 52. Lang G. *Diabetic retinopathy-staging and laser treatment.* Klin Monbl Augenheilkd, 2005. **222**(1): p. R1-13; quiz R14-8.
 53. Wilkinson C, Ferris F, Klein R, Lee P, Agardh C, Davis M, Dills D, Kampik A, Pararajasegaram R, Verdaguer J; Global Diabetic Retinopathy Project Group. *Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales.* Ophthalmology, 2003. **110**(9): p. 1677-82.
 54. *Microvascular and acute complications in IDDM patients: the EURODIAB IDDM Complications Study.* Diabetologia, 1994. **37**(3): p. 278-85.
 55. Klein R, Klein B, Moss S, Davis M, DeMets D. *The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. IV. Diabetic macular edema.* Ophthalmology, 1984. **91**(12): p. 1464-74.
 56. Deckert T, Poulsen J, Larsen M. *Prognosis of diabetics with diabetes onset before the age of thirty-one. II. Factors influencing the prognosis.* Diabetologia, 1978. **14**(6): p. 371-7.
 57. *Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group.* Lancet, 1998. **352**(9131): p. 837-53.
 58. *The effect of intensive diabetes therapy on measures of autonomic nervous system function in the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT).* Diabetologia, 1998. **41**(4): p. 416-23.
 59. Klein R, Moss S, Klein B, Davis M, DeMets D. *The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. XI. The incidence of macular edema.* Ophthalmology, 1989. **96**(10): p. 1501-10.
-

60. Janka H, Ziegler A, Valsania P, Warram J, Krolewski A. *Impact of blood pressure on diabetic retinopathy*. *Diabetes Metab*, 1989. **15**(5 Pt 2): p. 333-7.
 61. Danne T, Kordonouri O, Enders I, Weber B. *Factors influencing height and weight development in children with diabetes. Results of the Berlin Retinopathy Study*. *Diabetes Care*, 1997. **20**(3): p. 281-5.
 62. Sunness J. *The pregnant woman's eye*. *Surv Ophthalmol*, 1988. **32**(4): p. 219-38.
 63. Klein B, Moss S, Klein R. *Effect of pregnancy on progression of diabetic retinopathy*. *Diabetes Care*, 1990. **13**(1): p. 34-40.
 64. Chew E, Mills J, Metzger B, Remaley N, Jovanovic-Peterson L, Knopp R, Conley M, Rand L, Simpson J, Holmes L, et al. *Metabolic control and progression of retinopathy. The Diabetes in Early Pregnancy Study. National Institute of Child Health and Human Development Diabetes in Early Pregnancy Study*. *Diabetes Care*, 1995. **18**(5): p. 631-7.
 65. Horvat M, Maclean H, Goldberg L, Crock G. *Diabetic retinopathy in pregnancy: a 12-year prospective survey*. *Br J Ophthalmol*, 1980. **64**(6): p. 398-403.
 66. Maser R, Usher D, Becker D, Drash A, Kuller L, Orchard T. *Lipoprotein(a) concentration shows little relationship to IDDM complications in the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study cohort*. *Diabetes Care*, 1993. **16**(5): p. 755-8.
 67. Chew E, Klein M, Ferris F, Remaley N, Murphy R, Chantry K, Hoogwerf B, Miller D. *Association of elevated serum lipid levels with retinal hard exudate in diabetic retinopathy. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) Report 22*. *Arch Ophthalmol*, 1996. **114**(9): p. 1079-84.
 68. Davis M, Fisher M, Gangnon R, Barton F, Aiello L, Chew E, Ferris F, Knatterud G. *Risk factors for high-risk proliferative diabetic retinopathy and severe visual loss: Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Report #18*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1998. **39**(2): p. 233-52.
 69. Lyons T, Jenkins A, Zheng D, Lackland D, McGee D, Garvey W, Klein R. *Diabetic retinopathy and serum lipoprotein subclasses in the DCCT/EDIC cohort*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004. **45**(3): p. 910-8.
 70. Miki E, Lu M, Lee E, Keen H, Bennett P, Russell D. *The incidence of visual impairment and its determinants in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes*. *Diabetologia*, 2001. **44 Suppl 2**: p. S31-6.
 71. Kanski J. *Klinische Ophthalmologie*. Vol. 7. 2011: Urban & Fischer. p. 171.
 72. Marfurt C, Cox J, Deek S, Dvorscak L. *Anatomy of the human corneal innervation*. *Exp Eye Res*, 2010. **90**(4): p. 478-92.
 73. Darwish T, Brahma A, Efron N, O'Donnell C. *Subbasal nerve regeneration after LASEK measured by confocal microscopy*. *J Refract Surg*, 2007. **23**(7): p. 709-15.
 74. Goldmann H. *Spaltlampenphotographie und -photometrie*. *Ophthalmologica*, 1939. **98**: p. 257-70.
-

75. Sheppard C, *The Development of a Modern Microscopy*. Imaging and microscopy. Online im Internet: Url: <https://www.imaging-git.com/science/light-microscopy/confocal-microscopy>, [Stand 3. Nov. 2009].
 76. Minsky M. *Memoir on inventing the confocal Scanning Microscope*. Scanning, 1988. **10**: p. 128-138.
 77. Maurice D. *Cellular membrane activity in the corneal endothelium of the intact eye*. Experientia, 1968. **24**(11): p. 1094-5.
 78. Maurice D. *A scanning slit optical microscope*. Investigative Ophthalmology, 1974: p. 1033-37.
 79. Cavanagh H, Jester J, Essepian J, Shields W, Lemp M. *Confocal microscopy of the living eye*. CLAO J, 1990. **16**(1): p. 65-73.
 80. Masters B, Thaer A. *Real-time scanning slit confocal microscopy of the in vivo human cornea*. Appl Opt, 1994. **33**(4): p. 695-701.
 81. Stave J, Guthoff R. *Imaging the tear film and in vivo cornea. Initial results with a modified confocal laser scanning ophthalmoscope*. Ophthalmologe, 1998. **95**(2): p. 104-9.
 82. Stave J, Zinser G, Grümmer G, Guthoff R. *Modified Heidelberg Retinal Tomograph HRT. Initial results of in vivo presentation of corneal structures*. Ophthalmologe, 2002. **99**(4): p. 276-80.
 83. Hornova J, Kuntz Navarro J, Prasad A, Freitas D, Nunes C. *Correlation of Disc Damage Likelihood Scale, visual field, and Heidelberg Retina Tomograph II in patients with glaucoma*. Eur J Ophthalmol, 2008. **18**(5): p. 739-47.
 84. Borque E, Ferreras A, Polo V, Larrosa J, Alias E, Honrubia F. *Evaluation of four new discriminant functions for HRT II in glaucoma diagnosis*. Arch Soc Esp Oftalmol, 2008. **83**(6): p. 349-56.
 85. Guthoff R, Klink T, Schlunck G, Grehn F. *In vivo confocal microscopy of failing and functioning filtering blebs: Results and clinical correlations*. J Glaucoma, 2006. **15**(6): p. 552-8.
 86. Wisconsin-Madison, U.o., F.P.R. Center and UW-FPRC, *Modified 7-Standard Field Color Fundus Photography Procedure, adapted from the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS) and the Age-Related Eye Disease Study (AREDS)*. Manuals of Operations, 2000.
 87. Winter K. *Characteristic quantities for the quantification of CLSM images of the subbasal nerve plexus*. Biomed Tech 2010. **55**: p. 252-54.
 88. MacDonald B, Cockerell O, Sander J, Shorvon S. *The incidence and lifetime prevalence of neurological disorders in a prospective community-based study in the UK*. Brain, 2000. **123** (Pt 4): p. 665-76.
 89. Pirart J. *Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973 (3rd and last part) (author's transl)*. Diabete Metab, 1977. **3**(4): p. 245-56.
-

90. Singleton J, Smith A, Russell J, Feldman E. *Microvascular complications of impaired glucose tolerance*. Diabetes, 2003. **52**(12): p. 2867-73.
 91. Novella S, Inzucchi S, Goldstein J. *The frequency of undiagnosed diabetes and impaired glucose tolerance in patients with idiopathic sensory neuropathy*. Muscle Nerve, 2001. **24**(9): p. 1229-31.
 92. Sumner C, Sheth S, Griffin J, Cornblath D, Polydefkis M. *The spectrum of neuropathy in diabetes and impaired glucose tolerance*. Neurology, 2003. **60**(1): p. 108-11.
 93. Papanas N, Vinik A, Ziegler D. *Neuropathy in prediabetes: does the clock start ticking early?* Nat Rev Endocrinol, 2011. **7**(11): p. 682-90.
 94. Navarro X, Kennedy W, Aeppli D, Sutherland D. *Neuropathy and mortality in diabetes: influence of pancreas transplantation*. Muscle Nerve, 1996. **19**(8): p. 1009-16.
 95. Bild D, Selby J, Sinnock P, Browner W, Braveman P, Showstack J. *Lower-extremity amputation in people with diabetes*. Epidemiology and prevention. Diabetes Care, 1989. **12**(1): p. 24-31.
 96. Trautner C, Haastert B, Giani G, Berger M. *Incidence of lower limb amputations and diabetes*. Diabetes Care, 1996. **19**(9): p. 1006-9.
 97. Siitonen O, Niskanen L, Laakso M, Siitonen J, Pyörälä K. *Lower-extremity amputations in diabetic and nondiabetic patients. A population-based study in eastern Finland*. Diabetes Care, 1993. **16**(1): p. 16-20.
 98. Most R, Sinnock P. *The epidemiology of lower extremity amputations in diabetic individuals*. Diabetes Care, 1983. **6**(1): p. 87-91.
 99. Trautner B. *Diabetic foot*. Hautarzt, 1997. **48**(4): p. 278-90; quiz 289.
 100. *Dämpfer Stimmgabel Rydel-Seiffer*. Online im Internet: URL: <https://www.babin-ski.de/Diagnostik/stimmgabeln/Daempfer-links-fuer-Stimmgabel::1306.html> [Stand 13.05.2018].
 101. Morbach S. *Evidenzbasierte Praxisleitlinien: Diabetisches Fuß-Syndrom*. Diabetology, 2008. **Suppl 3** p. 175-80.
 102. DE, d. *Deutscher Gesundheitsbericht, Diabetes 2012, Die Bestandsaufnahme*. 2012.
 103. Hagen C. *GBE kompakt*, A.f.E.u. Robert Koch-Institut und Gesundheitsberichterstattung. 2011.
 104. Liebl A, Spannheimer A, Reitberger U, Görtz A. *Costs of long-term complications in type 2 diabetes patients in Germany. Results of the CODE-2 Study*. Med Klin (Munich), 2002. **97**(12): p. 713-9.
 105. Ziegler D, Papanas N, Zhivov A, Allgeier S, Winter K, Ziegler I, Brüggemann J, Strom A, Peschel S, Köhler B, Stachs O, Guthoff RF, Roden M; German Diabetes Study (GDS) Group. *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.
-

106. Klein B, Davis M, Segal P, Long J, Harris W, Haug G, Magli Y, Syrjala S. *Diabetic retinopathy. Assessment of severity and progression*. Ophthalmology, 1984. **91**(1): p. 10-7.
 107. Shahidi A, Sampson G, Pritchard N, Edwards K, Russell A, Malik R, Efron N. *Exploring retinal and functional markers of diabetic neuropathy*. Clin Exp Optom, 2010. **93**(5): p. 309-23.
 108. *Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38*. UK Prospective Diabetes Study Group. BMJ, 1998. **317**(7160): p. 703-13.
 109. Mimura T, Funatsu H, Uchigata Y, Kitano S, Shimizu E, Noma H, Amano S, Araie M, Iwamoto Y, Hori S. *Development and progression of diabetic retinopathy in patients with Type 1 diabetes who are positive for GAD autoantibody*. Diabet Med, 2004. **21**(6): p. 559-62.
 110. Bresnick G. *Diabetic retinopathy viewed as a neurosensory disorder*. Arch Ophthalmol, 1986. **104**(7): p. 989-90.
 111. Barber A, Lieth E, Khin S, Antonetti D, Buchanan A, Gardner T. *Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin*. J Clin Invest, 1998. **102**(4): p. 783-91.
 112. Takahashi H, Goto T, Shoji T, Tanito M, Park M, Chihara E. *Diabetes-associated retinal nerve fiber damage evaluated with scanning laser polarimetry*. Am J Ophthalmol, 2006. **142**(1): p. 88-94.
 113. Cabrera DeBuc D, Somfai G. *Early detection of retinal thickness changes in diabetes using Optical Coherence Tomography*. Med Sci Monit, 2010. **16**(3): p. MT15-21.
 114. Sugimoto M, Sasoh M, Ido M, Wakitani Y, Takahashi C, Uji Y. *Detection of early diabetic change with optical coherence tomography in type 2 diabetes mellitus patients without retinopathy*. Ophthalmologica, 2005. **219**(6): p. 379-85.
 115. Oshitari T, Hanawa K, Adachi-Usami E. *Changes of macular and RNFL thicknesses measured by Stratus OCT in patients with early stage diabetes*. Eye (Lond), 2009. **23**(4): p. 884-9.
 116. Karlberg C, Falk C, Green A, Sjølie A, Grauslund J. *Proliferative retinopathy predicts nephropathy: a 25-year follow-up study of type 1 diabetic patients*. Acta Diabetol, 2012. **49**(4): p. 263-8.
 117. Sasongko M, Wong T, Donaghue K, Cheung N, Jenkins A, Benitez-Aguirre P, Wang J. *Retinal arteriolar tortuosity is associated with retinopathy and early kidney dysfunction in type 1 diabetes*. Am J Ophthalmol, 2012. **153**(1): p. 176-83 e1.
 118. Patel D, McGhee C. *In vivo confocal microscopy of human corneal nerves in health, in ocular and systemic disease, and following corneal surgery: a review*. Br J Ophthalmol, 2009. **93**(7): p. 853-60.
 119. Oliveira-Soto L, Efron N. *Morphology of corneal nerves using confocal microscopy*. Cornea, 2001. **20**(4): p. 374-84.
-

120. Erie J, McLaren J, Hodge D, Bourne W. *Recovery of corneal subbasal nerve density after PRK and LASIK*. Am J Ophthalmol, 2005. **140**(6): p. 1059-1064.
 121. Tavakoli M, Quattrini C, Abbott C, Kallinikos P, Marshall A, Finnigan J, Morgan P, Efron N, Boulton AJ, Malik R. *Corneal confocal microscopy: a novel noninvasive test to diagnose and stratify the severity of human diabetic neuropathy*. Diabetes Care, 2010. **33**(8): p. 1792-7.
 122. Kallinikos P, Berhanu M, O'Donnell C, Boulton A, Efron N, Malik R. *Corneal nerve tortuosity in diabetic patients with neuropathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(2): p. 418-22.
 123. Dabbah M, Graham J, Petropoulos I, Tavakoli M, Malik R. *Automatic analysis of diabetic peripheral neuropathy using multi-scale quantitative morphology of nerve fibres in corneal confocal microscopy imaging*. Med Image Anal, 2011. **15**(5): p. 738-47.
 124. Holmes T, Pellegrini M, Miller C, Epplin-Zapf T, Larkin S, Luccarelli S, Staurenghi G. *Automated software analysis of corneal micrographs for peripheral neuropathy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010. **51**(9): p. 4480-91.
 125. Scarpa F, Grisan E, Ruggeri A. *Automatic recognition of corneal nerve structures in images from confocal microscopy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(11): p. 4801-7.
 126. Schimmelpfennig B. *Nerve structures in human central corneal epithelium*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1982. **218**(1): p. 14-20.
 127. Linna T, Tervo T. *Real-time confocal microscopic observations on human corneal nerves and wound healing after excimer laser photorefractive keratectomy*. Curr Eye Res, 1997. **16**(7): p. 640-9.
 128. Masters B, Thaer A. *In vivo human corneal confocal microscopy of identical fields of subepithelial nerve plexus, basal epithelial, and wing cells at different times*. Microsc Res Tech, 1994. **29**(5): p. 350-6.
 129. Patel D, McGhee C. *Mapping of the normal human corneal sub-Basal nerve plexus by in vivo laser scanning confocal microscopy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005. **46**(12): p. 4485-8.
 130. Villani E, Galimberti D, Viola F, Mapelli C, Del Papa N, Ratiglia R. *Corneal involvement in rheumatoid arthritis: an in vivo confocal study*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(2): p. 560-4.
 131. Zhivov A, Stachs O, Stave J, Guthoff R. *In vivo three-dimensional confocal laser scanning microscopy of corneal surface and epithelium*. Br J Ophthalmol, 2009. **93**(5): p. 667-72.
 132. Zhivov A, Guthoff R, Stachs O. *On-line mapping of corneal structures with in vivo laser scanning microscopy*. Klin Monbl Augenheilkd, 2009. **226**(12): p. 980-3.
 133. Zhivov A, Guthoff R, Stachs O. *In vivo confocal microscopy of the ocular surface: from bench to bedside and back again*. Br J Ophthalmol, 2010. **94**(12): p. 1557-8.
 134. Darwish T, Brahma A, Efron N, O'Donnell C. *Subbasal nerve regeneration after LASEK measured by confocal microscopy*. J Refract Surg, 2007. **23**(7): p. 709-15.
-

135. Darwish T, Brahma A, O'Donnell C, Efron N. *Subbasal nerve fiber regeneration after LASIK and LASEK assessed by noncontact esthesiometry and in vivo confocal microscopy: prospective study*. J Cataract Refract Surg, 2007. **33**(9): p. 1515-21.
 136. Patel D, McGhee C. *In vivo laser scanning confocal microscopy confirms that the human corneal sub-basal nerve plexus is a highly dynamic structure*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(8): p. 3409-12.
 137. Erie J, McLaren J, Patel S. *Confocal microscopy in ophthalmology*. Am J Ophthalmol, 2009. **148**(5): p. 639-46.
 138. Rosenberg M, Tervo T, Immonen I, Müller L, Grönhagen-Riska C, Vesaluoma M. *Corneal structure and sensitivity in type 1 diabetes mellitus*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(10): p. 2915-21.
 139. Malik R, Kallinikos P, Abbott C, van Schie C, Morgan P, Efron N, Boulton A. *Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fibre damage and repair in diabetic patients*. Diabetologia, 2003. **46**(5): p. 683-8.
 140. Mocan M, Durukan I, Irkeç M, Orhan M. *Morphologic alterations of both the stromal and subbasal nerves in the corneas of patients with diabetes*. Cornea, 2006. **25**(7): p. 769-73.
 141. Messmer E, Schmid-Tannwald C, Zapp D, Kampik A. *In vivo confocal microscopy of corneal small fiber damage in diabetes mellitus*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 2010. **248**(9): p. 1307-12.
 142. Quattrini C, Tavakoli M, Jeziorska M, Kallinikos P, Tesfaye S, Finnigan J, Marshall A, Boulton A, Efron N, Malik R. *Surrogate markers of small fiber damage in human diabetic neuropathy*. Diabetes, 2007. **56**(8): p. 2148-54.
 143. De Cillà S, Ranno S, Carini E, Fogagnolo P, Ceresara G, Orzalesi N, Rossetti L. *Corneal subbasal nerves changes in patients with diabetic retinopathy: an in vivo confocal study*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(11): p. 5155-8.
 144. Tavakoli M, Kallinikos P, Iqbal A, Herbert A, Fadavi H, Efron N, Boulton A, Malik R. *Corneal confocal microscopy detects improvement in corneal nerve morphology with an improvement in risk factors for diabetic neuropathy*. Diabet Med, 2011. **28**(10): p. 1261-7.
 145. Mehra S, Tavakoli M, Kallinikos P, Efron N, Boulton A, Augustine T, Malik R. *Corneal confocal microscopy detects early nerve regeneration after pancreas transplantation in patients with type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2007. **30**(10): p. 2608-12.
 146. Zhivov A, Stachs O, Kraak R, Stave J, Guthoff R. *In vivo confocal microscopy of the ocular surface*. Ocul Surf, 2006. **4**(2): p. 81-93.
 147. Pritchard N, Edwards K, Vagenas D, Shahidi AM, Sampson GP, Russell AW, Malik RA, Efron N. *Corneal sensitivity as an ophthalmic marker of diabetic neuropathy*. Optom Vis Sci., 2010. **87**(12): p. 1003-8.
 148. Chang P, Carrel H, Huang J, Wang IJ, Hou Y, Chen W, Wang J, Hu F. *Decreased density of corneal basal epithelium and subbasal corneal nerve bundle changes in patients with diabetic retinopathy*. Am J Ophthalmol, 2006. **142**(3): p. 488-90.
-

149. Franck N, Stary J. *Die Technik wissenschaftlichen Arbeitens. Eine praktische Anleitung*, 13. Auflage, 2006: Schönigh.
150. Deuser N. (2006) *Neurologische Stimmgabel nach Rydel-Seiffer*, Online im Internet: URL: <http://www.med-data.info/datapodosmk/Stimmgabel.pdf> [Stand 2008-05-07].
151. Liniger C, Albeanu A, Bloise D, Assal J. *The tuning fork revisited*. *Diabetic Med*, 1990. **7**: p. 859-64.
152. Ziegler D. *Diabetic Peripheral Neuropathy*. *Textbook of Diabetes*, 2010 Vol. **4**: p. 614-34.
153. Guthoff R, Wienss H, Hahnel C, Wree A. *Epithelial innervation of human cornea: a three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy*. *Cornea*, 2005. **24**(5): p. 608-13.
154. Stachs O, Knappe S, Zhivov A, Kraak R, Stave J, Guthoff R. *Three-dimensional confocal laser scanning microscopy of the corneal nerve structure*. *Klin Monbl Augenheilkd*, 2006. **223**(7): p. 583-8.
155. Falke K, Büttner A, Schittkowski M, Stachs O, Kraak R, Zhivov A, Rolfs A, Guthoff R. *The microstructure of cornea verticillata in Fabry disease and amiodarone-induced keratopathy: a confocal laser-scanning microscopy study*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2009. **247**(4): p. 523-34.
156. Dopplera K, Peyera A, Gobbib C, Fuhra P, Arnold A, Kapposa L, Steck A, Tolnayc M, Frankc S, Renauda S. *Die Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte in der Hautbiopsie*, *Schweiz Arch Neurol Psychiatr*, 2011. **162**(01): p.27-30.
157. Iqbal A, Kallinikos P, Efron N, Boulton A, Malik R. *Corneal nerve morphology: a surrogate marker for human diabetic neuropathy improves with improved glycaemic control*. *Diabetes [Suppl 1]*, 54, 2005. p.871.

VIII. THESEN

1. Die Nervenfaserdichte und -länge des subbasalen Nervenplexus der Cornea sind Surrogatparameter für die diabetische Neuropathie.
2. Die In-vivo konfokale Mikroskopie stellt eine Screeningmethode zur Diagnostik der diabetischen Neuropathie dar.
3. Die In-vivo konfokale Mikroskopie ist für die interdisziplinäre Zusammenarbeit von Diabetologen und Ophthalmologen von großer Bedeutung.
4. Die In-vivo konfokale Mikroskopie ist eine nichtinvasive, rasch durchzuführende Methode, die ihre Alltagstauglichkeit nachgewiesen hat.
5. Vor dem Hintergrund steigender Inzidenz und Prävalenz des Diabetes mellitus, sowohl in Industrie- als auch in Entwicklungsländern, wird die Frühdiagnostik der diabetischen Neuropathie an Bedeutung gewinnen.

IX. LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Sabine Christina Peschel
Geburtsdatum: 24.09.1981
Geburtsort: Cottbus
Anschrift: Turnstraße 7, 03130 Spremberg

Familienstand: ledig

Schul Ausbildung

1988 - 2001 Grunds chule und Gymnasium; Vetschau/Spreewald
Abschluss Abitur

Berufsausbildung

2001 - 2004 Ausbildung zur Augenoptikerin
Abschluss mit der Gesellenprüfung zur Augenoptikerin

Hochschulausbildung

ab Oktober 2004 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
März 2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktika

Februar/März 2005 Krankenpflegedienst Chirurgie Krankenhaus Spremberg
August 2005 Krankenpflegedienst Chirurgie Krankenhaus Spremberg
August/Sept. 2006 Krankenpflegedienst Innere Medizin Krankenhaus Spremberg

Februar/März 2009 Famulatur Augenarztpraxis Vetschau
August/Sept. 2009 Famulatur Chirurgie Krankenhaus Luckau
Februar/März 2010 Famulatur Allgemeinarztpraxis Spremberg
Juli/August 2010 Famulatur Praxis für Psychiatrie/Neurologie Wildau
August/Sept. 2010 Famulatur Allgemeine Chirurgie Lübben

Februar - Juni 2011 PJ Universitätsaugenklinik Rostock
Juni - August 2011 PJ Chirurgie Südstadtklinikum Rostock
August - September 2011 PJ Chirurgie Krankenhaus Bad Doberan
Oktober - Dezember 2011 PJ Universitätsklinikum Rostock Innere Medizin

Approbation

Mai 2012 Abschluss des Medizinstudiums an der Universität Rostock

Berufserfahrung

August 2012 - Juli 2017 Assistenzärztin der Universitätsaugenklinik Rostock
August - Sept. 2017 Assistenzärztin des Carl-Thiem-Klinikums in Cottbus
Oktober 2017 - aktuell Fachärztin im MVZ Spremberg des CTKs Cottbus

Prüfung zur Fachärztin für Augenheilkunde

September 2017

X. VERÖFFENTLICHUNGEN

Peer reviewed journals

1. **Focused Tortuosity Definitions Based on Expert Clinical Assessment of Corneal Subbasal Nerves.** Lagali N, Poletti E, Patel DV, McGhee CN, Hamrah P, Kheirkhah A, Tavakoli M, Petropoulos IN, Malik RA, Utheim TP, Zhivov A, Stachs O, Falke K, Peschel S, Guthoff R, Chao C, Golebiowski B, Stapleton F, Ruggieri A. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2015 Aug;56(9):5102-9. IF:3.427.
2. **Diabetic foot syndrome and corneal subbasal nerve plexus changes in Congolese patients with type 2 diabetes.** Zhivov A, Peschel S, Schober HC, Stachs O, Baltrusch S, Bambi MT, Kilangalanga J, Winter K, Kundt G, Guthoff RF. *PLoS One.* 2015 Mar 26;10(3):e0119842. IF: 3.54.
3. **Mosaicking the subbasal nerve plexus by guided eye movements.** Allgeier S, Maier S, Mikut R, Peschel S, Reichert KM, Stachs O, Köhler B. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014 Aug 26;55(9):6082-9. IF: 3.427.
4. **Early detection of nerve fiber loss by corneal confocal microscopy and skin biopsy in recently diagnosed type 2 diabetes.** Ziegler D, Papanas N, Zhivov A, Allgeier S, Winter K, Ziegler I, Brüggemann J, Strom A, Peschel S, Köhler B, Stachs O, Guthoff RF, Roden M; German Diabetes Study (GDS) Group. *Diabetes.* 2014 Jul;63(7):2454-63. IF: 6.07.
5. **Changes in the micromorphology of the corneal subbasal nerve plexus in patients after plaque brachytherapy.** Zhivov A, Winter K, Peschel S, Stachs O, Wree A, Hildebrandt G, Guthoff R. *Radiat Oncol.* 2013 Jun 7;8:136. IF: 2.83.
6. **Imaging and quantification of subbasal nerve plexus in healthy volunteers and diabetic patients with or without retinopathy.** Zhivov A, Winter K, Hovakimyan M, Peschel S, Harder V, Schober HC, Kundt G, Baltrusch S, Guthoff RF, Stachs O. *PLoS One.* 2013; 8(1):e52157. IF: 3.54.
7. **Quantitative Analysis of Corneal Subbasal Nerve Plexus with in Vivo Confocal Laser Scanning Microscopy.** Zhivov A, Winter K, Peschel S, Guthoff RF, Stachs O, Harder V, Schober HC, Koehler B. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde.* 2011 Dec;228(12):1067-72. IF: 0.04.
8. **Visuelle Analyse zur Früherkennung einer diabetischen Neuropathie/Visual Analysis for an Early Detection of Diabetic Neuropathy.** Röhlig M, Luboschik M, Kundt G, Stachs O, Peschel S, Zhivov A, Guthoff RF, Winter K., Schumann H. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde.* 2014; 231: 1162-1169. IF: 0.04.
9. **Large-Scale Imaging of Corneal Nerve Fibres by Guided Eye Movements.** Köhler B, Allgeier S, Eberle F, Maier S, Peschel S, Reichert KM, O Stachs. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde* 2014, 231(12):1170-1173. IF: 0.04.
10. **Changes in the micromorphology of the corneal subbasal nerve plexus in patients after plaque brachytherapy.** Zhivov A, Winter K, Peschel S, Stachs O, Wree A, Hildebrandt G, Guthoff RF. *Radiation Oncology* 2013; 8: 136. IF: 2.466.

Tagungen

- Sabine Peschel, A. Zhivov, O. Stachs, R.F. Guthoff, Möglichkeiten und Grenzen der klinischen Diagnostik mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie. 64. Tagung der Vereinigung Norddeutscher Augenärzte, 23. - 24.05.2014, Rostock/Warnemünde.
- Sabine Peschel, A. Götze, S. von Keyserlingk, B. Köhler, S. Allgeier, K. Winter, R. F. Guthoff, A. Jünemann, R. Guthoff, D.-C. Fischer, O. Stachs, Optische Kohärenztomographie (OCT) und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) zur Untersuchung der Morphologie der individuellen Netzhautschichten und des kornealen Nervenplexus (SNP) bei Kindern und Jugendlichen mit Diabetes mellitus Typ 1 und chronischer Niereninsuffizienz. 65. Tagung der Vereinigung Norddeutscher Augenärzte, 05.06. - 06.06.2015, Hamburg.
- Sabine Peschel, Andrey Zhivov, Oliver Stachs, Rudolf Guthoff. Veränderungen der Mikromorphologie des subbasalen Nervenplexus der Hornhaut von Patienten nach Brachytherapie, DOG 2011, Berlin.
- Sabine Peschel, Andrey Zhivov, Hans-Christof Schober, Oliver Stachs, Marie Therese Bambi, Ngoy Janvier Kilangalanga, Karsten Winter, Rudolf Guthoff. Diabetisches Fußsyndrom und Veränderungen des subbasalen Nervenplexus bei kongolesischen Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2. DOG 2013, Berlin.
- Aline Götze, Sophie von Keyserlingk, Sabine Peschel, Leokadia Fötisch, Bernd Köhler, Stephan Allgeier, Karsten Winter, Rudolf F. Guthoff, Anselm Jünemann, Rainer Guthoff, Dagmar-Christiane Fischer, Oliver Stachs. Optical coherence tomography and corneal confocal microscopy for evaluation of the individual retinal layers and subbasal corneal nerve plexus in pediatric patients with diabetes type 1 or chronic kidney disease in comparison to age and sex-matched healthy volunteers. DOG 2015, Berlin.

Buchbeitrag

- Entzündliche Augenerkrankungen, <https://books.google.de/books?isbn=3642384196>, Uwe Pleyer, Seiten 3-46, Jan 2014.

XI. EIDESSTÄTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere eidesstattlich durch eigenhändige Unterschrift, 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.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht oder die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Spremberg

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)

XII. DANKSAGUNG

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in jeglicher Hinsicht im Medizinstudium und später im Berufsleben bis hierhin unterstützt haben. Des Weiteren möchte ich herzlich für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation Herrn Prof. Dr. med. R.F. Guthoff, Herrn Prof. Dr. rer. nat. O. Stachs, Herrn Prof. Dr.-Ing. G. Kundt, Herrn Dr. rer. hum. K. Winter, Herrn Dr. med. V. Harder, Herrn Prof. Dr. med. H.-Ch. Schober, Herrn Prof. Dr. med. A. G. M. Jünemann, Herrn PD Dr. med. habil. A. Zhivov, den Kollegen und Patienten der Universitätsaugenklinik sowie des Südstadtklinikums Rostock und meinen Freunden danken. Das letzte Dankeschön ist an Fabian gerichtet, der mich sowohl im Privaten als auch im Beruflichen unterstützt und ergänzt.